UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE AGRICULTURE, ALIMENTATION, BIOLOGIE, ENVIRONNEMENT, SANTE (ABIES)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : ***PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS***

Spécialité : Eco-éthologie

Présentée et soutenue publiquement par

LUCIE DISPAN de FLORAN

Le 2 juillet 2025

Impact des infrastructures linéaires de transport sur la connectivité écologique pour les mammifères terrestres par une approche fonctionnelle

---

Thèse dirigée par **STEPHANE BETOULLE**

JURY

M. Jean-François ARNAUD,	Professeur,	Université de Lille,	**Président**
M.Stéphane BETOULLE**,**	Professeur,	URCA SEBIO,	**Directeur de thèse**
Mme Aude ERNOULT,	Professeure,	Université de Rennes 1,	**Rapportrice**
M. Olivier PAYS-VOLARD,	Professeur,	Université d'Angers,	**Rapporteur**
Mme Sylvie VANPEENE,	Ingénieure - chercheuse,	INRAE,	**Examinatrice**
M. Rémi HELDER,	Ingénieur de recherche,	URCA CERFE,	**Invité**
M. David LESBARRERES**,**	Professor,	Laurentian University,	**Co-encadrant**
M. Eric GUINARD,	Ingénieur de recherche,	Cerema,	**Co-encadrant**

« S’il a traversé, c’est qu’il peut traverser »

R. Delamare (2023)

Avant-propos

La réalisation de ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un contrat CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche) impliquant :

- L'entreprise URANO – 3, rue François Urano, CS 80761 Warcq, 08013 Charleville-Mézières Cedex, France ;
- Le CEntre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne –URCA-CERFE ; 5, rue de la Héronnières, 08240 Boult-aux-Bois, France ;
- L'Unité Mixte de Recherche sur le Stress Environnemental et la BIOsurveillance des milieux aquatiques de l'Université de Reims Champagne-Ardenne – UMR-SEBIO URCA ; UFR SEN, Campus Moulin de la Housse, BP 1030, 51687 Reims cedex 2, France.

Ces travaux répondent au volet environnemental d'un programme de recherche plus large nommé EFACILT (Etude de la FAune sauvage Confrontée aux ILT), porté par l'URCA-CERFE. Ils ont pu être menés grâce au soutien financier et/ou technique de plusieurs organismes publics et privés :



Remerciements

Il m'aura bien fallu quelques longues minutes pour réaliser que la page blanche que j'ai sous les yeux s'intitule « Remerciements ». Et quelques minutes de plus pour comprendre que ces mots seront les derniers que j'écrirai pour cette thèse… achevant ainsi un long roman d'aventure nommé « Ma vie de thésarde, en 3 ans (et plus) » dont j'ai été la principale protagoniste. Mais un bon roman qui finit sur une thèse heureuse doit autant sa force à son héroïne qu'aux personnages secondaires qui l'entourent. C'est pourquoi, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé, de près comme de loin, à la réussite de cette épopée académique.

Tout d'abord, je remercie les financeurs présentés en avant-propos et que je tiens tout de même à citer dans cette rubrique : la DREAL Grand Est, le programme de recherche ITTECOP du Ministère de la Transition Ecologique (MTE) et de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME), l'Office Français de la Biodiversité (OFB), la Fédération Départementale des Chasseurs des Ardennes (FDC 08), les Communautés de Communes des Crêtes Préardennaises et de l'Argonne Ardennaise, le CEREMA, l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA) et le Centre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie (CERFE). Je tiens plus particulièrement à remercier l'Association Nationale Recherche

Technologie (ANRT) et l'entreprise URANO pour m'avoir permis de réaliser une thèse CIFRE. Je remercie vivement Pascal Urano pour le soutien qu'il a apporté à ce projet et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de sa réalisation.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Stéphane Betoulle (et au laboratoire URCA SEBIO) pour avoir accepté d'encadrer cette thèse et pour avoir été très réactif dès que je le sollicitais. J'adresse également de chaleureux remerciements à mes co-encadrants, David Lesbarrères et Eric Guinard, pour leur soutien et leur grande réactivité. Leurs précieux conseils et leurs relectures attentives m'ont permis d'améliorer ma rigueur scientifique ainsi que mon esprit critique tout au long de mes travaux de thèse et de la rédaction de ce manuscrit. Un merci particulier à David pour le temps passé à corriger mon anglais dopé à la syntaxe française. Enfin, je remercie tout spécialement Rémi Helder pour m'avoir offert l'opportunité de me lancer dans cette aventure doctorale, sur un sujet qui m'a beaucoup passionné, et ce dans un cadre idéal. Ces quelques lignes ne sauraient suffire à dire combien je lui suis reconnaissante. Je me contenterai donc de lui adresser ma plus sincère gratitude pour sa bienveillance, son investissement inestimable, son optimisme constant et son soutien à toute épreuve.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse pour leur précieux conseils : Jean-Yves Georges, Marianne Cheveau et Lisa Sanchez.

Je souhaite grandement remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'en faire partie : Aude Ernoult et Olivier Pays-Volard pour en être les rapporteurs ainsi que Jean-François Arnaud et Sylvie Vanpeene pour en être les examinateurs.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à l'ensemble des personnes et structures qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à la réalisation de cette thèse, qu'il s'agisse de la mise en place de la collecte, de la collecte, de l'analyse ou de la valorisation des données. Je pense notamment aux communes bordant l'autoroute A34 et le canal des Ardennes, aux propriétaires, aux chasseurs, à l'appui scientifique de Marina Mergey, de Goéry Valance et de Julian Pichenot ainsi qu'aux partenaires techniques : FDC 08, laboratoire LPL, DIRN, SNCF, VNF, CEREMA, Lycée agricole de Saint-Laurent. Je ne nommerai pas ici individuellement les personnes ayant contribué au sein de ces structures, mais que chacune et chacun sache combien leur aide m'a été précieuse et combien je leur en suis reconnaissante.

Je ne peux, cependant, m'empêcher de citer Aurore Hubert et de la remercier chaleureusement pour le travail considérable qu'elle a mené dans la collecte des échantillons

de tissus (et de fèces de martres, qui n'a pu malheureusement aboutir…), ainsi qu'aux relevés photographiques − mission accomplie non sans quelques péripéties. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi Aurore, une collaboration aussi efficace que conviviale !

Un grand merci aux stagiaires ayant contribué spécifiquement à cette étude (Rose et Maxence), aux services civiques pour leur précieux soutien (Lucille, Simon, Pauline, Anaïs, Léa), ainsi qu'à toutes les personnes de passage au CERFE avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Parce que ce travail s'inscrit dans un projet plus large, porté par toute la formidable équipe du CERFE, il m'est également impossible de ne pas citer toutes les personnes qui la compose et sur qui j'ai eu la chance de pouvoir compter pour mener à bien cette thèse. Un immense merci pour votre aide précieuse sur le terrain, au bureau, et même jusque dans vos lits pour veiller les cages sans relâche : Rémi, Pauline, Maden, Manon, Clémence, Lucille, Rose et Thomas.

Merci à ma famille, à Kevin et aux amis pour tout leur amour, leur patience, leur compréhension et leur soutien. Leur présence et les moments de fête vécus ensemble ont rendu ce parcours plus doux.

Merci à Tiddef (papa) et Laurette pour leurs illustrations et leurs conseils sur la mise en page de ce manuscrit de thèse. Grâce à vous, j'aurais plus de chance de le feuilleter à nouveau. L'une des plus belles collaboration que l'on puisse imaginer.

Et enfin, j'aimerais conclure ces remerciements en adressant toute ma gratitude et mon amitié à celles et ceux qui m'ont accompagnée, quasi quotidiennement, à chaque étape de cette thèse. Vous l'avez partagé avec moi, toujours avec bienveillance, humour, sagesse (parfois), apéros, soirées… et cette fameuse « solida… » dont on ne connaîtra probablement jamais la fin. Merci donc à mes amis et collègues du CERFE qui ont tout fait, jusqu'à m'héberger à Boult, pour rendre ce parcours plus léger. Merci d'être si inspirants et drôles que je ne pourrai jamais m'empêcher de vous taquiner. Ils savent avec quelle aisance j'aime m'exprimer à l'écrit (contrairement à l'oral !) mais je leur dois bien ces quelques phrases qui suivent :

Merci Rémi, pour tout ce que tu as fait depuis mon arrivée au CERFE en 2019. Je n'en dirai pas plus parce que d'habitude tu me dis de me rendre là où poussent les racines des pissenlits pour préserver ta tranquillité, j'ai donc décidé de la respecter… pour cette fois-là.

Merci Pau, pour ta générosité, ton écoute, tes conseils, ton *back-up* en cas de coup de mou, tes coups de folies auxquels je ne peux résister. C'est à la fois rafraichissant (Mojitooos) et réconfortant d'être à tes côtés. Tu es un vrai repère dans la tempête.

Merci Mad, pour ta présence, nos délires et tout ce que tu m'as transmis depuis mon arrivée au CERFE. Si on m'avait dit qu'un demi-Breton ornitho(rynXe ?) et une Versaillaise pipelette s'entendraient si bien, je me serais pincée le bras (enfin, plutôt le tien, ça fait moins mal).

Merci Manoun, de m'avoir guidée dans les méandres du doctorat et de R, ta présence a rendu tout ça tellement plus rassurant pour moi. Sans oublier les longues discussions, les rires, la musique de bon goût et tes inimitables jeux de mots.

Merci Clem, pour savoir rire de tout en toute circonstances, pour ta folle gentillesse, pour ces moments à arpenter la forêt à la recherche de fèces de martres ou de sonneurs, pour nos instants colocs, les repas partagés et de nouveau tous ces rires.

Merci Lul, pour ton écoute, ta présence réconfortante, ton toit, nos échanges qui m'ont aidé à avoir confiance en moi, tes remarques toujours justes et ton côté bon public, qui m'encourage toujours à plus d'espièglerie.

Merci Rose, pour m'avoir fait confiance et pour ton travail appliqué, un bout de cette thèse est aussi le tien. Merci pour ces instants de complicité autour d'un pot de crème, pour tous ces coups de coude et ces regards où pointe ta folle douceur.

Et puis, merci Tom, pour avoir partagé ton bureau avec moi, pour nos échanges de blagues pourries, nos rires, se remettre au travail… puis échanger de nouveau, plus sérieusement cette fois-ci, puis en fait non, rire encore. Merci d'avoir rendu cette atmosphère de travail chaleureuse.

Impact des infrastructures linéaires de transport sur la connectivité écologique pour les mammifères terrestres par une approche fonctionnelle

Résumé

La fragmentation du paysage induite par les infrastructures linéaires de transport (ILTs) altère généralement la connectivité fonctionnelle, en limitant les déplacements et les flux de gènes, essentiels à la persistance des populations. Toutefois, l'ampleur de cet impact varie selon le type d'infrastructure et les espèces considérées. Cette étude a évalué les effets d'une autoroute et d'un canal sur la connectivité fonctionnelle réelle de trois espèces d'ongulés dans les Ardennes, en France. Une approche intégrative a été utilisée, combinant génétique du paysage, suivis GPS et surveillance par pièges-photographiques. Les analyses génétiques ont révélé un effet barrière de l'autoroute pour le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*), plus modéré pour le Sanglier (*Sus scrofa*) et inexistant pour le Chevreuil européen (*Capreolus capreolus*). En revanche, le canal n'a eu aucun effet significatif sur la connectivité génétique des espèces considérées. Le suivi photographique de 29 ouvrages non dédiés à la faune a montré qu'ils peuvent faciliter le déplacement d'une large gamme d'espèces de petits et moyens mammifères terrestres, bien que leur fréquentation varie selon les espèces. Les chevreuils utilisent plusieurs ouvrages (n=12), à l'inverse du cerf et du sanglier (n=2). Le suivi GPS de 14 chevreuils et 10 sangliers a confirmé qu'ils n'évitaient pas les abords de l'autoroute, mais que celle-ci façonnait profondément leurs déplacements en limitant les traversées. Ces travaux soulignent l'importance de s'appuyer sur des données empiriques multiples pour évaluer la connectivité et orienter plus efficacement les actions de conservation dans le cadre des politiques d'aménagement du territoire.

Mots-clefs : Connectivité fonctionnelle − Ongulés − Mammifères terrestres − Génétique du paysage − Suivi GPS − Autoroute − Déplacements − Comportement

Impact of Linear Transportation Infrastructure on Ecological Connectivity for Terrestrial Mammals Using a Functional Approach

Abstract

Landscape fragmentation caused by linear transport infrastructures (LTIs) generally disrupts functional connectivity by limiting animal movements and gene flow, processes that are essential to the persistence of populations. However, the extent of this impact varies depending on the type of infrastructure and the species involved. This study assessed the effects of a highway and a navigation canal on the actual functional connectivity of three ungulate species in the Ardennes region of France. An integrative approach was used, combining landscape genetics, GPS tracking, and camera trap monitoring. Genetic analyses revealed a barrier effect of the highway for red deer (*Cervus elaphus*), a moderate effect for wild boar (*Sus scrofa*), and no detectable impact for roe deer (*Capreolus capreolus*). In contrast, the canal had no significant effect on gene flow for any of the studied species. Camera monitoring of 29 non-wildlife crossing structures showed that they can facilitate movement for a wide range of small- and medium-sized terrestrial mammals, though their effectiveness varies by species. Roe deer use several structures (n=12), unlike red deer and wild boar (n=2). GPS tracking of 14 roe deers and 10 wild boars confirmed that the animals did not avoid the vicinity of the highway, but that it significantly shaped their movement patterns by limiting crossings. This research highlights the importance of using multiple empirical data sources to assess connectivity and more effectively guide conservation actions within a spatial planning policy framework.

Keywords: Functional connectivity − Ungulates − Terrestrial mammals − Landscape genetics − GPS tracking − Highway − Movements − Behavior

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BACI : Before-After-Control-Impact

CAP : *Capreolus capreolus* (Chevreuil européen ; chapitre 1)

CER : *Cervus elaphus* (Cerf élaphe ; chapitre 1)

CERFE : Centre de recherche et de Formation en Eco-éthologie

CGDD : Commissariat Général au Développement Durable

CZ : Central Zone (chapitre 1)

dBBMM : dynamic Brownian Bridge Motion Model

DI : Density Index

DIRN : Direction Interdépartementale des Routes du Nord

DNA : Deoxyribonucleic Acid

DOP : Dilution of Precision

EEA : European Environment Agency

ERC : séquence « Éviter, Réduire, Compenser »

EZ : Eastern Zone (chapitre 1)

FDC : Fédération Départementale des Chasseurs

FDD : Frequency of Detection Days

FDR : False Discovery Rate

FOEN : Federal Office for the Environment

GIS : Geographic Information System

GPS : Global Positioning System

GSM : Global System for Mobile

HWE : Hardy-Weinberg Equilibrium

IBD : Isolatio-by-Distance

IGN : Institut national de l'information géographique et forestière

ILT : Infrastructure Linéaire de Transport

LD : Linkage Disequilibrium

LGV : Ligne à Grande Vitesse

LKC : Loiselle's Kinship Coefficient

LPO : Ligue pour la Protection des Oiseaux

LTI : Linear Transportation Infrastructure

MAJIC : Mise À Jour des Informations Cadastrales

MAPI : Mapping Averaged Pairwise Information

MCMC : Markov chain Monte Carlo

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

MNT : Modèle Numérique de Terrain

NDVI : Normalized Difference Vegetation Index

OCS/OSO : Occupation du Sol

OFB : Office Français de la Biodiversité

PAF : ouvrage dédié au passage de la faune (Passage à Faune)

PCA : Principal Component Analysis

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLU : Plans Locaux d'Urbanisme

RDA : Redundancy Analysis

REP : Réseau Écologique Paneuropéen

RPG : Registre Parcellaire Graphique

SCoT : Schémas de Cohérence Territoriale

SDAGE : Gestion des Eaux

SEBIO : Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques

SIG : Système d'Information Géographique

SRADDET : Schémas Régionaux d'Aménagement, de Développement Durable et d'Égalité des Territoires

SRCE : Schémas Régionaux de Cohérence Écologique

SUS : *Sus scrofa* (Sanglier ; chapitre 1)

TVB : Trame Verte et Bleue

UTC : Universal Time Coordinated

UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

URCA : Université de Reims Champagne-Ardenne

WCS : Wildlife Crossing Structure

WZ : West Zone (chapitre 1)

ZI : Zone d'Influence

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 12

LA CRISE ACTUELLE DE LA BIODIVERSITE 13

Déclin mondial de la biodiversité 13

La fragmentation des habitats 13

LE ROLE DE LA CONNECTIVITE ECOLOGIQUE DANS LA CONSERVATION 15

Mesures de conservation de la connectivité 16

LES INFRASTRUCTURES LINEAIRES DE TRANSPORT 18

Un facteur majeur de la fragmentation 19

Les taxons sensibles : le cas des grands mammifères 22

UNE APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA CONNECTIVITE CENTREE SUR LES ESPECES 23

Optimiser l'estimation de la connectivité fonctionnelle du paysage 24

OBJECTIFS ET ORGANISATION DU MANUSCRIT 26

ZONE D'ETUDE 29

LES ESPECES MODELES 31

CHAPITRE 1 • VARIABILITY IN THE IMPACT OF LINEAR TRANSPORTATION INFRASTRUCTURES ON GENE FLOW IN FRENCH WILD UNGULATE POPULATIONS 34

Abstract 37

Introduction 38

Materials and methods 40

Study area 40

Samples collection 41

Microsatellite genotyping 42

Genetic variability analyses 43

Genetic structure 43

Results 46

Genetic diversity 46

Genetic structure and discontinuity 47

Discussion 51

Contrasted impact of the highway 51

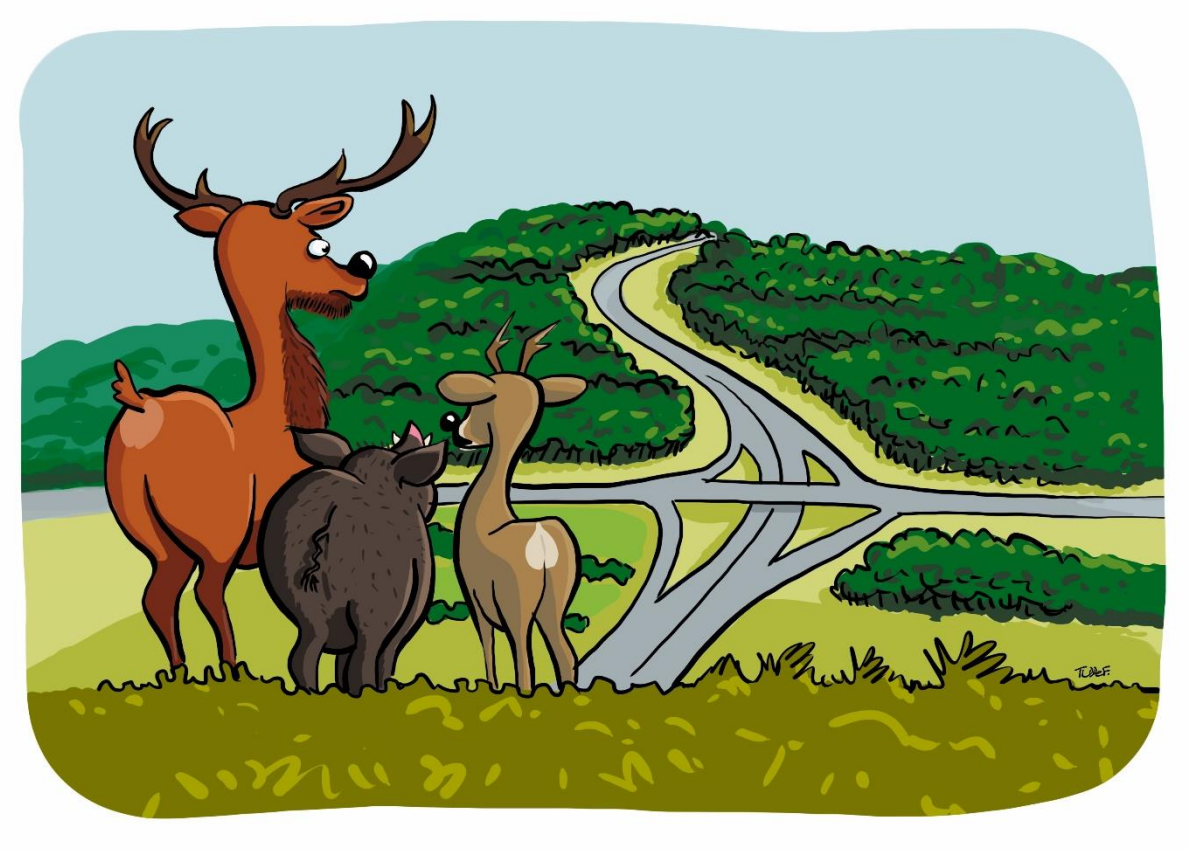
Waterway permeability for ungulates 52

On the importance of physical and behavioral approaches 53

Conclusions and recommendations 54

CHAPITRE 2 • USE OF HIGHWAY STRUCTURES BY MAMMALS AND THEIR CONTRIBUTION TO FUNCTIONAL CONNECTIVITY 57
Abstract 60
Introduction 60
Materials and methods 63
Study area 63
Monitoring and data collection 64
Explanatory variables 66
Data analysis 67
Results 68
Non-WCS use 68
Ungulates 71
Influence of non-WCS attributes 72
Discussion 73
Objectif 1: favored non-WCS type 74
Objectif 2: species detected in non-WCS 74
Objectif 3: selected or avoided attributes 75
Non-WCS and genetic connectivity 77
Conclusions and recommendations 77
CHAPITRE 3 • IDENTIFICATION DES RÉPONSES COMPORTEMENTALES DU CHEVREUIL EUROPÉEN (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) ET DU SANGLIER (*SUS SCROFA*) AUX INFRASTRUCTURES LINÉAIRES DE TRANSPORT : CAS DE L'AUTOROUTE A34 80
INTRODUCTION 81
ZONE D'ETUDE 86
MATERIEL ET METHODES 87
Modèles des colliers GPS 88
Capture et suivi 90
Gestion des données GPS 91
Zone d'influence des ILTs 92
Répartition spatiale aux ILTs 93
Déplacements à proximité d'un ouvrage de franchissement potentiel 94
Paramètres et identification des événements de rencontre 94
Influence de l'occupation du sol sur les événements de rencontre 99
RESULTATS 101

Capture et suivi 101
Proximité aux ILTs 102
Occasions de traversée 103
Influence des ILTs sur les paramètres de déplacement 103
Identification des événements de rencontre 106
Effet des habitats sur les événements de rencontre 109
Description de la dispersion d'individus à proximité de l'autoroute 110
DISCUSSION 111
Une caractéristique linéaire anthropique non évitée mais contraignante 112
Effet de la proximité à l'autoroute sur les réponses comportementales 115
La dispersion, un moteur pour le franchissement 117
CONCLUSION 117
DISCUSSION GENERALE 119
APPROCHE INTEGRATIVE MULTISPECIFIQUE DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE REELLE 120
Le canal des Ardennes 121
L'autoroute A34 122
APPROCHE FONCTIONNELLE THEORIQUE VS. REELLE : L'EXEMPLE DE L'A34 125
ORIENTATIONS POUR LA PLANIFICATION DE MESURES D'ATTENUATION 127
Approche structurelle et paysagère 127
Approche comportementale 131
CONCLUSION GENERALE 132
BIBLIOGRAPHIE 133
ANNEXES • MATERIEL SUPPLEMENTAIRE 159
TABLE DES FIGURES 169
TABLE DES TABLEAUX 172



INTRODUCTION GENERALE

LA CRISE ACTUELLE DE LA BIODIVERSITE

Déclin mondial de la biodiversité

La biodiversité est actuellement confrontée à une crise mondiale majeure, marquée par un taux d'extinction d'espèces 100 à 1000 fois supérieur à celui des extinctions naturelles historiques (Pimm et al. 2014; Ceballos et al. 2020). Le déclin de la biodiversité est d'autant plus alarmant que les extinctions ne concernent pas seulement les espèces en danger immédiat. Parmi les espèces actuellement répertoriées comme « non-menacées » par l'UICN, 33% connaissent également un déclin (Finn et al. 2023). L'ampleur de cette crise est encore difficile à évaluer en raison du manque de données sur de nombreuses espèces. Cependant, la situation des Vertébrés est relativement bien documentée, et si la tendance actuelle se poursuit, entre 269 et 350 espèces d'Oiseaux et de Mammifères pourraient disparaître d'ici 2100 (Johnson et al. 2017). Cette érosion rapide, qualifiée de sixième extinction de masse (Wake and Vredenburg 2008; Barnosky et al. 2011; Ceballos et al. 2015, 2020), est directement attribuée aux activités humaines (Díaz et al. 2019). A titre d'exemple, la biomasse des humains et de leurs animaux domestiques dépasse de près de 30 fois celle des mammifères sauvages, les plaçant en concurrence directe pour les ressources et l'espace vital (Bar-On et al. 2018). Ainsi, la principale menace pour la biodiversité demeure la perte et la modification des habitats, causées par l'expansion urbaine, l'agriculture intensive et la déforestation, qui représentent les trois principaux facteurs de destruction des écosystèmes selon l'UICN (Veach et al. 2017). D'autres pressions majeures s'y ajoutent, telles que la surexploitation, la pollution, le changement climatique et l'introduction d'espèces invasives (Habibullah et al. 2022; Jaureguiberry et al. 2022; Isbell et al. 2023; Gautrelet et al. 2024). Par conséquent, la réduction progressive de l'abondance et de la répartition géographique des espèces affecte la diversité fonctionnelle (i.e. fonctions écologiques remplies par les espèces) au sein des écosystèmes, compromettant leur résilience et donc, la pérennité des services écosystémiques (ex. le stockage de l'eau, le fonctionnement des sols ou la pollinisation ; Dirzo et al. 2014).

La fragmentation des habitats

Parmi les facteurs responsables du déclin de la biodiversité, la fragmentation des habitats entraîne une réduction de la biodiversité allant de 13% à 75% selon les écosystèmes, avec des conséquences plus marquées dans les fragments les plus petits et isolés (Haddad et al. 2015).

La fragmentation est un processus à l'échelle du paysage qui désigne la division d'un habitat continu en fragments plus petits et isolés les uns des autres, entourés par une matrice environnementale souvent inhospitalière telle que des zones agricoles et urbaines (Fahrig 2003; Ewers and Didham 2006). Ce processus est caractérisé par deux composantes principales induisant des modifications structurelles du paysage : la perte d'habitat, qui réduit directement la surface disponible pour les espèces, et la fragmentation *per se*, qui accentue l'isolement des fragments restantes sans nécessairement réduire leur superficie (Fahrig 2003, 2017; **Figure 1**).

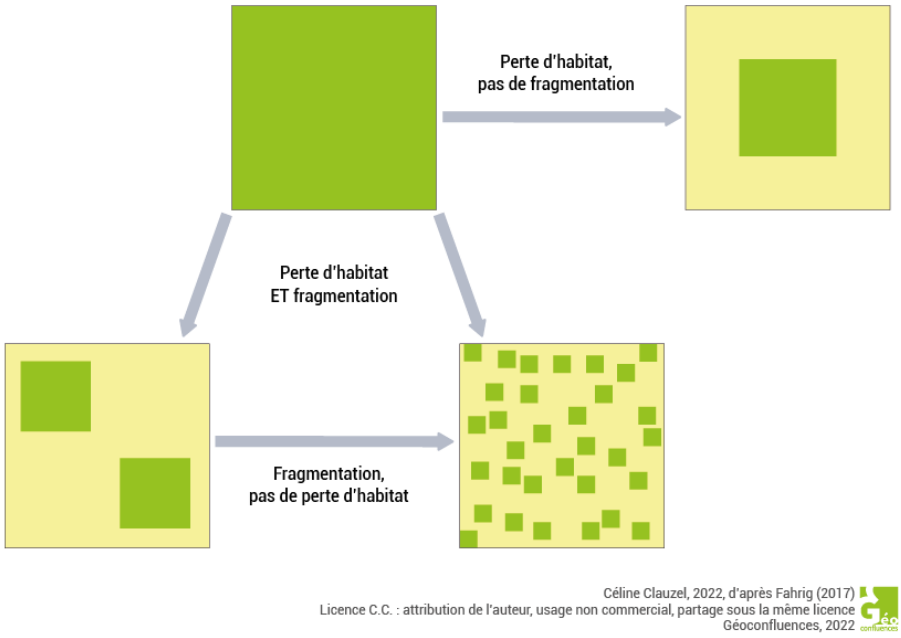


Figure 1 : Fragmentation d'un habitat (en vert) selon deux processus à ne pas confondre : la perte d'habitat et la fragmentation *per se*, d'après (Clauzel 2022)

De manière générale, la fragmentation réduit la richesse spécifique et l'abondance des populations en limitant les ressources disponibles et la capacité d'accueil des écosystèmes, ce qui accroît leur risque d'extinction (Ewers and Didham 2006). En outre, l'isolement des fragments restreint la dispersion des individus et les échanges génétiques entre populations isolées (Riley et al. 2006). Cela entraîne un risque de consanguinité et une perte de diversité génétique, rendant les populations plus vulnérables aux changements environnementaux (Lesbarrères et al. 2003, 2006). La fragmentation accentue également les effets de lisière, modifiant les conditions microclimatiques des fragments (température, humidité, exposition à la lumière), ce qui favorise les espèces généralistes et invasives, au détriment d'espèces spécialistes dont la survie dépend de conditions stables (Pfeifer et al. 2017; Fletcher et al. 2018).

Par ailleurs, en modifiant la composition des communautés biologiques, la fragmentation affecte directement la dynamique des réseaux trophiques, ce qui peut perturber des processus essentiels comme la dispersion des graines ou la régulation des populations d'herbivores et de prédateurs (Aguilar et al. 2006; Benítez-Malvido et al. 2016; Ryser et al. 2019). Toutefois, l'impact de la fragmentation est en partie modulé par les capacités d'adaptation et de déplacement des espèces : les espèces mobiles et/ou généralistes peuvent parfois compenser ces effets en exploitant les nouveaux environnements créés, tandis que les espèces spécialistes sont particulièrement vulnérables (Cushman et al. 2016; Dondina et al. 2017; Ripple et al. 2017). De manière générale, la fragmentation limite l'accès aux ressources et le déplacement des individus, ce qui diminue les flux génétiques et affecte ainsi la persistance des populations en accélérant leur déclin, pouvant aboutir à leur extinction locale (Haddad et al. 2015).

LE ROLE DE LA CONNECTIVITE ECOLOGIQUE DANS LA CONSERVATION

Face aux effets de la fragmentation, le maintien et la reconnexion des fragments d'habitats sont essentiels pour la libre circulation des individus et la viabilité des populations à long terme (Hilty et al. 2019). Ainsi, les stratégies de conservation se concentrent principalement sur l'amélioration de la connectivité entre les fragments d'habitat. La connectivité désigne la capacité d'un paysage à faciliter les déplacements des organismes entre les fragments d'habitats (Taylor et al. 1993). Elle joue un rôle clé dans la préservation de la biodiversité et des processus écologiques pour au moins deux niveaux distincts : i) à l'échelle de l'individu, en facilitant ses déplacements quotidiens au sein de son domaine vital pour lui assurer un accès efficace aux ressources (alimentation, refuge, partenaires sexuels) nécessaires à sa survie (Merkens et al. 2023) ; ii) à l'échelle des populations en influençant directement la dispersion des individus, le flux de gènes et la colonisation des habitats fragmentés (Tischendorf and Fahrig 2000; Baguette et al. 2013). L'intérêt de la connectivité paysagère réside alors dans son potentiel à atténuer les effets délétères de la fragmentation, en favorisant la diversité génétique et en assurant la stabilité des métapopulations. Cette dernière repose donc sur des échanges réguliers de flux (individus, gènes) entre populations locales, pour assurer leur viabilité et ainsi les protéger de l'extinction (Hanski 1999; Baguette et al. 2013).

La connectivité paysagère découle de l'interaction entre la structure physique du paysage et la réponse d'un organisme à cette structure (Taylor et al. 2006). Par conséquent, elle se

distingue selon deux types de connectivité : structurelle et fonctionnelle. La connectivité structurelle repose uniquement sur l'organisation spatiale des habitats, c'est-à-dire la disposition et la configuration physique des éléments du paysage, tels que la taille des fragments d'habitat, la distance qui les sépare ou la présence d'une barrière (Tischendorf and Fahrig 2000). En revanche, la connectivité fonctionnelle prend en compte la manière dont les organismes interagissent avec ces structures et se déplacent en fonction de leurs besoins biologiques et des contraintes du paysage (Bélisle 2005; Uezu et al. 2005). Une connectivité structurelle élevée ne garantit pas forcément une connectivité fonctionnelle efficace, car la dispersion des espèces dépend de leurs exigences écologiques et de leur comportement (Baguette et al. 2013). A l'inverse, une espèce capable de traverser une matrice inhospitalière peut bénéficier d'une connectivité fonctionnelle, même en l'absence de connectivité structurelle. Par exemple, les Tamias rayés (*Tamias striatus*) maintiennent une connectivité fonctionnelle entre les fragments, indépendamment de la taille des trouées forestières et de la présence de corridors (Bowman and Fahrig 2002). Par conséquent, même si les éléments du paysage sont des indicateurs de connectivité, leur rôle peut être surestimé ou inversement, car la perméabilité réelle des paysages varie selon les espèces. Cela souligne l'importance d'intégrer les traits d'histoire de vie (ex. dispersion) et le comportement des espèces dans les études de connectivité (Bolliger and Silbernagel 2020).

Mesures de conservation de la connectivité

Pour enrayer le déclin de la biodiversité, les politiques environnementales européennes ont progressivement élargi leur champs d'action au-delà des seules aires protégées (zones d'intérêts biologiques identifiées par le réseau Natura 2000 ; Biondi et al. 2012). En réponse à la fragmentation des habitats et à l'anthropisation croissante des territoires environnants, une approche de gestion intégrée du paysage s'est imposée. C'est dans ce contexte que la stratégie paneuropéenne pour la protection de la diversité biologique et paysagère, adoptée en 1995, a conduit à la création du Réseau Écologique Paneuropéen (REP), l'un des premiers dispositifs internationaux explicitant le concept de réseau écologique (Bonnin et al. 2007; Jones-Walters 2007; Jongman et al. 2011). Ce réseau vise à préserver ou restaurer la connectivité structurelle et fonctionnelle entre les sites naturels à l'échelle du continent européen et d'une partie de l'Asie septentrionale et centrale (Biondi et al. 2012). De nombreux territoires européens ont ainsi développé des stratégies locales en cohérence avec cette ambition, à l'image de la France. La déclinaison nationale du REP en France s'est concrétisée à travers la politique de la Trame

Verte et Bleue (TVB), introduite par le Grenelle de l'environnement de 2007 (Allag-Dhuisme et al. 2010). Son objectif principal est d'enrayer la perte de biodiversité en participant à la préservation, à la gestion et à la remise en bon état des continuités écologiques (Allag-Dhuisme et al. 2010; Delclaux and Fleury 2020). L'ensemble des continuités écologiques, formant les réseaux écologiques des territoires, s'articule autour de deux composantes : les réservoirs de biodiversité (fragments d'habitat), espaces riche en biodiversité et essentiels à l'accomplissement de tout ou une partie du cycle de vie des espèces ; les corridors écologiques, voies de déplacement empruntés par les organismes qui relient les réservoirs entre eux (Rosenberg et al. 1997; Allag-Dhuisme et al. 2010; **Figure 2**).

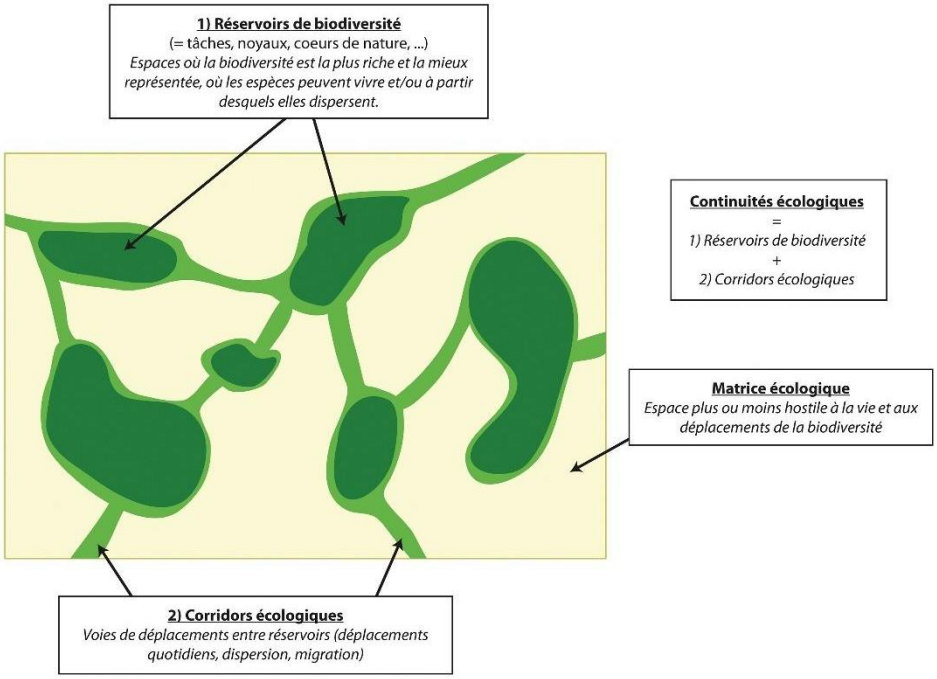


Figure 2 : Schéma théorique des continuités écologiques prises en compte par la TVB (©UMS PatriNat)

La prise en compte des continuités écologiques dans l'aménagement du territoire est assurée au niveau régional par les Schémas Régionaux de Cohérence Écologique (SRCE). Ces éléments sont depuis intégrés dans les Schémas Régionaux d'Aménagement, de Développement Durable et d'Égalité des Territoires (SRADDET), qui définissent les grandes orientations de la Trame Verte et Bleue (TVB). Ces orientations sont également déclinées dans des documents de planification locaux tels que les Schémas Directeurs d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SDAGE), les Schémas de Cohérence Territoriale (SCoT) et les Plans Locaux d'Urbanisme (PLU; Allag-Dhuisme et al. 2010). Une fois intégrés aux documents d'urbanisme, les réseaux

écologiques doivent être pris en compte dans les projets d'aménagement du territoire. Cependant, leur considération reste insuffisante, car rien n'empêche factuellement une municipalité d'aménager une zone commerciale à proximité d'un passage à faune. Cette prise en compte est d'autant plus cruciale pour les infrastructures de transport qui, en raison de leur configuration linéaire, exercent une influence significative sur les réseaux écologiques.

LES INFRASTRUCTURES LINEAIRES DE TRANSPORT

Les infrastructures linéaires de transport (ILTs ; ex. routes, voies ferrées, canaux, lignes électriques) désignent les installations fixes destinées à la circulation des personnes, des marchandises et des informations, à la fois sur de longue distance et à proximité (CGDD - Commissariat Général au Développement Durable 2016). Leur rôle est central dans le développement économique et social des territoires, en facilitant les échanges et la croissance des zones qu'elles relient (Banister and Berechman 2001; Lenz et al. 2018; Widjaja 2024). Organisées en réseau (ex. réseau routier, réseau ferroviaire, réseau fluvial, …), les ILTs renforcent la connectivité entre territoires, favorisent la mobilité de l'Homme et l'accès aux ressources (Rodrigue et al. 2006; Cervero 2013; Vitale Brovarone and Cotella 2020). En raison de leur influence sur divers aspects de la société, elles ont un impact majeur sur l'aménagement du territoire, la qualité de vie des populations et l'environnement (Liu et al. 2015; Polyzos and Tsiotas 2020; Pandey and Pathak 2025). Leur impact sur ce dernier est d'autant plus marqué dans les régions du monde où les réseaux d'ILTs sont les plus denses, à l'instar de l'Europe (Dulac 2013; Torres et al. 2016; Meijer et al. 2018). Actuellement, la densité du réseau d'ILTs en Europe est en grande partie le résultat d'une forte expansion du réseau autoroutier et ferroviaire (Lignes à Grande Vitesse ; LGV) au cours des trois dernières décennies (Rudolph et al. 2023). La France figure parmi les pays européens ayant les réseaux d'infrastructures de transport les plus denses et étendus (CGDD 2022). En 2021, son réseau routier (autoroutes, routes nationales et secondaires) couvrait environ 1,1 million de kilomètres, tandis que son réseau ferroviaire s'étendait sur près de 27 000 km et ses voies navigables sur environ 5 200 km (CGDD 2022). Par conséquent, le réseau routier est de loin le plus développé sur le territoire national.

Un facteur majeur de la fragmentation

Le réseau des ILTs, et en particulier celui des routes, constitue la principale cause de la fragmentation des habitats à l'échelle mondiale (Forman and Alexander 1998; Trombulak and Frissell 2000; Bekker and Iuell 2003; Coffin 2007; Bennett 2017). En effet, leur implantation, notamment en milieux naturels préservés, déclenche une cascade d'effets secondaires tels que l'urbanisation, l'expansion de l'agriculture ou l'exploitation des ressources, qui accentuent cette fragmentation (Spellerberg 1998). Dans ce contexte, il est probable que les écosystèmes européens, et en particulier français, soient parmi les plus fragmentés (Joint EEA-FOEN 2011; **Figure 3**), suggérant une dégradation significative de leurs écosystèmes.

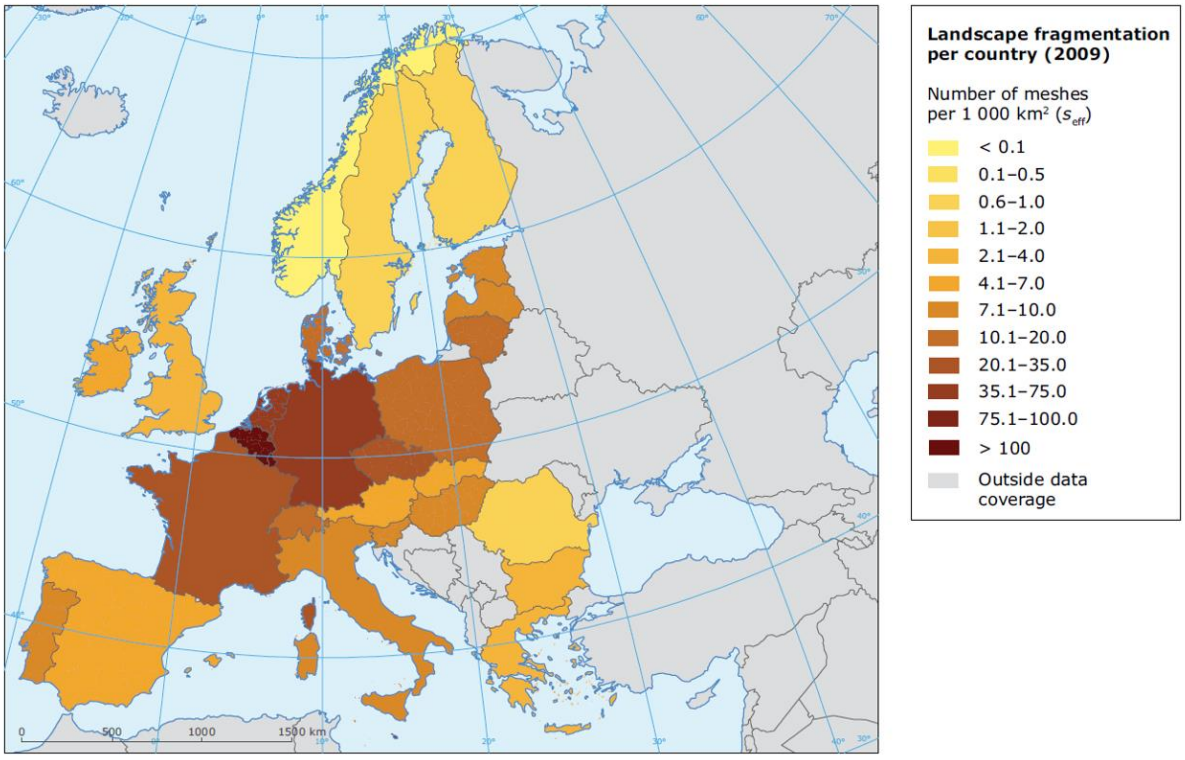


Figure 3 : Fragmentation du paysage européen par pays en 2009, extrait de (Joint EEA-FOEN 2011)

Les ILTs exercent des effets écologiques, à la fois directs et indirects (**Figure 4**), influençant la dynamique des populations et des écosystèmes, à différentes échelles. Des effets directs se manifestent dès leur construction, entraînant notamment la destruction et la perte physique d'habitat en convertissant les environnements naturels en zones artificialisées (Seiler 2001). A ce titre, les transports et infrastructures couvrent une superficie de 2,6% de la surface terrestre française (donnée 2022; Mirouse 2024), entraînant des défis majeurs pour la préservation des écosystèmes, de la faune et de flore. En outre, l'effet direct le plus connu et

visible de l'exploitation des ILTs est la mortalité due aux collisions avec des véhicules, affectant l'ensemble des espèces de Vertébrés (Forman and Alexander 1998; Clevenger et al. 2003; Seiler and Helldin 2006; Glista et al. 2008; Puig et al. 2012; Freitas et al. 2013; Grilo et al. 2020; Ramalho and Aguiar 2020). D'autres causes de mortalité ont également été observées, comme les noyades de mammifères terrestres dans les canaux de navigation (Peris and Morales 2004), causées par la présence de palplanches (parois lisses et métalliques) empêchant leur remontée sur la rive, ou l'électrocution des espèces aviaires sur les lignes électriques (Guil and Pérez-García 2022). Ainsi, la réduction du nombre d'individus qui parviennent à traverser sans être tués participe au facteur le plus important de la fragmentation globale associé aux ILTs : l'effet barrière. En effet, les ILTs peuvent potentiellement agir comme des barrières (ou des filtres) aux déplacements des animaux et restreindre leur aire de répartition. En rendant certains habitats inaccessibles, elles réduisent la perméabilité du paysage et la connectivité écologique et peuvent, à terme, conduire à l'isolement des populations (Seiler 2001; Holderegger and Di Giulio 2010; Bennett 2017). L'effet barrière résulte d'une combinaison d'effets indirects d'origine physique ou comportementale. D'une part, la présence d'obstacles physiques peut empêcher les animaux de franchir les ILTs tels que les clôtures d'exclusion pour la grande faune le long des autoroutes ou les palplanches utilisées dans la construction des canaux de navigation. D'autre part, les perturbations liées au trafic, à l'activité humaine et à la pollution (sonore, visuelle, physique et chimique) peuvent diminuer la qualité des habitats adjacents, conduisant ainsi les organismes à les éviter (Trombulak and Frissell 2000; D'Amico et al. 2016; Naidenko et al. 2021). Cette altération des conditions environnementales, associée à des effets sur le succès reproducteur, les réactions de fuite et l'état physiologique, peut modifier l'abondance et la répartition des individus à proximité (Forman and Alexander 1998; Seiler 2001; Shepard et al. 2008). Benítez-López et al. (2010) ont ainsi mis en évidence une diminution de la densité de population aux abords des ILTs, s'étendant jusqu'à une distance d'1 km pour les oiseaux et de 5 km pour les mammifères. Par ailleurs, lorsque les ILTs ont des effets individuellement modérés, ces derniers peuvent se cumuler et aboutir à un effet barrière qui limite fortement le passage (Coulon et al. 2006; Bartzke et al. 2015). C'est pourquoi il est essentiel de discriminer l'effet de chaque ILT dans un paysage fragmenté par plusieurs ILTs (Bissonette 2002; Balkenhol and Waits 2009).

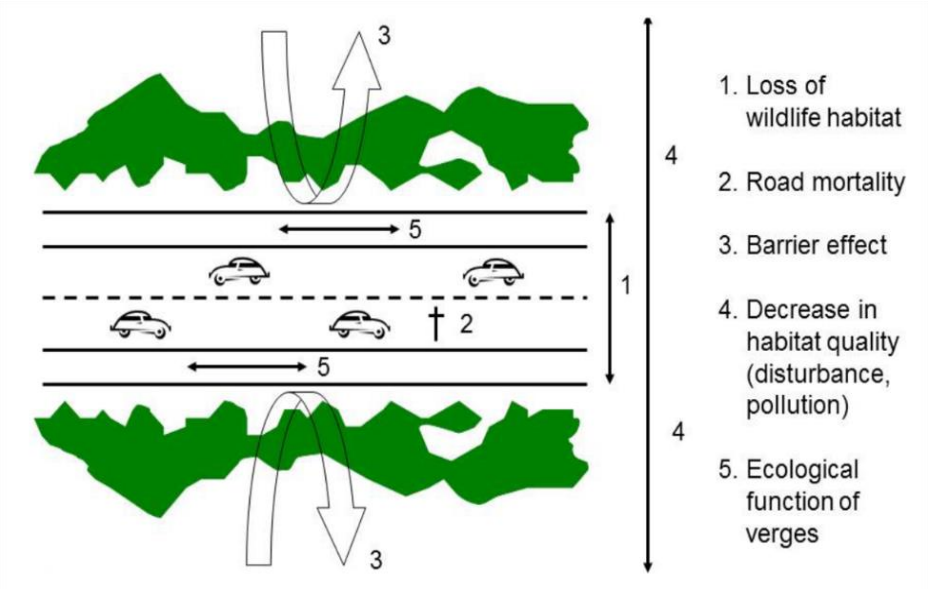


Figure 4 : Les effets directs (1,2) et indirects (3 à 5) d'une route sur la faune sauvage, extrait de (Huijser et al. 2021)

Toutefois, l'effet barrière n'est pas systématique et son intensité varie en fonction du type d'infrastructure, de son association à une seconde caractéristique linéaire (ex. clôture), du paysage et des espèces concernées sur le long terme (Underhill and Angold 2000; Seiler 2001; Fahrig and Rytwinski 2009; Botting et al. 2023). Par exemple, Remon et al. (2022) ont mis en évidence la variabilité des réponses de quatre espèces (la couleuvre *Natrix helvetica*, le crapaud *Alytes obstetricans*, le papillon *Maniola jurtina* et le carabe *Abax parallelepipedus*) face à six types d'ILTs (autoroute, route départementale, réseau de routes secondaires, gazoduc, ligne moyenne tension). Ces auteurs ont également montré qu'une même infrastructure pouvait avoir des impacts variés selon l'espèce concernée, confirmant ainsi que l'effet barrière ne peut être généralisé. Par ailleurs, Remon et al. (2022) ont également suggéré un effet corridor de la voie ferrée pour les serpents, et dans une moindre mesure, de l'autoroute pour les amphibiens, en raison de la disponibilité potentielle de nouveaux habitats le long de celles-ci. Ces résultats illustrent le fait que les ILTs peuvent aussi avoir des effets bénéfiques pour la connectivité des populations en fournissant des corridors de dispersion longitudinaux et de nouvelles ressources (alimentaire, refuge). En effet, le rôle des accotements, des talus ou des fossés bordant les ILTs en tant qu'habitats et corridors a été mis en évidence pour d'autres taxons, tels que les insectes pollinisateurs (ex. abeilles, papillons et syrphes; Moroń et al. 2017), les micromammifères (ex. Mulot sylvestre *Apodemus sylvaticus*; Ascensão et al. 2012; Galantinho et al. 2020) et les oiseaux forestiers (ex. Verdier d'Europe, *Carduelis chloris*; Morelli et al. 2014). Cependant, ces effets positifs dépendent fortement de la nature du paysage environnant (ex. effet corridor plus

élevé en plaines agricoles intensives), du volume de trafic, de la qualité des abords directs (bas-côtés, bermes) ainsi que du profil transversal (i.e. section en déblai, en remblai ou au niveau du terrain naturel) de chaque ILT, qui influencent la disponibilité des habitats et la sécurité des déplacements longitudinaux et transversaux (Guinard 2013; Villemey et al. 2018; Ouédraogo et al. 2020).

Les taxons sensibles : le cas des grands mammifères

Les amphibiens, les reptiles et les grands mammifères sont parmi les groupes les plus vulnérables aux effets des ILTs en raison de leurs traits d'histoire de vie et de leurs comportements (Rytwinski and Fahrig 2012). Les routes ont un impact particulièrement négatif sur les amphibiens et les reptiles : les premiers subissent une forte mortalité routière lors de leurs déplacements saisonniers notamment en périodes pluvieuses, tandis que les seconds, attirés par la chaleur des infrastructures pour leur thermorégulation, sont davantage exposés aux collisions (Fahrig and Rytwinski 2009; Boyle et al. 2019). Chez les mammifères, les ILTs entraînent une mortalité élevée et une fragmentation des habitats qui limite la dispersion, la migration, les zones d'alimentation et le succès reproducteur (Tucker et al. 2018). Les grands mammifères terrestres sont particulièrement affectés en raison de leur grande taille, de leur vaste domaine vital et de leur mobilité élevée, qui les exposent davantage aux collisions et à l'effet barrière (Tucker et al. 2014; Ceia-Hasse et al. 2018). Leur faible taux de reproduction limite également leur capacité à compenser les pertes démographiques causées par la mortalité routière (Rytwinski and Fahrig 2012; de Jonge et al. 2022). Les grands carnivores, en raison de leurs populations réduites, sont plus sensibles à la stochasticité des événements démographiques en milieu fragmenté (Crooks 2002; Riley et al. 2006; Crooks et al. 2011; Ceia-Hasse et al. 2017). Les ongulés, quant à eux, tendent à éviter les ILTs sur de longues distances, ce qui les expose à une perte d'habitat disponible et à la perturbation de leur schéma de déplacement (Leblond et al. 2011; Buchanan et al. 2014; Cramer et al. 2015; de Jonge et al. 2022). Par exemple, chez les rennes (*Rangifer tarandus*) en Norvège, le mouvement entre deux zones séparées par une route a été réduit en moyenne de 68,6 % par rapport au taux attendu sans route (Beyer et al. 2016). De plus, quatre rennes sur cinq évitaient les zones proches des routes jusqu'à 1 km, réduisant ainsi la surface effective de leur habitat.

Ainsi, en raison de leurs caractéristiques éco-éthologiques et physiques, les grands mammifères terrestres occupent une place centrale dans la restauration des réseaux écologiques. Particulièrement sensibles à la fragmentation, ils devraient être considérés comme des espèces

parapluies. Les mesures de préservation de la connectivité doivent donc leur être prioritaires, car leur conservation contribue également à celle de nombreuses autres espèces au sein d'un même écosystème (Baguette et al. 2013). Par ailleurs, la conservation efficace des espèces face aux ILTs nécessite une compréhension spécifique de leur rôle sur le comportement de déplacement de différentes espèces, car elles influencent directement la connectivité fonctionnelle du paysage (Bennett et al. 2011). Or, les évaluations de la connectivité se concentrent souvent sur une seule espèce (ex. Fraser et al. 2019; McManus et al. 2022; Aiello et al. 2023), négligeant ainsi la variabilité des réponses spécifiques aux espèces. Une approche multi-spécifique permettrait d'adapter les stratégies de conservation en identifiant des corridors écologiques favorisant le déplacement d'espèces aux exigences variées dans un paysage hétérogène (Brodie et al. 2015; Diniz et al. 2020; Petsas et al. 2020; Remon et al. 2022).

UNE APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA CONNECTIVITE CENTREE SUR LES ESPECES

Les analyses de connectivité sont essentielles pour améliorer la préservation des continuités écologiques et la compréhension des flux de gènes, d'individus et de populations au sein de paysages fragmentés. Dans le cadre des projets d'aménagements de réseaux écologiques régionaux, leur identification repose principalement sur l'approche structurelle de la connectivité (ex. photo-interprétation, méthode de dilatation-érosion) ou la modélisation théorique de la connectivité fonctionnelle (ex. méthode de perméabilité des milieux) (Allag-Dhuisme et al. 2010; Sordello et al. 2017; Vanpeene and Petit 2024). Toutefois, bien que l'approche structurelle soit relativement simple à évaluer et nécessite peu de données, elle ne reflète pas nécessairement la connectivité fonctionnelle pour toutes les espèces.

C'est pourquoi il est essentiel d'intégrer les traits écologiques et le comportement des espèces face aux différents éléments du paysage lors de l'identification des réseaux écologiques. Cette approche fonctionnelle permet une évaluation plus réaliste de la perméabilité du paysage en tenant compte de leur capacité réelle à franchir ou éviter les barrières naturelles ou anthropiques (Tischendorf and Fahrig 2000; Bélisle 2005; Taylor et al. 2006). Cependant, sa mise en œuvre se heurte à la difficulté d'acquérir des données empiriques précises sur les déplacements réels des espèces et leur utilisation des habitats (Finch et al. 2020; Petsas et al. 2020; Bolliger and Silbernagel 2020), en raison de contraintes logistiques et financières (Hebblewhite and Haydon 2010). Par conséquent, malgré les avancées des modèles de

connectivité fonctionnelle (ex. identification du chemin de moindre coût d'après la théorie des graphes, Adriaensen et al. 2003 ; chemins multiples d'après la théorie des circuits, McRae et al. 2008), ces derniers reposent souvent sur des valeurs de résistance du paysage ou des distances de dispersion animale estimées à partir de la littérature ou d'avis d'experts, plutôt que sur des observations directes (Chardon et al. 2003; Cushman et al. 2013; LaPoint et al. 2013; Bolliger and Silbernagel 2020; Churko et al. 2020). Cette subjectivité réduit la fiabilité des résultats, d'autant qu'ils supposent une connaissance parfaite du paysage par les espèces ou négligent la mémoire spatiale des organismes sur leurs déplacements (LaPoint et al. 2013; Diniz et al. 2020). De plus, certains modèles se concentrent parfois sur les corridors écologiques sans toujours considérer la qualité de la matrice environnante, pourtant déterminante pour les déplacements et la répartition des espèces (Watling et al. 2011; Brady et al. 2011). Enfin, la précision de ces modèles repose fortement sur la qualité et la pertinence des données d'occupation du sol utilisées en entrées. Par exemple, une faible résolution spatiale peut provoquer une sous-estimation de l'hétérogénéité réelle des habitats, manquant certains microhabitats tels que les haies, les talus ou les fossés qui peuvent pourtant jouer un rôle critique dans la connectivité du paysage (Thierry et al. 2020). L'ensemble de ces limites complique alors la validation globale de ces modèles, particulièrement dans les paysages fragmentés par les ILTs, où les capacités de franchissement varient selon les espèces (Zeller et al. 2012). L'approche fonctionnelle centrée sur des espèces spécifiques est donc essentielle pour : (i) identifier de manière cohérente les continuités écologiques (Vanpeene and Petit 2024), (ii) assurer leur gestion efficace et leur fonctionnalité pour les espèces ciblées (Abrahms et al. 2017) afin de (iii) optimiser les outils d'aide à la décision en conservation (Cushman et al. 2013; Laliberté and St-Laurent 2020).

Optimiser l'estimation de la connectivité fonctionnelle du paysage

L'estimation de la connectivité fonctionnelle vise à évaluer la réponse comportementale des organismes à la structure du paysage et, par extension, les conséquences sur leur succès reproductif et la dynamique des populations (Taylor et al. 2006). Centrée sur l'espèce, cette estimation permet d'identifier les obstacles à la dispersion et les éléments du paysage favorisant le mouvement. La connectivité fonctionnelle se décline en deux approches distinctes mais complémentaires : une approche théorique, basée sur la modélisation de la résistance du paysage (qui reflète le coût de déplacement local pour un organisme dans un paysage donné; Cushman et al. 2013) en fonction de la capacité supposée des espèces à s'y déplacer ; une

approche réelle, qui s'appuie sur des suivis d'individus dans leur environnement afin d'estimer un lien direct entre leurs déplacements et les éléments paysagers (Remon 2018). Bien que plus exigeante en termes de ressources, la seconde approche fournit des résultats précis sur les flux réels de dispersion dans un paysage donné. Elle permet également d'alimenter l'approche théorique en intégrant des données empiriques, améliorant ainsi la précision des modèles de connectivité. Les données utilisées pour estimer la connectivité fonctionnelle réelle proviennent principalement de trois sources : les analyses génétiques (ex. tests d'assignation génétique, différenciation génétique), le suivi direct des déplacements (ex. suivi GPS, télémétrie) et les observations de présence (ex. surveillance par piège-photographique, suivi par marquage-recapture, relevé de transect, relevé des collisions ou noyades; Bolliger and Silbernagel 2020). Les données génétiques renseignent sur les échanges génétiques entre populations et permettent de déduire l'impact des éléments du paysage sur ces flux à long terme (i.e. la génétique du paysage; Holderegger and Wagner 2008; Manel and Holderegger 2013). Cependant, elles ne renseignent pas directement sur les voies de déplacements des organismes et peuvent être soumises à un décalage temporel entre les schémas génétiques spatiaux et les effets induits par les changements de paysage (Landguth et al. 2010; Segelbacher et al. 2010). En revanche, le suivi direct des déplacements permet d'observer les trajectoires individuelles à travers le paysage avec une grande résolution spatiale et temporelle, tout en apportant des informations sur le comportement animal (Webb et al. 2010; Killeen et al. 2014). Il est toutefois limité à un petit nombre d'individus sur une courte période en raison du coût élevé des dispositifs de suivi (colliers ou balises GPS; Hebblewhite and Haydon 2010), ce qui peut réduire sa représentativité à l'échelle de la population. A l'instar des données génétiques, les données de présence ne révèlent pas directement les trajets parcourus mais elles offrent une alternative économique pour analyser un large échantillon. Elles permettent également d'identifier les éléments facilitant le déplacement des organismes à travers les obstacles (ex. ouvrages d'art routiers; Clevenger and Waltho 2005; Bhardwaj et al. 2020) et les zones utilisées pour leurs déplacements dans le paysage (Chakraborty et al. 2021; Huerta-Rodríguez et al. 2022).

Pour surmonter les limites propres à chaque méthode, il est utile de les combiner, chacune apportant des informations complémentaires sur les schémas de déplacement. Une approche intégrative combinant plusieurs sources de données indépendantes permet ainsi d'obtenir un aperçu plus complet de la connectivité. Par exemple, Carvalho et al. (2018) ont combiné des données sur la mortalité routière, le radiopistage et la génétique pour étudier l'impact d'une autoroute du sud du Portugal sur la Genette commune (*Genetta genetta*). Ils ont montré qu'elle

limitait les déplacements des adultes résidents et causait une mortalité importante chez les subadultes en dispersion. Cependant, les traversées fréquentes de ces derniers ont permis de maintenir un flux génétique suffisant, empêchant ainsi une structuration génétique de la population. Par conséquent, les conclusions les plus robustes sur la connectivité émergent de l'analyse croisée de diverses sources de données, lorsqu'elles convergent vers un même résultat (Cushman et al. 2013). Il devient alors possible de produire des estimations plus robustes de la connectivité fonctionnelle en intégrant diverses sources de données empiriques aux modèles de résistance du paysage basés sur avis d'experts ou en confrontant ces modèles à l'estimation de la connectivité fonctionnelle réelle (Creech et al. 2024).

OBJECTIFS ET ORGANISATION DU MANUSCRIT

Alors que la connectivité fonctionnelle assure les échanges de flux dans le paysage, elle peut être particulièrement affectée dans les paysages fragmentés par les infrastructures de transport, compromettant la persistance des populations naturelles. Pourtant, les outils d'aménagement du territoire intégrant les enjeux de biodiversité (ex. SRCE) reposent généralement sur des cadres de modélisation identifiant le rôle de la structure du paysage dans le succès du mouvement des organismes ou sur l'avis d'experts pour estimer la connectivité fonctionnelle. En l'absence de données empiriques suffisantes, ces estimations peuvent être biaisées et, selon Kaphegyi et al. (2013), conduire le plus souvent à une surestimation de la perméabilité des ILTs, avec un risque potentiel pour la conservation des populations. Ce risque est d'autant plus important lorsque l'impact de certains ILTs est sous-évalué en raison d'un manque d'attention et de données. C'est notamment le cas des canaux de navigation, encore peu étudiés en comparaison d'infrastructures plus répandues comme les routes (« Ecologie routière » ; Forman 2003; Guinard et al. 2023) ou les voies ferrées (« Ecologie ferroviaire »; Borda-de-Água et al. 2017), bien qu'ils puissent également constituer des barrières au déplacement des espèces (ex. Chevreuil européen *Capreolus capreolus*, Calenge et al. 2005; Cerf élaphe *Cervus elaphus*, Edelhoff et al. 2020). Comme mentionné précédemment, il est donc crucial d'intégrer des données empiriques pour améliorer les modèles et mieux évaluer l'impact des éléments linéaires anthropiques sur la connectivité. Une approche intégrative multi-spécifique, combinant plusieurs sources de données et permettant une analyse simultanée pour diverses espèces, offrirait des priorités de conservation plus cohérentes et applicables à l'ensemble des espèces concernées (Santini et al. 2016). Or, l'acquisition de données

empiriques reste limitée, rendant les évaluations de connectivité trop rares et incomplètes, alors qu'elles sont essentielles pour optimiser la gestion des réseaux écologiques et la planification des mesures de conservation.

Dans ce contexte, le travail de cette thèse vise à évaluer les effets réels d'infrastructures linéaires de transport (une autoroute clôturée et un canal) sur la connectivité fonctionnelle des mammifères terrestres de grande taille dans un paysage fragmenté. Pour cela, une approche intégrative multi-spécifique a été adoptée, combinant des analyses génétiques comparatives, des suivis directs du mouvement par colliers GPS et une surveillance par pièges-photographiques du franchissement des infrastructures pour trois espèces d'Ongulés. Toutes les données utilisées (excepté les données génétiques pour le cerf) ont été collectées spécifiquement dans le cadre de cette thèse sur une période d'environ vingt-quatre mois.

Le manuscrit de thèse se décline en trois chapitres, chacun étant consacré à l'analyse des données issues d'un outil de recherche répondant à un objectif précis :

Le premier chapitre a pour objectif d'évaluer l'impact des infrastructures de transport sur le flux de gènes des populations de trois espèces modèles (Cerf élaphe *Cervus elaphus*, Chevreuil européen *Capreolus capreolus* et Sanglier *Sus scrofa*). Il s'agissait, plus précisément, de confronter trois outils de la génétique du paysage afin de déterminer dans quelle mesure chaque ILT limite ou non les échanges génétiques entre individus situés de part et d'autre de ces infrastructures. Pour réaliser cette étude, une méthode d'échantillonnage à l'échelle de la population ou de l'individu a été adoptée. De plus, un ensemble de marqueurs ADN microsatellites spécifiques à chaque espèce a été utilisé ou développé. Cet axe de recherche a conduit à la publication suivante, qui constitue ce premier chapitre :

Dispan de Floran, L., Mergey, M., Galan, M., Vitte, I., Jouanillou, A., Le Barh, M., Guinard E., Lesbarrères D. et Helder, R. (2025). Variability in the impact of linear transportation infrastructures on gene flow in French wild ungulate populations. *Landscape Ecology*, 40(2), 31. DOI : https://doi.org/10.1007/s10980-025-02052-w

Le second chapitre a permis de dresser un inventaire des éléments fonctionnels du paysage utilisés par les mammifères terrestres pour franchir une infrastructure de transport (désignés par la suite comme « transparateurs »). Cette partie de l'étude repose sur un suivi par pièges

photographiques des ouvrages d'art non spécifiquement conçus pour la faune (buses, ponts et ponts-cadre) le long de l'autoroute A34. L'objectif était d'évaluer leur fréquentation, d'identifier les espèces les utilisant et de déterminer les caractéristiques physiques et environnementales influençant leur efficacité en tant que site de franchissement fonctionnel. Cette partie a abouti à la rédaction de l'article suivant, qui constitue ce second chapitre :

Dispan de Floran L., Valance G., Le Barh M., Maudet S., Hubert A., Guinard E., Hubert P., Lesbarrères D., Helder R. *en préparation* Use of non-wildlife crossing structures by terrestrial mammals and their contribution to functional connectivity. *Transportation Research Part D: Transportation & Environment.*

Le troisième chapitre vise à identifier les réponses comportementales d'individus confrontés aux infrastructures de transport. Il s'agissait ici de suivre directement les déplacements à fine échelle d'individus de chevreuils et de sangliers équipés de colliers GPS afin d'évaluer l'effet de l'autoroute A34 sur l'orientation générale des déplacements (éviter, longer, exploiter ou franchir l'ILT). Plus précisément, en comparant l'effet de cette infrastructure à celui du réseau de routes secondaires, l'étude cherche à déterminer dans quelle mesure l'autoroute influence les déplacements, notamment en termes d'effet répulsif ou attractif de ses abords, de franchissabilité et de modifications comportementales.

Bien que cela dépasse le cadre de cette thèse, les données collectées lors de la thèse permettront au Cerema (Centre d'études et d'Expertise sur les Risques, l'Environnement, la Mobilité et l'Aménagement) de développer des modèles de connectivité fonctionnelle capables, à terme, de prédire la perméabilité des ILTs en fonction de leurs caractéristiques, des espèces concernées et du paysage environnant. La **figure 5** résume l'intégration des données.

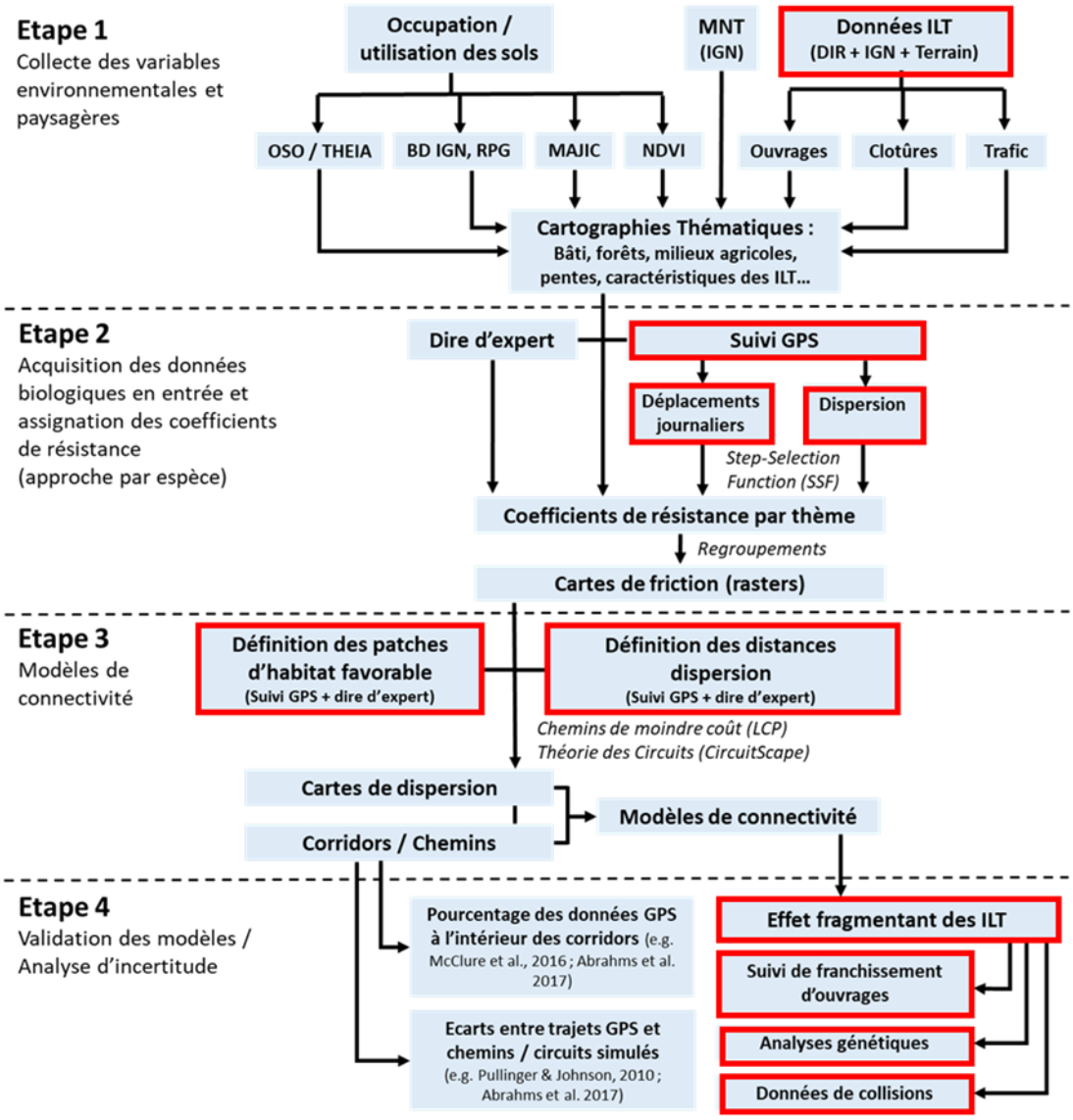


Figure 5 :Approche méthodologique pour la réalisation des modèles de connectivité. Intégration des résultats du travail de thèse en rouge. DIR : Direction Interdépartementale des Routes ; IGN : Institut national de l'information géographique et forestière ; MAJIC : Mise À Jour des Informations Cadastrales ; MNT : Modèle Numérique de Terrain ; NDVI : Normalized Difference Vegetation Index ; OSO : Occupation des Sols ; RPG : Registre Parcellaire Graphique (Source : Julian Pichenot - Cerema)

ZONE D'ETUDE

La zone d'étude se situe à l'interface de deux continuités écologiques d'importance interrégionales et nationales reconnues par le SRCE de Champagne-Ardenne (A. n°2015-342-0053, 08 décembre 2015, SRCE de la région Champagne-Ardenne; **Figure 6**). La première regroupe les mosaïques agricoles et forestières des Crêtes pré-ardennaises, traversant d'ouest en est le département des Ardennes. La seconde correspond à l'axe forestier, aquatique et humide de l'Arc humide, qui s'étend le long de la frontière entre les départements de la Marne et de la Meuse, avant de remonter vers les Ardennes. Ces deux continuités marquent la

séparation entre les paysages forestiers de l'Est de la France et les plaines céréalières du bassin parisien. Elles sont néanmoins traversées par quatre ILTs : l'autoroute A34 et le canal des Ardennes traversent la continuité des Crêtes pré-ardennaises, tandis que l'autoroute A4 et la LGV Paris-Strasbourg coupent celle de l'Arc humide. La présente étude se concentre spécifiquement sur la zone où l'autoroute A34 et le canal des Ardennes se cumulent après qu'une étude précédente ait écarté un effet barrière de l'autoroute A4 et de la LGV pour deux espèces forestières, le Cerf élaphe et la Martre des pins (*Martes martes*) (Programme Corridors 2016-2020 ; URCA-CERFE 2020).

Le site d'étude s'étend alors sur environ 1600 km² (49°38'36.9''N, 4°34'37.3''E) délimité par les communes de Charleville-Mézières et de Rethel, dans le département des Ardennes (**Figure 6**). Le paysage est rural et bocager, composé de villages, de champs cultivés (ex. maïs, blé, orge), de pâtures, de prairies humides et de forêts de feuillus et d'Epicéa commun (*Picea abies*). L'altitude varie de 86 à 214 m au-dessus du niveau de la mer et le climat est semi-continental. L'autoroute A34 (clôturée) est en service dans son intégralité depuis 2003 tandis que le canal des Ardennes (palplanches, berges naturelles) est opérationnel depuis 1835.

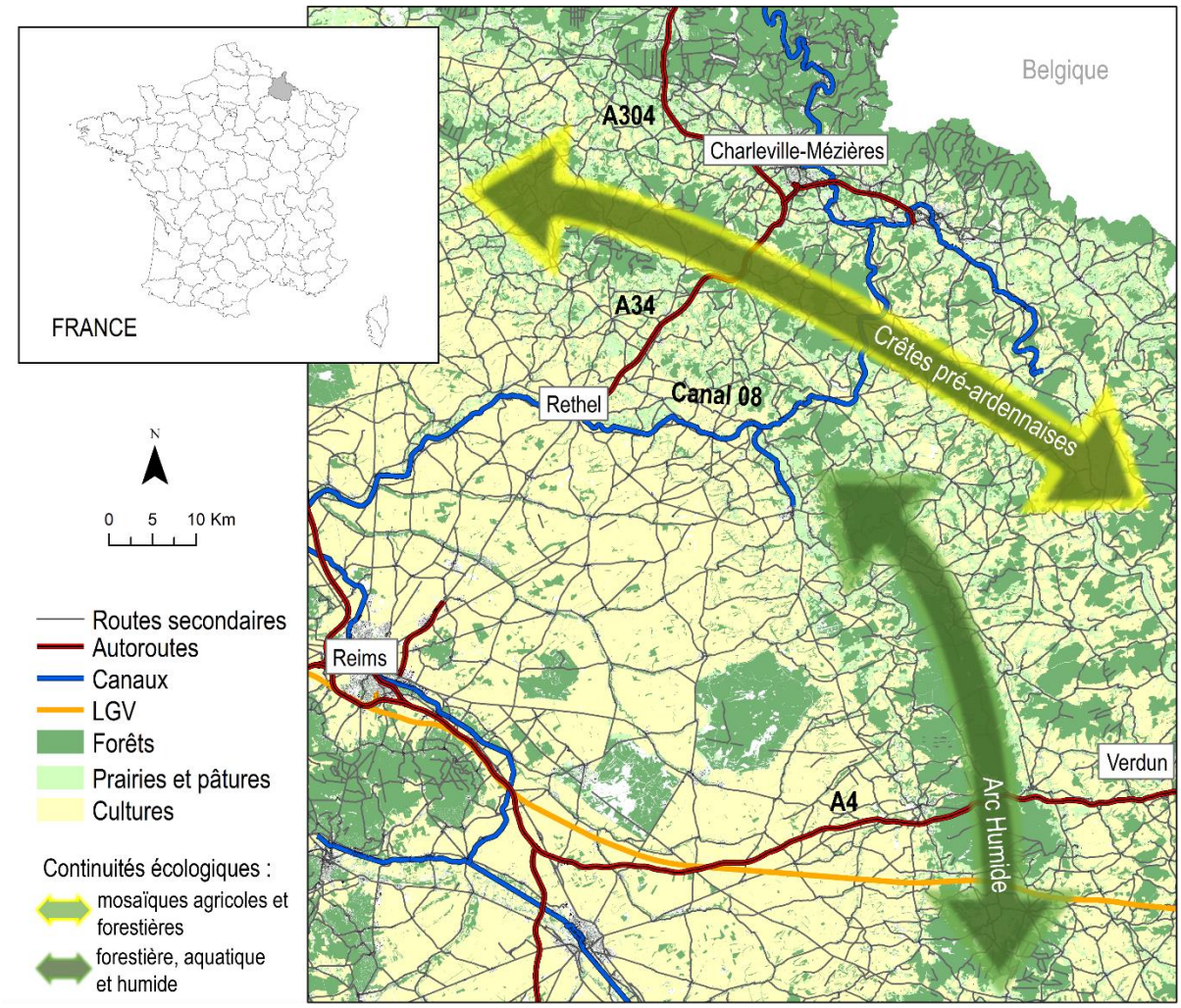


Figure 6 : Site d'étude sur le territoire de l'ex-région Champagne-Ardenne où quatre ILTs coupent deux corridors d'intérêt interrégionales et nationales (SRCE de Champagne-Ardenne). Canal 08 : Canal des Ardennes

LES ESPECES MODELES

L'évaluation de l'impact des ILTs sur la connectivité fonctionnelle des mammifères terrestres repose sur la sélection de trois espèces sympatriques réparties sur la quasi-totalité du territoire métropolitain. Elles se distinguent par leur grande taille, leur capacité élevée de dispersion et l'étendue relativement vaste de leurs territoires. Elles présentent également l'intérêt de disposer d'une mesure indicative de la taille de leur population sur l'ensemble de la zone d'étude, sachant que l'estimation de la densité à cette échelle nécessite un travail considérable. Par conséquent, les espèces sélectionnées appartiennent toutes à la guilde des Ongulés (**Figure 7**) : le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*), le Chevreuil européen (*Capreolus capreolus*) et le Sanglier (*Sus scrofa*).

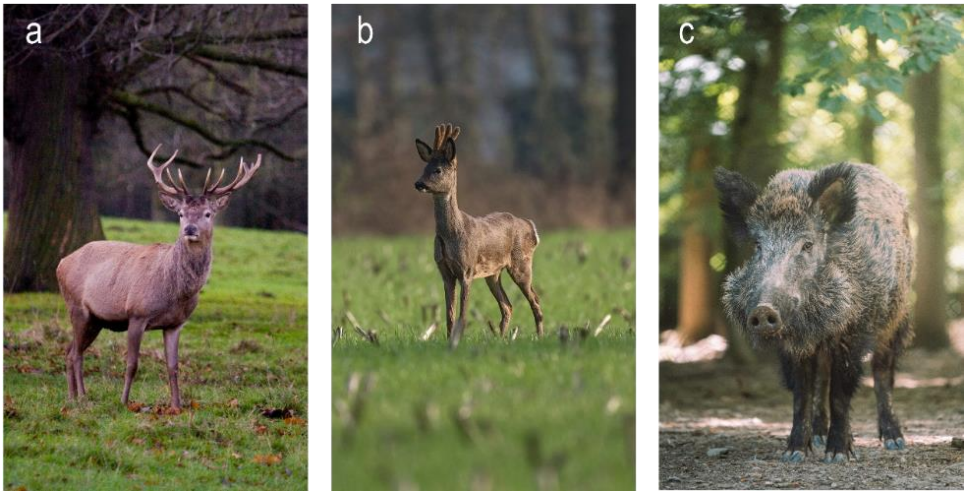


Figure 7 : (a) Cerf élaphe, (b) Chevreuil européen et (c) Sanglier

Le Cerf élaphe est, parmi les Cervidés, l'espèce présentant la plus vaste aire de répartition à l'échelle mondiale (MNHN and OFB 2003). Elle figure parmi les 15 espèces les plus utilisées pour l'élaboration de la TVB à l'échelle locale, et plus particulièrement pour la sous-trame forestière (Vanpeene and Petit 2024). Cette espèce est étroitement liée à l'habitat forestier, mais elle fréquente également les parcelles agricoles (cultures et prairies) en périphérie pour s'alimenter la nuit (Godvik et al. 2009). Le domaine vital d'un groupe matriarcal (biches adultes et jeunes) s'étend en moyenne sur 500 à 2000 ha, tandis que celui d'un groupe de mâles peut varier entre 1100 et 3000 ha (Sordello 2012). De plus, les jeunes mâles en dispersion natale peuvent parcourir jusqu'à 60 km pour s'établir sur un nouveau territoire (Sordello 2012). Espèce au tempérament farouche, le cerf est sensible à la perturbation induite par les activités anthropiques (St. Clair and Forrest 2009; Jayakody et al. 2011; Coppes et al. 2017) et à la fragmentation des habitats forestiers (Dellicour et al. 2011; Saint-Andrieux et al. 2020; Westekemper 2022). Plus précisément, cette espèce semble particulièrement vulnérable à la fragmentation induite par les ILTs. Par exemple, D'Amico et al. (2016) ont observé une réduction de 40 % de son habitat disponible en raison d'un évitement du réseau routier lors de ses déplacements. Par ailleurs, le franchissement d'ILTs clôturées par le cerf dépendrait souvent d'infrastructures adaptées à la faune sauvage (ex. écoponts; Mata et al. 2005, 2008; Corlatti et al. 2009), qui restent insuffisamment présentes sur les réseaux. La fragmentation par les ILTs limiterait les déplacements du cerf et entraînerait une structuration génétique entre les populations isolées, notamment par les réseaux routiers (ex. Pérez-Espona et al. 2008) , les autoroutes (Frantz et al. 2012) ou les canaux (Edelhoff et al. 2020).

Le Chevreuil européen est un Cervidé de taille moyenne (70 cm au garrot) avec un domaine vital couvrant en moyenne 80-100 ha (milieu forestier) à 200 ha (milieu de plaine) (Anciaux and Libois 1990). Les juvéniles peuvent parcourir une distance moyenne de 22 km avant de s'établir sur leur territoire post-dispersion (Debeffe et al. 2013). Le chevreuil est également une espèce de référence dans l'élaboration de la sous-trame forestière de la TVB à l'échelle locale (Vanpeene and Petit 2024). Bien qu'elle privilégie généralement l'habitat forestier, sa grande plasticité écologique lui a permis de coloniser divers milieux, allant des paysages bocagers aux grandes plaines céréalières (Sordello 2012). La modification du paysage n'est donc pas un facteur limitant pour cette espèce (Hewison et al. 2001; Jepsen and Topping 2004), capable de s'adapter à une certaine proximité avec les éléments anthropiques du paysage (ex. zones résidentielles : Bonnot et al. 2013; routes et autoroute : Theuerkauf and Rouys 2008; Naidenko et al. 2021). Sa plasticité comportementale lui permettrait également d'utiliser régulièrement les ouvrages non destinés au passage de la faune sauvage pour franchir les routes clôturées (Seiler and Olsson 2009; Bhardwaj et al. 2020). Cependant, plusieurs études ont montré que le chevreuil évitait généralement les routes lors de ses déplacements (Passoni et al. 2021; Luca Bastianelli et al. 2024). Les autoroutes clôturées et le cumul d'ILTs pourraient aussi limiter ses mouvements, entraînant alors une différenciation génétique des populations de part et d'autre de ces infrastructures (Coulon et al. 2006; Breyne et al. 2014).

Le Sanglier est une espèce de la famille des Suidés, qui présente les taux de reproduction les plus élevés parmi les Ongulés (4-6 marcassins par portée; Tack 2018). Espèce au régime alimentaire omnivore, elle fait preuve d'une grande plasticité, lui permettant d'occuper une large diversité de milieux : forêts de plaine et d'altitude, zones semi-arides, marais, plaines agricoles (Gerard et al. 1991). Le domaine vital d'un sanglier adulte peut varier en moyenne de 300 ha (femelle) à 1600 ha (mâle) (Gerard et al. 1991), et les jeunes peuvent parcourir une distance de dispersion natale variant de 5 à 17 km (Truvé and Lemel 2003). Le sanglier serait sensible à la fragmentation du paysage en présence d'un cumul de caractéristiques environnementales inhospitalières qui entraînerait une structuration génétique des populations (ex. zones urbaines et agricoles intensives, réseau routier et ferroviaire; Biosa 2013; Tadano et al. 2016; Lecis et al. 2022). Toutefois, certaines études (D'Amico et al. 2016; Naidenko et al. 2021; Luca Bastianelli et al. 2024) ont démontré que les ILTs seules peuvent perturber les déplacements des sangliers, qui auraient tendance à les éviter, ou à ne pas les franchir en l'absence d'ouvrages supérieurs. En revanche, elles ne semblent pas affecter nécessairement le flux de gènes (Frantz et al. 2012).



CHAPITRE 1 • VARIABILITY IN THE IMPACT OF LINEAR TRANSPORTATION INFRASTRUCTURES ON GENE FLOW IN FRENCH WILD UNGULATE POPULATIONS

Résumé du chapitre

Le développement des infrastructures linéaires de transport (ILTs), telles que les autoroutes et les canaux, entraîne une fragmentation des paysages naturels. Cela affecte la mobilité des espèces sauvages et réduit les échanges génétiques entre populations. La perte de connectivité peut alors accentuer l'isolement des populations, accroître la consanguinité et diminuer leur diversité génétique, compromettant ainsi leur viabilité à long terme. Bien que cruciaux, ces enjeux sont souvent abordés par des recherches centrées sur les ILTs les plus courantes (routes, autoroutes) via une approche mono-spécifique, négligeant la variabilité des réponses des espèces face aux obstacles. Dans ce contexte, l'étude vise à évaluer l'impact d'une autoroute clôturée et d'un canal de navigation sur le flux génétique de trois espèces d'Ongulés présentes dans le nord-est de la France : le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*), le Sanglier (*Sus scrofa*) et le Chevreuil européen (*Capreolus capreolus*). La méthodologie repose sur le génotypage de 98 cerfs, 120 sangliers et 140 chevreuils à l'aide de marqueurs microsatellites spécifiques à chaque espèce. Les individus ont été échantillonnés sur trois sites situées de part et d'autre des deux infrastructures. Les analyses ont combiné des approches bayésiennes de regroupement génétique (STRUCTURE, GENELAND) et une cartographie des dissimilarités génétiques basées sur des distances interindividuelles (MAPI). Cette dernière méthode complémentaire a permis d'identifier les zones de discontinuité génétique associées aux caractéristiques du paysage. La convergence des résultats a montré que l'autoroute constitue une barrière au flux génétique des cerfs et, dans une moindre mesure, des sangliers, en raison du grillage et d'un manque éventuel d'ouvrages de franchissement adaptés. En revanche, l'autoroute n'affecte pas les chevreuils, qui sembleraient plus tolérants aux éléments anthropiques. Le canal, quant à lui, ne représente un obstacle significatif pour aucune des trois espèces, ce qui pourrait s'expliquer par la fréquentation de ponts et/ou la présence de berges naturelles facilitant sa traversée. En conclusion, l'étude souligne la perméabilité variable des infrastructures de transport qui dépendent à la fois de leurs caractéristiques structurelles ainsi que des spécificités physiques et comportementales propres à chaque espèce. Il est donc crucial de prendre en compte ces deux aspects dans la planification de mesures d'atténuation pour restaurer efficacement la connectivité fonctionnelle dans les paysages fragmentés par les ILTs.

Variability in the impact of linear transportation infrastructures on gene flow in French wild ungulate populations

L. Dispan de Floran[1,2], M. Mergey[3], M. Galan[4], I. Vitte[5], A. Jouanillou[5], M. Le Barh[6], E. Guinard[7], D. Lesbarrères[8,9], R. Helder[6]

[1] SNC URANO, rue François Urano, 08000 Warcq, France

[2] URCA, UMR-I 02, SEBIO, UFR SEN, Campus du Moulin de la Housse, 51100 Reims, France

[3] FDC 64, 1 Avenue du Guat, CS 90308, 64303 Orthez cedex, France

[4] CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Univ Montpellier, 34988 Montferrier-sur-Lez, France

[5] LPL, 88 rue des Ecoles, 64150 Lagor, France

[6] URCA-CERFE, 5 rue de la Héronnière, 08240 Boult-aux-Bois, France

[7] CEREMA Dter Sud-Ouest, rue Pierre Ramond, CS 60013, 31166 Saint-Médard-en-Jalles, France

[8] Environment and Climate Change Canada, 1125 Colonel By Drive, Ottawa, ON K1S 5B6, Canada

[9] BIODIVAG, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers, France

Corresponding authors:

David Lesbarrères

david.lesbarreres@ec.gc.ca

phone: 705-677-9124

ORCID ID: 0000-0002-5505-1935

Lucie Dispan de Floran

lucie.dispan@gmail.com

phone: +33 6 89 14 37 48

Abstract

Context

Linear Transportation Infrastructures (LTIs) are among the largest factors responsible for landscape fragmentation, in turn increasing population isolation. In this context, studies have mainly focused on a single species' response to barrier elements and mitigation thereof. Yet, the implementation of conservation strategies to restore landscape connectivity may be challenging when multi-specific responses are not measured and fully considered.

Objectives

We aimed to assess the effect of two different types of LTIs, a fenced highway and a navigation canal on gene flow in three ungulate species in Northeastern France.

Methods

We genotyped 98 red deer (*C. elaphus*), 120 wild boars (*S. scrofa*) and 140 roe deer (*C. capreolus*) with species-specific microsatellite markers from 3 sampling sites located on either side of both LTIs considered in the study area. We assessed the continuity of gene flow using Bayesian clustering methods and a mapping approach to determine inter-individual genetic dissimilarity in relation to landscape characteristics.

Results

Our study showed different impacts of LTIs on the gene flow of species belonging *a priori* to the same functional group. Genetic differentiation among red deer and wild boar sampling units was observed on either side of the highway, but no such differentiation was identified for roe deer. However, no genetic structuring was associated with the presence of the canal in any species.

Conclusions

The impact of LTIs on gene flow in large species results from the structural characteristics of the infrastructure, and our study shows that mitigation measures should consider species-specific behaviors to facilitate the use of crossing structures and thus ensure gene flow across ILTs.

Keywords: Landscape genetics – Linear transport infrastructures – Microsatellites – Ungulates – Behavior

Introduction

Networks of Linear Transportation Infrastructures (LTIs) such as roadways, railways and inland waterways are necessary for the socioeconomic development of human settlements, particularly since the advent of the industrious era. Such networks extend over a large part of the earth's surface, particularly with the increasing growth of the road network over the last two decades (Dulac 2013). The highest road densities are found in some parts of South- and East-Asia as well as in North-Western Europe (Meijer et al. 2018), where many EU countries (e.g. Belgium, Luxembourg, France and Germany) have a dense and well-developed highway network (Brons et al. 2022). These countries also present the most developed inland waterways network in this part of Europe (Gus-Puszczewicz 2018). As a consequence of the fast growing urbanization and agriculture industrialization however, this dense LTI network has led to habitat loss and degradation (Coffin 2007; Muñoz et al. 2015; Poprach et al. 2016; Bennett 2017) as well as a decrease of population connectivity due to landscape fragmentation (Seiler 2001; Fahrig 2003). While for some species these artificial infrastructures provide shelter, food and represent a corridor for dispersal (Arnaud 2003; Kimmig et al. 2019; Ouédraogo et al. 2020), they present adverse effects for wildlife more often than not, including high levels of mortality due to traffic (Forman and Alexander 1998; Grilo et al. 2020) and behavioral modifications (Trombulak and Frissell 2000; Shepard et al. 2008; Roedenbeck and Voser 2008; Holderegger and Di Giulio 2010; Carvalho et al. 2018). In particular, gene flow is reduced between isolated populations (Forman and Alexander 1998; Riley et al. 2006), leading to an increased risk of inbreeding (Lesbarrères et al. 2003; Larison et al. 2021) and limited adaptive potential through reduced genetic diversity (Epps et al. 2005; Lesbarrères et al. 2006), ultimately threatening population long-term survival.

To reduce the threat of landscape fragmentation caused by LTIs, mitigation measures have emerged in recent decades to reduce wildlife mortality and increase the permeability of these infrastructures in order to restore ecological continuity (Rautenstrauch 1987; Clevenger et al. 2001c; van der Ree et al. 2007; Lesbarrères and Fahrig 2012; Gilhooly et al. 2019). Yet, implementing effective mitigation measures is costly, particularly for large mammals (Rytwinski et al. 2016; Denneboom et al. 2021). Furthermore, assessing mitigation success involves a preliminary understanding of the LTI species-specific permeability and the desired mitigation objectives. To this end, management and conservation decisions in road ecology are increasingly based on comparative analyses to explore the genetic diversity and structure of

populations confronted with artificial barriers (e.g. Before After Control Impact studies; Balkenhol and Waits 2009; Lesbarrères and Fahrig 2012).

Due to their physical characteristics, ungulates are among the species most affected by fenced or waterways with steep banks; their large size prevents them from passing through the fence, and their hooves prevent them from climbing up the steep banks once they have fallen into the water. Although the genetic impact of LTIs on ungulates has been studied in several countries (Epps et al. 2005; Pérez-Espona et al. 2008; Wilson et al. 2015; Tadano et al. 2016; Fraser et al. 2019; Lecis et al. 2022), few studies have assessed the combined impact of two different LTIs on three widespread ungulate species : red deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) (Coulon et al. 2006; Hepenstrick et al. 2012; Breyne et al. 2014; Edelhoff et al. 2020). Most of the research on these species has not focused on the isolated effect of one type of LTI but on the overall transport network and environmental factors present in their study area (Red deer: Pérez-Espona et al. 2008; Prunier et al. 2017; Edelhoff et al. 2020; wild boar: Tadano et al. 2016; Griciuvienė et al. 2021; roe deer: Coulon et al. 2006; Breyne et al. 2014; Mahmoodi et al. 2023), making it impossible to discriminate the effect of various LTI with often very different structural characteristics (e.g. highway vs. canal). For instance, wild boar seems to be genetically affected by a cumulative effect of the road network and environmental characteristics such as urban areas and farming plains (Biosa 2013; Tadano et al. 2016; Reiner et al. 2021; Lecis et al. 2022). In roe deer, Coulon et al. (2006) and Breyne et al. (2014) detected a genetic differentiation caused by the accumulation of highways and canals in the landscape, rather than by one type of LTI. In fact, only a few studies have focused on the isolated effect of an LTI, thus showing the negative effect of highways on gene flow in red deer (Frantz et al. 2012) and roe deer (Kuehn et al. 2007; Hepenstrick et al. 2012; Burkart et al. 2016) but not wild boar (Frantz et al. 2012; Kupferschmid et al. 2022). Compared with roads, the impact of navigation canals has received little attention, even though they can be a source of mortality (Peris and Morales 2004), create potential barriers to wildlife movement (Baechli et al. 2021) and limit gene flow, as observed in red deer (Edelhoff et al. 2020).

Given the variability of the LTIs impact on the genetic structure of species, further research is needed to clarify their effect. Using a set of species-specific microsatellite DNA markers, we assessed the effect of two LTIs, a fenced highway and a navigation canal, on population gene flow in *C. elaphus*, *S. Scrofa* and *C. capreolus* in the north-eastern part of France. With this work, we intend to clarify the specific impact of these two LTIs on gene flow in local ungulate

populations, in order to improve our understanding of the characteristics that make them permeable or not to these large mammals.

Materials and methods

Study area

The study was conducted in an area of approximately 70 x 50 km in the Ardennes in the Northeast of France (49°35'N, 4°37'E, Fig. 1), mainly composed of hedged farmlands and large continuous forests (22%) where two nationally important ecological corridors have been identified (Sordello et al. 2011). The forests are mostly oak (*Quercus sp*.), beech (*Fagus sylvatica*) and spruce (*Picea abies*) with regional roads, villages, a highway, a navigation canal, and unfenced railway lines crossing the area. In the south-western part of the study area, mixed farming is more intense, leading to greater fragmentation of woodland habitats. The climate is semi-continental with moderate annual precipitation (550-700mm) and an average annual temperature of 10°C. The A34 highway (62-km long) is fenced by a 2.5-m high fence with small meshes to prevent wildlife-vehicle collisions. This 2x2 lane road was opened in sections between 2001 and 2003. No wildlife crossings have been installed, although there are several overpasses and underpasses built for local traffic that can be used by wildlife to cross the highway (hereafter named non-wildlife crossings). The Ardennes Canal was commissioned in 1835. It has steep metal banks with piling walls deeply sunk into the banks and covered by a concrete block creating a return wall of about 10 cm, preventing animals from going up the bank once in the water; however, wildlife can cross the canal using non-wildlife crossings, such as bridges. No assessment of the targeted species density was carried out but the harvest data for each species are known for the study area: a total of 47 red deer, 1,464 roe deer and 1,192 wild boar were harvested during the 2021-2022 hunting season (Departmental Federation of Ardennes' Hunters). The three sampling sites (West zone (WZ), Central zone (CZ) and Eastern zone (EZ); 520 km^2 per site) are located on either side of the highway and the navigation canal (Fig.1). These three sites present similar topography, vegetation cover and human land use.

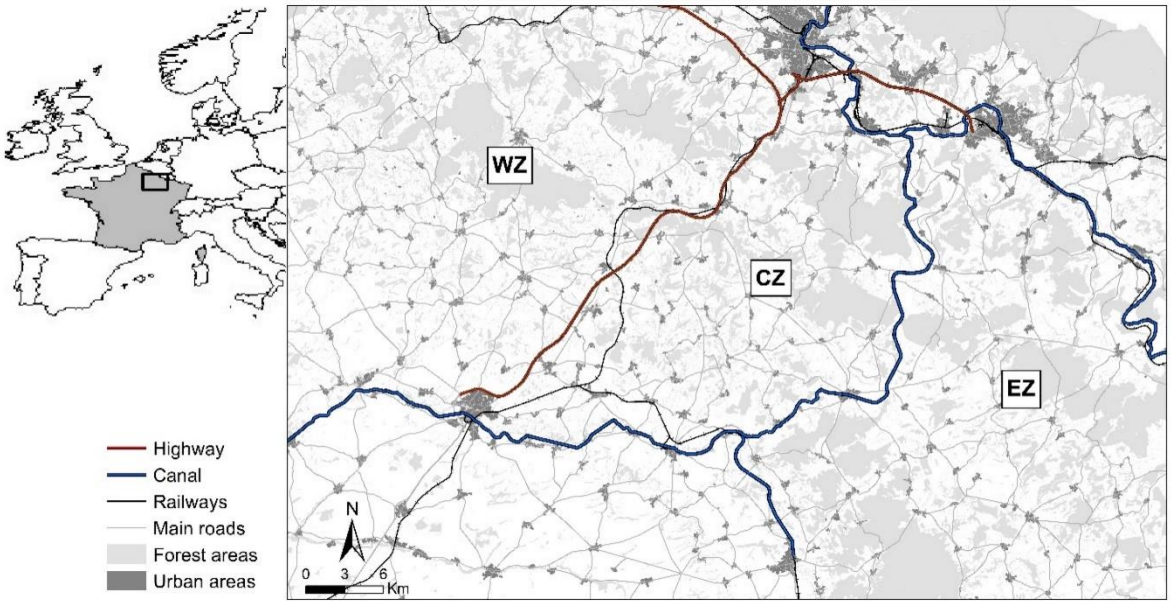


Fig.1: The location of the study area (left insert, black rectangle) in France where the three species (Red deer, Wild boar and Roe deer) were sampled. The study area was divided into three sampling sites, the West zone (WZ), the Central zone (CZ) and the Eastern zone (EZ) based on the two linear transportation infrastructures under consideration

Samples collection

Tissue samples were obtained from legally hunted red deer, wild boar and roe deer. Sampling was carried out by the Departmental Federation of Ardennes' Hunters. Red deer tissue samples (ear) were collected between October and March during the 2015-2018 hunting seasons. This population-based sampling focused on the three major forests where the red deer population is concentrated in the study area. Tissue samples (ear, muscle) from wild boar and roe deer individuals were collected between October and March during the 2020-2023 hunting seasons. For these species, a continuous individual-centered sampling was designed using a grid pattern of 150 cells of 10.4-sq. km, evenly divided between the three sampling sites (50 cells/site). As roe deer and wild boar occupy diverse habitats, the continuous approach was preferred to limit the effect of isolation-by-distance (IBD) whereby IBD can lead to the detection of artificial groupings by Bayesian clustering methods, wrongly inferring a linear barrier to gene flow (Frantz et al. 2009; Blair et al. 2012). One sample per species was taken for each cell. All tissues were conditioned in individual labelled 10ml tubes with 95% ethanol. The date and the harvesting location of each animal were recorded and plotted on a map using ESRI ArcGIS 10.2.2 software. Following collection, tissues were cut into 1x1-mm pieces and preserved at ambient temperature in 2-ml Eppendorf tubes with 95% ethanol.

Microsatellite genotyping

After an overnight enzymatic lysis of 10 mg of tissue, DNA extraction was carried out using an automated method on the KingFisher™ Flex (ThermoFisher™) with the ID Gene™ Mag Universal 384 extraction kit (Innovative Diagnostics). The loci chosen for genotyping each species were selected based on their size (≤ 400bp), their suitability for amplification in a single multiplex polymerase chain reaction (PCR), and their significance in characterizing the targeted European species.

Red deer were genotyped using 12 microsatellite loci (Table 1). Multiplex PCR was performed on 1µL of DNA in a final volume of 10µL, using the QIAGEN Multiplex PCR Kit Master Mix at 1X concentration and a final primer concentration of 0.15µM or 0.2µM for HUJ1177 and BM757 pairs. The amplification program included an initial step at 95°C for 15 minutes, followed by 45 cycles (94°C for 30s; 57°C for 90s; 72°C for 60s) and a final extension at 60°C for 30 minutes.

Table 1: Set of microsatellite loci developed for *C. elaphus* genotyping in a single multiplex PCR

Microsatellite locus	Publication	Size (bp)	Fluorescent Dye
OarFCB5	Pérez-Espona et al. 2008	76–105	6-FAM
T156	Pérez-Espona et al. 2008	129–214	6-FAM
BM1706	Galan et al. 2003	223–248	NED
RT1	Pérez-Espona et al. 2008	247–283	VIC
OarFCB304	Galan et al. 2003	124–145	VIC
HUJ1177	Galan et al. 2003	184–217	VIC
BMC1009	Galan et al. 2003	271–307	6-FAM
T26	Pérez-Espona et al. 2008	313–363	VIC
RM188/ D4S22	Pérez-Espona et al. 2008	119–139	NED
BM757	Galan et al. 2003	157–197	NED
RT7	Pérez-Espona et al. 2008	203–222	6-FAM
RT13	Pérez-Espona et al. 2008	289–329	NED

Wild boars were genotyped using 11 microsatellite markers (Table 2). Multiplex PCR was conducted on 1µL of DNA in a 10µL final volume, utilizing the QIAGEN Multiplex PCR Kit Master Mix at 1X concentration and a final primer concentration of 0.5µM each. The amplification program comprised an initial step at 95°C for 15 minutes, followed by 45 cycles (94°C for 30s; 59°C for 90s; 72°C for 60s) and a final extension at 60°C for 30 minutes.

Table 2: Set of microsatellite loci developed for *S. scrofa* genotyping in a single multiplex PCR

Microsatellite locus	Publication	Size (bp)	Fluorescent Dye
S0002	(Hagemann et al. 2022)	199–224	NED
S0005	(Cecchi et al. 2022)	202–269	VIC
S0068	(Costa et al. 2012)	238–281	NED
S0155	Hagemann et al. 2022	142–183	NED
S0227	Cecchi et al. 2022	229–272	6-FAM
S0386	(Snegin et al. 2021)	159–177	VIC
S0857	Snegin et al. 2021	137–212	6-FAM
Sw122	Hagemann et al. 2022	114–140	PET
Sw632	Hagemann et al. 2022	159–209	PET
Sw936	Snegin et al. 2021	81–117	6-FAM
Sw2410	Costa et al. 2012	112–140	VIC

Roe deer were genotyped using the following 12 microsatellite loci: IDVGA29, CSSM39, IDVGA8, BM1706, OarFC304, BMC1009, BM848, NHVRT48, CSSM41, BM757, CSSM43, and S1c11a1 (Galan et al. 2003). The PCR composition and amplification mirrored that used for red deer genotyping except for the final primer concentration, which was 0.1µM or 0.2µM for BM848 and CSSM43 pairs.

Post-amplification, amplicons were sequenced after diluting 2µL of amplicons 1:100 with a mixture of formamide and Genescan™ 500 LIZ™ size standard (Thermo Fisher Scientific Inc.). Alleles were identified under GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems) software by three persons independently.

Genetic variability analyses

Micro-Checker v.2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) was used to assess the absence of null alleles or scoring errors caused by stuttering and large allele drop-out. For all three species, genetic diversity was assessed at each sampling site according to the following measures: mean number of alleles per locus (A), allelic richness (Ar), observed (Ho) and expected (He) heterozygosities following Nei (1978), as well as the inbreeding coefficient (Fis; Weir and Cockerham 1984) with SPAGeDi 1.5 (Hardy and Vekemans 2015). Fis was tested with 10,000 permutations among individual genotypes. Linkage disequilibrium (LD) for each pair of loci and departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were estimated using FSTAT v2.9.4 (Goudet 2003) following 10,000 permutations and a Bonferroni correction for multiple comparisons.

Genetic structure

The sampling units referred to in the following analyses were established based on sampling sites corresponding to geographical areas considered *a priori* genetically isolated by the highway and the canal. Based on this assumption, the level of genetic differentiation was calculated between the three sampling units for each species using F_{ST} values (Weir and Cockerham 1984) in FSTAT v2.9.4. Significance of pairwise F_{ST} between sampling units was estimated with 10,000 permutations and subsequent Bonferroni correction for multiple comparisons.

For the three species, the genetic structure of sampling units was also analyzed using two Bayesian genetic clustering methods. First, we used a non-spatial clustering method implemented in STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) to infer the number of genetic clusters K from the individual's genotypes. We performed 20 independent runs for K=1-10, with a Markov chain Monte Carlo (MCMC) of 500,000 iterations following a burn-in of 100,000 iterations. We assumed an admixture model (individuals may have mixed ancestry), inferring separate alpha values for each sampling unit with an initial alpha value set to 1.0, and correlated allelic frequencies between sampling units. This allowed the identification of subtle subdivisions in the sampled units that were not detectable using the uncorrelated allelic frequencies method (Falush et al. 2003). The most likely number of distinct genetic clusters, K, was estimated with the Delta(K) method (Evanno et al. 2005) and the maximum value of LnP(X|K) (Pritchard et al. 2000) using CLUMPAK (Kopelman et al. 2015). For each individual, we averaged the proportion of genotype membership among all runs of the chosen K value. For all the species, we ran STRUCTURE without and with the LOCPRIOR (sampling unit information) option. The LOCPRIOR setting can be particularly informative when there are weak population structure signals by providing priors for Bayesian assignment based on the sample location and the LOCPRIOR model is not biased towards detecting structure when it is not present (Hubisz et al. 2009). Each individual was then assigned to the group for which the posterior probability was higher than 0.8.

Second, we used GENELAND v4.0.6 (Guillot et al. 2012), a Bayesian clustering method integrating the spatial coordinates of each individual when analyzing population genetic structure. We followed the same analysis procedure as described in Coulon et al. (2006) and Frantz et al. (2012) for all three species. In a first step, we inferred the number of genetic clusters by running the algorithm five times, allowing K to vary, with the following parameters: 10^6 MCMC iterations with a thinning of 1000, maximum rate of the Poisson process fixed to 100, uncertainty attached to the spatial coordinates fixed at 1 km, minimum K fixed to 1, maximum

K fixed to 10, maximum number of nuclei in the Poisson–Voronoi tessellation fixed to 300. We used the uncorrelated model as a model for allelic frequencies, as it is often more reliable than the correlated model (Basto et al. 2016; De Groot et al. 2016). In a second step, after inferring the number of populations from these five runs, we ran the algorithm 100 times with K fixed to this number. We reduced MCMC iterations to 10^5 with a thinning of 100 (suitable for a dataset of a similar size to ours, according to Guillot et al. (2012), the other parameters being identical to those in the previous step. The mean logarithm of the posterior probability was calculated for each of the 100 runs, and after excluding the first 200 values as a burn-in, the posterior probability of population membership for each pixel of the spatial domain was then computed for the ten runs with the highest values. For each individual, the probability of population membership was averaged across these 10 runs.

While Bayesian clustering methods such as STRUCTURE and GENELAND are widely used methods for detecting the presence of barriers to gene flow (Safner et al. 2011; Blair et al. 2012), they can overestimate the population genetic structure under the influence of IBD (Frantz et al. 2009; Blair et al. 2012). To limit this effect, our analyses were strengthened using the MAPI (Mapping Averaged Pairwise Information; Piry et al. 2016) procedure, implemented in the R package 'mapi'. This program is insensitive to patterns of IBD by limiting long-distance effects in the calculation of estimated genetic distances between individuals (Piry et al. 2016). In addition, visualization tools like MAPI constitute a complementary approach to the study of spatial genetic differentiation by mapping the spatial patterns of inter-individual distances. The method relies on a spatial network in which samples are linked by ellipses and a grid of hexagonal cells encompassing the study area. Pairwise metric values (see below) are attributed to ellipses and averaged within the cells they intersect. The resulting surface of variation reports a degree of genetic dissimilarity (or similarity according to the input distance metric) to each grid cell and can be displayed as a color map in Geographical Information System (GIS). Significant discontinuities in grid cell values can also be identified through a nonparametric randomization procedure. As an inter-individual analysis, this method avoids arbitrarily grouping individuals according to the sampling scheme (Prunier et al. 2013).

Two different inter-individual genetic distance metrics were used to run MAPI analyses: the Rousset a_R distance (a measure of inter-individual genetic differentiation; Rousset 2000) and the Loiselle's kinship coefficient ("LKC", the probability of identity-by-descent; Loiselle et al. 1995). Both were computed using the program SPAGeDi 1.5 (Hardy and Vekemans 2015). Several parameters were set specifically into the MAPI procedure. The dMin parameter

(i.e., minimal distance between two samples) allows the analysis to be limited to a given range of between-sample distances. To exclude pairwise comparisons between individuals from a same family group, dMin was set to 2000m, a distance known to be higher than the dispersal distance of a wild boar company and a red deer herd (Prévot and Licoppe 2014). Uncertainty on sample coordinates can also be taken into consideration, and as such the radius of the error circle was set to 1000m as our three species samples were associated with a lack of precision in geographical coordinates (we only know the hunting zone of origin). The MAPI hexagonal grid resolution was computed using a beta parameter of 0.20 which resulted in a cell half width of 450m and the eccentricity of ellipses that controls the smoothing intensity was set by default to 0.975. Finally, significant areas were estimated using 10,000 permutations of sample locations and an α value set to 0.05.

Results

Genetic diversity

A total of 98 tissue samples of *C. elaphus* (CER) have been collected in the study area and correctly amplified for all loci. Among the 121 *S. scrofa* (SUS) samples collected and amplified, one has been excluded from the dataset due to a total absence of microsatellite amplification, resulting in 120 individuals correctly amplified for at least seven loci. For *C. capreolus* (CAP), 140 individuals have been correctly amplified for all loci.

The loci HUJ1177 and RT13 showed evidence for null alleles in the CER data set, as did BM1706 locus in the CAP database. These have been removed from further analysis. None of the loci pairs showed significant linkage disequilibrium after adjustment of p-values using the Bonferroni correction for any species. In the CER data set, two loci deviated from HWE at the WZ site, but none of these deviations were significant after correction for multiple tests. In the SUS data set, while two loci deviated from HWE at the WZ site, one at both the WZ and CZ sites and one at the EZ site, none of these deviations were significant after correction for multiple tests. No departure from HWE was observed in the CAP data set.

All loci were polymorphic in all three species; the number of alleles per locus ranged from 7 to 12 for CER (mean=10; Table S1), from 4 to 19 for SUS (mean=7.36; Table S2) and from 3 to 14 for CAP (mean=7.36; Table S3). The mean number of alleles per study site was 7.9, 6.2 and 6.5 in CER, SUS and CAP respectively (Table 3). The largest variation in mean expected and observed heterozygosities was observed in CER (WZ and CZ) and SUS (WZ and EZ; Table

3). A significantly positive Fis was observed for two SUS sampled units (Fis= 7.8% for WZ and Fis= 6% for EZ, $p<0.05$ for both), exhibiting a deficiency of heterozygosity within these units.

Table 3 : Genetic diversity parameters for red deer, roe deer and wild boar sampling units at 3 sites separated by ILTs (N: sample size; A: number of alleles; Ar: allelic richness corrected for sample size; Hexp: expected heterozygosity; Hobs: observed heterozygosity; Fis: inbreeding coefficient; WZ: western zone; CZ: central zone; EZ: eastern zone)

	Sampling site	N	A	Ar	Hexp.	Hobs.	Fis
Red deer	WZ	36	7.70	7.41	0.72	0.69	0.045
	CZ	32	8.50	8.39	0.75	0.73	0.019
	EZ	30	7.50	7.70	0.74	0.74	–0.006
Roe deer	WZ	45	6.27	6.26	0.69	0.69	–0.000
	CZ	44	6.45	6.45	0.71	0.71	0.001
	EZ	51	6.73	6.61	0.71	0.69	0.022
Wild boar	WZ	42	5.91	5.84	0.65	0.60	0.078*
	CZ	38	6.45	6.44	0.68	0.67	0.028
	EZ	40	6.27	6.26	0.67	0.63	0.060*

*Indicates significant Fis value at $p < 0.05$

Genetic structure and discontinuity

Pairwise F_{ST} values among sampling units ranged from 0.001 to 0.054 for CER, from 0.013 to 0.041 for SUS and from 0.003 to 0.014 for CAP (Table 4). Significant genetic differentiation between individuals on either side of the highway was observed in CER and SUS ($p<0.0001$ for both species; Table 4). As compared to SUS ($p<0.001$), no significant genetic differentiation was observed between individuals on either side of the canal in CER and CAP (Table 4). Pairwise estimates of Fst between the two most distant sampling sites suggested significant genetic differentiation for all the species studied ($p<0.0001$; Table 4).

Table 4: Pairwise genetic differentiation of sampling units (Fst) between sampling units with significant differences after Bonferroni correction for multiple comparisons indicated below the diagonal (*p<0.05, **p<0.001, *** p<0.0001)

	Sampling site	WZ	CZ	EZ
Red deer	WZ	-	0.045	0.054
	CZ	***	-	0.001
	EZ	***	ns	-
Roe deer	WZ	-	0.003	0.014
	CZ	ns	-	0.005
	EZ	***	ns	-
Wild boar	WZ	-	0.041	0.029
	CZ	***	-	0.013
	EZ	**	**	-

Two genetic clusters were observed in the CER dataset based on STRUCTURE and GENELAND analyses (based on the five initial runs; Fig. S1). When no geographic information was provided, these genetic clusters corresponded to the sampling units separated by the highway (Fig. 2a) and this was even more significant when sample information was specified (Fig. 2b). A genetic discontinuity corresponding to the presence of the highway was also suggested by GENELAND (Fig. 2c). Although two individuals showed a level of genetic assignment $q \geq 0.8$ associated with the side of the highway opposite to their sampling location in the STRUCTURE analysis without location information (Fig. 2a), these individuals' q-value decreased ($q<0.6$; Fig. 2b), when sample location was added, approaching the value obtained with GENELAND ($q<0.1$; Fig. 2c).

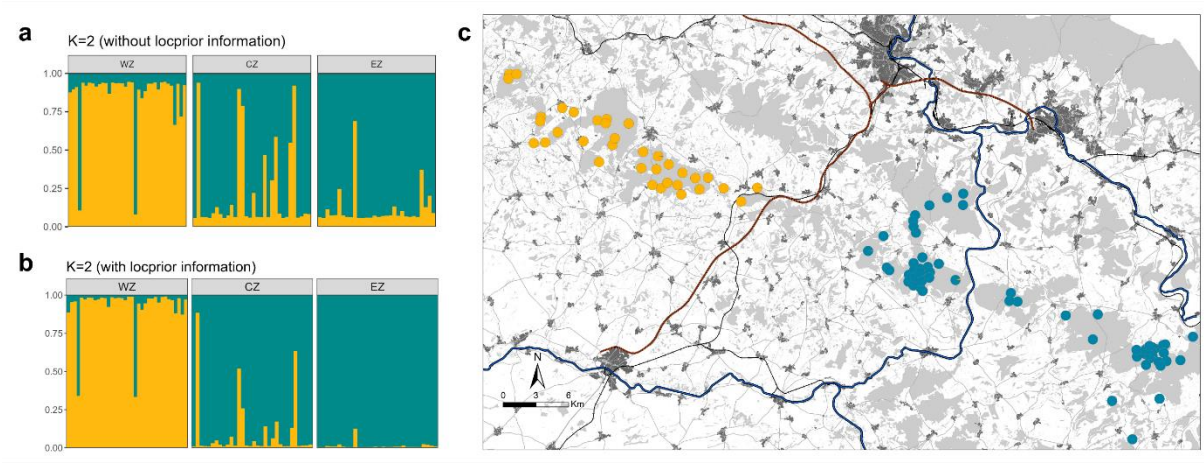


Fig. 2: Results of genetic clustering analysis obtained with STRUCTURE and GENELAND for three red deer sampling units: STRUCTURE plots (a) without and (b) with LOCPRIOR information. In the plots, individuals are shown with vertical lines, and the membership proportion is shown on the y-axis; (c) Genetic clusters membership values obtained using GENELAND. For each individual, the colours correspond to the percentage of membership of the genetic clusters inferred. The red and blue lines correspond to the highway and the canal, respectively

For SUS, three genetic clusters were identified under STRUCTURE while the maximum LnP(X|K) value resulted in only one genetic cluster (Fig. S2). When K=3, the membership of each individual was uniformly distributed between the clusters identified (average membership for cluster 1 = 32.8%, for each of clusters 2 and 3 = 33.6%) and no obvious spatial clustering of individuals was observed (Fig. 3a). With the sample information included, two genetic clusters were inferred by STRUCTURE (Fig. S2), suggesting a genetic boundary between individuals on either side of the highway (Fig. 3b). The cartographic visualization of the results obtained with GENELAND, which inferred two genetic clusters (Fig. S2), similarly matched with the location of the highway (Fig. 3c). For both CER and SUS, neither clustering methods revealed genetic structuring associated with the canal.

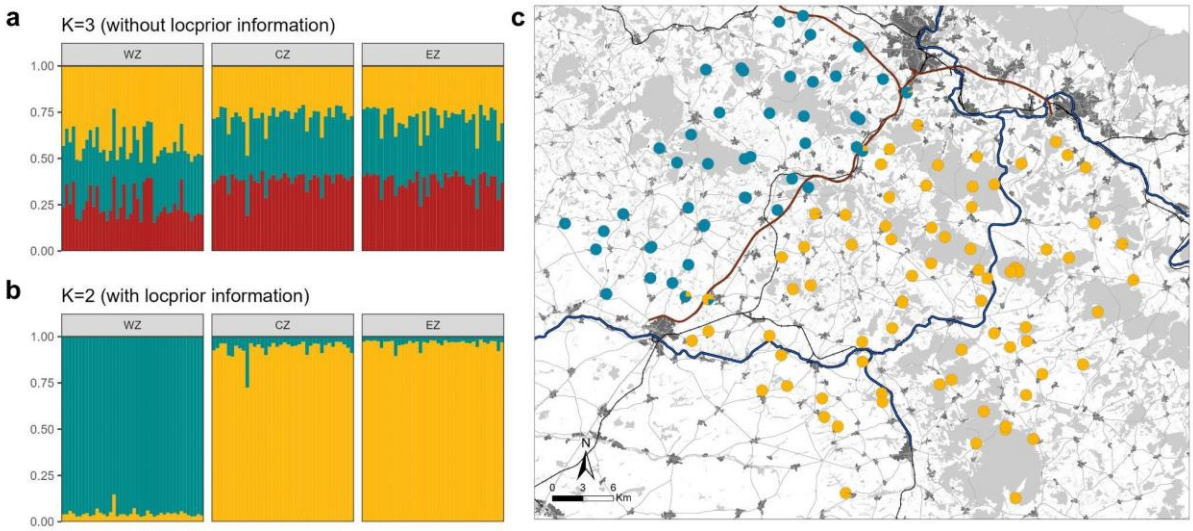


Fig.3: Results of genetic clustering analysis obtained with STRUCTURE and GENELAND for three wild boar sampling units: STRUCTURE plots (a) without and (b) with LOCPRIOR information. In the plots, individuals are shown with vertical lines, and the membership proportion is shown on the y-axis; (c) Genetic clusters membership values obtained using GENELAND. For each individual, the colours correspond to the percentage of membership of the genetic clusters inferred. The red and blue lines correspond to the highway and the canal, respectively

For CAP, all methods inferred only one genetic cluster (Fig. S3), suggesting a panmictic population throughout the study area (Fig. 4a and c). However, when sample information was added in STRUCTURE, two genetic clusters were identified (Fig. S3); individuals from WZ and EZ were assigned to a different group with individuals from CZ assigned to either group (Fig. 4b).

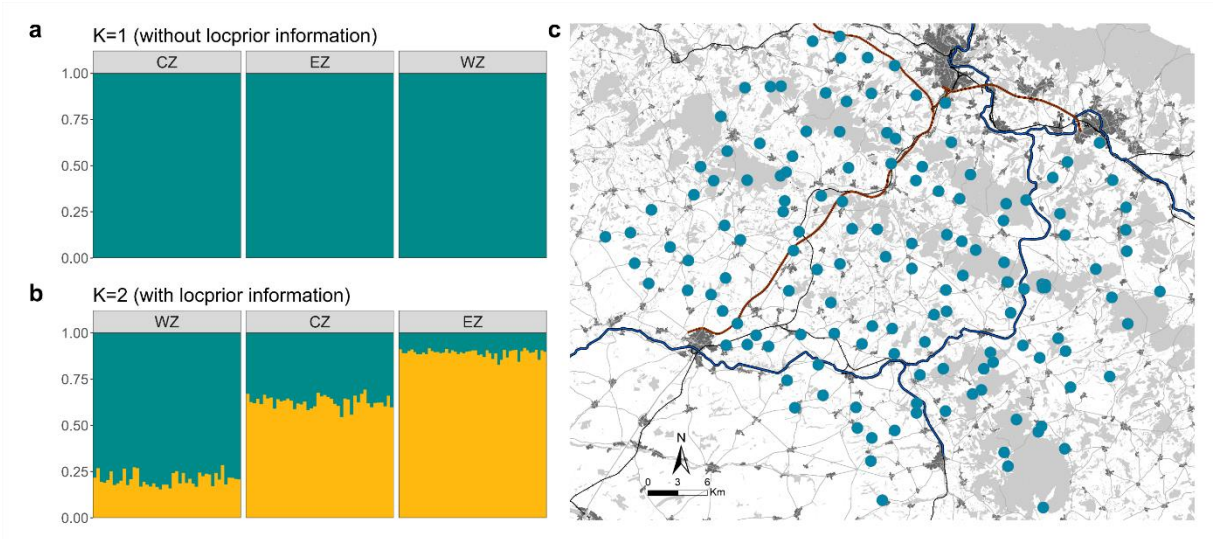


Fig.4: Results of genetic clustering analysis obtained with STRUCTURE and GENELAND for three roe deer sampling units: STRUCTURE plots (a) without and (b) with LOCPRIOR information. In the plots, individuals are shown with vertical lines, and the membership proportion is shown on the y-axis; (c) Genetic clusters membership values obtained using GENELAND. For each individual, the colours correspond to the percentage of membership of the genetic clusters inferred. The red and blue lines correspond to the highway and the canal, respectively

Cartographic visualization using MAPI software indicated significant spatial variation in the pairwise genetic distances among individuals in CER with both the a_R and the LKC values showing a significantly higher inter-individual genetic dissimilarity area (Fig. 5a and 5d). The area highlighted by both indices was characterized by the location of the highway. Conversely, two areas of significantly low genetic dissimilarity were identified west of the highway and east of the canal using the LKC coefficient (Fig. 5d). In the case of SUS, no area of significantly high genetic dissimilarity was detected by the a_R index values (Fig. 5b). In contrast, the map obtained with the LKC coefficient revealed a genetic discontinuity among individuals located along the highway involving two areas of significantly higher genetic dissimilarity (Fig. 5e). An area of significantly lower genetic dissimilarity to the west of the highway was also detected (Fig. 5e). For CAP, neither inter-individual genetic distance metrics indicated an area of significantly high genetic dissimilarity across the LTIs in this landscape (Fig. 5c and 5f).

For all three species, MAPI did not detect any unexpected areas of genetic discontinuity that did not overlap with the LTIs studied, thus ruling out IBD. In the case of roe deer, the only significant area of genetic discontinuity was in a sample-free space, forcing cells to be informed by long-distance connections, thus likely to provide biased results (Fig. 5c and 5f; Piry et al. 2016).

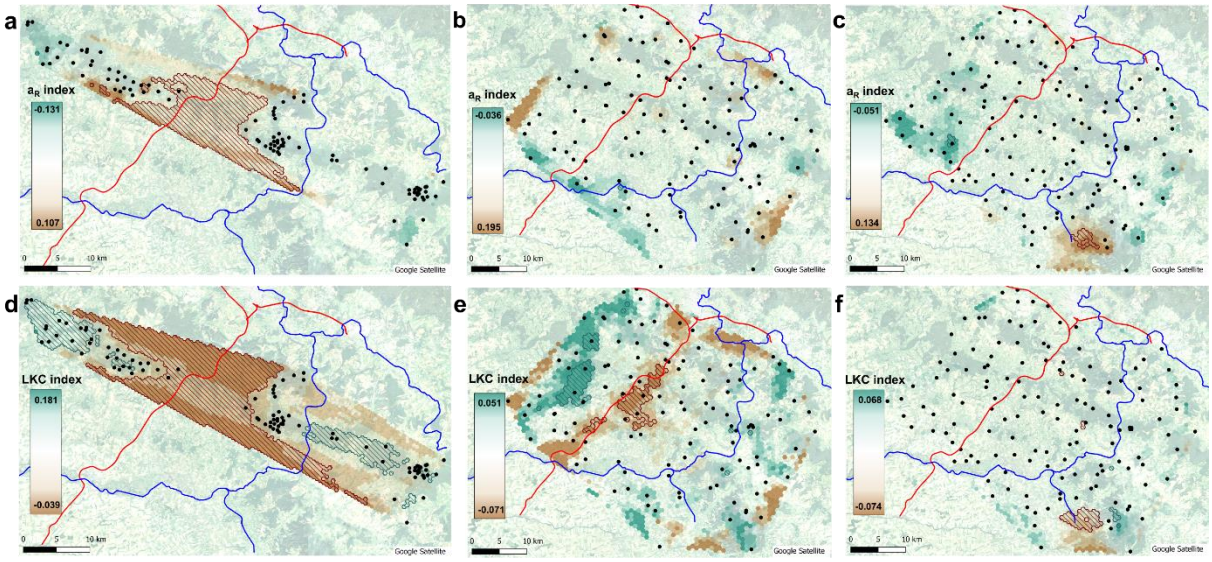


Fig. 5: MAPI graphical outputs inter-individual genetic distances based on Rousset's distance (a_R; a-c) and Loiselle's kinship coefficient (LKC; d-f) for red deer (a and d), wild boar (b and e) and roe deer (c and f) individuals. Genetic dissimilarity is represented by a color scale ranging from blue (lower genetic dissimilarity) to brown (higher genetic dissimilarity). The a_R distance measures genetic dissimilarity, while the LKC coefficient measures genetic similarity. For comparison, the order of the LKC values have been inverted on the color scale to match the visualizations obtained for a_R. Significant discontinuous or continuous areas are designated by hatched brown or blue polygons, respectively. Black dots indicate sample locations. The red and blue lines correspond to the highway and the canal, respectively

Discussion

This study highlights the variability of LTIs' effects on gene flow for ungulate species. On the one hand, our results suggest that a given transport infrastructure (e.g. highway) can have a species-specific degree of permeability: a barrier to gene flow for red deer and, to a lesser extent for wild boar, but not for roe deer. On the other hand, this permeability may vary according to the type of transport infrastructure, given the absence of any negative impact on gene flow associated with the canal for the three study species. While our conclusions support findings from Remon et al. (2022), our results also highlight the different responses to the same obstacle from species with similar life-history traits.

Contrasted impact of the highway

Our findings support the role of highways in shaping red deer population genetics (Pérez-Espona et al. 2008; Frantz et al. 2012; Prunier et al. 2017; Westekemper 2022). The spatial separation between red deer sampling sites on either side of the highway may contribute to this pattern, potentially confounded by IBD. However, given the species' dispersal capacity (up to 17 km for yearling males; Prévot and Licoppe 2013) and the distance between red deer sampling units in our system (15 km apart), IBD alone seems an unlikely explanation. If IBD was the dominant factor, we would expect to find related pairs (as measured by the LKC coefficient) among samples in the central zone, as limited dispersal would be enough to create local genetic structuring (Frantz et al. 2010). However, our results suggest that the highway acts as a significant barrier, overshadowing the effects of IBD at this scale and substantially restricting gene flow between the populations west and east of the highway (sampling units CZ and EZ).

Unlike the red deer, our results contrast with previous work on the sensitivity of wild boar (Frantz et al. 2012) and roe deer (Coulon et al. 2006; Kuehn et al. 2007; Hepenstrick et al. 2012; Burkart et al. 2016) to highways. Our results showed moderate genetic structuring in wild boar in the presence of the highway. While other studies reported a combination of environmental features (urban areas, intensively farmed plains) and LTIs (roads, railways) as the main cause of wild boar genetic structuring (Biosa 2013; Tadano et al. 2016; Reiner et al. 2021; Lecis et al. 2022), to our knowledge, only two studies have focused only on the effect of highways. Kupferschmid et al. (2022) demonstrated that the presence of wildlife crossing structures facilitates boar gene flow and Frantz et al. (2012) hypothesized that wild boar might cross a highway when wildlife crossing structures are lacking. The fact that the highway studied by Frantz et al. (2012) features sparse fencing could explain the absence of a detectable genetic

signal from crossing opportunities at the ends of the fenced sections (Huijser et al. 2016). Yet, our camera trap survey conducted in 2021 on 30 highway structures along the A34 (13 culverts, 16 underpasses, 2 bridges) showed that wild boar crossings were extremely rare with only nine crossing events being recorded at a single location in the northern part of our study area (unpublished data). To reduce the rate of wildlife-vehicle collisions, high-traffic roads such as highways are often equipped with wildlife exclusion fences (Clevenger et al. 2001c; Rytwinski et al. 2016). However, these fences can act as barriers, restricting the movements of large fauna and thereby reducing gene flow (Jaeger and Fahrig 2004; Olsson and Widen 2008; Holderegger and Di Giulio 2010; Hepenstrick et al. 2012; Jones et al. 2022), unless effective crossing structures are implemented to mitigate this negative impact (Huijser et al. 2009; Rytwinski et al. 2016; Gilhooly et al. 2019; Boyle et al. 2021). The A34 highway is fully operational since 2003 and has been fenced along its entire length; however, no specific wildlife exclusion system has been installed to direct animals towards the 64 non-wildlife crossings available (e.g., bridges and tunnels designed for vehicular traffic; Dodd et al. 2007; Glista et al. 2009; van der Ree et al. 2015).

Conversely, the genetic structure of roe deer sampling units appeared to be unaffected by the highway in the area, suggesting unconstrained gene flow between sampling areas. Our findings differ from those of Kuehn et al. (2007) and Hepenstrick et al. (2012) who reported genetic differentiation of roe deer populations located on either side of highways. Our 2021 camera trap monitoring confirmed numerous roe deer passages on 12 structures spread along the highway (2 bridges and 10 underpasses; unpublished data). While the use of these passages alone could therefore explain our results, several authors have also reported roe deer using non-wildlife crossings to cross highways (Mata et al. 2005; Bhardwaj et al. 2020).

Waterway permeability for ungulates

Waterways often include steep concrete or metal banks which constitute a death trap (e.g. drowning) for animals unable to climb back onto the banks, thus causing an effective barrier to animal dispersal (Edelhoff et al. 2020). Yet, we did not observe any barrier effect of the Ardennes Canal in the three species we studied apart from a slight genetic differentiation for roe deer. We believe it may be due to the simultaneous presence of the highway and the canal (Coulon et al. 2006; Breyne et al. 2014). Coulon et al. (2006) reported that a landscape element assumed to have a barrier effect on roe deer gene flow would act more as a moderator, but that the cumulative effect of several LTIs would lead to genetic differentiation. Furthermore, the

slight genetic differentiation detection in roe deer revealed only by STRUCTURE illustrates a difference in the ability of Bayesian clustering methods to consistently estimate membership probabilities (Coulon et al. 2006; Chen et al. 2007; Safner et al. 2011; Blair et al. 2012).

The presence of 47 potential crossings (bridges) likely allows individuals to move across the canal (Peris and Morales 2004; Baechli et al. 2021; Azedo et al. 2022). For instance, the canal flows through a 275m-long tunnel over which a forested area has been maintained, thus representing a major point of connectivity across the canal. In addition, previous research has demonstrated the existence of a time lag between spatial genetic patterns and the effects induced by landscape changes (Landguth et al. 2010). When the dispersal abilities of organisms are relatively high, the impact of a barrier can be lost within 15 generations once removed (Landguth et al. 2010). The Ardennes Canal has been part of the landscape for over a century. Since the deindustrialization of Eastern France in the 1970s, freight traffic on the canal has significantly declined, followed by a reduction in recreational boating three decades later (Voies Navigables de France et al. 2022). This decline in activity has resulted in decreased bank maintenance, likely leading to more natural slopes in certain areas where animals can cross safely without the risk of drowning. In fact, several animal trails were observed on these natural slopes, suggesting that wildlife has identified and utilized these safe passages across the canal. Over time, the emergence of alternative crossings and the canal's gradual deterioration have likely increased its permeability to gene flow, thereby reducing its barrier effect for ungulates.

On the importance of physical and behavioral approaches

To assess the genetic impact of LTIs on populations and develop effective mitigation measures, it is essential to consider the physical characteristics of the species that influence their ability to move across infrastructures. Hoofed species may be the most vulnerable to waterways due to the challenge that steep banks represent when animals are in the water. For instance, a study in Spain found higher drowning mortality in roe deer and wild boar than in carnivores (Peris and Morales 2004). In the case of fenced roads, large species as ungulates are the most impacted and can mostly cross through wide crossing structures (Clevenger and Waltho 2005; Mata et al. 2005). For instance, there is a direct positive relationship between the size of the animal and the size of the passage used (Mata et al. 2005). Yet, large passages are the most expensive mitigation measures for LTIs, making them the least commonly implemented, thus limiting crossing opportunities for large species.

Behavioral responses to anthropogenic infrastructures may also be considered in explaining the genetic impact of LTIs. Red deer and wild boar prefer areas away from roads (D'Amico et al. 2016) while roe deer can exhibit habituation behavior in a human-dominated landscape (Bonnot et al. 2013), with an ability to tolerate a certain proximity with anthropogenic elements of the landscape. In fact, the permeability of LTIs results from species habituation to crossings (Clevenger and Waltho 2003; Boyle et al. 2020). Previous works have observed an increase in the use of crossing structures by red deer after a few years of operation, suggesting habituation to crossings over time (Glista et al. 2009; Gagnon et al. 2011). This behavioral process could then further explain the difference in our results for wild boar as compared to Frantz et al.'s (2012). The bridges built for local traffic and the degradation of the canal banks over more than 50 years may have given the animals time to find safe crossings and get accustomed to them, thus maintaining gene flow across the canal. By contrast, species sensitive to human activity may avoid or reduce their use of crossing structures along LTIs as human activity increases (Hamilton et al. 2024). Furthermore, a typically shy species may be less prone to exploring new environments and more likely to stay away from these infrastructures whose unfamiliar characteristics are enhanced by vehicle traffic and human activity.

Conclusions and recommendations

While increasing the number of samples and loci could have improved the resolution of the genetic structure for the units studied here (Evanno et al. 2005; Landguth et al. 2012), our study demonstrates that gene flow in red deer and wild boar can be constrained by some LTIs (e.g. highway) when there is a lack of suitable and functional crossings. By contrast, the highway does not disrupt genetic connectivity in roe deer. We propose that the development of current and future LTIs should be based on two approaches to ensure their permeability to wildlife. First, the design of mitigation structures should consider the physical characteristics of the species for which they are intended to facilitate crossings. Not all species are similarly affected by LTIs and the cost of installing crossing structures or improving existing structures varies according to the species physical characteristics considered (Cerema 2021). In addition, behavior should be considered when planning solutions for the permeability of transport infrastructures (Lesbarrères et al. 2004). The presence of a passage across an LTI does not immediately translate into a pathway providing access to favorable areas (Varela 1992; Gerard and Maublanc 2023). While this process can take time (Dillon et al. 2020), habituation is often

essential for species to adopt crossings and maintain or re-establish gene flow. Habituation can be further encouraged through strategies aimed at directing individuals toward crossing structures. For example, creating artificial animal trails with odor cues (such as urine or feces) within the crossing structure could increase its use by wildlife (Dupuis-Desormeaux et al. 2018). Ultimately, functional connectivity should be assessed using a multi-species approach over suitable timescale, enabling mitigation efforts to effectively address species-specific behavioral responses to landscape changes over time.

Author contribution

RH contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by LDdF, MM, RH, MLB and DL. EG contributed his expertise in monitoring non-wildlife structures. MG, IV and AJ completed all laboratory analyses. The first draft of the manuscript was written by LDdF and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank all hunters who collaborated for the samples collection, especially Aurore Hubert who coordinated the collection. We are also grateful to Karine Berthier for her advice on interpreting the results from the MAPI software. Thanks to Stéphane Betoulle, Jean-François Gerard and Manon Poignet for their comments that helped improve the manuscript. Finally, we would like to thank the DREAL (Direction Régionale, de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement du Grand Est), the ANRT (Association Nationale Recherche et Technologie), the MTECT (Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires) and the ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) through ITTECOP research program, the URANO company, the OFB (Office Français de la Biodiversité), the Ardennes Departmental Federation of Hunters (Fédération Départementale des Chasseurs des Ardennes), the Communauté de Communes des Crêtes Préardennaises, the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise, the CEREMA (Centre d'études et d'expertise sur les risques , la mobilité et l'aménagement), the URCA (University of Reims Champagne-Ardenne) through the EFACILT research program and the URCA-CERFE (Centre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie) for funding this research.

Statements and Declarations

Funding This work was supported by the DREAL (Direction Régionale, de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement du Grand Est), the ANRT (Association Nationale Recherche et Technologie), the MTECT (Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires) and the ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) through ITTECOP research program, the URANO company, the OFB (Office Français de la Biodiversité), the Ardennes Departmental Federation of Hunters (Fédération

Départementale des Chasseurs des Ardennes), the Communauté de Communes des Crêtes Préardennaises, the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise, the CEREMA (Centre d'études et d'expertise sur les risques , la mobilité et l'aménagement), the URCA (University of Reims Champagne-Ardenne) through EFACILT research program, the URCA-CERFE (Centre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie).

Competing interests The authors declare no competing interests.

Data availability The dataset generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval No approval of research ethics committees was required to accomplish the goals of this study because our work was conducted on non-invasive samples.



CHAPITRE 2 • USE OF HIGHWAY STRUCTURES BY MAMMALS AND THEIR CONTRIBUTION TO FUNCTIONAL CONNECTIVITY

Résumé du chapitre

L'expansion du réseau routier mondial accentue les collisions avec la faune et renforce la fragmentation des habitats. Pour y remédier, la combinaison de clôtures et d'ouvrages spécialement conçus pour le passage de la faune constitue une solution efficace, mais coûteuse et donc difficile à généraliser. Dans ce contexte, considérer les ouvrages non dédiés au passage de la faune (non-PAF ; i.e. buses, ponts agricoles) peut s'avérer bénéfique au déplacement de la faune : ils n'engendrent pas de surcoût puisque déjà présents, et régulièrement répartis le long des routes. Leur efficacité reste cependant variable selon leurs caractéristiques, leur environnement et les espèces considérées, ce qui nécessite des études approfondies pour orienter les aménagements en faveur de la perméabilité des infrastructures de transport. Ainsi, cette étude a pour objectif d'inventorier les non-PAF potentiellement fonctionnels pour le passage de la faune sur une autoroute clôturée du nord-est de la France. Plus précisément, elle vise à identifier les types de structures les plus empruntées, les espèces utilisatrices et les facteurs influençant leur utilisation. Par ailleurs, trois espèces d'Ongulés – le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*), le Chevreuil européen (*Caproelus capreolus*) et le Sanglier (*Sus scrofa*) – ont fait l'objet d'une attention particulière en lien avec l'effet variable de l'autoroute sur leur connectivité génétique. Cette approche permet de mieux appréhender la contribution des non-PAF à cette connectivité et leur rôle potentiel en complément des mesures d'atténuation existantes. Entre avril 2021 et mai 2022, 29 pièges photographiques ont été déployés sur 16 buses, 11 ponts-cadre et 2 ponts. Les résultats ont détecté la présence de 16 espèces de mammifères terrestres empruntant les non-PAF, avec une préférence générale pour les ponts-cadre. Les petits et moyens carnivores se montrent opportunistes, utilisant divers types d'ouvrages, alors que les ongulés se révèlent plus sélectifs : le cerf et le sanglier les traversent rarement, tandis que le chevreuil les utilise davantage, mais seulement si les structures sont suffisamment larges et hautes (≥ 4,4 m). Aucune relation forte n'a été identifiée entre les caractéristiques environnementales et l'utilisation des non-PAF. Cela suggère que leur emplacement favorise déjà le passage de la faune et que les attributs structurels sont plus déterminants que le paysage environnant. Enfin, cette étude a pu mettre en avant la convergence des résultats issus du suivi photographique et des analyses génétiques : les non-PAF facilitent les déplacements et le flux génétique du chevreuil, mais pas ceux du cerf élaphe ni du sanglier. Leur contribution à la connectivité génétique varie donc selon les espèces considérées. L'étude souligne l'intérêt de disposer de plusieurs sites de franchissement polyvalents sur les routes clôturées, tout en tenant compte des comportements spécifiques à chaque espèce pour évaluer leur efficacité. Elle souligne aussi l'importance d'une approche combinant différents outils de recherche pour évaluer de façon optimale la connectivité fonctionnelle.

Use of highway structures by mammals and their contribution to functional connectivity

L. Dispan de Floran[1,2], G. Valance[3], M. Le Barh[4], S. Maudet[4], A. Hubert[5], E. Guinard[6], P. Hubert[4], D. Lesbarrères[7,8], R. Helder[4]

[1] SNC URANO, rue François Urano, 08000 Warcq, France

[2] URCA, UMR-I 02, SEBIO, UFR SEN, Campus du Moulin de la Housse, 51100 Reims, France

[3] URCA, Lab-I*, UFR SEN, Campus du Moulin de la Housse, 51100 Reims, France

[4] URCA-CERFE, 5 rue de la Héronnière, 08240 Boult-aux-Bois, France

[5] FDC 08, 49 rue du Muguet, 08090 Saint-Laurent, France

[6] Cerema Dter Sud-Ouest, rue Pierre Ramond, CS 60013, 33166 Saint-Médard-en-Jalles, France

[7] Environment and Climate Change Canada, 1125 Colonel By Drive, Ottawa, ON K1S 5B6, Canada

[8] BIODIVAG, Université d'Angers, Campus Belle Beille, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers, France

Corresponding authors:

Lucie Dispan de Floran

lucie.dispan@gmail.com

Rémi Helder

Remi.helder@univ-reims.fr

Abstract

The movement of terrestrial mammals across fenced roads can be facilitated by existing road structures (under- and overpasses, culverts) not specifically designed for wildlife, though their effectiveness may vary worldwide due to differences in environmental conditions and local populations dynamic. Using camera traps, we assessed the use of 29 such structures along a fenced highway in France and recorded crossings from 16 wild mammal species. Overall, carnivores frequently used a greater number of structures while roe deer only crossed through passages at least 4.4 m in both height and width. Red deer and wild boar rarely used these structures, suggesting they are unsuitable for these species. Comparison with a related genetic study suggests that the use of non-wildlife crossing structures supports species-specific genetic connectivity, confirming their complementary role alongside existing mitigation measures. The study highlights the value of considering multipurpose crossing sites to maintain permeability across fenced roads.

Keywords: Non-wildlife crossing structures – Ungulates – Mammals – Highway – Road ecology – Conservation

Introduction

Global road network covers a significant portion of the Earth's surface and is projected to expand by 14% to 60% by 2050 relative to 2010 levels (Dulac 2013; Meijer et al. 2018). Roads represent a major source of mortality for a broad range of vertebrate species, primarily due to collisions with vehicles (Forman and Alexander 1998; Seiler and Helldin 2006; Glista et al. 2008; Fahrig and Rytwinski 2009; Grilo et al. 2020, 2021), in turn leading to local population declines (Jackson and Fahrig 2011; Winton et al. 2020). With the aim of mitigating wildlife-vehicle collisions and the associated socio-economic costs - especially those involving large mammal species (Cramer et al. 2015; Ascensão et al. 2021) - road managers have increasingly incorporated the installation of exclusion fences along high-traffic roads. While exclusion fencing has proven effective in reducing vehicle collision risks (Clevenger et al. 2001c; Rytwinski et al. 2016), it may exacerbate the barrier effect of roads by restricting the movement of terrestrial wildlife, thereby impeding gene flow between populations (Jaeger and Fahrig 2004; Olsson et al. 2008; Holderegger and Di Giulio 2010; Hepenstrick et al. 2012; Dispan de Floran et al. 2025). This restriction can result in reproductive isolation of populations on either side of the fenced road, potentially leading to deleterious effects such as increased risk of

inbreeding (Larison et al. 2021) and reduced genetic diversity (Epps et al. 2005; Lesbarrères et al. 2006), ultimately threatening long-term population viability. To address these issues, the most effective strategy for simultaneously reducing wildlife-vehicle collisions and mitigating the barrier effect of roads is to combine fencing with wildlife crossing structures (WCS), such as underpasses and overpasses, in road infrastructure planning (Seiler and Helldin 2006; Huijser et al. 2009; Sawyer et al. 2012; Smith et al. 2015; Rytwinski et al. 2016; Gilhooly et al. 2019). Exclusion fences guide wildlife away from the road while directing them toward crossing structures that enable safe passage (Dodd et al. 2007; Glista et al. 2009; Klar et al. 2009; Simpson et al. 2016). The effectiveness of such structures is enhanced when their design considers the ecological preferences of target species and when they are strategically placed in locations with high wildlife crossing activity (Lesbarrères and Fahrig 2012). However, the high costs associated with installing these structures limit their widespread implementation along road networks (Rytwinski et al. 2016).

In case where the distribution of multiple small crossings, rather than a single large one, could be an important factor in maintaining road permeability (Karlson et al. 2017a; Helldin 2022), integrating non-wildlife crossing structures (non-WCS, i.e. drainage culverts or passages for livestock and vehicle access) into wildlife mitigation planning may be beneficial. These structures offer several advantages: they are cost-effective compared to WCS, widely available, and evenly distributed along road networks. Using camera traps, previous studies have demonstrated that non-WCS can facilitate crossings for terrestrial mammals with diverse physical and ecological traits (ungulates: Donaldson 2007; Seiler and Olsson 2009; Wang et al. 2018; Bhardwaj et al. 2020; large and medium-sized carnivores: Ascensão and Mira 2007; Grilo et al. 2008; Warnock-Juteau et al. 2022; Jensen et al. 2022; small carnivores and non-carnivores: Clevenger et al. 2001a; Mata et al. 2005, 2009; Ascensão and Mira 2007; Grilo et al. 2008; Brunen et al. 2020). Road structures initially designed for other purposes, such as culverts, underpasses, or overpasses, could therefore serve dual functions, reducing the cost of improving road permeability. However, the effectiveness of non-WCS depends on structural attributes (e.g., type and dimensions) and surrounding landscape features (e.g., forest cover percentage, proximity to urban areas, or nearby crossings; Clevenger et al. 2001a; Ascensão and Mira 2007; Seiler and Olsson 2009). These factors appear to influence species and species communities differently. For instance, structural attributes seem to primarily affect the passage of ungulates (Seiler and Olsson 2009; Bhardwaj et al. 2020), while small mammals, both

carnivorous or not, appears to be more influenced by surrounding habitat features and levels of human disturbance (Ascensão and Mira 2007; Grilo et al. 2008).

Furthermore, crossing structures use may vary depending on the landscape and the animal communities present. In North America, the presence of predators in highway underpasses can strongly influence their use by large ungulates such as deer (*Odocoileus* sp.), which tend to avoid them (Clevenger and Waltho 2005; Caldwell and Klip 2020). In contrast, a study conducted in Poland by Mysłajek et al. (2020) found that the presence of wolves (*Canis lupus*) did not hinder the movement of prey species through the under- and overpasses of a highway. Additionally, Brunen et al. (2020) found that drainage culverts were not suitable for enabling most small- and medium-sized mammals to cross the highway in their study area in Quebec, Canada. Notably, the red fox (*Vulpes vulpes*) was rarely, if ever, observed fully crossing these structures, whereas a larger species, the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), regularly used them. These findings contradict previous studies in Western Europe, suggesting that culverts facilitate highway crossings for generalist carnivores like the red fox (Grilo et al. 2008) while being unsuitable for ungulates such as red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boar (*Sus scrofa*; Mata et al. 2005). This variability underscores how species' responses to road-crossing structures can differ significantly across varying environments. Therefore, it is essential to conduct further studies in various landscapes to better understand the effectiveness of road structures in maintaining gene flow and functional connectivity across transportation infrastructures and ultimately guide the design of transport infrastructures toward more sustainable solutions, both for existing structures and future developments.

In this study, we assessed the use of non-WCS by a wide range of mammal species on a fenced highway in northeastern France. The primary objective was to provide an inventory of "transparators" (functional landscape elements facilitating wildlife movement across linear landscape barriers) that could maintain a certain degree of connectivity across the highway. Using camera trap monitoring, our specific objectives were: (1) to determine the most frequently used types of structures (under- and overpasses, culverts), (2) to identify the taxa/species using non-WCS to cross the highway, and (3) to characterize the structural and environmental attributes influencing the use of these alternative structures. Particular attention was given to red deer, wild boar, and roe deer, in relation to the contrasting genetic impact of the highway on these ungulate populations revealed in a related study (Dispan de Floran et al.

2025). With this comparative approach, we intend to clarify the contribution of non-WCS to genetic connectivity and their potential role as a complement to existing mitigation measures.

Materials and methods

Study area

The study was conducted along a 29 km section of the A34 highway (between kilometer markers 35-64) which connects the towns of Charleville-Mézières and Rethel in the Northeast of France (**Figure 8**). This 2x2 lane highway was opened to traffic in sections between 2001 and 2003. From its construction, the highway was fully fenced (2.5 m high) to prevent vehicle-wildlife collisions. According to 2023 data from the North Interdepartmental Roads Directorate (DIRN), the highway carries an annual average daily traffic of ~8,945 vehicles, including ~10% heavy vehicles. The studied highway section contains 64 structures (culverts, overpasses, underpasses), spaced at an average distance of 517 m (SD= 297 m, range = 12.69 - 1570.18), primarily built for local traffic and drainage purposes. To date, no specific wildlife crossings have been constructed.

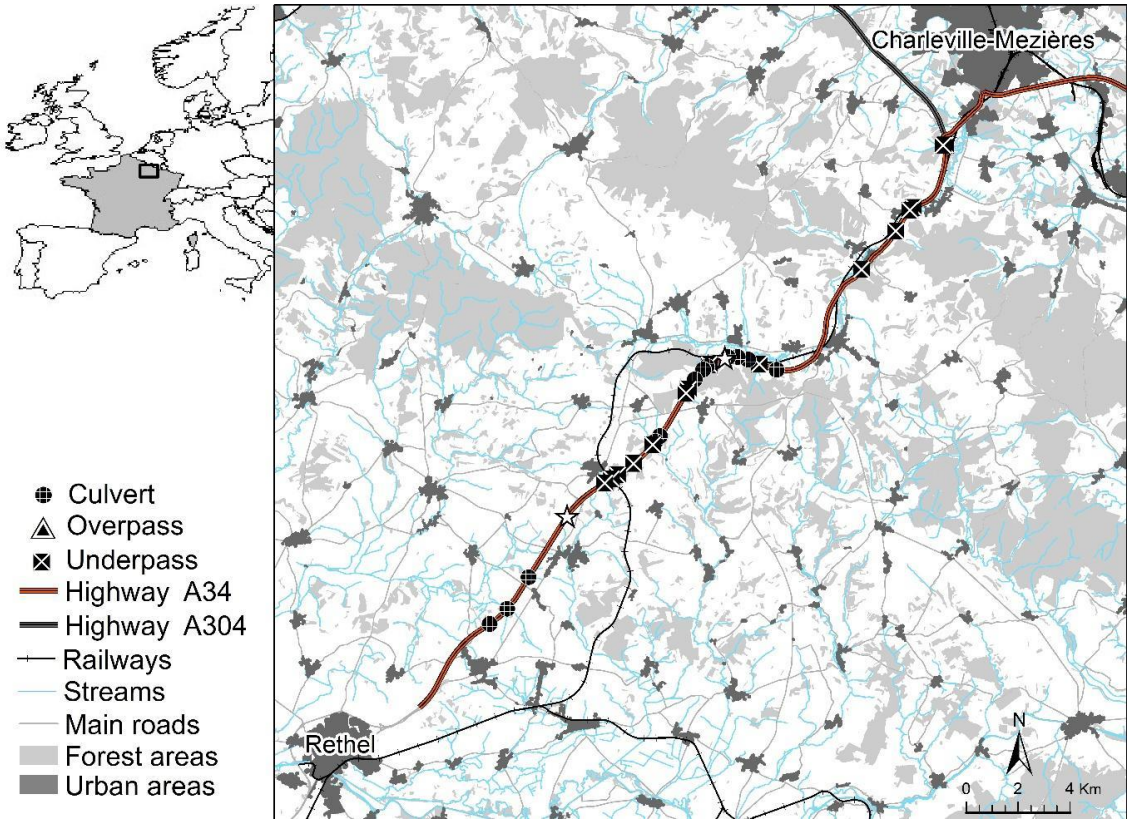


Figure 8 : Study area and location of the crossing structures along the section of the A34 highway in northeastern France

The highway crosses a predominantly rural landscape composed of hedged farmlands, large continuous forests, and villages. The area includes two nationally significant ecological corridors of woodland and hedged farmland environments (Sordello et al. 2011). The forests mainly consist of oak (*Quercus sp.*), beech (*Fagus sylvatica*) and spruce (*Picea abies*). In contrast, the south-western part of the study area is dominated by croplands. Elevation ranges from 86 to 214 m above sea level, and the climate is semi-continental. This heterogeneous landscape supports a diverse array of habitats, providing refuge to numerous terrestrial mammals species, including ungulates (red deer, wild boar, roe deer); medium and small-sized carnivores (European badger *Meles meles*, European wildcat *Felis silvestris*, red fox, Northern raccoon *Procyon lotor*, pine marten *Martes martes*, stone marten *Martes foina*, polecat *Mustela putorius*, stoat *Mustela erminea*, weasel *Mustela nivalis*); lagomorphs (European rabbit *Oryctolagus cuniculus*, European hare *Lepus europaeus*); European hedgehog (*Erinaceus europaeus*); large to small-sized rodents (beaver *Castor fiber*, coypu *Myocastor coypus*, muskrat *Ondatra zibethicus*, Eurasian red squirrel *Sciurus vulgaris*, edible dormouse *Glis glis*), as well as numerous micromammals (Berne et al. 2004; LPO Champagne-Ardenne 2012). Among these species, the wildcat, hedgehog, beaver, and red squirrel are protected at the national level in France. The wildcat and the polecat are classified as vulnerable species in our study area (Regional Red List of Champagne-Ardenne). Raccoons, coypus and muskrats are invasive alien species in France.

Monitoring and data collection

A sample of 31 out of the 64 non-WCS along the studied highway section was selected and their usage by terrestrial mammals was monitored. This sample included 17 culverts (drainage), 12 underpasses (local traffic or drainage), and 2 overpasses (local traffic; **Table 1**).

Table 1: Dimensions of the three types of structures studied, their sample size, and their main function

Type	*N*	Dimensions (m)				Main function
		Width	Height	Length	Openness	
Culverts	17	0.80 – 5.40	0.80 – 2.7	28.00 – 75.30	0.01 – 0.26	Drainage
Underpasses	12	3.00 – 24.16	3.60 – 8.65	12.10 – 98.30	1.02[b] – 4.78	Local traffic[c]
Overpasses	2	6.80 – 7.00	17.30[a]	45.00 – 52.00	2.25 – 2.69	Local traffic

[a] Overpass height equals twice the maximum height of an underpass (= 8.65 m), as in Clevenger and Waltho (2005).

[b] One underpass had an openness of 0.32 m.

[c] Two underpasses were designed for drainage purpose

Sampling was determined by the accessibility to the structures and the risk of theft or damage to the camera traps due to high human traffic. Considering these risks, monitored structures were limited to those associated with local or agricultural access roads, where human traffic (<5 vehicles/hour) was considered low, based on the 100 vehicles per hour threshold defined by (Yanes et al. 1995). Non-WCS use by mammals were monitored using Bushnell TrophyCam Aggressor and Bushnell TrophyCam Core DS motion-sensing infrared cameras, deployed continuously in the field from April 2021 to May 2022, except in cases of device damage, theft, or malfunction (n=8, **Table S4**). Structures monitored for less than 180 days were excluded from the analyses (n=2, **Table S4**) to minimize variations in monitoring effort while retaining the highest possible number of structures in the dataset. To avoid detection bias associated with camera trap models, cameras were randomly and permanently assigned to structures, and no significant effect of camera model on the data was detected (Mann-Whitney *U*-test, p>0.05). Camera installation was standardized as much as possible, considering the variety of structures monitored. Cameras were fixed at the first third of the structure's deck and oriented inward to photograph animals after they had entered at least one-third of the structure. For culverts with diameters <1.2 m (n=5, **Table S4**), cameras were installed outside the structure, facing the entrance, to prevent disturbance to animal crossings (e.g., refusal or turning back). Cameras were angled at 45° on the horizontal plane to optimize the depth of field for capturing animals close to the lens and to facilitate identification when the animal appeared three-quarters in the frame. They were placed between 50 cm and 1 m high, depending on the internal conditions of the structure (water level, dust, etc.). Cameras were inspected every 15 days to retrieve data and perform maintenance tasks (e.g., SD card and battery replacement, repositioning, lens cleaning).

Photographic data were used to count the number of complete crossings (when an animal fully crossed the structure without visibly turning back) for each species identified at each monitored structure. Images were processed using the DeepFaune deep learning classification model (Rigoudy et al. 2023) to classify photos containing at least one wild mammal individual vs. those with none. Each record included the structure ID, date, time, species identification, and the number of individuals completing a crossing. Crossings by micromammals (due to detection challenges; (Tobler et al. 2008; Glen et al. 2013), and domestic animals (to focus solely on wild species) were excluded, as were crossings that could not be confidently identified. Species difficult to differentiate in photographs were grouped: pine marten and stone

marten (*Martes foina*) were classified as "*Martes sp*.", and stoats and weasels (*Mustela nivalis*) as "*Mustela sp*.".

Explanatory variables

To verify the influence of structural and landscape attributes on the use of road structures by terrestrial mammals, 10 explanatory variables were explored (**Table 2**). Due to the small sample size, quantitative variables were preferred for more rigorous analyses, while the qualitative variable "Type" was retained as it captured the essential information from a broader set of qualitative variables (see Fisher's exact test matrix, $p<0.05$; **Table S5**).

Table 2 : Name, definition, and characteristics of explanatory variables for the analysis of non-WCS use (n=29) by terrestrial mammals in northeastern France

	Variable name	Definition and units	Type	Range of values
Structural	Type	Structure type	categorical	culvert, underpass, overpass
	Width	Crossing structure width (m)	continuous	0.80 – 24.16
	Length	Crossing structure length (m)	continuous	12.10 – 98.30
	Height	Crossing structure height (m)	continuous	0.76 – 17.30
	Openness	Crossing structure openness (=width x height/length)	continuous	0.02 – 4.78
Environmental	Dist_stream	Distance to the nearest stream (m)	continuous	0.00 – 1,069.31
	Dist_forest	Distance to the nearest forest cover (m)	continuous	9.97 – 381.04
	Forest_cover200m	Forest cover measured within 200 m radius (%)	continuous	0.00 – 84.05
	Dist_urb	Distance to the nearest village (m)	continuous	155.01 – 1,391.16
	DI	Structure Density Index	continuous	0.56 – 3.48

Structural variables included the type of structure as well as its dimensions, such as length, width, height, and openness ratio (Yanes et al. 1995). As in Clevenger and Waltho (2005), openness for overpasses was calculated by assigning them a height twice the maximum height of an underpass. Measurements and characterization of structural attributes were conducted in the field. The influence of the surrounding landscape at each structure was assessed using variables such as the distance to the nearest village, streams, and forest cover, as well as the percentage of forest cover within a 200 m radius. A 200 m radius was selected to represent the availability of forest habitat near the structures while minimizing overlap with adjacent monitored structures (Bhardwaj et al. 2020). The density of potential crossing structures is a confounding variable to consider when evaluating the effectiveness of passages for wildlife crossing transport infrastructure. Isolated structures are more likely to concentrate animal crossings, resulting in higher usage, whereas closely spaced structures may dilute use across multiple passages, reducing their use (Clevenger and Waltho 2005). To quantify the degree of structure isolation along the highway section, an "absolute probability for crossing structure

(P_{CSn})" (referred to as the Density Index, DI) was calculated for all structures (n=64) following the method described by Clevenger and Waltho (2005):

$DI = 100 \times ((CS_{n-1}+CS_{n+1})/2)/CS_{total})$, where CS was the crossing structure.

Additionally, DI was also calculated according to structure types when the species was detected only in a specific type of structure or group (e.g., "Non-culvert" group, n = 33; see the following section). A higher DI value indicates greater isolation of a structure from other potential crossings. Environmental variables were measured using ESRI ArcGIS 10.2.2 software. Detailed characteristics of each structure are provided in Supplementary Information **Table S4**.

Data analysis

The evaluation of mammal use of crossing structures was conducted using descriptive analyses due to the limited sample size (n=29). The measurement unit for non-WCS use was defined as the number of days on which at least one complete crossing (i.e. crossing event) by a species was detected at a structure. This approach minimizes the influence of repeated crossings (e.g., round trips associated with an individual's daily activity) for the same species at the same structure within a single day (Mata et al. 2005). To account for variability in monitoring duration between structures, the measurement unit was standardized by the number of effective monitoring days for each structure (variable "monitoring," **Table S4**). This frequency is referred to as the Frequency of Detection Days (FDD). Statistical analyses were restricted to species with sufficient detection data (n>30 crossing events in at least 7 non-WCS). Although overpasses (n=2) were included for reference, only culverts and underpasses were analyzed using the FDD of all detected mammals species, followed by a species-specific analysis. Additionally, species richness, used as a measure of diversity, was calculated based on the count of species for which at least one crossing event was detected for each monitored structure. The comparison of culvert and underpass use was carried using a Mann-Whitney *U*-test ($p<0.05$).

Spearman's rank correlation (r_s), followed by a false discovery rate (FDR) correction (Verhoeven et al. 2005), was used to explore the relationship between explanatory variables and the use of non-WSC by species. Culverts (n=16) were considered separately from underpasses and overpasses due to their different structural characteristics and primary function (drainage). Underpasses (n=11) and overpasses (n=2) were grouped as 'non-culvert' structures based on their analogous use by species (see Principal Component Analysis (PCA), **Figure S4**).

Non-parametric tests were preferred because of the small sample size. All analyses were conducted using the R v.4.4.0 program (R Core Team 2024).

Results

Non-WCS use

A total of 1,073,849 camera trap photos were collected across the 29 non-WCS by the end of the monitoring period, including 22,073 detections of terrestrial mammals. Of these, 18,255 detections (82.70%) were confirmed as crossing events, recorded over a cumulative 11,231 capture days. A total of 16 terrestrial mammal taxa/species were documented fully crossing the structures. The red fox was the most frequently detected species (18.36% of detection days on average), followed by the raccoon (15.57%), the badger (11.97%) and the hare (*Lepus europaeus*) (11.35%; **Table 3**). *Martes sp.*, coypu, wildcat, roe deer and hedgehog were observed less frequently (ranging from 6.69% to 2.70% of detection days on average). The remaining species were rarely recorded crossing the structures (average detection rates <1% of detection days). Raccoons, red foxes, *Martes sp*., badgers, wildcats, and coypus were detected at more than 50% of the monitored structures (**Table 3**).

Table 3 : Percentage of average frequency of detection days (FDD) for the 16 species/taxa detected in each type of structure, its minimum (Min) and Maximum (Max) values, and the number of structures used (nbSU)

Species	Culverts (n= 16) 5,925 days			Underpasses (n= 11) 4,454 days			Overpasses (n= 2) 852 days			Average (n=29)	nbSU (n=29)
	FDD	Min	Max	FDD	Min	Max	FDD	Min	Max	FDD	
Sciurus vulgaris	0.22	0	1.22	0.53	0	3.98	-	-	-	0.32	8
Erinaceus europaeus	0.05	0	0.32	6.95	0	20.61	0.59	0	1.17	2.70	14
Lepus europaeus	-	-	-	16.72	0	84.78	47.47	24.59	70.35	11.35	8
Mustela sp. [a]	0.74	0	4.78	0.24	0	1.87	-	-	-	0.53	7
Martes sp. [b]	10.20	0	25.88	2.78	0	12.81	0.12	0	0.24	6.69	22
Mustela putorius	0.82	0	9.02	0.06	0	0.25	-	-	-	0.48	8
Ondatra zibethicus	1.22	0	17.66	0.04	0	0.47	-	-	-	0.69	4
Myocastor coypus	8.58	0	68.97	2.14	0	11.94	0.12	0	0.23	5.55	17
Castor fiber	0.01	0	0.23	1.00	0	11.02	-	-	-	0.38	2
Procyon lotor	20.51	0	48.44	11.03	0.23	29.39	1.05	0.47	1.64	15.57	27
Felis silvestris	5.83	0	26.00	5.84	0	21.63	1.64	0	3.28	5.54	19
Meles meles	11.87	0	55.87	10.99	0	24.82	18.11	1.17	35.06	11.97	21
Vulpes vulpes	9.38	0	80.75	36.90	1.20	68.38	35.11	26.46	43.76	18.36	26
Capreolus capreolus	-	-	-	7.27	0	33.49	3.99	3.75	4.24	3.03	12
Sus scrofa	-	-	-	0.75	0	4.22	-	-	-	0.29	2
Cervus elaphus	-	-	-	0.02	0	0.24	0.23	0	0.47	0.02	2

[a] includes *Mustela erminea* and *Mustela nivalis*

[b] includes *Martes martes* and *Martes foina*

The average FDD for culverts, underpasses, and overpasses across all terrestrial mammal species was 0.50 (n = 16; SD = 0.23), 0.62 (n = 11; SD = 0.22), and 0.68 (n = 2; SD = 0.27), respectively. No significant difference was found in overall mammal use between culverts and underpasses ($U = 59$, $p = 0.162$; **Figure 9**). However, species richness was significantly higher in underpasses than in culverts ($U = 43$, $p < 0.05$; **Figure 10**), with the structures used by the highest number of species primarily located in the northern part of the study area. (**Figure 11**). European hedgehogs, coypus, and most carnivores (except *Mustela sp*.) used all three structure types, while ungulates and hares avoided culverts (**Table 3**). Red squirrels, *Mustela sp*., polecats, muskrats, beavers, and wild boars were absent from overpasses (Table 3). Hedgehogs ($U = 10.5$, $p<0.0001$) and red foxes ($U = 26$, $p = 0.002$) were detected significantly more often in underpasses than in culverts.

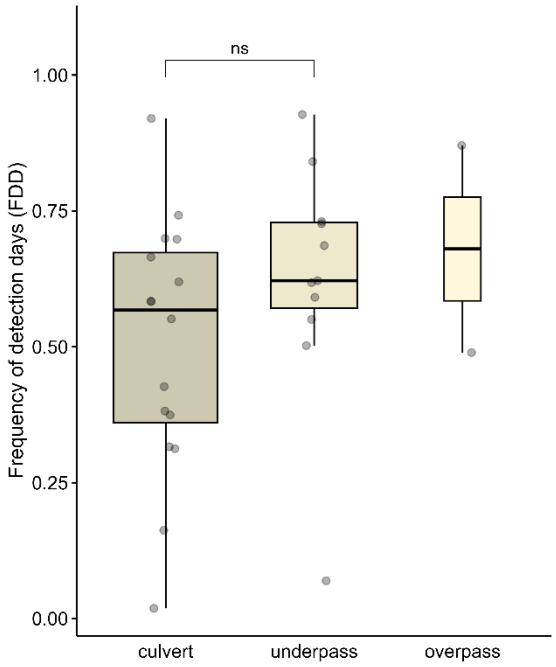


Figure 9 : Frequency of detection days (FDD) for all 16 mammals species at the three types of crossing structures studied along the A34 highway in France. Overpasses (n=2) are indicated for reference. Bold bars represent median values. Ns = non-significant (p>0.05)

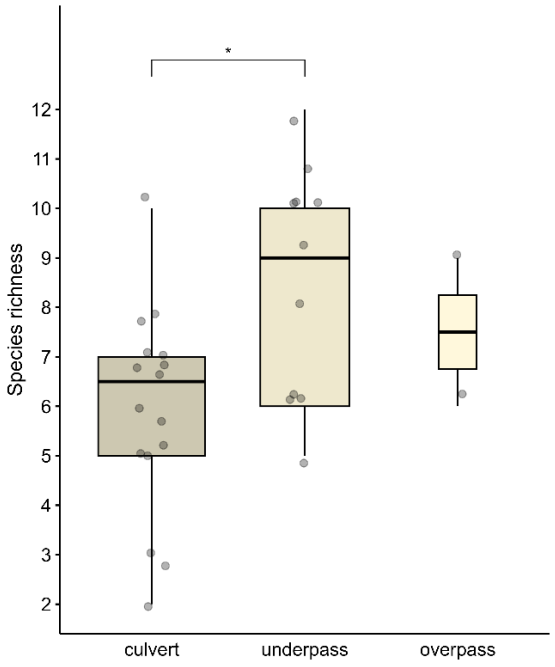


Figure 10 : Diversity index of mammal species detected in the three types of structures studied along the A34 highway, France. Overpasses (n=2) are indicated for reference. Bold bars represent median values. (*p<0.05)

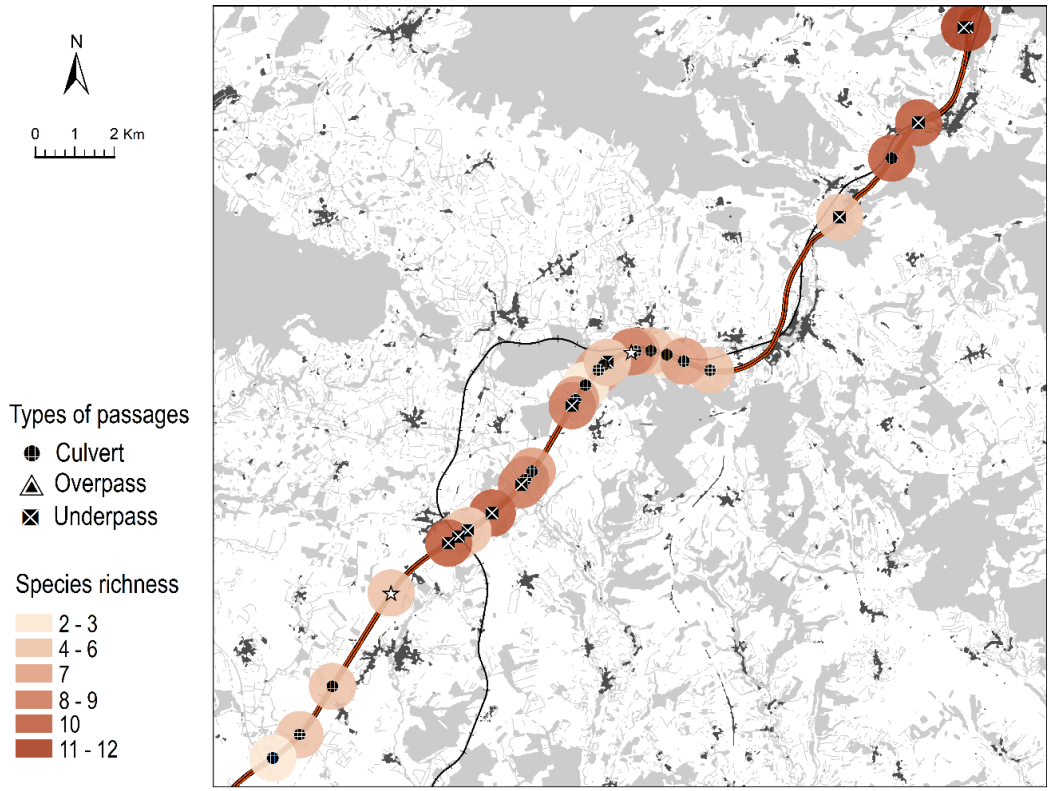


Figure 11: Species richness recorded at each of the 29 monitored structures along the A34 highway, France

Ungulates

Across overpasses and underpasses, 641 and 3 crossing events were recorded for roe deer and red deer, respectively, while 45 wild boar crossings were observed exclusively in two consecutive underpasses. Consequently, based on the timestamp data, only 9 wild boar crossings were detected in succession at both structures, suggesting that these individuals completely crossed the highway. Roe deer were the most frequent ungulate users of non-WCS, followed by wild boar and red deer, with an FDD of 3.12, 0.30, and 0.02 average days detected, respectively (**Table 3**). Roe deer were recorded in 12 "non-culvert" structures distributed across the highway section, whereas red deer and wild boar used only two structures each (**Table 3**). The median values for the width, height, and openness of structures used by at least one ungulate species are 7.47 m, 5.25 m, and 1.66, respectively. Red deer were observed using both an overpass (openness = 2.25) and an underpass (openness = 2.79) located 665 m apart within one of the forest corridors in the study area (**Figure 12**). The overpass, a rural track bridge, measures 6.77 x 52 m (width x length), has an artificial substrate (asphalt), is devoid of vegetation, and is regularly used by agricultural vehicles and ramblers. The underpass measures 12 x 5.36 x 23 m (width x height x length), serves a rural track, has sparse vegetation, a mixed substrate (stabilized soil), occasional human presence (<1 vehicle/day), and is located within the same forest corridor. For wild boar, the two consecutive underpasses (openness > 1.21) located 83 m apart beneath highway entrance and exit ramps were used in the northern part of the study area (**Figure 12**). These underpasses are relatively isolated from adjacent crossing structures (DI = 3.18) and feature shrub and tree vegetation at their entrances, a natural substrate, no anthropogenic traffic, proximity to forest cover (<15 m), and a permanent watercourse bordered by a natural bank. Additionally, one of these two underpasses is the only one equipped with a blackout screen among all the structures recorded along the highway (**Figure 12a**). Due to insufficient data, red deer and wild boar were excluded from further analyses.

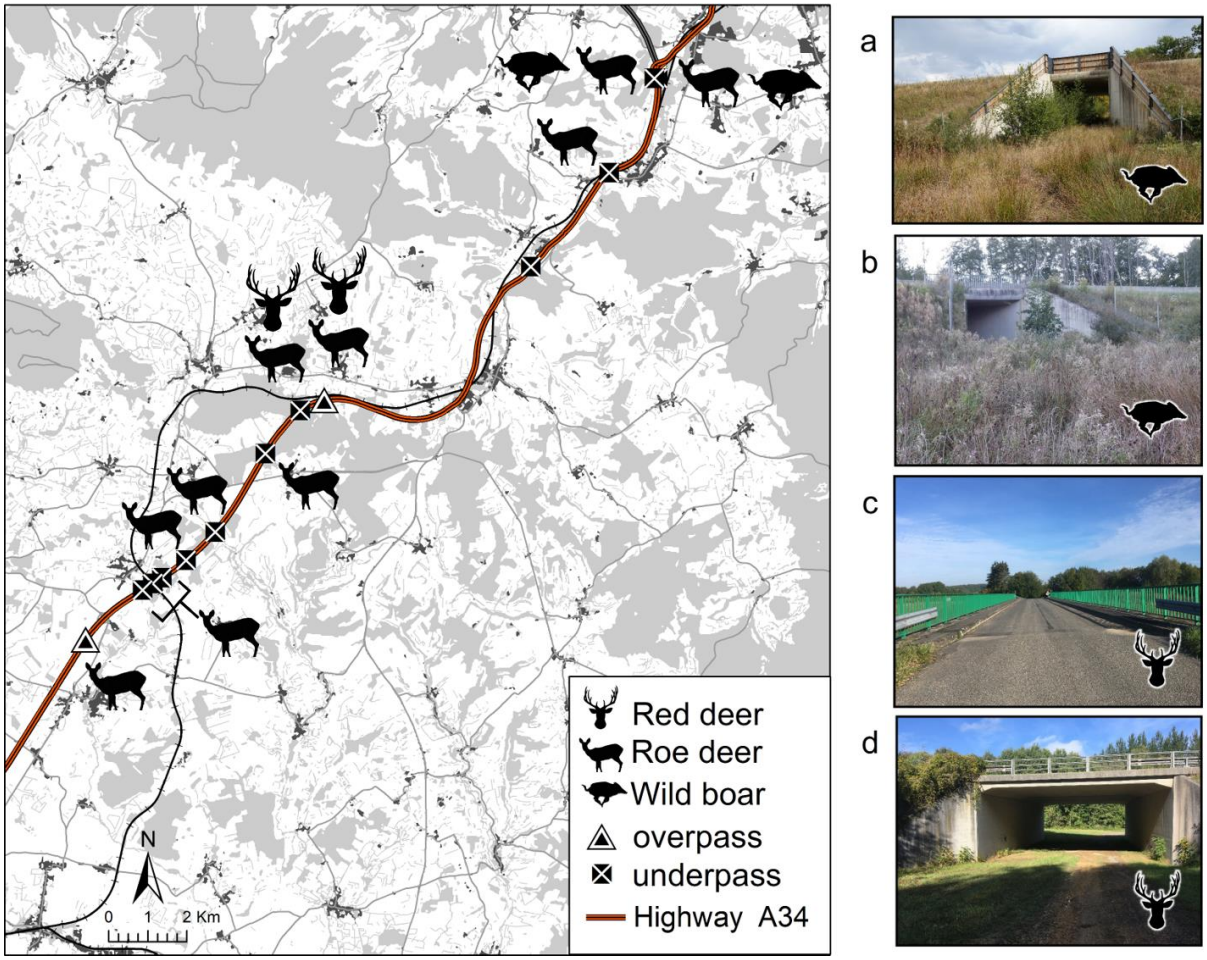


Figure 12 : Location of "non culvert" structures used by ungulate species (Red deer, roe deer and wild boar) along the A34 highway, France. Roe deer were detected in 12 structures; wild boar in only two contiguous underpasses (a and b), including (a) one with a blackout screen; red deer on an overpass (c) and in an underpass (d)

Influence of non-WCS attributes

The use of non-WCS by hedgehogs (r_s = 0.441) and red foxes (r_s = 0.459) was significantly influenced by the geographic isolation of the crossing relative to an alternative passage along the highway section (n = 64; Density Index, p<0.05 after FDR correction). A similar pattern was observed for *Mustela sp.* (r_s = 0.386) and for roe deer among non-culvert structures (n=33; r_s = 0.602), though it became non-significant after FDR correction.

Among culverts, only raccoons showed a significant positive correlation with structure height after FDR correction (p < 0.033; **Table 4**), indicating a preference for taller culverts. The use of culverts by red squirrels, *Mustela sp*., coypus, wildcats, and badgers showed moderate to strong correlations with explanatory variables (**Table 4**), although they became non-significant after FDR correction. Squirrels appeared to primarily use larger culverts for crossing. Wildcats appeared to prefer crossing through culverts near forests with high forest

cover, whereas badgers responded mainly to forest proximity. In contrast, *Mustela sp*. and coypus exhibited the opposite pattern.

For “non-culvert” structures, only coypus displayed a significant negative correlation with distance to the nearest watercourse after FDR correction ($p < 0.034$; **Table 4**), suggesting a preference for structures containing water or located near a stream. Moderate to strong relationships were also found between *Mustela sp*., *Martes sp*., coypus, wildcats, and environmental variables of 'non-culvert' structures (**Table 4**), although they became non-significant after FDR correction. *Mustela sp*., *Martes sp*., coypus, and wildcats appeared to cross using “non-culvert” structures near streams. *Mustela sp*. seemed to prefer using structures adjacent to forests for crossing. Wildcats and roe deer favored 'non-culvert' structures farther from urban areas, whereas red foxes showed the opposite.

Table 4 : Spearman rank correlation coefficients (rs) with their probability value (p) between the frequency of detected days of species using culverts (n=13) and "non culvert" structures (n=16) and explanatory variables

	Width		Length		Height		Openness		Dist_stream		Dist_forest		Forest_cover200 m		Dist_urb	
	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*	r_s	*p*
Culverts																
Sciurus vulgaris	**0.559**	0.024	–0.403	0.122	**0.575**	0.020	**0.610**	0.012	–0.115	0.671	–0.381	0.146	0.187	0.487	0.089	0.743
Erinaceus europaeus	–0.017	0.949	**–0.595**	0.015	–0.115	0.673	0.065	0.812	–0.193	0.475	0.047	0.861	–0.142	0.599	–0.272	0.308
Mustela sp.	0.011	0.968	–0.389	0.137	–0.149	0.583	0.021	0.937	–0.292	0.273	**0.544**	0.030	**–0.536**	0.032	–0.193	0.474
Martes sp.	0.309	0.244	0.204	0.448	0.300	0.259	0.280	0.293	–0.038	0.889	–0.137	0.612	0.019	0.944	–0.001	0.996
Mustela putorius	0.052	0.848	–0.217	0.420	0.077	0.777	0.064	0.813	0.211	0.433	–0.175	0.516	0.000	1.000	0.443	0.085
Myocastor coypus	0.417	0.108	–0.089	0.744	0.307	0.247	0.335	0.204	–0.055	0.840	**0.602**	0.014	**–0.628**	0.009	0.000	1.000
Procyon lotor	**0.574**	0.020	0.120	0.657	**0.675**	**0.004**	**0.570**	0.021	–0.426	0.100	–0.300	0.259	0.193	0.474	–0.084	0.757
Felis silvestris	–0.266	0.320	–0.027	0.921	0.390	0.135	0.293	0.271	0.083	0.761	**–0.516**	0.041	**0.508**	0.045	0.158	0.558
Meles meles	–0.357	0.174	–0.254	0.342	0.401	0.124	0.388	0.137	–0.227	0.398	**–0.570**	0.021	0.460	0.073	0.131	0.628
Vulpes vulpes	–0.137	0.612	0.123	0.651	0.214	0.425	0.120	0.659	0.069	0.800	–0.283	0.287	0.171	0.526	0.019	0.944
"Non culvert" structures																
Sciurus vulgaris	0.342	0.252	–0.174	0.570	–0.074	0.810	–0.027	0.931	–0.087	0.777	–0.188	0.539	0.087	0.777	–0.034	0.913
Erinaceus europaeus	–0.039	0.900	–0.556	0.048	–0.450	0.123	–0.293	0.331	0.136	0.658	–0.412	0.162	0.462	0.112	0.553	0.050
Lepus europaeus	0.147	0.632	0.052	0.867	0.133	0.665	0.119	0.699	0.441	0.131	0.362	0.225	–0.469	0.106	0.232	0.446
Mustela sp.	–0.507	0.077	–0.257	0.396	–0.140	0.648	–0.183	0.549	**–0.625**	0.022	**–0.620**	0.024	0.402	0.173	0.393	0.184
Martes sp.	0.201	0.511	–0.156	0.612	0.007	0.982	–0.020	0.950	**–0.594**	0.032	–0.412	0.162	0.167	0.585	0.145	0.637
Mustela putorius	0.190	0.534	0.318	0.290	0.269	0.375	–0.145	0.636	–0.145	0.635	–0.112	0.716	–0.078	0.799	0.022	0.942
Myocastor coypus	–0.165	0.590	–0.122	0.691	0.012	0.970	–0.197	0.519	**–0.734**	**0.004**	–0.475	0.101	0.290	0.337	0.357	0.232
Procyon lotor	–0.214	0.482	–0.248	0.413	–0.245	0.420	–0.104	0.734	–0.465	0.109	–0.473	0.103	0.462	0.112	0.357	0.231
Felis silvestris	–0.408	0.167	–0.453	0.120	–0.312	0.300	–0.184	0.547	**–0.592**	0.033	–0.555	0.049	0.464	0.110	**0.654**	0.015
Meles meles	–0.448	0.125	0.086	0.781	0.000	1.000	–0.318	0.289	–0.241	0.428	–0.108	0.726	–0.219	0.473	0.277	0.360
Vulpes vulpes	–0.445	0.128	0.271	0.371	–0.360	0.226	–0.505	0.078	–0.017	0.957	0.269	0.374	–0.357	0.231	**–0.621**	0.024
Capreolus capreolus	–0.148	0.629	–0.117	0.703	0.138	0.654	0.110	0.721	–0.085	0.782	–0.176	0.566	–0.170	0.578	**0.676**	0.011

Significant correlations ($p<0.05$) are shown in bold; those remaining significant after FDR correction are highlighted.

Discussion

Our study highlighted the presence of “transparators” -culverts, underpasses, and overpasses- that facilitate the movement of multiple terrestrial mammal species across a highway in France, thereby promoting ecological connectivity. However, it is important to note that the frequency of structure use can be significantly influenced by population density and the abundance of local species near the structures (Yanes et al. 1995; Grilo et al. 2008). Additionally, the frequency of structure usage provides valuable insight into the general trends of crossing effectiveness and the species' specific responses to structural and environmental attributes.

Objectif 1: favored non-WCS type

Our results showed that all types of non-WCS were used by various terrestrial mammals, including both narrow drainage culverts and larger structures designed for local traffic (vehicles, trains, pedestrians). Wildlife use of these multipurpose structures clearly demonstrates their role as "transparators" that helps mitigate the barrier effects of highways, navigation canals, and railways (Rodriguez et al. 1996; Mata et al. 2005; Grilo et al. 2008; Abra et al. 2020; Azedo et al. 2022). However, underpasses generally appeared to be preferred by a large diversity of terrestrial mammals, including ungulates and hares. This overall trend aligns with previous studies (Wang et al. 2018; Abra et al. 2020; Warnock-Juteau et al. 2022) highlighting the greater effectiveness of underpasses compared to culverts in facilitating crossings for a wide range of terrestrial mammals. Our results also showed that culverts were used as frequently as underpasses, underscoring their relative importance for wildlife passage. Notably, the lack of a significant difference in culvert and underpass use may have been influenced by the predominance of detected carnivore species, which are generally considered opportunistic users of both structure types (Yanes et al. 1995; Clevenger et al. 2001a; Grilo et al. 2008). Therefore, culverts are important for maintaining ecological connectivity for carnivores and, to a lesser extent, for small non-carnivorous species in landscapes fragmented by highways or railways (Yanes et al. 1995; Rodriguez et al. 1996; Ascensão and Mira 2007; Grilo et al. 2008; Mata et al. 2009). While the role of overpasses in wildlife passage requires further investigation, their high usage frequency and species richness suggest that they also contribute to highway permeability (Asari et al. 2020; Abra et al. 2020). Some species, like hares, may even prefer overpasses, exhibiting higher passage rates than other crossing types.

Objectif 2: species detected in non-WCS

Most terrestrial mammals present in the study area were detected using the monitored structures. Our findings are in line with studies on the same taxa in Western Europe (Yanes et al. 1995; Rodriguez et al. 1996; Mata et al. 2005, 2008; Ascensão and Mira 2007; Grilo et al. 2008; Seiler and Olsson 2009; Bhardwaj et al. 2020), confirming that many species, including those of national (wildcat) and local (polecat) conservation concern, use non-WCS to cross highways. Interestingly, while wildcats and polecats were detected in culverts and underpasses in our study, researches in Portugal have never recorded these species inside such structures, despite their presence near roads (Ascensão and Mira 2007) or within the study area (but one polecat crossing over 6 months of monitoring, in Grilo et al. 2008). Our results further support

the suitability of culverts and underpasses for wildcats, as shown in Spanish studies (Yanes et al. 1995; Rodriguez et al. 1996, 1997) but these regional variations suggest that the use of these structures may depend on geographic context. Additionally, the detection of red squirrels in culverts and underpasses indicates that non-WCS can also facilitate their movements across highways, and not just wildlife-adapted culverts, as observed by Mata et al. (2005, 2009) in their studies.

Red deer, wild boar, and beavers were rarely observed using non-WCS to cross the highway. In the case of red deer and wild boar, the hypothesis of direct crossings can be ruled out, given the very low mortality recorded during the study (only one collision with vehicles was recorded for both species by the DIRN; unpublished data). The infrequent use of the structures by these two species could therefore be explained by: (i) a tendency to avoid roads (D'Amico et al. 2016; Prokopenko et al. 2017), limiting animal access to the structures; (ii) structures that are unsuitable for the species' requirements, as they seem to primarily cross via viaducts or large wildlife over- and underpasses (Clevenger and Waltho 2005; Mata et al. 2008; Kusak et al. 2009; Mysłajek et al. 2020). This infrequent use of non-WCS by red deer and wild boar has also been reported in previous studies (red deer: Rodriguez et al. 1996; wild boar: Rodriguez et al. 1996; Mata et al. 2005; Ascensão and Mira 2007; Puig et al. 2012; Naidenko et al. 2021), although wild boar have been documented using underpasses designed for small and medium mammals (Ważna et al. 2020). Moreover, while ungulate densities in the study area remain unknown, hunting records indicate that red deer are considerably less abundant (42 individuals harvested during the 2021–2022 hunting season) compared to roe deer and wild boar (1,091 and 856 harvested individuals, respectively). This lower abundance likely reduced the probability of red deer detections within the structures. Finally, the ongoing recolonization of beavers within their historical range in France (Dewas et al. 2012), combined with their dependence on free-flowing watercourses, lessens their detection in the monitored structures.

Objectif 3: selected or avoided attributes

The size of non-WCS appears to be a key factor in their use or selection by certain species, directly influencing their effectiveness in enhancing road permeability. On one hand, the strong influence of structural attributes is evident in the avoidance of narrow structures (primarily culverts) by red deer, wild boar, and roe deer, confirming that larger and more open structures are better suited for large species such as ungulates (Ng et al. 2004; Clevenger and Waltho 2005; Mata et al. 2005; Bhardwaj et al. 2020). Specifically, crossings with a minimum openness

of 1.02 and width and height exceeding 4.4 m were significant determinants of roe deer use. Moreover, the median dimensions of structures used by this species (width: 7.47 m, height: 5.25 m, openness: 1.66) closely match those reported in Sweden (Seiler and Olsson 2009; Bhardwaj et al. 2020), reinforcing the existence of threshold values for effective passage. On the other hand, the preference of hedgehogs and red foxes for underpasses, as well as their use by hares, suggests that crossings with greater openness facilitate movement for small- to medium-sized species seeking better visibility (Mata et al. 2005, 2008; Ascensão and Mira 2007). These findings emphasize the importance of diverse crossing structure designs to accommodate the ecological requirements of the various species inhabiting the landscape.

Our results revealed no strong relationship between the environmental attributes of culverts and "non-culvert" structures, and terrestrial mammal crossings. In general, the lack of correlation with forest cover density (median Forest_cover200m: 27% for culverts, 18% for non-culvert structures), distance to forest (median Dist_forest: 46m for culverts, 78m for non-culvert structures) and distance to urban areas (median Dist_urb: 758m for culverts, 605m for non-culvert structures), suggests that the location of the sampled structures generally facilitates terrestrial mammal crossings. This aligns with findings from Mata et al. (2005) and Clevenger and Waltho (2005), confirming that when environmental conditions are suitable, structural attributes have a more decisive influence on wildlife use than the surrounding landscape. However, unaccounted environmental factors such as distance from the highway edge and presence of other roads nearby, along with animal behavioral factors, may have also significantly influenced the results. The proximity to a watercourse was the only significant factor, influencing coypu use of 'non-culvert' structures. The coypu, an invasive species in France, primarily depends on aquatic habitats for foraging and dispersal (Schertler et al. 2020) and water is generally farther from underpasses/overpasses than from culverts, some of which have permanent flow.

It is important to note that the two consecutive underpasses had the highest species diversity, suggesting that their environmental features provide optimal conditions for wildlife crossings. This is consistent with previous studies highlighting the importance of factors like natural substrates, low or no human activity, watercourse with natural strips and nearby forest cover (Yanes et al. 1995; Rodriguez et al. 1996; Donaldson 2007; Grilo et al. 2008; Lesbarrères and Fahrig 2012; Barrueto et al. 2014; Warnock-Juteau et al. 2022). Therefore, these structures appear to be the most effective "transparators" to improve highway permeability and promote habitat connectivity. Finally, the use of non-WCS structures by foxes and hedgehogs was

significantly linked to the isolation of these structures from adjacent crossings suggesting that these species generally exhibit opportunistic behavior, with crossings being related to the density of available structures rather than their specific characteristics (structural or environmental).

Non-WCS and genetic connectivity

The monitoring of non-WCS with camera traps revealed that roe deer regularly crossed the highway, while red deer and wild boar were rarely detected. These results suggest that these structures facilitate the roe deer movements across fenced roads and may reduce its genetic isolation, but not for red deer and wild boar. To determine if gene flow reflects the use of non-WCS, we compared the findings of this study with genetic analyses conducted simultaneously on these species on both sides of the A34 highway (Dispan de Floran et al. 2025). The results showed no genetic differentiation in roe deer, confirming an unconstrained gene flow. In contrast, marked genetic structuring was observed in red deer, and to a lesser extent in wild boar, indicating a restriction of genetic connectivity across the infrastructure. The convergence of the analyses on the use of non-WCS and on genetic structure highlights the effectiveness of these structures in ensuring genetic connectivity across the highway for roe deer, by facilitating crossings of reproductive individuals. This comparative approach confirms that the current use of non-WCS supports the observed gene flow and provides species-specific genetic connectivity. The highway has been in place for 20 years, suggesting that this time frame is long enough to allow for the roe deer's habituation to the structures and their usage. However, this timeframe may be too short for wild boars and red deer to adapt to non-WCS, knowing that a species like the red deer can take up to a decade to get accustomed to WCS (Gagnon et al. 2011). This approach warrants extension to other species and/or to various infrastructures to more broadly assess the impact of transportation infrastructures on the functional connectivity of wildlife.

Conclusions and recommendations

Our study showed that non-WCS can contribute to landscape connectivity by ensuring highway permeability, provided that their design is suitable. This finding highlights the importance of including existing multipurpose crossing structures in strategies to mitigate the barrier effect of roads. Their consideration is also essential to accurately assess the ecological permeability of linear transportation infrastructures. In combination with fencing along high-

traffic roads, these structures enable the safe movement of reproductive individuals. These results are consistent with previous studies (Karlson et al. 2017a; Helldin 2022) showing that the distribution of several small structures, rather than a single large WCS, is determinative for maintaining the ecological permeability of transportation infrastructures. These structures are particularly important for small- and medium-sized carnivores, which were more opportunistic than ungulates, regularly using many structures and adapting to various designs. While only a limited number of monitored structures were used by roe deer, their effectiveness is confirmed by the panmictic population observed on both sides of the highway in a related genetic study (Dispan de Floran et al. 2025). However, we recommend that highway managers prioritize actions aimed at restoring ecological continuity for red deer and wild boar. We suggest installing a large wildlife crossing to facilitate ungulate movement (Lesbarrères and Fahrig 2012; Denneboom et al. 2021), particularly in the corridor connecting the two main forest areas where the red deer population is concentrated. Besides the structural and landscape attributes, we also recommend focusing on the behavior of reluctant species to improve the use of non-WCS that are physically accessible to them. This includes measures to increase their attractiveness (through food, scents, etc.) or to redirect animals (via vegetation corridors) toward these structures to influence their perception and encourage them to incorporate them into their movement routes. Finally, we encourage the use of an approach combining ecological and genetic data to assess the effectiveness of crossing structures in ensuring functional connectivity. In a wider context, this approach allows for the identification of “transparators” that facilitate flows across landscape barriers.

CRediT authorship contribution statement

L. Dispan de Floran: Writing – original draft, Writing – review and editing, Visualization, Methodology, Formal analysis, Data curation. G. Valance: Formal analysis. M. Le Barh: Investigation, Methodology, Writing – review and editing. S. Maudet: Investigation. A. Hubert: Investigation. E. Guinard: Writing – review and editing. D. Lesbarrères: Writing – review and editing. P. Hubert: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing – review and editing. R. Helder: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review and editing.

Acknowledgements

We thank all the volunteers from the KIPASS citizen science program who collaborated with us in reviewing the photos. We also thank the DIRN (Direction Interdépartementale des Routes du Nord) for providing data on wildlife-vehicle collisions on the highway network. This research was funded by the DREAL (Direction

Régionale, de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement du Grand Est), the ANRT (Association Nationale Recherche et Technologie), the MTECT (Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires) and the ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) through ITTECOP research program, the URANO company, the OFB (Office Français de la Biodiversité), the Ardennes Departmental Federation of Hunters (Fédération Départementale des Chasseurs des Ardennes), the Communauté de Communes des Crêtes Préardennaises, the Communauté de Communes de l'Argonne Ardennaise, the Cerema (Centre d'études et d'expertise sur les risques , la mobilité et l'aménagement), the URCA (University of Reims Champagne-Ardenne) through the EFACILT research program and the URCA-CERFE (Centre de Recherche et de Formation en Eco-éthologie).



CHAPITRE 3 • IDENTIFICATION DES RÉPONSES COMPORTEMENTALES DU CHEVREUIL EUROPÉEN (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) ET DU SANGLIER (*SUS SCROFA*) AUX INFRASTRUCTURES LINÉAIRES DE TRANSPORT : CAS DE L'AUTOROUTE A34

INTRODUCTION

Dans un paysage hétérogène et souvent fragmenté, les déplacements sont essentiels à la survie des animaux. Ils permettent d'accéder aux diverses ressources (alimentaires, refuges, partenaires sexuels), d'échapper à la compétition, aux prédateurs et aux conditions environnementales défavorables (Fahrig 2007; Taylor and Norris 2007; Doherty and Driscoll 2018; Gaynor et al. 2019). Au-delà de ces besoins immédiats, les déplacements jouent également un rôle central dans les processus d'adaptation. En effet, ils permettent aux individus d'ajuster leur utilisation de l'espace en réponse aux changements de leur environnement, favorisant ainsi la persistance des populations face aux perturbations (Bro-Jørgensen et al. 2019). Cependant, le déplacement des animaux est menacé par la fragmentation du paysage causée en partie par les infrastructures linéaires de transport (ILTs; ex. routes, voies ferrées et canaux de navigation) et leur développement. Globalement omniprésentes dans le paysage (Laurance et al. 2014), les ILTs ont généralement des effets négatifs directs et indirects sur la faune sauvage. Elles provoquent notamment une mortalité accrue, restreignent l'accès aux ressources et induisent des changements de comportement entraînant un coût énergétique élevé pour les organismes (Trombulak and Frissell 2000; Fahrig and Rytwinski 2009; Benítez-López et al. 2010; Jackson and Fahrig 2011). Par exemple, Shannon et al. (2014) ont montré que le bruit lié à la circulation routière réduisait la recherche de nourriture, diminuait l'activité à la surface du sol et augmentait la vigilance chez le Chien de prairie (*Cynomys ludovicianus*). Ces perturbations peuvent entraîner des niveaux de stress élevés et une dégradation de la condition physique chez les individus (Pauli and Buskirk 2007).

Les réseaux routiers représentent les ILTs les plus denses dans le paysage. Par conséquent, leurs impacts néfastes sur la faune et les habitats sont largement documentés dans le domaine de la recherche en « écologie routière » (Forman 2003; Van Der Ree et al. 2015). Toutefois, ces impacts peuvent varier en fonction des caractéristiques de la route (surface, revêtement, volume de trafic ; Jaeger et al. 2005; Fahrig and Rytwinski 2009) et de l'association éventuelle à une seconde caractéristique linéaire telle que les clôtures (« écologie des clôtures »; Jakes et al. 2018; McInturff et al. 2020). Par exemple, la variabilité de leurs impacts s'illustre par l'étude de Mark Peaden et al. (2017) sur les tortues du désert de Mojave (*Gopherus agassizii*) suivies par balises GPS à proximité d'infrastructures routières dans la vallée d'Ivanpah, en Californie (Etats-Unis). La température moyenne des carapaces variait selon les ILTs considérées : près d'une route non clôturée à faible trafic (50 véhicules/jours), elles étaient élevées mais à un degré

viable, tandis que le long d'une route clôturée très fréquentée (50 000 véhicules/jours), les températures atteignaient des niveaux extrêmes proches du seuil létal pour l'espèce. La clôture empêchait les tortues d'accéder à leurs refuges (buissons ou terriers) habituels, augmentant ainsi leur exposition à des températures fatales.

L'ajout de clôtures aux ILTs, sans mesures d'atténuation complémentaires assurant la transparence écologique, tend à exacerber leur effet barrière sur les déplacements (Botting et al. 2023). Ces clôtures sont particulièrement présentes le long des routes et voies ferrées à grande vitesse et à trafic élevé (Lignes à Grande Vitesse et autoroutes). Elles sont installées parallèlement aux voies pour réduire le risque de collision entre animaux et véhicules, responsable de coûts socio-économiques importants (Seiler and Helldin 2006). Elles sont conçues le plus souvent pour être infranchissables par les grandes espèces telles que les Ongulés. En effet, ces derniers sont majoritairement impliqués dans les collisions les plus coûteuses et les plus meurtrières (Cramer et al. 2015; Jakes et al. 2018). Par conséquent, ces clôtures d'exclusion de la faune (de type grillage) peuvent limiter l'accès aux ressources et agir comme un obstacle majeur à la connectivité des habitats. Bright and Van Riper (2000, vu dans Gates et al. 2012) ont suggéré que ces emprises clôturées seraient d'ailleurs plus contraignantes que les routes seules pour les espèces à large répartition comme l'antilope d'Amérique (*Antilocapra americana*). De même, Olsson and Widen (2008) ont observé une diminution de 67 à 89% des traversées d'élans en Suède après la reconstruction d'une autoroute en 2x2 voies incluant trois passages à faune et l'installation d'une clôture. Les traversées enregistrées après l'installation de la clôture se sont produites uniquement sur ces passages, réduisant ainsi leur possibilité de traversée à plusieurs endroits. En plus d'agir comme une barrière physique, les clôtures peuvent aussi altérer le comportement des animaux, avec des impacts négatifs à différentes échelles. Par exemple, les antilopes d'Amérique peuvent parcourir de longues distances parallèlement aux routes clôturées pour traverser à l'endroit où la clôture est absente, détournant alors la migration saisonnière des populations (Gates et al. 2012). A l'échelle individuelle, cela se traduit par une augmentation des besoins énergétiques. Par ailleurs, le stress et les dépenses d'énergie peuvent aussi augmenter lorsqu'un individu reste temporairement empêtré dans une clôture en tentant de la franchir (Jakes et al. 2018). Ces impacts peuvent alors réduire la condition physique des individus, voire entraîner leur mort par épuisement ou à la suite de blessures.

Au-delà de leurs effets souvent néfastes, les routes et les clôtures peuvent également bénéficier à certaines espèces en : (1) offrant des habitats refuges, comme des zones protégées de la prédation, observées chez quatre espèces de grands herbivores (orignal *Alces alces*, wapiti *Cervus elaphus*, cerf de Virginie *Odocoileus virginianus*, cerf mulet *O. hemionus*) près de routes très fréquentées (Muhly et al. 2011) ; (2) favorisant la connectivité longitudinale, notamment pour des espèces généralistes telles que le Renard roux (*Vulpes vulpes*), qui utilisent les autoroutes comme principaux corridors de dispersion (Kimmig et al. 2019), ou encore pour des espèces invasives comme le Crapaud buffle (*Bufo marinus*), qui privilégient les routes pour des déplacements plus rapides qu'en zones densément végétalisées (Brown et al. 2006) ; et (3) augmentant les opportunités de recherche alimentaire. La combinaison de ces deux derniers points est particulièrement visible chez les Carnivores. Ces espèces peuvent exploiter les caractéristiques linéaires pour faciliter leurs déplacements vers de nouvelles zones alimentaires et, selon leur stratégie de chasse, capturer ou localiser leurs proies. En Australie, des prédateurs de taille moyenne, le Chat marsupial à queue tachetée (*Dasyurus maculatus*) et le Diable de Tasmanie (*Sarcophilus harrisii*), utilisaient les routes pour faciliter leurs déplacements et leur alimentation (Andersen et al. 2017). Le suivi GPS des diables de Tasmanie a révélé une forte sélection des routes asphaltées à la recherche de carcasses d'animaux tués par collision et de proies piégées dans les clôtures. Le chat marsupial, quant à lui, chassait par embuscade le long des accotements, attirant les proies grâce à la végétation qui s'y développait. Des comportements similaires ont été observés chez les loups (*Canis lupus*) au Canada qui utilisaient les routes pour parcourir de plus grandes distances plus rapidement qu'en forêt, augmentant ainsi la probabilité de rencontre avec leur proie principale, le caribou (*Rangifer tanrandus* ; Whittington et al. 2011; Dickie et al. 2017). Dans la province de Limpopo, Afrique du Sud, les lycaons (*Lycaon pictus*) adaptaient leur stratégie de chasse aux clôtures : 81% de leurs captures ont eu lieu à proximité de ces caractéristiques linéaires, empêchant les proies de fuir et facilitant leur mise à mort (Rhodes and Rhodes 2004). Les charognards exploitent également préférentiellement les bords des autoroutes en particulier au printemps en France, saison durant laquelle la probabilité de persistance des cadavres de petite et moyenne tailles est la plus faible (Guinard et al. 2012).

Étant donné la variabilité des réponses des espèces face aux routes et aux clôtures, l'effet combiné de ces caractéristiques linéaires mérite une attention particulière. En effet, il peut constituer un obstacle majeur pour l'ensemble des stratégies de déplacements des animaux

(quotidien, dispersion ou migration; Carvalho et al. 2018; Jones et al. 2022; Hering et al. 2022). La structure des éléments linéaires, les capacités d'adaptation comportementale des espèces aux perturbations, de leur mobilité et de leurs besoins en ressources régissent la façon dont elles réagissent aux barrières. Par conséquent, il est primordial d'étendre les recherches à différents taxons terrestres et dans des écosystèmes variés. De même qu'il est essentiel de mieux comprendre les impacts comportementaux des ILTs clôturées sur la faune sauvage, afin d'appréhender plus globalement leurs effets. Cela permettrait aux gestionnaires d'intégrer ces connaissances dans la planification des mesures d'atténuation afin d'améliorer la transparence des ILTs et conserver les voies naturelles de déplacement des populations animales dans le paysage (Gates et al. 2012; McInturff et al. 2020).

A ce jour, la plupart des études sur les réponses comportementales des ongulés aux clôtures se sont concentrées sur les clôtures de pâturage, d'espaces protégés et de propriétés privées (ex : Xu et al. 2021; DeVoe et al. 2022; Laguna et al. 2022). Bien qu'elles entravent généralement les déplacements, ces clôtures ont un effet semi-perméable car les ongulés sont capables de sauter par-dessus ou de ramper sous les fils des clôtures (Jones et al. 2018). En revanche, les clôtures d'exclusion de la faune installées le long des voies rapides sont plus restrictives. Leur hauteur (~2 m en France) et la taille des mailles (~15cm x 10cm) empêchent les grandes espèces de passer sans risquer de rester piégées et de mourir d'épuisement (Buton 2023). Malgré ces contraintes, l'effet simultané des autoroutes et des clôtures d'exclusion de la faune sur les réponses comportementale des ongulés a été peu étudié (mais voir Dodd et al. 2007; Olsson and Widen 2008; Jones et al. 2022). Dès lors, les études sur les interactions ongulés – routes – clôtures se sont concentrées principalement sur les effets directs (risque de mortalité, taux de franchissement ; Harrington and Conover 2006; Dodd et al. 2007; Huijser et al. 2016; Caldwell and Klip 2020) et indirects (utilisation de l'espace, déplacements à distance des ILTs; Beyer et al. 2016; Boyle et al. 2020). Pourtant, les réponses comportementales des ongulés aux routes clôturées semblent bien plus complexes. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que les animaux interagissent rapidement avec les caractéristiques linéaires (traversée ou demi-tour; Xu et al. 2021; Hering et al. 2022) mais aussi sur des temps plus longs selon leur stratégie de déplacement (vigilance, nourrissage, longe et allers-retours; Gates et al. 2012; Mulero-Pázmány et al. 2022; Hering et al. 2022). Une connaissance plus approfondie des réactions comportementales des animaux au niveau des routes et des clôtures doit donc être acquise. En effet, l'efficacité des mesures d'atténuation en dépend : si les animaux se déplacent loin des routes, l'installation d'un ouvrage conçu spécifiquement pour le passage de la faune pourrait

être moins pertinente, tandis que s'ils évoluent à proximité des routes et les longent, de tels ouvrages seraient plus susceptibles d'être utilisés.

Dans ce contexte, notre objectif est d'évaluer l'influence de la proximité d'une ILT clôturée dépourvue de structures dédiées au passage d'animaux (donc sans passage à faune), sur le comportement de déplacement de deux espèces d'ongulés répandues dans le paysage français, le chevreuil et le sanglier. Ces espèces ont été choisies en raison de leur sensibilité présumée différente aux ILTs. En général, ces espèces ont tendance à éviter les routes lors de leurs déplacements (chevreuil : Coulon et al. 2008; Passoni et al. 2021; Luca Bastianelli et al. 2024 ; sanglier : Theuerkauf and Rouys 2008; D'Amico et al. 2016; Naidenko et al. 2021; Luca Bastianelli et al. 2024). Toutefois, des études montrent que le chevreuil ne semble pas systématiquement éviter les routes. Par exemple, Naidenko et al. (2021) ont observé, par suivi photographique de transects parallèles à une autoroute en Russie, que la distribution des sangliers était influencée par la proximité de l'ILT, contrairement à celle du chevreuil. De même, Theuerkauf and Rouys (2008), en analysant la répartition des fèces près de routes en Pologne, sont arrivés à des conclusions similaires. Ces auteurs ont suggéré que les déplacements du chevreuil à proximité des ILTs pouvaient être motivés par l'absence de prédateur, une pression de chasse réduite ou une ressource alimentaire plus abondante dans ces zones.

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure l'autoroute A34 pouvait affecter le déplacement de ces ongulés dans le paysage, en termes d'effet répulsif ou attractif de ses abords, de franchissabilité et d'éventuelle modification des comportements de déplacement. Pour répondre à cette question, nous avons équipé des individus de colliers GPS et comparé les résultats d'analyses spatiales entre deux types d'ILTs : l'autoroute A34 et le réseau de routes secondaires. Ces infrastructures, bien que de même nature, pourraient présenter une perméabilité différente en raison de la largeur de chaussée, des perturbations liées au trafic et de la présence de la clôture le long de l'autoroute. Plus précisément, les analyses ont consisté à : (1) comparer la répartition spatiale des localisations de chevreuils et de sangliers aux abords de ces infrastructures afin de détecter un éventuel effet répulsif ou attractif, (2) évaluer l'attractivité des ouvrages de franchissement potentiels de l'autoroute en comparant le nombre d'occasions de traversées avec le nombre de traversées réelles, (3) mesurer, catégoriser puis comparer les différents types d'interactions des individus avec les abords directs de l'autoroute et du réseau routier secondaire et enfin, (4) explorer l'influence des habitats environnants sur les types d'interaction identifiés aux abords de l'autoroute.

ZONE D'ETUDE

L'étude a été conduite dans le département des Ardennes dans le Nord-Est de la France, entre Charleville-Mézières et Rethel (49°37'49.1"N, 4°33'26.1"E ; **Figure 13**). L'ILT étudiée, l'A34, est une autoroute à 2x2 voies grillagée (2m de hauteur) sur toute sa longueur depuis sa complète ouverture à la circulation, en 2003. Par ailleurs, au sud de Charleville-Mézières, l'autoroute A34 bifurque à l'Est en direction de Sedan, ville où elle se termine, tout en se connectant à l'autoroute A304 à l'Ouest, une infrastructure aux caractéristiques similaires mise en service en 2018. Le tronçon autoroutier considéré dispose de 53 ouvrages d'art (ponts et ponts-cadre) à destination du trafic local, ainsi que de plusieurs buses à des fins de drainage. Par ailleurs, une voie ferrée non grillagée à faible trafic longe l'autoroute. Toutefois, elle n'est pas prise en compte dans cette étude, car elle ne semble pas entraver les déplacements du chevreuil et du sanglier, qui ont pu la traverser à plusieurs reprises (Delamare 2023). L'autoroute A34 traverse un paysage rural composé de villages, de bocages, de forêts de feuillus et d'Epicéa commun (*Picea abies*). Le sud de la zone d'étude est néanmoins dominé par les terres cultivées, marquant la transition vers les vastes plaines céréalières du Bassin Parisien. Le climat est de type semi-continental et l'altitude varie de 86 à 214 m, avec la partie nord de la zone d'étude plus vallonnée que celle du sud. Les sites considérés pour chacune des deux espèces (chevreuil : 1347,4 ha ; sanglier : 30879,9 ha) sont définis par les domaines vitaux fusionnés des individus de chaque espèce (Burt 1943; **Figure 13**). Ceux-ci sont estimés par le modèle de mouvement du pont brownien dynamique (dBBMM; Kranstauber et al. 2012) à 99% de l'ensemble des localisations GPS horaires des individus suivis par collier GPS. Sur les sites considérés, la densité d'autoroute est de 0,44 km/km² pour le chevreuil et de 0,07 km/km² pour le sanglier. En ce qui concerne le réseau routier secondaire (composé uniquement des routes départementales et communales ; désignées ci-après sous le terme « routes »), la densité est de 0,59 km/km² pour le chevreuil et de 0,78 km/km² pour le sanglier. Sur l'ensemble de la zone d'étude, le chevreuil et le sanglier sont chassés en battue d'octobre à février et ne connaissent pas de prédateurs naturels à ce jour.

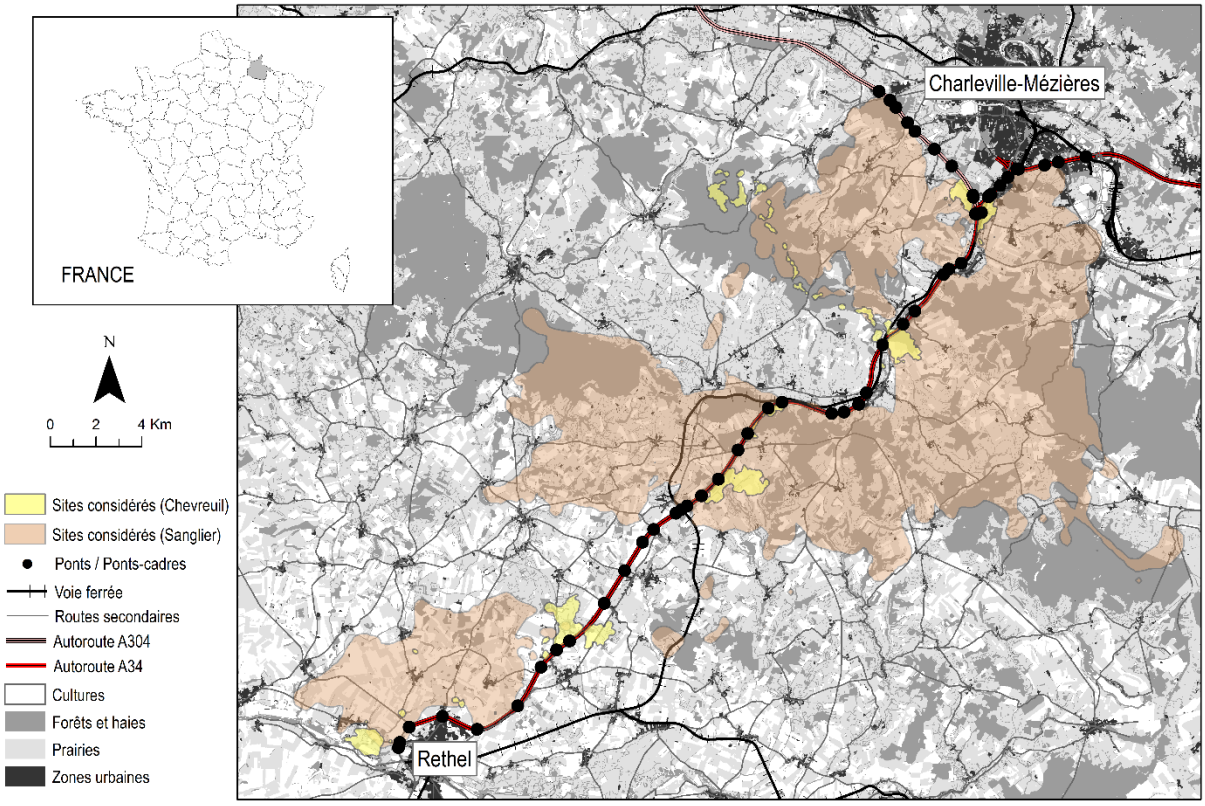


Figure 13 : Localisation de la zone d'étude dans le département des Ardennes, au Nord-Est de la France. Dans chaque site considéré, la proximité à l'autoroute A34 a été étudiée pour son effet sur le déplacement du chevreuil et du sanglier, en comparaison de celle au réseau routier secondaire

MATERIEL ET METHODES

La méthode repose sur une approche comparative entre deux types d'ILTs, les routes secondaires et l'autoroute A34, pour évaluer leurs potentiels effets distincts sur les déplacements d'ongulés. Dans un premier temps, l'analyse porte sur la répartition spatiale des localisations GPS d'individus. Cela permet de détecter un éventuel effet répulsif ou attractif des infrastructures sur leurs déplacements quotidiens. Dans le cas où l'autoroute n'exerce pas d'effet répulsif majeur, sa perméabilité est évaluée en fonction de la présence de sites de traversée potentiels (i.e. transparateurs). Cette évaluation repose sur l'attractivité des ouvrages de franchissement potentiels (ponts, ponts-cadre), à travers les occasions de traversée mesurées chez les individus suivis par colliers GPS. Dans un second temps, l'étude se concentre sur le comportement de déplacement des animaux à proximité des ILTs. Cette proximité est définie par la zone d'influence (ZI) de l'infrastructure. Cette zone est estimée selon la méthode d'analyse des comportements aux barrières (« Barrier Behavior Analysis ») développée par Xu et al. (2021). Dans cette zone, le comportement de déplacement des animaux est présumé être

directement affecté par l'ILT. Chaque déplacement enregistré dans cette zone est considéré comme un événement de rencontre, reflétant une interaction entre l'animal et l'ILT. Ces événements forment le cadre des deux axes d'analyse complémentaire de l'effet direct des ILTs sur le comportement de déplacement. Le premier axe examine la vitesse et les paramètres des événements de rencontre (temps passé, distance parcourue, amplitude) pour caractériser la dynamique de déplacement des ongulés aux abords des ILTs. Le second axe quantifie les types de réponses comportementales lors de ces événements, en s'inspirant d'une méthode de classification des événements de rencontre (ex. longe, demi-tour, traverse; Xu et al. 2021). Cette quantification permet d'évaluer la fréquence des différents types de comportements de déplacement individuels en réponse à une ILT. Ces deux axes, analysés conjointement, permettent de déterminer si les ILTs et leur environnement immédiat constituent une barrière, un risque (mortalité par collision avec des véhicules) ou, au contraire, une opportunité pour exploiter certaines ressources essentielles (ex. alimentation, abris). Enfin, la méthode intègre également l'influence de l'occupation du sol adjacent aux ILTs, en considérant la diversité des habitats environnants (forêts, prairies, cultures annuelles, zones artificielles). Ces habitats peuvent moduler les réponses comportementales des ongulés en induisant des réactions spécifiques, susceptibles de favoriser ou d'entraver leur capacité de déplacement. En combinant ces différentes méthodes, cette approche globale vise à mieux comprendre l'effet spécifique de l'autoroute A34 et de son environnement sur les déplacements des ongulés.

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées séparément pour chaque espèce à l'aide des packages « dplyr », « move », « sf », « rstatix », « ade4 » et leur représentation graphique avec les packages « ggplot2 » et « ggpubr » implantés dans le programme R v4.4.0 (R Core Team 2024).

Modèles des colliers GPS

Trois modèles de collier GPS ont été utilisés : un destiné aux chevreuils et deux aux sangliers. Chaque modèle a respecté la contrainte de ne pas dépasser 5% du poids de l'animal, conformément aux recommandations de Aldridge and Brigham (1988) et Casper (2009). De plus, les modèles ont été conçus pour répondre à un protocole de suivi spécifique sur une année : une série d'enregistrements fins (1 localisation/5 minutes/24 heures ; nommé ci-après « suivi fin ») réalisé une fois par semaine couplé à un suivi horaire hebdomadaire (1 localisation/heure/168 heures ; nommé ci-après « suivi horaire »). Une résolution GPS haute

fréquence (5 min) a été choisie pour le suivi fin afin de minimiser le risque de manquer entièrement une interaction animal-ILT, en particulier si celle-ci se déroule rapidement, ou de classer l'interaction de manière erronée (Hering et al. 2022).

Dans un premier temps, des colliers GPS ont été développés pour chaque espèce en collaboration avec l'entreprise locale Agom-systèmes® (Reims, France). Cette collaboration découle de travaux précédents fructueux dans le développement de systèmes autonomes de géolocalisation (Gautrelet 2023). Trois versions du modèle Collier traceur GPS 4G (nommées ici « Agom1 », « Agom2 » et « Agom3 ») ont ainsi été créées pour les chevreuils, et deux versions (« Agom2 » et « Agom3 ») pour les sangliers. Ces modèles ont été déployés sur les animaux entre octobre 2021 et juillet 2022 (**Annexe 1**). Malgré l'amélioration des systèmes embarqués à chaque version, la durée de vie annoncée par le constructeur (1 an) et/ou la précision du GPS ne satisfaisait pas le protocole de suivi souhaité (**Tableau 1**). La pose de chaque version a été stoppée dès lors qu'une nouvelle version émergeait.

Tableau 1: Caractéristiques des colliers GPS en fonction du modèle et de l'espèce. CH : chevreuil ; SA : sanglier

Espèces	Modèles	Poids (g)	Durée de vie[a] (j)		Programmation	Erreur de localisation (m)	
			Nb de colliers	Moyenne ± SD		Nb de colliers	Moyenne ± SD
CH	Agom1	600	2	67 ± 35,4	1 loc/10min/24h + 1 loc/h/6j de 00:00 à 00:00	3	46,5 ± 117,4
CH	Agom2	600	1	30		3	62,3 ± 101,6
SA		850					
CH	Agom3	600	2	158 ± 169,7	1 loc/10min/24h + 1 loc/h/6j de 12:00 à 12:00	4	34,1 ± 104,2
SA		850					
CH	Agom4	600	4	270,8 ± 119,2	1 loc/5min/24h + 1 loc/h/6j de 12:00 à 12:00	3	4,4 ± 3,4
SA	Tellus GSM	1090	1	243	1 loc/5min/48h + 1 loc/h/5j de 00:00 à 00:00	3	7,8 ± 27,9
SA	Vertex Lite	1045	2	236,5 ± 3,5	1 loc/5min/14h de 16:00 à 06:00 + 1 loc/h/6,4j de 12:00 à 12:00	7	21,0 ± 21,3

[a] estimée à partir des colliers pour lesquels le suivi s'est terminé par l'arrêt du collier (voir **Annexe 1**)

Dans un second temps, une ultime version du modèle Collier traceur GPS 4G (« Agom4 ») a été développée puis posée sur les chevreuils, de septembre 2022 à juin 2023, avec une durée de vie et une précision de géolocalisation plus importantes (**Tableau 1**). Les suivis des individus équipés de cette version ont donc été retenus pour la suite de l'étude.

En parallèle, de juillet 2021 à mai 2022, les sangliers ont été équipés du modèle Tellus GPS/GSM (Followit Sweden AB, Lindesberg, Suède). Muni d'un système de drop-off conçu pour libérer l'animal de son collier, ce modèle a permis des suivis fins plus longs pour une durée supérieure à 6 mois (**Tableau 1**). Cependant, le modèle Tellus GSM n'étant pas adapté initialement à la morphologie du sanglier, plusieurs individus ont perdu leur collier et leur suivi arrêté prématurément (Annexe A). Par conséquent, les sangliers ont été équipés par la suite du modèle Vertex Lite GPS/GSM (Vectronic Aerospace, Gmbh, Berlin, Allemagne) qui a semblé plus adapté à l'espèce puisqu'aucune perte de collier n'a été constatée. Un système de drop-off à compte-à-rebours a été conçu sur ce modèle pour détacher le collier au bout de 70 semaines. L'erreur de localisation estimée (distance Euclidienne entre la position du point enregistré et de son emplacement réel ; voir ci-après pour la méthode) pour ce modèle est néanmoins 3 fois supérieure au modèle Tellus (**Tableau 1**). Les suivis enregistrés par les modèles Tellus GSM et Vertex Lite ont été conservés pour les analyses ultérieures. Les tests de précision des colliers GPS de chaque modèle ont été réalisés en milieu « fermé » suivant le protocole décrit dans Gautrelet (2023).

Capture et suivi

Les animaux ont été capturés par télé-anesthésie de janvier 2021 à juillet 2022 ou par piégeage d'avril 2021 à janvier 2024. En raison du faible succès de capture par télé-anesthésie (1 chevreuil et 1 sanglier capturés/205 heures d'affût), des cages (180 x 120 x 120 cm ; photo en **Annexe 2**) et des enclos de type « corral » (5 m de diamètre ; photo en **Annexe 2**) ont été installés le long de l'autoroute. Ces dispositifs de capture, appâtés au maïs une fois par semaine, ont été équipés d'un système de surveillance (24/24h et 7/7j), ainsi que d'un système de fermeture à distance. Les chevreuils, dont la taille était jugée suffisante pour supporter le poids du collier et en bonne santé, ont été immobilisés par injection en intramusculaire d'un mélange anesthésiant (chlorhydrate de médétomidine (Domitor® ; 0,11 mg/kg) et hydrochloride de kétamine (Imalgene100® ; 4,09 mg/kg)). Cependant, après la mort d'individus équipés (n=3) dans la semaine suivant leur capture, pour une raison inconnue mais possiblement liée à l'anesthésie, la méthode d'immobilisation par anesthésie a été remplacée par une immobilisation physique : l'opérateur entre dans le dispositif de piégeage et attrape l'animal à l'aide d'un filet. Pour les sangliers, les individus d'un poids suffisant (estimation visuelle) et en bonne santé ont été immobilisés par une injection en intramusculaire d'un mélange anesthésiant (chlorhydrate de Tilétamine et de Zolazepam (Zoletil100® ; 5,5 mg/kg) et de Xylazine (2,75

mg/kg)). Lors de l'immobilisation, les animaux étaient sexés, mesurés, pesés et équipés d'un collier GPS. Les chevreuils maintenus par contention manuelle et en état de vigilance étaient seulement sexés et équipés d'un collier GPS. Les chevreuils anesthésiés ont reçu une injection de chlorhydrate d'atipamezol (Revertor® ; 0,34 mg/kg) pour inverser l'effet de la médétomidine. Au terme de la manipulation, les animaux ont été relâchés sur leur lieu de capture.

Les données recueillies à partir du modèle « Agom4 » utilisé pour le suivi du chevreuil ont été sauvegardées dans le collier. Elles ont ensuite été envoyées par transmission GSM tous les 5 jours sur une plateforme de stockage, de visualisation et de téléchargement des données en ligne (https://wild.geoagom.fr) mise à disposition par le constructeur.

Pour les sangliers, les colliers GPS du modèle Tellus GSM ont été programmés pour enregistrer une localisation toutes les 5 minutes pendant 48 heures et toutes les heures les jours restants de la semaine, de 00h00 à 00h00 UTC. Les colliers du modèle Vertex Lite ont été programmés pour enregistrer une localisation toutes les 5 minutes pendant 14 heures de 16h00 à 06h00 UTC une fois par semaine et toutes les heures les jours restants de la semaine, de 12h00 à 12h00 UTC. La réduction de la durée du suivi fin a été imposée par la durée de vie limitée du collier, spécifiée par le fabricant, dans le cadre d'un suivi fin hebdomadaire en parallèle du suivi horaire. Pour prolonger la durée de vie des colliers de 8 à 12 mois, la programmation du suivi fin a été optimisée en ciblant la plage horaire dans laquelle les sangliers se déplacent le plus. Ces périodes ont été déterminées en analysant les distances les plus élevées entre deux points successifs, considérées comme indicatrices de déplacements. Cette optimisation s'est appuyée sur les données issues de suivis antérieurs réalisés sur cinq sangliers (n=5) équipés de colliers Tellus GSM dans la zone d'étude. Comme pour le chevreuil, les données ont été transmises sur une plateforme en ligne (Tellus GSM : https://geo.followit.se/Pages/LoginPage.aspx ; Vertex Lite : https://inventa.vectronic-wildlife.com/map) pour y être téléchargées après transmission GSM toutes les 8 localisations (Tellus GSM) ou 6 localisations (Vertex Lite). Seuls les individus suivis au moins un mois ont été intégrés aux analyses ultérieures.

Gestion des données GPS

Les points nuls (absence de coordonnées) et les points spatialement imprécis, en raison d'un nombre insuffisant de satellites lors de l'acquisition GPS, ont été supprimés de chaque jeu de données. Dans le cas du filtrage des points imprécis, les localisations supérieures à 50 mètres (intervalle de temps de 5 minutes) ou à 250 mètres (intervalle de temps d'une heure) de la

localisation antérieure et postérieure avec un angle inférieur à 30 degrés ont été retirées. Ces valeurs ont été retenues après vérification visuelle de points formant un « pic » entre deux localisations sous le logiciel ArcGIS 10.2.2 (ESRI). L'indicateur de précision fourni par le collier GPS, la DOP (« Dilution Of Precision »), n'a pas été utilisé ici parce qu'il était peu informatif sur l'erreur de localisation pour chaque modèle (Corrélation de rang de Kendall (τ) ; « Agom4 » : $\tau = 0,16$; Tellus GSM : $\tau = 0,10$; Vertex Lite : $\tau = 0,12$). Pour les suivis horaires, le taux d'acquisition des données était de 97,46 % pour le modèle « Agom4 », 63,93 % pour Tellus GSM, et 77,73 % pour Vectronic Lite. Pour les suivis fins, ces taux atteignaient respectivement 99,88 %, 75,39 % et 78,90 % pour le modèle « Agom4 », Tellus GSM et Vectronic Lite.

Zone d'influence des ILTs

Dans le but d'évaluer le comportement de déplacement d'un individu en réponse à une ILT, une zone tampon a été définie afin d'identifier les localisations GPS situées à proximité immédiate de l'ILT. Cette zone a été délimitée à l'aide de la fonction « BaBA » du package *Barrier Behavior Analysis* (BaBA ; Xu et al. 2021) dans l'environnement du logiciel R v4.4.0. Selon les auteurs de ce package, la distance optimale pour étudier les comportements de déplacement à proximité d'une barrière potentielle correspond à la plus courte distance à cette barrière où figure le plus grand nombre de traversées de cet élément barrière en un court laps de temps (*quick cross*). Xu et al. (2021) suggèrent que la distance de la zone tampon à retenir est la distance à partir de laquelle le nombre de *quick cross* diminue ou se stabilise pour former un palier. Pour les deux espèces, le nombre de *quick cross* a été calculé en exécutant la fonction « BaBA ». La distance à l'ILT (d) variait de 50 à 180 m (chevreuil) ou de 100 à 250 m (sanglier), avec un incrément de 10 m. Les paramètres suivants impliqués dans la fonction ont été choisis selon l'écologie similaire des deux espèces :

- un intervalle de temps de 5 minutes (min), définit selon la résolution GPS du suivi fin ;
- une fenêtre glissante pour la rectitude moyenne du déplacement (w) de 1140 min, permettant de comparer la rectitude d'un événement précis à la rectitude de base sur une journée d'événement de rencontre de même durée (pour des déplacements quotidiens). Cette rectitude est un indicateur d'une orientation parallèle du mouvement à un élément linéaire, révélant un effet barrière ;

- une durée maximale considérant un court événement de rencontre (t_b) de 60 min, permettant de cadrer une interaction rapide telle que la traversée ou le demi-tour en moins d'une heure ;
- une durée minimale considérant un événement de rencontre prolongé (t_p) de 360 min, soit le quart de la journée afin de prendre en compte d'éventuelle phases d'inactivité ;
- une tolérance d'une durée maximale de 15 min, permettant à trois positions GPS occasionnelles de se trouver en dehors de la zone tampon au cours d'un événement de rencontre.

La fonction BaBA a été appliquée aux suivis fins de tous les individus d'une même espèce en considérant seulement les routes, compte tenu de l'absence de *quick cross* pour les deux espèces sur l'autoroute A34. Par conséquent, la zone d'influence définie pour les routes secondaires a également été étendue à la clôture de l'autoroute A34 (le terme « autoroute » sera toutefois conservé par la suite lorsque sera mentionnée sa ZI). Ce choix méthodologique a été privilégié pour éviter de définir arbitrairement une zone tampon autour de l'autoroute et pour limiter les biais liés à une autre approche basée sur les paramètres de déplacements. L'analyse initiale, qui utilisait la variance du dBBMM entre chaque points GPS actifs pour définir une zone d'influence des ILTs, a été abandonnée en raison de déséquilibres structurels marqués entre les groupes, de valeurs aberrantes significatives et d'une forte variabilité des paramètres de déplacement, rendant les résultats peu interprétables. La cartographie des routes et de l'autoroute A34 sont issues de la base de données BD Topo® 2022 des Ardennes. La position spatiale du grillage a été cartographiée à partir de l'imagerie aérienne de la BD Ortho® 2019 des Ardennes sous ArcGIS 10.2.2. Certaines positions spatiales du grillage ont été vérifiées à l'aide de l'outil Google Street view (Google Maps©) et lorsqu'elles n'étaient pas visibles par ces moyens, elles étaient enregistrées avec un GPS Garmin® lors d'une visite de terrain.

Répartition spatiale aux ILTs

Pour évaluer la proximité des chevreuils et des sangliers aux ILTs, la répartition spatiale des localisations horaires a été analysée au sein des dBBMM estimés pour les deux espèces (voir section « Zone d'étude »). Le suivi horaire a été privilégié pour deux raisons : (1) il permet de réduire l'impact de l'autocorrélation spatiale entre les points GPS et, (2) il permet de considérer les localisations GPS sur l'ensemble de la semaine, à l'inverse du suivi fin qui ne couvre qu'un ou deux jours (suivant la programmation du modèle de collier). La superficie des

ZI de l'autoroute et des routes présentes dans les sites considérées a été calculée ainsi que la surface disponible hors ZI. Les données de localisations ont ensuite été dénombrées pour calculer la proportion de points à l'intérieur des ZI des ILTs et ceux hors ZI. La signification statistique de la répartition des points entre les 3 groupes a été testée avec un test du Khi^2 de Pearson et les résidus standardisés calculés afin de révéler la contribution de chaque groupe au résultat global du test.

Déplacements à proximité d'un ouvrage de franchissement potentiel

L'attractivité des ouvrages de franchissement potentiels (ponts et ponts-cadre) de l'autoroute a été évaluée en quantifiant les occasions de traversée des individus suivis. Une occasion de traversée correspond à une situation où l'animal s'approche d'un ouvrage au cours de ses déplacements, ce qui lui permet potentiellement de le découvrir et d'augmenter ses chances de l'emprunter. Une zone tampon de 100m autour de chaque ouvrage a été définie arbitrairement pour délimiter l'espace où un animal peut entrer en contact avec l'ouvrage. Les occasions de traversée ont été calculées à partir des sous-trajets des suivis fins en comptant le nombre de fois où l'animal est entré dans cette zone tampon. Chaque entrée dans la zone tampon est considérée comme une occasion, sauf si des trajectoires (segments reliant deux localisations successives) consécutives restent dans la zone. Une nouvelle occasion est enregistrée lorsque l'animal quitte entièrement la zone avant d'y pénétrer à nouveau. La mesure des occasions de traversée a été réalisée sous ArcGIS 10.2.2.

Paramètres et identification des événements de rencontre

Les analyses de l'effet direct des ILTs sur le comportement de déplacement ont été réalisées sur les événements de rencontre (définis ci-après) à partir des localisations en phase d'activité des suivis fins de l'ensemble des individus équipés d'un collier GPS. Dans un premier temps, les points de localisation des suivis fins de chaque individu ont été organisés en trajet unique défini par un enregistrement continu sur une période de 16 heures ou 24 heures selon la programmation du collier. A partir de ces trajets, un sous-trajet a été identifié dès lors que le temps entre deux points successifs excédait 16 minutes (absence de 3 localisations). Dans un second temps, seuls les points correspondant aux phases d'activité ont été conservés. Cette activité a été estimée en fonction du nombre de localisations enregistrées dans un rayon de 30 mètres autour de chaque point d'un même sous-trajet. Pour le chevreuil, une période de deux heures a été considérée : si moins de 15 localisations étaient regroupées dans ce périmètre, le

point était qualifié d'actif. Pour le sanglier, la même logique a été appliquée sur une période de quatre heures, avec un seuil de 3 localisations seulement. En effet, l'alternance marquée entre phases actives et inactives chez cette espèce permet de distinguer les comportements avec un pas de temps plus court (15 minutes). En revanche, une durée plus longue (45 minutes) était nécessaire pour isoler de façon fiable les phases d'inactivité chez le chevreuil. Ces seuils ont été définis après avoir observé visuellement les amas de points, indiquant un arrêt de l'animal, à l'aide du logiciel ArcGIS 10.2.2. La première localisation de la phase d'inactivité a néanmoins été conservée comme point actif pour intégrer les déplacements avant et après l'immobilisation présumée, ainsi que sa position dans le sous-trajet (**Figure 14**). Enfin, la détermination des événements de rencontre a impliqué une ultime sélection des points des sous-trajets, ne conservant que ceux situés à l'intérieur des ZI des ILTs considérées. Par conséquent, les sous-trajets ont été fragmentés chaque fois qu'une localisation sortait de la ZI, pour ne conserver que les portions de sous-trajets strictement contenus dans celle-ci, définissant ainsi les événements de rencontre.

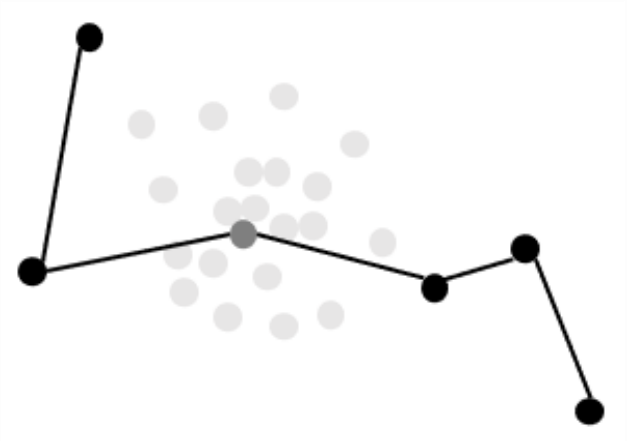


Figure 14 : Cadre théorique représentant la conservation du premier point (gris foncé) de la phase d'inactivité estimée (amas de points gris clair) dans le sous-trajet de déplacement (points et segments noirs). L'animal étant théoriquement immobile, sa localisation n'a pas bougé et peut être reliée directement au point actif suivant la phase d'inactivité afin de garder une continuité dans son déplacement. Les points inactifs ne sont pas pris en compte dans les mesures et la classification des évènements de rencontre

Pour restreindre les analyses ultérieures aux localisations se trouvant dans la ZI de chaque ILT, la distance euclidienne à l'autoroute et à la route secondaire la plus proche ont été mesurées pour chaque localisation enregistrée. Dans le cas où une localisation est située simultanément dans la ZI de l'autoroute et des routes, celle-ci est utilisée deux fois pour être prise en compte à la fois à proximité de l'autoroute et des routes. Ces distances ont ensuite été utilisées pour filtrer les localisations strictement inférieures aux valeurs définissant la largeur de la ZI des ILTs. Chaque localisation a ensuite été reliée à son point suivant pour former une trajectoire, et une valeur binaire lui a été attribuée : 1 si le segment de trajectoire associé coupe une ILT, et 0 dans le cas contraire.

Vitesse et paramètres des événements de rencontre

La vitesse au sein des ZI et les paramètres des événements de rencontre ont été mesurés séparément pour chaque ILT. Dans un premier temps, la vitesse a été calculée à partir de la distance euclidienne et du temps passé entre chaque paire de localisations successives (mesures effectuées par rapport à la localisation suivante). Pour évaluer l'impact potentiel des ILTs sur la vitesse des individus, les vitesses enregistrées à proximité des ILTs ont été comparées à une vitesse de référence. Cette dernière a été calculée à partir des sous-trajets observés dans les zones situées en dehors des ZI des deux ILTs, où le comportement des animaux est supposé ne pas être affecté par la présence de ces infrastructures. Dans un second temps, la distance parcourue, le temps passé et l'amplitude projetée des événements de rencontre ont été mesurés à partir des points qui les composent. La distance et le temps calculés entre chaque paire de localisations ont été additionnés pour chaque événement de rencontre. L'amplitude projetée est définie ici comme la distance maximale entre deux points projetés sur l'ILT, calculée à partir des coordonnées spatiales (UTM) projetées sur l'ILT des points les plus extrêmes d'un événement de rencontre (**Figure 15**). Cette approche projetée a permis de révéler au mieux le parallélisme d'un déplacement par rapport à l'ILT.

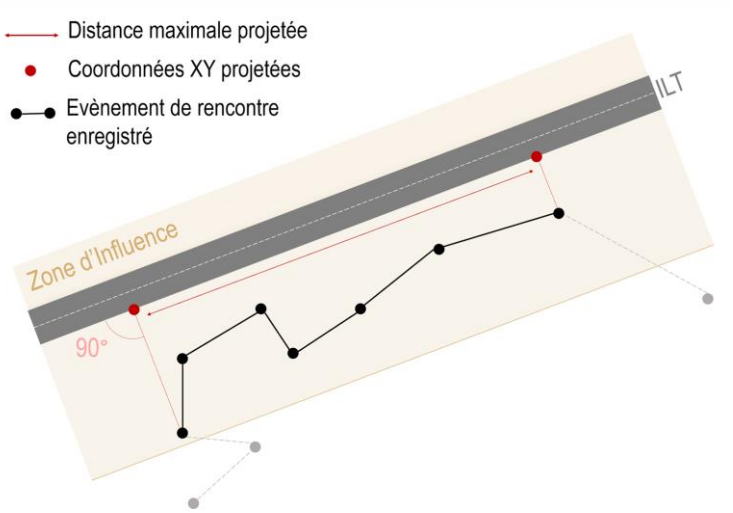


Figure 15 : Schéma de la mesure de l'amplitude projetée d'un évènement de rencontre. Les points et les segments noirs correspondent respectivement aux localisations GPS et aux trajectoires. Les points et les segments discontinus gris correspondent respectivement aux localisations GPS et aux trajectoires exclues de l'analyse

La différence des vitesses et des paramètres des événements de rencontre entre les zones (ZI des ILTs et hors ZI dans le cas de la mesure de la vitesse) a été évaluée par des tests non-paramétriques considérant l'écart significatif des données à la normalité (Test W^2 Cramer-von Mises, $p<0,001$ et test W de Shapiro-Wilk, $p<0,001$). La vitesse entre les zones a été testée par un test H de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn impliquant une correction de Bonferroni ($p<0,05$). Les localisation associées à une vitesse nulle ont été écartées des analyses (point ponctuel dans les ZI). La distance parcourue, le temps passé et l'amplitude

de déplacement dans les ZI des deux ILTs considérées ont été évalués par un test *U* de Mann-Whitney ($p<0,05$). Les localisations associées à une distance et à un temps nuls ont été écartées des analyses. Les points caractérisés par une amplitude nulle ont été conservés puisqu'ils peuvent représenter un événement de rencontre perpendiculaire à l'autoroute avec une distance parcourue et un temps bien définis. Étant donné que de nombreux déplacements individuels ont pu dévier des observations moyennes, la médiane a été utilisée plutôt que la moyenne des paramètres de déplacement, étant moins sensible aux observations extrêmes (Zar 1999).

Classification des événements de rencontre

Pour estimer la variabilité des réponses comportementales des chevreuils et des sangliers au cours des interactions avec les ILTs, plusieurs mesures préalables ont été nécessaires pour classer chaque événement de rencontre : le nombre de points constituant l'événement, le temps de l'événement, la distance parcourue, l'amplitude projetée de déplacement, la traversée ou non de l'ILT ainsi que le ratio entre l'amplitude projetée et la distance parcourue (R2). Ce dernier paramètre permet de cibler plus précisément les cas où un animal longe activement l'ILT. Il exclut les situations où ce comportement pourrait principalement résulter d'une amplitude de déplacement élevée, liée à une utilisation intensive de l'habitat (ex. alimentation) (**Figure 16**).

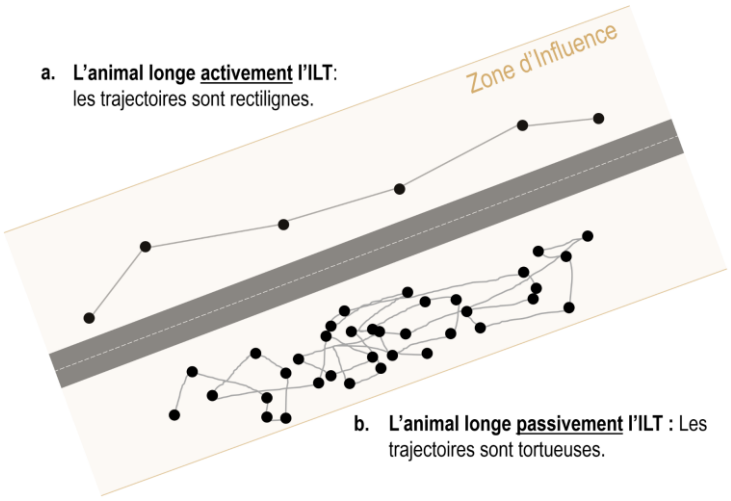


Figure 16 : Schéma théorique illustrant deux cas de déplacements que discrimine le paramètre R2 : (a) un animal longe activement l'ILT, la suivant de manière contrainte, et (b) un animal longe de manière passive l'ILT, son déplacement étant alors principalement lié à une utilisation intensive de l'habitat, sans lien direct avec l'ILT

A partir de ces mesures et en s'inspirant du raisonnement de Xu et al. (2021), quatre types de comportement ont été définis (Delamare 2023; **Figure 17**) :

- Traverse : deux localisations successives de part et d'autre de l'ILT, dont le segment les reliant croise l'ILT. Traversée = 1 ; R2<0,6 (chevreuil) ou 0,7 (sanglier).
- Longe : plusieurs localisations successives dans la ZI, sans traversée de l'ILT et dont le déplacement est parallèle à l'ILT. Traversée = 0 ; minimum de points nécessaire = 4 pour un R2>0,6 (chevreuil), 7 pour un R2 >0,5 ou 5 pour un R2>0,7 (sanglier).
- Longe puis traverse (ou inversement) : comme pour longe avec deux localisations successives de part et d'autre de l'ILT. Traversée = 1 ; minimum de points nécessaire = 4 pour un R2>0,6 (chevreuil), 7 pour un R2 >0,5 ou 5 pour un R2>0,7 (sanglier).
- Demi-tour : une seule localisation à l'intérieur de la ZI. Traversée = 0 ; temps = 0 (ponctuel).

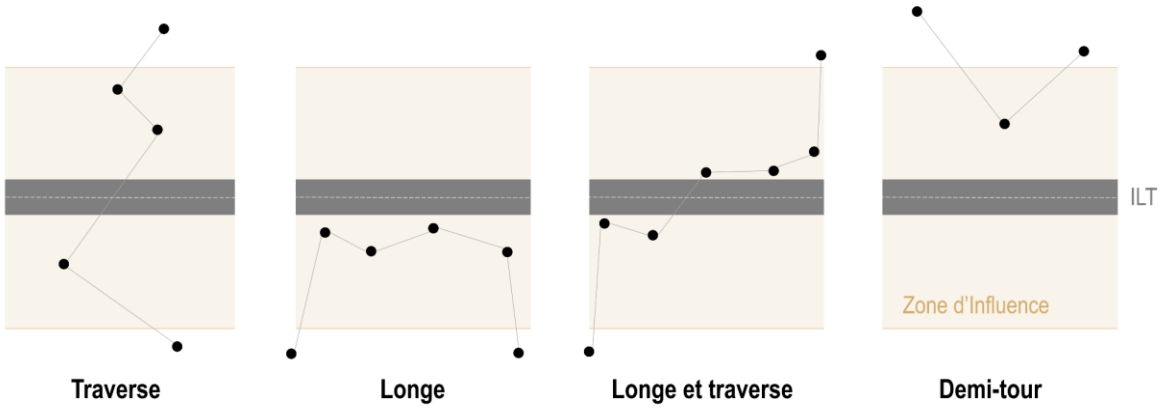


Figure 17 : Evénements de rencontre théoriques utilisés pour définir les quatre comportements aux ILTs : traverse, longe, longe puis traverse, demi-tour. Les points noirs et les lignes représentent respectivement les localisations GPS et les trajectoires

Dans le cas des réponses impliquant de longer l'ILT, les valeurs seuils pour le R2 et le nombre de points minimal retenus ont été estimés à partir d'une prévisualisation des événements de rencontre en faisant varier le R2 (de 0,5 à 0,9) et le nombre de points (de 2 à 10) sous ArcGIS 10.2.2. Les événements de rencontre qui ne correspondaient pas à une des variables de réponse présentées ci-dessus ont été catégorisés « non-classés ». En plus des mesures qui caractérisent chaque événement de rencontre, les données enregistrées comprenaient le nom de l'individu, un identifiant d'événement unique et le type de

comportement estimé dans la ZI. Dans un premier temps, les différents types de comportement ont été dénombrés pour chaque individu et ZI, afin d'analyser la variabilité inter-individuelle dans l'expression de chaque classe d'événement en réponse aux deux ILTs. Dans un second temps, la différence de fréquence de chaque classe d'événement a été testée entre les ZI de l'autoroute et des routes pour l'ensemble des individus par un test exact de Fisher ($p<0,05$), considérant les faibles effectifs. Par ailleurs, les vitesses liées à chaque classe d'événements de rencontre non ponctuelle (excluant le demi-tour) ont été calculées pour chaque ZI, puis comparées. Cette analyse vise à apporter des éléments d'interprétation aux comportements observés lors des événements de rencontre non-classés. Selon Patterson et al. (2008), un déplacement plus lent et tortueux suggère un déplacement net restreint à la recherche de nourriture ou une utilisation plus intensive des habitats. De plus, une réduction de la vitesse peut être influencée par l'arrêt de l'animal (ex. phase de repos) lors de l'événement de rencontre. La vitesse entre chaque type d'événement de rencontre a été testée par un test *H* de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn impliquant une correction de Bonferroni ($p<0,05$). Dans le cas où seuls deux classes d'événements de rencontre non ponctuels ont été identifiées aux abords d'une ILT, un test *U* de Mann-Whitney a été utilisé ($p<0,05$).

Influence de l'occupation du sol sur les événements de rencontre

Afin d'explorer la relation entre l'occupation du sol (OCS) et la variation des événements de rencontre à proximité de l'autoroute, la ZI considérée a été découpée tous les kilomètres pour tenir compte de l'hétérogénéité des variables paysagères (nommées ci-après « habitats ») le long de l'ILT (voir section « Zone d'étude »). Quatre habitats ont été retenus pour définir l'OCS : les cultures annuelles, les forêts et les haies, les prairies et les zones artificielles. La cartographie des sections de la ZI (chevreuil : 1 km x 90 m ; sanglier : 1 km x 220 m) a été croisée avec la cartographie de l'OCS pour obtenir la proportion de chaque habitat par section. En parallèle, la cartographie des points GPS des événements de rencontre identifiés a été croisée avec celle de l'OCS pour dénombrer les événements de rencontre associés à un type de comportement par section. Les sections dans lesquelles il n'a pas été dénombré d'événement de rencontre ont été écartées des analyses ultérieures. La cartographie de l'OCS de la zone d'étude (3 km de part et d'autre de l'autoroute A34) a été réalisée par le Centre d'étude et d'expertise sur les risques, l'environnement, la mobilité et l'aménagement (Cerema) à partir de la BD Topo® 2021, BD Forêt® 2014, BD Topage® 2019, du registre parcellaire graphique (RPG)

2020, de la carte d'occupation des sols 2020 (THEIA -CES OSO) et de la base de données des infrastructures routières Isidor. Les cartographies mentionnées dans cette section ont été réalisées sous ArcGIS 10.2.2. L'intersection des cartographies et les mesures qui en ont résulté ont été effectuées avec R v4.4.0.

Une analyse de co-inertie a été utilisée pour explorer la relation entre les habitats et les événements de rencontre estimés à proximité de l'autoroute. L'analyse de co-inertie identifie la covariance entre deux ensembles de variables, sur la base d'une analyse multivariée préalablement effectuée sur chacun des jeux de données, qui sont par la suite mis en relation (Dolédec and Chessel 1994). Le premier ensemble de données regroupait le décompte des types d'événements de rencontre dans chaque section d'autoroute et le second, la proportion de chaque type d'habitat par section. Les tableaux doivent partager le même nombre de lignes, dans le cas présent, celles-ci correspondaient aux sections dans lesquelles ont été comptabilisées les événements de rencontre. Considérant les variables quantitatives qui composent les deux ensembles de données, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour détecter la structure inhérente à chaque ensemble de données. Elle met ainsi en avant un axe principal qui définit la direction du vecteur maximisant l'inertie dans chaque tableau de données (Dolédec and Chessel 1994). Par la suite, l'analyse de co-inertie capture les projections des deux ACP pour lesquelles la corrélation conjointe est maximale afin d'identifier les associations similaires qui pourraient expliquer la relation commune aux deux ensembles de données. Le coefficient RV (borné entre 0 et 1) mesure ainsi la co-inertie entre les deux matrices, une valeur proche de 1 indique une forte similarité entre les deux ensembles de données. Une transformation de Hellinger a été appliquée à la matrice d'abondance des événements de rencontre pour éviter un problème de double zéro (Legendre and Gallagher 2001) et les variables environnementales ont été standardisées avant d'exécuter les ACP. Un test de permutation (n = 999) sur les résultats de l'analyse de co-inertie a été utilisé pour déterminer l'existence d'une corrélation significative entre les deux ensembles de variables ($p<0,05$). Une analyse de redondance (*Redundancy Analysis* - RDA) a ensuite été effectuée dans le cas d'une corrélation significative afin de tester l'effet d'une matrice de variables explicatives (les habitats) sur une matrice de variables réponses (les événements de rencontre). Cette analyse repose sur une statistique de type *F*, dont la significativité est testée par permutation (n=999 ; $p<0.05$). La RDA a été appliquée aux axes de l'ACP des variables environnementales afin d'améliorer la stabilité du modèle en réduisant la colinéarité des variables environnementales. L'analyse de co-inertie a été choisie pour son adaptation à des jeux de données caractérisés par

un grand nombre de variables (ici, les types de comportement et les habitats) échantillonnées sur peu de sites (les sections d'autoroute) (Dolédec and Chessel 1994).

RESULTATS

Capture et suivi

Au total, 23 chevreuils et 19 sangliers ont été capturés au cours de 205 heures d'affût et 18480 heures de piégeage. Parmi ces individus, un chevreuil a été capturé une seconde fois et un autre n'a pu être équipé d'un collier GPS pour cause de blessure mortelle lors de la capture. Sur les 41 suivis d'individus équipés d'un collier GPS, 18 suivis ($n_{chevreuil} = 9$; $n_{sanglier} = 9$) n'ont pas été inclus dans les analyses ultérieures pour plusieurs raisons : modèle du collier non conforme (voir section « Modèle des colliers GPS »), arrêt prématuré du collier (<30 jours de suivi), perte du collier ou mort de l'animal (**Annexe 1**). Par conséquent, 14 suivis de chevreuils et 10 suivis de sangliers ont été conservés pour la suite de l'étude. Pour le chevreuil, la durée cumulée des suivis a été de 3145 jours (225 ± 98 jours en moyenne par individu) permettant d'obtenir 73561 localisations horaires et un total de 435 trajets fins (n = 127709 localisations) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Récapitulatif des suivis (horaires et fins) des chevreuils

Individus	Sexe	Date de capture	Durée de suivi (j)	Nb de points horaires enregistrés	Suivis fins				
					Nb de trajet	Nb de sous-trajet	Nb de points en phase d'activité	% de points actifs dans ZI A34	% de points actifs dans ZI des routes
CH006b	M	28/01/2023	153	3583	21	24	2119	27.9	0.0
CH009	F	07/09/2022	111	2587	15	15	1492	25.4	1.5
CH010	M	07/09/2022	71	1709	10	10	829	7.8	17.6
CH011	F	11/10/2022	436	10444	61	62	8046	5.3	3.9
CH012	M	21/10/2022	240	5446	33	51	3465	0.1	0.0
CH013	F	09/12/2022	202	4997	29	30	2847	23.0	0.5
CH014	F	10/12/2022	241	5798	34	35	3160	21.6	0.7
CH015	F	08/01/2023	255	4662	28	30	3386	9.6	23.3
CH016	F	10/02/2023	152	3627	21	22	2180	29.8	2.0
CH017	M	01/03/2023	235	5554	33	34	5005	4.7	10.6
CH018	F	14/04/2023	318	7630	45	47	4488	7.4	8.5
CH019	F	01/05/2023	308	7390	44	47	4204	3.9	8.2
CH021	F	08/05/2023	300	7191	43	44	3649	0.0	0.2
CH022	M	01/06/2023	123	2943	18	22	964	0.0	0.4

En parallèle, les sangliers ont été suivis sur une durée cumulée de 1740 jours (174 ± 56 jours en moyenne par individu) permettant d'enregistrer 30209 points horaires et un total de 412 trajets fins (n = 72953 localisations) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Récapitulatif des suivis (horaires et fins) des sangliers

						Suivis fins				
Individus	Sexe	Modèle de collier	Date de capture	Durée de suivi (j)	Nb de points horaires enregistrés	Nb de trajet	Nb de sous-trajet	Nb de points en phase d'activité	% de points actifs dans ZI A34	% de points actifs dans ZI des routes
SA006	M	Tellus GSM	23/02/2022	145	2161	42[a]	150	2761	2.4	22.9
SA008	F	Tellus GSM	15/03/2022	243	4631	70[a]	142	4703	8.8	10.6
SA009	M	Tellus GSM	05/04/2022	190	2142	56[a]	312	3045	0.3	6.4
SA010	M	Tellus GSM	17/04/2022	179	2383	50[a]	243	3651	11.1	16.7
SA012	M	Tellus GSM	16/05/2022	188	3183	54[a]	180	4490	1.7	20.7
SA015	M	Vertex Lite	14/04/2023	78	1007	9	29	529	0.0	7.0
SA016	M	Vertex Lite	30/05/2023	234	5067	33	404	2470	0.0	15.3
SA017	F	Vertex Lite	05/06/2023	239	3860	34	150	2034	1.1	21.4
SA018	M	Vertex Lite	16/11/2023	125	2953	17	18	1336	1.3	5.1
SA019	M	Vertex Lite	22/11/2023	119	2822	17	23	1415	5.4	18.7

[a] Suivis fins issus du modèle de collier Tellus GSM (soit un enregistrement/5min/48h; **Tableau 1**)

Proximité aux ILTs

La distance retenue pour définir la largeur de la ZI des ILTs dans le cas du chevreuil était de 90 m (soit une largeur totale de 180m ; **Figure 18**). Les ZI de l'autoroute et des routes représentaient respectivement 6,39% (86,06 ha) et 8,16% (109,93 ha) de la superficie totale de la zone considérée pour le chevreuil (1347,43 ha). La densité des localisations horaires chez le chevreuil à proximité de l'autoroute et des routes était respectivement de 84,08 points GPS/ha et 28,82 points GPS/ha. Le test du Khi^2 a indiqué que la répartition des localisations observées s'écartait significativement d'une répartition aléatoire (χ^2=2709,8 ; p<0.001). L'analyse des résidus standardisés a révélé une fréquence des localisations plus élevée qu'attendue aux abords de l'autoroute (*r*= 38,26) et inversement pour les routes (*r*= -38,17), qui sont évitées par les chevreuils.

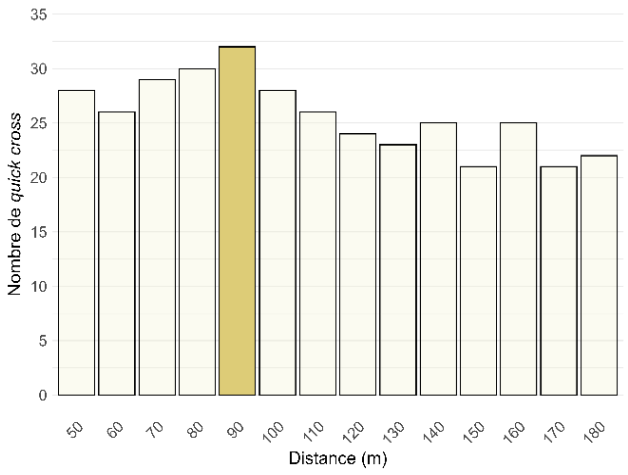


Figure 18 : Distance estimée fixant la largeur de la zone d'influence des ILTs (A34 et routes) chez le chevreuil. Elle correspond au seuil à partir duquel le nombre de quick cross diminue (barre surlignée en jaune)

Pour les sangliers, la largeur de la ZI des ILTs a été estimée à 220 m (soit une largeur totale de 440 m ; **Figure 19**). Les ZI de l'autoroute et des routes représentaient respectivement 2,52% (777,02 ha) et 22,99% (7098,32 ha) de la superficie totale de la zone considérée pour l'espèce (30879,85 ha). La densité des localisations horaires était de 1,15 points GPS/ha et de 0,63 points GPS/ha à proximité respective de l'autoroute et des routes. Le test du Khi^2 a révélé une répartition significativement biaisée des localisations horaires chez le sanglier (χ^2=1156,5 ; p<0.001) avec une fréquentation des abords de l'autoroute (*r*= 4,84) plus élevée que les routes, contre-sélectionnées par l'espèce (*r*= -33,96).

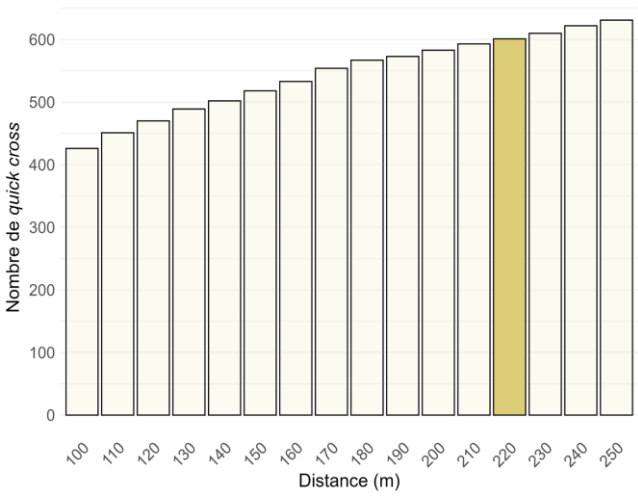


Figure 19 : Distance estimée fixant la largeur de la zone d'influence des ILTs (A34 et routes) chez le sanglier. Elle correspond au seuil à partir duquel l'augmentation du nombre de quick cross se stabilise autour de 1,5% (barre surlignée en jaune)

Occasions de traversée

Aucune traversée de l'autoroute n'a été observée chez les chevreuils et les sangliers conservés dans l'étude. Pourtant, ces individus se sont approchés à 100m ou moins des ouvrages de franchissement potentiels (n=53), lors de 33 sous-trajets pour les chevreuils et 13 pour les sangliers. Parmi ces déplacements, les chevreuils ont eu 37 occasions d'utiliser un ouvrage pour traverser l'autoroute tandis que les sangliers en ont eu seulement 18.

Influence des ILTs sur les paramètres de déplacement

La vitesse chez le chevreuil était significativement différente d'une zone à l'autre (*H*=50,88 ; p<0,0001 ; **Figure 20**). Les individus se déplaçaient plus rapidement aux abords des routes (médiane = 2,01 m/min, variant de 0 à 221,36 m/min), dans une moindre mesure hors des ZI (médiane = 1,69 m/min, variant de 0 à 179,61m/min) et plus lentement à proximité de l'autoroute (médiane = 1,55 m/min, variant de 0 à 115,87 m/min).

Sur la durée totale de suivi des chevreuils, 427 événements de rencontre (variant de 0 à 77/individu) ont été enregistrés à proximité de l'autoroute et 301 (variant de 0 à 85/individu) à proximité des routes. Deux individus ne se sont jamais approchés à moins de 90 m de l'autoroute de même qu'un individu pour les routes. Les chevreuils parcouraient de plus longues distances à l'intérieur de la ZI des routes (*U*=35513 ; p<0,05 ; médiane$_{ZIroute}$ = 130,38 m, variant de 1,05 à 1229,90 m ; médiane$_{ZIautoroute}$ = 99,96 m, variant de 0,85 à 1904,47 m), comme pour l'amplitude (*U*=34746 ; p<0,01 ; médiane $_{ZIautoroute}$ = 54,33 m, variant de 0 à 774,54 m ; médiane $_{ZIroute}$ = 75,55 m, variant de 0 à 829,51 m ; **Figure 21**). A l'inverse, le temps passé à proximité de l'autoroute était plus élevé (*U*=44085 ; p<0,05 ; médiane$_{ZIautoroute}$ = 45,02 min, variant de 4,98 à 1435,03 min ; médiane$_{ZIroute}$ = 40 min, variant de 4,98 à 1315,02 min ; (**Figure 21**).

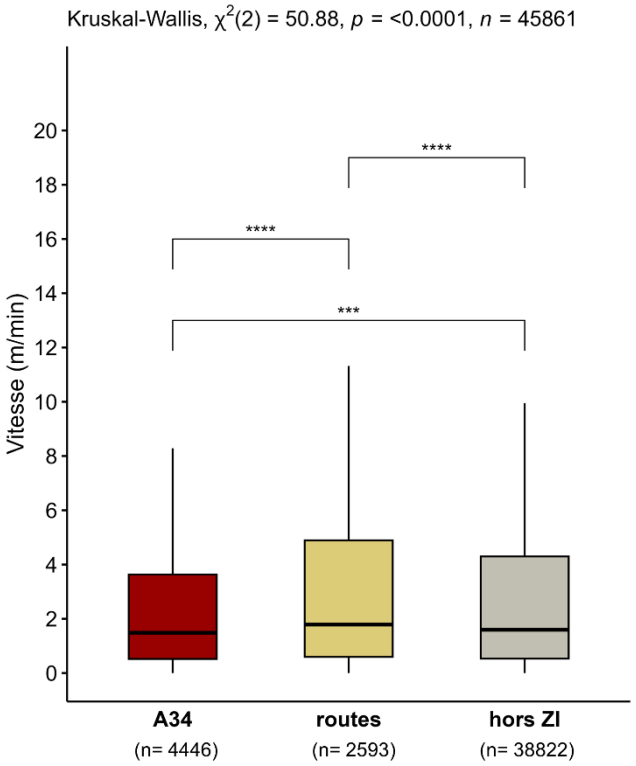


Figure 20 : Vitesse des chevreuils selon la proximité aux ILTs et hors zone d'influence des ILTs (*p<0,001, ****p<0,0001)**

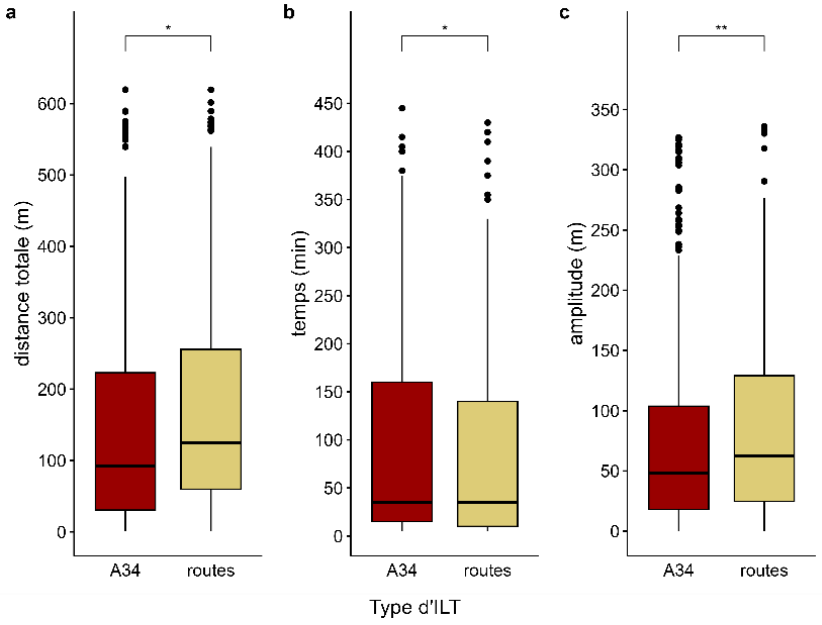


Figure 21 : Paramètres de déplacement des événements de rencontre des chevreuils à proximité directe des ILTs ayant une influence négative relative sur le déplacement des ongulés (*p<0,05, **p<0,01)

Dans le cas du sanglier, la vitesse variait significativement entre les zones (*H*=34,34 ; p<0,0001 ; **Figure 22**). Les sangliers se déplaçaient plus rapidement aux abords des routes (médiane = 12,74 m/min, variant de 0,01 à 216,07 m/min) que dans les autres zones où les vitesses étaient similaires (médiane $_{ZIautoroute}$ = 11,24 m/min, variant de 0,02 à 123,83 m/min ; médiane $_{hors\ ZI}$ = 11,33 m/min, variant de 0,02 à 204,58 m/min).

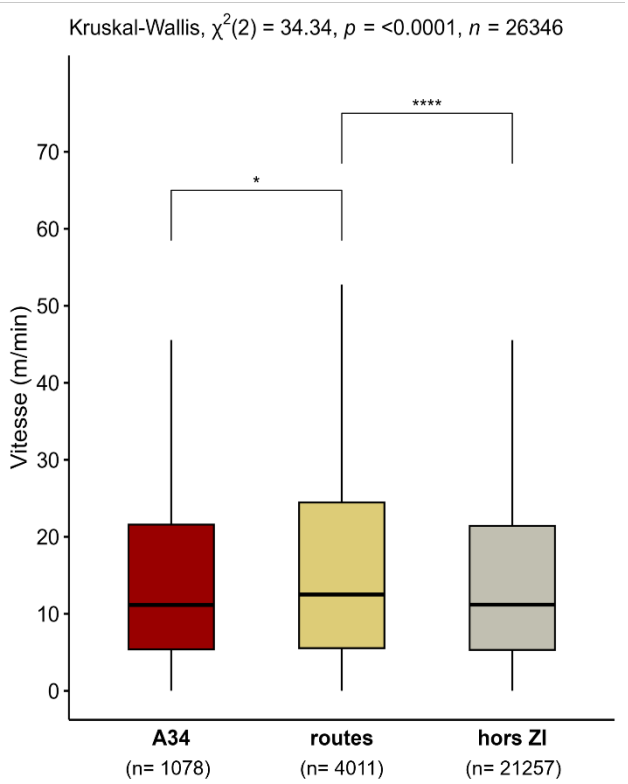


Figure 22 : Vitesse des sangliers selon la proximité aux ILTs et hors zone d'influence des ILTs (*p<0,05, ****p<0,0005). Pour une meilleure lecture, les valeurs aberrantes ont été retirées du graphique

Le suivi des sangliers a permis d'enregistrer 181 événements de rencontre (variant de 0 à 72/individu) à proximité de l'autoroute et 815 (variant de 9 à 154/individu) à proximité des routes. Aucune localisation n'a été relevée à moins de 220 m de l'autoroute pour deux individus. La distance parcourue au sein de la ZI des deux ILTs considérées (médiane $_{ZIautoroute}$ = 400,32 m, variant de 8,83 à 5953,13 m ; médiane $_{ZIroutes}$ = 354,92 m, variant de 1,82 à 2834,29 m) n'était pas différente chez le sanglier (**Figure 23**). En revanche, en excluant les événements de traversée des routes (n = 282), la largeur totale de la ZI des routes a été ramenée à celle de l'autoroute, soit 220 m de part et d'autre. Cette valeur correspond à la largeur effectivement accessible en l'absence de franchissement. Dans ce cas, la distance parcourue était significativement plus élevée aux abords de l'autoroute que des routes (*U* = 29815,5 ; p<0,0001). Les sangliers passaient plus de temps à proximité de l'autoroute (*U*=47037 ; p<0,005 ; médiane $_{ZIautoroute}$ = 34,56 min, variant de 4,32 à 804,96 min ; médiane $_{ZIroute}$ = 24,48 min, variant de 4,32 à 1199,95 min), comme pour l'amplitude (*U*=44656 ; p<0,05 ; médiane $_{ZIautoroute}$ = 231,35 m, variant de 0 à 4629,70 m ; médiane $_{ZIroute}$ = 170,88 m, variant de 0 à 1784,85 m ; **Figure 23**).

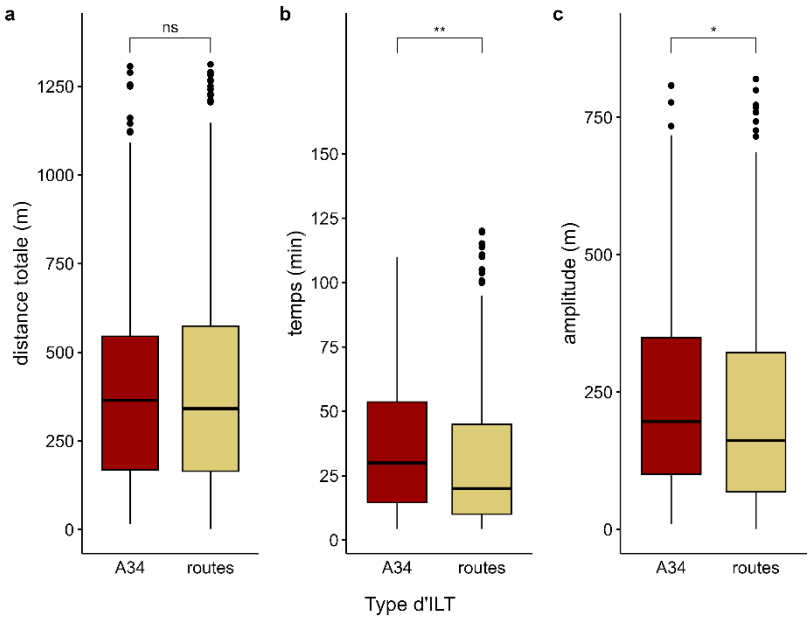


Figure 23 : Paramètres de déplacement des événements de rencontre des sangliers à proximité directe des ILTs ayant une influence négative relative sur le déplacement des ongulés (*p<0,05, **p<0,005)

Identification des événements de rencontre

Parmi les événements de rencontre identifiés chez le chevreuil à proximité de l'autoroute (n = 427) et des routes (n = 301), 50 (11,71%) et 40 (13,29%) réponses de type « longe » ainsi que 90 (21,08%) et 58 (19,27%) demi-tours ont été dénombrés respectivement dans les ZI de l'autoroute et des routes. Aucune traversée de l'autoroute n'a été enregistrée alors que 35 (11,63%) traversées et 6 (1,99%) réponses de type « longe puis traverse » ont été identifiées dans la ZI des routes. Une part importante des événements de rencontre n'a pas été définie avec 287 (67,21%) et 162 (53,82%) réponses non-classées aux abords respectifs de l'autoroute et des routes. A proximité de l'autoroute, l'événement de rencontre de type « longe » était caractérisé par une vitesse médiane significativement plus élevée (médiane = 2,27 m/min) que celle des événements non-classés (médiane = 1,45 m/min ; U = 1258742 ; p<0,0001). Aux abords des routes, la vitesse médiane la plus élevée correspondait aux événements de "longe puis traverse" (médiane = 3,36 m/min), suivie des événements de "longe" (médiane = 2,93 m/min), des traversées (médiane = 2,29 m/min) et des événements non-classés (médiane = 1,63 m/min). Les vitesses médianes de chaque classe d'événement de rencontre différaient significativement entre elles dans la ZI des routes (H = 76,05 ; p<0,0001). La vitesse médiane des événements de rencontre non-classés près des routes était significativement plus faible (test de Dunn, p<0,05) que celle des autres événements, lesquels ne présentaient pas de différence statistiques dans leur vitesse (test de Dunn, p>0,05). La fréquence

des réponses comportementales variait parmi les individus pour chaque type d'événement de rencontre et d'ILT considérées dans l'étude (**Figure 24**). Seule la fréquence des événements de rencontre non-classés était significativement plus élevée aux abords de l'autoroute (test exact de Fisher, p<0,001).

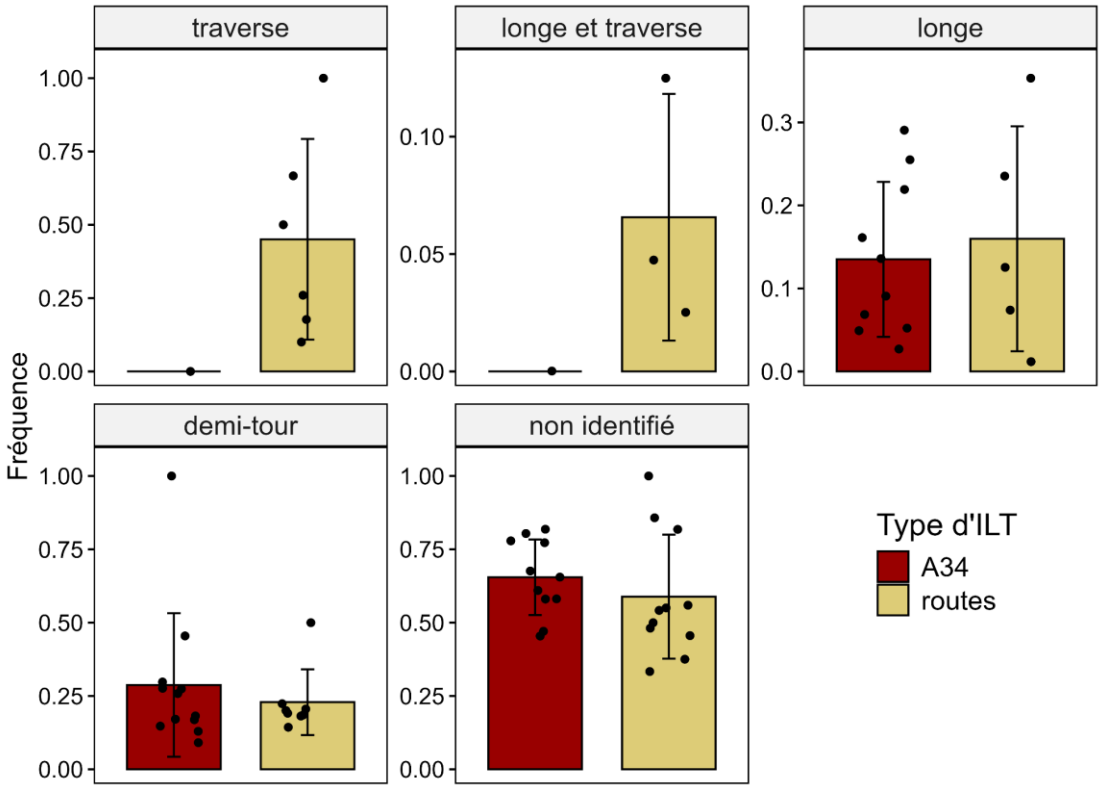


Figure 24 : Variabilité individuelle des comportements de déplacement des chevreuils face aux ILTs considérées dans le département des Ardennes, France, entre septembre 2022 et mars 2024. Les points noirs représentent la fréquence du type d'événement de rencontre exprimé par individu parmi les classes de comportements. Les barres noires indiquent l'écart-type du pourcentage total du type de comportement aux abords des ILTs pour l'ensemble des individus l'ayant exprimé, soit 0 et 6 individus respectivement pour les traversées de l'autoroute A34 et des routes ; 0 et 3 individus pour « longe puis traverse » respectivement à l'autoroute et aux routes ; 10 et 5 individus longeant respectivement l'autoroute et les routes ; 12 et 8 individus pour les demi-tour respectivement à l'autoroute et aux routes ; 11 individus pour les comportements non-classés aux abords des deux ILTs

Dans le cas des sangliers, le relevé des événements de rencontre aux abords de l'autoroute (n = 181) et des routes (n = 815) a permis de comptabiliser 33 (18,23%) et 46 (5,64%) réponses de type « longe » ainsi que 50 (27,62%) et 180 (22,09%) demi-tours à proximité respective de l'autoroute et des routes. Aucune traversée de l'autoroute n'a été identifiée alors que 273 (33,50%) traversées et 9 (1,10%) réponses de type « longe puis traverse » ont été estimées pour les routes. Le nombre d'événements de rencontre non-classés s'élevait à 98 (54,14%) et 307 (37,67%) respectivement au sein de la ZI de l'autoroute et des routes. A proximité de l'autoroute, l'événement de rencontre de type « longe » était caractérisé par une vitesse médiane significativement plus élevée (médiane = 15,60 m/min) que celle des événements non-classés (médiane = 9,20 m/min ; *U*

= 225569 ; p<0,0001). Aux abords des routes, la vitesse médiane la plus élevée correspondait aux événements de « longe puis traverse » (médiane = 22,69 m/min), suivie des traversées (médiane = 16,82 m/min), des événements de « longe » (médiane = 10,99 m/min) et des événements non-classés (médiane = 9,09 m/min). Les vitesses médianes de chaque classe d'événement de rencontre différaient significativement entre elles dans la ZI des routes (*H* = 296,29 ; p<0,0001). La vitesse médiane des événements non-classés était significativement plus faible que lorsque les individus traversaient ou longeaient puis traversaient les routes (test de Dunn, p<0,05). De même que la vitesse médiane des événements de « longe » était significativement plus faible que celles des événements de traversée et de « longe puis traverse » aux abords des routes (test de Dunn, p<0,05). A l'instar des chevreuils, la fréquence des réponses comportementales variait d'un individu à l'autre pour chaque type d'événement de rencontre et d'ILT (**Figure 25**). Les sangliers suivis longeaient significativement plus l'autoroute que les routes (Test exact de Fisher, p<0,0001), de même que les événements non-classés étaient plus fréquents aux abords de l'autoroute (Test exact de Fisher, p<0,0001).

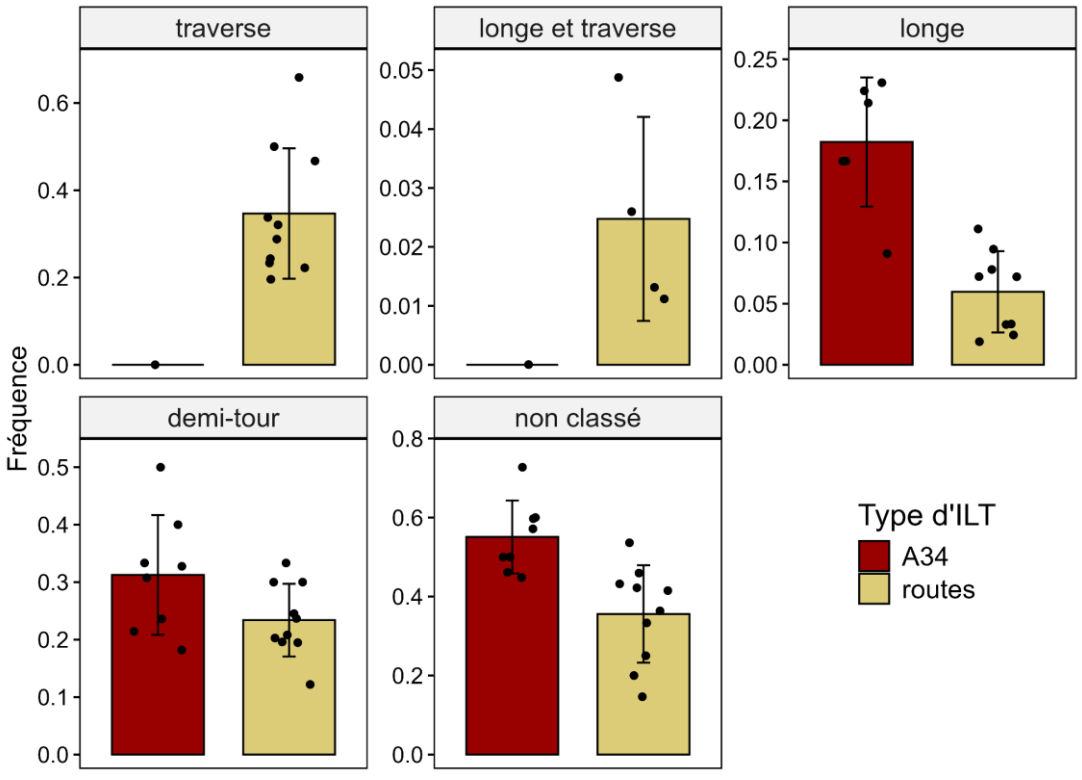


Figure 25 : Variabilité individuelle des comportements de déplacement des sangliers face aux ILTs considérées dans le département des Ardennes (France), entre février 2022 et mars 2024. Les points noirs représentent la fréquence du type d'événement de rencontre exprimé par individu parmi les classes de comportements identifiées aux ILTs. Les barres noires indiquent l'écart-type du pourcentage total du type de comportement aux abords des ILTs pour l'ensemble des individus l'ayant exprimé, soit 0 et 10 individus respectivement pour les traversées de l'autoroute A34 et des routes ; 0 et 4 individus pour « longe puis traverse » respectivement à l'autoroute et aux routes ; soit 6 et 9 individus longeant respectivement l'autoroute et les routes ; 8 et 10 individus pour les demi-tour respectivement à l'autoroute et aux routes ; 8 et 10 individus respectivement pour les comportements non-classés aux abords de l'autoroute et des routes.

Effet des habitats sur les événements de rencontre

Les événements de rencontre chez le chevreuil ont été identifiés dans 18 sections de l'autoroute caractérisées en moyenne par 38,54% (SD = 20,53 ; variation : 13,9-67,7%) de prairies, 34,32% (SD = 30 ; variation : 0-85%) de forêts et haies, 22,08% (SD = 28,76 ; variation : 0-81%) de cultures annuelles et 2,81% (SD = 2,51 ; variation : 0-7,7%) de zones artificialisées. L'indice de corrélation entre la matrice des types d'événement de rencontre et la proportion des habitats (RV = 0,28, p<0,05) indiquait une corrélation modérée entre les habitats et les événements de rencontre. Le premier axe représente 95,19% de la covariance totale entre les deux matrices, tandis que le second axe représente 3,47%. Le premier axe oppose les cultures annuelles sur la partie positive et les forêts et haies sur la partie négative (**Figure 26**).

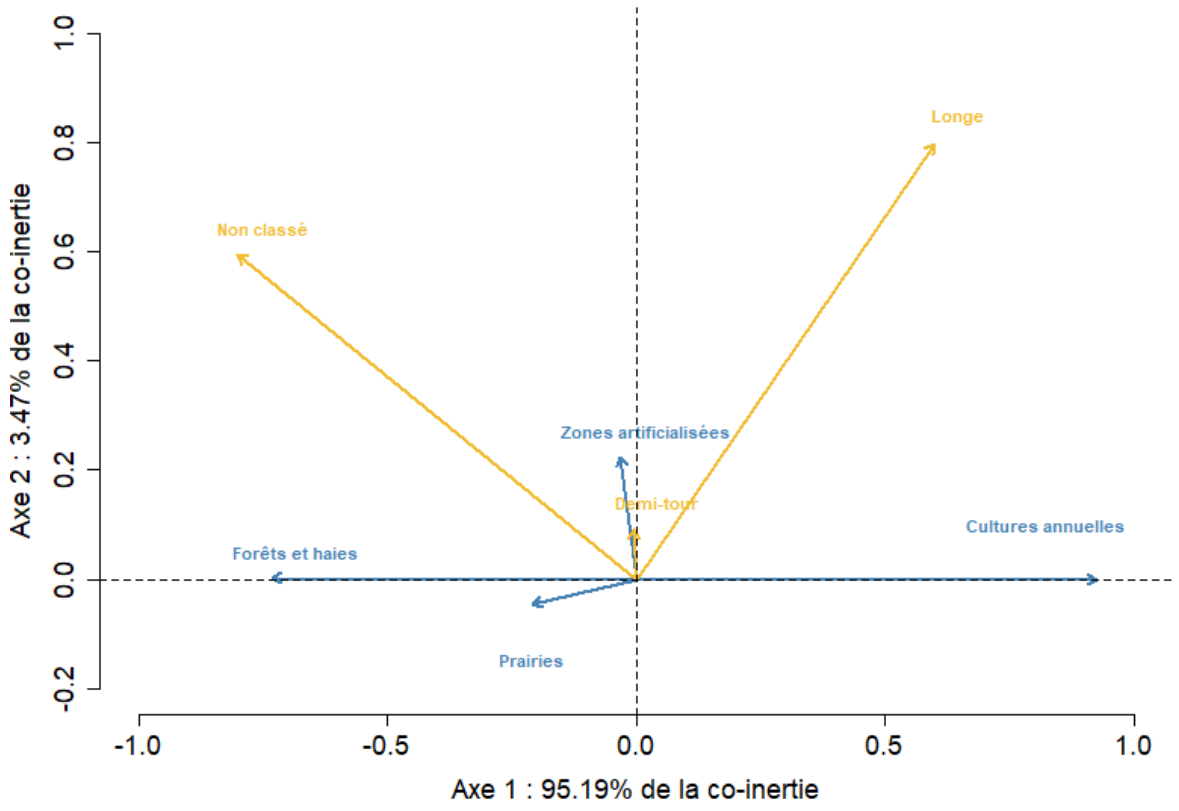


Figure 26 : Analyse de co-inertie de l'effet des habitats sur les réponses du chevreuil à l'autoroute A34, dans le département des Ardennes (France), entre septembre 2022 et mars 2024. En bleu figurent les habitats dans la zone d'influence de l'autoroute et en jaune, la réaction des chevreuils à la proximité de l'autoroute

Les événements de rencontre de type « longe » sont associés aux cultures annuelles tandis que les forêts et les haies induisent des réponses non-classées dans cette étude qui

s'apparenteraient à des déplacements plus lents (voir section précédente). Bien que le second axe montre une structuration plus faible entre les variables réponses et environnementales, il caractérise les réponses comportementales des chevreuils dans des habitats artificialisés. Plus précisément, les zones artificialisées sont associées à des déplacements non-classés et, dans une moindre mesure, à un comportement de type « longe ». D'après l'analyse de redondance, les variables environnementales expliquent 18,62% de la variation des réponses comportementales. Le modèle global n'a pas montré d'effet significatif des axes principaux de l'ACP des variables environnementales sur les événements de rencontre (F = 1,716 ; p>0,05), suggérant que les relations linéaires directes entre ces variables ne sont pas suffisantes pour expliquer l'association relevée par l'analyse de co-inertie.

Dans le cas du sanglier, 39 sections de l'autoroute présentaient des événements de rencontre. Les sections identifiées étaient composées en moyenne de 60,28% (SD = 22,23 ; variation : 0-91%) de prairies, 55,91% (SD = 25,42 ; variation : 0-100%) de forêts et haies, 25,69% (SD = 32,23 ; variation : 0-95%) de cultures annuelles, et 14,77% (SD = 15,51 ; variation : 0-82%) de zones artificialisées. Le coefficient de corrélation entre les deux matrices (variables événements de rencontre et habitats) indiquait une corrélation non significative entre l'occupation du sol et les réponses comportementales des sangliers (RV = 0,06, p>0,05).

Description de la dispersion d'individus à proximité de l'autoroute

Dans le cadre de ce volet d'étude, le suivi des chevreuils nous a donné l'opportunité d'observer des mouvements de dispersion individuel à proximité de l'autoroute. Parmi les 23 chevreuils équipés le long de l'autoroute (comprend les individus écartés des analyses précédentes), 4 individus (3 jeunes et 1 adulte) ont réalisé un mouvement de dispersion, parcourant des distances allant de 4 à 30 km selon l'individu (**Figure 27**). Le schéma de dispersion aux abords de l'autoroute était similaire pour trois des quatre individus. Les chevreuils se sont déplacés du même côté que leur territoire de départ, après avoir longé l'infrastructure ou s'y être confrontés avant d'avoir fait demi-tour, malgré la présence d'ouvrages de franchissement potentiels (ponts, ponts-cadre; **Figure 27**). En revanche, un individu s'est installé du côté opposé à l'autoroute par rapport à son territoire initial après avoir franchi à trois reprises l'autoroute via un pont-cadre et un pont (**Annexe 3**).

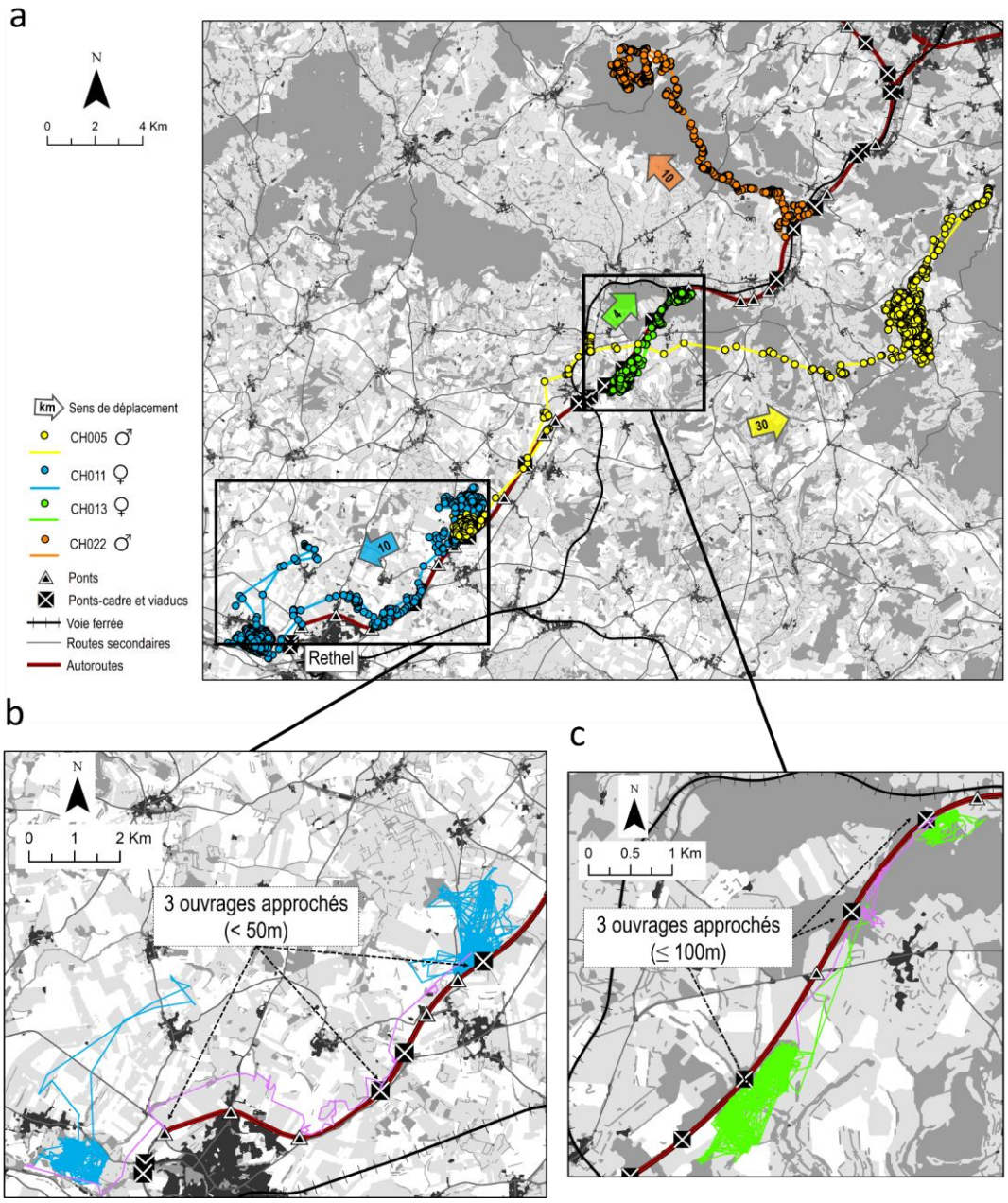


Figure 27 : (a) Suivis des déplacements de quatre individus dispersants lors de l'évaluation de l'effet de proximité à l'autoroute A34 sur le déplacement des chevreuils. Les points et les traits d'une même couleur représentent respectivement les localisations GPS et les trajectoires d'un individu. Distance euclidienne du déplacement de dispersion des quatre individus : CH005 (mâle) sur 30km, CH011 (femelle) sur 10km, CH013 (femelle) sur 4km et CH022 (mâle) sur 10km. (b et c) Trajectoires lors du mouvement de dispersion (en fushia) des individus ayant longé l'autoroute, s'approchant près d'ouvrages de franchissement potentiels à plusieurs occasions

DISCUSSION

La comparaison de différentes ILTs a permis de décrire l'influence de la proximité d'une autoroute sur le comportement de déplacement de deux espèces d'ongulés, le chevreuil et le sanglier. Les réponses comportementales à l'autoroute révèlent qu'une infrastructure linéaire clôturée agit comme une barrière physique et entrave les déplacements d'individus résidents

bien qu'ils n'en évitent pas les abords. Plus précisément, l'effet de proximité à l'autoroute peut varier parmi les espèces et les individus mettant en lumière des réponses comportementales à l'autoroute plus complexes que le simple fait de la traverser ou de rester à distance. L'absence d'association directe entre l'occupation du sol et les réponses comportementales des individus à proximité de l'autoroute ne signifie pas forcément qu'il n'existe aucun lien. Elle pourrait s'expliquer par plusieurs éléments : des facteurs sous-jacents à ces réponses non identifiés (ex. alimentation, fuite), des variables environnementales non mesurées (ex. pollution sonore ou chimique, présence de cours d'eau, composition végétale), une forte variabilité interindividuelle des comportements (Ascensão et al. 2014; Bonnot et al. 2015; Xu et al. 2023), ou encore une taille d'échantillon trop réduite.

Une caractéristique linéaire anthropique non évitée mais contraignante

Le réseau routier peut entraîner l'évitement des habitats adjacents par la faune sauvage, en raison de divers processus tels que la destruction ou la dégradation de l'habitat, la mortalité, ou encore l'inaccessibilité aux ressources (Benítez-López et al. 2010). Contrairement à ce que suggère Benítez-López et al. (2010), nos analyses indiquent que les chevreuils et les sangliers ne semblent pas éviter l'autoroute ni son environnement immédiat lors de leurs déplacements. Trois explications possibles à ce résultat peuvent être suggérées : (i) Depuis l'ouverture à la circulation de l'autoroute A34 en 2003, les populations locales d'ongulés ont été exposées pendant deux décennies aux perturbations associées à cette infrastructure. Cette période semblerait donc suffisante pour que les animaux se soient habitués aux perturbations anthropiques. En effet, selon Boyle et al. (2020), une habituation aux infrastructures anthropiques peut être détectée dans un délai de quatre ans après leur construction. Plus précisément, à l'échelle individuelle, l'habituation s'accompagne souvent d'une familiarité accrue avec le site, ce qui favoriserait des réponses d'accoutumance à l'infrastructure. Cette relation est illustrée par le comportement des individus suivis par GPS près de l'autoroute : ils ont été localisés dans les mêmes zones tout au long de leur suivi, sans effectuer de déplacements à grande échelle (individus résidents). Un tel sédentarisme suggère qu'un animal dont l'aire de répartition reste stable développe une connaissance approfondie de son environnement. Cette familiarité peut donc le rendre plus à l'aise à proximité des infrastructures linéaires se trouvant au sein ou en bordure de son domaine vital, comme l'ont démontré des travaux précédents (Ascensão et al. 2014; Jones et al. 2022). (ii) Une autre explication pourrait être que les zones adjacentes à l'autoroute offriraient des habitats d'alimentation de bonne qualité, les rendant

attrayantes (cf. comportement « non-classés » développés dans la section suivante), comme cela a été rapporté chez plusieurs espèces de grands mammifères terrestres (ex. le Fourmilier géant *Myrmecophaga tridactyla*, Noonan et al. 2022 ; le Grizzly *Ursus arctos*, Roever et al. 2010 ; le Wapiti *Cervus elaphus nelsoni*, Dodd et al. 2007 ; le Grand koudou *Tragelaphus strepsiceros*, Hering et al. 2022) y compris le chevreuil (Naidenko et al. 2021). Plus précisément, ces zones seraient caractérisées par des parcelles de coupe totale ou partielle du couvert végétal, favorisant une régénération naturelle de la végétation composée de jeunes plants et d'une friche herbacée, particulièrement appétents pour les ongulés. (iii) Enfin, les zones à proximité des autoroutes pourraient être associées à des zones de quiétude pour la faune sauvage. La fréquentation humaine serait faible et ponctuelle en comparaison d'espaces soumis davantage au développement des activités humaines (loisirs, expansion urbaine ; cf. comportement « non-classés » développés dans la section suivante). Bien que la proximité à l'autoroute puisse varier d'un individu à l'autre, les résultats de cette étude corroborent ceux de Boyle et al. (2020). Les auteurs ont mis en évidence un effet limité d'une autoroute à quatre voies sur l'écologie des déplacements de grands mammifères d'Amérique (trois espèces d'Ongulés, deux Félidés et trois Canidés).

Par ailleurs, la fréquence élevée des localisations de chevreuils et de sangliers près de l'autoroute peut refléter une tendance individuelle à se déplacer ou à stationner le long de la clôture qui borde l'infrastructure sur toute sa longueur. Conçue pour être à l'épreuve du gros gibier, la clôture agit comme une barrière imperméable en limitant le déplacement des animaux aux abords des voies dans le but de réduire le nombre de collisions entre animaux et véhicules (Clevenger et al. 2001b; Jaeger and Fahrig 2004; Rytwinski et al. 2016). Sans possibilité de traverser avec succès, les animaux sont contraints dans leur déplacement le long de la clôture donnant l'impression qu'ils « sélectionnent » les zones à proximité de l'autoroute. Ce type de réponse comportementale à la clôture a été décrite par Jones et al. (2022) chez un ongulé partiellement migrateur, l'antilope d'Amérique. Les auteurs ont montré que les individus sélectionnaient les zones adjacentes aux routes clôturées parce qu'ils se regroupaient le long des routes avant de découvrir un site de traversée fonctionnel. Les chevreuils et les sangliers suivis par GPS et résidant le long de l'autoroute A34 n'ont jamais traversé l'infrastructure bien que des déplacements aient été enregistrés à moins de 100 m des ouvrages de franchissement potentiels (ponts et ponts-cadre construits pour le trafic local). D'une part, cela suggère que ces ouvrages (n=53) pourraient ne pas répondre aux exigences de ces espèces, qui privilégient généralement des structures dotées d'une grande ouverture (hauteur et largeur élevées, faible

longueur; Clevenger and Waltho 2000, 2005; Seiler and Olsson 2009; Denneboom et al. 2021), situées au-dessus de la route (Mata et al. 2005; Glista et al. 2009; Mysłajek et al. 2016) et distantes des zones urbaines (Clevenger and Waltho 2000). Or, dans notre zone d'étude, seul un tiers des ouvrages est situé au-dessus de la route, souvent sur de grands axes routiers (ou des bretelles d'autoroute). En parallèle, parmi les 33 passages inférieurs recensés, la moitié sont associés à des routes ou des voies ferrées, ou sont localisés à proximité de zones urbaines, ce qui pourrait en limiter l'attractivité pour les ongulés. D'autre part, le faible nombre d'occasions de traversée (37 et 18 occasions respectivement pour les chevreuils et les sangliers suivis) pourrait refléter un évitement des sites des ouvrages. Cette réticence pourrait s'expliquer par la concentration d'activités humaines autour de ces ouvrages, notamment en journée, le long de l'ILT. Bien que les déplacements des animaux se produisent principalement la nuit, période où l'activité humaine et la circulation sont réduites, l'absence de structures spécifiquement dédiées à la faune contraint ces animaux à utiliser des passages destinés au trafic local (véhicules, engins agricoles, promeneurs). Même en conditions nocturnes, la configuration et l'usage de ces ouvrages pourraient limiter le succès des individus à les emprunter, réduisant leur efficacité comme sites de franchissement de l'autoroute.

A l'inverse, la distribution spatiale des sangliers et des chevreuils suivis par colliers GPS semble affectée par la proximité aux routes du réseau secondaire bien qu'elles soient perméables aux déplacements des ongulés. Les individus ont traversé les routes mais semblent s'y tenir à distance le reste du temps conformément à ce qui a été démontré dans plusieurs études précédentes chez le chevreuil (Coulon et al. 2008; Passoni et al. 2021) et le sanglier (Theuerkauf and Rouys 2008; D'Amico et al. 2016). Cette réponse comportementale reflèterait un évitement des perturbations induites par les routes, en tant que source de risque. Une ILT non clôturée expose les animaux à un risque élevé de mortalité par collision avec les véhicules (Fahrig and Rytwinski 2009; Grilo et al. 2020, 2021). En réponse à ce risque, D'Amico et al. (2016) ont suggéré que le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et le sanglier, grâce à leurs capacités d'apprentissage, évitent les routes non clôturées indépendamment du volume de trafic ou de la surface routière, en associant ces ILTs au passage des véhicules le long de celles-ci. Par ailleurs, des travaux plus récents sur le chevreuil ont démontré que la familiarité au site était associée à une perspective de survie lorsque les individus faisaient face à un risque de prédation et à d'autres causes de mortalité (famine, maladie, mortalité routière ; Gehr et al. 2020). Par conséquent, la familiarité avec le site semble jouer un rôle déterminant dans la répartition

spatiale des ongulés aux ILTs. Les animaux ont tendance à éviter les ILTs lorsque celles-ci représentent un risque immédiat, comme c'est le cas pour les routes secondaires. En revanche, ils se rapprochent des ILTs associées à des habitats de qualité, ce qui pourrait être le cas des zones adjacentes à l'autoroute.

Effet de la proximité à l'autoroute sur les réponses comportementales

Les interactions avec l'autoroute et sa clôture sont pour la plupart rapides (demi-tour) chez le sanglier et le chevreuil ce qui est cohérent avec d'autres études analysant les interactions Ongulés – clôtures – routes à partir d'individus suivis par collier GPS (Xu et al. 2021; Laguna et al. 2022; Hering et al. 2022). Dans une moindre mesure, des déplacements plus lents et des interactions plus longues (« longe ») ont également été identifiées à proximité de l'autoroute. Par conséquent, nous avons trouvé que les ongulés restaient plus longtemps près d'une ILT clôturée que non clôturée, et que celle-ci affectait différemment leurs déplacements selon l'espèce. Dans le cas des chevreuils, la durée modérément élevée du temps passé associée à un distance et une vitesse réduites à proximité de l'autoroute suggèrent des phases d'inactivité plus ou moins prolongées au cours de leurs interactions avec celle-ci. Ces phases pourraient correspondre à des comportements de repos, avec des individus dormant à proximité de l'ILT (Noonan et al. 2022). Elles pourraient également refléter des phases de rumination, comme cela a été constaté aux abords de structures linéaires chez différents ongulés (ex. Hering et al. 2022), ou encore de recherche de nourriture sur un espace restreint (Gottardi et al. 2010). Ces réponses comportementales sont néanmoins difficilement identifiables car l'espèce est connue pour alterner plusieurs périodes d'activité – alimentation, marche – et d'inactivité – repos, vigilance, rumination – sur de courts intervalles de temps, tout au long de la journée (Gottardi et al. 2010; Rodríguez-Morales et al. 2013). L'étude de Gottardi et al. (2010) sur la mesure de l'activité des chevreuils équipés d'accéléromètres illustre bien la difficulté à discriminer les comportements actifs et inactifs des individus. En effet, les auteurs ont indiqué des erreurs dans l'attribution des enregistrements en tant qu'événements actifs (33% des enregistrements immobiles) ou inactifs (35% des enregistrements mobiles), qui pouvaient représenter respectivement une alimentation sur une petite parcelle sans mouvements significatifs ou un déplacement sur une courte distance. Dans le cas du sanglier, les individus se livraient davantage à des déplacements élevés (temps, distance et amplitude) en réponse à la proximité de l'autoroute, correspondant à un déplacement de type « longe » significativement plus important qu'aux abords des routes secondaires. Etant donné la mobilité importante de l'espèce (vitesse médiane de référence égale

à 11,33 m/min hors ZI des ILTs dans notre zone d'étude, soit 16,32 km parcourue en une journée), les sangliers sont susceptibles d'interagir régulièrement avec la clôture de l'autoroute. Ils peuvent ainsi la longer à la recherche de nourriture ou d'un site de traversée répondant à leurs exigences écologiques, en vue d'accéder à de nouveaux habitats à exploiter. Ce type de réponse comportementale a été couramment observé chez des espèces hautement mobiles aux abords de clôtures bordant ou non des routes à la recherche d'une brèche où traverser (Vanak et al. 2010; Xu et al. 2021; Hering et al. 2022). Il est important de noter que longer une clôture peut s'avérer coûteux en énergie. Les animaux sont parfois contraints de parcourir plus d'une dizaine de kilomètres, sans nourriture disponible le long de la clôture, avant de trouver une opportunité de traverser (Gates et al. 2012; Nandintsetseg et al. 2019), ou de faire demi-tour (Vanak et al. 2010; Hering et al. 2022), au détriment d'une activité essentielle à leur survie (Gavin and Komers 2006). Ce fut également le cas d'un sanglier suivi le long de l'autoroute A34 qui a fini par s'éloigner de l'autoroute après l'avoir longé sur 4,6 km sans pouvoir la traverser.

Le nombre significativement plus élevé de comportements non-classés chez les deux espèces aux abords de l'autoroute, comparé à celui observé près des routes, peut résulter : (i) de découpages inopportuns de sous-trajets à l'intérieur de la ZI entraînant une perte de signification du déplacement, difficilement interprétable écologiquement ou, (ii) d'un schéma de déplacements plus lents, associant une faible distance parcourue et un temps passé plus long, qui suggère un comportement d'exploitation des abords de l'autoroute. Il peut s'agir, par exemple, d'une recherche de nourriture ou de temps d'arrêt plus ou moins prolongés au cours d'un déplacement (ex. phase de repos). Par opposition, près des routes secondaires, les ongulés présentent des vitesses élevées, mesure d'une perturbation (Prokopenko et al. 2017; Noonan et al. 2022), et d'une accélération probable du déplacement au moment de la traversée (Hering et al. 2022; Luca Bastianelli et al. 2024). Par conséquent, l'accélération des mouvements ou la linéarité des déplacements (cas du chevreuil) permettraient aux animaux de réduire la durée d'exposition au risque inhérent aux routes (Roever et al. 2010).

Finalement, ces résultats renforcent l'idée selon laquelle les abords de l'autoroute pourraient, selon l'individu considéré, être associés à une zone refuge (gîte, alimentation) pour les ongulés. Cependant, cette association s'accompagne d'une influence sur leurs schémas de déplacement. Pour confirmer cette hypothèse, des recherches supplémentaires sont nécessaires

afin de caractériser les déplacements impliqués dans la recherche de nourriture et de distinguer les véritables phases de repos des déplacements tortueux sur de courtes distances.

La dispersion, un moteur pour le franchissement

La dispersion est un processus de déplacement qui assure le brassage génétique des populations naturelles et donc la persistance de celles-ci face à des changements environnementaux rapides (Kokko and López-Sepulcre 2006). Les ILTs telles que les routes peuvent affecter la dispersion, en augmentant le risque de mortalité des individus qui tentent de traverser, en réduisant les déplacements ou en avortant les déplacements longues distances (Ducros et al. 2020). Parmi les individus équipés de colliers GPS à proximité de l'autoroute, aucun des résidents suivis issus des deux espèces n'a traversé l'autoroute contrairement à un dispersant chez le chevreuil. Bien que le nombre de chevreuils équipés en dispersion soit faible (n=4) pour tirer des conclusions, cette observation suggère un effet semi-perméable de l'autoroute sur les animaux en phase de dispersion. Cette hypothèse est néanmoins à modérer par la tolérance de l'espèce aux perturbations anthropiques et la variabilité individuelle dans le comportement de déplacement. Dans le premier cas, une espèce telle que le chevreuil avec de larges capacités à tolérer une certaine proximité aux éléments anthropiques du paysage (Bonnot et al. 2013) est plus susceptible de traverser une ILT. Cette espèce peut le faire en empruntant des ouvrages non destinés au passage de la faune (Mata et al. 2005; Bhardwaj et al. 2020), à l'inverse d'une espèce plus exigeante (ex. le sanglier; Naidenko et al. 2021). Dans le second cas, Bonnot et al. (2015) ont démontré l'existence d'une variabilité interindividuelle dans la gestion des situations à risque (prédation, perturbation) chez le chevreuil. Cette variabilité pourrait influencer la prise de décision des individus à traverser ou utiliser un ouvrage de franchissement. La combinaison de ces facteurs pourrait donc jouer un rôle clé quant à la perméabilité de l'autoroute agissant dans ce cas comme un filtre sur le déplacement du chevreuil.

CONCLUSION

Ce volet a mis en lumière l'impact complexe des ILTs, en particulier de l'autoroute A34, sur les déplacements des ongulés dans le Nord-est de la France. L'autoroute et son environnement immédiat ne repoussent pas systématiquement les chevreuils et les sangliers, illustrant leur capacité d'adaptation comportementale face aux défis posés par ces éléments

linéaires anthropiques (plasticité comportementale, Morelle et al. 2015; Kämmerle et al. 2017). Cette plasticité comportementale leur permet de s'accommoder de la présence de l'autoroute dans leur environnement, qu'elle soit perçue comme une zone refuge ou une contrainte. Cependant, cette coexistence avec l'autoroute façonne profondément leurs déplacements, en limitant notamment les traversées. La présence de clôtures et la faible attractivité des structures routières pour ces espèces limitent leurs déplacements de part et d'autre de l'autoroute, renforçant son effet barrière. Bien que les routes secondaires soient évitées, car perçues comme une source de risque, elles sont relativement perméables et ne constituent pas un obstacle majeur aux déplacements. Ce contraste met ainsi en avant l'effet variable des ILTs sur les schémas de déplacements des ongulés. Une étude approfondie des comportements de déplacement fins, tels que les refus, en réponse aux différents types de passages, semble indispensable pour mieux appréhender cette problématique à l'avenir.

Au-delà des déplacements quotidiens, cette étude ouvre des perspectives sur l'effet des ILTs sur la dispersion, comportement essentiel pour maintenir la diversité génétique des populations naturelles. Si la dispersion semble moins affectée par les routes secondaires, les autoroutes clôturées pourraient avoir un effet semi-perméable, limitant les déplacements longue distance et compromettant ainsi le brassage génétique des populations. Ces observations soulignent la nécessité d'étudier plus en détail les mécanismes sous-jacents à la prise de décision des ongulés lors de leurs déplacements dispersifs. Il est également essentiel de prendre en compte la variabilité comportementale interindividuelle ainsi que les contraintes environnementales, qui influencent directement leur capacité à franchir ces infrastructures.



DISCUSSION GENERALE

La connectivité fonctionnelle est devenue un enjeu majeur pour assurer le maintien et la persistance des populations, dans un contexte de transformation rapide des paysages liés aux activités humaines. Bien qu'elle soit de plus en plus intégrée dans les outils d'aménagement du territoire, les approches actuellement utilisées (modèles théoriques basés sur la résistance du paysage; McRae et al. 2008; Zeller et al. 2012) peinent souvent à refléter la capacité réelle de déplacement des espèces face aux éléments paysagers. Ces méthodes reposent souvent sur des hypothèses simplifiées et souffrent d'un manque de données empiriques multiples pour valider leurs prédictions (Diniz et al. 2020; Laliberté and St-Laurent 2020). Or, l'apport de différentes sources de données empiriques indépendantes (ex. génétiques, suivis directs des mouvements) est essentiel pour estimer avec précision les flux réels à travers le paysage et renforcer les stratégies de gestion des réseaux écologiques régionaux (Creech et al. 2024). Le travail de cette thèse s'est ainsi attaché à identifier les barrières effectives au déplacement de mammifères terrestres ainsi que les éléments facilitant leur franchissement, en adoptant une approche intégrative multispécifique. Plus précisément, l'objectif était d'évaluer les effets d'une autoroute clôturée et d'un canal de navigation sur la connectivité fonctionnelle réelle de trois grands mammifères terrestres (Cerf élaphe, Chevreuil européen et Sanglier). Cette évaluation a d'abord mobilisé des outils de génétique du paysage pour mesurer la perméabilité de ces infrastructures linéaires de transport (ILTs) aux flux de gènes chez les trois espèces modèles. Afin de mieux comprendre les mécanismes comportementaux sous-jacents à l'effet de l'autoroute, notamment chez le chevreuil et le sanglier, deux approches complémentaires ont ensuite été mises en œuvre : la surveillance par pièges-photographiques de la fréquentation des ouvrages non dédiés au passage de la faune, et le suivi GPS d'individus se déplaçant à proximité de l'autoroute.

APPROCHE INTEGRATIVE MULTISPECIFIQUE DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE REELLE

La fragmentation des habitats par les ILTs compromet généralement la connectivité fonctionnelle en limitant les flux de gènes et les déplacements à travers le paysage. Toutefois, cet effet est plus complexe qu'il n'y paraît car toutes les ILTs ne constituent pas systématiquement des barrières aux flux. Si des facteurs liés à l'infrastructure (ex. type, dimensions, volume de trafic ou présence de clôtures) et au contexte paysager influencent l'intensité de l'effet barrière, celui-ci dépend également fortement des traits écologiques

propres à chaque espèce. Les résultats de cette thèse montrent que l'impact des ILTs sur la connectivité fonctionnelle des ongulés dépend à la fois du type d'infrastructure et de l'espèce considérée.

Le canal des Ardennes

Bien que les canaux puissent constituer des obstacles potentiels aux déplacements des mammifères sauvages, (ex. mortalité par noyade; Rautenstrauch and Krausman 1989; Peris and Morales 2004), les analyses génétiques menées dans cette étude n'ont pas mis en évidence d'effet barrière du canal des Ardennes sur les flux de gènes des ongulés étudiés. La raison de cette absence d'effet, détaillées précédemment (section Discussion, chapitre 1), s'expliquerait principalement par la présence de divers sites de franchissement potentiellement fonctionnels pour la faune (berges naturelles, ponts, corridor forestier). La perméabilité du canal au flux de gènes des populations d'ongulés suggère qu'il ne constitue pas un obstacle à leurs déplacements et ne limite donc pas la connectivité fonctionnelle à travers le paysage.

Toutefois, l'impact des canaux est probablement très hétérogène en raison de l'espèce considérée et des caractéristiques liées au canal (ex. nature des berges, présence de clôtures). Une étude menée sur la Martre des Pins (*Martes martes*) dans le nord-est de la France a montré une réduction du flux de gènes entre les populations séparées par des canaux de navigation (i.e. canal des Ardennes, canal de l'Aisne à la Marne et canal de la Sambre à l'Oise; Mergey et al. 2017). Néanmoins, les auteurs n'ont pas toujours pu discriminer l'influence respective des canaux dans des paysages fragmentés par d'autres éléments paysagers (autoroutes, plaines céréalières), en particulier pour le canal des Ardennes. Par ailleurs, ils n'ont observé aucune structuration génétique chez les martres séparées par deux autres canaux (Canal de la Marne au Rhin et Canal entre Champagne et Bourgogne). Les auteurs ont suggéré que la nature des berges entre ces canaux expliquerait la variabilité de leur impact. Ainsi, un canal bordé de berges naturelles aux pentes douces, permettant aux animaux de remonter facilement hors de l'eau, présenterait moins de risques de perturber le flux de gènes (ex. le canal des Ardennes où environ 25 km de berges naturelles sont présents sur un tronçon de 40 km) qu'un canal dépourvu de telles berges. Bien que le canal des Ardennes ne constitue pas un obstacle pour les ongulés, sa perméabilité reste à confirmer pour d'autres taxons tels que la martre et ceux ayant une capacité de déplacement limitée (ex. amphibiens; Kobayashi and Abe 2023). En effet, certains tronçons longs de plusieurs centaines de mètres sont entièrement constitués de palplanches, ce qui pourrait entraîner une hausse de la mortalité par noyade (effet puit démographique) et ainsi

compromettre la connectivité fonctionnelle pour d'autres espèces. Par conséquent, les canaux de navigation et leurs berges devraient être davantage considérés dans les évaluations de la connectivité fonctionnelle et intégrés à l'élaboration de la Trame Verte et Bleue (TVB), ce qui n'est pas encore le cas dans la région Grand-Est.

L'autoroute A34

Les résultats, basés sur l'intégration de données génétiques, de télémétrie et d'observations par pièges-photographiques, corroborent ceux de précédentes études (ex. Epps et al. 2005; Olsson and Widen 2008; Frantz et al. 2012; Biosa 2013; Wilson et al. 2015; Naidenko et al. 2021) : une grande route clôturée (ex. autoroute) modifie les schémas de déplacements des ongulés, allant jusqu'à limiter fortement les franchissements pour les espèces les plus sensibles et/ou exigeantes. Dans cette étude, ces contraintes ont conduit à une réduction du flux de gènes chez le cerf et le sanglier mais n'ont pas semblé suffisante pour induire un effet génétique notable chez le chevreuil. Cette variabilité a pu s'expliquer par les observations photographiques des structures routières. Celles-ci ont révélé que les cerfs et les sangliers traversaient rarement l'autoroute, contrairement au chevreuil, qui effectuait des franchissements réguliers via plusieurs ouvrages (un tiers des ouvrages suivis). Ces déplacements transversaux sont alors suffisants pour maintenir un flux de gènes et prévenir une structuration génétique de la population. Toutefois, les individus résidents suivis par GPS, qu'il s'agisse de chevreuils ou de sangliers, sont restés cantonnés d'un seul côté de l'infrastructure. Ces résultats illustrent la complexité des réponses des ongulés face aux autoroutes (voir également Boyle et al. 2020), complexité qui se retrouve également chez un ensemble plus vaste de grands mammifères terrestres confrontés aux ILTs (ex. Coyote *Canis latrans*, Lynx roux *Lynx rufus* : Riley et al. 2006; Boyle et al. 2020). A l'instar d'un ensemble restreint d'études empiriques (Riley et al. 2006; Litvaitis et al. 2015; Soanes et al. 2018; Remon 2018; Carvalho et al. 2018), cette étude souligne donc l'intérêt de combiner des informations génétiques et écologiques pour évaluer les effets barrières des ILTs sur la connectivité fonctionnelle.

Le Cerf élaphe s'est révélé particulièrement vulnérable à la fragmentation du paysage induite par l'autoroute A34. Cette sensibilité semble liée à la rare utilisation des ouvrages pour franchir l'autoroute. L'hypothèse de traversées directes peut être écartée, compte tenu de la très faible mortalité enregistrée pendant l'étude (un seul cas de mortalité par collision avec un véhicule a été enregistré par la Direction Interdépartementale des Routes du Nord − DIRN ; données non publiées). Deux facteurs principaux pourraient expliquer cette rare fréquentation

des ouvrages : (i) espèce farouche et sensible aux perturbations anthropiques (Jayakody et al. 2011; Coppes et al. 2017), le cerf aurait tendance à éviter les zones proches de l'autoroute. Plusieurs études (D'Amico et al. 2016; Prokopenko et al. 2017; Loraamm et al. 2021) ont mis en évidence un comportement d'évitement des routes en lien avec le trafic ou la perception d'un risque (prédation humaine et animale). Les animaux n'auraient alors pas accès aux ouvrages, ce qui réduirait la probabilité de franchir l'autoroute ; (ii) le manque d'ouvrages adaptés aux besoins de l'espèce, qui privilégie les structures de grande taille tels que les viaducs (Kusak et al. 2009; URCA-CERFE 2020; Denneboom et al. 2021) et les passages à faune (Mata et al. 2005, 2008; Mysłajek et al. 2020). En outre, l'emplacement des ouvrages semble également déterminant : leur utilisation serait favorisée lorsqu'ils s'inscrivent dans une continuité de l'habitat forestier. Meisingset et al. (2013) ont ainsi montré que les cerfs sélectionnent préférentiellement des secteurs boisés proches de pâtures pour traverser les routes. Dans le cadre de l'étude de la perméabilité de l'A34, un des deux viaducs existants (large de 330m) a été suivi de manière opportuniste par piège photographique pendant un an. Aucun passage de cerf n'y a été détecté, probablement en raison de son emplacement en dehors du corridor forestier reliant les massifs de Signy-l'Abbaye et du Mont-Dieu, où se concentre la population. En comparaison, un viaduc situé dans une continuité forestière sur l'autoroute A4 (Marne) a enregistré 84 passages de cerfs en seulement neuf mois (URCA-CERFE 2020). Un suivi GPS permettrait de mieux documenter leur comportement de déplacement face à l'autoroute, mais les tentatives de capture de cette espèce sur la zone d'étude ont échoué.

En revanche, le suivi GPS en complémentarité des deux autres outils, a pu être déployé sur les deux autres espèces cibles, le sanglier et le chevreuil. Bien que le Sanglier n'évite par les abords de l'autoroute A34, la rareté avec laquelle il a utilisé les structures routières pour traverser a certainement conduit à la réduction du flux de gènes entre les individus situés de part et d'autre. A l'instar du cerf, les traversées directes de l'autoroute par le sanglier semblent peu probables, en raison du très faible nombre de collisions recensées au cours de l'étude (un seul cas rapporté par la DIRN ; données non publiées). De plus, le sanglier semble également favoriser les viaducs (Kusak et al. 2009; URCA-CERFE 2020), les ponts larges ou les passages à faune (Mata et al. 2008; Mysłajek et al. 2020) pour franchir les routes clôturées à fort trafic. Au-delà d'un éventuel manque de motivation à traverser l'autoroute, les sangliers pourraient avoir ignoré les ouvrages par peur ou par manque d'attractivité. Par conséquent, sans emprunter ces passages, les adultes ne peuvent pas transmettre aux jeunes l'utilisation de ces structures pour traverser (apprentissage social ; Bracis and Mueller 2017), ce qui compromet la

transmission intergénérationnelle de potentiels sites de franchissement fonctionnels et l'acclimatation progressive à ces ouvrages. Ainsi, la seule présence de structures routières ne garantit pas la connectivité fonctionnelle du sanglier.

La surveillance photographique des ouvrages a mis en évidence la présence de transparateurs (structures routières : ponts, ponts-cadre) facilitant les franchissements sécurisés d'individus chez le chevreuil. La fréquentation de ces ouvrages contribue ainsi à expliquer le flux de gènes estimé de part et d'autre de l'autoroute. La combinaison de ces deux approches indique donc un maintien global de la connectivité fonctionnelle pour l'espèce, malgré la fragmentation du paysage par l'autoroute. Néanmoins, cette estimation demeure partielle, dans la mesure où elle ne prend pas en compte les contraintes comportementales subies par les individus résidant à proximité. En effet, la télémétrie a mis en évidence un effet barrière marqué, les déplacements quotidiens des résidents suivis étant fortement influencés par la présence de l'autoroute, sans franchissement. Cette approche a également permis d'observer un franchissement de l'autoroute lors de la dispersion d'un jeune individu, suggérant que ces déplacements restent possibles mais limités. Ce constat rejoint les observations de Passoni et al. (2021), à partir d'un suivi GPS de chevreuil à travers les Alpes et l'Europe centrale, selon lesquelles les individus, qu'ils soient résidents ou en dispersion, évitent fortement de traverser les routes. Toutefois, les auteurs n'ont pu déterminer si la connectivité génétique était malgré tout maintenue, car la télémétrie à elle seule pourrait surestimer l'effet barrière des routes en ne détectant pas les traversées effectives (Soanes et al. 2018; Carvalho et al. 2018). Le chevreuil ne semble pas être une espèce isolée dans ce type de réponse à une autoroute : Carvalho et al. (2018) ont observé une situation similaire chez la Genette commune (*Genetta genetta*) au sud du Portugal, où, malgré l'absence de structuration génétique apparente entre les deux côtés d'une autoroute, un effet barrière touchait les adultes résidents, tandis que le flux de gènes était assuré par les subadultes en dispersion.

Il est donc essentiel d'adopter une approche multi-spécifique pour éviter des généralisations inadaptées. Par conséquent, les futures études visant à évaluer la connectivité fonctionnelle dans des paysages fragmentés devraient privilégier des approches intégratives et multi-spécifiques, combinant données génétiques, écologiques et comportementales. Cette démarche est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes comportementaux sous-jacents qui expliquent la diversité des réponses individuelles et interspécifiques aux ILTs. Elle permet ainsi d'alimenter les modèles de connectivité, contribuant à la conception de mesures

de gestion plus efficaces et adaptées pour maintenir durablement la connectivité écologique et la viabilité des populations naturelles.

APPROCHE FONCTIONNELLE THEORIQUE VS. REELLE : L'EXEMPLE DE L'A34

À l'échelle régionale, la prise en compte des continuités écologiques dans l'aménagement du territoire est assurée par le SRADDET. Ce schéma définit les grandes orientations de la TVB, en intégrant les enjeux liés aux continuités écologiques d'importance régionale et locale. En septembre 2024, le SRADDET a publié une cartographie actualisée de la TVB en région Grand Est. Bien qu'elle ne soit pas juridiquement contraignante, cette carte constitue un outil de référence pour le suivi et l'évaluation des politiques locales. Elle vient également enrichir les diagnostics écologiques et guide les décisions relatives à la préservation, à la restauration et à la déclinaison locale de la TVB. Cette nouvelle cartographie a ainsi permis d'identifier les zones de conflit entre continuités écologiques et ILTs présentes sur le territoire. L'évaluation de la perméabilité de ces infrastructures repose sur l'analyse du type et de l'importance des ILTs, des continuités écologiques concernées, ainsi que sur les caractéristiques des ouvrages d'art et des passages à faune présents sur les tronçons étudiés. Concernant l'autoroute A34, l'impact a été qualifié de modéré à moyen (**Figure 28**), en raison de la présence de deux viaducs (larges de 330 m et 260 m) compensant l'absence de passage à faune dédié. Cependant, bien que cette cartographie repose sur une évaluation globale de l'impact des ILTs à partir d'une liste d'espèces cibles, elle tend à sous-estimer l'impact réel de l'A34 sur le cerf et le sanglier au regard des résultats de cette thèse. De plus, les deux viaducs (signalés en vert sur l'empreinte de l'A34; **Figure 28**) ont été considérés par défaut comme perméables pour la faune, bien que les suivis génétiques du cerf et du sanglier dans ce contexte paysager contredisent cette hypothèse. Cette tendance à surestimer la perméabilité d'une ILT sur la seule base de la présence d'ouvrages jugés a priori fonctionnels a également été observée en Bulgarie par Kaphegyi et al. (2013); sur deux autoroutes évaluées, seules 13 des 77 structures recensées répondaient aux critères de franchissement nécessaires pour maintenir la connectivité paysagère entre deux sous-populations d'Ours brun (*Ursus arctos*).

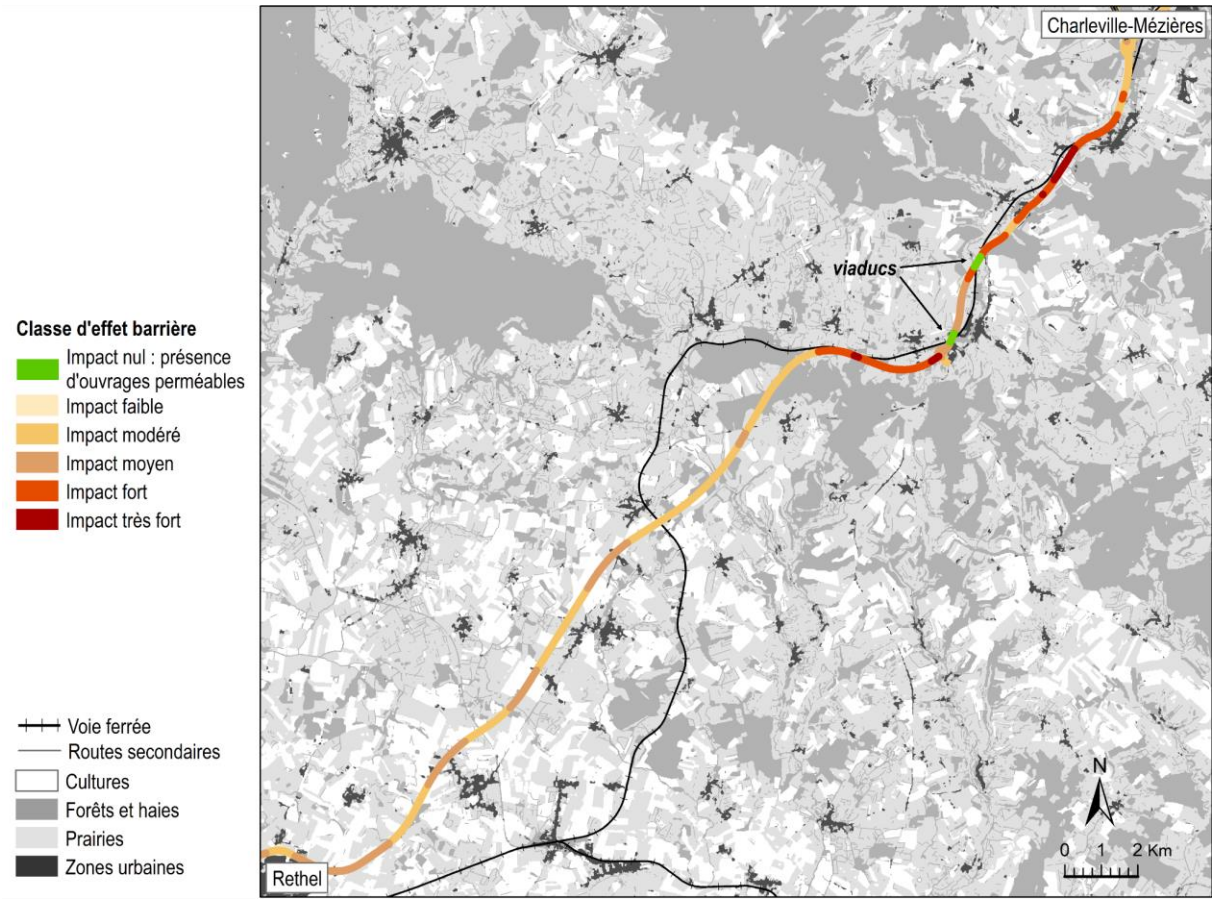


Figure 28 : Modélisation de l'impact de l'autoroute A34 sur la continuité écologique bocagère d'importance nationale inspirée de la cartographie actualisée de la TVB en région Grand Est. (Source : DataGrandEst, DREAL Grand Est, Région Grand Est, AERM, AESN, AERMC)

Bien que la modélisation des continuités écologiques et de leurs points de rupture à l'échelle régionale soit utile, elle reste imprécise et doit être complétée par des données empiriques pour refléter l'impact réel des ILTs sur la faune. L'effet modéré estimé de l'A34 semble cohérent avec la fréquentation des ouvrages par les espèces de petite et moyenne taille, ainsi que par une espèce de grande taille, le chevreuil. En revanche, nos résultats montrent un désaccord pour d'autres espèces de grande taille, comme le sanglier et le cerf. Ce constat conduit à deux conclusions : 1) l'approche multi-spécifique déployée par le SRADDET devrait prendre en compte la taille et l'éco-éthologie des espèces, en particulier pour estimer l'impact des ILTs grillagés ; 2) bien que l'approche fonctionnelle réelle fournisse des résultats plus pertinents, il est évidemment irréalisable de l'appliquer à l'ensemble des ILTs du territoire. La réalisation d'études de fonctionnalité réelle constitue néanmoins un outil essentiel pour valider et enrichir l'approche fonctionnelle théorique.

ORIENTATIONS POUR LA PLANIFICATION DE MESURES D'ATTENUATION

Ce travail de thèse a mis en évidence un effet barrière à la connectivité fonctionnelle affectant le cerf et le sanglier, en lien avec l'autoroute A34. Au regard des enjeux de préservation d'une espèce patrimoniale (le Cerf élaphe), ainsi que des continuités écologiques d'importance nationale et régionale, il apparaît primordial d'envisager des mesures d'atténuation pour restaurer la transparence écologique de cette ILT. Etant donné la barrière physique et comportementale que l'autoroute peut induire pour la faune, deux grandes approches de gestion peuvent être mobilisées : (i) l'approche *structurelle et paysagère*, qui désigne les interventions sur l'ILT elle-même et ses abords. Elle vise à créer ou rétablir les possibilités de franchissement, par exemple par la création de passages à faune ou l'aménagement d'ouvrages existants ; (ii) l'approche *comportementale*, qui repose sur des actions destinées à inciter les animaux à emprunter les ouvrages qui leur sont physiquement disponibles. Les mesures envisagées pour restaurer la connectivité à travers l'autoroute A34 pourraient également constituer un cadre de référence pour la requalification d'infrastructures existantes. Elles pourraient aussi guider l'intégration de dispositifs adaptés dans les futurs projets, conformément à la séquence « Éviter, Réduire, Compenser » (ERC) visant à limiter les impacts des ILTs sur les milieux naturels (Bourdil and Vanpeene-Bruhier 2013).

Approche structurelle et paysagère

La construction d'un ouvrage dédié exclusivement au passage de la faune (i.e. passage à faune) constitue l'une des mesures les plus encourageantes pour reconnecter les populations d'ongulés séparées par une infrastructure linéaire clôturée (Lesbarrères and Fahrig 2012; Denneboom et al. 2021). Plusieurs études ont démontré leur efficacité à faciliter les déplacements transversaux d'ongulés (Clevenger and Waltho 2005; Olsson and Widen 2008; Mata et al. 2008; Simpson et al. 2016; Kupferschmid et al. 2022), notamment le cerf, le chevreuil et le sanglier, qui figurent parmi les utilisateurs les plus fréquents de ces ouvrages. Par exemple, un suivi par piège à traces sur un écopont en Croatie a révélé que 84,8 % des passages concernait cette guilde, avec une prédominance du chevreuil (42 %), suivi du cerf (26,1 %) et du sanglier (16,7 % ; Kusak et al. 2009). En Pologne, l'analyse de 15 passages à faune a également confirmé cette tendance, les ongulés totalisant 77,4 % des traversées, dont 51,7 % par le chevreuil, 28 % par le sanglier et 22 % par le cerf (Mysłajek et al. 2020). En Arizona (Etats-Unis), l'utilisation de 6 passages à faune inférieurs suivis par pièges

photographiques a montré que les wapitis (*Cervus elaphus nelsoni*) représentaient 68 % des animaux détectés (Dodd et al. 2007). De plus, Mysłajek et al. (2020) et Denneboom et al. (2021) suggèrent une légère préférence des ongulés pour les passages supérieurs par rapport aux passages inférieurs.

L'efficacité de ces ouvrages dépend toutefois de plusieurs facteurs : leurs dimensions (ex. >35m de largeur dans un contexte de restauration de continuité écologique régionale à enjeu important de continuité pour les espèces patrimoniales et protégées; Cerema 2021), leur quiétude et leur accessibilité aux abords, ainsi que leur intégration paysagère. En effet, l'emplacement d'un passage à faune dans le paysage est également crucial : les ouvrages sont plus efficaces s'ils sont éloignés des perturbations humaines et proches des habitats utilisés pour les ressources et les déplacements des espèces considérées (Clevenger and Waltho 2000; Glista et al. 2009; Lesbarrères and Fahrig 2012; Denneboom et al. 2021). Par exemple, pour le cerf, un ouvrage sera d'autant plus efficace s'il est situé le long d'un axe de déplacement historique ou actuel (Vignon 1999). Dans le cas de la présente étude, il serait alors pertinent d'implanter un écopont dans le corridor forestier reliant les massifs de Signy-l'Abbaye et du Mont-Dieu (**Figure 29**), où les seuls franchissements observés restent rares. Ce secteur est aussi celui où les suivis GPS du sanglier et du chevreuil ont révélé une forte réticence à emprunter les ouvrages non dédiés au passage de la faune, bien qu'ils ne fuient pas les abords de l'autoroute. De plus, les passages à faune profitent également à de nombreux taxons aux traits écologiques variés (Amphibiens, Reptiles, Lagomorphes, Carnivores; Mata et al. 2005), augmentant ainsi leur portée écologique pour la restauration des continuités écologiques. Toutefois, la construction d'un passage à faune représente un coût important. Il est donc fortement recommandé d'intégrer une conception expérimentale de type BACI (*Before-After-Control-Impact*) dans le projet d'aménagement routier (Lesbarrères and Fahrig 2012). Cela permettait d'évaluer son efficacité sur le site concerné tout en générant des données précieuses pour orienter et améliorer de futurs projets similaires.

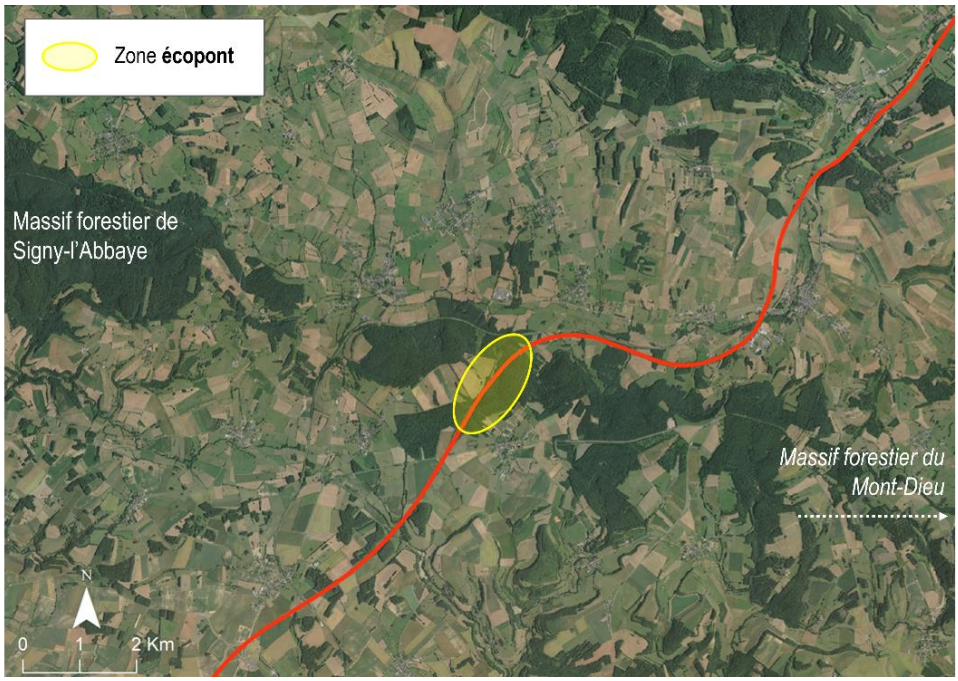


Figure 29 : Emplacement suggéré pour l'installation d'un écopont favorisant la préservation d'une continuité forestière dans le département des Ardennes, France. La ligne rouge représente l'autoroute A34

Par ailleurs, les ouvrages non spécifiques au passage de la faune (ponts, ponts-cadre et buses), largement disponibles et répartis uniformément le long de l'infrastructure, ne doivent pas être négligés. Leur amélioration viendrait renforcer la contribution d'un écopont, en diversifiant les options de franchissement et en répondant aux exigences variées des espèces. Plusieurs études (Karlson et al. 2017b; Helldin 2022) soulignent d'ailleurs l'intérêt d'une répartition de multiples sites de passage pour le maintien de la perméabilité, plutôt qu'un seul ouvrage majeur. Les grands ouvrages inférieurs traversés par un cours d'eau avec une banquette naturelle (ex. ponts-cadre agricole et grande buse) sont particulièrement attractifs pour les espèces associées aux ripisylves (Glista et al. 2009), et représentent une option à moindre coût pour améliorer la connectivité pour une grande variété d'animaux, terrestres comme aquatiques (Lesbarrères and Fahrig 2012). Enfin, l'aménagement d'une continuité végétale à travers et aux abords de l'ouvrage facilite son intégration dans le paysage et oriente les animaux vers le passage (Saxena and Habib 2022). En recréant un environnement favorable, ces dispositifs participent à la reconnexion des habitats, offrent des microhabitats propices et encouragent l'utilisation des structures de franchissement par la faune.

Enfin, bien qu'aucun travail n'ait été publié dans des revues scientifiques internationales, plusieurs rapports techniques et scientifiques ont été diffusés en France (VINCI 2016 ; VINCI

2023). Ces travaux portent sur la restauration des continuités écologiques le long des autoroutes, notamment par l'aménagement d'ouvrages pour la faune. Ils contribuent ainsi de manière significative à l'enrichissement des connaissances sur la restauration de la perméabilité des ILTs en France, et peuvent également servir de référence dans les projets d'aménagement à l'étranger.

Approche comportementale

La requalification d'une ILT existante est souvent envisagée sous un angle anthropocentré, en se concentrant sur la création de passage à faune ou l'amélioration d'ouvrages existants (Bissonette and Adair 2008). Bien que ces aménagements soient utiles, ils ne suffisent pas à rétablir à eux seuls la connectivité fonctionnelle si les réactions comportementales des animaux face à ces structures ne sont pas prises en compte (Lesbarrères et al. 2004; Saxena and Habib 2022). Un ouvrage peut être a priori structurellement adapté à une espèce, mais rester inutilisé en raison d'un manque d'attrait et d'habituation. Dans ce contexte, il est possible d'agir sur le comportement animal pour inciter artificiellement les individus à envisager ces structures dans leurs déplacements, et ainsi à franchir les barrières que représentent les ILTs pour accéder à de nouveaux habitats (principe d'énaction; Varela 1992; Gerard and Maublanc 2023). Il s'agit alors de renforcer l'attractivité d'un passage en favorisant la continuité sensorielle (gustative et olfactive) afin d'encourager son utilisation. Par exemple, cela peut passer par :

- Le dépôt temporaire ou permanent de ressources alimentaires locales appétantes pour les espèces considérées. Dans le cas des herbivores, l'ajout de végétaux locaux peut favoriser d'autres espèces telles que les invertébrés ;

- L'utilisation temporaire d'indices olfactifs imprégnant l'intérieur et les abords de l'ouvrage pour stimuler la fréquentation du site, tel que cela est pratiqué pour le piégeage d'animaux (Pawlina and Proulx 1999; Randler et al. 2020). Par exemple, l'utilisation de fèces de cerfs a permis d'augmenter l'utilisation d'un passage à faune en Île-de-France par les ongulés, un an après l'échec d'une première réhabilitation structurelle (Vignon and Walczak 1999).

À ce jour, hormis l'installation de clôtures, l'approche comportementale est principalement utilisée pour réduire la mortalité liée aux collisions faune-véhicule, en dissuadant les animaux de traverser les ILTs sur les voies (Glista et al. 2009). Les techniques reposent sur des répulsifs olfactifs, visuels ou sonores, dont les effets biologiques restent encore mal compris. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour développer des méthodes comportementales d'attraction, incitant les animaux à emprunter les ouvrages de franchissement. Cela permettrait non seulement de réduire les risques de collisions, mais aussi de maintenir les continuités écologiques dans un paysage fragmenté par des éléments barrières anthropiques.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux de cette thèse ont mis en évidence la complexité des effets exercés par les ILTs sur la connectivité fonctionnelle du paysage. Ces effets varient selon la nature de l'infrastructure et le contexte environnemental, mais également en fonction des caractéristiques éco-éthologiques propres à chaque espèce. En mobilisant une approche intégrative et multi-spécifique combinant données génétiques, suivi des ouvrages de franchissement et analyse fine des déplacements individuels, ce travail a proposé une évaluation plus complète du processus de fragmentation par les ILTs. Ces résultats rappellent qu'il est essentiel de rester prudent face aux généralisations fondées sur des données partielles ou des modèles théoriques de résistance paysagère, dont le pouvoir prédictif reste limité en l'absence de validation empirique fondée sur des sources multiples et complémentaires. En intégrant à la fois les flux de gènes et les comportements de déplacement, cette approche permet non seulement de révéler les flux de gènes à l'échelle des populations, mais aussi de mieux comprendre les contraintes comportementales qui limitent les franchissements effectifs. Il devient alors possible d'identifier avec précision les points de rupture de la connectivité fonctionnelle malgré la présence de site de franchissement, et d'évaluer plus finement l'efficacité réelle des structures existantes. Une telle démarche est indispensable pour guider de manière ciblée les efforts de restauration ou de maintien des corridors écologiques, en concentrant les mesures de gestion sur les secteurs où les effets de barrière sont les plus marqués. L'approche développée dans ce travail constitue de ce fait une méthodologie robuste, reproductible et transférable, particulièrement pertinente pour la planification écologique, notamment dans le cadre de la TVB et des futurs projets d'aménagement des ILTs. En renforçant la pertinence des diagnostics écologiques, elle contribue à accroître l'efficacité des stratégies d'atténuation – souvent coûteuses – tout en permettant une gestion mesurée des stratégies de conservation, en évitant des interventions là où la connectivité est peu affectée. Ce travail offre ainsi une approche méthodologique et des perspectives applicables à une gestion plus précise et réaliste de la connectivité écologique dans les paysages fragmentés.

BIBLIOGRAPHIE

Abra FD, Canena A da C, Garbino GST, Medici EP (2020) Use of unfenced highway underpasses by lowland tapirs and other medium and large mammals in central-western Brazil. Perspectives in Ecology and Conservation 18:247–256. https://doi.org/10.1016/j.pecon.2020.10.006

Abrahms B, Sawyer SC, Jordan NR, et al (2017) Does wildlife resource selection accurately inform corridor conservation? Journal of Applied Ecology 54:412–422. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12714

Adriaensen F, Chardon JP, De Blust G, et al (2003) The application of 'least-cost' modelling as a functional landscape model. Landscape and Urban Planning 64:233–247. https://doi.org/10.1016/S0169-2046(02)00242-6

Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. Ecology Letters 9:968–980. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00927.x

Aiello CM, Galloway NL, Prentice PR, et al (2023) Movement models and simulation reveal highway impacts and mitigation opportunities for a metapopulation-distributed species. Landsc Ecol 38:1085–1103. https://doi.org/10.1007/s10980-023-01600-6

Aldridge HDJN, Brigham RM (1988) Load Carrying and Maneuverability in an Insectivorous Bat: A Test of The 5% "Rule" of Radio-Telemetry. Journal of Mammalogy 69:379–382. https://doi.org/10.2307/1381393

Allag-Dhuisme F, Amsallem J, Barthod C, et al (2010) Choix stratégiques de nature à contribuer à la préservation et à la remise en bon état des continuités écologiques : premier document en appui à la mise en oeuvre de la Trame verte et bleue en France. MEEDDM

Anciaux MR, Libois RM (1990) Atlas des mamifères sauvages de Wallonie : Le chevreuil (*Capreolus capreolus L.*), Cahiers d'éthologie

Andersen GE, Johnson CN, Barmuta LA, Jones ME (2017) Use of anthropogenic linear features by two medium-sized carnivores in reserved and agricultural landscapes. Sci Rep 7:11624. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11454-z

Arnaud J-F (2003) Metapopulation genetic structure and migration pathways in the land snail Helix aspersa: influence of landscape heterogeneity. Landscape Ecol 18:333–346. https://doi.org/10.1023/A:1024409116214

Asari Y, Noro M, Yamada Y, Maruyama R (2020) Overpasses intended for human use can be crossed by middle and large-size mammals. Landscape Ecol Eng 16:63–68. https://doi.org/10.1007/s11355-019-00396-5

Ascensão F, Clevenger AP, Grilo C, et al (2012) Highway verges as habitat providers for small mammals in agrosilvopastoral environments. Biodivers Conserv 21:3681–3697. https://doi.org/10.1007/s10531-012-0390-3

Ascensão F, Grilo C, LaPoint S, et al (2014) Inter-Individual Variability of Stone Marten Behavioral Responses to a Highway. PLOS ONE 9:e103544. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103544

Ascensão F, Mira A (2007) Factors affecting culvert use by vertebrates along two stretches of road in southern Portugal. Ecol Res 22:57–66. https://doi.org/10.1007/s11284-006-0004-1

Ascensão F, Yogui DR, Alves MH, et al (2021) Preventing wildlife roadkill can offset mitigation investments in short-medium term. Biological Conservation 253:108902. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108902

Azedo R, Ilhéu A, Santos S, Vaz PG (2022) Carnivores cross irrigation canals more often through overpasses than through culverts. Basic and Applied Ecology 61:53–67. https://doi.org/10.1016/j.baae.2022.03.004

Baechli J, Albanesi S, Bellis LM (2021) Effectiveness of crossings as wildlife passages for mammals in the Yungas of Argentina. Journal for Nature Conservation 59:125944. https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125944

Baguette M, Blanchet S, Legrand D, et al (2013) Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks. Biological Reviews 88:310–326. https://doi.org/10.1111/brv.12000

Balkenhol N, Waits LP (2009) Molecular road ecology: exploring the potential of genetics for investigating transportation impacts on wildlife. Molecular Ecology 18:4151–4164. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04322.x

Banister D, Berechman Y (2001) Transport investment and the promotion of economic growth. Journal of Transport Geography 9:209–218. https://doi.org/10.1016/S0966-6923(01)00013-8

Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, et al (2011) Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature 471:51–57. https://doi.org/10.1038/nature09678

Bar-On YM, Phillips R, Milo R (2018) The biomass distribution on Earth. Proceedings of the National Academy of Sciences 115:6506–6511. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115

Barrueto M, Ford AT, Clevenger AP (2014) Anthropogenic effects on activity patterns of wildlife at crossing structures. Ecosphere 5:art27. https://doi.org/10.1890/ES13-00382.1

Bartzke GS, May R, Solberg EJ, et al (2015) Differential barrier and corridor effects of power lines, roads and rivers on moose (*Alces alces*) movements. Ecosphere 6:art67. https://doi.org/10.1890/ES14-00278.1

Basto MP, Santos-Reis M, Simões L, et al (2016) Assessing Genetic Structure in Common but Ecologically Distinct Carnivores: The Stone Marten and Red Fox. PLOS One 11:e0145165. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145165

Bekker H, Iuell B (2003) Habitat fragmentation due to infrastructure. In: Irwin, CL, Garrett, P, McDermott, KP editors, USA: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University., p 15

Bélisle M (2005) Measuring Landscape Connectivity: The Challenge of Behavioral Landscape Ecology. Ecology 86:1988–1995. https://doi.org/10.1890/04-0923

Benítez-López A, Alkemade R, Verweij PA (2010) The impacts of roads and other infrastructure on mammal and bird populations: A meta-analysis. Biological Conservation 143:1307–1316. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.02.009

Benítez-Malvido J, Dáttilo W, Martínez-Falcón AP, et al (2016) The Multiple Impacts of Tropical Forest Fragmentation on Arthropod Biodiversity and on their Patterns of Interactions with Host Plants. PLOS ONE 11:e0146461. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146461

Bennett VJ (2017) Effects of Road Density and Pattern on the Conservation of Species and Biodiversity. Curr Landscape Ecol Rep 2:1–11. https://doi.org/10.1007/s40823-017-0020-6

Bennett VJ, Smith WP, Betts MG (2011) Toward understanding the ecological impact of transportation corridors. Gen Tech Rep PNW-GTR-846 Portland, OR: US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station 40 p 846:. https://doi.org/10.2737/PNW-GTR-846

Berne A, Deroy M, Lucet S, et al (2004) Orientations Régionales de Gestion de la Faune sauvage et d'amélioration de la qualité de ses Habitats de la région Champagne-Ardenne (ORGFH). Direction Régionale de l'Environnemanet (DIREN)

Beyer HL, Gurarie E, Börger L, et al (2016) 'You shall not pass!': quantifying barrier permeability and proximity avoidance by animals. Journal of Animal Ecology 85:43–53. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12275

Bhardwaj M, Olsson M, Seiler A (2020) Ungulate use of non-wildlife underpasses. Journal of Environmental Management 273:111095. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111095

Biondi E, Casavecchia S, Pesaresi S, Zivkovic L (2012) Natura 2000 and the Pan-European Ecological Network: a new methodology for data integration. Biodivers Conserv 21:1741–1754. https://doi.org/10.1007/s10531-012-0273-7

Biosa D (2013) Relationships between environmental variables and genetic structure of wild ungulate populations. PhD dissertation in Environmental Biology, Università à Degli Studi di Sassari

Bissonette JA (2002) Scaling roads and wildlife: the Cinderella principle. Zeitschrift für Jagdwissenschaft 48:208–214. https://doi.org/10.1007/BF02192410

Bissonette JA, Adair W (2008) Restoring habitat permeability to roaded landscapes with isometrically-scaled wildlife crossings. Biological conservation 141:482–488

Blair C, Weigel DE, Balazik M, et al (2012) A simulation-based evaluation of methods for inferring linear barriers to gene flow. Molecular Ecology Resources 12:822–833. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03151.x

Bolliger J, Silbernagel J (2020) Contribution of Connectivity Assessments to Green Infrastructure (GI). ISPRS International Journal of Geo-Information 9:212. https://doi.org/10.3390/ijgi9040212

Bonnin M, Bruszik A, Delbaere B, et al (eds) (2007) Le réseau écologique paneuropéen: état d'avancement, Conseil de l'Europe. Éd. du Conseil de l'Europe, Strasbourg

Bonnot N, Morellet N, Verheyden H, et al (2013) Habitat use under predation risk: hunting, roads and human dwellings influence the spatial behaviour of roe deer. Eur J Wildl Res 59:185–193. https://doi.org/10.1007/s10344-012-0665-8

Bonnot N, Verheyden H, Blanchard P, et al (2015) Interindividual variability in habitat use: evidence for a risk management syndrome in roe deer? Behavioral Ecology 26:105–114. https://doi.org/10.1093/beheco/aru169

Borda-de-Água L, Barrientos R, Beja P, Pereira HM (eds) (2017) Railway Ecology. Springer International Publishing, Cham

Botting I, Ascensão F, Navarro LM, et al (2023) The road to success and the fences to be crossed: considering multiple infrastructure in landscape connectivity modelling. Wildlife Biology n/a:e01187. https://doi.org/10.1002/wlb3.01187

Bourdil C, Vanpeene-Bruhier S (2013) Séquence ERC & Continuités écologiques. Réflexions sur la prise en compte des atteintes portées aux continuités écologiques dans la compensation des projets d'aménagement. Irstea

Bowman J, Fahrig L (2002) Gap crossing by chipmunks: an experimental test of landscape connectivity. Can J Zool 80:1556–1561. https://doi.org/10.1139/z02-161

Boyle SP, Dillon R, Litzgus JD, Lesbarrères D (2019) Desiccation of herpetofauna on roadway exclusion fencing. The Canadian Field-Naturalist 133:43–48. https://doi.org/10.22621/cfn.v133i1.2076

Boyle SP, Keevil MG, Litzgus JD, et al (2021) Road-effect mitigation promotes connectivity and reduces mortality at the population-level. Biological Conservation 261:109230. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109230

Boyle SP, Litzgus JD, Lesbarrères D (2020) Limited evidence for negative effects of highway widening on North American large mammals. Eur J Wildl Res 66:90. https://doi.org/10.1007/s10344-020-01428-4

Bracis C, Mueller T (2017) Memory, not just perception, plays an important role in terrestrial mammalian migration. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 284:20170449. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0449

Brady MJ, McAlpine CA, Possingham HP, et al (2011) Matrix is important for mammals in landscapes with small amounts of native forest habitat. Landscape Ecol 26:617–628. https://doi.org/10.1007/s10980-011-9602-6

Breyne P, Mergeay J, Casaer J (2014) Roe deer population structure in a highly fragmented landscape. Eur J Wildl Res 60:909–917. https://doi.org/10.1007/s10344-014-0859-3

Bright JL, Van Riper C (2000) Pronghorn home ranges, habitat selection and distribution around water sources in northerne Arizona. USGS Forest and Rangeland Ecosystem Science Center, Biological Resources Division, Colorado Plateau Field Station

Brodie JF, Giordano AJ, Dickson B, et al (2015) Evaluating multispecies landscape connectivity in a threatened tropical mammal community. Conservation Biology 29:122–132. https://doi.org/10.1111/cobi.12337

Bro-Jørgensen J, Franks DW, Meise K (2019) Linking behaviour to dynamics of populations and communities: application of novel approaches in behavioural ecology to conservation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 374:20190008. https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0008

Brons M, Dijkstra L, Ibáñez JN, Poelman H (2022) Road infrastructure in Europe: road length and its impact on road performance. Publications Office of the European Union WP 03/2022: https://doi.org/10.2776/21558

Brown GP, Phillips BL, Webb JK, Shine R (2006) Toad on the road: Use of roads as dispersal corridors by cane toads (*Bufo marinus*) at an invasion front in tropical Australia. Biological Conservation 133:88–94. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.05.020

Brunen B, Daguet C, Jaeger JAG (2020) What attributes are relevant for drainage culverts to serve as efficient road crossing structures for mammals? Journal of Environmental Management 268:110423. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110423

Buchanan CB, Beck JL, Bills TE, Miller SN (2014) Seasonal Resource Selection and Distributional Response by Elk to Development of a Natural Gas Field. Rangeland Ecology & Management 67:369–379. https://doi.org/10.2111/REM-D-13-00136.1

Burkart S, Gugerli F, Senn J, et al (2016) Evaluating the functionality of expert-assessed wildlife corridors with genetic data from roe deer. Basic and Applied Ecology 17:52–60. https://doi.org/10.1016/j.baae.2015.09.001

Burt WH (1943) Territoriality and Home Range Concepts as Applied to Mammals. Journal of Mammalogy 24:346–352. https://doi.org/10.2307/1374834

Buton C (2023) Impacts écologiques des clôtures et solutions de remédiation possibles. Etat des connaissances et bonnes pratiques spécifiques aux centrales photovoltaïques au sol. Cabinet X-AEQUO

Caldwell MR, Klip JMK (2020) Wildlife Interactions within Highway Underpasses. The Journal of Wildlife Management 84:227–236. https://doi.org/10.1002/jwmg.21801

Calenge C, Maillard D, Invernia N, Gaudin J-C (2005) Reintroduction of roe deer Capreolus capreolus into a Mediterranean habitat: female mortality and dispersion. Wildlife Biology 11:153–161. https://doi.org/10.2981/0909-6396(2005)11[153:RORDCC]2.0.CO;2

Carvalho F, Lourenço A, Carvalho R, et al (2018) The effects of a motorway on movement behaviour and gene flow in a forest carnivore: Joint evidence from road mortality, radio tracking and genetics. Landscape and Urban Planning 178:217–227. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2018.06.007

Casper RM (2009) Guidelines for the instrumentation of wild birds and mammals. Animal Behaviour 78:1477–1483. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.09.023

Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, et al (2015) Accelerated modern human–induced species losses: Entering the sixth mass extinction. Sci Adv 1:e1400253. https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253

Ceballos G, Ehrlich R, Raven PH (2020) Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. Proceedings of the National Academy of Sciences 117:13596–13602. https://doi.org/10.1073/pnas.1922686117

Cecchi F, Fabbri MC, Tinacci L, et al (2022) Genetic resistance to Campylobacter coli and Campylobacter jejuni in wild boar (*Sus scrofa L.*). Rend Fis Acc Lincei 33:407–417. https://doi.org/10.1007/s12210-022-01052-1

Ceia-Hasse A, Borda-de-Água L, Grilo C, Pereira HM (2017) Global exposure of carnivores to roads. Global Ecology and Biogeography 26:592–600. https://doi.org/10.1111/geb.12564

Ceia-Hasse A, Navarro LM, Borda-de-Água L, Pereira HM (2018) Population persistence in landscapes fragmented by roads: Disentangling isolation, mortality, and the effect of dispersal. Ecological Modelling 375:45–53. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.01.021

Cerema (2021) Les passages à faune. Préserver et restaurer les continuités écologiques, avec les infrastructures linéaires de transport., Cerema. Bron

Cervero R (2013) Linking urban transport and land use in developing countries. Journal of Transport and Land Use 6:7–24

CGDD - Commissariat Général au Développement Durable (2016) DATALAB transport : Les infrastructures linéaires de transport : évolutions depuis 25 ans. MEEM, Service de l'observation et des statistiques (SOeS), Paris

CGDD - Commissariat Général au Développement Durable (2022) DATALAB transport : Bilan annuel des transports en 2021. MEEM, Service de l'observation et des statistiques (SOeS), Paris

Chakraborty P, Borah J, Bora PJ, et al (2021) Camera trap based monitoring of a key wildlife corridor reveals opportunities and challenges for large mammal conservation in Assam, India. Trop Ecol 62:186–196. https://doi.org/10.1007/s42965-020-00138-x

Chardon JP, Adriaensen F, Matthysen E (2003) Incorporating landscape elements into a connectivity measure: a case study for the Speckled wood butterfly (*Pararge aegeria L.*). Landscape Ecology 18:561–573. https://doi.org/10.1023/A:1026062530600

Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. Molecular Ecology Notes 7:747–756. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01769.x

Churko G, Kienast F, Bolliger J (2020) A Multispecies Assessment to Identify the Functional Connectivity of Amphibians in a Human-Dominated Landscape. ISPRS International Journal of Geo-Information 9:287. https://doi.org/10.3390/ijgi9050287

Clauzel C (2022) Les réseaux écologiques, une stratégie de conservation pour concilier fonctionnalités écologiques et aménagement du territoire. Géoconfluences

Clevenger AP, Chruszcz B, Gunson K (2001a) Drainage culverts as habitat linkages and factors affecting passage by mammals. Journal of Applied Ecology 38:1340–1349. https://doi.org/10.1046/j.0021-8901.2001.00678.x

Clevenger AP, Chruszcz B, Gunson KE (2003) Spatial patterns and factors influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. Biological Conservation 109:15–26. https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00127-1

Clevenger AP, Chruszcz B, Gunson KE (2001b) Highway Mitigation Fencing Reduces Wildlife-Vehicle Collisions. Wildlife Society Bulletin (1973-2006) 29:646–653

Clevenger AP, Chruszcz B, work(s): KEGR (2001c) Highway Mitigation Fencing Reduces Wildlife-Vehicle Collisions. Wildlife Society Bulletin 29:646–653

Clevenger AP, Waltho N (2005) Performance indices to identify attributes of highway crossing structures facilitating movement of large mammals. Biological Conservation 121:453–464. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.04.025

Clevenger AP, Waltho N (2003) Long-term, year-round monitoring of wildlife crossing structures and the importance of temporal and spatial variability in performance studies. Lake Placid New York, United States

Clevenger AP, Waltho N (2000) Factors Influencing the Effectiveness of Wildlife Underpasses in Banff National Park, Alberta, Canada. Conservation Biology 14:47–56. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.00099-085.x

Coffin AW (2007) From roadkill to road ecology: A review of the ecological effects of roads. Journal of Transport Geography 15:396–406. https://doi.org/10.1016/j.jtrangeo.2006.11.006

Coppes J, Burghardt F, Hagen R, et al (2017) Human recreation affects spatio-temporal habitat use patterns in red deer (*Cervus elaphus*). PLOS ONE 12:e0175134. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175134

Corlatti L, Hackländer K, Frey-Roos F (2009) Ability of Wildlife Overpasses to Provide Connectivity and Prevent Genetic Isolation. Conservation Biology 23:548–556. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.01162.x

Costa V, Pérez-González J, Santos P, et al (2012) Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). BMC Res Notes 5:479. https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-479

Coulon A, Guillot G, Cosson J-F, et al (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. Molecular Ecology 15:1669–1679. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02861.x

Coulon A, Morellet N, Goulard M, et al (2008) Inferring the effects of landscape structure on roe deer (*Capreolus capreolus*) movements using a step selection function. Landscape Ecol 23:603–614. https://doi.org/10.1007/s10980-008-9220-0

Cramer P, Olsson M, Gadd ME, et al (2015) Transportation and Large Herbivores. In: Handbook of Road Ecology. John Wiley & Sons, Ltd, pp 344–352

Creech TG, Brennan A, Faselt J, et al (2024) Validating Connectivity Models: A Synthesis. Curr Landscape Ecol Rep 9:120–134. https://doi.org/10.1007/s40823-024-00102-8

Crooks KR (2002) Relative Sensitivities of Mammalian Carnivores to Habitat Fragmentation. Conservation Biology 16:488–502. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00386.x

Crooks KR, Burdett CL, Theobald DM, et al (2011) Global patterns of fragmentation and connectivity of mammalian carnivore habitat. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 366:2642–2651. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0120

Cushman SA, Elliot NB, Macdonald DW, Loveridge AJ (2016) A multi-scale assessment of population connectivity in African lions (*Panthera leo*) in response to landscape change. Landscape Ecol 31:1337–1353. https://doi.org/10.1007/s10980-015-0292-3

Cushman SA, McRae B, Adriaensen F, et al (2013) Biological corridors and connectivity. In: Macdonald DW, Willis KJ (eds) Key Topics in Conservation Biology 2, 1st edn. Wiley, pp 384–404

D'Amico M, Périquet S, Román J, Revilla E (2016) Road avoidance responses determine the impact of heterogeneous road networks at a regional scale. J Appl Ecol 53:181–190. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12572

De Groot GA, Hofmeester TR, La Haye M, et al (2016) Hidden dispersal in an urban world: genetic analysis reveals occasional long-distance dispersal and limited spatial substructure among Dutch pine martens. Conserv Genet 17:111–123. https://doi.org/10.1007/s10592-015-0765-6

de Jonge MMJ, Gallego-Zamorano J, Huijbregts MAJ, et al (2022) The impacts of linear infrastructure on terrestrial vertebrate populations: A trait-based approach. Glob Chang Biol 28:7217–7233. https://doi.org/10.1111/gcb.16450

Debeffe L, Morellet N, Cargnelutti B, et al (2013) Exploration as a key component of natal dispersal: dispersers explore more than philopatric individuals in roe deer. Animal Behaviour 86:143–151. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.05.005

Delamare R (2023) Etude des comportements de la faune sauvage confrontée aux infrastructures linéaires de transport : cas du chevreuil et du sanglier. URCA-CERFE, Boult-aux-Bois, France

Delclaux J, Fleury P (2020) Politique de conservation de la biodiversité et d'aménagement du territoire : état de l'art sur la mise en œuvre de la Trame verte et bleue en France. Cybergeo: European Journal of Geography. https://doi.org/10.4000/cybergeo.35801

Dellicour S, Frantz A, Colyn M, et al (2011) Population structure and genetic diversity of red deer (*Cervus elaphus*) in forest fragments in north-western France. Conservation Genetics 12:1287–1297. https://doi.org/10.1007/s10592-011-0230-0

Denneboom D, Bar-Massada A, Shwartz A (2021) Factors affecting usage of crossing structures by wildlife – A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment 777:146061. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146061

DeVoe JD, Proffitt KM, Millspaugh JJ (2022) Fence types influence pronghorn movement responses. Ecosphere 13:e4285. https://doi.org/10.1002/ecs2.4285

Dewas M, Herr J, Schley L, et al (2012) Recovery and status of native and introduced beavers Castor fiber and Castor canadensis in France and neighbouring countries. Mammal Review 42:144–165. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00196.x

Díaz S, Settele J, Brondízio ES, et al (2019) Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. Science 366:eaax3100. https://doi.org/10.1126/science.aax3100

Dickie M, Serrouya R, McNay RS, Boutin S (2017) Faster and farther: wolf movement on linear features and implications for hunting behaviour. Journal of Applied Ecology 54:253–263. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12732

Dillon RM, Boyle SP, Litzgus JD, Lesbarrères D (2020) Build It and Some Will Use It: A Test of Road Ecopassages for Eastern Gartersnakes. Journal of Herpetology 54:19–23. https://doi.org/10.1670/18-163

Diniz MF, Cushman SA, Machado RB, De Marco Júnior P (2020) Landscape connectivity modeling from the perspective of animal dispersal. Landscape Ecol 35:41–58. https://doi.org/10.1007/s10980-019-00935-3

Dirzo R, Young HS, Galetti M, et al (2014) Defaunation in the Anthropocene. Science 345:401–406. https://doi.org/10.1126/science.1251817

Dispan de Floran L, Mergey M, Galan M, et al (2025) Variability in the impact of linear transportation infrastructures on gene flow in French wild ungulate populations. Landsc Ecol 40:31. https://doi.org/10.1007/s10980-025-02052-w

Dodd NL, Gagnon JW, Boe S, Schweinsburg RE (2007) Assessment of Elk Highway Permeability by Using Global Positioning System Telemetry. The Journal of Wildlife Management 71:1107–1117. https://doi.org/10.2193/2006-106

Doherty TS, Driscoll DA (2018) Coupling movement and landscape ecology for animal conservation in production landscapes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 285:20172272. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2272

Dolédec S, Chessel D (1994) Co-inertia analysis: an alternative method for studying species–environment relationships. Freshwater Biology 31:277–294. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1994.tb01741.x

Donaldson B (2007) Use of Highway Underpasses by Large Mammals and Other Wildlife in Virginia: Factors Influencing Their Effectiveness. Transportation Research Record 2011:157–164. https://doi.org/10.3141/2011-17

Dondina O, Orioli V, D'Occhio P, et al (2017) How does forest species specialization affect the application of the island biogeography theory in fragmented landscapes? Journal of Biogeography 44:1041–1052. https://doi.org/10.1111/jbi.12827

Ducros D, Morellet N, Patin R, et al (2020) Beyond dispersal versus philopatry? Alternative behavioural tactics of juvenile roe deer in a heterogeneous landscape. Oikos 129:81–92. https://doi.org/10.1111/oik.06793

Dulac J (2013) Global land transport infrastructure requirements: estimating road and railway infrastructure capacity and costs to 2050. Information Papers International Energy Agency: Paris OECD

Dupuis-Desormeaux M, Kaaria TN, Mwololo M, et al (2018) A ghost fence-gap: surprising wildlife usage of an obsolete fence crossing. PeerJ 6:e5950. https://doi.org/10.7717/peerj.5950

Edelhoff H, Zachos FE, Fickel J, et al (2020) Genetic analysis of red deer (*Cervus elaphus*) administrative management units in a human-dominated landscape. Conserv Genet 21:261–276. https://doi.org/10.1007/s10592-020-01248-8

Epps CW, Palsbøll PJ, Wehausen JD, et al (2005) Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep: Highways reduce genetic diversity. Ecology Letters 8:1029–1038. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00804.x

Evanno et al. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611–2620. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Ewers RM, Didham RK (2006) Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. Biological Reviews 81:117–142. https://doi.org/10.1017/S1464793105006949

Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. Annu Rev Ecol Evol Syst 34:487–515. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419

Fahrig L (2017) Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. Annu Rev Ecol Evol Syst 48:1–23. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022612

Fahrig L (2007) Non-optimal animal movement in human-altered landscapes. Functional Ecology 21:1003–1015. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01326.x

Fahrig L, Rytwinski T (2009) Effects of Roads on Animal Abundance: an Empirical Review and Synthesis. Ecology and Society 14:

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. Genetics 164:1567–1587. https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567

Finch D, Corbacho DP, Schofield H, et al (2020) Modelling the functional connectivity of landscapes for greater horseshoe bats Rhinolophus ferrumequinum at a local scale. Landscape Ecol 35:577–589. https://doi.org/10.1007/s10980-019-00953-1

Finn C, Grattarola F, Pincheira-Donoso D (2023) More losers than winners: investigating Anthropocene defaunation through the diversity of population trends. Biological Reviews 98:1732–1748. https://doi.org/10.1111/brv.12974

Fletcher RJ, Didham RK, Banks-Leite C, et al (2018) Is habitat fragmentation good for biodiversity? Biological Conservation 226:9–15. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.07.022

Forman RTT (ed) (2003) Road ecology: science and solutions. Island Press, Washington, DC, USA

Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. Annu Rev Ecol Syst 29:207–231. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.207

Frantz AC, Bertouille S, Eloy MC, et al (2012) Comparative landscape genetic analyses show a Belgian motorway to be a gene flow barrier for red deer (*Cervus elaphus*), but not wild boars (*Sus scrofa*): A Belgian motorway as a barrier to gene flow. Molecular Ecology 21:3445–3457. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05623.x

Frantz AC, Cellina S, Krier A, et al (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? Journal of Applied Ecology 46:493–505. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01606.x

Frantz AC, Pope LC, Etherington TR, et al (2010) Using isolation-by-distance-based approaches to assess the barrier effect of linear landscape elements on badger (*Meles meles*) dispersal. Molecular Ecology 19:1663–1674. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04605.x

Fraser DL, Ironside K, Wayne RK, Boydston EE (2019) Connectivity of mule deer (*Odocoileus hemionus*) populations in a highly fragmented urban landscape. Landscape Ecol 34:1097–1115. https://doi.org/10.1007/s10980-019-00824-9

Freitas SR, Adélia S, Sousa COM (2013) Effects of landscape characteristics on roadkill of mammals, birds and reptiles in a highway crossing the atlantic forest in southeastern brazil. Scottsdale, Arizona

Gagnon JW, Dodd NL, Ogren KS, Schweinsburg RE (2011) Factors associated with use of wildlife underpasses and importance of long-term monitoring. The Journal of Wildlife Management 75:1477–1487. https://doi.org/10.1002/jwmg.160

Galan M, Cosson JF, Aulagnier S, et al (2003) Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. Molecular Ecology Notes 3:142–146. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00384.x

Galantinho A, Herrera JM, Eufrázio S, et al (2020) Les accotements routiers assurent la connectivité des petits mammifères : une étude de cas avec des souris sylvestres (*Apodemus sylvaticus*) dans un système agro-sylvo-pastoral. Journal of Environmental Management 258:110033. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.110033

Gates CC, Jones P, Suitor M, et al (2012) The Influence of Land Use and Fences on Habitat Effectiveness, Movements and Distribution of Pronghorn in the Grasslands of North America. In: Somers MJ, Hayward M (eds) Fencing for Conservation. Springer New York, New York, NY, pp 277–294

Gautrelet M (2023) Ecologie spatiale et régime alimentaires du Raton laveur (*Procyon lotor*) en France métropolitaine. Thèse de doctorat, Physiologie et Biologie des Organismes - Populations - Interactions, Université de Reims Champagne-Ardenne

Gautrelet M, Gerard J-F, Helder R, et al (2024) First look on the home range, movement, and habitat selection of the invasive Northern raccoon (*Procyon lotor*) in France through two contrasted populations. Eur J Wildl Res 70:7. https://doi.org/10.1007/s10344-023-01756-1

Gavin SD, Komers PE (2006) Do pronghorn (*Antilocapra americana*) perceive roads as a predation risk? Can J Zool 84:1775–1780. https://doi.org/10.1139/z06-175

Gaynor KM, Brown JS, Middleton AD, et al (2019) Landscapes of Fear: Spatial Patterns of Risk Perception and Response. Trends in Ecology & Evolution 34:355–368. https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.01.004

Gehr B, Bonnot NC, Heurich M, et al (2020) Stay home, stay safe—Site familiarity reduces predation risk in a large herbivore in two contrasting study sites. Journal of Animal Ecology 89:1329–1339. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13202

Gerard J-F, Maublanc M-L (2023) Nothing in the Environment Makes Sense Except in the Light of a Living System: Organisms, Their Relationships to the Environment, and Evolution. Evolutionary Biology 50:1–12. https://doi.org/10.1007/s11692-022-09594-w

Gerard J-F, Teillaud P, Spitz F, et al (1991) Le sanglier. Rev Ecol Suppl. 6:11–67

Gilhooly PS, Nielsen SE, Whittington J, Clair CCS (2019) Wildlife mortality on roads and railways following highway mitigation. Ecosphere 10:e02597. https://doi.org/10.1002/ecs2.2597

Glen AS, Cockburn S, Nichols M, et al (2013) Optimising Camera Traps for Monitoring Small Mammals. PLOS ONE 8:e67940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067940

Glista DJ, DeVault TL, DeWoody JA (2008) Vertebrate Road Mortality Predominantly Impacts Amphibians. Herpetological Conservation and Biology 3:77–87

Glista DJ, DeVault TL, DeWoody JA (2009) A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways. Landscape and Urban Planning 91:1–7. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2008.11.001

Godvik IMR, Loe LE, Vik JO, et al (2009) Temporal scales, trade-offs, and functional responses in red deer habitat selection. Ecology 90:699–710. https://doi.org/10.1890/08-0576.1

Gottardi E, Tua F, Cargnelutti B, et al (2010) Use of GPS activity sensors to measure active and inactive behaviours of European roe deer (*Capreolus capreolus*). 74:355–362. https://doi.org/10.1515/mamm.2010.058

Goudet J (2003) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html. Accessed 18 Jan 2024

Griciuvienė L, Janeliūnas Ž, Jurgelevičius V, Paulauskas A (2021) The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of wild boar (*Sus scrofa*) population in Lithuania. BMC Genomic Data 22:53. https://doi.org/10.1186/s12863-021-01008-8

Grilo C, Bissonette JA, Santos-Reis M (2008) Response of carnivores to existing highway culverts and underpasses: implications for road planning and mitigation. Biodivers Conserv 17:1685–1699. https://doi.org/10.1007/s10531-008-9374-8

Grilo C, Borda-de-Água L, Beja P, et al (2021) Conservation threats from roadkill in the global road network. Global Ecology and Biogeography 30:2200–2210. https://doi.org/10.1111/geb.13375

Grilo C, Koroleva E, Andrášik R, et al (2020) Roadkill risk and population vulnerability in European birds and mammals. Frontiers in Ecology and the Environment 18:323–328. https://doi.org/10.1002/fee.2216

Guil F, Pérez-García JM (2022) Bird electrocution on power lines: Spatial gaps and identification of driving factors at global scales. Journal of Environmental Management 301:113890. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113890

Guillot G, Santos F, Estoup A (2012) Population genetics analysis using R and the Geneland program. https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/6334216/Geneland-Doc.pdf

Guinard E (2013) Infrastructures de transport autoroutières et avifaune : les facteurs influençant la mortalité par collision. Thèse de doctorat, Biologie et Ecologie, Ecole pratique des hautes études - EPHE PARIS

Guinard É, Julliard R, Barbraud C (2012) Motorways and bird traffic casualties: Carcasses surveys and scavenging bias. Biological Conservation 147:40–51. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.019

Guinard E, Loukea M, Chalkia E, et al (2023) Report on identification of Best Practice and Gaps and Barriers to expand replicability and application of good and best practice to mainstream biodiversity and transport. WP3 D3.2 Report, BISON project Horizon Europe

Gus-Puszczewicz A (2018) Inland waterways in the development of inland shipping. Transport Economics and Logistics 77:33–40. https://doi.org/10.26881/etil.2018.77.03

Habibullah MS, Din BH, Tan S-H, Zahid H (2022) Impact of climate change on biodiversity loss: global evidence. Environ Sci Pollut Res 29:1073–1086. https://doi.org/10.1007/s11356-021-15702-8

Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, et al (2015) Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. Science Advances 1:e1500052. https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052

Hagemann J, Conejero C, Stillfried M, et al (2022) Genetic population structure defines wild boar as an urban exploiter species in Barcelona, Spain. Science of The Total Environment 833:155126. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155126

Hamilton KM, Bommarito T, Lewis JS (2024) Human activities influence mule deer use of overpasses across multiple scales. J Wildl Manag 88:e22560. https://doi.org/10.1002/jwmg.22560

Hanski I (1999) Metapopulation Ecology. OUP Oxford

Hardy O, Vekemans X (2015) SPAGeDI 1.5. A program for Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity. User's manual http://ebe. ulb. ac. be/ebe/SPAGeDi_files/SPAGeDi_1. 5_Manual. pdf. Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Harrington JL, Conover MR (2006) Characteristics of Ungulate Behavior and Mortality Associated with Wire Fences. Wildlife Society Bulletin 34:1295–1305. https://doi.org/10.2193/0091-7648(2006)34[1295:COUBAM]2.0.CO;2

Hebblewhite M, Haydon DT (2010) Distinguishing technology from biology: a critical review of the use of GPS telemetry data in ecology. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 365:2303–2312. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0087

Helldin JO (2022) Are several small wildlife crossing structures better than a single large? Arguments from the perspective of large wildlife conservation. NC 47:197–213. https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.67979

Hepenstrick D, Thiel D, Holderegger R, Gugerli F (2012) Genetic discontinuities in roe deer (*Capreolus capreolus*) coincide with fenced transportation infrastructure. Basic and Applied Ecology 13:631–638. https://doi.org/10.1016/j.baae.2012.08.009

Hering R, Hauptfleisch M, Kramer-Schadt S, et al (2022) Effects of fences and fence gaps on the movement behavior of three southern African antelope species. Front Conserv Sci 3:. https://doi.org/10.3389/fcosc.2022.959423

Hewison AJ, Vincent JP, Joachim J, et al (2001) The effects of woodland fragmentation and human activity on roe deer distribution in agricultural landscapes. Can J Zool 79:679–689. https://doi.org/10.1139/z01-032

Hilty JA, Keeley ATH, Jr WZL, Merenlender AM (2019) Corridor Ecology, Second Edition: Linking Landscapes for Biodiversity Conservation and Climate Adaptation. Island Press

Holderegger R, Di Giulio M (2010) The genetic effects of roads: A review of empirical evidence. Basic and Applied Ecology 11:522–531. https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.06.006

Holderegger R, Wagner HH (2008) Landscape Genetics. BioScience 58:199–207. https://doi.org/10.1641/B580306

Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources 9:1322–1332. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x

Huerta-Rodríguez JO, Rosas-Rosas OC, López-Mata L, et al (2022) Camera traps reveal the natural corridors used by mammalian species in eastern Mexico. Ecol Process 11:51. https://doi.org/10.1186/s13717-022-00394-w

Huijser M, Ament R, Bell M, et al (2021) Animal Vehicle Collision Reduction and Habitat Connectivity Pooled Fund Study – Literature Review. Western Transportation Institute – Montana State University, Bozeman, Montana

Huijser MP, Duffield JW, Clevenger AP, et al (2009) Cost–Benefit Analyses of Mitigation Measures Aimed at Reducing Collisions with Large Ungulates in the United States and Canada: a Decision Support Tool. Ecology and Society 14:

Huijser MP, Fairbank ER, Camel-Means W, et al (2016) Effectiveness of short sections of wildlife fencing and crossing structures along highways in reducing wildlife–vehicle collisions and providing safe crossing opportunities for large mammals. Biological Conservation 197:61–68. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.02.002

Isbell F, Balvanera P, Mori AS, et al (2023) Expert perspectives on global biodiversity loss and its drivers and impacts on people. Frontiers in Ecology and the Environment 21:94–103. https://doi.org/10.1002/fee.2536

Jackson ND, Fahrig L (2011) Relative effects of road mortality and decreased connectivity on population genetic diversity. Biological Conservation 144:3143–3148. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.09.010

Jaeger J a. G, Fahrig L (2004) Effects of Road Fencing on Population Persistence. Conservation Biology 18:1651–1657. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00304.x

Jaeger JAG, Bowman J, Brennan J, et al (2005) Predicting when animal populations are at risk from roads: an interactive model of road avoidance behavior. Ecological Modelling 185:329–348. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.12.015

Jakes AF, Jones PF, Paige LC, et al (2018) A fence runs through it: A call for greater attention to the influence of fences on wildlife and ecosystems. Biological Conservation 227:310–318. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.09.026

Jaureguiberry P, Titeux N, Wiemers (2022) The direct drivers of recent global anthropogenic biodiversity loss. Science Advances 8:eabm9982. https://doi.org/10.1126/sciadv.abm9982

Jayakody S, Sibbald AM, Mayes RW, et al (2011) Effects of human disturbance on the diet composition of wild red deer (*Cervus elaphus*). Eur J Wildl Res 57:939–948. https://doi.org/10.1007/s10344-011-0508-z

Jensen A, Perrine J, Schaffner A, et al (2022) Mammal use of undercrossings is influenced by openness and proximity to riparian corridors. Wildlife Research 50:. https://doi.org/10.1071/WR21183

Jepsen JU, Topping CJ (2004) Modelling roe deer (*Capreolus capreolus*) in a gradient of forest fragmentation: behavioural plasticity and choice of cover. Can J Zool 82:1528–1541. https://doi.org/10.1139/z04-131

Johnson CN, Balmford A, Brook BW, et al (2017) Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. Science 356:270–275. https://doi.org/10.1126/science.aam9317

Joint EEA-FOEN (2011) Landscape fragmentation in Europe : joint EEA-FOEN report. European Environment Agency, LU

Jones PF, Jakes AF, Eacker DR, et al (2018) Evaluating responses by pronghorn to fence modifications across the Northern Great Plains. Wildlife Society Bulletin - Record Set Up In Error 42:225–236. https://doi.org/10.1002/wsb.869

Jones PF, Jakes AF, Vegter SE, Verhage MS (2022) Is it the road or the fence? Influence of linear anthropogenic features on the movement and distribution of a partially migratory ungulate. Mov Ecol 10:37. https://doi.org/10.1186/s40462-022-00336-3

Jones-Walters L (2007) Pan-European Ecological Networks. Journal for Nature Conservation 15:262–264. https://doi.org/10.1016/j.jnc.2007.10.001

Jongman RHG, Bouwma IM, Griffioen A, et al (2011) The Pan European Ecological Network: PEEN. Landscape Ecol 26:311–326. https://doi.org/10.1007/s10980-010-9567-x

Kämmerle J-L, Brieger F, Kröschel M, et al (2017) Temporal patterns in road crossing behaviour in roe deer (*Capreolus capreolus*) at sites with wildlife warning reflectors. PLOS One 12:e0184761. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184761

Kaphegyi TAM, Dees M, Zlatanova D, et al (2013) Rapid assessment of linear transport infrastructure in relation to the impact on landscape continuity for large ranging mammals. Biodivers Conserv 22:153–168. https://doi.org/10.1007/s10531-012-0409-9

Karlson M, Seiler A, Mörtberg U (2017a) The effect of fauna passages and landscape characteristics on barrier mitigation success. Ecological Engineering 105:211–220. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.059

Karlson M, Seiler A, Mörtberg U (2017b) The effect of fauna passages and landscape characteristics on barrier mitigation success. Ecological Engineering 105:211–220. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.059

Killeen J, Thurfjell H, Ciuti S, et al (2014) Habitat selection during ungulate dispersal and exploratory movement at broad and fine scale with implications for conservation management. Mov Ecol 2:15. https://doi.org/10.1186/s40462-014-0015-4

Kimmig SE, Beninde J, Brandt M, et al (2019) Beyond the landscape: Resistance modelling infers physical and behavioural gene flow barriers to a mobile carnivore across a metropolitan area. Molecular Ecology. https://doi.org/10.1111/mec.15345

Klar N, Herrmann M, Kramer-Schadt S (2009) Effects and Mitigation of Road Impacts on Individual Movement Behavior of Wildcats. Journal of Wildlife Management 73:631–638. https://doi.org/10.2193/2007-574

Kobayashi S, Abe S (2023) The effects of irrigation canals and roads as barriers to gene flow between Japanese brown frog (*Rana japonica*) breeding sites at a fine scale in a Satoyama landscape. Wetlands Ecol Manage 31:191–202. https://doi.org/10.1007/s11273-023-09910-x

Kokko H, López-Sepulcre A (2006) From Individual Dispersal to Species Ranges: Perspectives for a Changing World. Science 313:789–791. https://doi.org/10.1126/science.1128566

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Molecular Ecology Resources 15:1179–1191. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387

Kranstauber B, Kays R, LaPoint SD, et al (2012) A dynamic Brownian bridge movement model to estimate utilization distributions for heterogeneous animal movement. Journal of Animal Ecology 81:738–746. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2012.01955.x

Kuehn R, Hindenlang KE, Holzgang O, et al (2007) Genetic Effect of Transportation Infrastructure on Roe Deer Populations (*Capreolus capreolus*). Journal of Heredity 98:13–22. https://doi.org/10.1093/jhered/esl056

Kupferschmid FAL, Crovadore J, Fischer C, Lefort F (2022) Shall the Wild Boar Pass? A Genetically Assessed Ecological Corridor in the Geneva Region. Sustainability 14:7463. https://doi.org/10.3390/su14127463

Kusak J, Huber D, Gomerčić T, et al (2009) The permeability of highway in Gorski kotar (Croatia) for large mammals. Eur J Wildl Res 55:7–21. https://doi.org/10.1007/s10344-008-0208-5

Laguna E, Barasona JA, Carpio AJ, et al (2022) Permeability of artificial barriers (fences) for wild boar (*Sus scrofa*) in Mediterranean mixed landscapes. Pest Management Science 78:2277–2286. https://doi.org/10.1002/ps.6853

Laliberté J, St-Laurent M-H (2020) Validation of functional connectivity modeling: The Achilles' heel of landscape connectivity mapping. Landscape and Urban Planning 202:103878. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2020.103878

Landguth EL, Cushman SA, Schwartz MK, et al (2010) Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. Molecular Ecology 19:4179–4191. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04808.x

Landguth EL, Fedy BC, OYLER-McCANCE SJ, et al (2012) Effects of sample size, number of markers, and allelic richness on the detection of spatial genetic pattern. Molecular Ecology Resources 12:276–284. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03077.x

LaPoint S, Gallery P, Wikelski M, Kays R (2013) Animal behavior, cost-based corridor models, and real corridors. Landscape Ecol 28:1615–1630. https://doi.org/10.1007/s10980-013-9910-0

Larison B, Kaelin CB, Harrigan R, et al (2021) Population structure, inbreeding and stripe pattern abnormalities in plains zebras. Molecular Ecology 30:379–390. https://doi.org/10.1111/mec.15728

Laurance WF, Clements GR, Sloan S, et al (2014) A global strategy for road building. Nature 513:229–232. https://doi.org/10.1038/nature13717

Leblond M, Frair J, Fortin D, et al (2011) Assessing the influence of resource covariates at multiple spatial scales: an application to forest-dwelling caribou faced with intensive human activity. Landscape Ecol 26:1433–1446. https://doi.org/10.1007/s10980-011-9647-6

Lecis R, Dondina O, Orioli V, et al (2022) Main roads and land cover shaped the genetic structure of a Mediterranean island wild boar population. Ecol Evol 12:e8804. https://doi.org/10.1002/ece3.8804

Legendre P, Gallagher ED (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. Oecologia 129:271–280. https://doi.org/10.1007/s004420100716

Lenz NV, Skender P Helga, Mirković PA (2018) The macroeconomic effects of transport infrastructure on economic growth: the case of Central and Eastern E.U. member states. Economic Research-Ekonomska Istraživanja 31:1953–1964. https://doi.org/10.1080/1331677X.2018.1523740

Lesbarrères D, Fahrig L (2012) Measures to reduce population fragmentation by roads: what has worked and how do we know? Trends Ecol Evol 27:374–380. https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.01.015

Lesbarrères D, Lodé T, Merilä J (2004) What type of amphibian tunnel could reduce road kills? Oryx 38:220–223. https://doi.org/10.1017/S0030605304000389

Lesbarrères D, Pagano A, Lodé T (2003) Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: the case of Agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. Comptes Rendus Biologies 326:68–72. https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00040-4

Lesbarrères D, Primmer CR, Lodé T, Merilä J (2006) The effects of 20 years of highway presence on the genetic structure of *Rana dalmatina* populations. Ecoscience 13:531–538. https://doi.org/10.2980/1195-6860(2006)13[531:TEOYOH]2.0.CO;2

Litvaitis JA, Reed GC, Carroll RP, et al (2015) Bobcats (*Lynx rufus*) as a Model Organism to Investigate the Effects of Roads on Wide-Ranging Carnivores. Environmental Management 55:1366–1376. https://doi.org/10.1007/s00267-015-0468-2

Liu J, Hull V, Luo J, et al (2015) Multiple telecouplings and their complex interrelationships. Ecology and Society 20:

Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). Am J Bot 82:1420–1425. https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb12679.x

Loraamm R, Anderson J, Burch C (2021) Identifying road avoidance behavior using time-geography for red deer in Banff National Park, Alberta, Canada. Transactions in GIS 25:1331–1346. https://doi.org/10.1111/tgis.12748

LPO Champagne-Ardenne (2012) Atlas des mammifères sauvages de Champagne-Ardenne, LPO Champagne-Ardenne

Luca Bastianelli M, von Hoermann C, Kirchner K, et al (2024) Risk response towards roads is consistent across multiple species in a temperate forest ecosystem. Oikos 2024:e10433. https://doi.org/10.1111/oik.10433

Mahmoodi S, Ahmadi K, Shabani AA, et al (2023) Anthropogenic and natural fragmentations shape the spatial distribution and genetic diversity of roe deer in the marginal area of its geographic range. Ecological Indicators 154:110835. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110835

Manel S, Holderegger R (2013) Ten years of landscape genetics. Trends in Ecology & Evolution 28:614–621. https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.012

Mark Peaden J, Justin Nowakowski A, Tuberville TD, et al (2017) Effects of roads and roadside fencing on movements, space use, and carapace temperatures of a threatened tortoise. Biological Conservation 214:13–22. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.07.022

Mata C, Hervás I, Herranz J, et al (2005) Complementary use by vertebrates of crossing structures along a fenced Spanish motorway. Biological Conservation 124:397–405. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.01.044

Mata C, Hervás I, Herranz J, et al (2008) Are motorway wildlife passages worth building? Vertebrate use of road-crossing structures on a Spanish motorway. Journal of Environmental Management 88:407–415. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.03.014

Mata C, Hervás I, Herranz J, et al (2009) Seasonal changes in wildlife use of motorway crossing structures and their implication for monitoring programmes. Transportation Research Part D: Transport and Environment 14:447–452. https://doi.org/10.1016/j.trd.2009.05.001

McInturff A, Xu W, Wilkinson CE, et al (2020) Fence Ecology: Frameworks for Understanding the Ecological Effects of Fences. BioScience 70:971–985. https://doi.org/10.1093/biosci/biaa103

McManus J, Schurch MPE, Goets S, et al (2022) Delineating Functional Corridors Linking Leopard Habitat in the Eastern and Western Cape, South Africa. Conservation 2:99–121. https://doi.org/10.3390/conservation2010009

McRae BH, Dickson BG, Keitt TH, Shah VB (2008) Using Circuit Theory to Model Connectivity in Ecology, Evolution, and Conservation. Ecology 89:2712–2724. https://doi.org/10.1890/07-1861.1

Meijer JR, Huijbregts MAJ, Schotten KCGJ, Schipper AM (2018) Global patterns of current and future road infrastructure. Environ Res Lett 13:064006. https://doi.org/10.1088/1748-9326/aabd42

Meisingset EL, Loe LE, Brekkum Ø, et al (2013) Red deer habitat selection and movements in relation to roads. The Journal of Wildlife Management 77:181–191. https://doi.org/10.1002/jwmg.469

Mergey M, Bardonnet C, Quintaine T, et al (2017) Identifying environmental drivers of spatial genetic structure of the European pine marten (*Martes martes*). Landscape Ecol 32:2261–2279. https://doi.org/10.1007/s10980-017-0567-y

Merkens L, Mimet A, Bae S, et al (2023) Connectivity at home: A data-driven connectivity modeling framework for home range movements in heterogeneous landscapes. 2023.12.22.571399

Mirouse B (2024) L'occupation du territoire en 2022 - Enquêtes Teruti 2021-2022-2023. Agreste - MASAF, Paris

MNHN, OFB (2003) Fiche de *Cervus elaphus Linnaeus*, 1758. In: Inventaire national du patrimoine naturel (INPN). https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/61000. Accessed 30 Mar 2025

Morelle K, Podgórski T, Prévot C, et al (2015) Towards understanding wild boar *Sus scrofa* movement: a synthetic movement ecology approach. Mammal Review 45:15–29. https://doi.org/10.1111/mam.12028

Morelli F, Beim M, Jerzak L, et al (2014) Can roads, railways and related structures have positive effects on birds? – A review. Transportation Research Part D: Transport and Environment 30:21–31. https://doi.org/10.1016/j.trd.2014.05.006

Moroń D, Skórka P, Lenda M, et al (2017) Railway lines affect spatial turnover of pollinator communities in an agricultural landscape. Diversity and Distributions 23:1090–1097. https://doi.org/10.1111/ddi.12600

Muhly TB, Semeniuk C, Massolo A, et al (2011) Human Activity Helps Prey Win the Predator-Prey Space Race. PLOS ONE 6:e17050. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017050

Mulero-Pázmány M, Rollán L, D'Amico M, González-Suárez M (2022) Road orientation affects the impact of roads on wildlife. Wildlife Res 50:39–46. https://doi.org/10.1071/WR21149

Muñoz PT, Torres FP, Megías AG (2015) Effects of roads on insects: a review. Biodivers Conserv 24:659–682. https://doi.org/10.1007/s10531-014-0831-2

Mysłajek RW, Nowak S, Kurek K, et al (2016) Utilisation of a wide underpass by mammals on an expressway in the Western Carpathians, S Poland. fozo 65:225–232. https://doi.org/10.25225/fozo.v65.i3.a8.2016

Mysłajek RW, Olkowska E, Wronka-Tomulewicz M, Nowak S (2020) Mammal use of wildlife crossing structures along a new motorway in an area recently recolonized by wolves. Eur J Wildl Res 66:79. https://doi.org/10.1007/s10344-020-01412-y

Naidenko S, Chistopolova M, Hernandez-Blanco JA, et al (2021) The effect of highway on spatial distribution and daily activity of mammals. Transportation Research Part D: Transport and Environment 94:102808. https://doi.org/10.1016/j.trd.2021.102808

Nandintsetseg D, Bracis C, Olson KA, et al (2019) Challenges in the conservation of wide-ranging nomadic species. Journal of Applied Ecology 56:1916–1926. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13380

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583–590. https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583

Ng SJ, Dole JW, Sauvajot RM, et al (2004) Use of highway undercrossings by wildlife in southern California. Biological Conservation 115:499–507. https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00166-6

Noonan MJ, Ascensão F, Yogui DR, Desbiez ALJ (2022) Roads as ecological traps for giant anteaters. Animal Conservation 25:182–194. https://doi.org/10.1111/acv.12728

Olsson MPO, Widen P (2008) Effects of highway fencing and wildlife crossings on moose *Alces alces* movements and space use in southwestern Sweden. Wildlife Biology 14:111–117. https://doi.org/10.2981/0909-6396(2008)14[111:EOHFAW]2.0.CO;2

Olsson MPO, Widén P, Larkin JL (2008) Effectiveness of a highway overpass to promote landscape connectivity and movement of moose and roe deer in Sweden. Landscape and Urban Planning 85:133–139. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2007.10.006

Ouédraogo D-Y, Villemey A, Vanpeene S, et al (2020) Can linear transportation infrastructure verges constitute a habitat and/or a corridor for vertebrates in temperate ecosystems? A systematic review. Environ Evid 9:13. https://doi.org/10.1186/s13750-020-00196-7

Pandey BK, Pathak JR (2025) A Sociological Exploration of Road Accessibility and its Influence on People's Livelihood. NPRC Journal of Multidisciplinary Research 2:105–115. https://doi.org/10.3126/nprcjmr.v2i1.74675

Passoni G, Coulson T, Ranc N, et al (2021) Roads constrain movement across behavioural processes in a partially migratory ungulate. Mov Ecol 9:57. https://doi.org/10.1186/s40462-021-00292-4

Patterson TA, Thomas L, Wilcox C, et al (2008) State–space models of individual animal movement. Trends in Ecology & Evolution 23:87–94. https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.10.009

Pauli JN, Buskirk SW (2007) Risk-disturbance overrides density dependence in a hunted colonial rodent, the black-tailed prairie dog *Cynomys ludovicianus*. Journal of Applied Ecology 44:1219–1230. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01337.x

Pawlina IM, Proulx G (1999) Factors affecting trap efficiency: A review. In: Mammal Trapping, Proulx, G, Ed. Alpha Wildlife Publications, Sherwood Park, AB, Canada, pp 95–115

Pérez-Espona S, Pérez-Barbería FJ, Mcleod JE, et al (2008) Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). Molecular Ecology 17:981–996. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03629.x

Peris S, Morales J (2004) Use of passages across a canal by wild mammals and related mortality. Eur J Wildl Res 50:. https://doi.org/10.1007/s10344-004-0045-0

Petsas P, Tsavdaridou AI, Mazaris AD (2020) A multispecies approach for assessing landscape connectivity in data-poor regions. Landscape Ecol 35:561–576. https://doi.org/10.1007/s10980-020-00981-2

Pfeifer M, Lefebvre V, Peres CA, et al (2017) Creation of forest edges has a global impact on forest vertebrates. Nature 551:187–191. https://doi.org/10.1038/nature24457

Pimm SL, Jenkins CN, Abell R, et al (2014) The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. Science 344:1246752. https://doi.org/10.1126/science.1246752

Piry S, Chapuis M-P, Gauffre B, et al (2016) Mapping Averaged Pairwise Information (MAPI): a new exploratory tool to uncover spatial structure. Methods in Ecology and Evolution 7:1463–1475. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12616

Polyzos S, Tsiotas D (2020) The contribution of transport infrastructures to the economic and regional development: a review of the conceptual framework. Theoretical and Empirical Researches in Urban Management 15:

Poprach K, Řehák Z, Zwach I, Machar I (2016) Applying of Indicator Vertebrate Species to Environmental Assessment in the Landscape: Danube – Oder – Elbe Water Canal in the Czech Republic. Journal of Landscape Ecology 9:61–82. https://doi.org/10.1515/jlecol-2016-0008

Prévot C, Licoppe A (2014) Comparaison de la dispersion chez le cerf et le sanglier en wallonie. Forêt Wallonne 29–38

Prévot C, Licoppe A (2013) Comparing red deer (*Cervus elaphus L.*) and wild boar (*Sus scrofa L.*) dispersal patterns in southern Belgium. Eur J Wildl Res 59:795–803. https://doi.org/10.1007/s10344-013-0732-9

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics 155:945–959. https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945

Pritchard JK, Wen X, Falush D (2010) Documentation for structure software: Version 2.3. In: Univ. Chicago. https://pic.biodiscover.com/files/c/9p/biodiscover1385456414.7278405.pdf. Accessed 14 Dec 2023

Prokopenko CM, Boyce MS, Avgar T (2017) Characterizing wildlife behavioural responses to roads using integrated step selection analysis. Journal of Applied Ecology 54:470–479. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12768

Prunier JG, Colyn M, Legendre X, Flamand M-C (2017) Regression commonality analyses on hierarchical genetic distances. Ecography 40:1412–1425. https://doi.org/10.1111/ecog.02108

Prunier JG, Kaufmann B, Fenet S, et al (2013) Optimizing the trade-off between spatial and genetic sampling efforts in patchy populations: towards a better assessment of functional connectivity using an individual-based sampling scheme. Molecular Ecology 22:5516–5530. https://doi.org/10.1111/mec.12499

Puig J, Sanz L, Serrano M, Elosegui J (2012) Wildlife roadkills and underpass use in northern spain. Environ Eng Manag J 11:1141–1147. https://doi.org/10.30638/eemj.2012.138

R Core Team (2024) R : A Language and Environment for Statistical Computing.

Ramalho DF, Aguiar LMS (2020) Bats on the road — a review of the impacts of roads and highways on bats. Acta Chiropterologica 22:417–433. https://doi.org/10.3161/15081109ACC2020.22.2.015

Randler C, Katzmaier T, Kalb J, et al (2020) Baiting/Luring Improves Detection Probability and Species Identification—A Case Study of Mustelids with Camera Traps. Animals 10:2178. https://doi.org/10.3390/ani10112178

Rautenstrauch KR (1987) Ecology of desert mule deer in southwest Arizona. Dissertation, University of Arizona

Rautenstrauch KR, Krausman PR (1989) Preventing Mule Deer Drownings in the Mohawk Canal, Arizona. Wildi Soc Bull 17:280–286

Reiner G, Rumpel M, Zimmer K, Willems H (2021) Genetic Differentiation of Wild Boar Populations in a Region Endangered by African Swine Fever. The Journal of Wildlife Management 85:423–436. https://doi.org/10.1002/jwmg.22015

Remon J (2018) Connectivité fonctionnelle en paysage fragmenté : apport des données génétiques et démographiques pour étudier l'impact multi-spécifique des infrastructures linéaires de transport. Thèse de doctorat, Ecologie, biodiversité et évolution, Toulouse 3 Paul Sabatier

Remon J, Moulherat S, Cornuau JH, et al (2022) Patterns of gene flow across multiple anthropogenic infrastructures: Insights from a multi-species approach. Landscape and Urban Planning 226:104507. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2022.104507

Rhodes R, Rhodes G (2004) Prey selection and use of natural and man-made barriers by African wild dogs while hunting. 34:

Rigoudy N, Dussert G, Benyoub A, et al (2023) The DeepFaune initiative: a collaborative effort towards the automatic identification of European fauna in camera trap images. Eur J Wildl Res 69:113. https://doi.org/10.1007/s10344-023-01742-7

Riley SPD, Pollinger JP, Sauvajot RM, et al (2006) A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores: physical and social barrier to gene flow. Molecular Ecology 15:1733–1741. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02907.x

Ripple WJ, Wolf C, Newsome TM, et al (2017) Extinction risk is most acute for the world's largest and smallest vertebrates. Proc Natl Acad Sci USA 114:10678–10683. https://doi.org/10.1073/pnas.1702078114

Rodrigue J-P, Comtois C, Slack B (2006) The geography of transport systems. Routledge, London

Rodriguez A, Crema G, Delibes M (1996) Use of Non-Wildlife Passages Across a High Speed Railway by Terrestrial Vertebrates. Journal of Applied Ecology 33:1527–1540. https://doi.org/10.2307/2404791

Rodriguez A, Crema G, Delibes M (1997) Factors affecting crossing of red foxes and wildcats through non-wildlife passages across a high-speed railway. Ecography 20:287–294. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1997.tb00373.x

Rodríguez-Morales B, Díaz-Varela ER, Marey-Pérez MF (2013) Spatiotemporal analysis of vehicle collisions involving wild boar and roe deer in NW Spain. Accident Analysis & Prevention 60:121–133. https://doi.org/10.1016/j.aap.2013.07.032

Roedenbeck IA, Voser P (2008) Effects of roads on spatial distribution, abundance and mortality of brown hare (*Lepus europaeus*) in Switzerland. Eur J Wildl Res 54:425–437. https://doi.org/10.1007/s10344-007-0166-3

Roever CL, Boyce MS, Stenhouse GB (2010) Grizzly bear movements relative to roads: application of step selection functions. Ecography 33:1113–1122. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06077.x

Rosenberg DK, Noon BR, Meslow EC (1997) Biological Corridors: Form, Function, and Efficacy. BioScience 47:677–687. https://doi.org/10.2307/1313208

Rousset (2000) Genetic differentiation between individuals. J Evolut Biol 13:58–62. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00137.x

Rudolph F, Riach N, Kees J (2023) Development of Transport Infrastructure in Europe: Exploring the shrinking and expansion of railways, motorways and airports. Berlin/Wuppertal: T3 Transportation Think Tank/Wuppertal Institute

Ryser R, Häussler J, Stark M, et al (2019) The biggest losers: habitat isolation deconstructs complex food webs from top to bottom. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 286:20191177. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1177

Rytwinski T, Fahrig L (2012) Do species life history traits explain population responses to roads? A meta-analysis. Biological Conservation 147:87–98. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.11.023

Rytwinski T, Soanes K, Jaeger JAG, et al (2016) How Effective Is Road Mitigation at Reducing Road-Kill? A Meta-Analysis. PLOS ONE 11:e0166941. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166941

Safner T, Miller MP, McRae BH, et al (2011) Comparison of Bayesian Clustering and Edge Detection Methods for Inferring Boundaries in Landscape Genetics. International Journal of Molecular Sciences 12:865–889. https://doi.org/10.3390/ijms12020865

Saint-Andrieux C, Calenge C, Bonenfant C (2020) Comparison of environmental, biological and anthropogenic causes of wildlife–vehicle collisions among three large herbivore species. Population Ecology 62:64–79. https://doi.org/10.1002/1438-390X.12029

Santini L, Saura S, Rondinini C (2016) A Composite Network Approach for Assessing Multi-Species Connectivity: An Application to Road Defragmentation Prioritisation. PLOS ONE 11:e0164794. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164794

Sawyer H, Lebeau C, Hart T (2012) Mitigating roadway impacts to migratory mule deer—A case study with underpasses and continuous fencing. Wildlife Society Bulletin 36:492–498. https://doi.org/10.1002/wsb.166

Saxena A, Habib B (2022) Crossing structure use in a tiger landscape, and implications for multi-species mitigation. Transportation Research Part D: Transport and Environment 109:103380. https://doi.org/10.1016/j.trd.2022.103380

Schertler A, Rabitsch W, Moser D, et al (2020) The potential current distribution of the coypu (*Myocastor coypus*) in Europe and climate change induced shifts in the near future. NB 58:129–160. https://doi.org/10.3897/neobiota.58.33118

Segelbacher G, Cushman SA, Epperson BK, et al (2010) Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. Conserv Genet 11:375–385. https://doi.org/10.1007/s10592-009-0044-5

Seiler A (2001) Ecological Effects of Roads: A review, SLU-Department of Conservation Biology. Uppsala, Sweden

Seiler A, Helldin JO (2006) Mortality in wildlife due to transportation. In: Davenport J, Davenport JL (eds) The Ecology of Transportation: Managing Mobility for the Environment. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 165–189

Seiler A, Olsson M (2009) Are Non-Wildlife Underpasses Effective Passages for Wildlife ? Duluth, Minnesota

Shannon G, Angeloni LM, Wittemyer G, et al (2014) Road traffic noise modifies behaviour of a keystone species. Animal Behaviour 94:135–141. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.06.004

Shepard DB, Kuhns AR, Dreslik MJ, Phillips CA (2008) Roads as barriers to animal movement in fragmented landscapes. Animal Conservation 11:288–296. https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2008.00183.x

Simpson NO, Stewart KM, Schroeder C, et al (2016) Overpasses and underpasses: Effectiveness of crossing structures for migratory ungulates. The Journal of Wildlife Management 80:1370–1378. https://doi.org/10.1002/jwmg.21132

Smith DJ, van der Ree R, Rosell C (2015) Wildlife Crossing Structures: an effective strategy to restore or maintain wildlife connectivity across roads. In: Handbook of Road Ecology. John Wiley & Sons, Ltd, pp 172–183

Snegin EA, Makeeva VM, Kaledin AP, et al (2021) Genetic diversity of the Central European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) breeds based on a microsatellite DNA locus. Vavilovskii Zhurnal Genet Selektsii 25:822–830. https://doi.org/10.18699/VJ21.095

Soanes K, Taylor AC, Sunnucks P, et al (2018) Evaluating the success of wildlife crossing structures using genetic approaches and an experimental design: Lessons from a gliding mammal. Journal of Applied Ecology 55:129–138. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12966

Sordello R (2012) Synthèse bibliographique sur les traits de vie du Cerf élaphe (*Cervus elaphus Linnaeus*, 1758) relatifs à ses déplacements et à ses besoins de continuités écologiques. Service du patrimoine naturel du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris

Sordello R, Billon L, Amsallem J, Vanpeene S (2017) Trame Verte et Bleue : Bilan technique et scientifique sur l'élaboration des Schémas régionaux de cohérence écologique. Méthodes d'identification des composantes de la TVB. Centre de ressources TVB

Sordello R, Comolet-Tirman J, Da Costa H, et al (2011) Trame verte et bleue - Critères nationaux de cohérence - Contribution à la définition du critère pour une cohérence interrégionale et transfrontalière. Rapport MNHN-SPN

Spellerberg I (1998) Ecological effects of roads and traffic: a literature review. Global Ecology & Biogeography Letters 7:317–333. https://doi.org/10.1046/j.1466-822x.1998.00308.x

St. Clair CC, Forrest A (2009) Impacts of Vehicle Traffic on the Distribution and Behaviour of Rutting Elk, *Cervus elaphus*. Behaviour 146:393–413

Tack J (2018) Wild Boar (*Sus scrofa*) populations in Europe: a scientific review of population trends and implications for management. Brussels, Belgium, p 56

Tadano R, Nagai A, Moribe J (2016) Local-scale genetic structure in the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*): insights from autosomal microsatellites. Conserv Genet 17:1125–1135. https://doi.org/10.1007/s10592-016-0848-z

Taylor CM, Norris DR (2007) Predicting conditions for migration: effects of density dependence and habitat quality. Biology Letters 3:280–284. https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0053

Taylor PD, Fahrig L, Henein K, Merriam G (1993) Connectivity Is a Vital Element of Landscape Structure. Oikos 68:571–573. https://doi.org/10.2307/3544927

Taylor PD, Fahrig L, With KA (2006) Landscape connectivity: a return to the basics. In: Crooks KR, Sanjayan M (eds) Connectivity Conservation, 1st edn. Cambridge University Press, pp 29–43

Theuerkauf J, Rouys S (2008) Habitat selection by ungulates in relation to predation risk by wolves and humans in the Białowieża Forest, Poland. Forest Ecology and Management 256:1325–1332. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.06.030

Thierry C, Lesieur-Maquin N, Fournier C, et al (2020) Comment cartographier l'occupation du sol en vue de modéliser les réseaux écologiques? Méthodologie générale et cas d'étude en Ile-de-France

Tischendorf L, Fahrig L (2000) On the usage and measurement of landscape connectivity. Oikos 90:7–19. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.900102.x

Tobler MW, Carrillo-Percastegui SE, Leite Pitman R, et al (2008) An evaluation of camera traps for inventorying large- and medium-sized terrestrial rainforest mammals. Animal Conservation 11:169–178. https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2008.00169.x

Torres A, Jaeger JAG, Alonso JC (2016) Assessing large-scale wildlife responses to human infrastructure development. Proceedings of the National Academy of Sciences 113:8472–8477. https://doi.org/10.1073/pnas.1522488113

Trombulak SC, Frissell CA (2000) Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. Conservation Biology 14:18–30. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99084.x

Truvé J, Lemel J (2003) Timing and distance of natal dispersal for wild boar *Sus scrofa* in Sweden. Wildlife Biology 9:51–57. https://doi.org/10.2981/wlb.2003.056

Tucker MA, Böhning-Gaese K, Fagan WF, et al (2018) Moving in the Anthropocene: Global reductions in terrestrial mammalian movements. Science 359:466–469. https://doi.org/10.1126/science.aam9712

Tucker MA, Ord TJ, Rogers TL (2014) Evolutionary predictors of mammalian home range size: body mass, diet and the environment. Global Ecology and Biogeography 23:1105–1114. https://doi.org/10.1111/geb.12194

Uezu A, Metzger JP, Vielliard JME (2005) Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. Biological Conservation 123:507–519. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.01.001

Underhill JE, Angold PG (2000) Effects of roads on wildlife in an intensively modified landscape. Environmental Reviews 8:21–29

URCA-CERFE (2020) Programme CORRIDORS 2016-2020 : Identification des corridors forestiers et des passages à faune actifs pour les mammifères terrestres en Champagne-Ardenne. Unviersité de Reims Champagne-Ardenne - CERFE, Boult-aux-Bois, France

van der Ree R, Gagnon JW, Smith DJ (2015) Fencing: A valuable tool for reducing wildlife-vehicle collisions and funnelling fauna to crossing structures. In: Handbook of Road Ecology. John Wiley & Sons, Ltd, pp 159–171

van Der Ree R, Smith DJ, Grilo C (2015) Handbook of Road Ecology. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA

van der Ree R, van der Grift C, Mata C, Suarez F (2007) Overcoming the barrier effect of roads - how effective are mitigation strategies? An international review pf the effectiveness of underpasses and overpasses designed to increase the permeability of roads for wildlife. C. L. Irwin, D. Nelson, and K. P. McDermott, Center for Transportation and The Environment, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, Little Rock, Arkansas, USA, pp 423–431

van Oosterhout DC, Hutchinson DWF, Wills DPM, Shipley PF (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4:535–538

Vanak AT, Thaker M, Slotow R (2010) Do fences create an edge-effect on the movement patterns of a highly mobile mega-herbivore? Biological Conservation 143:2631–2637. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.07.005

Vanpeene S, Petit Q (2024) Espèces animales indicatrices de la Trame Verte et Bleue. INRAE-RECOVER

Varela FJ (1992) Autopoiesis and a biology of intentionality. In: Proceedings of the workshop "Autopoiesis and Perception," McMullin B. Dublin City University, Dublin, pp 4–14

Veach V, Moilanen A, Minin ED (2017) Threats from urban expansion, agricultural transformation and forest loss on global conservation priority areas. PLOS ONE 12:e0188397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188397

Verhoeven KJF, Simonsen KL, McIntyre LM (2005) Implementing false discovery rate control: increasing your power. Oikos 108:643–647. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13727.x

Vignon V (1999) Le cerf et l'aménagement du territoire dans le sud-ouest de l'Île-de-France. Ministère de l'Équipement, des Transports et du Logement, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement

Vignon V, Walczak S (1999) Réhabilitation d'un passage faune sous infrastructures jumelées (TGV et autoroute) jusque-là non utilisé par les ongulés sauvages (cerf, chevreuil, sanglier) : Le cas du passage de la Bâte (tronc commun des autoroutes A10/A11). Ministère de l'Equipement, des

Transports et du Logement ; Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement., Strasbourg

Villemey A, Jeusset A, Vargac M, et al (2018) Can linear transportation infrastructure verges constitute a habitat and/or a corridor for insects in temperate landscapes? A systematic review. Environ Evid 7:5. https://doi.org/10.1186/s13750-018-0117-3

VINCI (2016) Rapport : Retour d'expérience des aménagements et des suivis faunistiques sur le réseau VINCI Autoroutes, p. 160

VINCI (2023) Rapport : Retour d'experience n°2 des aménagements et des suivis faunistiques sur le réseau VINCI Autoroutes, p. 115

Vitale Brovarone E, Cotella G (2020) Improving Rural Accessibility: A Multilayer Approach. Sustainability 12:2876. https://doi.org/10.3390/su12072876

Voies Navigables de France, Région Grand Est, Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires (2022) Devenir des canaux du Grand Est : des projets de territoires pour revitaliser le petit gabarit. Espace presse VNF 12

Wake DB, Vredenburg VT (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. Proceedings of the National Academy of Sciences 105:11466–11473. https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105

Wang Y, Guan L, Chen J, Kong Y (2018) Influences on mammals frequency of use of small bridges and culverts along the Qinghai–Tibet railway, China. Ecol Res 33:879–887. https://doi.org/10.1007/s11284-018-1578-0

Warnock-Juteau K, Bolduc V, LoScerbo D, et al (2022) Co-use of existing crossing structures along roads by wildlife and humans: Wishful thinking? NC 47:235–270. https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.73060

Watling JI, Nowakowski AJ, Donnelly MA, Orrock JL (2011) Meta-analysis reveals the importance of matrix composition for animals in fragmented habitat. Global Ecology and Biogeography 20:209–217. https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00586.x

Ważna A, Kaźmierczak A, Cichocki J, et al (2020) Use of underpasses by animals on a fenced expressway in a suburban area in western Poland. NC 39:1–18. https://doi.org/10.3897/natureconservation.39.33967

Webb SL, Gee KL, Strickland BK, et al (2010) Measuring Fine-Scale White-Tailed Deer Movements and Environmental Influences Using GPS Collars. International Journal of Ecology 2010:459610. https://doi.org/10.1155/2010/459610

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. Evolution 38:1358–1370. https://doi.org/10.2307/2408641

Westekemper K (2022) Impacts of landscape fragmentation on red deer (*Cervus elaphus*) and European wildcat (*Felis silvestris silvestris*): a nation-wide landscape genetic analysis. Dissertation, Georg-August-University Göttingen

Whittington J, Hebblewhite M, DeCesare NJ, et al (2011) Caribou encounters with wolves increase near roads and trails: a time-to-event approach. Journal of Applied Ecology 48:1535–1542. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2011.02043.x

Widjaja G (2024) Infrastructure investment policy to boost economic growth and increase employment. International journal of financial economics 1:418–426

Wilson RE, Farley SD, McDonough TJ, et al (2015) A genetic discontinuity in moose (*Alces alces*) in Alaska corresponds with fenced transportation infrastructure. Conserv Genet 16:791–800. https://doi.org/10.1007/s10592-015-0700-x

Winton S, Bishop C, Larsen K (2020) When protected areas are not enough: low-traffic roads projected to cause a decline in a northern viper population. Endang Species Res 41:131–139. https://doi.org/10.3354/esr01017

Xu W, Dejid N, Herrmann V, et al (2021) Barrier Behaviour Analysis (BaBA) reveals extensive effects of fencing on wide-ranging ungulates. Journal of Applied Ecology 58:690–698. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13806

Xu W, Gigliotti LC, Royauté R, et al (2023) Fencing amplifies individual differences in movement with implications on survival for two migratory ungulates. Journal of Animal Ecology 92:677–689. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13879

Yanes M, Velasco JM, Suárez F (1995) Permeability of roads and railways to vertebrates: The importance of culverts. Biological Conservation 71:217–222. https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)00028-O

Zar JH (1999) Biostatistical Analysis. In: 4th edn. Pearson Education India, Prentice Hall

Zeller KA, McGarigal K, Whiteley AR (2012) Estimating landscape resistance to movement: a review. Landscape Ecol 27:777–797. https://doi.org/10.1007/s10980-012-9737-0

ANNEXES • MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

TABLE DES ANNEXES

Table S1. Genetic diversity of red deer in France for each of the 10 loci in a single multiplex kit 161

Table S2. Genetic diversity of wild boar in France for each of the 11 loci in a single multiplex kit..... 161

Table S3. Genetic diversity of roe deer in France for each of the 11 loci in a single multiplex kit 162

Fig. S1. Inference of genetic clusters (K) based on the STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) and the GENELAND (Guillot et al. 2012) algorithms on 98 *C. elaphus* individuals from 3 sampling sites in northeastern France. STRUCTURE without (a-b) and with (c-d) LOCPRIOR information: (a and c) the ad hoc statistic delta K described in (Evanno et al. 2005) and, (b and d) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest from 20 independent runs were performed under the CLUMPAK website (Kopelman et al. 2015), have inferred two genetic clusters, as did GENELAND (e). 162

Fig. S2. Inference of genetic clusters (K) based on the STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) and the GENELAND (Guillot et al. 2012) algorithms on 120 *S. scrofa* individuals from 3 sampling sites in northeastern France. STRUCTURE without LOCPRIOR information: (a) the ad hoc statistic delta K described in Evanno et al. (2005) inferred K=3 while (b) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest from 20 independent runs inferred K=1. STRUCTURE with LOCPRIOR information: (c) the ad hoc statistic delta K described in Evanno et al. (2005) and, (d) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest have inferred K=2, as did GENELAND (e). Genetic cluster inference was performed under the CLUMPAK website (Kopelman et al. 2015). 163

Fig. S3. Inference of genetic clusters (K) based on the STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) and the GENELAND (Guillot et al. 2012) algorithms on 140 *C. capreolus* individuals from 3 sampling sites in northeastern France. STRUCTURE without (a-b) and with (c-d) LOCPRIOR information: (a and c) the ad hoc statistic delta K described in (Evanno et al. 2005) and, (b and d) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest from 20 independent runs were performed under the CLUMPAK website (Kopelman et al. 2015), have inferred two genetic clusters, as did GENELAND (e). 163

Figure S4. Detailed structural and environmental attributes of 31 non-wildlife crossing structures used in the analysis of factors influencing animal crossing across the A34 highway, France. ……163

Table S5. Fisher's exact test matrix between 6 initial qualitative variables (ns = non-significant, *p<0.05, **p<0.01). 164

Figure S4. Principal component analysis (PCA) of 16 culverts, 11 underpasses, and 2 overpasses based on the passage of 7 target species. The plot represents the first two principal components (PC1 and PC2) and aims to assess the clustering of underpasses and overpasses for the analysis of structure attributes influencing species passage. 165

Annexe 1. Récapitulatif des captures, du modèle de collier utilisé, de la durée et de la cause de l'arrêt du suivi du chevreuil et du sanglier. En gris, les individus écartés des analyses pour les raisons suivantes : arrêt prématuré du collier, d'imprécision GPS trop importante, euthanasie de l'individu à la capture..... 166

Annexe 2 : Dispositifs de capture par cage-piège ou corral 167

Annexe 3 : Traversée de l'autoroute A34 par un chevreuil en dispersion. 168

Table S1. Genetic diversity of red deer in France for each of the 10 loci in a single multiplex kit

Locus	N	A	He	Ho
B1706	98	7	0.67	0.58
BM1188	98	8	0.72	0.69
BM757	98	10	0.52	0.54
BMC1009	98	11	0.83	0.79
OarFCB304	98	9	0.83	0.71
OarFCB5	98	11	0.78	0.78
RT1	98	11	0.62	0.63
RT7	98	11	0.86	0.83
T156	98	10	0.83	0.81
T26	98	12	0.85	0.83
Mean	98	10	0.75	0.72

N: sample size; A: number of alleles; He: expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity

Table S2. Genetic diversity of wild boar in France for each of the 11 loci in a single multiplex kit

Locus	N	A	He	Ho
S0002	120	7	0.80	0.75
S0005	120	19	0.91	0.84
S0068	120	8	0.78	0.68
S0155	120	4	0.43	0.39
S0227	120	6	0.46	0.40
S0386	120	6	0.68	0.64
SW122	120	5	0.71	0.71
SW2410	120	4	0.58	0.54
SW632	120	8	0.68	0.66
SW857	120	8	0.81	0.73
SW936	120	6	0.65	0.60
Mean	120	7.36	0.68	0.63

N: sample size; A: number of alleles; He: expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity

Table S3. Genetic diversity of roe deer in France for each of the 11 loci in a single multiplex kit

Locus	N	A	He	Ho
BM757	140	12	0.86	0.886
BM848	140	6	0.75	0.75
BMC1009	140	7	0.67	0.671
CSSM39	140	6	0.80	0.75
CSSM41	140	3	0.62	0.607
CSSM43	140	6	0.74	0.779
IDVGA29	140	3	0.22	0.221
IDVGA8	140	6	0.75	0.736
NVHRT48	140	4	0.59	0.557
OarFCB304	140	14	0.88	0.871
Slc11a1	140	14	0.88	0.821
Mean	140	7.36	0.70	0.70

N: sample size; A: number of alleles; He: expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity

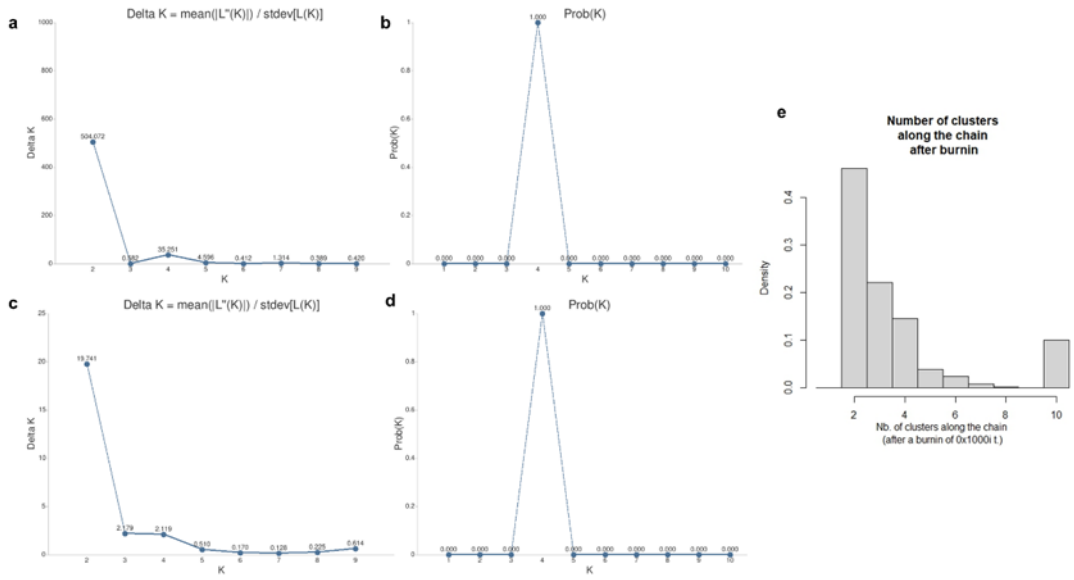


Fig. S1. Inference of genetic clusters (K) based on the STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) and the GENELAND (Guillot et al. 2012) algorithms on 98 *C. elaphus* individuals from 3 sampling sites in northeastern France. STRUCTURE without (a-b) and with (c-d) LOCPRIOR information: (a and c) the ad hoc statistic delta K described in (Evanno et al. 2005) and, (b and d) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest from 20 independent runs were performed under the CLUMPAK website (Kopelman et al. 2015), have inferred two genetic clusters, as did GENELAND (e).

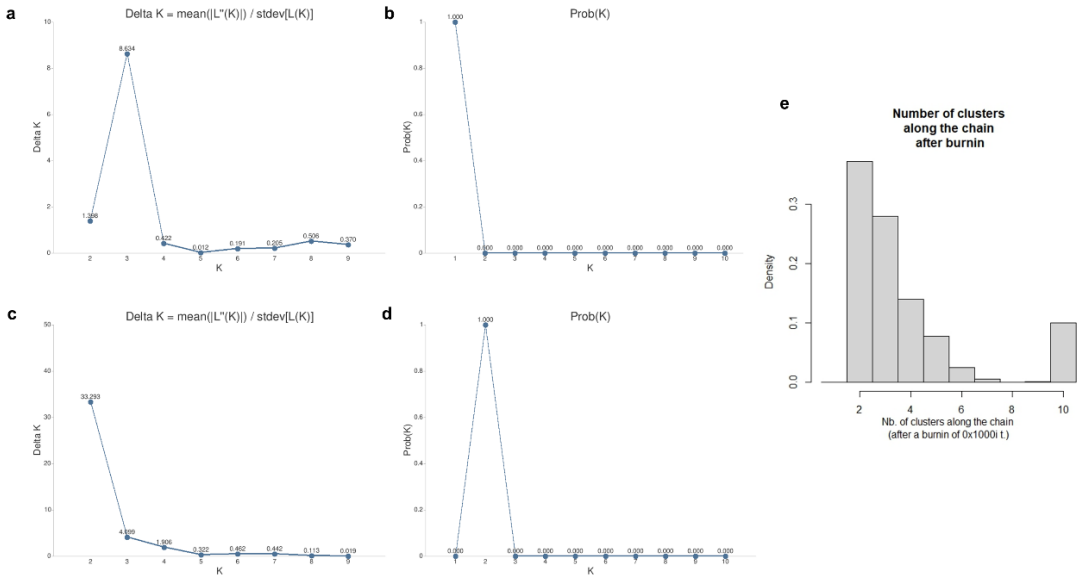


Fig. S2. Inference of genetic clusters (K) based on the STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) and the GENELAND (Guillot et al. 2012) algorithms on 120 *S. scrofa* individuals from 3 sampling sites in northeastern France. STRUCTURE without LOCPRIOR information: (a) the ad hoc statistic delta K described in Evanno et al. (2005) inferred K=3 while (b) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest from 20 independent runs inferred K=1. STRUCTURE with LOCPRIOR information: (c) the ad hoc statistic delta K described in Evanno et al. (2005) and, (d) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest have inferred K=2, as did GENELAND (e). Genetic cluster inference was performed under the CLUMPAK website (Kopelman et al. 2015).

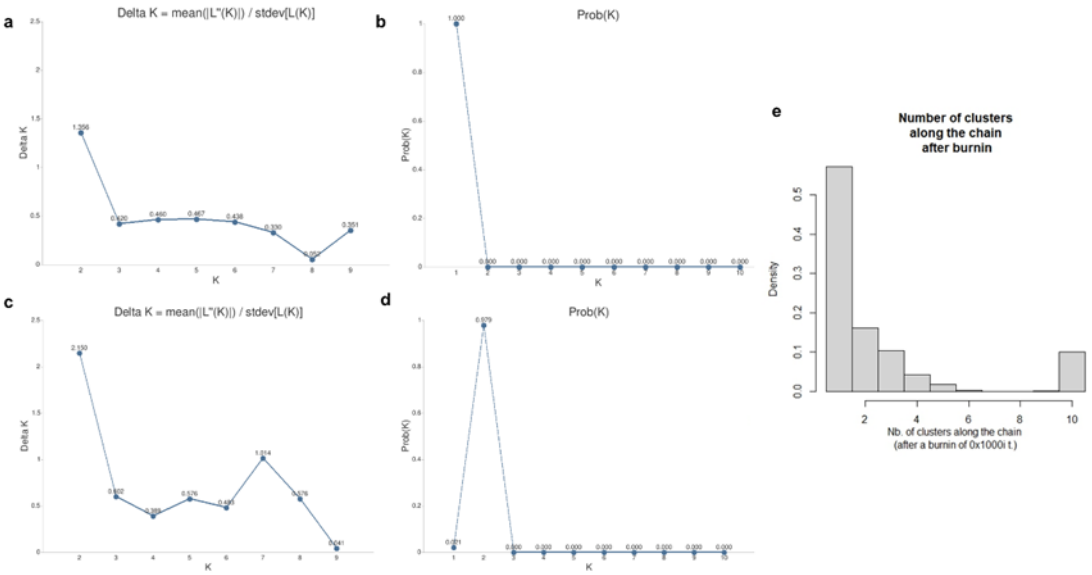


Fig. S3. Inference of genetic clusters (K) based on the STRUCTURE (Pritchard et al. 2010) and the GENELAND (Guillot et al. 2012) algorithms on 140 *C. capreolus* individuals from 3 sampling sites in northeastern France. STRUCTURE without (a-b) and with (c-d) LOCPRIOR information: (a and c) the ad hoc statistic delta K described in (Evanno et al. 2005) and, (b and d) median values of LnP(X/K) the k for which Pr(K=k) is highest from 20 independent runs were performed under the CLUMPAK website (Kopelman et al. 2015), have inferred two genetic clusters, as did GENELAND (e).

Table S4 : Detailed structural and environmental attributes of 31 non-wildlife crossing structures used in the analysis of factors influencing animal crossing across the A34 highway, France.

Type	Structure name	Width (m)	Height (m)	Lenght (m)	Openness	Dist_stream (m) [a]	Dist_forest (m) [b]	Forest_cover200m (%) [c]	Dist_urb (m) [d]	DI [e]	Cam_model [f]	Monitoring (j)	Damaged (d), stolen (s), dysfonction (dys.) [g]	Main function
culvert	A34_6	5.40	2.70	55.40	0.26	9.14	93.43	20.51	247.23	0.56	BCO	69	s	drainage
culvert	A34_7	2.93	2.05	28.00	0.21	61.81	53.53	13.12	465.66	3.46	BCO	426		drainage
culvert	A34_19	2.00	2.00	75.30	0.05	296.56	122.08	8.16	701.62	1.48	BCO	413		drainage
culvert	A34_20	3.90	2.58	63.00	0.16	0.00	57.36	33.80	458.11	1.98	BCO	427		drainage
culvert	A34_21	1.40	1.40	69.00	0.03	168.76	65.73	32.75	469.59	1.49	BAG	427		drainage
culvert	A34_22	1.40	1.24	72.00	0.02	293.83	33.18	16.52	435.03	1.36	BAG	352	dys.	drainage
culvert	A34_23	1.20	1.03	61.00	0.02	263.33	114.20	12.27	559.04	0.85	BAG	419		drainage
culvert	A34_26	2.00	1.95	46.00	0.08	309.43	14.79	81.02	907.48	0.49	BAG	410		drainage
culvert	A34_27a	1.20	1.00	58.00	0.02	207.25	14.14	82.30	1013.90	0.32	BCO	425		drainage
culvert	A34_27b	0.80	0.80	37.00	0.02	202.48	13.90	81.31	1022.67	0.60	BCO	419		drainage
culvert	A34_28	1.33	1.33	54.00	0.03	0.00	29.94	46.18	798.18	1.04	BCO	427		drainage
culvert	A34_29	4.17	2.07	38.00	0.23	0.00	20.70	77.66	717.75	1.05	BCO	427		drainage
culvert	A34_33	0.80	0.80	61.00	0.01	142.98	38.34	41.68	1242.26	2.34	BCO	427		drainage
culvert	A34_34	2.50	2.05	59.00	0.09	0.00	20.08	21.86	1323.62	0.74	BCO	225	d	drainage
culvert	A34_47	2.00	1.28	37.00	0.07	0.00	245.08	0.00	403.10	2.34	BAG	314	d	drainage
culvert	A34_49	2.50	1.50	32.00	0.12	0.00	152.10	5.64	977.63	2.51	BAG	184	d	drainage
culvert	A34_51	0.93	0.76	54.00	0.01	518.21	193.06	0.37	1119.30	1.33	BAG	203	d	drainage
underpass	A34_1a	5.91	6.10	29.80	1.21	0.00	15.41	45.61	921.70	3.18	BCO	427		drainage
underpass	A34_1b	4.50	4.40	12.10	1.63	0.00	9.97	44.66	1009.16	3.18	BAG	245	s	drainage
underpass	A34_5	17.49	8.65	98.30	1.54	40.00	113.98	11.75	155.01	1.30	BCO	406		local trafic
underpass	A34_9	3.00	3.60	33.40	0.32	200.46	136.86	21.66	313.91	3.48	BAG	427		local trafic
underpass	A34_25	11.99	5.36	23.00	2.79	328.40	31.35	67.68	857.48	1.32	BAG	417		local trafic
underpass	A34_30	11.95	5.14	23.00	2.67	47.57	21.05	84.05	675.70	1.72	BCO	427		local trafic
underpass	A34_35	7.93	4.96	27.00	1.46	79.55	79.85	17.94	1391.16	2.04	BAG	406		local trafic
underpass	A34_36	9.01	5.10	27.00	1.70	1069.31	78.30	12.78	1030.60	3.06	BCO	427		local trafic
underpass	A34_38	6.00	4.60	27.00	1.03	484.74	33.26	23.09	430.40	1.77	BCO	423		local trafic
underpass	A34_39	24.16	6.70	34.00	4.78	226.93	231.02	0.05	281.88	0.99	BCO	422		local trafic
underpass	A34_40	6.04	4.60	27.00	1.02	5.16	48.47	14.50	375.51	2.57	BCO	427		local trafic
underpass	A34_52	6.94	3.80	24.00	1.09	317.03	51.87	0.40	1095.48	1.56	BCO	14	s	local trafic
overpass	A34_24	6.80	17.30	52.00	2.25	196.02	155.35	5.49	605.17	1.33	BCO	427		local trafic
overpass	A34_44	7.00	17.30	45.00	2.69	513.55	381.04	0.00	600.25	2.79	BAG	425		local trafic

[a] Distance to the nearest stream (m)
[b] Distance to the nearest forest cover (m)
[c] Forest cover measured within 200 m radius (%)
[d] Distance to the nearest village (m)
[e] Structure Density Index (= 100 x $((CS_{n-1}+CS_{n+1})/2)/CS_{total}$)
[f] Camera models: Bushnell TrophyCam Aggressor (BAG), Bushnell TrophyCam Core DS (BCO)
[g] Cameras damaged, stolen or dysfunction during monitoring

Table S5. Fisher's exact test matrix between 6 initial qualitative variables (ns = non-significant, *p<0.05, **p<0.01).

	Shape [b]	Ledge_Sidwlk [c]	Main_funct [d]	Substrate [e]	H_presence [f]
Type[a]	**$1.477 \cdot 10^{-7}$ ****	**0.013 ***	**$2.014 \cdot 10^{-5}$ ****	0.122 ns	**$3.580 \cdot 10^{-4}$ ****
Shape	-	**0.010 ***	**0.013 ***	0.166 ns	**0.002 ****
Ledge_Sidwlk		-	0.455	1.000 ns	0.274 ns
Main_funct			-	0.294 ns	**$1.428 \cdot 10^{-5}$ ****
Substrate				-	**$9.331 \cdot 10^{-4}$ ****
H_presence					-

[a] Structure type (culvert - underpass - overpass)
[b] Structure shape (circular - arch - box - flat)
[c] Presence of ledge or sidwalk (yes/no)
[d] Main function (drainage - railroad - rural track - back road)
[e] Substrate (natural - mixed - artificial)
[f] Human presence (yes/no)

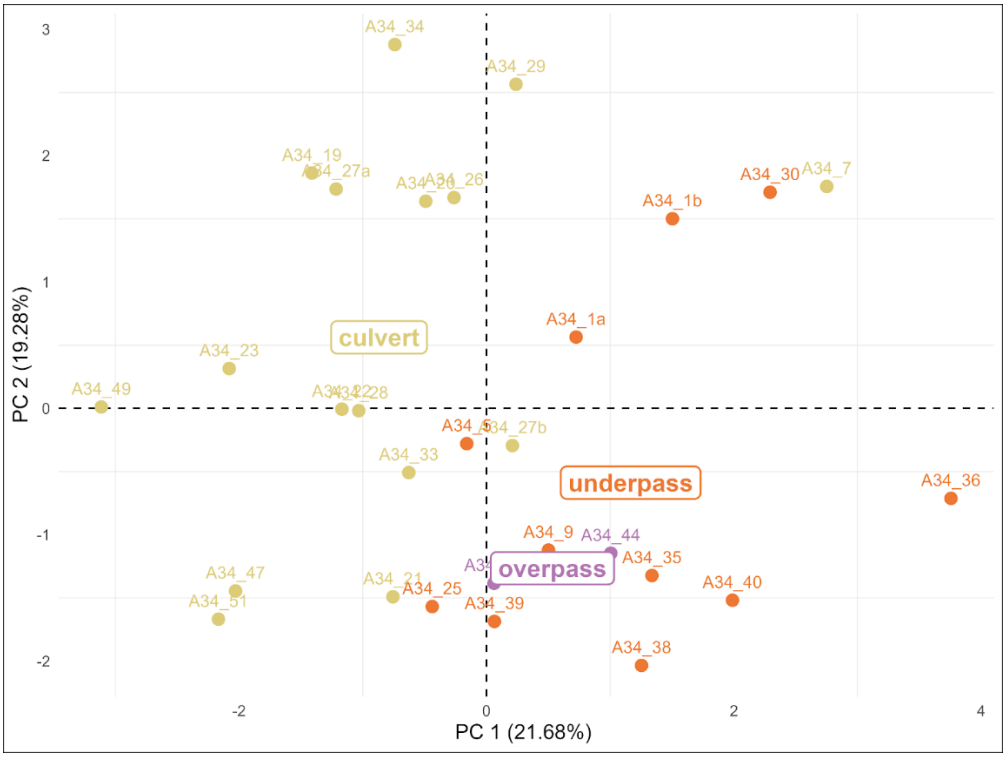


Figure S4. Principal component analysis (PCA) of 16 culverts, 11 underpasses, and 2 overpasses based on the passage of 7 target species. The plot represents the first two principal components (PC1 and PC2) and aims to assess the clustering of underpasses and overpasses for the analysis of structure attributes influencing species passage.

Annexe 1. Récapitulatif des captures, du modèle de collier utilisé, de la durée et de la cause de l'arrêt du suivi du chevreuil et du sanglier. En gris, les individus écartés des analyses pour les raisons suivantes : arrêt prématuré du collier, d'imprécision GPS trop importante, euthanasie de l'individu à la capture.

Individus	Sexe	Age	Date de capture	Modèle du collier	Durée de suivi (j)	Cause de la fin du suivi
Chevreuil						
CH001	M	A	06/10/2021	AGOM1	29	Prélevé à la chasse
CH002	M	J	07/10/2021	AGOM1	92	Arrêt du collier
CH003	F	A	23/10/2021	AGOM1	42	Arrêt du collier
CH004	F	J	13/12/2021	AGOM2	8	Mort de cause inconnue (capture ?)
CH005	M	J	03/02/2022	AGOM3	278	Arrêt du collier
CH006a	M	A	28/03/2022	AGOM3	305	Recapture avec remplacement du collier
CH006b	M	A	28/01/2023	AGOM4	153	Mort de cause inconnue
CH007	M	A	12/06/2022	AGOM3	3	Mort de cause inconnue (capture ?)
CH008	F	A	04/07/2022	AGOM3	4	Mort de cause inconnue (capture ?)
CH009	F	A	07/09/2022	AGOM4	111	Pélevé à la chasse
CH010	M	A	07/09/2022	AGOM4	71	Prédaté par des chiens
CH011	F	J	11/10/2022	AGOM4	436	Arrêt du collier
CH012	M	J	21/10/2022	AGOM4	240	Arrêt du collier
CH013	F	A	09/12/2022	AGOM4	202	Mort de cause inconnue
CH014	F	J	10/12/2022	AGOM4	241	Mort de cause inconnue
CH015	F	A	08/01/2023	AGOM4	255	Arrêt du collier
CH016	F	J	10/02/2023	AGOM4	152	Arrêt du collier
CH017	M	A	01/03/2023	AGOM4	235	Prélevé à la chasse
CH018	F	A	14/04/2023	AGOM4	318	En cours
CH019	F	J	01/05/2023	AGOM4	308	En cours
CH020	M	J	06/05/2023	AGOM4	0	Euthanasié (blessures lors de la capture)
CH021	F	J	08/05/2023	AGOM4	300	En cours
CH022	M	J	01/06/2023	AGOM4	123	Mort de cause inconnue
Sanglier						
SA001	M	A	18/07/2021	Followit	2	Perte du collier
SA002	M	A	07/11/2021	AGOM2	30	Arrêt du collier
SA003	M	A	20/12/2021	AGOM2	41	Prélevé à la chasse
SA004	M	J	12/01/2022	AGOM3	7	Perte du collier
SA005	F	A	12/01/2022	AGOM3	38	Arrêt du collier
SA006	M	A	23/02/2022	Followit	145	Prélevé à la chasse
SA007	F	A	09/03/2022	Followit	18	Perte du collier
SA008	F	A	15/03/2022	Followit	243	drop-off activé
SA009	M	A	05/04/2022	Followit	190	Perte du collier
SA010	M	A	17/04/2022	Followit	179	Prélevé à la chasse
SA011	M	A	15/05/2022	Followit	10	Perte du collier
SA012	M	A	16/05/2022	Followit	188	Prélevé à la chasse
SA013	M	A	14/01/2023	Vertex Lite	28	Prélevé à la chasse
SA014	F	J	22/01/2023	Vertex Lite	6	Prélevé à la chasse
SA015	M	A	14/04/2023	Vertex Lite	78	Prélevé à la chasse
SA016	M	A	30/05/2023	Vertex Lite	234	Arrêt du collier
SA017	F	J	05/06/2023	Vertex Lite	239	Arrêt du collier
SA018	M	A	16/11/2023	Vertex Lite	125	En cours
SA019	M	A	22/11/2023	Vertex Lite	119	En cours

Annexe 2 : Dispositifs de capture par cage-piège ou corral.

En complément de la capture par télé-anesthésie, les chevreuils et les sangliers ont été capturés par cage-piège (180 x 120 x 120 cm ; photo du haut) ou corral (enclos de 5m de diamètre ; photo du bas), entre avril 2021 et janvier 2024. Les dispositifs de capture ont été munis de systèmes de surveillance à distance par piège photographique (envoi de photos 24/24h et 7/7j) et de fermeture à distance par aimant (désactivation de l'aimant pour la fermeture) de l'unique porte guillotine. Les corrals ont été équipés d'un distributeur automatique de maïs (agrainoir) tandis que les cages ont été agrainées à la main. Dans le but d'éviter les blessures et de diminuer le stress de l'animal, les dispositifs de piégeage ont été équipés d'une caisse de contention à double portes guillotines dont le fonctionnement est le suivant : lorsque l'animal est pris dans la cage ou le corral, la fermeture du piège entraîne l'ouverture de la première porte de la caisse de contention (système de contrepoids). En pénétrant à l'intérieur de la caisse, l'animal actionne un fil tendu au dernier tiers de la caisse déclenchant alors la fermeture de la seconde porte pour le maintenir à l'intérieur. Cet aménagement nous a permis de contenir l'animal dans un espace restreint sans qu'il puisse se blesser jusqu'à l'arrivée des manipulateurs puis de l'atteindre rapidement pour l'endormir par anesthésie. La capture par cages et corrals aménagés n'a pas porté atteinte à l'intégrité physique des individus de façon irrémédiable, provoquant dans certains cas des blessures superficielles.



Annexe 3 : Traversée de l'autoroute A34 par un chevreuil en dispersion.

Parmi les quatre chevreuils dispersants, le chevreuil CH005 a été capturé à l'ouest de l'autoroute et a été le seul à franchir nettement l'autoroute pour s'établir sur un primo (ou nouveau) territoire, à l'est de l'infrastructure. Il a ainsi parcouru 30 km (distance euclidienne) sur trois jours et a traversé à trois reprises l'autoroute. Cependant, lors de son déplacement de dispersion, sa position a été enregistrée une fois par heure, laissant supposer des franchissements dans deux zones différentes de l'autoroute via des ouvrages d'art de nature différente : (1) un pont-cadre situé sur une route départementale à proximité de la commune de Saulces-Monclin. L'individu aurait franchi une deuxième fois en sens inverse cet ouvrage après avoir vraisemblablement fait demi-tour à l'approche de l'aire de repos de l'autoroute ; (2) un pont sur une route départementale proche de la commune de Villers-le-Tourneur.

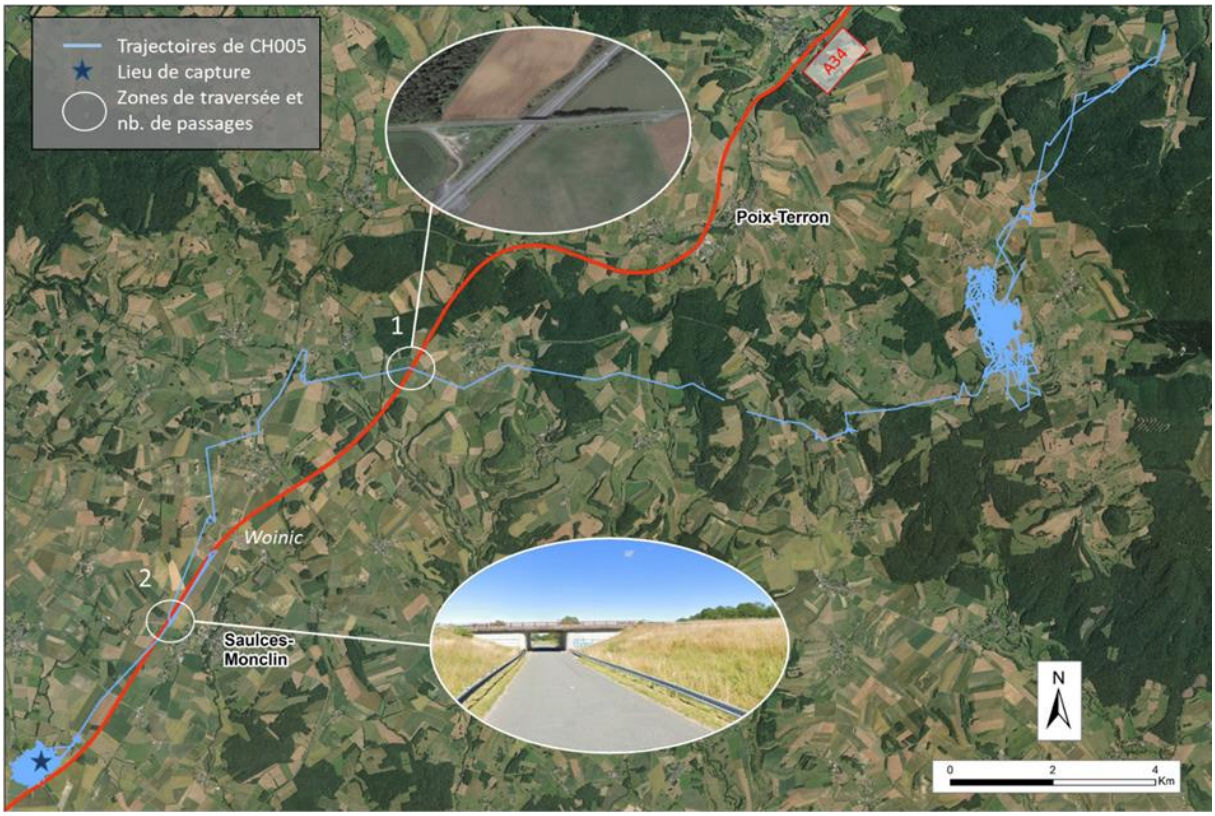


TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Fragmentation d'un habitat (en vert) selon deux processus à ne pas confondre : la perte d'habitat et la fragmentation *per se*, d'après (Clauzel 2022). 14

Figure 2 : Schéma théorique des continuités écologiques prises en compte par la TVB (©UMS PatriNat). ... 17

Figure 3 : Fragmentation du paysage européen par pays en 2009, extrait de (Joint EEA-FOEN 2011)..... 19

Figure 4 : Les effets directs (1,2) et indirects (3 à 5) d'une route sur la faune sauvage, extrait de (Huijser et al. 2021). 21

Figure 5 : Approche méthodologique pour la réalisation des modèles de connectivité. Intégration des résultats du travail de thèse en rouge. DIR : Direction Interdépartementale des Routes ; IGN : Institut national de l'information géographique et forestière ; MAJIC : Mise À Jour des Informations Cadastrales ; MNT : Modèle Numérique de Terrain ; NDVI : Normalized Difference Vegetation Index ; OSO : Occupation des Sols ; RPG : Registre Parcellaire Graphique (Source : Julian Pichenot - Cerema)..... 29

Figure 6 : Site d'étude sur le territoire de l'ex-région Champagne-Ardenne où quatre ILTs coupent deux corridors d'intérêt interrégionales et nationales (SRCE de Champagne-Ardenne). Canal 08 : Canal des Ardennes. 31

Figure 7 : (a) Cerf élaphe, (b) Chevreuil européen et (c) Sanglier. 32

Figure 8 : Study area and location of the crossing structures along the section of the A34 highway in northeastern France. 63

Figure 9 : Frequency of detection days (FDD) for all 16 mammals species at the three types of crossing structures studied along the A34 highway in France. Overpasses (n=2) are indicated for reference. Bold bars represent median values. Ns = non-significant (p>0.05). 70

Figure 10 : Diversity index of mammal species detected in the three types of structures studied along the A34 highway, France. Overpasses (n=2) are indicated for reference. Bold bars represent median values. (*p<0.05)...70

Figure 11: Species richness recorded at each of the 29 monitored structures along the A34 highway, France.70

Figure 12 : Location of "non culvert" structures used by ungulate species (Red deer, roe deer and wild boar) along the A34 highway, France. Roe deer were detected in 12 structures; wild boar in only two contiguous underpasses (a and b), including (a) one with a blackout screen; red deer on an overpass (c) and in an underpass (d). 72

Figure 13 : Localisation de la zone d'étude dans le département des Ardennes, au Nord-Est de la France. Dans chaque site considéré, la proximité à l'autoroute A34 a été étudiée pour son effet sur le déplacement du chevreuil et du sanglier, en comparaison de celle au réseau routier secondaire. 87

Figure 14 : Cadre théorique représentant la conservation du premier point (gris foncé) de la phase d'inactivité estimée (amas de points gris clairs) dans le sous-trajet de déplacement (points et segments noirs). L'animal étant théoriquement immobile, sa localisation n'a pas bougé et peut être reliée directement au point actif suivant la phase d'inactivité afin de garder une continuité dans son déplacement. Les points inactifs ne sont pas pris en compte dans les mesures et la classification des évènements de rencontre. 95

Figure 15 : Schéma de la mesure de l'amplitude projetée d'un évènement de rencontre. Les points et les segments noirs correspondent respectivement aux localisations GPS et aux trajectoires. Les points et les segments discontinus gris correspondent respectivement aux localisations GPS et aux trajectoires exclues de l'analyse. 96

Figure 16 : Schéma théorique illustrant deux cas de déplacements que discrimine le paramètre R2 : (a) un animal longe activement l'ILT, la suivant de manière contrainte, et (b) un animal longe de manière passive l'ILT, son déplacement étant alors principalement lié à une utilisation intensive de l'habitat, sans lien direct avec l'ILT. 97

Figure 17 : Evénements de rencontre théoriques utilisés pour définir les quatre comportements aux ILTs : traverse, longe, longe puis traverse, demi-tour. Les points noirs et les lignes représentent respectivement les localisations GPS et les trajectoires. 98

Figure 18 : Distance estimée fixant la largeur de la zone d'influence des ILTs (A34 et routes) chez le chevreuil. Elle correspond au seuil à partir duquel le nombre de quick cross diminue (barre surlignée en jaune)..... 102

Figure 19 : Distance estimée fixant la largeur de la zone d'influence des ILTs (A34 et routes) chez le sanglier. Elle correspond au seuil à partir duquel l'augmentation du nombre de quick cross se stabilise autour de 1,5% (barre surlignée en jaune). 103

Figure 20 : Vitesse des chevreuils selon la proximité aux ILTs et hors zone d'influence des ILTs (***p<0,001, ****p<0,0001) 104

Figure 21 : Paramètres de déplacement des événements de rencontre des chevreuils à proximité directe des ILTs ayant une influence négative relative sur le déplacement des ongulés (*p<0,05, **p<0,01)..... 104

Figure 22 : Vitesse des sangliers selon la proximité aux ILTs et hors zone d'influence des ILTs (*p<0,05, ****p<0,0005). Pour une meilleure lecture, les valeurs aberrantes ont été retirées du graphique..... 105

Figure 23 : Paramètres de déplacement des événements de rencontre des sangliers à proximité directe des ILTs ayant une influence négative relative sur le déplacement des ongulés (*p<0,05, **p<0,005). 106

Figure 24 : Variabilité individuelle des comportements de déplacement des chevreuils face aux ILTs considérées dans le département des Ardennes, France, entre septembre 2022 et mars 2024. Les points noirs représentent la fréquence du type d'événement de rencontre exprimé par individu parmi les classes de comportements. Les barres noires indiquent l'écart-type du pourcentage total du type de comportement aux abords des ILTs pour l'ensemble des individus l'ayant exprimé, soit 0 et 6 individus respectivement pour les traversées de l'autoroute A34 et des routes ; 0 et 3 individus pour "longe puis traverse" respectivement à l'autoroute et aux routes ; 10 et 5 individus longeant respectivement l'autoroute et les routes ; 12 et 8 individus pour les demi-tour respectivement à l'autoroute et aux routes ; 11 individus pour les comportements non-classés aux abords des deux ILTs..... 107

Figure 25 : Variabilité individuelle des comportements de déplacement des sangliers face aux ILTs considérées dans le département des Ardennes (France), entre février 2022 et mars 2024. Les points noirs représentent la fréquence du type d'événement de rencontre exprimé par individu parmi les classes de comportements identifiées aux ILTs. Les barres noires indiquent l'écart-type du pourcentage total du type de comportement aux abords des ILTs pour l'ensemble des individus l'ayant exprimé, soit 0 et 10 individus respectivement pour les traversées de l'autoroute A34 et des routes ; 0 et 4 individus pour "longe puis traverse" respectivement à l'autoroute et aux routes ; soit 6 et 9 individus longeant respectivement l'autoroute et les routes ; 8 et 10 individus

pour les demi-tour respectivement à l'autoroute et aux routes ; 8 et 10 individus respectivement pour les comportements non-classés aux abords de l'autoroute et des routes. 108

Figure 26 : Analyse de co-inertie de l'effet des habitats sur les réponses du chevreuil à l'autoroute A34, dans le département des Ardennes (France), entre septembre 2022 et mars 2024. En bleu figurent les habitats dans la zone d'influence de l'autoroute et en jaune, la réaction des chevreuils à la proximité de l'autoroute. 109

Figure 27 : (a) Suivis des déplacements de quatre individus dispersants lors de l'évaluation de l'effet de proximité à l'autoroute A34 sur le déplacement des chevreuils. Les points et les traits d'une même couleur représentent respectivement les localisations GPS et les trajectoires d'un individu. Distance euclidienne du déplacement de dispersion des quatre individus : CH005 (mâle) sur 30km, CH011 (femelle) sur 10km, CH013 (femelle) sur 4km et CH022 (mâle) sur 10km. (b et c) Trajectoires lors du mouvement de dispersion (en fushia) des individus ayant longé l'autoroute, s'approchant près d'ouvrages de franchissement potentiels à plusieurs occasions..... 111

Figure 28 : Modélisation de l'impact de l'autoroute A34 sur la continuité écologique bocagère d'importance nationale inspirée de la cartographie actualisée de la TVB en région Grand Est (Source : DataGrandEst, DREAL Grand Est, Région Grand Est, AERM, AESN, AERMC)..... 126

Figure 29 : Emplacement suggéré pour l'installation d'un écopont favorisant la préservation d'une continuité forestière dans le département des Ardennes, France. La ligne rouge représente l'autoroute A34..... 129

TABLE DES TABLEAUX

Table 1: Dimensions of the three types of structures studied, their sample size, and their main function. . 64

Table 2 : Name, definition, and characteristics of explanatory variables for the analysis of non-WCS use (n=29) by terrestrial mammals in northeastern France. 66

Table 3 : Percentage of average frequency of detection days (FDD) for the 16 species/taxa detected in each type of structure, its minimum (Min) and Maximum (Max) values, and the number of structures used (nbSU). 69

Table 4 : Spearman rank correlation coefficients (rs) with their probability value (p) between the frequency of detected days of species using culverts (n=13) and "non culvert" structures (n=16) and explanatory variables. 73

Tableau 1: Caractéristiques des colliers GPS en fonction du modèle et de l'espèce. CH : chevreuil ; SA : sanglier. 89

Tableau 2 : Récapitulatif des suivis (horaires et fins) des chevreuils. 101

Tableau 3 : Récapitulatif des suivis (horaires et fins) des sangliers. 102

Impact des infrastructures linéaires de transport sur la connectivité écologique pour les Mammifères terrestres par une approche fonctionnelle

La fragmentation du paysage induite par les infrastructures linéaires de transport (ILTs) altère généralement la connectivité fonctionnelle, en limitant les déplacements et les flux de gènes, essentiels à la persistance des populations. Toutefois, l'ampleur de cet impact varie selon le type d'infrastructure et les espèces considérées. Cette étude a évalué les effets d'une autoroute et d'un canal sur la connectivité fonctionnelle réelle de trois espèces d'ongulés dans les Ardennes, en France. Une approche intégrative a été utilisée, combinant génétique du paysage, suivis GPS et surveillance par pièges-photographiques. Les analyses génétiques ont révélé un effet barrière de l'autoroute pour le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*), plus modéré pour le Sanglier (*Sus scrofa*) et inexistant pour le Chevreuil européen (*Capreolus capreolus*). En revanche, le canal n'a eu aucun effet significatif sur la connectivité génétique des espèces considérées. Le suivi photographique de 29 ouvrages non dédiés à la faune a montré qu'ils peuvent faciliter le déplacement d'une large gamme d'espèces de petits et moyens mammifères terrestres, bien que leur fréquentation varie selon les espèces. Les chevreuils utilisent plusieurs ouvrages (n=12), à l'inverse du cerf et du sanglier (n=2). Le suivi GPS de 14 chevreuils et 10 sangliers a confirmé qu'ils n'évitaient pas les abords de l'autoroute, mais que celle-ci façonnait profondément leurs déplacements en limitant les traversées. Ces travaux soulignent l'importance de s'appuyer sur des données empiriques multiples pour évaluer la connectivité et orienter plus efficacement les actions de conservation dans le cadre des politiques d'aménagement du territoire.

Mots-clés en français : Connectivité fonctionnelle − Ongulés − Mammifères terrestres − Génétique du paysage − Suivi GPS − Autoroute − Déplacements − Comportement

Impact of linear transportation infrastructure on ecological connectivity for terrestrial Mammals using a functional approach

Landscape fragmentation caused by linear transport infrastructures (LTIs) generally disrupts functional connectivity by limiting animal movements and gene flow, processes that are essential to the persistence of populations. However, the extent of this impact varies depending on the type of infrastructure and the species involved. This study assessed the effects of a highway and a navigation canal on the actual functional connectivity of three ungulate species in the Ardennes region of France. An integrative approach was used, combining landscape genetics, GPS tracking, and camera trap monitoring. Genetic analyses revealed a barrier effect of the highway for red deer (*Cervus elaphus*), a moderate effect for wild boar (*Sus scrofa*), and no detectable impact for roe deer (*Capreolus capreolus*). In contrast, the canal had no significant effect on gene flow for any of the studied species. Camera monitoring of 29 non-wildlife crossing structures showed that they can facilitate movement for a wide range of small- and medium-sized terrestrial mammals, though their effectiveness varies by species. Roe deer use several structures (n=12), unlike red deer and wild boar (n=2). GPS tracking of 14 roe deers and 10 wild boars confirmed that the animals did not avoid the vicinity of the highway, but that it significantly shaped their movement patterns by limiting crossings. This research highlights the importance of using multiple empirical data sources to assess connectivity and more effectively guide conservation actions within a spatial planning policy framework.

Mots-clés en anglais : Functional connectivity − Ungulates − Terrestrial mammals − Landscape genetics − GPS tracking − Highway − Movements − Behavior

Discipline : PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Spécialité : Eco-éthologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

SEBIO - UMR-I 02