

Maxime ZUCCA et Camille MEUNIER
Natureparif

90-92 avenue du Général Leclerc
93500 PANTIN
Tél.: 01 83 65 40 19

E-mail: maxime.zucca@natureparif.fr
camille.meunier@espaces-naturels.fr

natureparif

Agence régionale pour
la nature et la biodiversité

 **île de France**

De l'ADN pour l'inventaire des mares

RÉSUMÉ

Le plus souvent, c'est par l'observation directe que l'on relève la présence d'une espèce et que l'on évalue la taille de sa population. Mais pour des espèces discrètes, d'autres techniques indirectes peuvent être employées. Ainsi, pour les chauves-souris, l'enregistrement acoustique apporte des informations que ne fournit pas l'observation directe en vol ; la pose d'appareils photographiques à déclenchement automatique permet de détecter les mammifères les plus discrets.

Une autre technique possible est l'étude de l'ADN relâché dans le milieu par les êtres vivants - via leur déjections -, appelé ADN environnemental et nommé ADNe dans la suite de cet article (POMPANON et al. 2011 [9]). Cette méthode innovante permet, en particulier, de détecter efficacement les espèces discrètes et/ou difficiles à identifier dans des habitats restreints comme les mares et sans perturber le milieu en limitant certains biais liés aux observateurs.

INTRODUCTION

Les organismes vivants relâchent en permanence de l'ADN dans le milieu environnant, que l'on retrouve dans leurs sécrétions, leurs déjections, les mues, les cellules mortes, les fragments d'œufs... Cet ADN, désormais extérieur à l'organisme vivant, est appelé ADN environnemental, ou ADNe. Il peut également faire l'objet d'un séquençage, permettant de savoir de quelle espèce il provient. Pour cela, un fragment du brin d'ADN, correspondant à une partie du gène codant pour la cytochrome oxydase 1 et défini comme fragment de référence pour identifier les espèces animales (POMPANON et al. 2011), est analysé comme un «code-barre» (barcoding en anglais). Les étendues d'eau stagnantes - et notamment les mares - constituent un habitat idéal pour procéder à ce genre d'expérimentation: les brins d'ADN n'y circulent pas comme dans l'eau courante et le fluide permet de les récolter aisément. Ils se conservent entre 1

et 25 jours dans l'eau, selon les conditions de température, d'acidité ou d'exposition au soleil (JEAN 2013 [7]).

La première étude réalisée en France à partir de barcoding d'ADNe a porté sur la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), une espèce exotique envahissante (FICETOLA et al. 2008 [4]). Après évaluation de la distribution de l'espèce en France, 9 sites très bien suivis et accueillant des densités différentes de l'espèce ont été choisis: 3 plans d'eau où la Grenouille taureau était présente en forte densité (des douzaines d'individus adultes et des centaines de têtards observés), 3 où elle était présente en faible densité (un ou deux individus adultes observés, pas de reproduction) et 3 où elle était absente. Trois prélèvements d'eau ont été réalisés sur chacun de ces 9 sites et les analyses d'ADN effectuées en laboratoire ont montré une adéquation avec les

résultats issus des inventaires classiques. Cette étude a permis une validation de la méthode ADNe pour la détection de la Grenouille taureau, même lorsque celle-ci était présente en faible densité.

Sur cette même espèce, une autre étude a montré que la méthode ADNe semblait plus performante que des méthodes d'inventaire d'amphibiens classiques, en termes de sensibilité et d'effort d'échantillonnage (DEJEAN *et al.* 2012 [2]). En effet, à l'aide d'analyses ADNe, sur 49 sites étudiés, 38 se sont révélés positifs à la présence de la Grenouille taureau, contre 7 d'après les inventaires courants diurnes et nocturnes. Les résultats

issus de l'approche ADNe ont été confirmés par la suite, à l'aide d'un effort d'échantillonnage plus important.

En 2013, le bureau d'études Ecosphère a comparé les relevés issus d'observations d'amphibiens aux résultats d'analyses d'ADN environnemental sur 40 mares de la Vienne et la Haute-Vienne: 90% des espèces connues historiquement sont détectées par l'ADN environnemental, contre 60% avec les protocoles d'observations classiques (nécessitant plus de passages, dont certains de nuit). De plus, des espèces non connues ont été trouvées grâce à la méthode ADNe (ACQUEBERGE 2013 [1]).

UNE EXPÉRIMENTATION SUR 100 MARES EN ÎLE-DE-FRANCE

Natureparif - Agence régionale pour la nature et la biodiversité en Île-de-France - a, entre autres, pour mission d'améliorer la connaissance de la biodiversité régionale. Dans ce cadre, l'agence a également pour rôle de contribuer au développement d'outils d'inventaire novateurs fiables pour les diffuser ensuite aux acteurs du territoire.

Un protocole simple à mettre en œuvre

Le protocole d'échantillonnage mis en œuvre dans la présente étude est simple. À l'aide d'un tube attaché à l'extrémité d'une perche, 20 échantillons d'eau sont prélevés dans chaque mare afin d'en couvrir l'ensemble de l'étendue, avant d'être mélangés puis ajoutés à une solution d'éthanol et d'acétate de sodium permettant la conservation de l'ADN.

Le matériel (tube et perche) est changé entre chaque mare, et le préleveur ne pénètre pas dans l'eau, afin d'empêcher toute contamination éventuelle d'ADN extérieur au milieu, ainsi que de champignons pathogènes, telles que la chytridiomycose. L'ADN est ensuite conservé à basse température, dans un réfrigérateur. Ce protocole est cependant en cours d'évolution, afin d'ac-

Les sites étudiés

Cent mares ont ainsi fait l'objet de prélèvements d'échantillons d'eau, au cours des mois d'avril et mai 2013 (dont 5 dans le département de Seine-Saint-Denis), et les analyses ont porté sur les groupes des amphibiens, des poissons, des odonates et des mammifères. Un second passage a été effectué en juillet et août sur 15 mares (dont 2 dans le département de Seine-Saint-Denis), en ciblant particulièrement les odonates. Les

L'approche multi-spécifique de l'ADN environnemental étant un outil nouveau et intéressant, Natureparif a souhaité participer aux premiers tests grandeur nature, dans le cadre d'un partenariat recherche et développement avec le laboratoire Spygen.

croître la quantité d'ADN prélevé (DEJEAN, com. Pers.) En laboratoire, l'analyse des échantillons fait intervenir la technique du «metabarcoding»: un couple d'amorces (le code-barre) caractéristique d'un groupe taxonomique recherché, les amphibiens par exemple, permet d'amplifier par PCR le fragment cible des brins d'ADN. Les séquences d'ADN sont ensuite comparées à des bases de données de référence, ce qui permet une identification à l'espèce dès lors que celle-ci possède une séquence référencée. Signalons cependant que l'ADN analysé provient des mitochondries: il s'agit donc uniquement de l'ADN maternel. Cela ne permet donc pas d'identifier les hybrides (ex. Triton de Blasius) et de différencier les kleptons (ex. Grenouille verte).

mares ont été sélectionnées de manière à couvrir l'ensemble de la région et des grands milieux, en privilégiant les mares pour lesquelles nous disposons déjà de connaissances pour au moins un des groupes taxonomiques ciblés. En tout, 21 mares ont été parcourues en milieu urbain, 52 dans les milieux ouverts agricoles et semi-naturels et 29 en milieu forestier. Au printemps 2014, seules 6 mares ont fait l'objet d'échan-

tillonnage, mais à quatre reprises : en avril, mai, juin et juillet, afin d'étudier la variabilité de la détection des espèces d'amphibiens en fonction de la période de prélèvement. Dans cet article, nous ne mentionnerons que les résultats concernant les amphibiens et les poissons.

Les données de mammifères sont très faibles et ne se prêtent pas à des analyses. Les données d'odonates sont encore dans l'attente de la récolte de tissus de toutes les espèces de la zone considérée, pour finaliser la banque de gènes de ce groupe taxonomique.

RÉSULTATS

Les amphibiens

Des biais liés à la période et à la qualité de la banque de gènes de référence

La comparaison entre inventaires classiques et relevés d'ADN environnemental ayant déjà été réalisée pour les amphibiens par l'étude d'Ecosphère (ACQUEBERGE 2013 [1]), nous n'avons pas focalisé notre attention sur cette problématique. Cependant, les amphibiens observés lors des prélèvements ont systématiquement été notés et les données historiques existantes ont fait l'objet de comparaison avec les résultats des analyses ADN. Globalement, la méthode ADN environnemental permet une meilleure détection des espèces, mais deux exceptions notables ont été mises en évidence en 2013 :

- le groupe pelophylax, des grenouilles vertes, était particulièrement sous-détecté : pour cette espèce, les prélèvements semblent avoir eu lieu trop tôt (avril et début mai),
- le Triton alpestre n'a été détecté dans aucune mare, alors qu'il figurait régulièrement dans les relevés de terrain.

Pour ce dernier, il est apparu que l'absence de détection provenait de la nature de l'amorce ADN utilisée

par Spygen pour le détecter. Le Triton alpestre est une espèce dont la répartition française se situe principalement à l'est d'une diagonale Bretagne / Alpes-Maritimes. Elle est absente dans le sud et le sud-ouest du pays. Il existe cependant une population isolée près de Montpellier et c'est au sein de cette population que l'amorce utilisée dans la banque de gènes a été prélevée, dans le cadre d'une collaboration entre Spygen et le CEFE de Montpellier. D'autres amorces d'ADN de triton alpestre, provenant de populations de l'est de la France, ont alors été utilisées, permettant cette fois de détecter l'espèce dans une mare située en forêt de Ferrière, où le Triton alpestre est connu. Cela suggère que la population de Montpellier est fortement différenciée génétiquement. Cette problématique se pose également pour de nombreuses populations de poissons, relativement isolées dans des bassins versants. Il apparaît dès lors important d'utiliser, pour une même espèce, des amorces ADN provenant de tissus prélevés dans différentes régions.

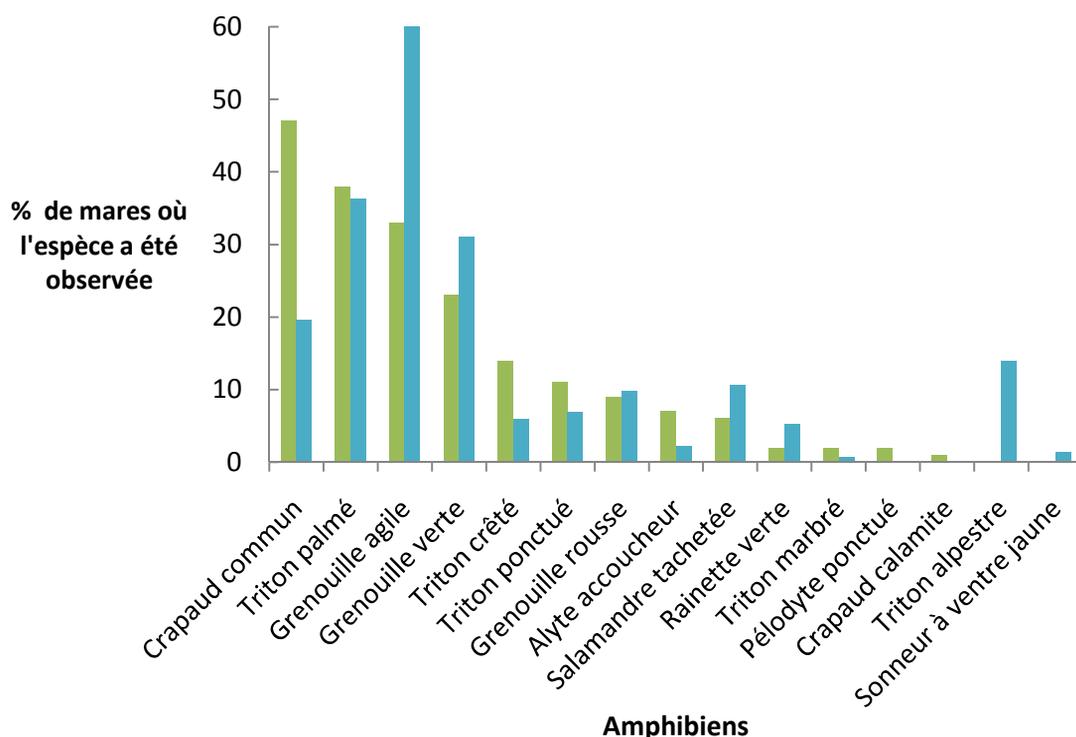
Fréquence d'observation des espèces

Sur les 100 mares échantillonnées en 2013, 92 accueillent au moins une espèce d'amphibien. En moyenne, les mares accueillent 2 espèces, et jusqu'à 5 espèces pour 4 d'entre elles. Lors de la deuxième étude, en 2014, pas moins de 10 espèces ont été détectées dans une mare de la forêt de Ferrières!

Le pourcentage de mares accueillant les différentes espèces est présenté dans la figure 1. Celui-ci est comparé aux pourcentages d'amphibiens détectés lors d'observations directes, sur un échantillon de 460 mares sorti de la base de données de la Société nationale de

protection de la nature (SNPN). On relève notamment que le Crapaud commun est nettement plus détecté en proportion que lors des inventaires de mares classiques en région, ce qui s'explique probablement par une sous-détection de l'espèce lors des inventaires naturalistes. La différence de proportion concernant la Grenouille agile s'explique par un plus grand pourcentage de mares forestières dans la base de données de la SNPN (près de 70%, contre 30% dans notre étude). Enfin, l'absence de détection du Triton alpestre par l'ADNe lors de ce premier test est expliquée plus haut.

FIGURE 1 : COMPARAISON ENTRE LE POURCENTAGE DE MARES AU SEIN DESQUELLES CHAQUE ESPÈCE D'AMPHIBIEN A ÉTÉ TROUVÉE :



1) En vert : grâce à l'étude ADN environnemental portant sur 100 mares réparties dans toute la région.

2) En bleu : d'après la base de données de la SNPN basée sur les observations batrachologiques réalisées sur 460 mares de la région.

Phénologie de détection

Les prélèvements effectués au printemps 2014 indiquent que ceux réalisés au mois de mai permettent de détecter 95% des espèces (voir tableau 1). En avril, environ 80% des espèces sont détectées: la Rainette verte, l'Alyte accoucheur et les Grenouilles vertes ne sont pas ou peu détectées. De même, en juin, 75% des espèces sont identifiées par les relevés: l'ADNe des espèces précoces, cette

fois, n'est plus présent dans l'eau à cette période. Il s'agit en particulier de la Salamandre tachetée, du Crapaud commun et de la Grenouille rousse. En juillet, à peine plus de la moitié des espèces est détectée dans les 6 mares. La période optimale pour effectuer les prélèvements s'avère être, en Île-de-France, le mois de mai.

	Total sites de présence	Avril	Mai	Juin	Juillet
Alyte accoucheur	2	0	2	2	2
Crapaud commun	4	4	3	1	0
Crapaud calamite	1	1	1	1	1
Pélodyte ponctué	1	1	1	1	0
Rainette verte	3	1	3	2	1
Grenouille verte	4	2	4	3	4
Grenouille agile	5	5	5	5	3
Grenouille rousse	1	1	1	0	0
Salamandre tachetée	2	2	2	0	1
Triton alpestre	3	3	3	3	3
Triton palmé	6	6	6	5	5
Triton ponctué	3	2	2	2	1
Triton crêté	4	4	4	4	3
Triton marbré	1	1	1	1	1
TOTAL espèces-sites	40	33	38	30	25

Tableau 1 : résultats des prélèvements mensuels effectués sur 6 mares franciliennes au printemps 2014. La première colonne indique le nombre de mares, parmi les 6, au sein desquelles l'espèce a été détectée au moins une fois au cours des 4 mois (le Triton palmé a ainsi été trouvé sur les 6 mares). Les colonnes suivantes détaillent la phénologie de détection par mois.

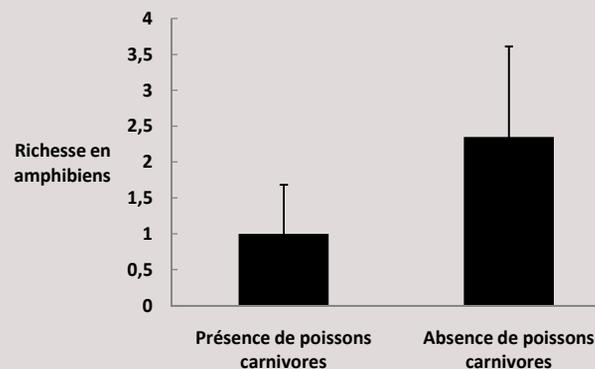
mauvais goût. Les têtards de Grenouille rieuse développent également des défenses morphologiques leur permettant de réduire la prédation par les poissons (TEPLITSKY *et al.* 2013 [10]).

Si l'on considère toutes les espèces de poissons présentes dans les mares, leur simple présence n'impacte pas de manière significative la richesse en amphibiens (test de Wilcoxon non significatif), qui reste autour de 2 par mare.

Il convient cependant de s'intéresser plus particulièrement à la présence de poissons carnivores, susceptibles de prédater les œufs ou les larves d'amphibiens (HECNAR et M'CLOSKEY 1997 [5]). En tout, 18 mares sur les 100 accueillent des poissons carnivores.

En se basant sur les données de l'inventaire, on trouve nettement moins d'amphibiens (test de Wilcoxon significatif, $p=0.0002$) dans les mares à poissons dans lesquelles se trouvent des espèces carnivores (1.0 ± 0.16 espèces) que dans celles sans espèces carnivores (2.5 ± 0.27 espèces) (voir figure 3). Seul le Crapaud commun semble bénéficier de la présence de poissons carnivores: il est présent en plus grande proportion dans les mares où ils se trouvent, ce qui s'explique probablement par une compétition moindre pour les ressources avec les autres amphibiens. Notre échantillon suggère donc qu'environ

FIGURE 3 : IMPACT SIGNIFICATIF DE LA PRÉSENCE OU DE LA NON-PRÉSENCE DE POISSONS CARNIVORES SUR LA RICHESSE EN AMPHIBIENS.



ron 20% des mares franciliennes sont défavorables à la présence d'amphibiens du fait de la présence de poissons carnivores.

Enfin, la présence du groupe des «poissons exogènes» (au moins une espèce exogène présente dans 27 mares) n'impacte pas davantage la richesse spécifique en amphibiens que celle des «poissons indigènes».

Et en Seine-Saint-Denis ?

Quatre mares et un marais ont fait l'objet de prélèvements en Seine-Saint-Denis en avril/mai 2013. Le marais est celui du Sausset et nous avons choisi de le maintenir dans cette étude, bien que le préleveur chargé de ce secteur n'ait pas respecté la consigne de ne cibler que des mares.

Le Marais du Sausset

Sur ce marais, aucun amphibien n'a été détecté. Au contraire, 7 espèces de poissons au moins fréquentent le marais, dont un carnivore. Il s'agit de la Bouvière, du Gardon, du Rotengle, du Goujon, de la Perche soleil, de la Carpe commune et du Poisson chat. Concernant les mammifères, l'ADN du Lapin de garenne a été retrouvé au marais du Sausset.

Les 4 mares de Seine-Saint-Denis

Mare à Julie, Parc du Sausset

Deux espèces d'amphibiens sont présentes: le Triton ponctué et le Triton palmé. Aucun poisson n'est présent.

Mare aux Tritons, Bois de Bernouille

Quatre espèces d'amphibiens détectées et aucun poisson: la Grenouille «verte», la Grenouille agile, le Triton palmé et le Triton crêté.

Mare du parc des Coteaux d'Avron

Deux espèces d'amphibiens - l'Alyte accoucheur et le Crapaud commun - sont présents sur le site, et aucun poisson.

Mare du parc des Beaumonts

Seul le Crapaud commun a été détecté par les inventaires d'ADN environnemental, alors qu'il semble que d'autres espèces soient connues sur le site. De même, aucun poisson n'a été trouvé. Il est probable que pour cette mare, un problème de conservation de l'échantillon ait conduit à la dégradation d'une partie de l'ADN, problème constaté pour quelques sites lors de la première phase de notre étude.

Aucun mammifère sauvage n'a été détecté sur l'ensemble des mares. Sur les 4 sites recensés en Seine-Saint-Denis, le nombre d'amphibiens observés est légèrement supé-

rieur à la moyenne régionale (2,5 contre 2 à l'échelle des 100 mares étudiées en Île-de-France).

CONCLUSION

Les deux méthodes d'inventaire, classique ou par ADN, sont complémentaires. Lorsque les prélèvements sont effectués à la bonne période, la méthode de l'ADN environnemental permet de détecter plus d'espèces, de manière standardisée et sans biais lié à l'observateur, avec un impact minimal sur le milieu. Elle est donc particulièrement efficace pour la surveillance d'espèces rares, menacées ou patrimoniales, mais aussi pour suivre le développement ou l'apparition d'espèces exotiques, telles que le Xénope et la Grenouille taureau. Elle permet également d'échantillonner plusieurs groupes taxonomiques à la fois, avec un effort d'échantillonnage relativement faible. En revanche, la méthode de l'ADN environnemental ne permet pour l'instant pas de quantifier les populations. L'abondance relative du nombre de fragments d'ADN donne une indication, mais celle-ci peut être fortement biaisée par la récolte d'un sous-échantillon d'eau au milieu, par exemple d'un jet d'urine. L'ADN de l'espèce considérée sera présent en grand nombre dans l'échantillon, sans que cela ne signifie pour autant qu'elle est abondante dans le milieu. Cette méthode peut donc difficilement servir d'outil de suivi de l'abondance des amphibiens à grande

échelle, comme le permettent des programmes tels que le STOC (Suivi temporel des oiseaux communs) pour les oiseaux.

De même, il n'est pas possible de connaître les caractéristiques démographiques d'une population grâce à cette méthode, qui ne permet pas de déterminer l'âge et le sexe. La méthode par ADN environnemental est donc particulièrement intéressante en amont, lorsqu'il s'agit de rechercher les mares occupées par les différentes espèces. Il est ensuite nécessaire d'employer d'autres protocoles de terrain pour avoir une meilleure connaissance de l'état des populations.

Notons enfin que le coût de cette méthode par ADN environnemental est équivalent à celui des inventaires courants. Ainsi, par rapport aux trois jours de travail nécessaires pour effectuer le protocole classique de dénombrement des amphibiens sur 6 mares (deux passages diurnes et un passage nocturne), coûtant entre 1500 et 2000 euros, l'échantillonnage des 6 mêmes mares par l'ADN environnemental ne « coûtera » qu'une « journée-homme » non expert (300-400 euros). L'analyse des 6 échantillons d'eau, à 270 euros pièce, reviendra à 1620 euros.

BIBLIOGRAPHIE

[1] ACQUEBERGE M. (2013). *Comparaison des techniques d'inventaires des amphibiens: méthodes classiques et Environmental DNA Metabarcoding. Application sur un projet de ligne à grande vitesse*, mémoire de master expertise faune-flore, MNHN/Ecosphère.

[2] DEJEAN T., VALENTINI A., MIQUEL C., TABERLET P., BELLEMAIN E., MIAUD C. (2012). «Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*», *Journal of Applied Ecology*, 49, p.953-959.

[3] DUGUET R., MELKI F. (2013). *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*, Mèze: Éditions Biotope (Collection Parthénope).

[4] FICETOLA G.F., MIAUD C., POMPANON F., TABERLET P. (2008). «Species detection using environmental DNA from water samples», *Biology Letters*, 4, p.423-425.

[5] HECNAR S.J., M'CLOSKEY R.T. (1997). «The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution», *Biological Conservation*, 79, p.123-131.

[6] KEITH P., PERSAT H., FEUNTEUN E., ALLARDI J. (2011). *Les poisons d'eau douce de France*, Mèze: Éditions Biotope, Paris: Muséum national d'Histoire naturelle.

[7] JEAN P. (2013). *La détection des espèces par l'ADN environnemental: vers un nouvel outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants*, mémoire de master «sciences des sociétés et de leur environnement», Université Lyon 2.

[8] JELIAZKOV A., CHIRON F., GARNIER J., BESNARD A., SILVESTRE M., JIGUET, F. (2014). «Level-dependence of the relationships between amphibian biodiversity and environment in pond systems within an intensive agricultural landscape», *Hydrobiologia*, 723, p.7-23.

[9] POMPANON F., COISSAC E., TABERLET P. (2011). «Metabarcoding: une nouvelle façon d'analyser la biodiversité», *Biofutur*, vol. 319, p.30-32.

[10] TEPLITSKY C., PLENET S., JOLY P. (2003). «Tadpoles' responses to risk of fish introduction», *Oecologia*, 134, p.270-277.