

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*  
Spécialité : Ecologie, évolution

Par

**Nadège BÉLOUARD**

**Coexistence d'espèces dans des habitats discontinus. Le cas  
d'espèces natives et invasives dans des réseaux de mares**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13 décembre 2018

Unité de recherche : UMR CNRS 6553 ECOBIO, UMR INRA Ecologie et Santé des Ecosystèmes

## Rapporteurs avant soutenance :

Stéphanie MANEL	Directrice d'études EPHE, UMR CNRS 5175 CEFE, Université Montpellier II
Gentile Francesco FICETOLA	Chargé de recherches, Department of Environmental Science and Policy, Università degli Studi di Milano

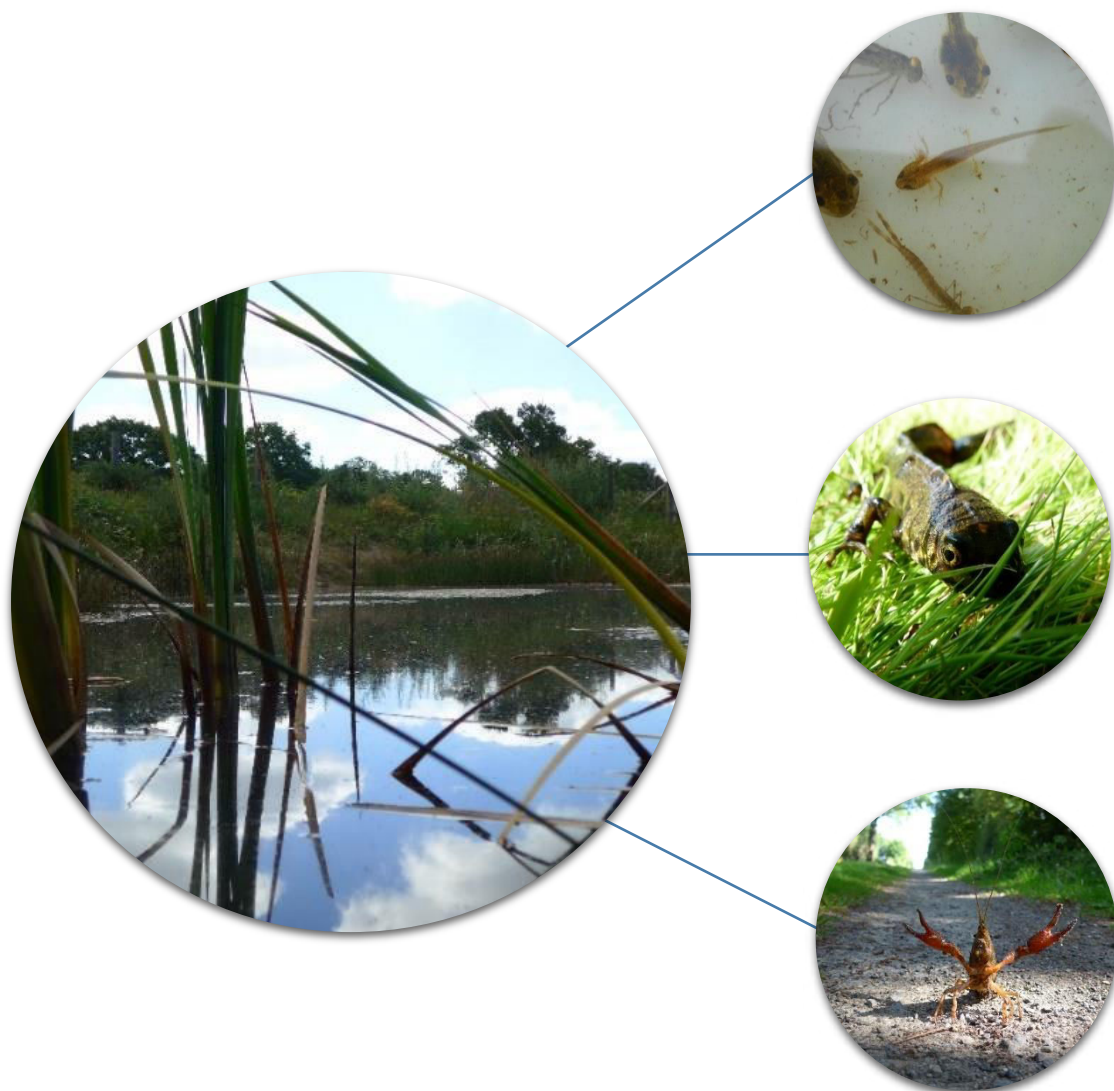
## Composition du Jury :

Pierre JOLY	Professeur des universités, UMR CNRS 5023 LEHNA, Université de Lyon 1, Président du Jury
Françoise BUREL	Directrice de recherche, UMR CNRS 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1
Stéphanie MANEL	Directrice d'études EPHE, UMR CNRS 5175 CEFE, Université Montpellier II
Gentile Francesco FICETOLA	Chargé de recherches, Department of Environmental Science and Policy, Università degli Studi di Milano
Eric PETIT	Directeur de recherche, UMR INRA ESE, Agrocampus Ouest, Directeur de thèse
Jean-Marc PAILLISSON	Ingénieur de recherche, UMR CNRS 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1, Co-directeur de thèse



# Coexistence d'espèces dans des habitats discontinus

Le cas d'espèces natives et invasives dans des réseaux  
de mares



Nadège BÉLOUARD

2018



## REMERCIEMENTS

Les trois années durant lesquelles j'ai travaillé sur cette thèse ont été marquées de l'empreinte de nombreuses personnes, que je souhaite remercier.

Ecrire des lignes de code, raconter des histoires, c'est facile. Poser une bonne question, prendre des décisions éclairées, ça l'est beaucoup moins. C'est pourquoi j'adresse un immense merci à mes deux directeurs de thèse qui, de façon différente et complémentaire, m'ont patiemment aidé à grandir en tant que scientifique, même lorsque je m'embourbais dans d'obscurs traitements de données finalement inutiles. Merci de m'avoir donné les clés (ou plus exactement *fait chercher* les clés) nécessaires pour pratiquer une belle science. Le jeu en valait définitivement la chandelle, et je mesure le chemin parcouru en ces trois années – je mesure aussi le chemin qui reste à faire !

Je remercie les membres du jury, Stéphanie Manel, Françoise Burel, Francesco Ficetola et Pierre Joly d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Merci à Fabien Laroche, Nicolas Poulet, Alain Butet, Vincent Jung et Simon Chollet, les membres de comité de thèse, avec qui les journées de discussions ont été particulièrement animées et fructueuses.

Merci à Adrien Oger, dont l'aide a été cruciale durant les deux premières années de ma thèse, tant sur le terrain qu'au labo, et sans qui tout ce travail n'aurait pas pu être accompli. Merci à Gilles Lassalle qui m'a initié au monde mystérieux de la bioinformatique, celui où rien n'est impossible (si toutefois on a du temps devant soi). Toute ma gratitude à Anne-Laure Besnard, pour m'avoir fait confiance et avoir réussi à enterrer la pipettophobie que je traînais comme un boulet. Merci également à Dominique Huteau pour son aide sur le plateau isotopique.

Merci à toutes les personnes qui sont venus nous donner un petit ou un grand coup de main durant les phases de terrain (pharaoniques), de jour comme de nuit. Pardon aux aventuriers qui ont malencontreusement fait un petit plongeon, et aux curieux qui se sont fait serrer la pince un peu trop fort (mais il faut avouer que rétrospectivement, c'est quand même drôle). L'expression d'une personne qui découvre pour la première fois un triton marbré est inoubliable. Un merci tout particulier à mes super copains, Tiffanie Allain, Romain Lahaye et Antoine Avrilla, qui savaient à quoi s'attendre, et qui sont quand même venus nous assister. Merci pour votre aide et votre application, même dans le froid, la nuit, la pluie, la fatigue, le vacarme assourdissant d'un concert de rainettes (parfois même tout ça à la fois), et soumis au régime 100% sandwich jambon-fromage.

## Remerciements

Je remercie le Syndicat Mixte du Parc Naturel Régional de Brière, pour son soutien logistique par la mise à disposition de locaux, de véhicules et d'agents pour la conduite des opérations de terrain. Merci également aux plus de 60 propriétaires de mares qui ont accueilli avec bienveillance le débarquement massif de matériel et de scientifiques en cuissardes, parfois à répétition et quasiment sous leurs fenêtres.

Merci à Pascaline Le Gouar et Vincent Jung qui m'ont fait confiance et jeté dans le grand bain de l'enseignement, et grâce à qui j'ai découvert, contre toute attente, que l'enseignement était une autre facette passionnante dans ce travail.

Merci aux collègues des labos ECOBIO, ESE, GTUBE, et du GRETIA, et spécialement Lionel Picard pour son aide à la détermination des coléoptères aquatiques, mais aussi Géraldine Dubourg et Loïs Morel, qui ont été d'un soutien précieux quand il a fallu.

Enfin, merci Robin, merci d'avoir toujours été là, d'avoir accepté des semaines – des mois en fait – d'absence pour le terrain, les horaires de travail à rallonge, et d'avoir pour autant été d'un soutien sans faille, depuis le début, dans les hauts et les bas – merci de m'avoir fait revenir du bureau et d'avoir assuré ma survie à coups de bons petits plats, oups.

Pour finir, j'ai une pensée émue pour les petites mares de Brière, que j'ai suivies, explorées, scrutées pendant quelques saisons, que je connais toutes – littéralement – par leur petit nom, et qui me laissent parmi les plus beaux souvenirs de ces trois années de thèse.

## SOMMAIRE

Remerciements.....	3
Sommaire.....	5
<b>Introduction générale.....</b>	<b>6</b>
1 Invasions biologiques et effets sur les communautés natives.....	8
2 Mécanismes de coexistence des espèces et invasions biologiques .....	12
3 Approche empirique des métacommunautés : le cas des réseaux de mares.....	21
4 Problématique et organisation de la thèse .....	23
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>28</b>
1 Particularités des espèces étudiées et du site d'étude .....	30
2 Méthodes d'étude.....	43
<b>Chapitre 1.....</b>	<b>58</b>
Patrons de coexistence d'espèces natives avec une espèce invasive .....	58
<b>Chapitre 2.....</b>	<b>98</b>
Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive.....	98
<b>Chapitre 3.....</b>	<b>126</b>
Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés envahies .....	126
<b>Chapitre 4.....</b>	<b>148</b>
Interactions trophiques entre espèces natives et invasive .....	148
Partie 1 : Développement d'une méthode d'échantillonnage non-létale des amphibiens pour les analyses d'isotopes stables .....	148
Partie 2 : Niches trophiques des espèces invasives et natives et coexistence .....	164
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>202</b>
1 Persistance de l'écrevisse de Louisiane dans les mares .....	205
2 Relativité de l'isolement des patches au sein d'une métacommunauté .....	210
3 Intensité des interactions locales et persistance des espèces.....	211
4 Métacommunautés : coexistence des espèces natives avec une espèce invasive .....	214
5 Implications pour la gestion .....	215
<b>Annexe .....</b>	<b>220</b>
Identification de la composition spécifique des communautés des mares par le métabarcoding d'ADN environnemental.....	220
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>230</b>

## **INTRODUCTION GENERALE**



Partout dans le monde, les changements globaux, incluant le changement climatique (Walther *et al.* 2002; Parmesan & Yohe 2003) mais aussi le changement d'usage des terres (Guo & Gifford 2002), la fragmentation des habitats (Fahrig 2003) ou encore les invasions biologiques (Vitousek *et al.* 1997) constituent indépendamment mais aussi en synergie d'importantes perturbations pour les écosystèmes et les communautés d'espèces (Dukes & Mooney 1999; Parmesan 2006; Parmesan & Matthews 2006; Brook *et al.* 2008; Davis 2009; Murphy & Romanuk 2014). En particulier, les occurrences d'invasions biologiques ont considérablement augmenté durant les dernières décennies, notamment en lien avec la fréquence et les distances parcourues par les moyens de transport modernes (Lockwood *et al.* 2007; Davis 2009; Hulme 2009). L'arrivée de ces espèces dans des communautés préexistantes soulève la question du maintien des espèces natives dans les écosystèmes, autrement dit, la possibilité de coexistence entre ces espèces non-natives et les espèces natives.

### **1 Invasions biologiques et effets sur les communautés natives**

#### 1 a. Le concept d'invasion biologique

La définition d'une espèce invasive a suscité de nombreux travaux, et un vocabulaire varié est utilisé pour désigner les espèces non-natives selon les stades d'avancement de l'invasion et la perception des impacts qu'elles causent (*e.g.* Richardson *et al.* 2000; Colautti & MacIsaac 2004; Valéry *et al.* 2008; Catford *et al.* 2009; Blackburn *et al.* 2011). Le concept du processus d'invasion (« *invasion pathway* ») a permis d'appréhender ce phénomène de façon consensuelle, sous la forme d'une série d'étapes séparées par des barrières que les espèces doivent franchir pour devenir invasives (voir aussi Lockwood *et al.* 2007; synthétisé dans Blackburn *et al.* 2011, Figure 1).

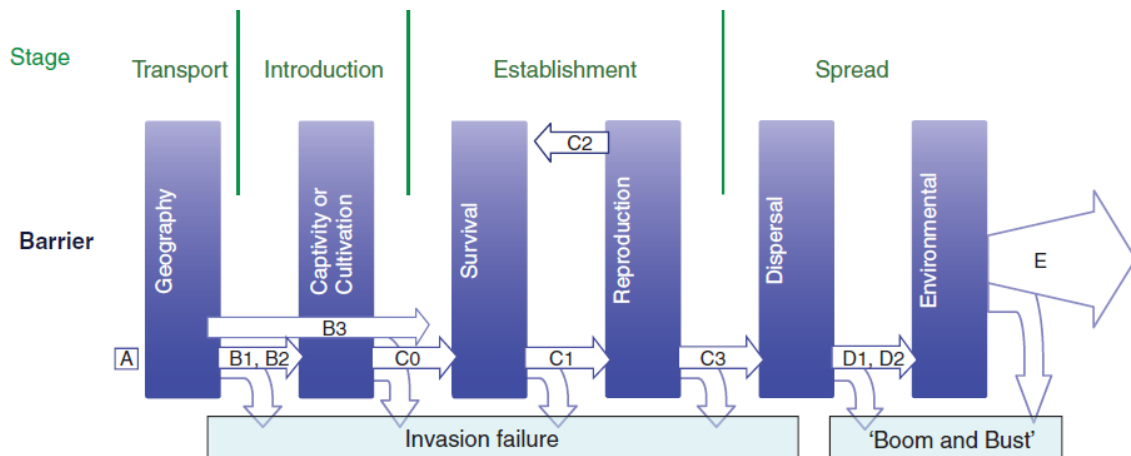


Figure 1. Représentation des étapes successives du processus d'invasion et des barrières surmontées une à une par les espèces pour passer à l'étape suivante. A : Individus présents dans leur aire native. B1, B2 : Individus transportés hors de leur aire native et maintenus en captivité ou en culture. B3 : Individus transportés hors de leur aire native et directement introduits dans le nouvel environnement. C0 : Individus s'échappant de captivité ou de culture. C1 : Individus parvenant à survivre dans leur aire d'introduction. C2 : Individus parvenant à survivre et se reproduire dans leur aire d'introduction, sans que la population ne se maintienne. C3 : Individus parvenant à survivre, se reproduire, et maintien de la population. D1 : Individus issus d'une population introduite et se maintenant à distance de celle-ci. D2 : Individus issus d'une population introduite, se maintenant et se reproduisant à distance de celle-ci. E : Individus se dispersant, survivant, et se reproduisant à de multiples sites hors de la population d'introduction. Chaque étape peut échouer et conduire à l'échec du processus d'invasion (adapté de Blackburn *et al.* 2011).

Il est communément admis que la première étape de ce processus est constituée par le transport d'une espèce hors de son aire de répartition naturelle, outrepassant ainsi des barrières biogéographiques à sa dispersion spontanée (voir toutefois Hoffmann & Courchamp 2016; Wilson *et al.* 2016). Certaines espèces introduites doivent franchir une barrière géographique supplémentaire, à l'échelle locale, pour s'affranchir de la captivité ou de la culture, tandis que d'autres sont directement introduites dans une nouvelle aire. Pour les individus introduits, il s'agit ensuite de survivre et se reproduire dans leur nouvel environnement, et de réitérer ce cycle autant de fois qu'il est nécessaire à la fondation d'une population viable (phase d'établissement). Enfin, les individus issus de ces populations établies doivent réussir à se disperser dans leur nouvel environnement et créer de nouvelles populations hors de la zone d'introduction, afin que l'espèce soit qualifiée d'invasive dans une région donnée (phase d'expansion). A chaque étape, l'espèce peut échouer à surmonter la barrière à sa progression, et seule une fraction des espèces introduites parviennent réellement à les franchir toutes (Williamson 1996; Lockwood *et al.* 2007; Jeschke & Pyšek 2018). Il est important de noter que les changements

occasionnés par les espèces non-natives peuvent intervenir dès la phase d'introduction et à chaque étape du processus d'invasion, et pas seulement lorsque l'espèce est effectivement devenue invasive (Jeschke & Heger 2018), bien que la phase d'expansion des espèces invasives soit critique puisqu'elle détermine l'ampleur spatiale des entités modifiées par l'arrivée d'une nouvelle espèce. Le terme d'espèce invasive est donc utilisé dans ce manuscrit pour décrire des espèces non-natives qui se maintiennent et se dispersent dans leur aire d'introduction, causant des changements à différents niveaux de la biodiversité native.

Le phénomène des invasions biologiques suscite une large gamme de travaux en écologie, et en accord avec le concept du processus d'invasion, les questionnements peuvent être scindés en deux groupes majeurs :

- (1) ceux portant sur les premières phases de l'invasion et ayant trait aux caractéristiques communes aux espèces invasives (*invasiveness*, *e.g.* Lockwood *et al.* 2005; Wilson *et al.* 2009; Kleunen *et al.* 2010; Estoup *et al.* 2016) ainsi qu'aux routes d'invasions (*e.g.* Estoup *et al.* 2010; Lawson Handley *et al.* 2011), souvent à large échelle spatiale,
- (2) ceux portant sur les phases post-établissement, et notamment les voies de dispersion et l'évolution des traits depuis la zone d'introduction (Sax *et al.* 2007; Lawson Handley *et al.* 2011; Colautti & Lau 2015), et les effets des espèces invasives sur la biodiversité à tous les niveaux d'organisation (détaillés ci-après), à plus fine échelle spatiale.

Ce travail de thèse s'intègre entièrement dans ce second groupe de questions.

### 1 b. Vers la compréhension des mécanismes d'impacts des espèces invasives

Une abondante littérature suggère que les espèces invasives ont des impacts négatifs sur les espèces natives et les habitats (Mack *et al.* 2000; Clavero & Garcia-Berthou 2005; Simberloff 2005), mais également sur les sociétés humaines à travers l'altération des services écosystémiques (Pejchar & Mooney 2009; Vilà *et al.* 2010; Blackburn *et al.* 2014), au point que les invasions biologiques sont aujourd'hui considérées comme une cause

majeure d'altération de la biodiversité (Vitousek *et al.* 1997). Les impacts les plus spectaculaires ont probablement lieu en cas d'introduction de prédateurs sur des îles qui en étaient dépourvues. Ainsi, les introductions du serpent *Boiga irregularis* sur l'île de Guam (Fritts & Rodda 1998), des gastéropodes *Achatina fulica* puis *Euglandina rosea* en Polynésie française (Clarke *et al.* 1984) ou encore de la perche du Nil *Lates nilotus* dans le lac Victoria (Ogutu-Ohwayo 1990), ont conduit à l'extinction de centaines d'espèces endémiques de ces régions. En dehors de ces cas extrêmes, les effets répertoriés des espèces invasives ont lieu à tous les niveaux de la diversité : diminutions d'abondances de populations, changements de composition des communautés, mais aussi hybridation avec les espèces natives, transmission de maladies, modifications d'habitat ou altération des interactions entre espèces par exemple (Traveset & Richardson 2006; Cucherousset & Olden 2011; Medina *et al.* 2011; Vilà *et al.* 2011; Blackburn *et al.* 2014; Mollot *et al.* 2017).

Une large part des études sur les effets des invasions biologiques s'est limitée au constat de ces changements, généralement qualifiés de délétères. Cependant, l'arrivée d'une nouvelle espèce dans une communauté génère nécessairement des modifications liées à ses interactions avec les espèces résidentes, et certains auteurs ont remis en cause le fait de systématiquement considérer les espèces invasives comme des menaces pour la biodiversité (Gurevitch & Padilla 2004; Sagoff 2005; Davis *et al.* 2011; Hobbs 2016), considérant même la possibilité que les invasions puissent procurer des bénéfices (Schlaepfer *et al.* 2011) ou créer de « nouveaux écosystèmes » (Hobbs *et al.* 2006). Ces idées ont été largement critiquées et sont à l'origine de vifs débats au sein de la communauté scientifique (*e.g.* Simberloff 2005, 2011; Richardson & Ricciardi 2013; Murcia *et al.* 2014; Russel & Blackburn 2017; Tassin *et al.* 2017) mais ont toutefois permis de faire un pas en avant dans la théorisation des effets des espèces invasives. Le champ de la biologie des invasions s'étant principalement nourri de considérations empiriques, une multitude de concepts propres à des contextes d'invasions particuliers s'est développée, donnant lieu à une grande confusion à la fois dans les définitions et dans les hypothèses. De récents travaux ont tenté d'ordonner ces concepts dans un cadre théorique plus général (Catford *et al.* 2009; Blackburn *et al.* 2011, 2014) ou de tester leur validité (Jeschke & Heger 2018). Ainsi, la notion d'impacts, qui est difficile à quantifier et souvent empreinte de subjectivité, a été largement précisée en se basant notamment sur

la théorie des niches (Parker *et al.* 1999; Lockwood *et al.* 2007; Ricciardi *et al.* 2013; Jeschke *et al.* 2014).

Replacer les invasions biologiques dans la théorie écologique classique constitue donc une opportunité pour la compréhension des effets des espèces invasives sur les communautés natives (Shea & Chesson 2002; Levine *et al.* 2003; Melbourne *et al.* 2007), mais l'inverse est aussi vrai. Une autre vision des invasions biologiques est née parmi les écologues, selon laquelle les invasions biologiques peuvent être considérées comme des « expérimentations naturelles » étant donné qu'elles permettent d'observer les conséquences de l'addition d'espèces dans des communautés préétablies, un angle de vue intéressant pour la compréhension de phénomènes écologiques et évolutifs (Sax *et al.* 2005, 2007). La théorie des métacommunautés, en liant les processus intra-communautaires et les flux entre communautés, offre un cadre conceptuel idéal pour comprendre les impacts de l'expansion des espèces invasives (Howeth *et al.* 2010).

## **2 Mécanismes de coexistence des espèces et invasions biologiques**

### **2 a. Théorie des métacommunautés**

La coexistence des espèces est au cœur des questions d'écologie, particulièrement dans le contexte actuel des invasions biologiques, puisqu'il s'agit de comprendre comment les espèces réussissent à vivre ensemble alors que, selon le principe d'exclusion compétitive énoncé par Gause (1934), deux espèces avec la même niche écologique ne peuvent coexister de façon stable. L'assemblage des communautés est le processus par lequel des espèces présentes dans un pool régional colonisent des milieux et interagissent pour former des communautés locales (Figure 2). Pour cela, les espèces doivent se disperser puis passer au travers de deux « filtres » : filtre environnemental (abiotique) et filtre des interactions biotiques (HilleRisLambers *et al.* 2012). La coexistence stable entre les espèces se caractérise par le maintien à long terme des espèces dans les communautés (Chesson 2000).

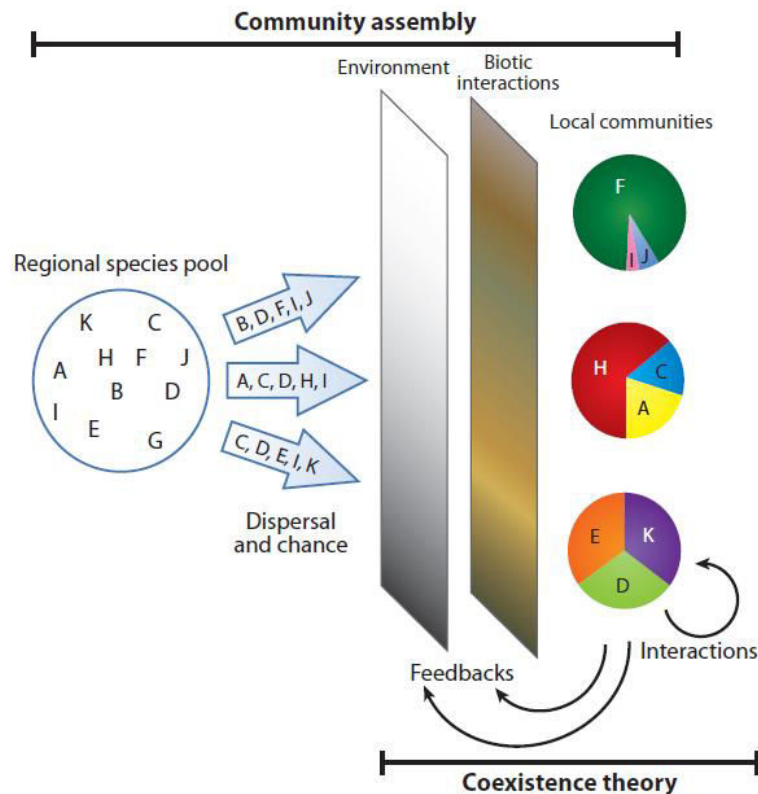


Figure 2. Schéma du processus d'assemblage des communautés. Un sous-ensemble du pool régional d'espèces colonise chaque site grâce à la dispersion et le hasard, après être passé au travers d'un filtre abiotique (environnemental) et biotique (tiré de HilleRisLambers *et al.* 2012).

La coexistence des espèces peut être considérée comme étant le produit de quatre grands types de mécanismes opérant à des échelles différentes (Vellend 2010) : la dispersion, qui permet l'arrivée d'espèces dans chacune des communautés ; la sélection, i.e. les interactions entre espèces ayant un effet sur leur démographie ; la dérive écologique, i.e. la stochasticité démographique inhérente à chaque population et pouvant conduire à sa disparition ; et enfin, la spéciation, à des échelles de temps longues, qui permet la différenciation d'espèces proches d'un point de vue phylogénétique. Historiquement, une grande partie de la littérature sur la coexistence des espèces s'est focalisée sur les processus locaux, i.e. les interactions au sein des communautés (incluant les effets environnementaux et les interactions biotiques), et ce n'est que plus tard que l'écologie des communautés s'est intéressée aux processus à plus large échelle en intégrant l'effet de processus spatiaux sur la composition des communautés. Le concept de métacommunauté a été défini afin de prendre explicitement en compte le rôle de la dispersion, s'ajoutant à celui des filtres dans l'assemblage des communautés (Leibold *et*

al. 2004; Holyoak *et al.* 2005). Une métacommunauté est définie comme un groupement de communautés locales, liées par la dispersion de multiples espèces potentiellement en interaction (Gilpin & Hanski 1991; Wilson 1992). Ainsi, ce concept reconnaît l'importance de processus ayant lieu à différentes échelles spatiales ainsi que leur interaction pour donner lieu à la coexistence des espèces. Quatre paradigmes ont été dressés pour structurer la pensée autour des processus de dispersion, d'hétérogénéité des habitats et d'équivalence des espèces (Leibold *et al.* 2004) :

- (1) « *Species-sorting* » : la dispersion n'est pas un facteur limitant, mais les espèces sont filtrées par des facteurs environnementaux et/ou biotiques, et ne sont présentes que dans les sites favorables.
- (2) « *Mass-effects* » : la dispersion en masse permet à des espèces d'être présentes à des localités suboptimales. C'est l'immigration récurrente qui permet aux espèces de se maintenir dans les sites-puits.
- (3) « *Patch-dynamics* » : un compromis colonisation-compétition, où les meilleurs compétiteurs éliminent les espèces les moins compétitives des communautés, mais ces espèces éliminées sont de meilleurs colonisateurs d'autres patches d'habitat
- (4) « *Neutral* » : toutes les espèces ont des traits équivalents et il n'y a pas d'hétérogénéité dans les habitats ; les assemblages d'espèces sont stochastiques.

On peut aussi considérer un cinquième paradigme, « *dispersal limitation* », où les espèces sont triées par les conditions environnementales comme dans le *species-sorting*, mais où la dispersion n'est pas suffisante pour leur permettre d'atteindre tous les habitats optimaux (Heino *et al.* 2015).

Si ces paradigmes ont eu un intérêt heuristique certain dans une première phase d'appropriation du concept (e.g. Cottenie 2005), les recherches doivent maintenant se poursuivre vers l'objectif de la détermination des rôles relatifs des processus qui conduisent à la coexistence des espèces (Logue *et al.* 2011; Winegardner *et al.* 2012; Heino *et al.* 2015). Ces quatre paradigmes ne sont en effet que des guides reflétant des cas particuliers de l'importance relative des processus locaux (filtres) et spatiaux (dispersion, Figure 3). Or, différentes combinaisons de ces processus peuvent aboutir aux mêmes patrons de coexistence, en particulier en milieux naturels, complexes et hétérogènes (Logue *et al.* 2011; Heino *et al.* 2015). Dans le but d'isoler l'effet d'une variable particulière

sur la coexistence des espèces, il est donc intéressant de caractériser séparément les processus locaux et spatiaux, et d'examiner les patrons de coexistence à la lumière des connaissances acquises sur ces deux processus. C'est la trame de travail utilisée dans cette thèse, qui aborde donc la question de la coexistence entre espèces invasives et espèces natives par l'étude des processus locaux et de dispersion de façon isolée, avant de les confronter aux patrons de coexistence effectivement observés.

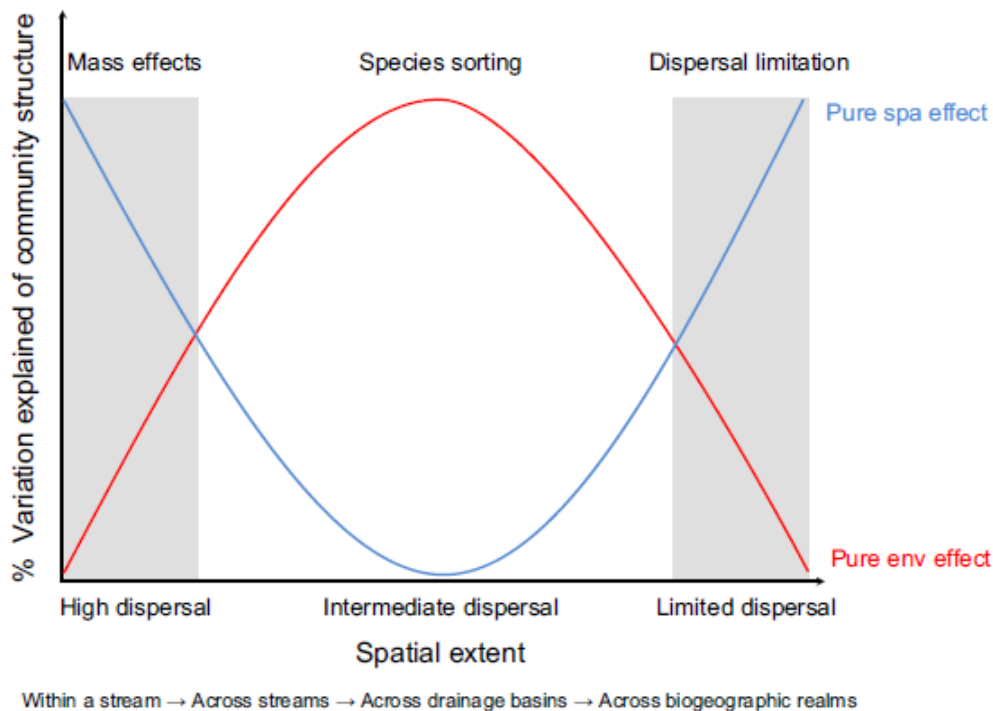


Figure 3. Représentation de trois paradigmes des métacommunautés (*mass effects*, *species sorting* et *dispersal limitation*) sur un continuum d'importance relative des effets environnementaux (courbe rouge) et spatiaux (courbe bleue). Ce continuum existe entre différentes métacommunautés, mais aussi selon l'échelle spatiale à laquelle une même métacommunauté est considérée (tiré de Heino *et al.* 2015).

## 2 b. Processus locaux

La théorie contemporaine de la coexistence des espèces précise l'effet de la métaphore des filtres dans le processus d'assemblage des communautés et les conditions dans lesquelles les espèces coexistent. Cette théorie indique que les différences de niches entre espèces facilitent la coexistence et donc la diversité des espèces dans les communautés, tandis que les différences relatives de fitness des espèces donnent lieu à l'exclusion compétitive (Chesson 2000; HilleRisLambers *et al.* 2012). Cette théorie prédit donc que la

coexistence a lieu lorsque les différences de niche sont supérieures aux différences relatives de fitness (Figure 4; Chesson 2000).

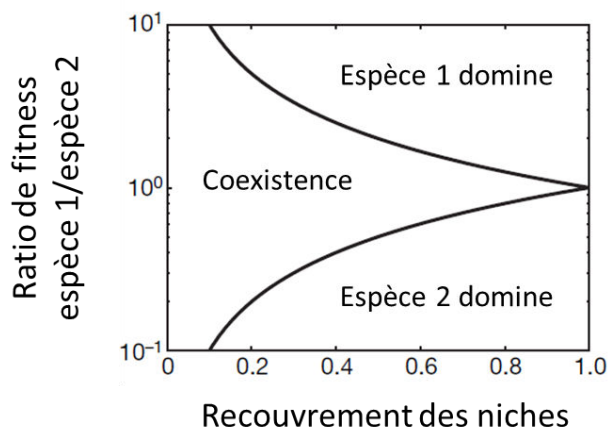


Figure 4. Schéma des conditions permettant la coexistence entre deux espèces selon la théorie contemporaine de la coexistence des espèces (adapté de Chesson & Kuang 2008)

La prédation peut exercer différents rôles dans la coexistence des espèces (Chesson & Kuang 2008) en modifiant les interactions de compétition entre espèces : à faible intensité, elle maintient les populations au-dessous des niveaux auxquels ils entrent en compétition, et ainsi diminue la compétition interspécifique. A intensité modérée, elle peut se transformer en compétition apparente, i.e. la faible abondance d'une proie A peut conduire un prédateur à augmenter sa consommation d'une proie B ; les deux proies sont donc en compétition indirecte. Enfin, à forte intensité, la prédation peut conduire à l'extinction des proies et ainsi joue un rôle capital dans la composition spécifique des communautés.

Par ailleurs, la niche d'une espèce est très dépendante des interactions qui sont uniques à un environnement et à une composition d'espèces particulière et c'est pourquoi l'arrivée d'une nouvelle espèce peut remettre en cause le maintien des espèces résidentes. En effet, les espèces invasives s'intègrent aux réseaux d'interactions des communautés natives en créant des liens, notamment trophiques, avec les espèces natives (effets additifs, Figure 5). Une large gamme d'interactions trophiques peut exister entre les espèces natives et invasives, par exemple, la prédation, la compétition pour la ressource (compétition par exploitation), la compétition par inférence (interactions agonistiques), mais il existe aussi des liens non-trophiques tels que la modification de l'habitat (Jackson *et al.* 2017b). Les

espèces invasives supposées avoir les plus larges effets sont celles ayant une position centrale dans les réseaux trophiques, puisqu'elles cumulent de multiples liens avec les espèces natives, à la fois de compétition avec les espèces de même niveau trophique, et des relations prédateur-proie avec les espèces des niveaux inférieurs et supérieurs (Jackson *et al.* 2017b). Elles peuvent aussi modifier les liens existant dans les réseaux trophiques (effets non-additifs, Figure 5; David *et al.* 2017). En effet, les espèces invasives peuvent à la fois atteindre une fitness supérieure à celle des compétiteurs natifs, causant leur exclusion compétitive, mais aussi induire l'extinction des proies, notamment grâce à leur réponses fonctionnelles plus élevées face à la disponibilité des ressources (Bollache *et al.* 2008; Alexander *et al.* 2014).

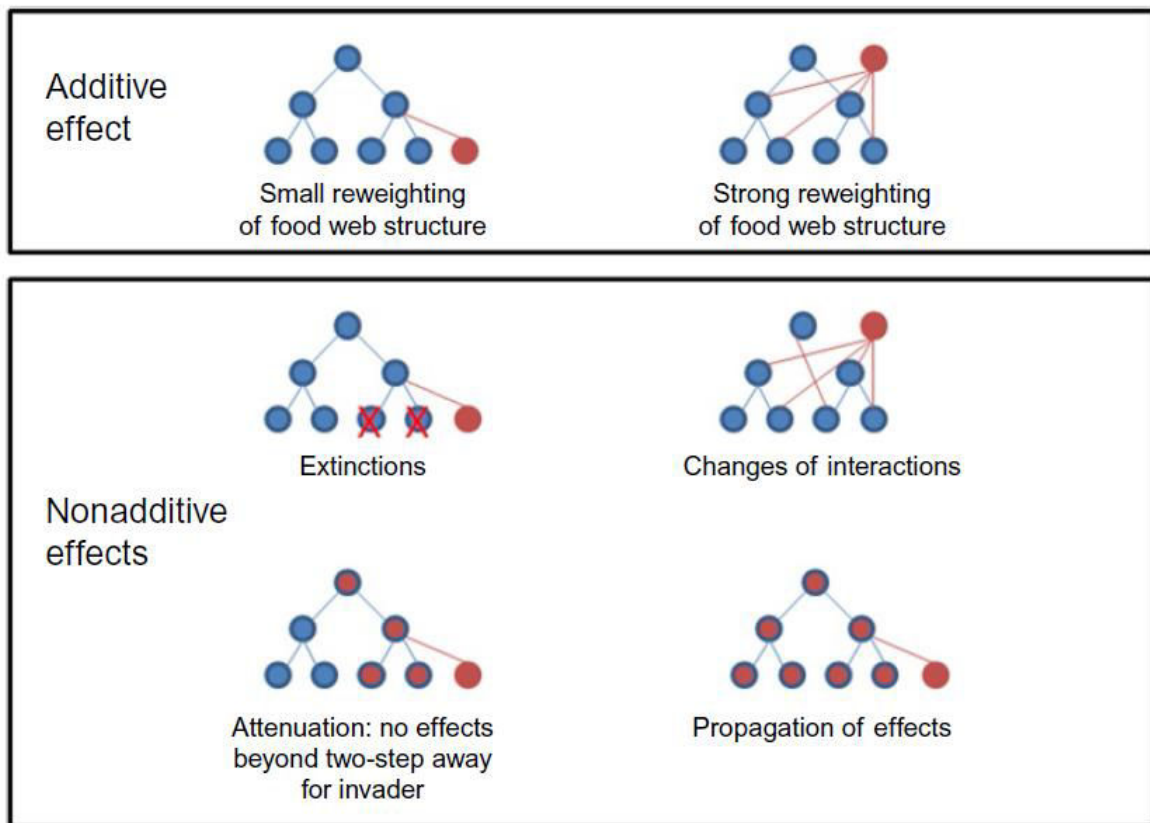


Figure 5. Illustration des effets potentiels de l'intégration d'une espèce invasive sur la structure d'un réseau trophique. Les espèces natives sont représentées en bleu et l'espèce invasive en rouge. Les espèces natives affectées par l'invasion sont représentées par des cercles bleus remplis de rouge (David *et al.* 2017).

Il existe cependant plusieurs moyens pour les espèces natives et invasives de se maintenir dans un réseau trophique donné. D'abord, l'espèce invasive peut occuper une niche vacante dans un écosystème, ce qui ne crée pas de compétition avec les populations

natives de même niveau trophique (Shea & Chesson 2002; Jackson & Britton 2014). Mais les espèces peuvent également diminuer le recouvrement de leur niche avec celle de leur compétiteur, par un ajustement des ressources utilisées (partition de niche), ou au contraire augmenter l'étendue des ressources utilisées de façon à diminuer la différence de fitness avec leur compétiteur supérieur (Olsson *et al.* 2009; Figure 6, Jackson *et al.* 2012; Tran *et al.* 2015).

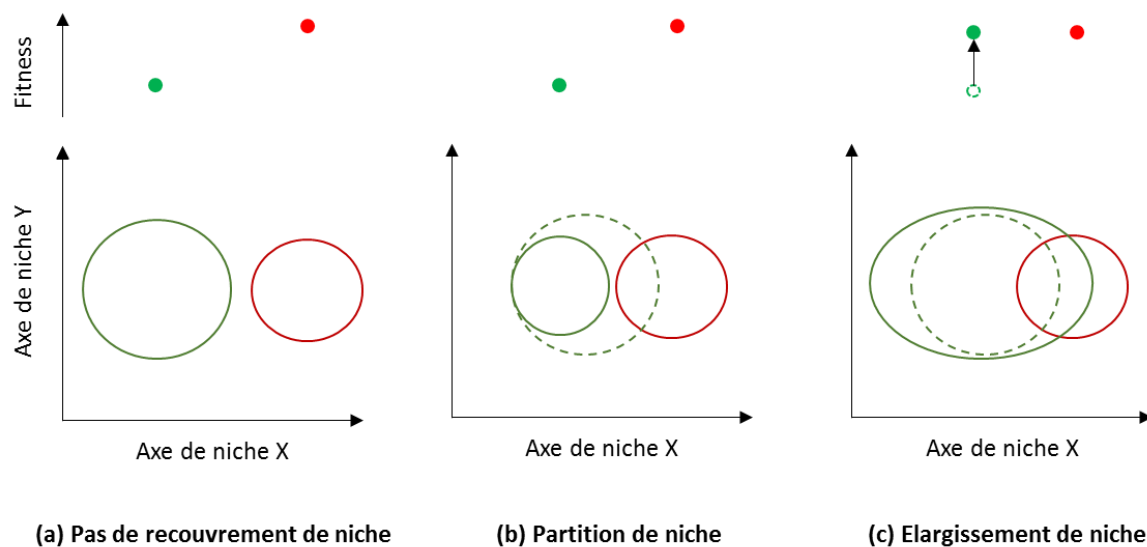


Figure 6. Schéma de trois mécanismes pouvant permettre la coexistence entre une espèce native et une espèce invasive dans un environnement donné, par la modulation des différences de niches et des différences de fitness. Les ellipses représentent les niches des espèces, en rouge celle de l'espèce invasive, en vert celle de l'espèce native. Ces scénarios sont proposés sous l'hypothèse d'une espèce invasive ayant une fitness supérieure à celle de l'espèce native, et seuls sont schématisés les cas où l'espèce native seulement change sa niche. Les ellipses en traitillés représentent la niche de l'espèce native en allopatrie, celles en trait plein représentent les niches des espèces en sympatrie. (a) Les niches des espèces sont constitutivement non-recouvrantes, pas de changement en sympatrie, (b) une espèce diminue le recouvrement de sa niche avec celle de l'autre espèce en diminuant la gamme des ressources qu'elle utilise, sans changement dans les rapports de fitness entre les deux espèces (c) une espèce augmente l'étendue de ses ressources, ce qui lui permet d'augmenter sa fitness par rapport à celle de l'autre espèce malgré l'augmentation du recouvrement des niches.

L'étude des niches des espèces invasives et des espèces natives permet donc d'appréhender à la fois les mécanismes des effets des espèces invasives et les possibilités de coexistence, et cela dans différentes conditions environnementales qui peuvent faire varier la fitness et la niche des espèces. Différentes méthodes permettent de quantifier les interactions locales entre espèces. L'observation directe des comportements

interspécifiques, par les outils de l'éthologie, permet de quantifier à la fois des relations trophiques et non-trophiques. Si elle peut apporter des informations précieuses sur les stratégies liées à la prédation, les inférences sur les réseaux trophiques sont en revanche limitées, alors que c'est probablement le mécanisme principal par lequel les espèces invasives agissent sur les espèces natives (Jackson *et al.* 2017b). Les interactions trophiques sont quantifiées de manière efficace par l'identification de contenus stomacaux (visuelle ou moléculaire) ou l'inférence de régimes alimentaires, possible grâce à plusieurs types de marqueurs moléculaires tels que les acides gras ou les isotopes stables (principes et comparaisons de ces méthodes dans Nielsen *et al.* 2018). C'est l'analyse des réseaux trophiques par les isotopes stables qui a été utilisée dans ce travail de thèse.

### 2 c. Dispersion

La dispersion est le mouvement d'individus ou de propagules d'une population donneuse vers une population receveuse, ayant de potentielles conséquences sur les flux de gènes dans l'espace (Ronce 2007). C'est un mouvement en trois phases : l'émigration d'une population source, le mouvement en lui-même, et l'établissement dans une population receveuse (Figure 7). Elle diffère ainsi de la migration, qui est un mouvement récurrent entre deux habitats (Cayuela *et al.* 2018). La dispersion affecte la démographie des populations et la répartition de la diversité génétique dans l'espace, mais joue également un rôle central dans la dynamique et l'évolution des populations structurées dans l'espace, notamment parce qu'elle contrebalance l'effet de la dérive génétique (Broquet & Petit 2009; Cayuela *et al.* 2018). En permettant aux individus de trouver des conditions environnementales favorables, elle permet la persistance des espèces à l'échelle du paysage, et maintient une correspondance entre les conditions locales et la composition spécifique (Leibold *et al.* 2004). Tenir compte de la dispersion est donc d'une importance cruciale pour comprendre la composition des communautés.

Le bénéfice de la dispersion est cependant dépendant du contexte, car de nombreux risques sont associés à chaque étape du processus (Bonte *et al.* 2012). L'émigration est affectée par des causes liées à l'individu (facteurs morphologiques et physiologiques), aux facteurs sociaux (évitement de la consanguinité) et environnementaux (disponibilité des

ressources, risques de prédation, Figure 7, Clobert *et al.* 2009). Le mouvement des individus (phase de transit) peut être actif ou passif (i.e. transport par des facteurs extérieurs, e.g. par le vent, les courants, les animaux). Il est affecté par la connectivité du paysage, c'est-à-dire la façon avec laquelle le paysage facilite ou empêche le mouvement entre des habitats (Taylor *et al.* 1993). La discipline de l'écologie du paysage est ainsi née pour permettre de quantifier le mouvement des individus en lien avec la composition et la configuration du paysage (Burel & Baudry 2003). Enfin, l'immigration dans une communauté peut échouer à cause d'un environnement non-adapté ou des relations trophiques avec les espèces établies (Bonte *et al.* 2012). En cela, la colonisation des communautés locales par une espèce invasive diffère des processus de dispersion des espèces natives car l'espèce invasive n'est initialement présente dans aucune des communautés réceptrices (Broquet & Petit 2009) et cela a des conséquences notamment en termes d'évolution des populations (Keller & Taylor 2008; Excoffier *et al.* 2009).

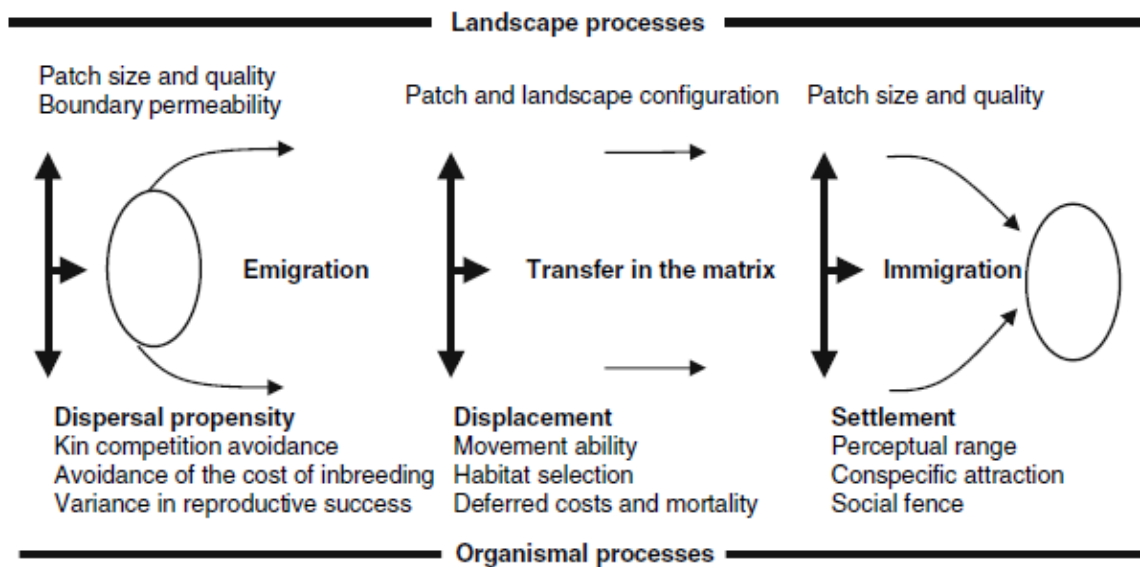


Figure 7. Influence des facteurs individuels et environnementaux au cours des trois étapes du processus de dispersion (Baguette & Van Dyck 2007).

Ainsi, non seulement les espèces n'ont pas la même propension à disperser en fonction du contexte, mais le succès de dispersion est également variable selon les caractéristiques environnementales et la composition des communautés réceptrices. Pourtant, il est courant d'utiliser des estimateurs de la dispersion des espèces basés sur les distances entre les sites, la taille corporelle des espèces ou leur mode de dispersion pour inférer la

coexistence des espèces (e.g. De Bie *et al.* 2012). Cela peut conduire à d'importantes imprécisions, et la compréhension des mécanismes de coexistence pourrait largement être améliorée si les études empiriques de métacommunautés caractérisaient directement les taux de dispersion des espèces entre les communautés (Logue *et al.* 2011; Heino *et al.* 2015). Ainsi, ce travail de thèse s'est attaché à étudier les flux entre populations.

Une large variété de méthodes et d'outils permettent de mesurer la dispersion (voir l'arbre de décision proposé dans Cayuela *et al.* 2018). Les approches directes, c'est-à-dire des suivis de mouvements grâce à la télémétrie, les méthodes de capture-marquage-recapture, l'assignation génétique des individus à leur population d'origine par exemple (Manel *et al.* 2005; Cayuela *et al.* 2018) permettent de quantifier le nombre de migrants entre des sites. Elles présentent toutefois des limites pour l'étude de la coexistence des espèces, car elles identifient la somme de la dispersion efficace, i.e. donnant lieu à une reproduction dans la population réceptrice, et la dispersion non-efficace, i.e. sans reproduction subséquente. Les approches indirectes de la dispersion reposent sur les effets des mouvements d'individus sur les fréquences génotypiques dans les populations (Slatkin 1987) et permettent de quantifier la dispersion efficace (Broquet & Petit 2009). La génétique du paysage, combinant écologie du paysage et génétique des populations, permet d'établir le lien entre la proximité génétique des populations et la connectivité des éléments du paysage qui les sépare (Manel *et al.* 2003). L'étude de la dispersion par la génétique du paysage permet aussi de retracer les voies de dispersion utilisées par les espèces invasives, des éléments indispensables à la prédiction de leur expansion et de leurs effets sur les communautés natives (Lawson Handley *et al.* 2011).

### **3 Approche empirique des métacommunautés : le cas des réseaux de mares**

Le parti pris de ce travail a été de considérer uniquement des approches observationnelles en milieu naturel, de façon à considérer les mécanismes de coexistence dans la variété et la complexité des écosystèmes, en complément de leur identification généralement obtenue dans des approches expérimentales. Les écosystèmes aquatiques se prêtent à l'étude des métacommunautés car les possibilités de flux entre les

communautés sont variables selon leur degré de continuité aquatique (Heino *et al.* 2015). Dans des écosystèmes à forte continuité hydrologique, comme les écosystèmes marins ou côtiers, la dispersion n'est pas fortement contrainte par les limites du milieu, et la répartition des espèces est attendue d'être principalement liée aux caractéristiques des habitats (effet prépondérant des filtres environnementaux, Heino *et al.* 2015). Dans le cas des lacs et mares, l'isolement relatif des patches dans une matrice terrestre rend plus difficile la dispersion pour les communautés (De Bie *et al.* 2012; Baguette *et al.* 2013), et les espèces peuvent ne pas être présentes à tous les sites favorables car elles ne peuvent pas les atteindre (effet prépondérant de la limitation de dispersion). Cet isolement peut constituer une barrière totalement hermétique pour les espèces purement aquatiques, mais variable pour les espèces capables de disperser par voie terrestre ou aérienne.

De plus, les mares sont des petits écosystèmes d'eau douce d'une surface inférieure à 2 hectares, véritables îles dans le paysage qui varient largement dans leurs caractéristiques physiques et biotiques au niveau local (Boix *et al.* 2012; Oertli & Frossard 2013). De par cette variété de conditions environnementales, les filtres biotiques et abiotiques peuvent intensément trier les espèces, et l'approche observationnelle des métacommunautés nécessite donc la prise en compte de multiples variables environnementales pouvant agir sur les processus étudiés, incluant la composition de l'ensemble de la communauté des mares, ainsi que les caractéristiques de l'habitat et du paysage environnant.

En formant des réseaux d'habitats aux caractéristiques variées et variablement connectés entre eux par le paysage, les réseaux de mares sont des métacommunautés naturelles dont on attend que la structure soit influencée à la fois par les processus spatiaux et locaux (Heino *et al.* 2015). Elles fournissent donc à la fois des réplicats et des réseaux intéressants pour explorer les mécanismes écologiques de la coexistence des espèces (De Meester *et al.* 2005). Par ailleurs, les mares et les écosystèmes aquatiques en général sont actuellement particulièrement menacés par les invasions biologiques (Ricciardi & Atkinson 2004; Ricciardi & MacIsaac 2011). L'application du concept de métacommunautés présente donc également un intérêt majeur pour comprendre les effets des invasions biologiques dans ces milieux (Howeth *et al.* 2010).

#### 4 Problématique et organisation de la thèse

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de l'étude des mécanismes de coexistence entre espèces natives et invasives, par des approches observationnelles dans des réseaux de mares. Ils ont consisté à déterminer les patrons de coexistence entre des espèces natives et une espèce invasive en tenant compte des filtres environnementaux et biotiques, puis à décomposer l'effet de deux mécanismes à l'origine de l'assemblage des communautés : les interactions trophiques au sein des communautés locales, et la dispersion des espèces entre les communautés (Figure 8).

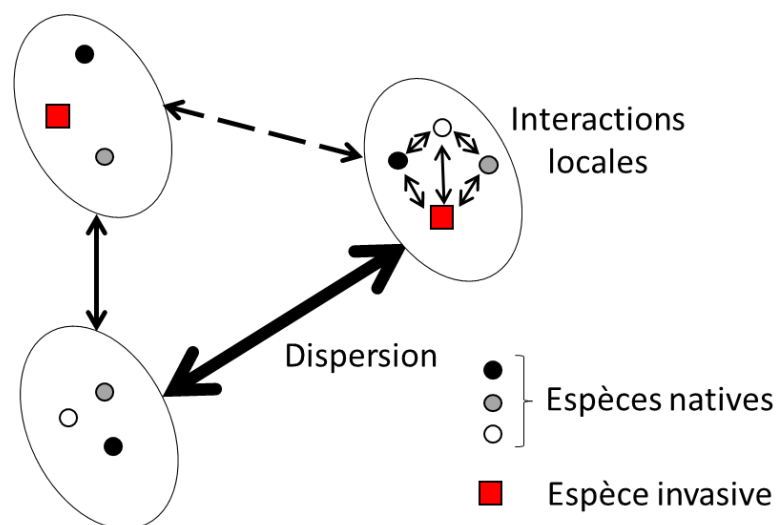


Figure 8. Représentation schématique d'une métacommunauté et des processus de coexistence étudiés dans ces travaux de thèse. Les ellipses représentent les limites des communautés, les pictogrammes représentent les espèces (natives ou invasive). Les espèces sont reliées par des interactions locales dans les communautés et les communautés sont reliées par la dispersion des espèces.

L'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*), originaire du sud-ouest des Etats-Unis, a envahi de nombreuses régions du monde au cours des dernières décennies (Loureiro *et al.* 2015) et est reconnue pour ses impacts sur de nombreux taxons, et notamment sur les amphibiens qui sont menacés à l'échelle mondiale (Kats & Ferrer 2003; Souty-Grosset *et al.* 2016). Dans le Parc Naturel Régional (PNR) de Brière, en Loire-Atlantique, une partie des mares a été colonisée par l'écrevisse de Louisiane (Tréguier *et al.* 2014, 2018) qui menace donc potentiellement le maintien des amphibiens dans la région. Ce sont ces taxons qui sont pris comme exemples pour l'étude des patrons de coexistence entre des

espèces natives et une espèce invasive dans ce travail de thèse, dans les réseaux de mares de Brière.

La partie « Matériel et méthodes » de ce manuscrit a vocation à éclairer les principales particularités de ces espèces et des sites d'études, nécessaires à la compréhension de l'ensemble des travaux, ainsi que les principes des méthodes utilisées pour traiter la problématique générale.

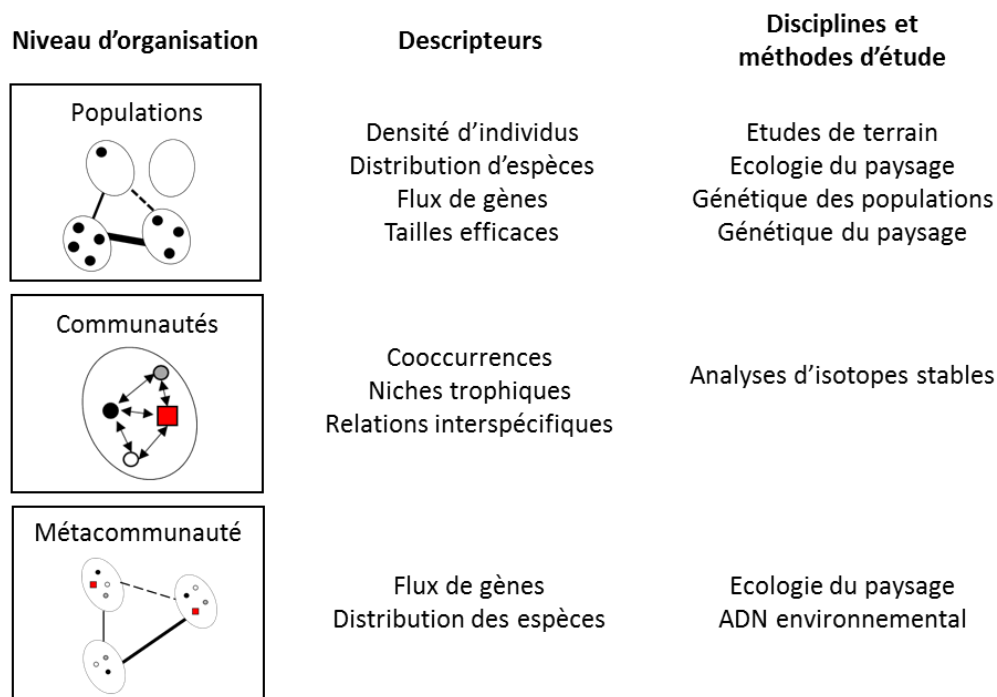


Figure 9. Schéma synthétique reliant les descripteurs étudiés dans ces travaux de thèse pour chaque niveau d'organisation et les disciplines ou méthodes utilisées à cet effet. Dans les schémas des niveaux d'organisation, les ellipses symbolisent les entités des mares et les figurés, des espèces. Les traits symbolisent les flux de gènes entre communautés, et les flèches les interactions entre espèces.

Le corps de ce manuscrit se découpe en quatre chapitres ciblant successivement les patrons de coexistence puis les mécanismes de coexistence des espèces. L'ordre des chapitres présenté dans ce manuscrit correspond à la chronologie des travaux effectués, mais les différentes parties sont indépendantes, et chaque chapitre apporte un éclairage particulier à la question de départ (Figure 9). La discussion générale s'attachera à faire ressortir des éléments associant chacun de ces chapitres.

**Chapitre 1 : Patrons de coexistence d'espèces natives avec une espèce invasive**

Article 1 : Effets variables d'une espèce invasive sur la reproduction et la distribution d'espèces natives dans des réseaux de mares, manuscrit accepté dans *Freshwater Biology*.

Ce premier chapitre a eu pour but de déterminer les patrons de coexistence entre l'écrevisse de Louisiane et trois espèces d'amphibiens sur la zone d'étude, par deux approches complémentaires : (1) l'étude des variations de densités de larves d'amphibiens dans les mares chez deux espèces d'amphibiens et (2) la distribution de trois espèces d'amphibiens dans deux réseaux de mares. Différents facteurs susceptibles d'influencer chacun de ces patrons ont été testés, parmi lesquels la présence d'écrevisse de Louisiane, mais aussi d'autres taxons présents dans les mares, des variables d'habitat et, pour la distribution, des variables paysagères.

**Chapitre 2 : Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive**

Article 2 : Dérive génétique durant la phase d'expansion d'une espèce fortement invasive, manuscrit à soumettre dans *Molecular Ecology*

La structure génétique des populations d'écrevisse de Louisiane a été étudiée de façon à appréhender plus précisément le patron de colonisation des mares, les voies de dispersion utilisées et les forces évolutives en présence durant la phase d'expansion d'une espèce invasive en milieu discontinu.

**Chapitre 3 : Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés envahies**

Article 3 : Investigation empirique du rôle de la dispersion dans la coexistence des espèces dans une métacommunauté envahie, manuscrit en préparation.

La connectivité des populations de trois espèces d'amphibiens natives a été analysée dans un même réseau de mares, de façon à évaluer les possibilités de maintien de ces espèces malgré l'invasion partielle des mares par l'écrevisse de Louisiane. Les potentiels effets de cette invasion sur la diversité et la structure génétique des populations d'amphibiens ont ensuite été testés.

**Chapitre 4 - Interactions trophiques entre espèces natives et invasive**

*Partie 1 : Développement d'une méthode d'échantillonnage non-létale des amphibiens pour les analyses d'isotopes stables*

Article 4 : La nageoire est un substitut au muscle pertinent et non-létal pour des mesures d'isotopes stables chez les amphibiens, manuscrit en révision dans *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*

Le muscle est le tissu de référence utilisé dans les analyses d'isotopes stables, mais son prélèvement chez les amphibiens implique l'euthanasie des individus. Compte-tenu des statuts de conservation et de protection de ces espèces, cet article vise à tester la conformité des valeurs isotopiques de la nageoire avec celles du muscle chez quatre espèces d'amphibiens, et à calibrer une méthode de prélèvement la moins invasive possible pour, *in fine*, étudier les réseaux trophiques comportant ces espèces en utilisant des échantillons de nageoire d'amphibiens.

*Partie 2 : Niches trophiques des espèces natives et invasive et coexistence*

Article 5 : La partition de niche trophique entre les amphibiens et une écrevisse invasive favorise leur coexistence dans les mares, manuscrit en préparation

L'écrevisse de Louisiane pourrait avoir différents types d'interactions avec les amphibiens, et ces travaux visent à déterminer lesquelles ont réellement lieu dans les milieux naturels. Les interactions de l'écrevisse avec quatre espèces d'amphibiens natifs sont étudiées dans les réseaux trophiques des mares. Les variations de position et de taille des niches trophiques des têtards et des tritons adultes sont évaluées en regard de la présence de l'écrevisse, mais aussi d'autres potentiels compétiteurs, prédateurs ou ressources des mares, en utilisant les analyses d'isotopes stables.

Enfin, en **Annexe**, sont présentés les objectifs, méthodes et premiers résultats de travaux supplémentaires visant à déterminer la distribution actualisée de l'écrevisse et la composition de l'ensemble des communautés d'amphibiens, grâce au métabarcoding d'ADN environnemental. Ces travaux ont pour but ultime d'étudier la coexistence des communautés entières d'amphibiens avec l'écrevisse de Louisiane.



## **MATERIEL ET METHODES**



## 1 Particularités des espèces étudiées et du site d'étude

### 1 a. Les amphibiens

Les amphibiens regroupent plus de 6400 espèces aux morphologies, milieux de vie et traits écologiques variés (Crump 2010). Ce taxon est en déclin à l'échelle mondiale, et la Liste Rouge de l'IUCN classe 30% des espèces comme étant en danger d'extinction, faisant des amphibiens le groupe le plus menacé parmi les vertébrés (Baillie *et al.* 2004). De multiples facteurs sont responsables de ce déclin, mais la dégradation des habitats et les invasions biologiques sont considérées parmi les principales menaces pesant sur ce taxon (Kats & Ferrer 2003; Beebee & Griffiths 2005; Cushman 2006; Bucciarelli *et al.* 2014). Dans de nombreux pays, comme en France, les amphibiens sont donc des espèces à forts enjeux de conservation dans les zones humides. Parmi les urodèles (e.g. tritons et salamandres) et les anoures (e.g. grenouilles et crapauds), un grand nombre d'espèces se reproduit dans des écosystèmes aquatiques tels que les mares et effectue des migrations saisonnières vers des milieux terrestres au stade adulte (ACEMAV 2003). Les larves se développent dans les milieux aquatiques puis se métamorphosent (Figures 10 à 13; Gosner 1960), un changement morphologique et physiologique qui s'accompagne d'un changement de régime alimentaire et de la sortie du milieu aquatique. Les individus y reviennent pour se reproduire à l'âge adulte, période durant laquelle les tritons adultes développent une nageoire caudale, qui régresse à nouveau à la fin de la période de reproduction.

Le temps de développement des larves est généralement de l'ordre de plusieurs semaines (ACEMAV 2003). En revanche, le temps de résidence des adultes dans les milieux aquatiques est très variable selon les espèces, allant de seulement quelques jours à plusieurs mois, voire l'année entière notamment chez certaines espèces possédant des morphes néoténiques (i.e. adultes ayant conservé des caractères juvéniles comme les branchies, voir les travaux de Denoël, Denoël *et al.* 2009; Denoël & Winandy 2015). Les tritons et leurs larves sont des prédateurs de divers invertébrés, allant du zooplancton à des hétéroptères ou coléoptères aquatiques, selon leur taille corporelle (Figure 10), mais aussi de larves d'amphibiens ou d'autres tritons (Fasola & Canova 1992; Covaciu-Marcov

2010; Tóth *et al.* 2011), tandis que les têtards d'anoures ont un régime alimentaire qui peut varier mais est principalement constitué de particules déposées sur le substrat ou en suspension dans la colonne d'eau, incluant des algues, des macrophytes et des détritiques, et certaines espèces peuvent se nourrir sur des cadavres (Altig *et al.* 2007; Whiles & Altig 2010). Bien qu'une littérature grandissante étudie désormais les réseaux trophiques incluant des amphibiens (e.g. Caut *et al.* 2013; Arribas *et al.* 2015; Schmidt *et al.* 2017), l'écologie trophique des amphibiens est toujours mal connue (Altig *et al.* 2007).



Figure 10. Larve de triton palmé vue à la loupe binoculaire. Le zooplancton contenu dans son tractus digestif apparaît par transparence à cause de la faible pigmentation chez les très jeunes stades larvaires (crédit : A. Oger).

En lien avec le caractère biphasique du cycle de vie chez de nombreuses espèces, les caractéristiques du paysage terrestre environnant la mare ont une importance toute aussi grande que celles de la mare elle-même (Denoël *et al.* 2013). En ce qui concerne les mares, la végétation aquatique est capitale pour beaucoup d'espèces qui l'utilisent pour attacher la masse d'œufs (anoures) ou envelopper les œufs un à un dans les feuilles (tritons), mais aussi comme protection contre les prédateurs (Orizaola & Brana 2003; Miaud & Muratet 2004; Boissinot *et al.* 2019). La présence de poissons est également défavorable aux amphibiens, notamment à cause de la prédation que les poissons exercent sur les œufs et les larves d'amphibiens (Hecnar & M'Closkey 1997; Smith *et al.* 1999; Joly *et al.* 2001; Winandy *et al.* 2017). Au niveau du paysage, la présence de haies ou de boisements à proximité des mares est favorable en tant qu'habitat durant la phase terrestre, contrairement aux cultures ou surfaces urbanisées (Joly *et al.* 2001; Pellet *et al.* 2004; Denoël & Lehmann 2006; Ficetola *et al.* 2009; Denoël *et al.* 2013; Boissinot *et al.* 2015, 2019). Néanmoins, la tolérance des espèces d'amphibiens vis-à-vis des conditions environnementales est très variable et tandis que certaines espèces sont très ubiquistes,

d'autres sont associés à une gamme réduite d'habitats et donc souvent moins largement distribuées (ACEMAV 2003).

Du fait que les amphibiens soient des espèces hautement philopatriques (e.g. Reading *et al.* 1991; Gamble *et al.* 2007) et souvent présents à de faibles effectifs dans les mares, les mares ont longtemps été considérées comme les limites des unités populationnelles (Jehle *et al.* 2005a), connectées par des rares évènements de dispersion assurant le maintien de l'ensemble du système. Toutefois, ce fonctionnement en métapopulation a été remis en cause par l'accroissement du nombre d'études sur la dispersion des amphibiens, en particulier grâce au développement de la génétique des populations, montrant que les capacités de dispersion sont parfois largement sous-estimées (Smith & Green 2005; Semlitsch 2008). L'agrégation des individus dans les mares a également encouragé les travaux sur l'influence de la connectivité du paysage sur la dispersion (Spear *et al.* 2005). La dispersion reste toutefois mal connue chez un grand nombre d'espèces d'amphibiens, et notamment, les barrières anthropiques ont des effets variables sur la structure des populations (Hitchings & Beebee 1997; mais voir Prunier *et al.* 2014).

Les travaux de cette thèse se sont focalisés principalement sur quatre espèces d'amphibiens largement distribuées sur la zone d'étude et possédant des traits écologiques contrastés : la grenouille agile *Rana dalmatina*, la rainette verte *Hyla arborea*, le triton palmé *Lissotriton helveticus*, et le triton marbré *Triturus marmoratus*.

La grenouille agile (*agile frog* en anglais, Figure 11) est une espèce d'anouère de la famille des *Ranidae* tolérant une grande variété de conditions environnementales et largement distribuée en Europe (ACEMAV 2003). Les adultes ne passent que quelques jours dans les mares pour la reproduction en février-mars, durant lesquels la femelle pond une masse de plusieurs centaines d'œufs flottant à la surface des mares et souvent fixée à un support (ACEMAV 2003; Miaud & Muratet 2004). Cette espèce a été peu étudiée comparé à une espèce très proche d'un point de vue phylogénétique, la grenouille rousse (*Rana temporaria*), mais ayant des traits écologiques distincts (reproduction plus précoce et dans des habitats temporaires).



Figure 11. Stades de développement chez la grenouille agile. (a) têtard aux pattes postérieures développées, (b) juvénile en fin de métamorphose, (c) mâle adulte.

La rainette verte (*European tree frog* en anglais) est un anoure de la famille des *Hylidae*. Cette espèce est moins ubiquiste que la grenouille agile, et trouvée préférentiellement dans les mares ensoleillées et comportant une ripisylve arbustive (ACEMAV 2003). Durant la période de reproduction qui dure plusieurs semaines, les mâles forment des chorus nocturnes pour attirer les femelles, bien qu'ils se réfugient dans la végétation terrestre durant la journée (Figure 12). La femelle attache une petite masse d'œufs à la végétation aquatique immergée. La phénologie de cette espèce est souvent plus tardive que celle de la grenouille agile, avec une reproduction en mars-avril. Cette espèce présente des capacités de dispersion importantes pour un amphibien, et des mouvements de l'ordre de 2 kilomètres ont parfois été observés (Angelone & Holderegger 2009; Angelone *et al.* 2011).



Figure 12. Stades de développement chez la rainette verte. (a) Têtard, (b) juvénile, (c) mâle adulte.

Le triton palmé (*palmate newt* en anglais) est un urodèle de petite taille (5 à 10 cm), de la famille des *Salamandridae* (Figure 13). Très ubiquiste, cette espèce se trouve dans tous types de milieux aquatiques, des lacs aux simples ornières forestières (ACEMAV 2003). Les individus passent une grande partie de l'année en milieu aquatique et les populations

peuvent présenter des morphes néoténiques (Denoël & Winandy 2015). En vallée de la Loire, cette espèce présente une structure génétique faible, indiquant une dispersion fréquente entre les habitats aquatiques (Johanet 2009). Ces fréquents évènements de dispersion peuvent lui permettre de coloniser rapidement un ensemble de mares (Isselin-Nondedeu *et al.* 2017).



Figure 13. Stades de développement du triton palmé. (a) Jeune larve (< 1 mois), (b) Larve en cours de métamorphose (rétraction presque totale des branchies), (c) mâle adulte nuptial arborant des palmes aux pattes postérieures et un mucron (filament au bout de la queue).

Le triton marbré (*marbled newt* en anglais) est la plus grande espèce d'amphibien trouvée dans la zone d'étude (environ 11 à 16 cm de long, ACEMAV 2003). Comme le triton palmé, il fait partie de la famille des *Salamandridae* mais contrairement à lui, le triton marbré passe seulement quelques semaines dans les mares pour la reproduction (Jehle *et al.* 2001; Guérin *et al.* 2017). Ainsi sa coloration aposématique est présente sur la partie dorsale (Figure 14), contrairement aux autres espèces du genre *Triturus* (Arntzen & Wallis 1991). Le triton marbré forme souvent des populations de petite taille (Jehle *et al.* 2001) et il tolère une moins large gamme de conditions environnementales que les trois autres espèces d'amphibiens considérées (ACEMAV 2003). Par ailleurs, cette espèce présente une anomalie chromosomique qui cause la mort de 50% des embryons durant les premiers stades de développement. Des travaux en génétique des populations ont indiqué que les populations étudiées sont structurées génétiquement entre mares (Jehle *et al.* 2005b) et les distances génétiques sont influencées par la composition du paysage (Costanzi *et al.* 2018).



Figure 14. Stades de développement du triton marbré. (a) Jeune larve reconnaissable à sa queue tachetée, (b) Larve en cours de métamorphose (rétraction des branchies), (c) mâle adulte nuptial arborant une crête dorsale.

### 1 b. L'écrevisse de Louisiane

L'écrevisse de Louisiane (*red swamp crayfish* en anglais) est un crustacé d'eau douce de la famille des *Cambaridae*. Originaire du sud-ouest des Etats-Unis et du nord-ouest du Mexique, elle a été introduite dans de nombreux pays au cours du 20<sup>ème</sup> siècle pour l'aquaculture, pour la consommation humaine, comme appât pour la pêche ou comme animal d'ornement (Loureiro *et al.* 2015; Souty-Grosset *et al.* 2016). Elle est désormais présente sur tous les continents (sauf en Australie et en Antarctique), et particulièrement en Europe, où son introduction a eu lieu d'abord en Espagne à partir de 1973 (Souty-Grosset *et al.* 2016). Des introductions secondaires ont ensuite eu lieu dans différents pays et notamment en France, et l'espèce s'est ensuite disséminée à l'occasion d'échappements d'élevage, d'introductions volontaires, ou encore accidentellement lors de l'empoisonnement de lacs (Loureiro *et al.* 2015).

Elle tolère une large gamme de conditions environnementales et vit à la fois dans les milieux courants et stagnants : rivières, lacs, mares, marais, réservoirs artificiels, etc (Loureiro *et al.* 2015). Omnivore généraliste, elle se nourrit principalement de végétaux et de litière, mais se comporte de façon opportuniste et se nourrit selon l'abondance des ressources disponibles (Gutiérrez-Yurrita *et al.* 1998; Correia 2003; Alcorlo *et al.* 2004; Alcorlo & Baltanás 2013). Sa flexibilité trophique et son caractère amphibie lui permettent même d'aller chercher des ressources en milieu terrestre (Grey & Jackson 2012). L'écrevisse de Louisiane se reproduit une à deux fois par an selon les milieux et les zones géographiques (Alcorlo *et al.* 2008), la maturité sexuelle est atteinte dès trois mois et sa durée de vie est de l'ordre de trois ans (Loureiro *et al.* 2015). Dans les mares, elle se reproduit généralement une fois par an à l'automne (Figure 15).

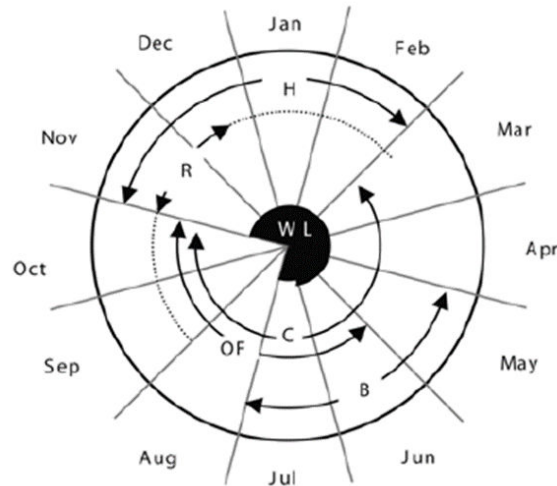


Figure 15. Cycle biologique de l'écrevisse de Louisiane dans des mares permanentes sableuses. H : hibernation, R : recrutement, C : copulation, OF : femelles ovigères, B : creusement de terriers (adapté de Alcorlo *et al.* 2008).

L'espèce peut se déplacer sur des distances allant jusqu'à plusieurs kilomètres en quelques jours en milieu aquatique (Gherardi & Barbaresi 2000; Gherardi *et al.* 2002; Aquiloni *et al.* 2005; Kerby *et al.* 2005). Elle peut également se déplacer en milieu terrestre (Figure 16), et bien que les déterminants de la sortie de l'eau soient mal compris, ils semblent liés aux périodes de fortes précipitations (Grey & Jackson 2012; Marques *et al.* 2015). Sa capacité de résistance à la dessiccation, de l'ordre de 20 heures, lui permet potentiellement de couvrir 1.6 km en milieu terrestre (Banha & Anastácio 2014). La possibilité d'une dispersion passive de l'écrevisse par les véhicules ou les oiseaux d'eau, si elle peut être envisagée, serait toutefois assez marginale (probabilité inférieure à 1% même dans des conditions particulièrement favorables, Anastácio *et al.* 2014; Banha & Anastácio 2014). En revanche, certaines pratiques, notamment de pisciculture comme les empoisonnements massifs, pourraient favoriser son introduction dans de nouveaux milieux. Si certains auteurs se sont intéressés aux routes d'invasion à large échelle spatiale (e.g. Liu *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2013; Quan 2014), sa dispersion à fine échelle est mal connue. En effet, à cause d'introductions secondaires au sein d'une région, il est parfois difficile de reconstituer le patron d'invasion et les voies utilisées naturellement par cette espèce pour se disperser (e.g. Li *et al.* 2012). Pourtant, en milieux discontinus, sa dispersion naturelle pourrait en fait être nettement plus restreinte (Paulson & Martin 2014).

Bien qu'aucune étude ne répertorie d'effets de cette écrevisse sur les milieux de son aire d'origine, elle est responsable de nombreux impacts dans les écosystèmes qu'elle a colonisés en Europe, parmi lesquels on peut citer :

- porteuse saine et vecteur d'*Aphanomyces astaci*, aussi appelé « la peste des écrevisses ». Ce champignon parasite est l'une des causes majeures de déclin des écrevisses natives d'Europe (Souty-Grosset *et al.* 2016).
- déclin des macrophytes dans les écosystèmes aquatiques lié à son herbivorie (Twardochleb *et al.* 2013; Carreira *et al.* 2014)
- creusement de terriers conduisant à l'érosion des berges des milieux et l'augmentation des particules en suspension dans l'eau. Cette activité de bioturbation a un effet indirect, puisque l'augmentation de la turbidité de l'eau diminue la quantité de macrophytes (Geiger *et al.* 2005)
- déclin des communautés natives : macroinvertébrés (Siesa *et al.* 2014), poissons et amphibiens (Twardochleb *et al.* 2013; Souty-Grosset *et al.* 2016). Les effets sur les amphibiens sont développés dans la sous-partie suivante (1c).

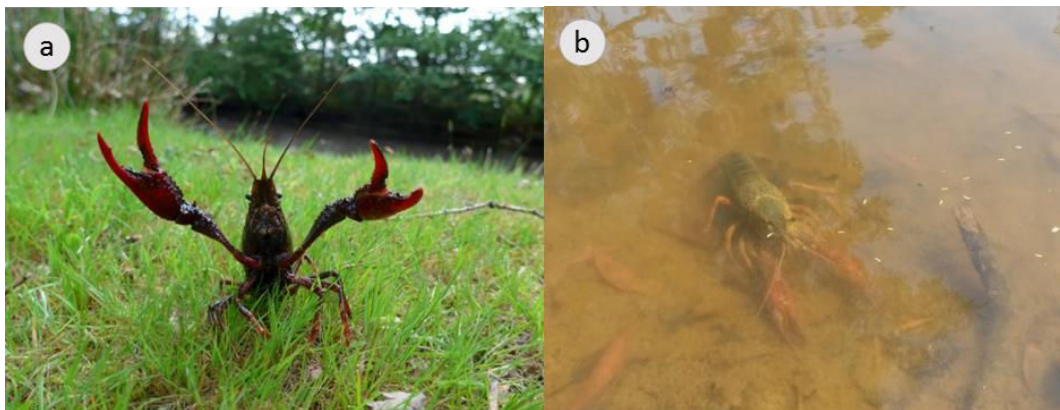


Figure 16. Ecrevisse de Louisiane adulte (a) en posture agressive en milieu terrestre et (b) en milieu aquatique.

Par ses conséquences sur les milieux, elle est à ce jour considérée parmi les “pires” espèces invasives dans le monde (Savini *et al.* 2010; Nentwig *et al.* 2018). Néanmoins, dans certaines régions, elle constitue une ressource alimentaire importante pour certaines espèces de mammifères et d'oiseaux et on considère paradoxalement qu'elle ait pu avoir un effet positif sur la biodiversité (Correia 2001; Tablado *et al.* 2010).

### 1 c. Relations entre populations invasives d'écrevisse de Louisiane et amphibiens natifs

La relation la plus étudiée entre l'écrevisse de Louisiane et les amphibiens est très largement la prédation que l'écrevisse exerce sur les œufs et larves d'amphibiens. En milieu expérimental, l'écrevisse de Louisiane est capable de s'alimenter sur des têtards et larves de différentes espèces d'amphibiens, et semble insensible aux bufotoxines sécrétées par les crapauds (Cruz & Rebelo 2005; Cruz *et al.* 2006a). En milieu naturel, le lien négatif entre les densités de larves et l'abondance d'écrevisse est parfois nettement observé (Ficetola *et al.* 2011, 2012) tandis qu'il est absent dans d'autres cas (Rodriguez-Perez *et al.* 2014). De plus, une recrudescence des taux de blessures des têtards est observée dans les habitats envahis et correspondrait à des attaques sublétales d'écrevisses (Nunes *et al.* 2010). L'absence de reconnaissance de l'écrevisse en tant que prédateur par les larves d'amphibiens, en lien avec le manque de coévolution des espèces, pourrait être à l'origine d'une prédation accrue, et en particulier sur les espèces d'amphibiens de milieux temporaires, moins riches en prédateurs natifs. En effet, l'écrevisse en elle-même ne suscite pas de stratégie anti-prédatrice, contrairement à d'autres prédateurs tels que les larves d'odonates (Gomez-Mestre & Diaz-Paniagua 2011). En revanche, les signaux chimiques émis par les têtards consommés alertent leurs conspécifiques et élicitent rapidement une réponse comportementale d'évitement chez la plupart des espèces (Pearl *et al.* 2003; Nunes *et al.* 2013; Hettyey *et al.* 2016; Ramamonjisoa *et al.* 2018) qui leur permet effectivement d'échapper à la prédation (Polo-Cavia & Gomez-Mestre 2014). Dans les cas où l'écrevisse est reconnue comme un prédateur, une stratégie anti-prédatrice des têtards consiste à réduire leur niveau d'activité pour éviter d'être détectés (Nunes *et al.* 2013, 2014b). Leur morphologie peut également être altérée, par un épaississement de la queue qui, en permettant une meilleure nage, augmenterait les chances de survie, ou servirait simplement de leurre (Nunes *et al.* 2014a; voir cependant Pease & Wayne 2014).

Néanmoins, de par son omnivorie et ses effets sur les habitats, l'écrevisse de Louisiane peut potentiellement interagir avec les amphibiens de multiples autres façons qui sont nettement moins documentées. L'écrevisse montre un comportement agressif envers les tritons adultes (Gamradt *et al.* 1997) et on peut supposer que cela pourrait altérer leur reproduction, leur alimentation, voire même les pousser à choisir un autre habitat de

reproduction, comme cela a été montré chez le triton alpestre (*Ichtyosaura alpestris*) avec des poissons invasifs (Winandy & Denoël 2013, 2015; Winandy *et al.* 2015). Par l'altération de la turbidité de l'eau et la diminution de la quantité de végétation, elle pourrait aussi également affecter les amphibiens en modifiant drastiquement les habitats et les ressources alimentaires disponibles (Arribas *et al.* 2015). Enfin, l'écrevisse est parfois porteuse saine du champignon *Batrachochytridium dendrobatidis*, responsable de mortalités massives chez les amphibiens (Brannelly *et al.* 2015), et pourrait donc causer la diminution des populations d'amphibiens contaminées.

Ainsi, l'abondance des populations d'amphibiens diminue dans nombre de régions envahies par cette écrevisse, ou bien, à défaut de suivi temporel, la distribution des amphibiens peut être négativement reliée à la présence de l'écrevisse (Cruz & Rebelo 2005; Cruz *et al.* 2008; Witte *et al.* 2008; Ficetola *et al.* 2011; Meek 2018). Certains facteurs environnementaux limitant les populations d'écrevisses sembleraient faciliter le maintien des populations d'amphibiens (Kats *et al.* 2013; Díaz-Paniagua *et al.* 2014). Dans certains cas, cette écrevisse constitue même une ressource alimentaire pour d'autres espèces invasives, ce qui finalement limite l'impact sur les amphibiens (Liu *et al.* 2018). Du fait de la variété des relations qui peuvent être entretenues entre l'écrevisse de Louisiane et les amphibiens, une approche prenant en compte les patrons de coexistence observés à la lumière des mécanismes liés à la coexistence est absolument appropriée pour comprendre la coexistence de ces espèces.

### 1 d. Contexte dans le Parc Naturel Régional de Brière

Situé au nord-ouest de la France, près de l'estuaire de la Loire, le PNR de Brière s'étend sur 548 km<sup>2</sup> de bocage et de zones humides (Figure 17). Il comprend 182,5 km<sup>2</sup> de marais, dont les marais dulçaquicoles de Brière (90 km<sup>2</sup>), au centre du PNR, et les marais saumâtres du Mès (16 km<sup>2</sup>). Ces marais sont plus précisément formés d'une mosaïque de prairies inondables, roselières et plans d'eau, entrecoupée d'un réseau de canaux. Ces habitats patrimoniaux abritent des espèces emblématiques comme l'anguille d'Europe *Anguilla anguilla*, le butor étoilé *Botaurus stellaris* ou la guifette moustac *Chlidonias hybrida*. La valeur de conservation des marais de Brière est ainsi reconnue internationalement (site Ramsar, Natura2000, Réserve Naturelle Régionale).

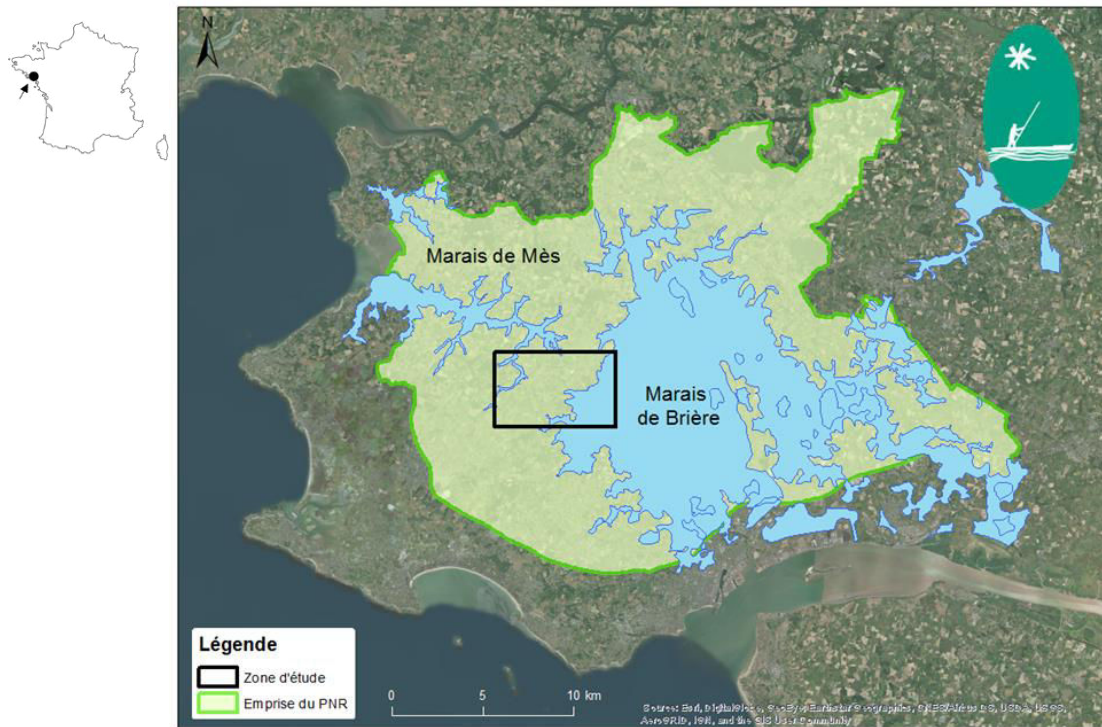


Figure 17. Emprise du Parc Naturel Régional de Brière et position de la zone d'étude

A ce jour, environ 80 000 personnes habitent sur le territoire du Parc. Les activités traditionnelles anciennes (extraction de la tourbe, coupe de roseau, fauche et pâturage extensif) ont aujourd'hui majoritairement disparu, et une agriculture de type polyculture-élevage se maintient sur le territoire. Les niveaux d'eau des marais sont contrôlés de façon à former un cycle annuel d'inondation des vastes surfaces de prairies et roselières durant la période hivernale et d'exondation de celles-ci durant la période estivale. En bordure de marais, les activités anthropiques sont donc fortement contraintes par ce cycle hydrologique, et une frange du paysage est majoritairement utilisée en pâturage extensif (Figure 18). Ce cycle d'inondation connecte périodiquement les mares attenantes aux marais, et permet des flux d'individus entre ces milieux.

De nombreuses espèces invasives sont désormais répandues sur le territoire, comme le ragondin *Myocastor coypus*, la jussie *Ludwigia grandiflora*, et l'écrevisse de Louisiane. Cette dernière s'est échappée d'un élevage amateur éphémère en bordure de marais et a rapidement colonisé le marais de Brière, où elle est présente depuis le milieu des années 1980. Cela constitue la seule source d'introduction connue de l'espèce dans la zone. L'écrevisse a rapidement atteint des abondances très importantes dans les marais de

Brière et régulièrement, des « marées rouges » d'écrevisses sortant de l'eau ont été visibles aux abords des marais. A partir de 2003, l'espèce a également été trouvée dans les marais de Mès. Les marais ont subi de profondes transformations durant ces dernières décennies, avec notamment la diminution drastique des herbiers aquatiques à partir de 1988, qui a été attribuée à l'écrevisse de Louisiane.



Figure 18. Vue aérienne d'une partie de la bordure du marais de Brière en période estivale. La zone d'inondation du marais, délimitée à son maximum hivernal à gauche par la ligne noire, se réduit aux canaux et plans d'eau en été (taches foncées dans la partie est). Le reste du territoire est composé de bocage, de cultures et de quelques îlots de surfaces urbanisées.

Le PNR comporte également, en périphérie des marais, un paysage bocager comprenant un dense réseau de haies et une mosaïque de mares : plus de 1000 mares ont été répertoriées dans la partie ouest du Parc, dont le potentiel de conservation a été identifié plus récemment et qui ont été l'objet d'un intérêt particulier depuis lors.

La zone d'étude est située entre un repli du marais de Mès et le marais de Brière (Figure 19). L'occupation du sol ayant été cartographiée, et la présence de mares inventoriée lors de précédents travaux (Tréguier 2013), une analyse fine du paysage était possible sur ce territoire. Ainsi, il comprend 230 mares sur une surface de 12 km<sup>2</sup>. L'âge précis de l'invasion de chacune des mares par l'écrevisse de Louisiane n'est cependant pas connu. L'écrevisse de Louisiane est la seule espèce d'écrevisse trouvée sur la zone, qui n'a jamais comporté d'espèce d'écrevisse native. Par ailleurs, les espèces proches

morphologiquement et génétiquement des espèces d'amphibiens modèles sont absentes de la zone précise d'étude : on n'y trouve donc ni la grenouille rousse (*Rana temporaria*), ni le triton crêté (*Triturus cristatus*), ni la rainette méridionale (*Hyla meridionalis*), ni le triton ponctué (*Lissotriton vulgaris*), ce qui exclut les possibilités de confusion et d'hybridation.



Figure 19. Vue aérienne de la zone d'étude, entre marais et mares. Les marais de Mès (à l'ouest) et de Brière (à l'est) sont représentés en bleu, ainsi que les 230 mares dont une grande partie n'apparaît pas à l'échelle de la carte.

Un grand nombre de mares a été étudié lors des travaux de ce manuscrit : 157 pour la distribution des amphibiens et 38 pour les densités de larves (chapitre 1), 36 pour la génétique des écrevisses (chapitre 2), 31 pour la génétique des amphibiens (chapitre 3), 20 pour les réseaux trophiques (chapitre 4) et 72 pour la composition des communautés (Annexe). Les mares de la zone d'étude étant situées sur des terrains privés, chaque propriétaire et, le cas échéant, chaque exploitant agricole a été recherché sur la base du cadastre et sollicité en amont de chaque phase de terrain afin d'obtenir la permission d'accéder aux terrains et d'échantillonner les mares. Pour l'ensemble des travaux, cela représente environ 60 particuliers et trois institutions, qui ont tous accédé à notre demande. Un compte-rendu individuel des captures et analyses leur a été fourni après les analyses.

## 2 Méthodes d'étude

### 2 a. Méthodes de captures, estimations de densité et distribution des espèces

Deux méthodes ont été utilisées dans le but d'échantillonner les communautés aquatiques : le piégeage passif et le « *pipe sampling* ». Ces deux méthodes permettent d'obtenir des informations différentes et complémentaires sur les amphibiens, les écrevisses, mais aussi les autres macroinvertébrés aquatiques. Les références des autorisations de captures des amphibiens et des écrevisses pour chaque axe de travail sont indiquées dans les chapitres correspondants. Les écrevisses de Louisiane capturées ont été euthanasiées par congélation selon la réglementation en vigueur.

- Piégeage passif

Les pièges d'interception, ou pièges passifs, permettent d'obtenir des données de présence ou d'abondance d'espèces fiables pourvu que le piège soit adapté au mode de locomotion et à la taille des espèces visées et que le nombre de pièges utilisés soit adapté à la taille de l'habitat à échantillonner. Les pièges Ortmann (Figure 20 a et b), flottants à la surface de l'eau, sont adaptés à la capture d'animaux nageant dans la colonne d'eau et en particulier des amphibiens (Drechsler *et al.* 2010). Les nasses grillagées (Figure 20 c et d) pêchent les animaux marchant au fond de l'eau et de taille supérieure à la maille (ici, 5,5 mm). Elles sont efficaces pour capturer des écrevisses de toutes tailles (Paillisson *et al.* 2011b) et les grands amphibiens marcheurs tels que les tritons adultes.

Toutefois, la détection des espèces par le piégeage passif est soumise à l'activité et la densité des espèces. Ainsi, une espèce peut ne pas être détectée alors qu'elle est présente dans l'habitat échantillonné (faux-négatif). La probabilité de détection est donc inférieure à 1 dans de nombreux cas et le taux réel d'occupation des mares est plus élevé que le taux d'occupation observé. Cette sous-estimation peut fortement biaiser les analyses entreprises sur la base de ces données (Mazerolle *et al.* 2005). Les modèles d'occupation d'espèces ont été développés pour estimer la présence ou l'absence d'espèces à des sites

donnés en tenant compte d'une détection imparfaite au cours d'échantillonnages répétés (MacKenzie *et al.* 2003).

Cette technique d'échantillonnage a été utilisée pour connaître la distribution des amphibiens et de l'écrevisse (chapitre 1), en appliquant donc les modèles d'occupation d'espèces, mais aussi pour la capture des amphibiens, écrevisses et grands dytiques en vue des analyses génétiques et d'isotopes stables (chapitres 2 à 4).



Figure 20. Utilisation des pièges d'interception. (a) Détail d'un piège Ortmann, constitué de 4 entonnoirs décalés, (b) Pièges Ortmann en pêche, flottant à la surface de l'eau, (c) Détail d'une nasse à écrevisses, constituée de deux entonnoirs décalés, (d) Nasse en pêche, posée sur le substrat mais dont la partie supérieure est hors d'eau pour préserver les espèces respirant l'air à la surface.

- Pipe sampling

La plupart des techniques d'échantillonnage de la faune aquatique ne permet pas d'obtenir des données de densité pour les taxons échantillonnés. Par exemple, la zone d'interception des pièges passifs est généralement inconnue (Wilson & Gibbons 2010). Bien que les transects à l'épuisette puissent être standardisés (en longueur, en temps ou en nombre par exemple), ils présentent l'inconvénient notable de détruire la végétation aquatique. Le pipe sampling est un analogue de la technique des quadrats qui peut être utilisé en milieu aquatique pour obtenir des informations de densité répliquables, tout en

ne perturbant qu'une surface minime dans le milieu (Skelly & Richardson 2010). Il s'agit de plonger un cylindre creux dans l'eau d'un geste rapide, et de l'enfoncer dans le sédiment pour former une entité d'échantillonnage close (Figure 21). Les animaux piégés dans le cylindre sont ensuite échantillonnés à l'épuisette jusqu'à épuisement (Werner *et al.* 2007).



Figure 21. Utilisation du « pipe sampling » pour évaluer la densité des taxons des communautés aquatiques.

Cette technique permet d'intercepter tous les taxons aquatiques (écrevisses et poissons compris) mais, en raison de la faible surface échantillonnée (ici,  $0,25 \text{ m}^2$ ), nécessite d'être répétée en plusieurs endroits du milieu en standardisant par exemple la distance entre les réplicats (Skelly & Richardson 2010). A titre d'exemple, au cours de l'échantillonnage de 2015, un seul de ces « pipes » a permis d'échantillonner 466 larves d'amphibiens, ou encore 24 écrevisses. Cela souligne à la fois son efficacité et son inconvénient, qui est de demander un temps d'échantillonnage conséquent lorsque les espèces sont abondantes, comme c'est fréquemment le cas dans les mares.

Cette technique d'échantillonnage a été utilisée pour connaître la densité des amphibiens, et en particulier des larves d'amphibiens, mais aussi de la communauté aquatique, dans l'analyse des patrons de coexistence (chapitre 1) et dans l'étude des réseaux trophiques (chapitre 4).

## 2 b. Les isotopes stables pour étudier les interactions trophiques

Les isotopes stables sont des variants d'éléments chimiques présents naturellement dans l'environnement, comportant un neutron supplémentaire par rapport à l'isotope dominant de l'élément, comme le carbone  $^{13}\text{C}$ , l'azote  $^{15}\text{N}$  ou le soufre  $^{34}\text{S}$  par exemple. Durant la photosynthèse, les producteurs primaires accumulent préférentiellement l'isotope le plus lourd dans leurs tissus, avec une intensité qui varie selon leur métabolisme (McCutchan *et al.* 2003). Ils obtiennent donc une « signature isotopique » particulière par rapport à l'environnement, c'est-à-dire une proportion particulière des variants isotopiques, notée  $\delta$ . Ainsi, le rapport des isotopes du carbone retranché à des référentiels internationaux est noté  $\delta^{13}\text{C}$ . Les tissus d'un consommateur produits grâce à l'ingestion d'une ressource, incorporent cette signature isotopique selon une relation particulière. Les rapports isotopiques du carbone des consommateurs varient peu par rapport à ceux des producteurs primaires, alors que les rapports isotopiques de l'azote des consommateurs sont enrichis en  $^{15}\text{N}$  comparé à ceux de leur ressources (McCutchan *et al.* 2003). Les isotopes stables, et notamment ceux du carbone et de l'azote, sont ainsi des traceurs naturels des ressources utilisées et des niveaux trophiques dans les réseaux trophiques (Post 2002; Michener & Lajtha 2007). C'est une technique désormais largement utilisée pour étudier des questions d'écologie trophique (Fry 2006).

La niche isotopique, c'est-à-dire l'espace isotopique utilisé par un ensemble d'individus, est considérée comme un proxy de la niche trophique (Bearhop *et al.* 2004) et peut être caractérisée grâce à des métriques témoignant de la surface, l'étendue ou la dispersion des points de la niche (Layman *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2011). La structure des réseaux trophiques peut donc être examinée en comparant la position et la taille des communautés dans l'espace multidimensionnel des isotopes, mais également pour comparer la position relative de différentes populations d'une ou plusieurs communautés (Figure 22, Layman *et al.* 2007, 2012; Jackson *et al.* 2011, 2012). Un changement de régime alimentaire dans le temps ou dans l'espace peut ainsi être identifié par une variation de signature isotopique (Vander Zanden *et al.* 1999; Jackson *et al.* 2016). Au-delà des relations de prédation, les isotopes stables permettent d'identifier des processus de compétition puisque deux individus utilisant les mêmes ressources possèdent une signature isotopique similaire.

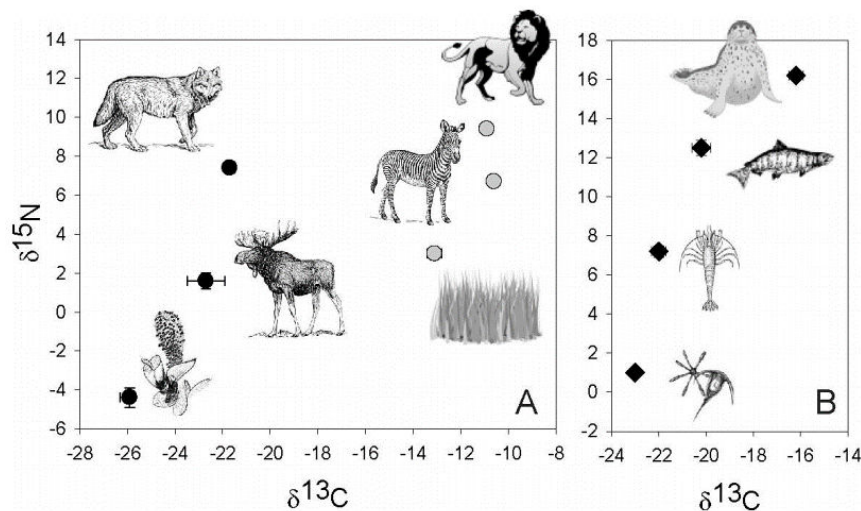


Figure 22. Illustration de réseaux trophiques déterminés avec les isotopes stables du carbone et de l'azote, en milieu terrestre (A) ou marin (B). Les valeurs de l'azote augmentent avec le niveau trophique, du producteur primaire au consommateur. Les valeurs du carbone varient peu entre une ressource et son consommateur. Dans le cas A, il est possible de discriminer la ressource utilisée par un consommateur en se basant sur les différences de valeurs isotopes du carbone des ressources (tiré de Ben-David & Flaherty 2012).

La signature isotopique des ressources assimilées est intégrée dans les tissus sur une large échelle temporelle et les analyses d'isotopes stables sont donc moins sensibles à la stochasticité que les analyses de contenus stomacaux (Nielsen *et al.* 2018). Elles permettent aussi de s'affranchir des difficultés liées à l'identification taxonomique d'éléments dégradés dans le système digestif des individus (Nielsen *et al.* 2018). En revanche, un certain nombre de paramètres doit être estimé dans les analyses d'isotopes stables. D'abord, la différence isotopique entre une ressource et un consommateur, appelé facteur de discrimination trophique (FDT), varie selon les espèces et les ressources consommées (McCutchan *et al.* 2003). Les FDT ont effectivement été calculés pour un certain nombre de couples ressources-consommateurs (Post 2002; Caut *et al.* 2009), et en l'absence de tests spécifiques, les études se basent sur des moyennes de FDT. Les modèles de mélange peuvent être utilisés pour discriminer les ressources utilisées par les individus, mais implique que les ressources soient peu nombreuses et leurs signatures isotopiques nettement différenciées (Phillips 2001), ce qui peut être un obstacle dans les écosystèmes très homogènes ou très diversifiés.

Enfin, au sein d'un même individu, les tissus diffèrent dans leur vitesse d'intégration des ressources et des isotopes (Martinez del Rio *et al.* 2009). Le muscle est le tissu de

référence en isotopie, considéré comme le plus stable et homogène (Pinnegar & Polunin 1999), mais il nécessite l'euthanasie des individus de petite taille, qui n'est généralement pas souhaitable pour des raisons éthiques et épistémologiques (Jardine *et al.* 2011). Les potentiels tissus alternatifs, dont le prélèvement est non-létal, doivent donc être soumis à la comparaison de leurs valeurs isotopiques avec celles du muscle, pour pouvoir être utilisés dans les analyses d'isotopes stables (Kelly *et al.* 2006; Jardine *et al.* 2011; Fincel *et al.* 2012). C'est l'objet de la partie 1 du chapitre 4 qui vise à développer une méthode non-létale de prélèvement chez les amphibiens, en testant l'adéquation entre les valeurs isotopiques du muscle et de la nageoire chez les amphibiens.

## 2 c. La génétique des populations pour étudier la dispersion

Quatre forces évolutives sont responsables de la variation des fréquences alléliques dans une population de taille finie : la mutation et les flux de gènes (liés en général à la dispersion) augmentent la diversité génétique d'une population, tandis que la sélection et la dérive génétique diminuent la diversité génétique (Slatkin 1987). Lorsque l'on souhaite inférer les flux de gènes en particulier, on utilise des marqueurs moléculaires dits « neutres », non-soumis à la sélection, et aux taux de mutation négligeables à des échelles de temps courtes, et qui sont donc influencés principalement par la dispersion et la dérive génétique (Ellegren 2000). Les flux de gènes homogénéisent les fréquences alléliques des populations ; ainsi, la génétique des populations permet d'étudier la dispersion grâce à la variation des fréquences alléliques dans l'espace et/ou dans le temps (Broquet & Petit 2009). Dans le cas de populations structurées spatialement, comme dans les réseaux de mares, la différenciation génétique entre les populations peut être mesurée par le  $F_{ST}$  de Wright (Wright 1931), c'est-à-dire le déficit en hétérozygotes causé par la structure en sous-populations. La taille efficace d'une population ( $N_e$ ) correspond à la taille d'une population idéale qui subirait la même intensité de dérive génétique que la population à l'étude, c'est donc un estimateur direct de la dérive génétique (Wright 1931).

La limitation de la dispersion dans l'espace donne lieu à un patron d'isolement par la distance, dans lequel les populations plus proches spatialement sont également plus proches génétiquement (Rousset 1997). L'identification d'un tel patron permet donc de caractériser les capacités de dispersion d'une espèce dans un environnement donné. Le

paysage séparant deux populations pouvant influencer le comportement de dispersion des individus, la génétique du paysage a vocation à expliciter cet effet en mettant en relation les distances génétiques avec des distances géographiques entre populations (Manel *et al.* 2003).

Dans le cas des espèces invasives, la génétique des populations est utile pour retracer l'histoire d'invasion et identifier des voies de dispersion (Lawson Handley *et al.* 2011). Toutefois, la diversité génétique d'une espèce invasive peut être réduite si la population fondatrice est de petite taille, et cela rend difficile les estimations de dispersion faute de variation suffisante entre populations. De la même façon, des échanges fréquents d'individus entre populations ne permettent pas d'identifier de structure génétique et donc d'identifier l'histoire d'invasion. Ces deux éléments font qu'à une échelle locale comme celle d'un réseau de mares, il est probable que les flux de gènes d'une espèce invasive soient difficiles à identifier.

Chez les amphibiens, des méthodes non-invasives de prélèvement d'ADN ont été validées (Pidancier *et al.* 2003; Broquet *et al.* 2007; Prunier *et al.* 2012), et ici, l'échantillonnage de cellules buccales a été pratiqué à l'aide d'écouvillons (Figure 23).

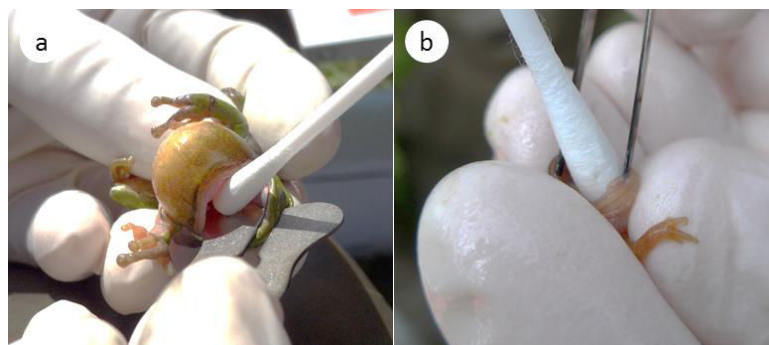


Figure 23. Ecouvillonnage des amphibiens. (a) rainette verte et (b) triton palmé

#### 2 d. Caractérisation des variables explicatives : habitat, communautés locales et paysage

Les filtres d'habitat, des communautés locales, et le paysage sont des composantes pouvant influencer les processus locaux et spatiaux et la composition des communautés d'espèces (HilleRisLambers *et al.* 2012). Une des pierres angulaires de ce travail de thèse

était donc de considérer ces éléments comme des variables explicatives des mesures effectuées sur les amphibiens, au même titre que l'invasion de l'écrevisse de Louisiane. Il était d'autant plus nécessaire de les caractériser que les mares peuvent considérablement varier dans leurs caractéristiques (biotiques et abiotiques) et leur environnement immédiat.

- Habitat : les mares

Les mares sont des écosystèmes considérés comme naturels, faisant partie intégrante du paysage bocager et du patrimoine culturel, mais elles sont en réalité étroitement liées aux activités humaines puisqu'elles ont souvent été creusées pour l'abreuvement du bétail ou le drainage de zones humides, ou jardinées pour des activités récréatives (i.e. maintien des abords à des stades herbacés, empierrement, empoissonnement, etc, Oertli *et al.* 2005; Oertli & Frossard 2013). De par leur petite taille et leur productivité, elles ont une dynamique d'évolution rapide à l'échelle des temps écologiques : d'un stade pionnier, sans macrophytes et sans ripisylve, la quantité de matière organique autochtone augmente progressivement et la mare passe par des stades de fort recouvrement de macrophytes. Puis la mare se comble progressivement par l'accumulation de matière organique au fond et les apports de litière par la ripisylve qui se développe progressivement sur ses berges, jusqu'à des stades avancés de fermeture de canopée, un processus pouvant avoir lieu en quelques années seulement (Figure 24).

Ainsi, il est important de noter que (1) les taxons présents dans les mares varient selon les conditions environnementales, et évoluent donc au cours de cette succession écologique (ACEMAV 2003; Oertli & Frossard 2013) et (2) la persistance des mares au cours du temps nécessite un rajeunissement périodique qui consiste à remettre en lumière en diminuant le couvert de canopée et à exporter toute ou partie de la matière organique du fond de la mare. En Brière, des opérations de restauration ont été conduites à l'automne 2014, l'année avant le début des travaux relatés dans cette thèse, dans des mares choisies sur la base de la présence de populations de tritons marbrés et dans le cadre d'un Contrat Nature. Hormis ces mares, aucune restauration n'a été observée. En conséquence, de nombreuses mares ont atteint des stades successionnels avancés, particulièrement dans des zones en déprise comme la zone d'inondation aux abords du marais, en lien avec la perte d'intérêt pour ces habitats à l'heure actuelle.

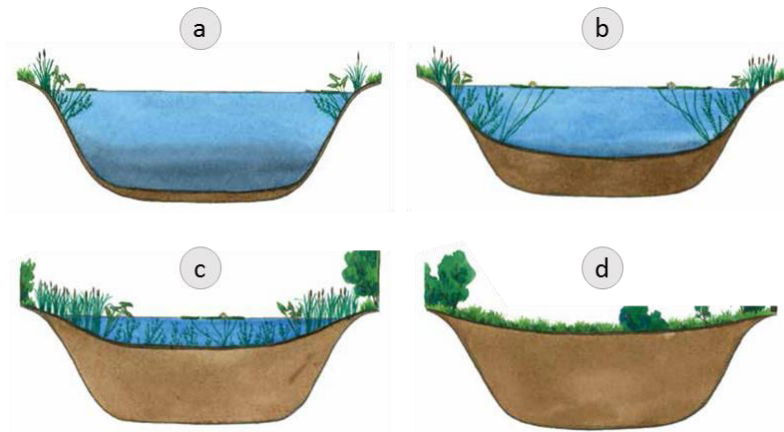


Figure 24. Succession écologique d'une mare. (a) Stade pionnier, avec peu de végétation aquatique et terrestre, (b) avec le temps, la mare est colonisée par la végétation aquatique et la matière organique s'accumule au fond, (c) la profondeur de la mare diminue et le couvert arboré des berges augmente, (d) la mare est comblée par la matière organique et colonisée par une prairie, puis une forêt. Modifié d'après une illustration du Missouri Department of Conservation (2008). Lien : <https://nature.mdc.mo.gov/sites/default/files/downloads/CMAE-Teacher.pdf>

Etant donné cette rapidité d'évolution, certaines caractéristiques (et notamment biotiques) ont été mesurées durant les phases de terrain à chaque fois qu'elles ont été nécessaires aux analyses. Cela inclut le recouvrement de végétation aquatique, le couvert de canopée et la profondeur maximale. En revanche, la surface de la mare a été considérée comme constante sur la période d'étude et mesurée par photointerprétation avec ArcGIS 10 sur la base d'une cartographie fournie par le département de la Loire Atlantique (BD\_ORTHO\_2009).

Les variables d'habitat ont été utilisées dans l'étude de l'abondance et la distribution des amphibiens (chapitre 1). Dans les analyses de réseaux trophiques (chapitre 4), certaines d'entre elles ont été utilisées comme proxy de la quantité de ressources disponibles.



Figure 25. Diversité des profils de mares étudiées

Bien que toutes ces entités aquatiques soient similaires dans leur typologie générale (zone humide d'une surface généralement inférieure à deux hectares, Biggs *et al.* 2005), elles varient considérablement dans leurs caractéristiques physiques (Tableau 1 et Figure 25). Parmi 157 des mares étudiées sur la zone, 80 sont situées dans un contexte agricole, en opposition aux mares récréatives situées à moins de 50 mètres d'une habitation et généralement plus artificialisées. Le périmètre de ces mares était en moyenne  $\pm$  SD de  $71 \pm 62$  m, leur surface de  $463 \pm 1112$  m<sup>2</sup>, et leur profondeur maximale de  $1.2 \pm 1.0$  m.

- Communautés locales



Figure 26. Diversité des macroinvertébrés trouvés dans les mares : (a) Grand dytique adulte, (b) larve de grand dytique, (c) Notonectes, (d) Corix, (e) larve de libellule, (f) larve de Zygoptera.

Au-delà des espèces-cibles considérées dans ces travaux de thèse, les communautés des mares sont riches en macroinvertébrés (Figure 26), qu'il est essentiel de prendre en compte lorsque l'on étudie les interactions locales dans les mares. L'identification à la famille a généralement été suffisante pour les besoins de ces travaux. On peut citer notamment la guildes des prédateurs stricts (grands dytiques de la famille des *Dytiscidae*, la notonecte *Notonecta glauca*, les odonates dont les larves de zygoptères et d'anisoptères), des crustacés détritivores (certains gammares, aselles), des herbivores stricts (*Physa acuta*), des filtreurs (*Corbiculidae*), et des groupes aux régimes alimentaires plus variés (*Corixidae*, larves de diptères dont la famille des *Chironomidae*). Leur densité

a été estimée par pipe sampling, et leur échantillonnage a été nécessaire pour l'analyse des patrons d'abondances de larves (chapitre 1) et les analyses de réseaux trophiques (chapitre 4).

- Paysage

Des zones tampon circulaires ont été utilisées pour décrire le paysage dans un rayon de 200 mètres autour des mares, une méthode couramment utilisée en écologie du paysage (Marty *et al.* 2005; Ficetola *et al.* 2009). Les principales catégories d'occupation du sol représentées sur la zone sont les boisements, les cultures, les prairies, les surfaces urbanisées et les haies (Tableau 1). On peut noter que la zone d'étude étant constituée de petites parcelles, aucune mare ne comprend qu'un seul type d'occupation du sol dans son environnement immédiat.

Tableau 1. Caractéristiques paysagères dans un rayon de 200 mètres autour de 157 mares de la zone d'étude.

Métriques	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Boisements (%)	14.7	12.7	0	60.6
Cultures (%)	27.4	19.5	0	78.0
Prairies (%)	31.2	19.0	0	87.3
Surfaces urbanisées (%)	9.5	9.6	0	44.7
Longueur de haies (m)	1281	631	0	2547

Par ailleurs, selon l'angle d'étude, on peut visualiser les mares de la zone d'étude comme faisant partie d'un réseau unique (tel que le paysage peut être vu par les grandes espèces de mammifères par exemple), deux réseaux séparés (tenant compte du réseau hydrologique, c'est-à-dire des bassins versants), ou beaucoup plus (selon les capacités de dispersion de l'espèce considérée). En se basant sur la délimitation des bassins versants, un réseau de mares peut être lié au marais du Mès, et l'autre au marais de Brière. La distance médiane entre les mares du réseau de Mès et le marais de Mès est de 371 mètres, tandis qu'elle est de 874 mètres entre les mares du réseau de Brière et le marais de Brière. La distance médiane des mares à leur plus proche voisine est de 84 mètres dans le réseau de Mès et 68 mètres dans le réseau de Brière. Les distances entre les milieux aquatiques sont donc extrêmement limitées, ce qui peut favoriser l'expansion d'une espèce invasive

aquatique comme l'écrevisse de Louisiane. Plusieurs types de distances peuvent être utilisés pour caractériser la connectivité entre deux populations selon les hypothèses qui sont faites sur la dispersion des espèces (voir la comparaison de trois types de distances dans McRae & Beier 2007). Dans ce manuscrit, les analyses comprennent les distances Euclidiennes (Figure 27a), qui ne tiennent pas compte de la variation du paysage entre les populations, et les chemins de moindre coût (Figure 27b), qui représentent le chemin optimal pour une espèce donnée (Adriaensen *et al.* 2003).

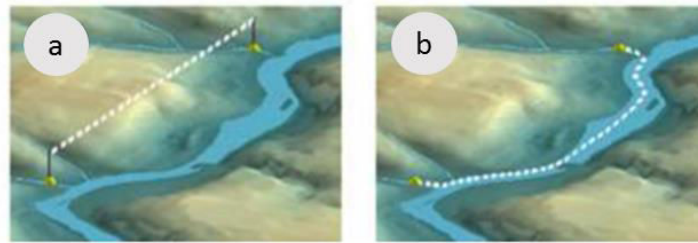


Figure 27. Illustration de distances géographiques séparant deux populations. (a) Distance euclidienne et (b) distance de moindre coût considérant un coût inférieur du milieu aquatique (modifié d'après Kärnä *et al.* 2015).

Le chemin de moindre coût liant deux populations est déterminé sur la base d'une carte de l'occupation du sol, transformée en une carte de coût de traversée de chaque élément du paysage. Les catégories d'occupation du sol retenues (i.e. la résolution thématique) sont variables selon les espèces car elles dépendent des hypothèses faites sur la facilité de traversée des milieux, propre à chaque espèce (Figure 28) : pour l'écrevisse de Louisiane, l'hypothèse a été que l'espèce peut facilement se déplacer en milieu aquatique et non en milieu terrestre, tandis que chez les amphibiens, l'hypothèse a été que leur dispersion est aisée en milieu aquatique et dans les boisements, incluant aussi le linéaire de haies, comparé au reste des occupations du sol (Figure 28). Les coefficients de coût de chaque milieu sont généralement attribués soit en se basant sur des données biologiques (suivi de mouvement), soit à dire d'expert. Néanmoins, dans le cas de paysages présentant peu de types d'occupations du sol, l'essai-erreur peut être utilisé pour trouver la combinaison de coût idéale qui permet d'expliquer la variable réponse considérée, et c'est la méthode qui a été utilisée ici. La valeur de la distance de moindre coût est égale au coût cumulé de tous les pixels traversés pour relier un patch source à un patch de destination (Adriaensen *et al.* 2003).

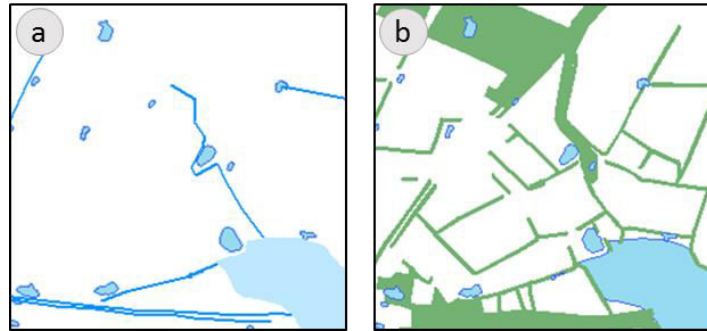


Figure 28. Deux espèces différentes, deux perceptions d'un même environnement ouvrant la voie à des connectivités contrastées entre populations de ces espèces : (a) le paysage binaire tel que testé pour l'écrevisse de Louisiane, comprenant uniquement les milieux aquatiques (marais, cours d'eau, mares) et la matrice terrestre, (b) le paysage testé pour les amphibiens, comprenant les milieux aquatiques, les milieux boisés (haies et boisements) et la matrice terrestre (prairies, cultures, surfaces urbanisées).

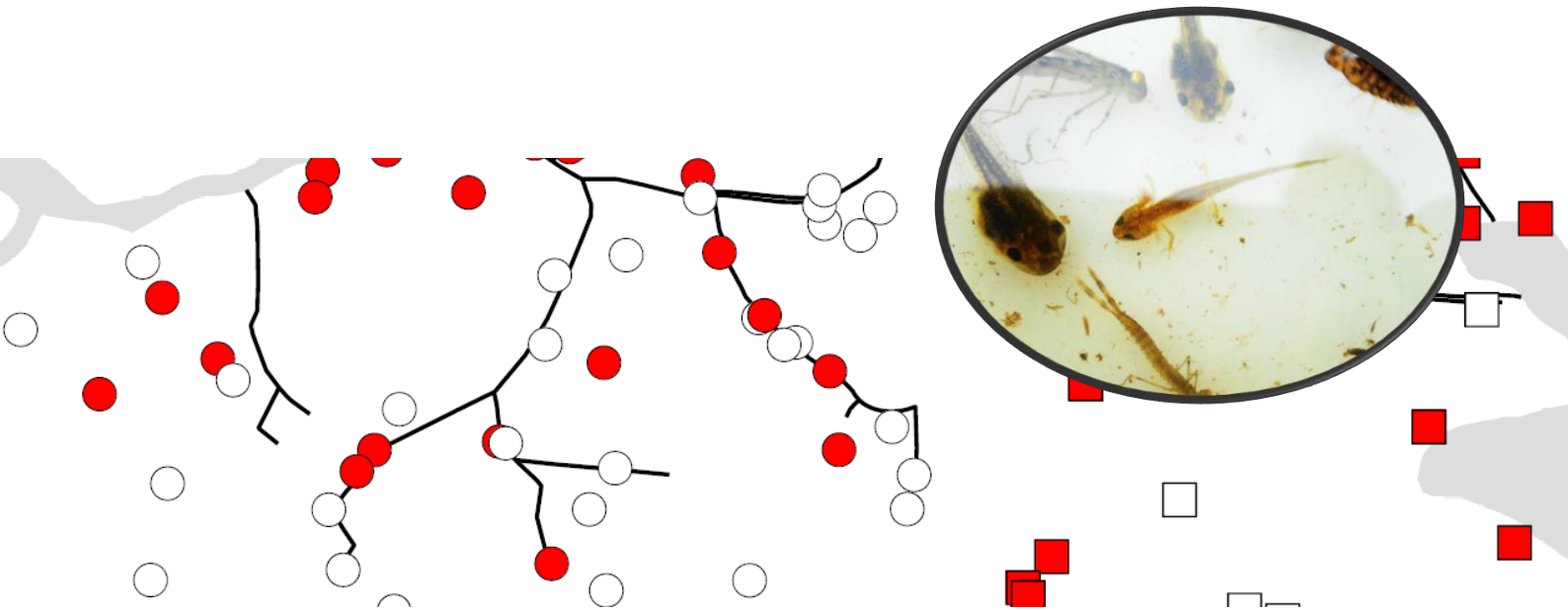
Les données paysagères ont été utilisées dans les analyses de distribution des amphibiens (chapitre 1) et pour les analyses de génétique du paysage (chapitres 2 et 3).

Enfin, les analyses statistiques précises et propres à chaque volet d'étude sont détaillées dans chaque chapitre.

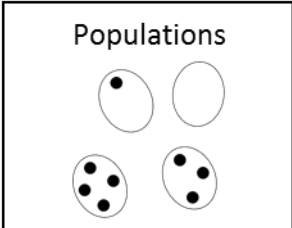


# CHAPITRE 1

Patrons de coexistence d'espèces natives avec une espèce invasive



## Article 1 : Effets variables d'une espèce invasive sur la reproduction et la distribution d'espèces natives dans des réseaux de mares

Niveau d'organisation	Descripteurs	Disciplines et méthodes d'étude
	Densité d'individus Distribution d'espèces	Etudes de terrain Ecologie du paysage

### Résumé :

La coexistence des espèces est une question d'actualité puisque les changements globaux mettent en contact des espèces ayant eu des distributions distinctes dans le passé. L'arrivée d'une espèce non-native dans une communauté est généralement considérée comme délétère pour les espèces natives, mais les études empiriques ont rarement documenté l'importance relative des effets des espèces invasives et de ceux des espèces natives. De plus, les possibilités pour les espèces natives de coexister avec les espèces invasives sont mieux évaluées par l'étude de plusieurs descripteurs des populations natives susceptibles d'être affectés par les espèces invasives, et si possible dans différents contextes.

A l'aide d'études de terrain, nous avons évalué si la reproduction (densités de larves) et la distribution des sites de reproduction de plusieurs espèces d'amphibiens étaient liées à l'écrevisse de Louisiane *Procambarus clarkii*, comparé à d'autres prédateurs natifs, des caractéristiques d'habitat et du paysage, dans deux réseaux de mares différant par l'intensité de l'invasion.

L'écrevisse était négativement associée aux densités de larves d'une espèce de triton, mais pas à celles d'une grenouille. Sa taille d'effet était semblable à celle de prédateurs natifs, et nettement plus faible que celle du couvert arboré des mares. Les amphibiens étaient globalement répandus sur les deux réseaux de mares. Dans les deux réseaux, la présence de poissons était un prédicteur négatif de l'occupation des mares par les amphibiens, mais l'écrevisse était négativement liée à la distribution d'une espèce

seulement et cela dans un seul réseau. Un petit nombre de variables environnementales, notamment le recouvrement de végétation aquatique, étaient aussi associés à la distribution des sites de reproduction des amphibiens.

Les associations négatives entre les amphibiens et l'écrevisse de Louisiane étaient donc loin d'être la règle. Ces résultats sont moins alarmants que les conclusions établies dans la majorité de la littérature sur la sensibilité des amphibiens à l'écrevisse de Louisiane. Des facteurs environnementaux et des différences dans les traits écologiques entre espèces ont été avancés pour expliquer les effets variables de l'écrevisse de Louisiane sur les amphibiens. De plus, l'impact sur la reproduction des amphibiens n'a pas systématiquement résulté en un effet sur leur distribution, même dans le réseau le plus envahi. Tous ces résultats soutiennent l'idée que l'influence des espèces invasives peut être très disparate, particulièrement lorsque l'environnement est adéquat pour les communautés natives.

## **Variable effects of an invasive species on the reproduction and distribution of native species in pond networks**

Nadège Bélouard, Eric J. Petit, Jean-Marc Paillisson

*Adapted from an article accepted in Freshwater Biology*

### **Abstract**

The question of species coexistence is a topical issue as global changes put in contact some species that had distinct distribution ranges in the past. The arrival a non-native species in a community is generally considered as deleterious for native species, but empirical studies seldom documented the relative importance of the effects of invasive species as compared to other factors. Besides, the possibilities for native species to coexist with invasive species are expected to be better assessed by the joint investigation of several descriptors of native populations susceptible to be affected by the invaders, and if possible under different contexts.

Using survey data, we evaluated whether the reproduction (larval densities) and the distribution of breeding sites of several amphibian species were related to the invasive red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, as compared to other native predators, habitat and landscape features, in two pond networks that differed in invasion intensity.

Crayfish was negatively associated to the larval densities of a newt species but not to those of a frog. Its effect size was similar to that of some native predators, and much smaller than that of the canopy cover of ponds. Amphibians were globally widespread in the two pond networks. In both networks, fish presence was a consistent negative predictor of pond occupancy by amphibians, but crayfish presence was negatively related to the distribution of only one species in each network. A few environmental variables, notably the aquatic vegetation cover, were also associated with the distribution of amphibian breeding sites.

Negative associations between amphibians and the red swamp crayfish were thus far from being the rule. These findings were less alarming than the conclusions drawn from the majority of the literature on the sensitivity of amphibians to the invasive red swamp crayfish. Environmental factors and differences in ecological traits between native species

were put forward to explain the variable effects of the red swamp crayfish on amphibians. Moreover, the impact on the reproduction of amphibians did not systematically result in effects on their distributions even in the most invaded area. All these findings support the idea that the influence of invasive species can be very uneven, especially when the environment is suitable for native communities.

**Keywords:** Amphibians - Breeding habitat - Larval densities - *Procambarus clarkii* - Species coexistence

## Introduction

One of the fundamental questions in the field of modern ecology is to understand how species can coexist in a community (Leibold *et al.* 2004; Chase & Bengtsson 2010). This issue is of particular importance as biodiversity currently goes through drastic human-mediated disturbances that modify species distributions (e.g. climate change, introduction of non-native species outside of their range, Groom 2006; Brook *et al.* 2008; Primack 2010). Some species that previously had distinct distribution ranges are now put in contact. The arrival of a new species in a community results in new interactions (competition, predation, etc.) with resident species, which can affect their abundance and demography, and ultimately the community structure (David *et al.* 2017). Invasion biology takes part in the issue of species coexistence by assessing, understanding, and predicting how non-native species affect resident species (Lockwood *et al.* 2007; Davis 2009).

Extensive empirical studies have evidenced that non-native species can dramatically impact native species populations in diverse ways (e.g. predation, competition, hybridization, habitat alteration), sometimes leading to local extinctions, especially on islands (Bruno *et al.* 2005; Medina *et al.* 2011; David *et al.* 2017; Mollot *et al.* 2017). As a result, invasive species are repeatedly pointed at as a major threat to biodiversity (Vitousek *et al.* 1997). Theoretical or empirical literature about alternative outcomes for native species is marginal (e.g. Davis *et al.* 2011, 2015; Mazerolle *et al.* 2014) and heavily criticized (Richardson & Ricciardi 2013). However, niche theory predicts that species coexistence is possible owing to niche differentiation, and this has also been supported in

the case of native and invasive competitors (e.g. Bonesi & Macdonald 2004; Laha & Mattingly 2006; Peters & Lodge 2013). Prey availability can also promote coexistence between native preys and invasive predators (Liu *et al.* 2018), and, in some cases, invasive species even facilitate native species by increasing their food resources or improving their habitat quality (Rodriguez 2006). Thus, species coexistence is mediated by multiple forces which can result in uneven effects of invasive species across species and environmental contexts (Verhoef & Olff 2010). Besides, it is often implicitly assumed that an observed negative effect on the survival of a particular life stage of a population compromises its persistence; however, this transfer highly depends on the population dynamics of the given species, as revealed by elasticity and sensitivity analyses (Benton & Grant 1999). Whether an invasive species increases the probability of local species extinctions is therefore not straightforward (Gurevitch & Padilla 2004). For these reasons, the issue of coexistence between native and invasive species would greatly benefit from jointly considering different descriptors of native populations (Strayer *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2016).

Amphibians are severely declining worldwide as a result of a variety of anthropogenic factors, and biological invasions are cited among the main threats for this imperiled vertebrate group (Kats & Ferrer 2003; Beebee & Griffiths 2005; Bucciarelli *et al.* 2014). They include the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), which is considered as one of the most widespread and worrisome invasive species, especially in Europe (Souty-Grosset *et al.* 2016). Amphibians interact with this crayfish during the aquatic stage of their life cycle. In laboratory conditions, the red swamp crayfish readily eats eggs and larvae of a range of amphibian species (Cruz & Rebelo 2005; Cruz *et al.* 2006a), so that predation is generally considered as the critical interaction between crayfish and amphibians, even if other effects are also invoked (competition, habitat alteration and disturbance, e.g. Gamradt *et al.* 1997; Arribas *et al.* 2015). In the wild, before-after studies have shown declines of amphibians attributed to the invasive crayfish (Cruz *et al.* 2008; Witte *et al.* 2008). The main message conveyed is that the red swamp crayfish highly affects amphibian populations, but the intensity of the impacts are actually rather variable between species and studies (Cruz & Rebelo 2005; Ficetola *et al.* 2011, 2012; Rodriguez-Perez *et al.* 2014). Accounting for the effects of additional environmental factors in natural communities (such as habitat and landscape features, and native predators) is therefore

highly welcome to understand the relative effects of the red swamp crayfish on native amphibians (Bucciarelli *et al.* 2014). Besides, Ficetola *et al.* (2011) considered declines of larval densities of amphibians as early predictors of local extinctions due to the invasive red swamp crayfish. Nevertheless, they acknowledged this prediction can be challenged by multiple factors, and information on species distribution in sites with long invasion history is needed to understand the long-term impact of the crayfish.

The present survey-based study aims at exploring the question of the coexistence of native amphibians with the invasive red swamp crayfish in pond networks by jointly considering two complementary population descriptors: larval densities and the distribution of breeding sites in several amphibian species. First, we determined if larval densities of amphibians were linked to the red swamp crayfish abundance while also considering native predators and pond characteristics. Second, we tested if the distribution of amphibians was related to the presence of the red swamp crayfish, fish and other environmental factors, in two pond networks that differed in invasion intensity. Convergent negative correlations of crayfish with both the reproduction and the distribution of amphibians would indicate that the local impact of the red swamp crayfish triggered local extinctions of populations, and this effect is expected to be greater in the most invaded pond network. By contrast, whatever the relationship between crayfish abundances and larval densities, the absence of a negative relationship between crayfish presence and the distribution of amphibians in breeding sites would indicate that amphibian populations persisted despite the presence of the invasive crayfish.

## **Materials and methods**

### **1 Study areas**

The Regional Natural Park of Brière (RNPB), northwestern France (47°23'N, 02°12'W) includes large marshes and a high density of ponds (around 15 ponds/km<sup>2</sup>) within a hedgerow landscape. The red swamp crayfish started colonizing the largest marsh, the marsh of Brière, in the early 1980s, when a few individuals escaped from a nearby crayfish farm. It was first recorded in another adjacent marsh, the marsh of Mès, in 2003. From

these marshes, crayfish naturally colonized ponds in the surroundings through small watercourses (Tréguier *et al.* 2018). From this result and because aquatic continuity was totally disrupted between the two marshes, ponds were classified into two distinct networks following catchment delineation (Figure 1): the network of ponds of the catchment of Brière (hereafter network of Brière, 3.6 km<sup>2</sup>, 83 ponds) and the network of Mès (2.6 km<sup>2</sup>, 74 ponds).

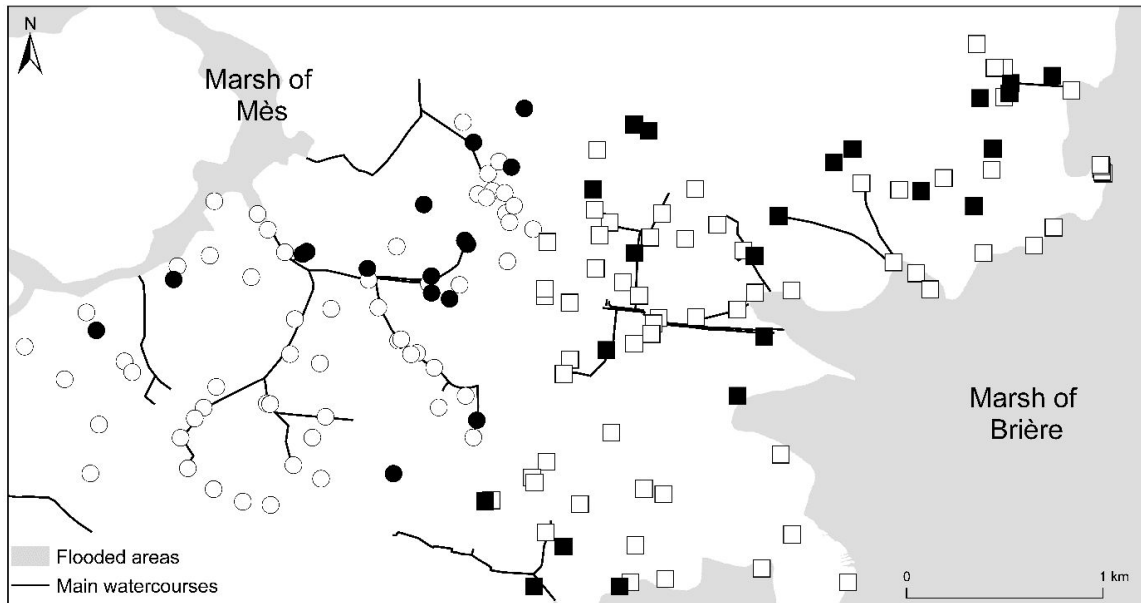


Figure 1. Spatial location of the 74 ponds within the network of Mès (circles) and the 83 ponds within the network of Brière (squares). Black symbols indicate ponds where larval densities were studied. Some ponds appear superimposed due to the spatial scale.

The present study focused on three amphibians hosted in ponds: the agile frog (*Rana dalmatina*), the palmate newt (*Lissotriton helveticus*) and the marbled newt (*Triturus marmoratus*). The 157 ponds of the two networks were monitored in 2011 and 2012 to assess the distribution of amphibians and crayfish, and 38 ponds were sampled in 2015 to quantify larval densities (Figure 1). These 38 ponds were selected to represent the diversity of environmental conditions and red swamp crayfish abundances recorded in the study area. Nevertheless, we excluded fish ponds because the drastic effect of fish on amphibians is widely documented (e.g. Hecnar & M'Closkey 1997), and we concentrated our efforts on assessing the effects of other pond descriptors. All applicable ethical guidelines for the use of amphibians and crayfish in scientific research have been followed as stipulated in the licenses delivered by local authorities (license numbers 45/2011, 15/2012 and 10/2015 of the Prefecture de la Loire-Atlantique).

## 2 Densities of amphibian larvae and potentially interacting species

Ponds were visited every two weeks from April 4<sup>th</sup> 2015 to monitor larval development. Sampling occurred at the beginning of larval metamorphosis, from April 29<sup>th</sup> until June 11<sup>th</sup> depending on ponds and species. We used pipe sampling, which consists in quickly plunging a 0.25-m<sup>2</sup> hollow cylinder through the water column into the sediment, thus providing a closed sampling unit (see a complete description in Skelly & Richardson 2010). Sampling was repeated approximately every 10 m along the shoreline, in the limits of 4-10 samples per pond (204 in total, mean pond perimeter: 59 m, range: 26-170 m). All trapped amphibians (larvae and adults) were collected with a dip net (4-mm mesh) until depletion, identified and counted down to the species level. Adult agile frogs stay in ponds only a few days to lay their eggs, hence they were not sampled. A specific sampling session was done in mid-May to record the densities of native predator species: *Dytiscidae*, *Notonectidae*, *Corixidae*, *Anisoptera*, *Zygoptera* and adult palmate newts. A complementary 24-h trapping survey was also used to catch larger predators, namely red swamp crayfish and adult marbled newts. Traps (length × width × height: 50 × 29 × 21 cm, 5.5-mm mesh with two side entrances, 4-cm inner opening diameter, efficient at catching these species, Paillisson *et al.* 2011b) were set at approximately 5-m intervals along the shoreline, in the limits of 8-20 traps per pond (407 in total). These traps are efficient at catching these targeted species (Paillisson *et al.* 2011b). Depending on sampling methods, results were expressed in densities (mean numbers of individuals.m<sup>-2</sup> using pipe samplers) or abundances (mean numbers of individuals caught per trap per day using traps).

## 3 Survey of amphibian breeding sites

Trapping is a suitable technique to monitor amphibian and crayfish presence/absence over large-scale surveys. We used two types of traps: the first was described above, and the second had only one side entrance with a 5-cm inner opening diameter (length × width × height: 55 × 17 × 17 cm, 5-mm mesh). They were set alternately at 10-m intervals along the shoreline, in the limit of 12 per pond (mean pond perimeter: 72 m, range: 12-425 m), and laid over 24 h. We accounted for the fact that the largest ponds were under-sampled in the statistical analyses (see below). All trapped amphibians, crayfish and fish were counted by species. Ponds were visited several times to optimize species detection: in

March 2011, May 2011, and May 2012; 101 ponds were sampled three times, 10 twice, and 46 only once. For each pond, trapping data were converted into detection or non-detection events for each of the three amphibian species at each sampling date. Fish were accounted as present in a pond if they were trapped at least once. An environmental DNA (eDNA, *i.e.* the molecular detection of target species from environmental samples) experiment was performed concomitantly to the trapping session to detect the presence of the red swamp crayfish (see Tréguier *et al.* 2014). Crayfish were accounted as present in a pond when they were detected in at least one of the PCR replicates by eDNA, or in traps. Detection and site occupancy by the crayfish were fully examined in two companion studies (Tréguier *et al.* 2014, 2018). In short, the species was detected in 62% of the ponds of the network of Brière and 37% of the ponds of the network of Mès (see Figure S1). The two networks therefore contrasted in invasion intensity because of the time since invasion and the proportion of invaded ponds.

#### 4 Environmental variables

To account for the natural evolution of ponds, maximum pond depth (cm) and aquatic vegetation cover were measured twice: in 2012 for exploring the distribution of breeding sites (and converted into three classes: <25%, 25-75% or >75%), and in 2015 for the study of larval densities (and used as a continuous variable). Pond canopy cover was assessed in 2015 and only used to investigate its effects on larval densities of amphibians (three categories: herbaceous riparian vegetation, partially surrounded by shrubs, or surrounded by trees). By contrast, pond size (m<sup>2</sup>) was considered constant over the study period and measured using aerial photointerpretation using ArcGIS 10 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, USA) and a map provided by the General Council of Loire-Atlantique (BD ORTHO 2009). Landscape metrics were measured in the same manner: forest cover (%), length of hedgerows (m), *i.e.* some key descriptors of terrestrial habitats for amphibians, and the number of nearby ponds, all in a 200-m buffer radius around each pond. This buffer size is in the range of distances proved to be important for amphibians (Ficetola *et al.* 2009). Since meteorological conditions influence the detectability of amphibians (e.g. Mazerolle *et al.* 2005), we calculated the mean daily air temperature (°C) in each trapping day in 2011 and 2012 (Météo France, Saint-Nazaire station). Daily precipitations were not used as they were scarce at this time of the year.

## 5 Statistical analyses

All analyses were done with R 3.5.0 (R Core Team 2018) using the packages *usdm* (Naimi *et al.* 2014), *MuMIn* (Barton 2009), *glmulti* (Calcagno 2013), *unmarked* (Fiske & Chandler 2011), and *AICcmodavg* (Mazerolle 2017). Habitat and landscape characteristics of the two pond networks were compared using Mann-Whitney U tests or chi-square tests. Correlations between predictive variables were inferior to 0.38 for the study of larval densities and ranged from -0.48 to 0.47 depending on pond networks for the investigation of the distribution of breeding sites. Datasets did not show signs of multicollinearity (variance inflation factors < 2). All continuous variables were standardized.

Linear models were used to assess the relationship between densities of amphibian larvae (log-transformed to better fit the model) and the candidate variables: the four habitat variables (pond size, pond depth, aquatic vegetation cover and canopy cover) and the eight potentially interacting species (*Dytiscidae*, *Notonectidae*, *Corixidae*, *Anisoptera*, *Zygoptera*, adult palmate newts, adult marbled newt and red swamp crayfish). As no biological hypothesis seemed prevalent, we tested all possible additive combinations of up to three of these candidate variables, to limit the complexity of models. Models were ranked by the Akaike's information criterion corrected for small sample sizes (Burnham & Anderson 2003). Model-averaged estimates of the variables were calculated over different model selections:  $\Delta AICc < 2$ ,  $\Delta AICc < 4$ ,  $\Delta AICc < 7$ , or the cumulated  $wAICc < 0.95$ , and because results were qualitatively identical, we presented only the results from  $\Delta AICc < 2$  (but see the Results section). Models with  $\Delta AICc < 2$  with the same variables as the top model but including an additional non-informative variable were discarded (Arnold 2010).

Site occupancy models have been developed to assess species distribution patterns while accounting for imperfect detection using multiple visits (MacKenzie *et al.* 2003). These models are particularly useful for survey data on cryptic or elusive species, such as aquatic species (Mazerolle *et al.* 2005). Detection probabilities for each amphibian species were first modeled alone to limit the number of models. Candidate covariates accounting for variation in species detection were: survey methods (trap type), sampling effort (number of traps per pond), temporal variables (Julian date, month, year), and

meteorological conditions (mean air temperature). All additive combinations of up to two of these covariates were computed (except the nonsensical combination Julian date + month), and the first-ranked model (based on AIC) was selected for subsequent analyses. In all cases, the first-ranked model was always more competitive than the others (AIC at least 2 units lower), except for the marbled newt for which two and five models had a  $\Delta\text{AIC} < 2$  depending on networks (see the Results section). However, the choice of any of these models for the marbled newt did not impact the results of the second step of analysis (see below), so that the first-ranked model was selected for each of the two networks. In the second step of analysis, site occupancy (*i.e.* the distribution of breeding sites) was modelled using landscape (forest cover, length of hedgerows, nearby ponds) and habitat variables (pond size, pond depth, aquatic vegetation cover), crayfish and fish presence, while accounting for detection probabilities with the covariates selected at the previous step of analysis. All additive combinations of up to three variates of occupancy were computed. Here again, estimates of variables were model-averaged over different model selections ( $\Delta\text{AIC} < 2$ ,  $\Delta\text{AIC} < 4$ ,  $\Delta\text{AIC} < 7$ , or the cumulated  $w\text{AIC} < 0.95$ ). Since results were qualitatively identical (see the Results section), we only retained the selections with  $\Delta\text{AIC} < 2$ . Additionally, goodness-of-fit of the first-ranked occupancy model was assessed using 1,000 parametric bootstraps of the estimated Pearson chi-square statistic. Overdispersion occurred in the models for palmate newts, so that models were ranked by QAIC and standard errors were inflated by  $\sqrt{\hat{c}}$  (MacKenzie & Bailey 2004) with  $\hat{c} = 1.75$  and  $\hat{c} = 1.95$  in the networks of Mès and Brière, respectively.

## Results

### 1 Predictors of larval densities

Breeding activities were detected in all 38 ponds for the agile frog and the palmate newt, but in only nine ponds for the marbled newt. Mean density ranged from 0 to 188 tadpoles.m<sup>-2</sup> for the agile frog and from 0 to 205 larvae.m<sup>-2</sup> for the palmate newt. Marbled newt larvae were found in only three ponds, so these data were not used for the statistical analyses. In parallel, 3,721 macroinvertebrates were caught, including 130 crayfish in 10

ponds, as well as 199 adult palmate newts and 153 adult marbled newts (see details on captures in Table S1).

For the agile frog, the first-ranked model was largely better supported than the other models (Table S2). For the palmate newt, two models showed similar AIC values (Table 1) but only the first was retained as they included the same two variables and were very close in AICc (Table S3).

Table 1. Model selection with  $\Delta AICc < 2$  used to explain the larval densities of the agile frog and the palmate newt. AICc = AIC corrected for small sample sizes. Cum. wAICc = cumulated weight of AICc.

Species	(Intercept)	Pond size	Canopy cover	Crayfish	<i>Dytiscidae</i>	Palmate newts	Marbled newts	AICc	$\Delta AICc$	wAICc	Cum. wAICc	R <sup>2</sup>
Agile frog												
	1.95		-1.55			-0.64	-0.70	130.30	0.00	0.74	0.74	0.51
Palmate newt												
	2.73		-1.60	-0.85				125.05	0.00	0.25	0.25	0.54
	2.97		-1.49	-0.88	-0.02			126.29	1.24	0.13	0.38	0.56

Densities of palmate newt larvae were negatively associated to crayfish abundances (estimate  $\pm$  95% CI:  $-0.85 \pm 0.37$ ), but densities of agile frog tadpoles were not (Table 1, see also model-averaged estimates following the different selection criteria used in Table S4). Densities of tadpoles were linked to abundances of adult marbled newts ( $-0.70 \pm 0.39$ ) and palmate newts ( $-0.64 \pm 0.40$ ). The confidence intervals of these three predictors largely overlapped. Furthermore, the larval densities of both species decreased in a similar way with canopy cover ( $-1.61 \pm 0.71$  for the palmate newt, and  $-1.55 \pm 0.77$  for the agile frog), its effect size was twice higher than those of the other significant variables. None of the native insects were significantly related to larval densities of amphibians.

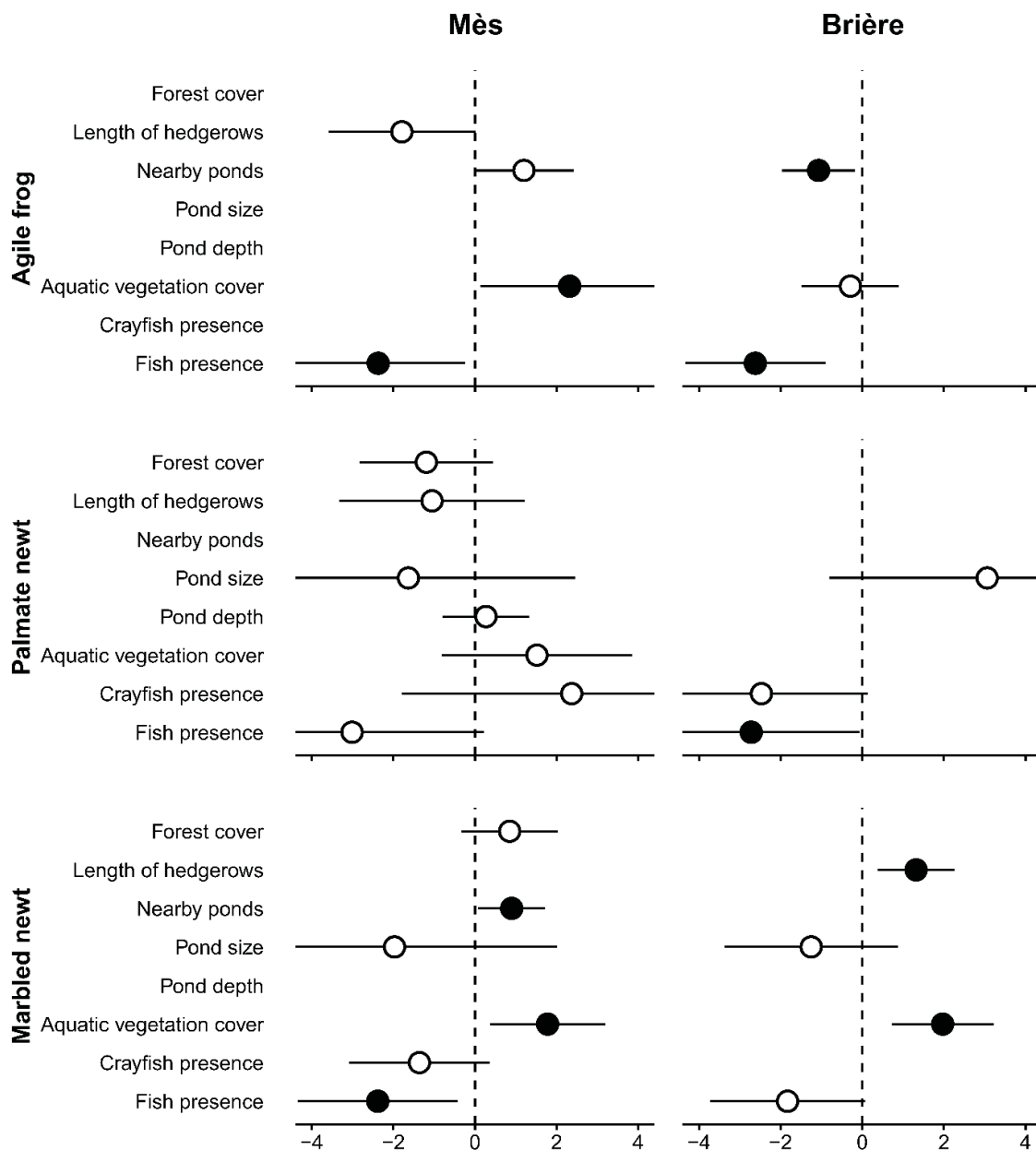


Figure 2. Model-averaged estimates of variables explaining the distribution of breeding sites of amphibians. 95% confidence intervals are provided (horizontal bars), and estimates are in black when they do not encompass zero. Some variables were not retained in the selection of models. Estimate values are reported in Table S14.

## 2 Predictors of the distribution of amphibian breeding sites

Two of the three amphibians were widespread in both networks; estimated occupancies  $\pm$  95% CI were  $0.65 \pm 0.15$  and  $0.70 \pm 0.15$  for the agile frog and  $0.79 \pm 0.11$  and  $0.72 \pm 0.12$  for the palmate newt, respectively in the networks of Mès and Brière (see additional information in Tables S5 and S6, and species distribution maps in Figures S2

and S3). The marbled newt was less common in both networks:  $0.27 \pm 0.13$  and  $0.31 \pm 0.12$  (see Tables S5 and S6, and Figure S4). On average, ponds of the network of Mès were surrounded by a lower proportion of forest cover but a longer length of hedgerows than were ponds of the network of Brière (Table S7). Pond networks did not differ in any other environmental characteristics nor in the proportion of ponds with fish (Table S7). Crayfish occurrence was therefore the only major difference between networks, the network of Brière being more invaded than the network of Mès (Figure S1). Model selections retained one to eight models depending on species and networks (see model selections in Tables S8 to S13; and comparisons of model-averaged estimates in Table S14). Fish presence (see its distribution in Figure S5) was negatively related to the distribution of all three amphibians in both networks (estimates ranged from -1.83 to -3.01, Figure 2). In all cases, except for the palmate newt in Brière, amphibian occurrence was associated with aquatic vegetation cover with variable effect sizes (Figure 2, see the map in Figure S6). Other associations between amphibian occurrence and candidate variables were observed but they varied between species and networks without any general pattern (Figure 2). Among them, the importance of crayfish presence was apparently unpredictable. A negative correlation between the crayfish and palmate newt distributions was noted in the most invaded network, whereas the estimate was positive (but with a large uncertainty) in the other network. Lastly, crayfish presence was negatively related to the marbled newt occurrence in the least invaded network only, and it was not selected for the agile frog in either network.

## Discussion

The links between the red swamp crayfish and the two population descriptors studied (larval densities and species distribution) highly varied between amphibian species and networks. Besides, some environmental factors or native species were as important for amphibians as compared to the red swamp crayfish. Results were first interpreted independently, then we discussed whether the introduced crayfish and native amphibians can coexist in ponds.

## 1 Variable relationships between larval densities of amphibians and crayfish

The red swamp crayfish was negatively associated to the larval densities of the palmate newt, but not to those of the agile frog. Elsewhere, larval densities of the whole amphibian community, including the agile frog and the smooth newt *Lissotriton vulgaris* (a species very close to the palmate newt), were negatively related to the red swamp crayfish (Ficetola *et al.* 2011), even though crayfish densities were lower than in the present study (pipe sampling data used for the comparison: median density of 3 ind.m<sup>-2</sup> in colonized ponds, with a maximum of 23 ind.m<sup>-2</sup>). The link between larval densities of amphibians and crayfish was found to be of variable intensity depending on species in other studies (Gamradt *et al.* 1997; Cruz & Rebelo 2005), and was not found for the Mediterranean tree frog *Hyla meridionalis* in the Camargue (Rodriguez-Perez *et al.* 2014).

Differences in ecological traits between amphibian species could play a major role in the extent of the interactions they have with crayfish, and in turn, the intensity of impacts. Given larval densities depend on both the number of breeding adults (i.e. egg production) and larval survival, several hypotheses can be drawn to support this idea. Agile frog and palmate newt had similar breeding phenology and were studied in the same ponds, but larvae of the two species were probably differently exposed to crayfish: tadpoles are usually more often present in the water column, whereas larval newts spend more time at the bottom of ponds, closer to benthic crayfish (observed in Cruz & Rebelo 2005; Rodriguez-Perez *et al.* 2014). Differences in the intensity of interactions with crayfish can also originate from the behavior of adult amphibians since newts spend a long period in ponds contrary to agile frog breeders. Agonistic interactions with crayfish would affect newt oviposition, and in turn larval densities (see Winandy *et al.* 2015). Additionally, the intensity of the interactions between crayfish and amphibians could vary between study areas. For instance, in typical shallow Mediterranean ponds (Beja & Alcazar 2003), the risk for a tadpole to be predated by a crayfish is supposed to be higher because of a lower spatial segregation. Besides, the functional response of a predator itself (the relationship between prey consumption by a predator and prey density, Holling 1965) can be significantly affected by environmental characteristics and prey availability (Lipcius & Hines 1986; Kratina *et al.* 2007). Since the red swamp crayfish is an omnivorous generalist (Loureiro *et al.* 2015), predation on amphibian larvae could be much lower in very productive ecosystems (see Table S1 for partial data on the rich

aquatic communities we recorded). Finally, exploring how larval densities of amphibians could be influenced by the population structure of the invasive species could be an interesting avenue. Indeed, an ontogenetic shift in the diet of individuals has been documented in the red swamp crayfish (e.g. Correia 2002), and it could play a role in the severity of the impacts on native communities.

Assessing the relative importance of native predators, environmental features and invasive species is helpful to better determine the threats on native species. Densities of agile frog tadpoles were negatively associated with adult newts, and this result is in line with the well-known important predation of newts upon anuran larvae (e.g. Wilbur *et al.* 1983; Smith 2006). Interestingly, the effect sizes of the invasive crayfish and native adult newts on amphibian larvae were very similar, something that was untested in close-related studies. This finding supports theoretical studies which suggest that non-native predators might have on average no more negative impact on native species than when predators and preys have coevolved together (e.g. David *et al.* 2017). Beyond the issue of the origin of the predator (i.e. native vs non-native), the most important is that the global predation pressure upon palmate newt larvae is increased by adding one more predator, which could have significant consequences on population dynamics. Lastly, native insects did not have a significant effect on amphibians here, while they did in Ficetola *et al.* (2012). We also found that canopy cover strongly influenced the larval densities of both amphibian species. Whether canopy cover influenced adult oviposition, larval survival, or both was not possible to disentangle here, but previous works demonstrated that fitness of amphibian larvae was lower in less productive, closed-canopy ponds (Skelly *et al.* 2002; Schiesari 2006). It is noteworthy that the effect of the canopy cover on larval densities was twice as high as that of some predators (i.e. crayfish or adult newts), underlining the relevance of considering habitat features. By contrast, in Ficetola *et al.* (2012), relationships between native amphibians and pond features were overwhelmed by the effect of crayfish. To sum up, the relative importance of the red swamp crayfish (against the other factors we studied) to explain larval densities of amphibians was lower than in comparable studies (Ficetola *et al.* 2011, 2012), suggesting overall a lower impact of crayfish on amphibians in our study area.

## 2 Variable determinants of amphibian distribution at breeding sites

Pond occupancy by two of the three amphibian species was remarkably high, even in the most invaded pond network. The agile frog and the palmate newt are indeed known to live in a wide range of environmental conditions, whereas the marbled newt is considered to have higher requirements in habitat types (ACEMAV 2003; Trochet *et al.* 2014) and was rarer in the present study. Fish occurrence was a strong negative predictor of the distribution of all three amphibian species, regardless of the pond network, an effect which is well documented elsewhere (e.g. Hecnar & M'Closkey 1997; Smith *et al.* 1999; Winandy & Denoël 2013). In contrast, we did not find any general pattern of amphibian distribution relatively to crayfish occurrence. Negative correlations were found only for the marbled newt in the network of Mès, and for the palmate newt in the network of Brière.

Overall, survey data do not allow to identify with certainty the causes of the observed species distribution pattern. For example, the spatial segregation between two species can either be due to the spatial exclusion of one species by the other (e.g. intense predation, exploitative competition), or by significant differences in their ecological traits (e.g. habitat requirements, dispersal abilities) that make species co-occurrence rare (i.e. chance encounters). The latter explanation must absolutely be considered to avoid misinterpretations of species distribution data. In our study, the marbled newt populations mainly occurred in the center of the study area, which was also less invaded due to lower aquatic continuity (see Tréguier *et al.* 2018, and Figure S1 and S4 for distribution maps). The low co-occurrence of marbled newt with crayfish in the network of Mès is likely an artefact due to uncorrelated causes (on the one hand, the colonization pattern of the crayfish, and on the other hand, the ecological requirements of the marbled newt). This explains why this relationship is not supported in the most invaded network, where the crayfish is more largely distributed. This alternative hypothesis has not been mentioned in other related studies (e.g. Cruz *et al.* 2006b; Ficetola *et al.* 2011), and the absence of species distribution maps in these studies prevents any comparison with our data.

Besides, it has been suggested that an apparent coexistence between amphibians and non-native predators might only be transient before the complete elimination of

amphibians from invaded aquatic habitats (Kats & Ferrer 2003; Ficetola *et al.* 2011; Milligan *et al.* 2017). Accordingly, we hypothesized that any influence of crayfish would be more pronounced in the most invaded network. Surprisingly, only the distribution of the palmate newt was related to the crayfish in the most invaded network. In the other network, the high uncertainty in the estimate for crayfish for this species prevented any robust conclusion (Figure 2). These findings are consistent with Ficetola *et al.* (2011), but do not validate their prediction that all species would be affected after a long period of invasion. One major limitation of studies on species distribution patterns is that they are often based on presence/absence data and using short-term surveys, so that no distinction is made between small or large, and declining or thriving populations. However, here, the overall persistence of amphibians in the network invaded for 30 years is rather conclusive. The extent of the interactions between crayfish and amphibians, already evoked for larval densities, can explain the influence of crayfish on the distribution of amphibians found here, but also the variability in the relationship between crayfish and amphibian distribution in the literature (Cruz *et al.* 2006b; Ficetola *et al.* 2011).

Recent studies showed that preserving a number of habitats free of invasive species, or some environmental forces significantly impacting populations of this invasive crayfish could promote the maintenance of amphibians in invaded areas (Kats & Ferrer 2003; Kats *et al.* 2013; Díaz-Paniagua *et al.* 2014). In the RNPB, crayfish spread is highly limited due to the patchy distribution of ponds within a hedgerow landscape (Tréguier *et al.* 2018) which is, by contrast, undoubtedly highly suitable for amphibians (high pond densities, preserved woodland habitats, etc., see Table S1). In such a context, the widespread distribution of amphibians is supposed to be promoted by high dispersal. It could also explain why their distribution patterns are not as much impacted as compared to what has been shown in other related studies, where dispersal of amphibians might be limited by less suitable environments.

### 3 Insights into species coexistence

Reduced reproduction success does not necessarily have significant consequences on population dynamics of species (Benton & Grant 1999). That is why considering

simultaneously different population descriptors of native species is a step forward toward drawing robust conclusions about their persistence in invaded areas. It is with this objective that we explored the importance of the red swamp crayfish on larval densities and breeding distribution of amphibians in two pond networks. Our results were largely less alarming than the conclusions drawn from the majority of available related studies (e.g. Cruz *et al.* 2006b; Ficetola *et al.* 2011), since the red swamp crayfish variably impacted amphibians.

In amphibians, population persistence has long been thought to be highly dependent on egg and larva survival, especially because of well-documented wide oscillations in their reproductive success (Semlitsch 2002). However, elasticity analyses have shown that the population dynamics of amphibians are actually more sensitive to post-metamorphic survival (Biek *et al.* 2002; Vonesh & De la Cruz 2002; Schmidt *et al.* 2005). Moreover, density dependence can drastically affect larval survival; in some cases, lower larval densities yield higher survival rates (through lower intraspecific competition), and ultimately increase the growth rates of populations (Vonesh & De la Cruz 2002). Our findings on the joint assessment of larval densities and species distribution in ponds support the idea that amphibians are variably but sometimes moderately sensitive to survival at their premetamorphic stages, so that the red swamp crayfish does not notably influence their population dynamics. Furthermore, Ficetola *et al.* (2009) suggested that an amphibian whose distribution was not influenced by the red swamp crayfish still attempts to breed in invaded ponds despite reproductive failure, and that this strategy will irremediably lead to its local extinction. Our results showed that larval densities were sometimes unrelated to the invasive crayfish, and therefore rather suggest that the coexistence between amphibians and crayfish is likely possible under some conditions.

To conclude, based on the two population descriptors we studied, we largely mitigate the general message that the red swamp crayfish always impacts amphibian communities, which has become commonplace in the literature. Importantly, although crayfish is often expected to turn waterbodies unsuitable for amphibian reproduction, notably by altering plant communities (Carreira *et al.* 2014), we did not find significant relationships between crayfish and aquatic vegetation cover. The coexistence of amphibian communities with the invasive crayfish is likely promoted by specific conditions (as discussed earlier) that are suitable for amphibians. We encourage new empirical investigations that would

consider such factors when studying the relative importance of the effects of invasive species on native communities, to ultimately understand under which conditions the coexistence between native and invasive species is possible or not.

### **Acknowledgements**

We are indebted to Anne Tréguier for providing data on the breeding sites of amphibians, to the Syndicat mixte du RNPB for logistic support, and to landowners for allowing us to sample their ponds. We also thank G. Surzur and J.P. Damien for their assistance during fieldwork. This research was supported by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques and the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (PhD Grant to N.B.). We are grateful to G.F. Ficetola for constructive advices on statistical analyses. We thank two anonymous reviewers and B. Demars for their constructive comments on an earlier version of the manuscript. The authors declare they have no conflict of interest.

## Supplementary material

**Table S1** Summary (mean value [range], or number of ponds for each modality) of the variables recorded in the 38 ponds sampled to model the densities of larval amphibians.

Variables	Mean or number
Pond size (m <sup>2</sup> )	168 [18 – 536]
Pond depth (cm)	103 [29 – 180]
Aquatic vegetation cover (%)	36 [0 – 100]
Canopy cover (number of ponds)	
Herbaceous riparian vegetation	16
Partially surrounded by shrubs	15
Surrounded by trees	7
Crayfish (ind. trap. day <sup>-1</sup> )	0.4 [0 – 7.3]
<i>Dytiscidae</i> (ind. m <sup>-2</sup> )	13.9 [0 – 70.0]
<i>Notonectidae</i> (ind. m <sup>-2</sup> )	9.4 [0 – 29.6]
<i>Corixidae</i> (ind. m <sup>-2</sup> )	18.4 [0 – 191.5]
<i>Anisoptera</i> (ind. m <sup>-2</sup> )	5.2 [0 – 48.0]
<i>Zygoptera</i> (ind. m <sup>-2</sup> )	19.1 [0 – 224.0]
Adult palmate newts (ind. m <sup>-2</sup> )	4.1 [0 – 19.2]
Adult marbled newts (ind. trap. day <sup>-1</sup> )	0.3 [0 – 2.7]

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S2** AICc values of candidate models relating the larval densities of the agile frog. AICc = AIC corrected for small sample sizes. Cum. wAICc = cumulated weight of AICc. The table contains the selection of models with  $\Delta AICc < 10$ .

	(Intercept)	Pond size	Pond depth	Aquatic vegetation cover	Canopy cover	Crayfish	Dytiscidae	Notonectidae	Corixidae	Anisoptera	Zygoptera	Palmate newts	Marbled newts	AICc	$\Delta AICc$	wAICc	Cum. wAICc	R <sup>2</sup>
	1.95				-1.55							-0.64	-0.70	130.30	0.00	0.74	0.74	0.51
	1.94	-0.54			-1.57							-0.76		136.59	6.28	0.03	0.77	0.42
	1.99		-0.36		-1.41								-0.65	137.33	7.02	0.02	0.80	0.41
	2.02				-1.28								-0.70	137.52	7.22	0.02	0.82	0.36
	1.78				-1.40		0.02						-0.64	139.27	8.97	0.01	0.83	0.38
	1.92				-1.19				0.01				-0.67	139.30	9.00	0.01	0.83	0.38
	2.10				-1.35						-0.01		-0.67	139.37	9.07	0.01	0.84	0.38
	1.84				-1.21			0.02					-0.72	139.54	9.23	0.01	0.85	0.37
	1.97				-1.57							-0.64		139.71	9.41	0.01	0.86	0.32
	1.94			-0.35	-1.69							-0.64		139.86	9.56	0.01	0.86	0.37
	2.26											-0.45	-0.70	139.87	9.57	0.01	0.87	0.27
	2.02	-0.16			-1.26								-0.65	139.87	9.57	0.01	0.87	0.37
	2.02				-1.29	-0.15							-0.72	139.87	9.57	0.01	0.88	0.37
	1.95				-1.25					0.01			-0.70	139.93	9.63	0.01	0.89	0.37
	1.60				-1.74		0.02					-0.60		139.96	9.66	0.01	0.89	0.37
	2.01			-0.14	-1.33								-0.65	139.97	9.67	0.01	0.90	0.37

Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S3** AICc values of candidate models relating the larval densities of the palmate newt. AICc = AIC corrected for small sample sizes. Cum. wAICc = cumulated weight of AICc. The table contains the selection of models with  $\Delta AICc < 10$ .

(Intercept)	Pond size	Pond depth	Aquatic vegetation cover	Canopy cover	Crayfish	Dytiscidae	Notonectidae	Corixidae	Anisoptera	Zygoptera	Palmate newts	Marbled newts	AICc	$\Delta AICc$	wAICc	Cum. wAICc	R <sup>2</sup>
2.73				-1.60	-0.85								125.05	0.00	0.25	0.25	0.54
2.97				-1.49	-0.88	-0.02							126.29	1.24	0.13	0.38	0.56
2.74			0.14	-1.55	-0.83								127.25	2.20	0.08	0.46	0.55
2.72		-0.14		-1.66	-0.87								127.27	2.22	0.08	0.54	0.54
2.68				-1.58	-0.84				0.01				127.51	2.46	0.07	0.61	0.54
2.74				-1.57	-0.86						0.09		127.63	2.58	0.07	0.68	0.54
2.69				-1.57	-0.84			0.00					127.70	2.65	0.07	0.75	0.54
2.77				-1.62	-0.86		-0.01						127.82	2.77	0.06	0.81	0.54
2.73	-0.02			-1.60	-0.86								127.87	2.82	0.06	0.87	0.54
2.73				-1.61	-0.86							-0.01	127.88	2.83	0.06	0.93	0.54
2.73				-1.60	-0.85					0.00			127.88	2.83	0.06	0.99	0.54

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S4** Model-averaged estimates  $\pm$  95% confidence intervals of variables used to model larval densities of amphibians, following different model selection criteria.

Parameter	Agile frog				Palmate newt			
	$\Delta AICc < 2$	$\Delta AICc < 4$	$\Delta AICc < 7$	wAICc < 0.95	$\Delta AICc < 2$	$\Delta AICc < 4$	$\Delta AICc < 7$	wAICc < 0.95
Models count	1	1	2	38	2	11	11	10
Marbled newt	-0.70 $\pm$ 0.39	-0.70 $\pm$ 0.39	-0.67 $\pm$ 0.45	-0.65 $\pm$ 0.49		0 $\pm$ 0.03	0 $\pm$ 0.03	0 $\pm$ 0.03
Palmate newt	-0.64 $\pm$ 0.40	-0.64 $\pm$ 0.40	-0.65 $\pm$ 0.42	-0.56 $\pm$ 0.54		0.01 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.05
<i>Zygoptera</i>				0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
<i>Anisoptera</i>				0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.01 $\pm$ 0.05
<i>Corixidae</i>				0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.01 $\pm$ 0.04
<i>Notonectidae</i>				0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0.03
<i>Dytiscidae</i>				0 $\pm$ 0	-0.01 $\pm$ 0.02	0 $\pm$ 0.01	0 $\pm$ 0.01	-0.03 $\pm$ 0.14
Crayfish				0 $\pm$ 0.01	-0.86 $\pm$ 0.38	-0.86 $\pm$ 0.39	-0.86 $\pm$ 0.39	-0.86 $\pm$ 0.39
Canopy cover	-1.55 $\pm$ 0.77	-1.55 $\pm$ 0.77	-1.55 $\pm$ 0.8	-1.46 $\pm$ 0.94	-1.57 $\pm$ 0.76	-1.58 $\pm$ 0.76	-1.58 $\pm$ 0.76	-1.58 $\pm$ 0.76
Aquatic vegetation				0 $\pm$ 0.02		0.01 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.05
Pond depth				-0.01 $\pm$ 0.05		-0.01 $\pm$ 0.06	-0.01 $\pm$ 0.06	0 $\pm$ 0.04
Pond size			-0.02 $\pm$ 0.09	-0.02 $\pm$ 0.09		0 $\pm$ 0.03	0 $\pm$ 0.03	0 $\pm$ 0.03

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S5** Models selected to estimate the detection probability of amphibians, and site occupancy estimations in the networks of Mès (n = 74 ponds) and Brière (n = 83 ponds).

	Agile frog		Palmate newt		Marbled newt	
	Mès	Brière	Mès	Brière	Mès	Brière
<b>Detection</b>						
Variables selected	Month + Number of traps	Month + Year	Month + Type of traps	Month + Type of traps	Month + Number of traps	Year + Type of traps
Detection probability (min – max)	0.12 – 0.80	0.13 – 0.86	0.36 – 0.84	0.41 – 0.82	0.30 – 0.53	0.38 – 0.88
<b>Site occupancy</b>						
Observed occupancy	0.61	0.57	0.70	0.58	0.20	0.25
Estimated occupancy $\pm$ 95% CI	0.65 $\pm$ 0.15	0.70 $\pm$ 0.15	0.79 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.13	0.31 $\pm$ 0.12

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S6** Largest model selections used to predict the detectability of amphibian species in the two pond networks. Int. = intercept; Nb traps = Number of traps; Temp. = temperature; Cum. wAIC = cumulated wAIC.

Network	Species	Int.	Month	Year	Nb traps	Trap type	Temp.	Date	AIC	ΔAIC	WAIC	Cum. WAIC	R <sup>2</sup>		
<b>Mès</b>	<b>Agile frog</b>	-2.04	3.44		1.04				315.55	0.00	0.99	0.99	0.68		
	<b>Palmate newt</b>	1.63	-0.95				-1.26			396.95	0.00	0.76	0.76	0.32	
		0.95				-0.51	-1.26			400.03	3.08	0.16	0.92	0.29	
		1.15		-0.70			-1.20			403.09	6.14	0.04	0.95	0.27	
		1.07					-1.26			403.62	6.68	0.03	0.98	0.24	
	<b>Marbled newt</b>	0.14	-0.98			0.92				165.41	0.00	0.21	0.21	0.11	
		-0.42				0.78				165.95	0.54	0.16	0.38	0.08	
		-0.20		-1.15		0.99				166.34	0.93	0.13	0.51	0.10	
		-0.51				0.72			0.33	166.88	1.47	0.10	0.61	0.09	
		-0.61				0.79	0.38			167.38	1.97	0.08	0.69	0.09	
		-0.42				0.76		-0.06		167.92	2.51	0.06	0.75	0.08	
		-0.64							0.47	169.11	3.70	0.03	0.79	0.03	
		-0.54								169.37	3.97	0.03	0.82	0.00	
		-0.66						-0.39	0.49	169.70	4.29	0.03	0.84	0.05	
		-0.54						-0.41		169.91	4.51	0.02	0.86	0.02	
		-0.12	-0.75					-0.53		170.31	4.90	0.02	0.88	0.05	
		-0.27	-0.50							170.56	5.16	0.02	0.90	0.01	
		-0.82						0.36	0.48	170.57	5.16	0.02	0.92	0.04	
		-0.71						0.35		170.84	5.44	0.01	0.93	0.01	
		-0.70			0.38				0.47	170.94	5.54	0.01	0.94	0.04	
		-0.62			0.62					170.96	5.56	0.0133	0.96	0.01	
		-0.72					0.37	-0.41		171.37	5.96	0.01	0.97	0.03	
		-0.31	-0.66	0.97						171.68	6.27	0.01	0.98	0.03	
	-0.60		0.43					-0.40	171.70	6.30	0.01	0.99	0.03		
	-0.44	-0.50				0.35			172.03	6.63	0.01	0.99	0.02		
	-0.81		0.64			0.37			172.41	7.00	0.01	1.00	0.01		
	<b>Brière</b>	<b>Agile frog</b>	-1.88	2.39	1.34					356.76	0.00	0.79	0.79	0.58	
			-1.81	2.83						361.47	4.72	0.08	0.87	0.54	
			-1.87	2.85		-0.32					361.68	4.93	0.07	0.94	0.55
			-1.90	2.84			0.18				363.21	6.45	0.03	0.97	0.54
			-1.83	2.83					-0.09		363.24	6.48	0.03	1.00	0.54
		<b>Palmate newt</b>	1.52	-1.04				-0.87			423.22	0.00	0.72	0.72	0.22
0.85							-0.87		-0.47	425.85	2.63	0.19	0.91	0.19	
1.02			-1.21	0.82						429.57	6.34	0.03	0.94	0.15	
<b>Marbled newt</b>		-0.50			1.33		1.18			233.97	0.00	0.42	0.42	0.12	
		-0.22					1.07			235.78	1.81	0.17	0.59	0.08	
		-0.23					1.07		0.05	237.75	3.78	0.06	0.65	0.08	
		-0.20				0.05	1.07			237.76	3.79	0.06	0.72	0.08	
		-0.22					1.07	-0.01		237.78	3.81	0.06	0.78	0.08	
		-0.22	0.00				1.07			237.78	3.81	0.06	0.84	0.08	
		0.06		1.20						238.85	4.88	0.04	0.88	0.04	
		0.26								240.03	6.07	0.02	0.90	0.00	
		0.22	-0.34	1.37						240.34	6.38	0.02	0.92	0.05	
		0.04		1.20	-0.03					240.84	6.87	0.01	0.93	0.04	
0.05		1.19					0.03	240.84	6.87	0.01	0.94	0.04			
0.06		1.19					0.00	240.85	6.88	0.01	0.96	0.04			

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S7** Summary (mean value [range] or number of ponds for each modality) of the variables recorded in the two networks of ponds (n = 74 ponds in Mès and n = 83 ponds in Brière) to explain the distribution of amphibian breeding sites. Landscape features were calculated in a 200-m radius buffer zone around each focal pond. Differences in environmental features between the two networks are reported (\*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001).

Variables	Networks	
	Mès	Brière
Pond size (m <sup>2</sup> )	371 [7 – 8950]	544 [10 – 7023]
Pond depth (cm)	130 [20 – 584]	110 [20 – 427]
Aquatic vegetation cover		
<25%	37	37
25-75%	8	16
>75%	29	30
Forest cover (%) ***	10 [0 – 30]	19 [0 – 61]
Length of hedgerows (m) ***	1502 [533 – 2497]	1084 [0 – 2547]
Nearby ponds	3.1 [0 – 9]	2.5 [0 – 6]
Crayfish presence (Yes/No) **	28/46	52/31
Fish presence (Yes/No)	28/46	23/60

**Table S8** Largest model selection used to predict the distribution of the agile frog in the network of Mès.

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	AIC	ΔAIC	wAIC	Cum. wAIC	R <sup>2</sup>
5.60	-1.46					2.00	-2.37		286.79	0	0.52	0.52	0.8
5.08	-2.54	1.20				3.07			288.49	1.7	0.22	0.74	0.8
3.87	-1.26		-1.85			1.89			291.58	4.79	0.05	0.79	0.79
4.13	-1.46					2.05			291.59	4.8	0.05	0.84	0.79
4.27	-1.58				0.38	2.15			292.56	5.77	0.03	0.87	0.79
4.30	-1.70					2.15	0.75		293.16	6.36	0.02	0.89	0.79
4.18	-0.30	-1.40				2.08			293.33	6.53	0.02	0.91	0.79
4.96						1.56	-2.07		293.91	7.11	0.02	0.92	0.78
4.60				-1.19		1.49	-1.67		294.59	7.8	0.01	0.93	0.78
4.94						1.43	0.80	-2.37	295.07	8.27	0.01	0.94	0.78
1.18	-3.17		-7.78				5.98		295.23	8.44	0.01	0.95	0.77

**Table S9** Largest model selection used to predict the influence of variables on the distribution of the agile frog in the network of Brière.

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	AIC	ΔAIC	wAIC	Cum. wAIC	R <sup>2</sup>
2.46			-1.07			-0.29		-2.62	342.47	0.00	0.33	0.33	0.68
3.49			-0.95	-1.70		-0.21			346.42	3.95	0.05	0.38	0.66
1.54			-0.97	-0.73				-1.48	346.54	4.07	0.04	0.42	0.65
1.73	-0.63		-1.11					-1.98	346.82	4.35	0.04	0.46	0.65
2.47	-0.67					0.49		-2.22	346.86	4.39	0.04	0.49	0.66
1.72			-0.95					-1.96	346.86	4.39	0.04	0.53	0.64
1.72			-0.96		-0.57			-2.03	347.02	4.55	0.03	0.57	0.65
1.08	-0.62		-1.11	-1.38					347.29	4.83	0.03	0.59	0.65
4.74						0.01	-1.37	-1.76	347.36	4.89	0.03	0.62	0.66
0.98			-0.87	-1.37					347.50	5.03	0.03	0.65	0.64
2.24						0.28		-2.12	347.64	5.17	0.03	0.68	0.65
2.10				-0.62		0.32		-1.63	348.00	5.53	0.02	0.70	0.66
2.37					-0.45	0.37		-2.11	348.04	5.57	0.02	0.72	0.66
5.54			-0.79			-0.48	-1.78		348.33	5.86	0.02	0.73	0.66
2.14		0.52				0.46		-1.96	348.36	5.89	0.02	0.75	0.66
1.93			-0.87				-0.54	-1.77	348.36	5.89	0.02	0.77	0.65
0.83		0.42	-0.90	-1.33					348.38	5.91	0.02	0.79	0.65
1.55		0.26	-0.96					-1.76	348.51	6.04	0.02	0.80	0.65
4.69				-0.98		0.04	-1.30		348.94	6.47	0.01	0.82	0.65
1.30			-0.78	-1.13			-0.57		349.00	6.53	0.01	0.83	0.64
1.00			-0.87	-1.26	-0.17				349.35	6.88	0.01	0.84	0.64
2.82				-1.35		0.30			349.61	7.14	0.01	0.85	0.64
2.34	-0.50			-1.19		0.45			349.95	7.48	0.01	0.86	0.65
1.63	-0.74		-0.90			0.14			349.97	7.50	0.01	0.86	0.65
1.52		0.72	-0.83			0.09			350.20	7.73	0.01	0.87	0.65
3.58			-0.99		-0.65	-0.01			350.33	7.86	0.01	0.88	0.65
1.37		0.53		-1.13		0.50			350.35	7.88	0.01	0.88	0.65
5.49					-0.55	0.09	-1.94		350.36	7.89	0.01	0.89	0.65
4.73						-0.05	-1.73		350.89	8.42	0.00	0.89	0.64
3.29				-1.18	-0.22	0.34			351.30	8.83	0.00	0.90	0.64
1.24				-0.80				-1.13	351.40	8.93	0.00	0.90	0.62
4.43	-0.43					0.08	-1.58		351.41	8.94	0.00	0.91	0.64
1.16	-0.66		-0.99						351.48	9.02	0.00	0.91	0.62
0.83				-1.24					351.51	9.04	0.00	0.91	0.61
1.61			-0.79			-0.08			351.52	9.05	0.00	0.92	0.63
1.57					-0.53			-1.79	351.75	9.28	0.00	0.92	0.62
1.08	-0.63		-1.01		-0.51				351.77	9.30	0.00	0.92	0.63
1.45				-0.93			-0.95		351.81	9.34	0.00	0.93	0.62
1.81			-0.68		-0.51		-1.22		351.82	9.35	0.00	0.93	0.63
1.25	-0.50			-0.77				-1.17	351.97	9.50	0.00	0.93	0.63
4.56		0.36				0.12	-1.55		352.07	9.60	0.00	0.94	0.64
1.58			-0.66				-1.04		352.15	9.68	0.00	0.94	0.62
1.52	-0.52		-0.80				-0.84		352.19	9.72	0.00	0.94	0.63
0.78	-0.45			-1.22					352.28	9.81	0.00	0.94	0.62
1.41								-1.65	352.28	9.81	0.00	0.95	0.61

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

**Table S10** Largest model selection used to predict the distribution of the palmate newt in the network of Mès.

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. over	Crayfish presence	Fish presence	QAIC	ΔQAIC	wQAIC	Cum. wQAIC
6.25	-1.19					1.76		-2.90	226.13	0.00	0.09	0.09
5.68						1.56		-2.75	226.35	0.22	0.08	0.18
5.85						1.13	1.83	-3.74	226.95	0.81	0.06	0.24
6.49		-0.95				1.52		-2.70	227.21	1.08	0.05	0.29
2.77				-2.62			3.07	-3.60	227.43	1.30	0.05	0.34
3.74		-1.17						-2.93	227.73	1.60	0.04	0.39
5.65				-0.26		1.48		-2.57	228.07	1.94	0.04	0.42
5.93					0.27	1.57		-2.86	228.09	1.95	0.04	0.46
3.06								-2.92	228.28	2.15	0.03	0.49
5.91			0.12			1.62		-2.76	228.30	2.17	0.03	0.52
3.16				-2.07	1.50			-2.85	228.84	2.70	0.02	0.54
3.43		-1.12					1.13	-3.26	228.84	2.71	0.02	0.57
2.91				-0.83				-2.56	229.00	2.87	0.02	0.59
3.04							1.37	-3.57	229.03	2.90	0.02	0.61
4.12		-1.43			0.50			-3.34	229.05	2.92	0.02	0.63
3.46		-1.01		-0.46				-2.64	229.32	3.18	0.02	0.65
6.97				-6.61		7.82	7.04		229.43	3.30	0.02	0.67
3.74		-1.20	0.07					-2.91	229.72	3.59	0.02	0.69
3.77	0.06	-1.17						-2.95	229.73	3.59	0.02	0.70
3.03			-0.18					-2.88	230.15	4.01	0.01	0.71
4.50	-1.09					2.34			230.24	4.10	0.01	0.73
3.05					0.10			-2.94	230.24	4.11	0.01	0.74
3.03	-0.13							-2.91	230.24	4.11	0.01	0.75
4.08				-1.32		1.73			230.47	4.34	0.01	0.76
4.77		-0.96				1.86			230.55	4.42	0.01	0.77
4.06						1.96			230.63	4.49	0.01	0.78
2.88			-0.20	-0.74				-2.53	230.86	4.73	0.01	0.79
3.12					-0.20		1.53	-3.68	230.91	4.77	0.01	0.80
5.41		-1.70	0.74			2.31			230.93	4.80	0.01	0.81
2.98			-0.12				1.31	-3.48	230.98	4.85	0.01	0.82
2.91	0.02			-0.84				-2.56	231.00	4.87	0.01	0.82
3.07	0.05						1.37	-3.59	231.03	4.89	0.01	0.83
4.33	-0.90			-1.09		2.03			231.07	4.94	0.01	0.84
1.33				-2.14					231.10	4.97	0.01	0.85
4.51	-1.37					2.71	1.22		231.12	4.99	0.01	0.86
4.57	-1.12	-0.63				2.16			231.16	5.02	0.01	0.86
4.15				-2.06	0.87	1.74			231.23	5.10	0.01	0.87
4.74		-0.76		-1.04		1.67			231.35	5.21	0.01	0.88
1.74		-0.85		-1.74					231.56	5.43	0.01	0.88
0.82				-3.10			1.63		231.68	5.54	0.01	0.89

**Table S10** (continued)

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	QAIC	$\Delta$ QAIC	wQAIC	Cum. wQAIC
1.40				-2.94	0.84				231.90	5.77	0.01	0.89
1.88		-0.93		-2.72	1.04				231.97	5.83	0.01	0.90
3.01			-0.19		0.12			-2.90	232.10	5.96	0.00	0.90
3.00	-0.15		-0.19					-2.88	232.10	5.97	0.00	0.91
4.58	-1.14		0.17			2.44			232.11	5.97	0.00	0.91
4.65		-1.01				1.92	0.69		232.13	6.00	0.00	0.92
1.28		-0.96		-2.56			1.55		232.19	6.06	0.00	0.92
3.02	-0.13				0.10			-2.94	232.20	6.07	0.00	0.93
4.58	-1.09				0.03	2.35			232.23	6.10	0.00	0.93
3.71						2.03	0.57		232.39	6.26	0.00	0.94
4.94		-1.02			0.16	1.89			232.41	6.28	0.00	0.94
4.28			0.05	-1.33		1.76			232.46	6.33	0.00	0.94
1.90		-1.13							232.49	6.35	0.00	0.95
4.09			0.09			2.01			232.58	6.45	0.00	0.95
4.09					0.03	1.97			232.62	6.49	0.00	0.96
0.95				-3.47	0.71		1.26		232.90	6.76	0.00	0.96
1.33			-0.17	-2.05					232.99	6.86	0.00	0.96
1.62	0.05			-2.13					233.10	6.96	0.00	0.96

**Table S11** Largest model selection used to predict the influence of variables on the distribution of the palmate newt in the network of Brière.

(intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	QAIC	ΔQAIC	wQAIC	Cum. wQAIC
3.89				3.06			-2.47	-2.72	220.54	0.00	0.15	0.15
2.08							-1.81		223.03	2.49	0.04	0.20
2.44							-1.56	-1.26	223.19	2.66	0.04	0.24
2.09				1.73				-2.49	223.28	2.74	0.04	0.28
1.66								-1.67	223.52	2.98	0.03	0.31
2.63					0.98		-1.66	-1.50	223.71	3.18	0.03	0.34
2.36				1.02			-2.11		223.81	3.28	0.03	0.37
2.10					0.47		-1.84		224.12	3.59	0.03	0.40
1.72					0.61			-1.81	224.31	3.77	0.02	0.42
2.24			-0.43	1.97				-2.72	224.44	3.91	0.02	0.44
1.99	0.30						-1.72		224.62	4.08	0.02	0.46
2.09	0.20						-1.82		224.85	4.31	0.02	0.48
0.94									224.88	4.34	0.02	0.50
2.46	0.26						-1.55	-1.31	224.91	4.38	0.02	0.51
2.36		0.22					-1.54	-1.17	225.01	4.47	0.02	0.53
2.19	0.27			1.78				-2.61	225.03	4.49	0.02	0.55
2.08			0.00					-1.81	225.03	4.49	0.02	0.56
1.92		0.27		1.57				-2.26	225.09	4.55	0.02	0.58
1.78	0.36							-1.83	225.11	4.57	0.02	0.59
2.43			-0.05				-1.54	-1.27	225.18	4.64	0.02	0.61
2.06				1.61	0.09			-2.44	225.26	4.72	0.01	0.62
2.23		0.34		0.94			-1.97		225.28	4.74	0.01	0.64
1.55		0.24						-1.52	225.34	4.80	0.01	0.65
1.66			-0.17					1.67	225.38	4.84	0.01	0.67
2.02		0.36			0.51		-1.74		225.54	5.00	0.01	0.68
2.58				2.30		0.94		-2.92	225.64	5.10	0.01	0.69
2.31				0.83	0.21		-2.07		225.66	5.12	0.01	0.70
2.37	0.13			1.02			-2.12		225.74	5.20	0.01	0.71
2.36			-0.10	1.06			-2.09		225.76	5.23	0.01	0.72
1.97	0.45	0.52					-1.70		225.86	5.32	0.01	0.74
1.75			-0.28		0.70			-1.87	225.94	5.40	0.01	0.75
2.11	0.19				0.46		-1.87		225.95	5.41	0.01	0.76
0.89		0.46							225.97	5.44	0.01	0.77
1.59		0.32			0.64			-1.64	226.00	5.47	0.01	0.78
1.77	0.26				0.58		-1.89		226.08	5.54	0.01	0.79
2.09			-0.08		0.49			-1.82	226.09	5.56	0.01	0.79
0.94					0.44				226.10	5.56	0.01	0.80
1.86						0.69		-1.82	226.41	5.87	0.01	0.81
1.57	0.57	0.51						-1.58	226.45	5.91	0.01	0.82
1.98		0.30	-0.05				-1.70		226.60	6.07	0.01	0.83

Table S11 (continued)

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	QAIC	ΔQAIC	wQAIC	Cum. wQAIC
0.95				0.29					226.69	6.15	0.01	0.83
2.50						0.34	-1.44	-1.38	226.70	6.16	0.01	0.84
0.94	0.17								226.75	6.21	0.01	0.85
0.94			-0.13						226.77	6.23	0.01	0.86
2.07					0.80	0.82		-2.15	226.78	6.24	0.01	0.86
2.09						0.22	-1.74		226.79	6.26	0.01	0.87
2.09	0.20		0.02				-1.83		226.85	6.31	0.01	0.88
0.91		0.52			0.50				226.96	6.42	0.01	0.88
1.78	0.34		-0.12					-1.82	227.03	6.50	0.01	0.89
1.53		0.30	-0.21					-1.50	227.11	6.57	0.01	0.89
0.88	0.47	0.67							227.12	6.58	0.01	0.90
1.74		0.58				1.02		-1.57	227.44	6.90	0.00	0.90
0.92		0.54		0.46					227.48	6.94	0.00	0.91
2.41				1.08		0.20	-2.07		227.55	7.01	0.00	0.91
0.89		0.49	-0.21						227.71	7.17	0.00	0.92
2.15					0.50	0.19	-1.80		227.81	7.28	0.00	0.92
0.95			-0.19	0.48					227.90	7.36	0.00	0.93
1.94		0.45				0.52	-1.50		228.01	7.47	0.00	0.93
0.95	0.14				0.42				228.01	7.48	0.00	0.93
0.90	0.49	0.76			0.50				228.04	7.50	0.00	0.94
0.94				-0.02	0.45				228.10	7.56	0.00	0.94
1.00						0.54			228.15	7.62	0.00	0.94
1.03		0.71				0.96			228.20	7.66	0.00	0.95

**Table S12** Largest model selection used to predict the influence of variables on the distribution of the marbled newt in the network of Mès.

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	AIC	ΔAIC	wAIC	Cum. wAIC	R <sup>2</sup>
-0.44			0.93			1.78	-1.41		157.17	0.00	0.11	0.11	0.31
-0.96			0.87			1.84			158.17	1.00	0.07	0.18	0.28
-1.17			0.85	-1.97		1.68			158.76	1.59	0.05	0.23	0.30
0.00	0.77							-2.44	158.98	1.80	0.05	0.28	0.25
0.41	0.93						-1.22	2.31	158.98	1.81	0.05	0.33	0.27
-0.22								-2.12	159.31	2.14	0.04	0.37	0.22
-0.17	0.75		0.44					-2.35	159.43	2.26	0.04	0.40	0.27
-0.36			0.44					-2.09	159.65	2.48	0.03	0.44	0.24
-0.10			0.52				-1.15	-1.90	159.67	2.49	0.03	0.47	0.26
-0.93		-0.30	1.00			1.83			159.77	2.59	0.03	0.50	0.29
-0.95	0.32		0.86			1.81			159.79	2.61	0.03	0.53	0.29
0.03							-0.94	-1.95	159.92	2.75	0.03	0.56	0.24
-0.95			0.89		-0.09	1.86			160.10	2.93	0.03	0.59	0.28
-0.11	0.74			-0.60				-2.22	160.60	3.42	0.02	0.61	0.25
-0.01	0.80				0.19			-2.51	160.61	3.43	0.02	0.63	0.25
-0.40				-1.13				-1.84	160.73	3.55	0.02	0.65	0.23
-0.04	0.80	0.16						-2.47	160.83	3.66	0.02	0.66	0.25
-0.30						1.29	-1.27		160.85	3.67	0.02	0.68	0.25
-0.55			0.45	-1.06				-1.78	161.13	3.96	0.02	0.70	0.25
-0.23					0.12			-2.15	161.15	3.98	0.02	0.71	0.22
-0.35		-0.30	0.59					-2.04	161.18	4.01	0.02	0.73	0.25
-0.22		0.02						-2.13	161.31	4.14	0.01	0.74	0.22
-0.77						1.34			161.49	4.32	0.01	0.76	0.22
0.04					0.20		-1.03	-1.97	161.55	4.38	0.01	0.77	0.24
-0.14				-0.96			-0.88	-1.75	161.57	4.40	0.01	0.78	0.24
-0.36			0.43		0.07			-2.11	161.61	4.43	0.01	0.79	0.24
-0.97				-2.26		1.21			161.69	4.52	0.01	0.81	0.24
0.03		0.04					-0.94	-1.95	161.91	4.74	0.01	0.82	0.24
-0.54				-1.71		1.20	-1.08		162.02	4.85	0.01	0.83	0.26
-0.18	0.44					1.26	-1.40		162.10	4.93	0.01	0.84	0.26
-0.44				-1.28	0.22			-1.82	162.34	5.17	0.01	0.84	0.23
-0.36	0.77		0.66					-1.85	162.51	5.34	0.01	0.85	0.23
-0.30					0.18	1.27	-1.35		162.59	5.42	0.01	0.86	0.25
-0.31		0.17				1.33	-1.28		162.68	5.51	0.01	0.87	0.25
-0.41		0.03		-1.12				-1.84	162.72	5.55	0.01	0.87	0.23
-0.75	0.31					1.33			163.03	5.85	0.01	0.88	0.22
-0.23		0.00			0.12			-2.15	163.15	5.98	0.01	0.89	0.22
-0.58			0.55				-1.46		163.23	6.06	0.01	0.89	0.20
-0.89			0.55	-2.07			-1.14		163.28	6.11	0.01	0.90	0.22

**Table S12** (continued)

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	AIC	ΔAIC	wAIC	Cum. wAIC	R <sup>2</sup>
-0.78		0.14				1.37			163.36	6.19	0.01	0.90	0.22
-0.92	0.26			-2.06		1.18			163.38	6.20	0.01	0.91	0.24
-1.02				-2.38	0.18	1.16			163.41	6.24	0.01	0.91	0.24
-1.29			0.48	-2.49					163.44	6.27	0.00	0.92	0.19
-0.97		0.20		-2.24		1.25			163.46	6.29	0.00	0.92	0.24
-0.78					0.05	1.33			163.47	6.29	0.00	0.93	0.22
-1.19				-2.53					163.62	6.45	0.00	0.93	0.17
-0.86				-2.26			-0.99		163.87	6.70	0.00	0.94	0.19
0.55							-1.26		164.08	6.91	0.00	0.94	0.16
-0.38	0.59						-1.49		164.08	6.91	0.00	0.94	0.19
-0.50		-0.46	0.74				-1.50		164.11	6.93	0.00	0.95	0.21
-1.23	0.46		0.52	-2.39					164.15	6.98	0.00	0.95	0.21

**Table S13** Largest model selection used to predict the influence of variables on the distribution of the marbled newt in the network of Brière.

(Intercept)	Forest cover	Length of hedgerows	Nearby ponds	Pond size	Pond depth	Aquatic veg. cover	Crayfish presence	Fish presence	AIC	ΔAIC	wAIC	Cum. wAIC	R <sup>2</sup>
-0.90		1.30				2.01		-1.84	215.34	0	0.35	0.35	0.38
-1.51		1.34		-1.25		1.91			216.35	1.01	0.21	0.56	0.37
-1.36		1.38				1.99			217.65	2.31	0.11	0.67	0.34
-0.91		1.32				1.77	-0.85		218.25	2.91	0.08	0.75	0.36
-1.43	0.34	1.57				1.90			219.06	3.72	0.05	0.8	0.35
-1.36		1.38			-0.25	1.98			219.16	3.83	0.05	0.86	0.35
-1.36		1.37	0.09			2.04			219.58	4.24	0.04	0.9	0.34
-0.37						1.55		-2.07	222.94	7.6	0.01	0.91	0.3
-1.58	0.71	1.47		-2.22					223.2	7.87	0.01	0.91	0.29
-0.10		0.90					-1.16	-1.44	223.32	7.98	0.01	0.92	0.29
-0.57				-0.70		1.56		-1.62	223.75	8.41	0.01	0.92	0.31
-0.04						1.42	-0.73	-1.89	223.78	8.44	0.01	0.93	0.31
-0.38	-0.37					1.70		-2.04	223.8	8.46	0.01	0.93	0.31
-0.78	0.67	1.41						-1.90	223.84	8.5	0.01	0.94	0.29
-0.77		0.96		-1.48			-1.02		223.87	8.53	0	0.94	0.29
-1.36		0.97		-2.00					224.22	8.88	0	0.95	0.27

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence

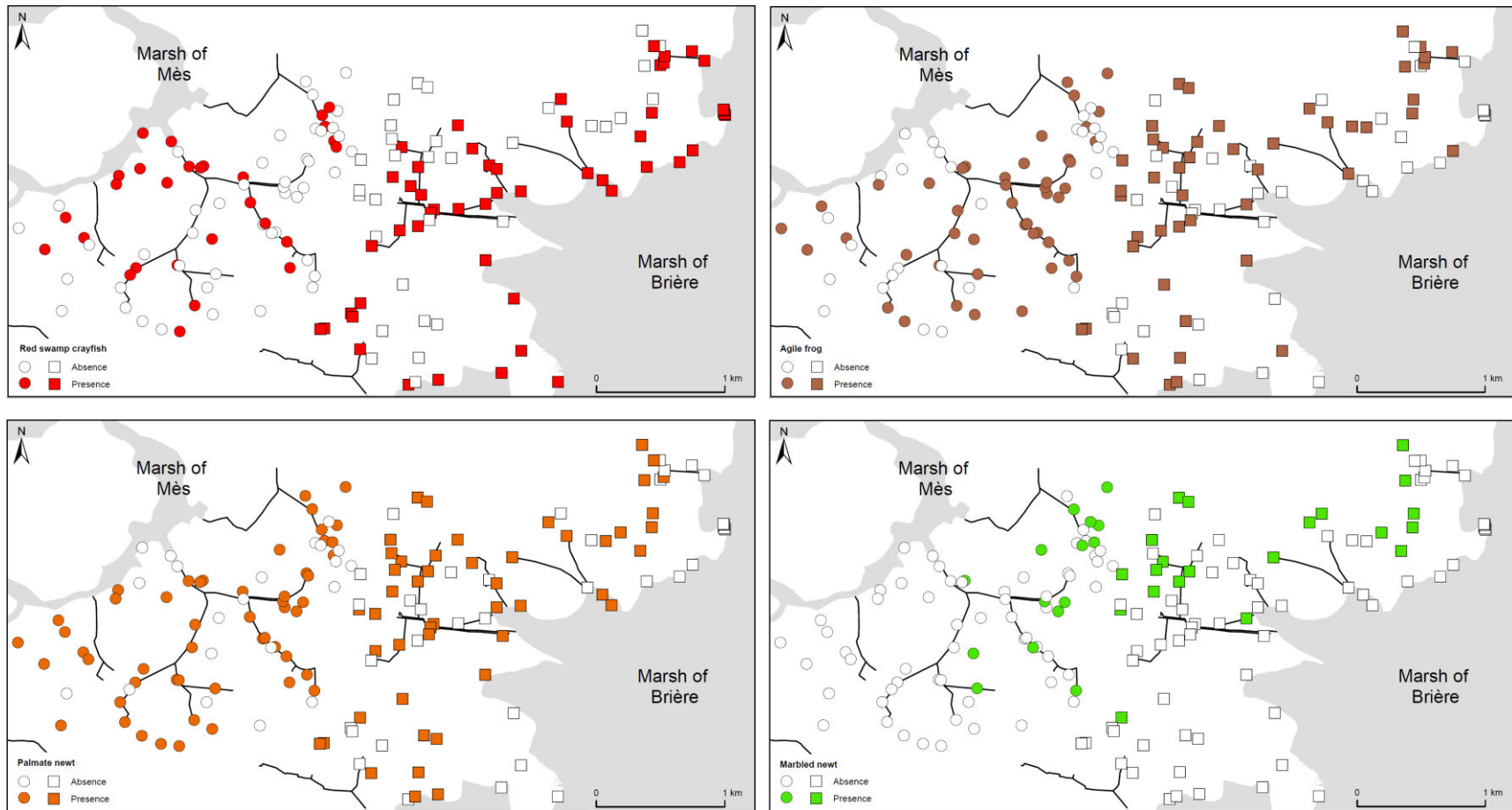
**Table S14** Comparison of model-averaged estimates ( $\pm$  95% confidence intervals) of variables used to model the distribution of amphibian species in the two pond networks, following different model selection criteria. Models for the palmate newt were ranked on QAIC and corrected with  $\hat{c} = 1.75$  and  $\hat{c} = 1.95$  in the networks of Mès and Brière, respectively.

Selection criteria	Network of Mès				Network of Brière			
	$\Delta AIC < 2$	$\Delta AIC < 4$	$\Delta AIC < 7$	wAIC < 0.95	$\Delta AIC < 2$	$\Delta AIC < 4$	$\Delta AIC < 7$	wAIC < 0.95
<b>Agile frog</b>								
Models count	2	2	7	11	1	2	21	45
Fish presence	-2.37 $\pm$ 2.12	-2.37 $\pm$ 2.12	-2.37 $\pm$ 2.12	-2.35 $\pm$ 2.10	-2.61 $\pm$ 1.72	-2.62 $\pm$ 1.72	-2.26 $\pm$ 1.82	-2.20 $\pm$ 1.80
Crayfish presence			0.75 $\pm$ 2.55	1.83 $\pm$ 5.45			-1.16 $\pm$ 1.84	-1.23 $\pm$ 1.78
Aquatic vegetation	2.32 $\pm$ 2.18	2.32 $\pm$ 2.17	2.27 $\pm$ 2.10	2.24 $\pm$ 2.10	-0.28 $\pm$ 1.19	-0.28 $\pm$ 1.20	-0.12 $\pm$ 1.27	-0.10 $\pm$ 1.27
Pond depth			0.38 $\pm$ 0.74	0.38 $\pm$ 0.74			-0.46 $\pm$ 0.80	-0.53 $\pm$ 0.78
Pond size			-1.85 $\pm$ 3.29	-2.44 $\pm$ 5.49		-1.70 $\pm$ 1.94	-1.20 $\pm$ 1.69	-1.18 $\pm$ 1.63
Nearby ponds	1.20 $\pm$ 1.22	1.20 $\pm$ 1.22	1.2 $\pm$ 1.22	1.20 $\pm$ 1.22	-1.07 $\pm$ 0.89	-1.05 $\pm$ 0.90	-1.01 $\pm$ 0.88	-1.00 $\pm$ 0.86
Length of hedgerows	-1.79 $\pm$ 1.80	-1.79 $\pm$ 1.80	-1.72 $\pm$ 1.74	-1.74 $\pm$ 1.76			0.40 $\pm$ 0.82	0.43 $\pm$ 0.86
Forest cover			-0.30 $\pm$ 1.06	-0.30 $\pm$ 1.06			-0.64 $\pm$ 0.84	-0.63 $\pm$ 0.84
<b>Palmate newt</b>								
Models count	8	19	58	53	1	10	53	63
Fish presence	-3.01 $\pm$ 3.23	-3.00 $\pm$ 3.19	-3.00 $\pm$ 3.19	-3.00 $\pm$ 3.19	-2.72 $\pm$ 2.65	-2.11 $\pm$ 2.45	-1.97 $\pm$ 2.33	-1.97 $\pm$ 2.33
Crayfish presence	2.37 $\pm$ 4.16	2.04 $\pm$ 3.86	1.84 $\pm$ 3.67	1.85 $\pm$ 3.68	-2.47 $\pm$ 2.60	-2.24 $\pm$ 2.61	-2.08 $\pm$ 2.51	-2.08 $\pm$ 2.51
Aquatic vegetation	1.52 $\pm$ 2.33	1.53 $\pm$ 2.33	1.66 $\pm$ 2.41	1.65 $\pm$ 2.41			0.68 $\pm$ 1.72	0.62 $\pm$ 1.71
Pond depth	0.27 $\pm$ 1.06	0.70 $\pm$ 1.92	0.53 $\pm$ 1.84	0.54 $\pm$ 1.84		0.59 $\pm$ 1.18	0.52 $\pm$ 1.22	0.51 $\pm$ 1.22
Pond size	-1.63 $\pm$ 4.08	-1.43 $\pm$ 3.74	-1.57 $\pm$ 3.59	-1.53 $\pm$ 3.57	3.06 $\pm$ 3.86	2.5 $\pm$ 3.84	2.11 $\pm$ 3.76	2.08 $\pm$ 3.76
Nearby ponds		0.10 $\pm$ 1.08	0.04 $\pm$ 1.14	0.05 $\pm$ 1.16		-0.43 $\pm$ 0.92	-0.16 $\pm$ 0.90	-0.16 $\pm$ 0.90
Length of hedgerows	-1.05 $\pm$ 2.27	-1.12 $\pm$ 2.04	-1.09 $\pm$ 1.94	-1.09 $\pm$ 1.94			0.36 $\pm$ 1.04	0.38 $\pm$ 1.06
Forest cover	-1.19 $\pm$ 1.63	-1.01 $\pm$ 1.82	-0.83 $\pm$ 1.86	-0.85 $\pm$ 1.86			0.29 $\pm$ 1.08	0.29 $\pm$ 1.08

**Table S14** (continued)

Selection criteria	Network of Mès				Network of Brière			
	$\Delta AIC < 2$	$\Delta AIC < 4$	$\Delta AIC < 7$	wAIC < 0.95	$\Delta AIC < 2$	$\Delta AIC < 4$	$\Delta AIC < 7$	wAIC < 0.95
<b>Marbled newt</b>								
Models count	5	20	51	50	2	6	7	16
Fish presence	-2.38 ± 1.96	-2.19 ± 1.90	-2.14 ± 1.88	-2.14 ± 1.88	-1.83 ± 1.90	-1.83 ± 1.90	-1.83 ± 1.90	-1.83 ± 1.90
Crayfish presence	-1.36 ± 1.72	-1.27 ± 1.72	-1.25 ± 1.72	-1.25 ± 1.72		-0.85 ± 1.41	-0.85 ± 1.41	-0.88 ± 1.41
Aquatic vegetation	1.78 ± 1.4112	1.76 ± 1.41	1.66 ± 1.41	1.66 ± 1.41	1.97 ± 1.25	1.95 ± 1.25	1.95 ± 1.25	1.94 ± 1.25
Pond depth		0.06 ± 0.67	0.1 ± 0.69	0.1 ± 0.69		-0.25 ± 0.71	-0.25 ± 0.71	-0.25 ± 0.71
Pond size	-1.97 ± 3.98	-1.42 ± 3.92	-1.61 ± 4.06	-1.59 ± 4.06	-1.25 ± 2.12	-1.25 ± 2.12	-1.25 ± 2.12	-1.29 ± 2.16
Nearby ponds	0.9 ± 0.82	0.78 ± 0.88	0.76 ± 0.88	0.76 ± 0.88			0.09 ± 0.69	0.09 ± 0.69
Length of hedgerows		-0.07 ± 0.94	-0.07 ± 0.94	-0.07 ± 0.94	1.32 ± 0.94	1.35 ± 0.94	1.35 ± 0.94	1.34 ± 0.94
Forest cover		0.7 ± 1.18	0.7 ± 1.18	0.71 ± 1.18		0.34 ± 0.86	0.34 ± 0.86	0.34 ± 0.96

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence



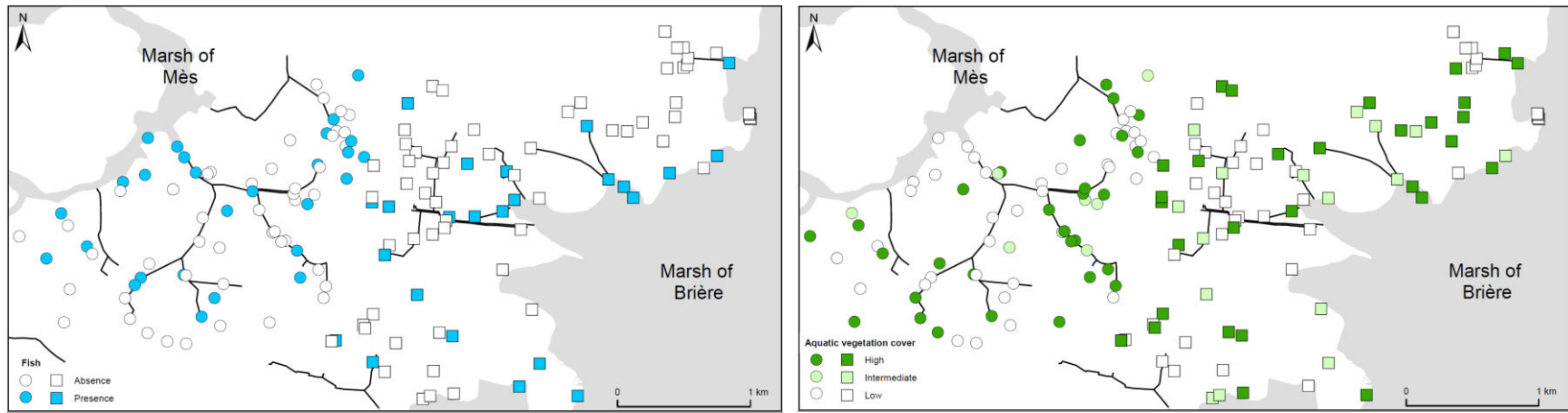
Top left : Figure S1. Distribution of the red swamp crayfish in the two pond networks

Top right : Figure S2. Distribution of the agile frog in the two pond networks

Bottom left : Figure S3. Distribution of the palmate newt in the two pond networks

Bottom right : Figure S4. Distribution of the marbled newt in the two pond networks

## Chapitre 1 : Patrons de coexistence



Left : Figure S5. Distribution of fish in the two pond networks.

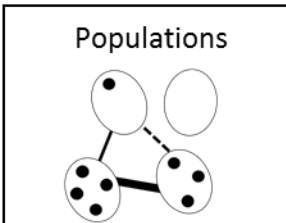
Right : Figure S6. Map of the aquatic vegetation cover in the two pond networks

## CHAPITRE 2

Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive



**Article 2 : Dérive génétique durant la phase d'expansion d'une espèce fortement invasive**

Niveau d'organisation	Descripteurs	Disciplines et méthodes d'étude
	Flux de gènes Tailles efficaces	Génétique des populations Génétique du paysage

Résumé :

Comprendre les processus écologiques liés à l'expansion de l'aire de distribution des espèces est d'un intérêt majeur puisque les changements globaux sont notamment responsables de changements dans les aires de distribution d'espèces et des invasions biologiques. Les preuves s'accumulent autour du fait que l'évolution sur le front d'expansion des populations mène à l'accélération de l'expansion elle-même. Les études soulignent en général le rôle de la sélection naturelle dans ce processus, mais le hasard peut aussi jouer un rôle majeur en évolution. Dans cette étude, nous avons posé la question de l'influence de la dérive génétique sur l'évolution des fréquences alléliques et génotypiques d'une espèce invasive. Nous avons examiné l'influence réciproque des flux de gènes et de la dérive génétique chez 36 populations d'écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*, dans une région constituée de zones humides récemment envahies (30 ans, Brière, nord-ouest de la France). Malgré la petite échelle spatiale de l'étude (15 km<sup>2</sup>), les populations étaient fortement structurées selon la barrière des surfaces terrestres et ont révélé un patron limpide de colonisation par les cours d'eau. De plus, ces populations ont montré de très faibles tailles efficaces, suggérant que la dérive génétique domine l'évolution de ces populations. Nous avons aussi observé un déclin significatif de la diversité génétique en seulement deux ans. Cette étude est une preuve empirique de l'importance de la dérive génétique dans la dynamique évolutive durant la phase d'expansion. Au-delà, ces résultats inattendus pourraient avoir un effet significatif sur les questions de gestion de cette espèce.

## Genetic drift during the spread phase in a highly invasive species

Nadège Bélouard, Jean-Marc Paillisson, Adrien Oger, Anne-Laure Besnard, Eric J. Petit

*Manuscript to be submitted*

### Abstract

Understanding the ecological processes linked to species range expansions is of major interest as global change notably causes shifts in species ranges and biological invasions. Evidence is accumulating that evolution at the leading edges of expanding populations leads to accelerated spread. Studies generally emphasized the role of natural selection in this process, but chance can also play a major role in evolution. In this study, we questioned the influence of genetic drift on the evolution of allelic and genotypic frequencies in an invasive species. We examined the interplay of gene flow and genetic drift in 36 populations of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in a relatively recently invaded wetland area (30 years, Brière, northwestern France). Despite the small spatial scale of our study (15 km<sup>2</sup>), populations were highly structured according to the strong barrier of land surfaces and revealed a clear pattern of colonization through watercourses. More, these populations exhibited very small effective population sizes, suggesting that genetic drift dominated in the evolution of these populations. We also observed a significant decrease in genetic diversity over only two years. This study is a clear empirical evidence of the importance of genetic drift in the evolutionary dynamics during the spread phase. Beyond, these unexpected findings could have a significant impact on management issues of this species.

**Key-words:** biological invasion, colonization, edge populations, effective population size, evolution, landscape genetics, range expansion, red swamp crayfish

## Introduction

Understanding the ecological and evolutionary processes linked to species range expansions is of major interest as global changes will affect the spatial distribution of most living species (Parmesan 2006; Excoffier et al. 2009; Walther et al. 2009; Phillips et al. 2010b). The most conspicuous examples are shifts of range distributions linked to climatic change or biological invasions (Dukes & Mooney 1999; Walther et al. 2002; Parmesan 2006). The early view of colonization waves spreading at constant rates (Fisher 1937; Skellam 1951) has been challenged by empirical observations documenting that spread rates accelerate during the colonization process due to a variety of processes such as long-distance dispersal, species interactions, environmental heterogeneity, or evolution (Hastings et al. 2005). Recent theoretical and experimental models have investigated the role played by evolution during the spread phase, both at the phenotypic and genetic level (Excoffier et al. 2009; Phillips et al. 2010b; Slatkin & Excoffier 2012; Phillips 2015), and evidence is accumulating that evolution at leading edges leads to accelerated spread but also to less predictable demographic and genetic trajectories (Excoffier et al. 2009; Phillips 2015; Ochocki & Miller 2017; Weiss-Lehman et al. 2017). Empirical studies of evolutionary changes during range expansion have put the emphasis on the role played by natural selection, though conclusive evidence for adaptation during the spreading phase is rare (Colautti & Lau 2015; Bertelsmeier & Keller 2018). In fact, chance is another important actor of evolution at leading edges (Keller & Taylor 2008; Excoffier et al. 2009), with consequences that stem not only from the stochastic nature of spatial drift but also from the resulting effects on inbreeding (Szücs et al. 2017).

The issue of the evolution of spread is especially important to predict the success of biological invasions. In this study, we questioned the influence of genetic drift on the evolution of allelic and genotypic frequencies in expanding populations of an invasive species. For that purpose, we explored the population genetics of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), a highly invasive aquatic species. Native from the south-central USA, it is now found in most regions of the world (Capinha et al. 2011). In Europe, it was first introduced for aquaculture in Spain in the early 1970s, and it quickly invaded most west-

European countries (Savini et al. 2010; Souty-Grosset et al. 2016). Invasion routes or history at large scales were relatively well documented (e.g. Li et al. 2012, 2015; Quan 2014). The species lives in a wide range of aquatic environments, and its introduction is generally followed by a rapid range expansion due to its ability to move overland and resist desiccation (Gherardi & Barbaresi 2000; Gherardi et al. 2002; Barbaresi et al. 2004; Aquiloni et al. 2005; Banha & Anastácio 2014; Ramalho & Anastácio 2015). Despite these characteristics, current evidence based on distribution patterns or genetic structure suggest a resistance of terrestrial habitats to the active colonization of isolated aquatic habitats by the species (Paulson & Martin 2014; Tréguier et al. 2018), and are, at a large scale, best explained by anthropogenic factors (Capinha et al. 2013; Huang et al. 2017; Yi et al. 2018). Using landscape genetics, we first determined the colonization pathways of discrete aquatic habitats by the red swamp crayfish over an area of few square kilometers in which active dispersal has been shown to be the main way of colonization of aquatic habitat colonization by crayfish (Tréguier et al. 2018). We then quantified the strength of genetic drift by estimating effective population sizes, and finally, we assessed its consequences on gene diversity using a temporal sampling. This study provides an empirical example of the evolution of allelic frequencies led by genetic drift during the spread of an invasive species, adding evidence to the idea that chance, besides natural selection, also contributes to shape range expansions.

## **Material and methods**

### **1 Study location, sampling and molecular characterization**

The Regional Natural Park of Brière (RNPB), northwestern France (47°23'N, 02°12'W), comprises several marshes, including the marsh of Brière (90 km<sup>2</sup>) and the marsh of Mès (16 km<sup>2</sup>), with a high density of ponds in a hedgerow landscape. The study was conducted in an area of 5 km × 3 km located between the two marshes (Figure 1). Aquatic continuity is completely disrupted between the two marshes, so that ponds are clustered into two networks following catchment delineations (Figure 1, see a more detailed description of the

RNPB in Tréguier *et al.* 2018). Hereafter, the marshes of Brière and Mès with their surrounding ponds were called the network of Brière and the network of Mès, respectively.

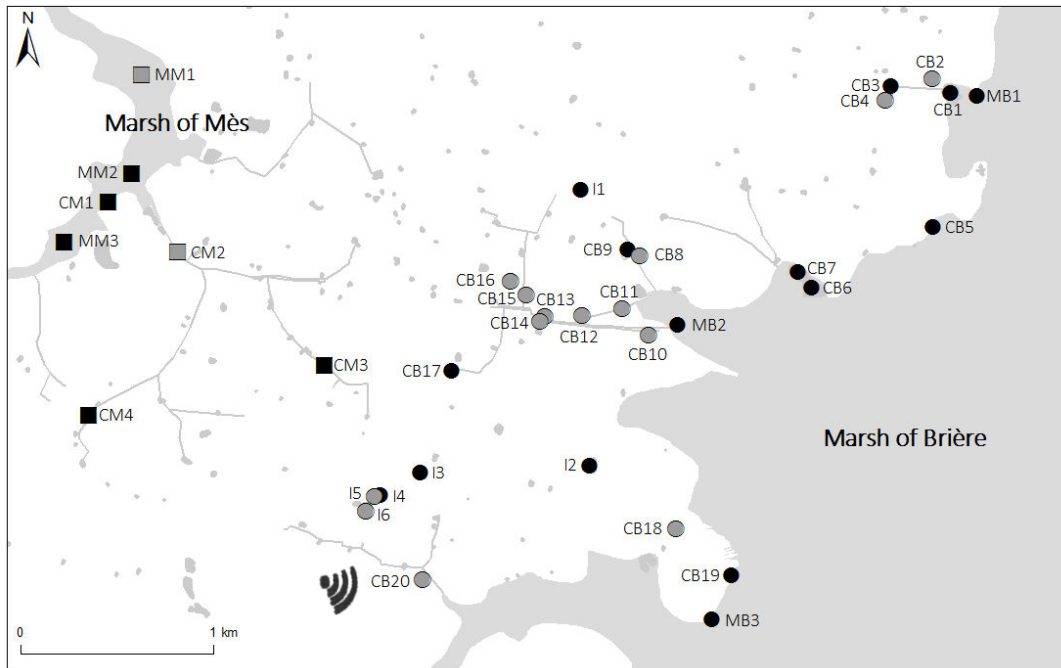


Figure 1. Spatial location of the crayfish populations sampled. Grey zones are the historical maximal flooded areas of the marshes. Grey polygons are non-sampled ponds, and grey lines represent watercourses. Circles and squares depict sampled crayfish populations of the networks of Brière and Mès, respectively. Among them, black symbols signal populations sampled both in 2014 and in 2016, and grey symbols populations sampled only in 2016. The Wifi pictogram indicates the specific locality of the only known introduction site of crayfish in the RNPB.

We sampled crayfish in five marsh canals and 15 ponds of this area in May 2014 (Figure 1). In May 2016, we sampled these 20 stations again, plus 16 additional ponds and another canal to refine landscape genetics and observe temporal changes in allelic frequencies. Historical records suggest the red swamp crayfish was introduced only once in the marsh of Brière in the early 1980s when individuals escaped from a closing crayfish farm (see its location on Figure 1). The marsh of Brière therefore constitutes the putative source of crayfish for the natural colonization of surrounding aquatic habitats. Based on the distribution pattern of crayfish populations in a companion paper (Tréguier *et al.* 2018), active dispersal was the main way in which crayfish colonized ponds, and sampled stations can be classified into five groups with respect to the degree of aquatic connectivity to a

marsh: marsh stations of Brière or Mès (MB and MM, respectively), ponds connected to a marsh (either located within the maximal flooded area of a marsh or less than 75 m from a watercourse, CB and CM), and ponds isolated from more than 115 m from a watercourse (I, Table 1). Watercourses of the network of Brière were dry at the sampling season. We sampled 16-32 individuals per station using traps, for a total of 507 individuals in 2014, and 1 039 individuals in 2016. Crayfish were euthanized by freezing following ethical guidelines stipulated in the licenses EMA/SM/13.73 and 2016/SEE-Biodiversité/070 delivered by the Préfecture de la Loire-Atlantique.

DNA was extracted from abdomen muscle using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in 2014, and using the Chelex protocol (Walsh et al. 1991) in 2016. DNA was amplified at nine microsatellite loci (described in Belfiore & May 2000: PclG4, PclG7, PclG15, PclG16, PcG17, PclG27, PclG32, PclG37, PclG48) with a touchdown PCR program: 95°C for 15 min, then 20 cycles at 94°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, 72°C for 60 seconds, with annealing temperatures decreasing by 0.5°C every cycle from 60 to 50°C. The PCR reaction continued for 20 additional cycles at 94°C for 45 seconds, 50°C for 45 seconds, 72°C for 60 seconds. Amplified PCR products were sequenced by the GENTYANE platform (INRA, Clermont-Ferrand, France) and individuals were genotyped in GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## 2 Genetic structure and pathways of gene flow

Deviation from Hardy-Weinberg proportions was tested for each locus in each population with an exact test based on Monte-Carlo permutations of alleles. Each population was described using allelic richness ( $A_r$ , based on a minimum of 15 individuals), gene diversity (HS), Wright's inbreeding coefficient (FIS), and  $\beta_{WT}$  (population-specific index of differentiation relative to the entire pool, Weir & Goudet 2017). We also calculated pairwise  $F_{ST}$ , whose significance were tested using permutation tests.

Two competing hypotheses of pathways of gene flow were tested: isolation by distance (IBD) and least-cost paths (LCP). We tested both one- and two-dimensional IBD models as the first would be more appropriate for ponds along waterways, whereas the second would

better fit in the wider marshes (Rousset 1997). Geographic distances were represented by raw or log-transformed Euclidean distances between ponds (one- or two-dimensional IBD, respectively). The other scenario tested the hypothesis that crayfish dispersal was restricted by terrestrial habitats, and watercourses play the role of corridors. A binary cartography of the study area (terrestrial vs. aquatic habitats) was designed using ArcGis 10.1 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, USA, 2011) and a land use map (BD ORTHO 2009), and field validation. Geographic distances were the least-cost distances using aquatic pathways between ponds. In the absence of estimations of habitat permeability, we tested costs for crayfish dispersal over terrestrial habitats that were 5, 10, 20, 50 and 100 times higher than for crossing aquatic habitats, hereafter called cost-ratios of 5:1, 10:1, 20:1, 50:1 and 100:1, respectively. We tested the correlations between genetic distances (linearized pairwise  $F_{ST}$ , i.e.  $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ) and each type of geographic distances using permutation Mantel tests. If the invasion of discrete aquatic habitats actually resulted from independent introductions in each marsh, correlations should be higher when separating the two networks. Therefore, the scenarios were tested on all populations together, and then, separately in each network. Population genetic analyses and landscape genetics are presented for samples of 2016 because of the higher sample size, but 2014 samples led to qualitatively identical results (Figs. S1 and S2).

Most population genetics models, such as Wright's models, assume that samples are collected after dispersal (Broquet & Petit 2009). Here, sampled crayfish included both juveniles and reproductive adults, so it was important to check whether it did affect the results. Since the distribution of body length of all sampled crayfish (measured from the tip of the rostrum to the end of the telson) was bimodal (Figure S3), we considered individuals below the intersection of the two cohorts as juveniles (< 1 year) and the others as adults (> 1 year) and we kept populations of the two age classes with  $n > 3$  individuals (267 juveniles in 20 populations, 753 adults in 34 populations). As we noted similar patterns of genetic variation between populations (allelic richness,  $\beta$ WT, IBD and LCP) for each stage, results are presented with both stages pooled (but see results for separated stages in Figs. S4 to S6).

### 3 Effective population sizes and temporal changes in genetic diversity and structure

Effective population size ( $N_e$ ) is a fundamental population genetic parameter which is related to the intensity of genetic drift in natural populations (Wright 1931). Linkage disequilibrium, as implemented in NeEstimator v2 (Do et al. 2014), is an efficient method to estimate  $N_e$  both in case of isolated populations and in migration scenarios (Gilbert & Whitlock 2015).  $N_e$  estimated using this method (LD $N_e$ ) also promptly detects changes in effective population sizes (Antao et al. 2011). First, we calculated LD $N_e$  for each population on the datasets of 2014 and 2016. In accordance to the results on genetic structure, we presented LD $N_e$  estimates in 2016 regardless of network assignment. Second, we compared  $N_e$  values obtained for populations sampled twice (i.e. in 2014 and 2016) to identify a trend in the recent evolution of the strength of genetic drift for each population category, using a Wilcoxon signed rank test because infinite estimates were obtained when genetic drift was low. Then, we evaluated the evolution in allelic frequencies by testing the significance of changes in allelic richness from 2014 to 2016 ( $Ar_{2016} - Ar_{2014}$ ), and in  $\beta_{WT}$  ( $\beta_{WT2016} - \beta_{WT2014}$ ) to reflect the evolution of the structure of populations, using permutation paired t-tests. Lastly, as genetic drift is expected to increase absolute inbreeding, we calculated the mean proportion of homozygous loci in populations sampled in 2016 and tested its variation against the three population categories using a permutation *ANOVA*.

Datasets were handled using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995), and the R (R Core Team 2018) packages adegenet (Jombart 2008), pegas (Paradis 2010), hierfstat (Goudet & Jombart 2015), raster (Hijmans 2017) and gdistance (van Etten 2017). All permutation tests were done with 10 000 permutations.

## Results

### 1 Genetic structure and pathways of gene flow

Genotypic frequencies did not show consistent deviations from Hardy-Weinberg proportions over loci or populations after Bonferroni corrections (global  $F_{IS}$  per population are available in Table 1), and we kept the entire dataset for further analyses. Overall populations, 79 alleles were found over the nine loci (three to 13 alleles per loci).

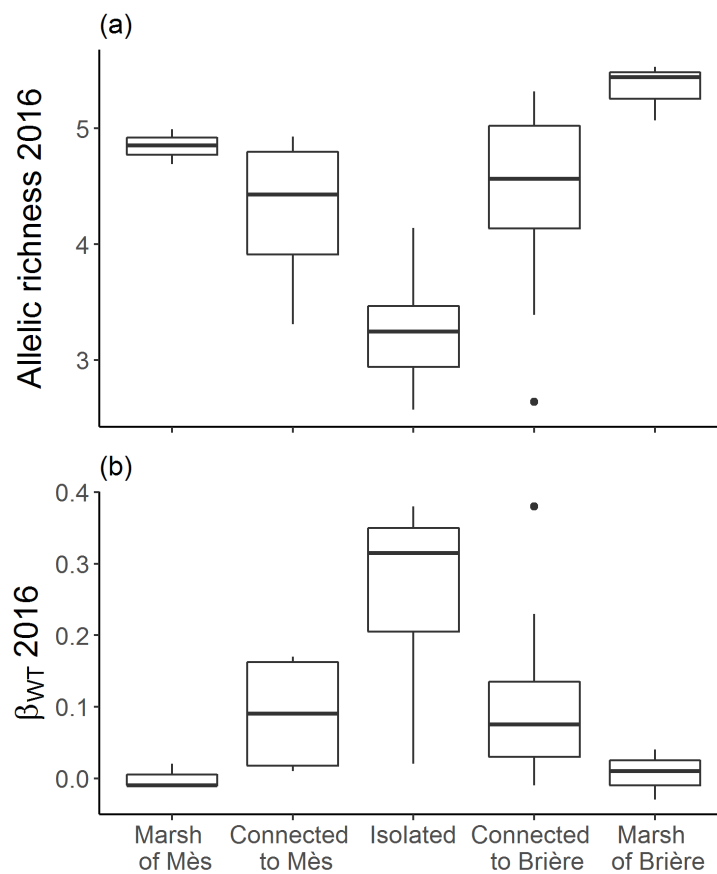


Figure 2. Genetic variation between population categories in 2016: (a) mean allelic richness ( $A_T$ ), and (b)  $\beta_{WT}$  (population-specific differentiation relative to the entire pool following Weir and Goudet (2017)). Values are available in Tables 1 and 2.

## Chapitre 2 : Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive

Table 1. Genetic diversity and summary statistics for crayfish populations sampled in 2014 and 2016. n, number of individuals genotyped; FIS, Wright's coefficient of inbreeding; Ar, allelic richness; HS, expected heterozygosity;  $\beta_{WT}$ , population-specific differentiation relative to the entire pool following Weir and Goudet (2017).

Category	Site name	n		mean Ar		mean H <sub>s</sub>		F <sub>IS</sub>		$\beta_{WT}$	
		2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
Marsh of Brière	MB1	25	30	5.44	5.44	0.69	0.70	-0.035	0.056	0.02	0.01
	MB2	32	30	5.41	5.07	0.69	0.68	0.036	-0.053	0.02	0.04
	MB3	24	30	5.38	5.53	0.70	0.72	0.001	0.042	0.01	-0.03
Connected to Brière	CB1	25	29	5.34	5.32	0.69	0.71	0.010	0.005	0.02	-0.01
	CB2	-	29	-	3.73	-	0.60	-	-0.094	-	0.15
	CB3	25	30	4.90	4.91	0.66	0.68	-0.033	0.024	0.06	0.03
	CB4	-	30	-	5.29	-	0.70	-	0.049	-	0.01
	CB5	25	30	5.14	4.58	0.70	0.68	-0.012	-0.044	0	0.04
	CB6	23	30	5.43	5.05	0.68	0.69	0.029	-0.009	0.03	0.03
	CB7	21	30	4.95	5.01	0.70	0.69	0.018	0.017	0	0.03
	CB8	-	30	-	4.33	-	0.64	-	-0.065	-	0.09
	CB9	25	29	3.78	3.55	0.64	0.55	-0.058	0.022	0.09	0.23
	CB10	-	30	-	2.64	-	0.44	-	-0.042	-	0.38
	CB11	-	26	-	5.25	-	0.71	-	0.044	-	0
	CB12	-	31	-	4.63	-	0.70	-	0.047	-	0
	CB13	-	30	-	3.41	-	0.57	-	-0.128	-	0.19
	CB14	-	30	-	4.55	-	0.63	-	0.012	-	0.11
	CB15	-	30	-	4.72	-	0.65	-	0.093	-	0.07
	CB16	-	30	-	4.42	-	0.62	-	0.066	-	0.13
	CB17	25	30	4.66	4.28	0.68	0.65	-0.017	-0.000	0.03	0.08
	CB18	-	30	-	3.39	-	0.60	-	-0.046	-	0.15
	CB19	30	29	5.14	5.23	0.68	0.68	-0.021	-0.018	0.03	0.04
	CB20	-	30	-	4.27	-	0.62	-	-0.023	-	0.12
Isolated	I1	23	30	3.50	3.52	0.60	0.59	0.023	-0.028	0.14	0.17
	I2	25	30	3.56	3.31	0.51	0.48	0.025	-0.008	0.27	0.32
	I3	25	29	4.61	4.14	0.71	0.69	0.019	0.050	-0.02	0.02
	I4	24	30	3.38	3.18	0.45	0.49	-0.105	0.003	0.36	0.31
	I5	-	30	-	2.86	-	0.45	-	-0.082	-	0.36
	I6	-	28	-	2.57	-	0.44	-	0.063	-	0.38
Marsh of Mès	MM3	-	29	-	4.85	-	0.72	-	-0.010	-	-0.01
	MM2	22	29	4.68	4.99	0.69	0.69	0.084	-0.016	0.02	0.02
	MM1	25	30	4.82	4.69	0.70	0.71	-0.040	0.028	0.01	-0.01
Connected to Mès	CM1	23	30	4.89	4.75	0.67	0.69	0.088	0.036	0.05	0.02
	CM2	-	27	-	4.93	-	0.70	-	0.080	-	0.01
	CM3	21	18	3.72	4.11	0.57	0.58	-0.025	-0.096	0.18	0.17
	CM4	20	16	3.67	3.31	0.63	0.59	-0.067	-0.001	0.10	0.16

Mean allelic richness varied by a factor of two among populations (Table 1), from 2.57 (I6) to 5.53 alleles per locus (MB3), and so did mean gene diversity, from 0.44 (I6 and CB10) to 0.72 (MB3). Allelic richness highly varied according to pond categories; it decreased with increasing isolation from the marshes, being the highest for marsh stations (mean value = 5.09), intermediate for ponds connected to the marshes (4.40) and the lowest for isolated ponds (3.26, Figure 2a). The same pattern was observed for gene diversity, with mean values ranging from 0.70 in the marshes to 0.64 in connected ponds and 0.52 in the isolated ponds (Figure S7). More, the allelic composition of populations in ponds and in the marsh of Mès was always nested in that of populations from the marsh of Brière.  $\beta_{WT}$  was also linked to pond category, being the lowest for marsh stations, intermediate for connected ponds, and the highest for isolated ponds (Figure 2b).

Pairwise  $F_{ST}$  varied from -0.005 to 0.406, and most populations were differentiated so that each pond delineated a distinct genetic unit (89% of the 630 pairs being significant, Table S1). However, genetic distances were not correlated to Euclidean distances between populations ( $r = -0.16$ ,  $p = 0.95$ ) nor to these distances log-transformed ( $r = -0.09$ ,  $p = 0.89$ ). The highest pairwise  $F_{ST}$  values were found between isolated ponds (mean = 0.24, all pairs significant, even three ponds were distant from < 100 m), and the lowest between stations of the same marsh (< 0.01, all pairs being non-significant even stations were up to 3 km apart). Populations closely connected to the marsh by a watercourse were undifferentiated, and pairwise  $F_{ST}$  values between the two marshes were also low (< 0.04). Isolated populations were genetically closer to the marsh of Brière than to the marsh of Mès; this supported their assignment to the network of Brière for the following analyses. Genetic distances were better correlated to the least-cost distances using aquatic pathways, and this correlation increased with the cost of terrestrial dispersal to reach a plateau above the cost ratio of 50:1 (Figure 3a, empty dots, see also similar results for data from 2014, Figure S2). When considering the network of Brière only, the pattern persisted (Figure 3a, filled dots): genetic distances were not correlated to Euclidean distances ( $r = -0.04$ ,  $p = 0.68$ , Fig 3b), but were highly correlated to least-cost distances between populations, the amount of genetic information explained increased by a factor of five using the cost-ratio of 100:1 when compared to both networks combined ( $r = 0.54$ ,  $p < 0.01$ , Figure 3c). In the network of Mès, sampled populations were all

directly connected to watercourses, and least-cost distances were therefore similar whatever the cost-ratio applied to terrestrial areas. In this network, the correlation between genetic and Euclidean distances was high and significant (1-dimensional IBD:  $r = 0.74$ ,  $p < 0.01$ ; 2-dimensional IBD:  $r = 0.72$ ,  $p < 0.01$ ), so was the correlation between genetic and least-cost distances (plateau after a cost-ratio of 5:1,  $r = 0.83$ ,  $p = 0.03$ ).

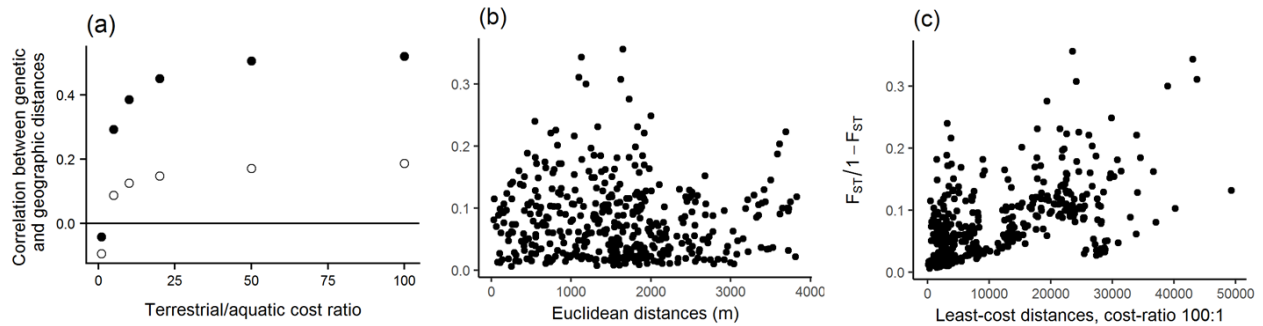


Figure 3. Correlations between genetic (linearized pairwise  $F_{ST}$ ) and geographic distances for crayfish populations sampled in 2016: (a) correlation with increasing costs for crossing terrestrial habitats, all ponds together (empty circles) or only populations from the network of Brière (filled circles), (b) plot of the correlation when using Euclidean distances (i.e. scenario of IBD), and (c) plot of the correlation when using least-cost distances (terrestrial/aquatic cost-ratio of 100:1), both for populations from the network of Brière.

## 2 Effective population sizes and temporal changes in genetic diversity and structure

$LDN_e$  were very low for isolated ponds in 2016 (7.1 to 26.2) and they were the highest and sometimes infinite for marsh stations (Figure 4a, Table 2). Besides, there was a large variation in  $N_e$  estimates for ponds connected to the marshes (from 1.2 to infinite in few cases, Figure 4a). In 2016, absolute consanguinity varied among pond categories ( $p < 0.001$ , Figure 4b), and it was significantly higher in isolated ponds (mean homozygosity: 45%) as compared to connected ponds (32%), and in these two categories as compared to marsh stations (27%).

## Chapitre 2 : Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive

Table 2. Effective population sizes (95% confidence intervals) estimated using linkage disequilibrium in 2014 and in 2016.

Site name	LDNe (2014)	LDNe (2016)
MB1	472.3 (39 · ∞)	415.3 (58.8 · ∞)
MB2	∞ (62.6 · ∞)	183.1 (46.1 · ∞)
MB3	128.4 (35.2 · ∞)	∞ (86.6 · ∞)
CB1	203.8 (38.4 · ∞)	50.6 (24.6 · 306.7)
CB2	-	1.2 (1.0 · 1.6)
CB3	30.5 (15.3 · 114.4)	56.3 (25.6 · 783.5)
CB4	-	100.3 (37.7 · ∞)
CB5	41.6 (18.4 · 629.6)	32.4 (16.9 · 101.5)
CB6	35 (15.6 · 367)	∞ (86.6 · ∞)
CB7	37.4 (15.5 · ∞)	∞ (122.6 · ∞)
CB8	-	6.5 (3.3 · 10.0)
CB9	20 (9.9 · 61.5)	7.5 (3.7 · 12.4)
CB10	-	7.9 (2.8 · 18.3)
CB11	-	370.1 (45.3 · ∞)
CB12	-	30.6 (17.4 · 72.6)
CB13	-	2.7 (1.9 · 4.8)
CB14	-	6.6 (3.8 · 9.7)
CB15	-	26.8 (16.0 · 55.6)
CB16	-	25.5 (14.9 · 54.4)
CB17	16.5 (9.1 · 36.5)	18.1 (11.1 · 32.6)
CB18	-	∞ (56.3 · ∞)
CB19	87 (31.8 · ∞)	∞ (2734.5 · ∞)
CB20	-	1.9 (1.5 · 2.4)
I1	21.5 (8.6 · 184.7)	14.4 (8.1 · 28.2)
I2	19.6 (8.7 · 77)	13.7 (7.3 · 28.5)
I3	29.8 (13.1 · 241.4)	20.5 (12.1 · 41.1)
I4	22.9 (8.3 · 709)	13.6 (7.0 · 29.7)
I5	-	26.2 (9.8 · 470.8)
I6	-	7.1 (2.5 · 19.2)
MM1	422.8 (36 · ∞)	1266.8 (54.0 · ∞)
MM2	412.7 (30.9 · ∞)	∞ (74.4 · ∞)
MM3	-	∞ (67.1 · ∞)
CM1	∞ (48.4 · ∞)	59.1 (27.2 · 733.1)
CM2	-	113.2 (33.0 · ∞)
CM3	3 (2 · 7.4)	2.9 (2.1 · 6.1)
CM4	20 (7.9 · 190.7)	7.6 (2.6 · 24.5)

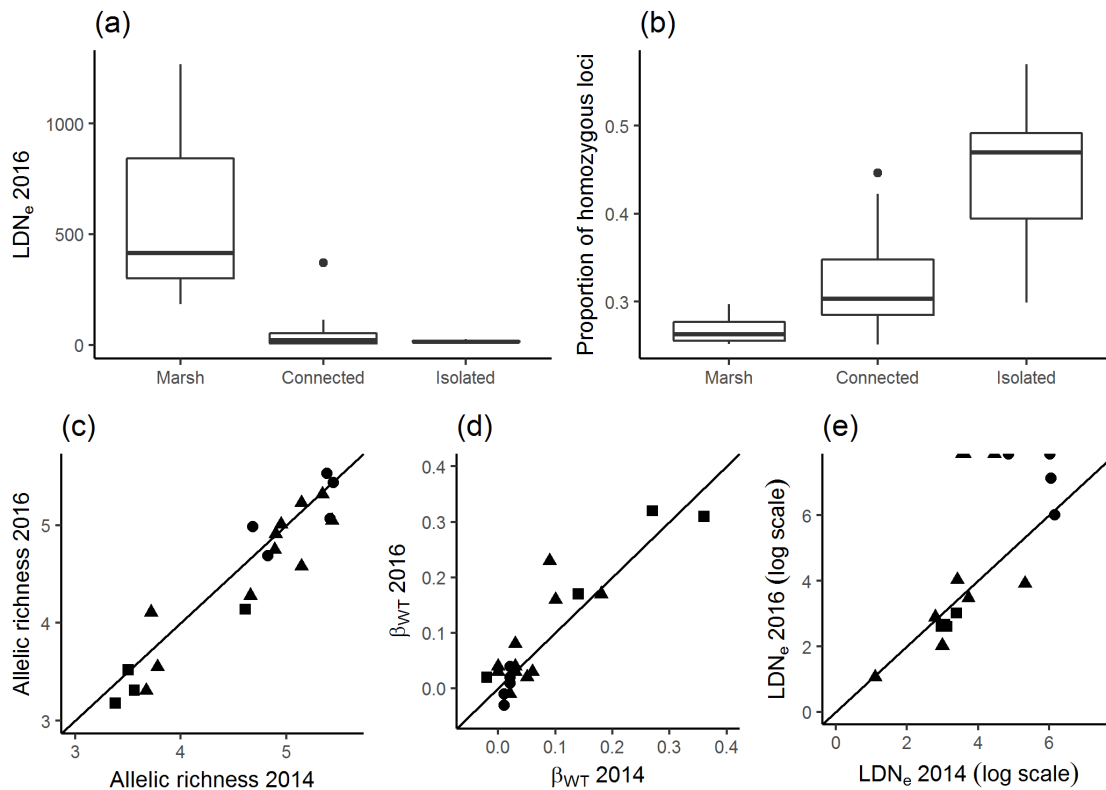


Figure 4. (a) Estimates of effective populations sizes using the linkage disequilibrium method ( $LDN_e$ ), and (b) mean population homozygosity (mean values) according to three population categories ( $n = 36$  populations, 2016). Populations for which infinite estimates of  $N_e$  were found (i.e.  $>10\,000$ , seven stations) were discarded to facilitate the reading of the chart (see  $N_e$  estimates in Table ??). Changes in the genetic statistics between 2014 and 2016 based on: (c) allelic richness, (d)  $\beta_{WT}$ , and (e)  $LDN_e$ , with circles, triangles and squares representing marsh canals, ponds connected to the marsh and isolated ponds, respectively. Truncated symbols indicate infinities. Plain lines represent  $y = x$ .

Between 2014 and 2016, there was a significant decrease in allelic richness ( $p < 0.05$ , Figure 4c), but with marked differences between pond categories: a sharp loss of genetic diversity in isolated populations (mean loss: 0.22 allele), while this loss was lower in connected ponds (0.14 allele) and inexistent in marsh populations (0 allele). The structure between populations however did not significantly increased over these two years (mean difference in  $\beta_{WT} = 0.01$ ,  $p = 0.21$ , Figure 4d).  $N_e$  estimates decreased in all isolated ponds (4/4), in 55% of the connected ponds (6/11), and in 40% of the marsh stations (2/5, Figure 4e), though these changes in  $N_e$  were overall not significant ( $p > 0.05$ ).

## Discussion

The spatial and temporal variation of allele frequencies of populations of a highly invasive aquatic species, the red swamp crayfish, revealed a prominent effect of genetic drift during its expansion.

### 1 Reconstructing colonization pathways to identify edge populations

Genetic diversity varied greatly between red swamp crayfish populations in the present study, as this has already been observed in two other studies (0.35 to 0.84, Paulson & Martin 2014; 0.25 to 0.60, Huang et al. 2017). Such variations can be indicative of the historical pattern of spread of the invasive species. Indeed, the establishment of new populations at range edges usually begins with relatively few dispersive individuals (and therefore, a subset of the genetic pool of the source population). A direct consequence is a reduced genetic diversity in the founded population, the so-called founder effect, producing a pattern analog to genetic drift with the allelic composition of the founded populations nested in that of the source population (Slatkin & Excoffier 2012). Here, the observed variations in genetic diversity between waterbodies led to the conclusion that the invasion probably began in the marsh of Brière (which is concordant with historical records), and that a natural colonization occurred towards the ponds. A similar genetic pattern can be described for the second pond network. Thus pond invasions actually emerged from the two marshes, representing crayfish sources. However, in the marsh of Mès, crayfish was recorded for the first time in 2003, 20 years after its introduction in the marsh of Brière. The singularity of this study area is that the colonization of the marsh of Mès likely resulted from a secondary introduction event with an inoculum originating from the marsh of Brière, since the allelic composition of crayfish population in Mès stations was nested in that of populations from the marsh of Brière. Such fine genetic signal of crayfish spread was not identified elsewhere, probably blurred by multiple introduction events at several locations (Li et al. 2012; Huang et al. 2017; Yi et al. 2018).

We also found that genetic units were delineated by aquatic continuity, so that ponds as near as 30 m from each other constituted distinct genetic populations, whereas, by contrast, stations within a marsh and ponds closely connected to it (i.e. ponds within the perimeter of the maximum flooded area of the marsh, or at short watercourse distance from the marsh) were part of a single large genetic unit extending over at least 3 km from north to south. More, landscape genetics analyses indicated that the colonization of waterbodies occurred through watercourses, meaning that land surfaces constituted a strong barrier to the spread of crayfish. Further, a remarkable proportion of the genetic variance was explained by only one binary variable (the aquatic or terrestrial nature of the habitat), which is uncommon in landscape genetics (Graves et al. 2014; see e.g. Spear et al. 2005; Ferrer et al. 2016). Although red swamp crayfish are undoubtedly able to move overland (Ramalho & Anastácio 2015), wandering on terrestrial land to seek suitable habitat patches is dangerous for crayfish due to the risk of desiccation (death occurs between 6 and 21h, Banha & Anastácio 2014). Moreover, the authors of this study estimated that red swamp crayfish could travel as far as 1600 m overland, a distance which is much longer than needed to colonize the entire study area here. As only half of the ponds of this 15 km<sup>2</sup>-area were successfully colonized by the red swamp crayfish after 30 years of invasion (Tréguier et al. 2018), the overland dispersal was likely less efficient in this area than has been reported in the literature. Paulson & Martin (2014) showed that genetic differentiation of red swamp crayfish populations was linked to the hydrological isolation of lakes. Despite apparent suitable conditions for crayfish to invade the study area (a high density of aquatic patches in close proximity to two crayfish sources, the marshes), the red swamp crayfish populations suffered from strong founder effects during the colonization of pond networks, because gene flow was highly restricted by the patchy nature of the landscape. Whether populations at the range edge were founded following a radial expansion coming from the marshes or from serial colonizations from one pond to another over time (Slatkin 1993) remains unresolved, given successive founder effects during colonization or a decrease in the number of effective migrants with distance to the marsh could give rise to the genetic structure observed. However, most current genetic distances were so high that they could signal ponds have been colonized in one event only, without subsequent immigration. Crayfish populations in isolated ponds can be thus considered to be the range edge of the invasion of the red swamp crayfish.

## 2 Spatial gradient of genetic drift along with the colonization

According to theoretical models (Excoffier et al. 2009; Phillips et al. 2010b; Slatkin & Excoffier 2012; Phillips 2015), range edges could be the seat of important evolutionary changes influencing the spread phase of the invasive species. Accelerated invasion has been observed in several empirical studies of flagship species, including the cane toad (Phillips et al. 2006, 2010a), but also insects (Simmons & Thomas 2004) or plants (Williams et al. 2016), and natural selection has been invoked to govern these changes. Besides, rapid divergence in genetic trajectories at invasion fronts could be mediated by chance only (Excoffier et al. 2009; Phillips 2015; Ochocki & Miller 2017; Weiss-Lehman et al. 2017). Our findings support the idea that the strength of genetic drift increases from the core population towards the edge of the invasion. Genetic drift was very intense at the edges of the invasion, with already very low effective population sizes and allelic richness showing a sharp decrease over only two years. By contrast, the strength of genetic drift was weaker in source populations (i.e. marsh stations), since effective population sizes and allelic richness were high and stable over time. The influence of genetic drift was intermediate for populations in ponds connected to the marsh. Therefore, this case study is a clear empirical evidence of the importance of genetic drift in the evolutionary dynamics during the spread phase, as described in theoretical models (Keller & Taylor 2008). However, the diversity at neutral markers, like microsatellites, is not necessarily representative of the diversity at ecologically relevant traits, as they are subjected to natural selection, and because traits are integrated across the effects of multiple genes (Estoup et al. 2016). Further works combining neutral markers and quantitative traits (i.e. comparative analysis of  $F_{ST}$  and  $Q_{ST}$ ) would be particularly relevant to explore the possible effects of natural selection.

Lastly, marked decreases in crayfish abundances occurred in ponds over the last five years (2012-2016, Table S2), suggesting a decrease in population growth rate at range edges, contrary to what was found elsewhere (Szücs et al. 2017). Populations exhibiting high homozygosity can be subject to inbreeding depression or become small enough that environmental and demographic stochasticity lead them to extinction, in a dynamic called extinction vortex (Fagan & Holmes 2006). As a result, the long-term persistence of edge

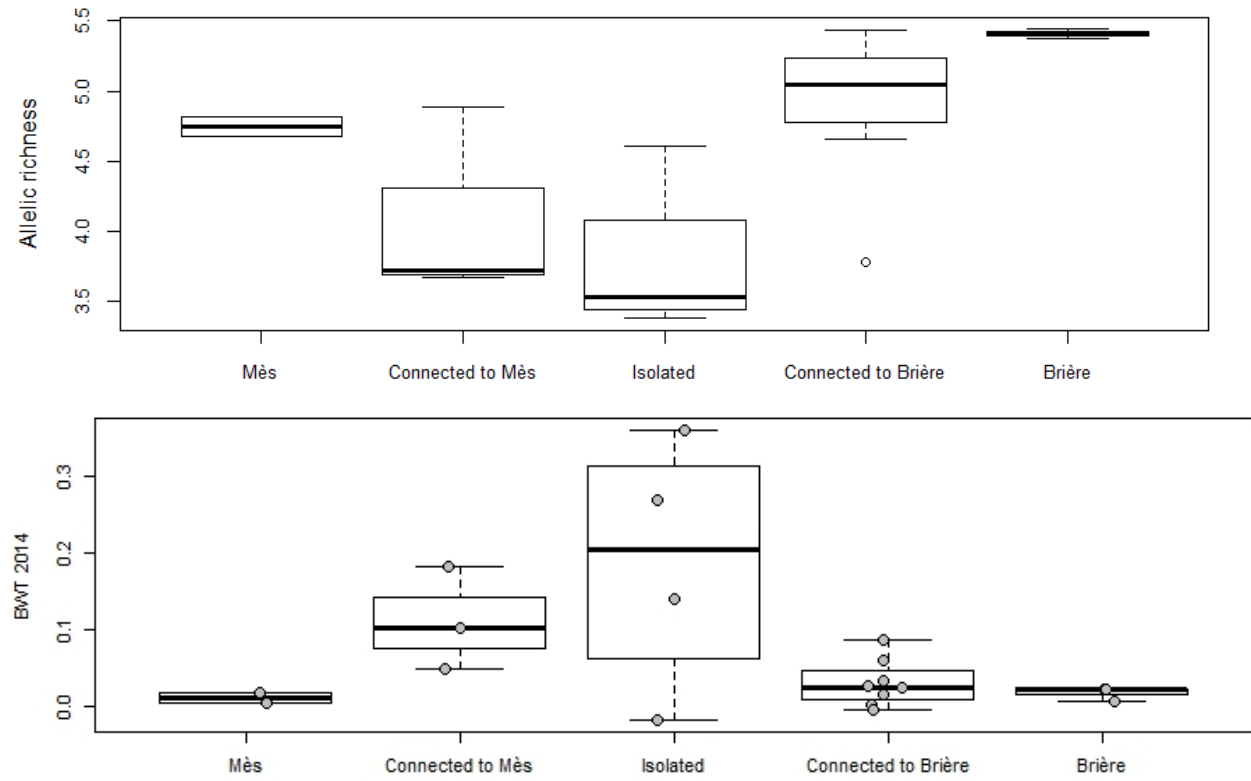
populations of the invasive species may be compromised, as documented in threatened species (Caughley 1994). Spontaneous population crashes in invasive species have been recorded in the past, especially on islands, but most of the time, they remained unexplained (Simberloff & Gibbons 2004). Strong genetic drift, associated to inbreeding depression, could be proposed as a reason for these disappearances.

Other outcomes can result from the assessment of the intensity of gene flow and genetic drift in invasive populations. Here, findings suggest that the colonization of new waterbodies could be prevented by disrupting the aquatic connection between sites. Such prediction of the expansion of species has decisive consequences for management plans, be they for modelling scenarios under global changes, for the control of biological invasions, the biological control or rerelease plans of conservation. To conclude, estimations of range shifts could be improved by considering genetic drift as an important evolutionary force during species expansions.

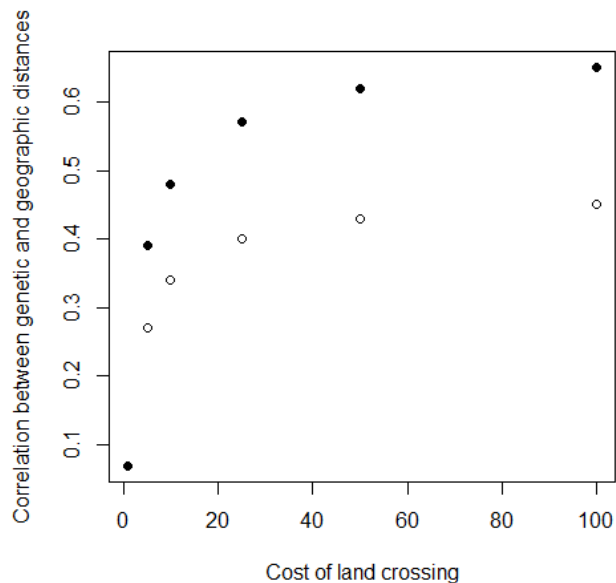
### **Acknowledgements**

We are indebted to the Syndicat mixte du RNPB for logistic support, and to landowners for allowing us to sample their ponds. This research was supported by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques and the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (PhD Grant to N.B.).

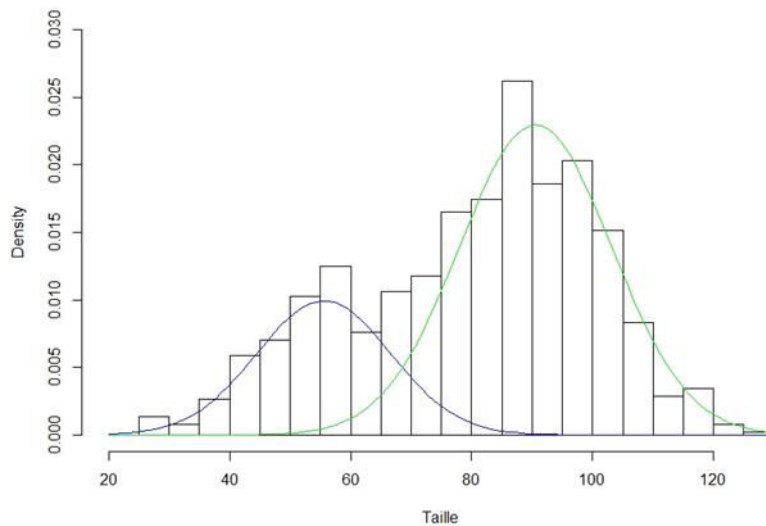
**Supplementary material**



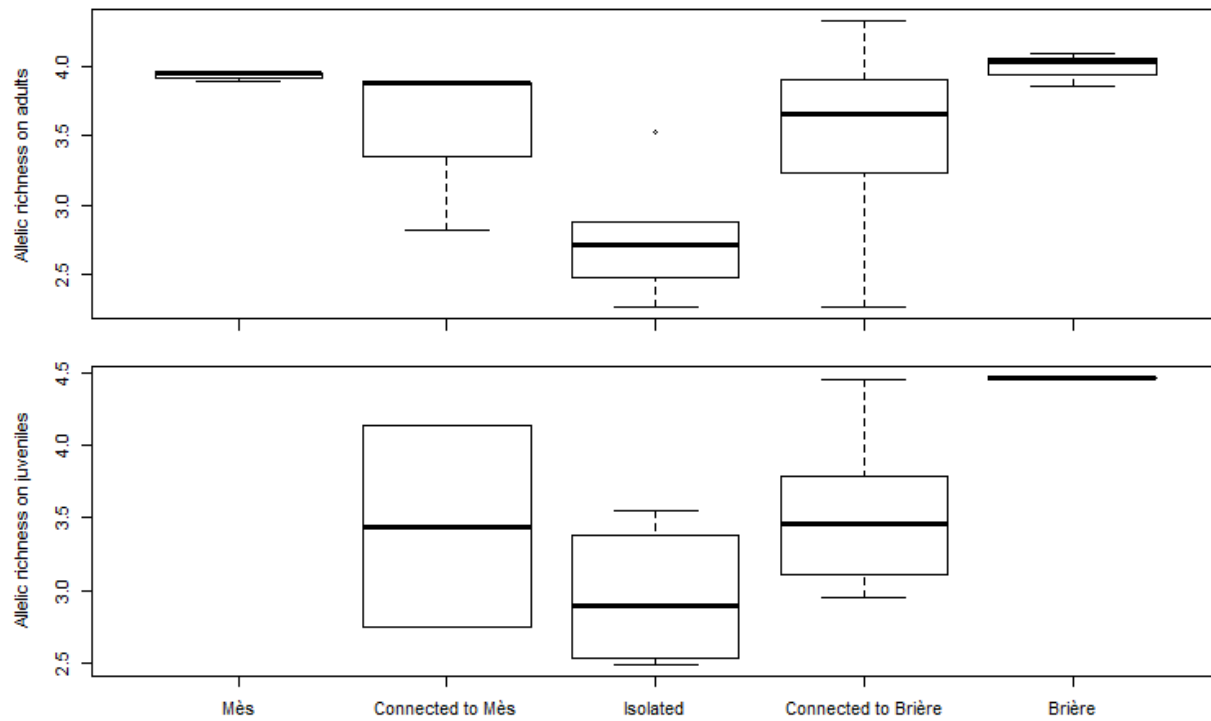
**Figure S1** (a) Mean allelic richness and (b)  $\beta$ WT according to networks and connectivity to the marshes on the dataset of 2014.



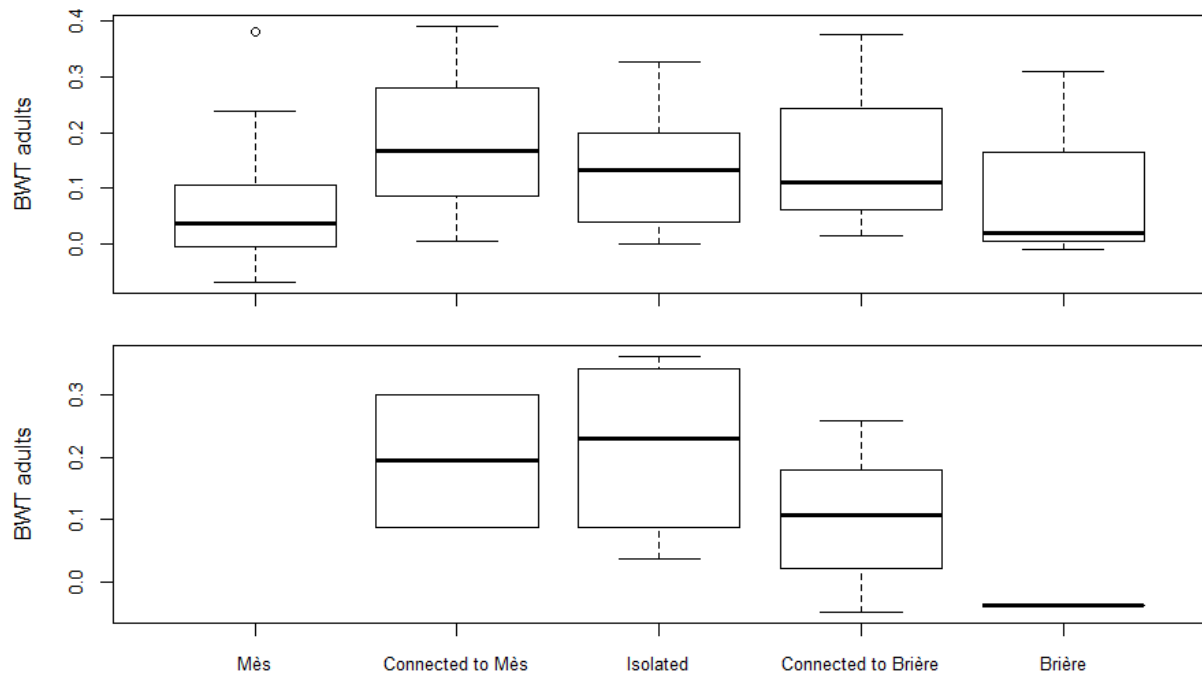
**Figure S2** Evolution of the correlations between genetic and geographic distances for crayfish populations with increasing cost of land crossing, all ponds together (empty circles) or for the network of Brière only (filled circles), on the dataset of 2014.



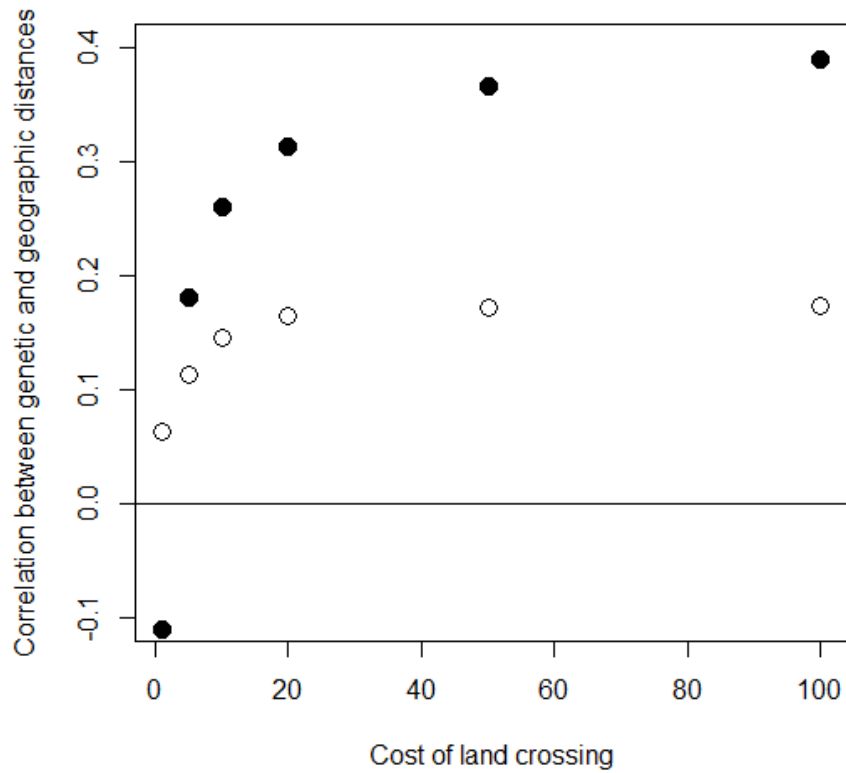
**Figure S3.** Frequency distribution of total length (from the tip of the rostrum to the extremity of the telson) of crayfish sampled in 2016 ( $n = 1039$ ) with fitted normal curves corresponding to two-age classes.



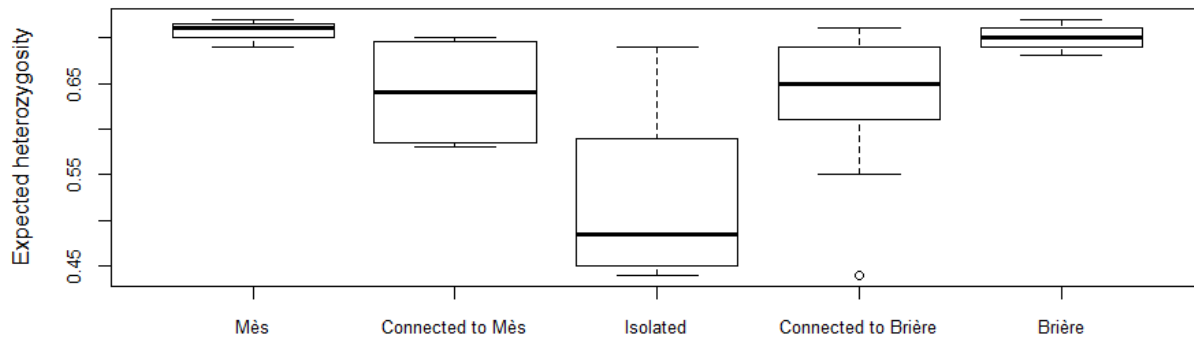
**Figure S4.** Mean allelic richness of crayfish populations while considering separately (a) adults and (b) juveniles, categorized by networks and connectivity to the marshes.



**Figure S5.**  $\beta_{WT}$  of crayfish populations while considering separately (a) adults and (b) juveniles, categorized by networks and connectivity to the marshes.



**Figure S6.** Evolution of the correlation between genetic and geographic distances for crayfish populations with increasing cost of land crossing, all ponds together while considering separately adults (empty circles) and juveniles (filled circles).



**Fig S7.** Mean gene diversity ( $H_e$ ) of crayfish populations according to station categories.

## Chapitre 2 : Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive

**Table S1.** Pairwise  $F_{ST}$  of crayfish populations sampled in 2016. <sup>NS</sup> indicates non-significant  $F_{ST}$  (p-value obtained after 12 600 permutations).

	<b>MB1</b>	<b>MB2</b>	<b>MB3</b>	<b>CB1</b>	<b>CB2</b>	<b>CB3</b>	<b>CB4</b>	<b>CB5</b>	<b>CB6</b>	<b>CB7</b>	<b>CB8</b>	<b>CB9</b>	<b>CB10</b>	<b>CB11</b>	<b>CB12</b>	<b>CB13</b>	<b>CB14</b>
<b>MB2</b>	0.0043 <sup>NS</sup>																
<b>MB3</b>	0.0027 <sup>NS</sup>	-0.0008 <sup>NS</sup>															
<b>CB1</b>	0.0158 <sup>NS</sup>	0.0191 <sup>NS</sup>	0.0061 <sup>NS</sup>														
<b>CB2</b>	0.0902	0.0937	0.0931	0.0902													
<b>CB3</b>	0.0182	0.0235	0.0160 <sup>NS</sup>	0.0147 <sup>NS</sup>	0.0852												
<b>CB4</b>	0.0177 <sup>NS</sup>	0.0162 <sup>NS</sup>	0.0158 <sup>NS</sup>	0.0087 <sup>NS</sup>	0.0935	0.0082 <sup>NS</sup>											
<b>CB5</b>	0.0177 <sup>NS</sup>	0.0175	0.0056 <sup>NS</sup>	0.0146	0.0916	0.0154	0.0213										
<b>CB6</b>	0.0174	0.0219 <sup>NS</sup>	0.0164 <sup>NS</sup>	0.0201	0.0896	0.0178	0.0349	0.0184 <sup>NS</sup>									
<b>CB7</b>	0.0133 <sup>NS</sup>	0.0049 <sup>NS</sup>	-0.0001 <sup>NS</sup>	0.0177 <sup>NS</sup>	0.0891	0.0258	0.0282	0.0091 <sup>NS</sup>	0.0071 <sup>NS</sup>								
<b>CB8</b>	0.0320	0.0425	0.0283	0.0573	0.1403	0.0772	0.0706	0.0517	0.0645	0.0419							
<b>CB9</b>	0.0943	0.0769	0.1020	0.1289	0.1794	0.1101	0.1179	0.1135	0.0945	0.0836	0.1141						
<b>CB10</b>	0.2003	0.1584	0.1759	0.1969	0.2455	0.2370	0.1823	0.2040	0.2406	0.1866	0.2241	0.2587					
<b>CB11</b>	0.0020 <sup>NS</sup>	0.0113 <sup>NS</sup>	0.0013 <sup>NS</sup>	0.0092 <sup>NS</sup>	0.0838	0.0239	0.0204 <sup>NS</sup>	0.0127 <sup>NS</sup>	0.0224 <sup>NS</sup>	0.0094 <sup>NS</sup>	0.0335	0.1146	0.1860				
<b>CB12</b>	0.0182	0.0350	0.0183	0.0027 <sup>NS</sup>	0.0989	0.0262	0.0263	0.0204	0.0251	0.0287	0.0707	0.1454	0.2056	0.0167 <sup>NS</sup>			
<b>CB13</b>	0.1449	0.1330	0.1124	0.1291	0.2053	0.1189	0.1225	0.1305	0.1444	0.1277	0.1807	0.2571	0.3157	0.0935	0.1532		
<b>CB14</b>	0.0837	0.0934	0.0856	0.0842	0.0625	0.0781	0.0757	0.0753	0.0989	0.0938	0.1569	0.2156	0.2396	0.0750	0.0705	0.1745	
<b>CB15</b>	0.01 00 <sup>NS</sup>	0.0257 <sup>NS</sup>	0.0167 <sup>NS</sup>	0.0197 <sup>NS</sup>	0.1238	0.0337	0.0326	0.0242 <sup>NS</sup>	0.0141 <sup>NS</sup>	0.0128 <sup>NS</sup>	0.0483	0.1095	0.2421	0.0099 <sup>NS</sup>	0.0284	0.1423	0.1163
<b>CB16</b>	0.0388	0.0361	0.0494	0.0460	0.1290	0.0536	0.0411	0.0319	0.0442	0.0434	0.1127	0.1135	0.2275	0.0447	0.0549	0.1805	0.1144
<b>CB17</b>	0.0312	0.0678	0.0479	0.0581	0.1456	0.0642	0.0748	0.0489	0.0500	0.0590	0.0712	0.1685	0.2892	0.0295	0.0623	0.1590	0.1220
<b>CB18</b>	0.0826	0.0567	0.0615	0.0783	0.1382	0.1112	0.0722	0.0826	0.0940	0.0610	0.0917	0.1597	0.1598	0.0866	0.0914	0.2184	0.1325
<b>CB19</b>	0.0022 <sup>NS</sup>	-0.0020 <sup>NS</sup>	-0.0048 <sup>NS</sup>	0.0168 <sup>NS</sup>	0.0910	0.0159	0.0204	0.0093 <sup>NS</sup>	0.0160 <sup>NS</sup>	-0.0011 <sup>NS</sup>	0.0452	0.0794	0.1938	0.011 0 <sup>NS</sup>	0.0286	0.1372	0.0946
<b>CB20</b>	0.0247	0.0343	0.0273	0.0441	0.1491	0.0519	0.0477	0.0410	0.0556	0.0348	0.0571	0.1096	0.2525	0.0388	0.0680	0.1823	0.1463
<b>I1</b>	0.0918	0.0967	0.0837	0.1265	0.1721	0.1109	0.1104	0.1010	0.1379	0.1093	0.1637	0.2013	0.2733	0.1121	0.1192	0.2370	0.1286
<b>I2</b>	0.1353	0.1412	0.1293	0.1757	0.2232	0.1867	0.1889	0.1718	0.1765	0.1480	0.1390	0.2503	0.2973	0.1576	0.1583	0.3005	0.2316
<b>I3</b>	0.0478	0.0655	0.0387	0.0513	0.1299	0.0756	0.0694	0.0381	0.0486	0.0343	0.0736	0.1629	0.2241	0.0381	0.0530	0.1613	0.1201
<b>I4</b>	0.1451	0.1443	0.1452	0.1408	0.2681	0.1646	0.1325	0.1538	0.1759	0.1696	0.1907	0.2714	0.3717	0.1341	0.1928	0.2215	0.2291
<b>I5</b>	0.1637	0.1800	0.1768	0.1570	0.2751	0.1898	0.1624	0.1775	0.1786	0.1917	0.2315	0.3044	0.4065	0.1644	0.2036	0.2594	0.2681
<b>I6</b>	0.1726	0.1513	0.1571	0.1563	0.2915	0.2075	0.1688	0.1876	0.1775	0.1646	0.1898	0.2365	0.3460	0.1681	0.2137	0.2589	0.3018
<b>MM1</b>	0.0112 <sup>NS</sup>	0.0231	0.0124 <sup>NS</sup>	0.0282	0.0838	0.0273	0.0279	0.0180	0.0256	0.0211	0.0634	0.1165	0.1991	0.0143 <sup>NS</sup>	0.0309	0.1414	0.0707
<b>MM2</b>	0.0071 <sup>NS</sup>	0.0178	0.0181	0.0322	0.1019	0.0427	0.0292	0.0265	0.0351	0.0216	0.0671	0.1047	0.1744	0.0134	0.0365	0.1553	0.0743
<b>MM3</b>	0.0222	0.0385	0.0276	0.0326	0.0978	0.0347	0.0354	0.0312	0.0302	0.0255	0.0746	0.1132	0.2177	0.0166 <sup>NS</sup>	0.0384	0.1376	0.0755
<b>CM1</b>	0.0157	0.0344	0.0267	0.0378	0.0950	0.0471	0.0325	0.0309	0.0365	0.0308	0.0844	0.1267	0.1928	0.0199	0.0389	0.1593	0.0761
<b>CM2</b>	0.0087 <sup>NS</sup>	0.0225	0.0166 <sup>NS</sup>	0.0262	0.0696	0.0273	0.0220 <sup>NS</sup>	0.0175	0.0200	0.0165	0.0714	0.1023	0.1936	0.0082 <sup>NS</sup>	0.0273	0.1338	0.0525
<b>CM3</b>	0.0810	0.0891	0.0949	0.0954	0.1519	0.1222	0.0908	0.1151	0.1236	0.1139	0.1589	0.1951	0.2142	0.0790	0.0963	0.2161	0.1456
<b>CM4</b>	0.0801	0.1123	0.1046	0.1088	0.1736	0.1270	0.1083	0.1087	0.1182	0.1175	0.1222	0.2085	0.2928	0.0806	0.1171	0.2486	0.1607

## Chapitre 2 : Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive

**Table S1.** Continued

	<b>CB15</b>	<b>CB16</b>	<b>CB17</b>	<b>CB18</b>	<b>CB19</b>	<b>CB20</b>	<b>I1</b>	<b>I2</b>	<b>I3</b>	<b>I4</b>	<b>I5</b>	<b>I6</b>	<b>MM1</b>	<b>MM2</b>	<b>MM3</b>	<b>CM1</b>	<b>CM2</b>	<b>CM3</b>
<b>CB16</b>	0.0337																	
<b>CB17</b>	0.0334	0.0887																
<b>CB18</b>	0.1003	0.1085	0.1602															
<b>CB19</b>	0.0085 <sup>NS</sup>	0.0326	0.0541	0.0706														
<b>CB20</b>	0.0359	0.0606	0.0713	0.1159	0.0229 <sup>NS</sup>													
<b>I1</b>	0.1508	0.1423	0.1567	0.1559	0.0871	0.0899												
<b>I2</b>	0.1764	0.2294	0.1832	0.1910	0.1380	0.1917	0.2321											
<b>I3</b>	0.0439	0.0933	0.0558	0.1234	0.0495	0.0800	0.1556	0.1942										
<b>I4</b>	0.1367	0.1257	0.1566	0.2337	0.1487	0.1390	0.2580	0.3749	0.2024									
<b>I5</b>	0.1604	0.1317	0.1922	0.2522	0.1812	0.1650	0.2936	0.3969	0.2050	0.1238								
<b>I6</b>	0.1521	0.1536	0.2397	0.2011	0.1643	0.1549	0.3193	0.3656	0.2253	0.1475	0.1331							
<b>MM1</b>	0.0268	0.0454	0.0497	0.0990	0.0168	0.0472	0.1077	0.1391	0.0370	0.1686	0.1682	0.1864						
<b>MM2</b>	0.0204	0.0292	0.0427	0.0890	0.0147	0.0406	0.1072	0.1481	0.0461	0.1426	0.1628	0.1706	-0.0025 <sup>NS</sup>					
<b>MM3</b>	0.0267	0.0459	0.0536	0.1195	0.0321	0.0556	0.1345	0.1758	0.0364	0.1618	0.1632	0.1844	-0.0060 <sup>NS</sup>	0.0023 <sup>NS</sup>				
<b>CM1</b>	0.0272	0.0327	0.0497	0.1028	0.0270	0.0495	0.1083	0.1664	0.0441	0.1617	0.1583	0.1893	-0.0026 <sup>NS</sup>	-0.0061 <sup>NS</sup>	0.0026 <sup>NS</sup>			
<b>CM2</b>	0.0201	0.0300	0.0443	0.0913	0.0148	0.0461	0.1044	0.1526	0.0425	0.1620	0.1672	0.1812	-0.0053 <sup>NS</sup>	-0.0061 <sup>NS</sup>	-0.0036 <sup>NS</sup>	-0.008 <sup>NS</sup>		
<b>CM3</b>	0.1178	0.0906	0.1440	0.1460	0.1031	0.1338	0.1749	0.2182	0.1649	0.2343	0.1984	0.2125	0.0787	0.0690	0.0950	0.0683	0.0664	
<b>CM4</b>	0.0884	0.1323	0.0874	0.1844	0.1026	0.1335	0.2201	0.2295	0.1008	0.2154	0.2223	0.2675	0.0488	0.0542	0.0602	0.0662	0.0688	0.1435

## Chapitre 2 : Colonisation d'un réseau de mares par une espèce invasive

Table S2. Evolution of the abundances of the red swamp crayfish, expressed as catch-per-unit-effort (CPUE, individuals/trap/24h) in ponds sampled at least twice between 2012 and 2016 using the same protocol with wire mesh traps. Some ponds were sampled in 2011 but not in 2012 and are indicated with a star.

	<b>CPUE 2012</b>	<b>CPUE 2014</b>	<b>CPUE 2016</b>
<b>MB1</b>	5.25*	NA	1.84
<b>MB2</b>	5.36*	NA	1.50
<b>MB3</b>	4.47*	2.40	1.50
<b>CB1</b>	13.08	2.50	2.00
<b>CB2</b>	2.50		0.40
<b>CB3</b>	6.25	1.30	1.33
<b>CB4</b>	8.00		2.25
<b>CB5</b>	12.78	2.08	1.39
<b>CB6</b>	7.08	2.12	2.00
<b>CB7</b>	6.55	2.62	1.27
<b>CB8</b>	2.00		0.80
<b>CB9</b>	2.11	1.2	0.55
<b>CB11</b>	4.40		1.00
<b>CB12</b>	1.40*		1.50
<b>CB13</b>	4.83		1.05
<b>CB14</b>	1.00		0.80
<b>CB15</b>	5.00		1.40
<b>CB16</b>	2.44		NA
<b>CB17</b>		0.63	0.67
<b>CB18</b>	4.25		1.27
<b>CB19</b>	4.00	2.14	0.70
<b>CB20</b>	1.00*		1.07
<b>I1</b>	11.91	2.87	1.50
<b>I2</b>	5.18	0.88	0.73
<b>I3</b>	9.75	1.56	1.07
<b>I4</b>	2.50	NA	NA
<b>I5</b>	4.00		0.50
<b>MM2</b>		1.56	1.73
<b>MM1</b>		2.08	1.67
<b>CM1</b>	3.17	0.66	1.07
<b>CM2</b>	1.5*		0.55
<b>CM3</b>	2.67	0.87	0.14
<b>CM4</b>	1.00	0.66	0.20

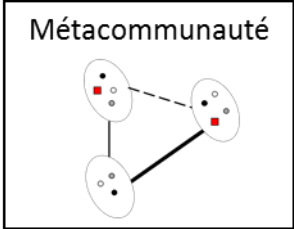


## CHAPITRE 3

### Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés envahies



**Article 3 : Investigation empirique du rôle de la dispersion dans la coexistence des espèces dans une métacommunauté envahie**

Niveau d'organisation	Descripteurs	Disciplines et méthodes d'étude
 <p>Métacommunauté</p>	Flux de gènes Distribution des espèces	Ecologie du paysage ADN environnemental

Résumé :

La dispersion est un processus-clé dans la détermination de la distribution et la coexistence des espèces, car la colonisation de patchs permet aux espèces de persister malgré les extinctions locales dues notamment aux interactions entre espèces. Dans une métacommunauté donnée, la dispersion peut varier même entre des espèces proches, et une meilleure compréhension de la coexistence des espèces pourrait être atteinte en déterminant la dispersion réelle des différentes espèces d'une métacommunauté, des données qui font souvent défaut. De plus, les espèces invasives peuvent considérablement altérer la persistance des espèces natives dans les communautés naturelles. Dans de tels cas, non seulement la dispersion est indispensable pour le maintien des espèces natives à l'échelle du paysage, mais la dispersion elle-même peut aussi être altérée par l'invasion.

L'idée majeure de ce travail était de tester si la dispersion des espèces natives peut permettre la coexistence entre des espèces natives et une espèce invasive. Nous avons utilisé la génétique du paysage chez trois espèces d'amphibiens aux traits écologiques variés pour identifier les flux de gènes liant les populations et comment ils étaient influencés par le paysage, dans un réseau de mares partiellement envahi par une espèce invasive, l'écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*. Nous avons également testé si la présence de l'écrevisse de Louisiane diminuait la diversité génétique et augmentait la structure génétique des populations d'amphibiens.

Dans le même réseau de mares, la structure génétique était variable entre les trois espèces d'amphibiens considérées. Seule une espèce a montré une forte limitation de flux de gènes, alors que les populations des deux autres espèces n'étaient généralement pas différenciées. La présence de l'écrevisse de Louisiane n'affectait pas la diversité ni la structure génétique des populations d'amphibiens. Ces résultats suggèrent que la dispersion des amphibiens pourrait être suffisamment importante pour maintenir le fonctionnement de la métacommunauté avec l'invasion de l'écrevisse de Louisiane, et que les impacts locaux ne seraient pas propagés aux populations non-envahies. Des analyses supplémentaires incluront la détermination des taux unidirectionnels de flux de gènes pour déterminer les contributions relatives des populations envahies et non-envahies à la dynamique globale de la métacommunauté. Ces résultats sont en faveur de l'intégration de la dispersion dans l'estimation des possibilités de coexistence entre espèces invasive et natives.

## **Empirical investigation of the role of dispersal in species coexistence in an invaded metacommunity**

Nadège Bélouard, Jean-Marc Paillisson, Eric J. Petit

*Manuscript in preparation*

### **Abstract**

Dispersal is a key process in determining species distribution and coexistence, because the colonization of patches allows species to persist despite local extinctions due notably to the interactions between species. In a given metacommunity, dispersal can vary even between close species, and a better understanding of species coexistence could be reached by determining the actual dispersal of the different species of a metacommunity instead of relying of proxies. Besides, invasive species can dramatically alter the persistence of native species in natural communities. In such cases, not only dispersal is critical for native species to maintain at the landscape level, but also dispersal itself can be impacted by the invader.

The main idea of this work was to test whether the coexistence between native and invasive species could be mediated by the dispersal of native species. We used landscape genetics in three amphibian species with contrasted ecological traits in order to identify the gene flow linking populations and how they were influenced by the landscape in a pond network partially invaded by the invasive red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. We also tested whether the red swamp crayfish presence decreased the genetic diversity and increased the genetic structure of amphibian populations.

In the same pond network, the genetic structure highly varied between the three amphibian species considered. Only one species showed strong limitation of gene flow, while the populations of the other two species were not generally not highly differentiated. The presence of the red swamp crayfish did not affected the genetic diversity nor structure of amphibian populations. These results suggest that the dispersal of amphibians could be high

enough for the metacommunity functioning to maintain along with the invasion of the red swamp crayfish, and that potential local impacts would not be propagated to uninvaded populations. Additional analyses will include the determination of unidirectional rates of gene flow to disentangle the relative contributions of invaded and uninvaded populations to the global metacommunity dynamics. These findings also support integrating dispersal into the estimation of the possibilities of coexistence between invasive and native species.

**Keywords:** amphibian, red swamp crayfish, biological invasion, population genetics, effective population size

## Introduction

In the metacommunity concept, interactions in local communities (predator-prey relationships, competition, non-trophic interactions, etc.) can lead to unstable species coexistence (Chesson 2000). The persistence of a species despite local extinctions is therefore dependent on its capacity to disperse and colonize suitable patches (e.g. Leibold *et al.* 2004). However, dispersal is often inferred based on proxies, such as body size or dispersal mode (e.g. De Bie *et al.* 2012), when investigating species coexistence. Close species can show marked differences in their dispersal, and a better assessment of this process would help to understand species coexistence in empirical metacommunities (Logue *et al.* 2011; Heino *et al.* 2015). Besides, the extinction/recolonization regimes can be altered by the arrival of a new species, which adds new links to the interaction network (David *et al.* 2017; Jackson *et al.* 2017b). Yet, the addition of species in local communities is becoming more frequent as a result of climate change or human introductions for instance (Walther *et al.* 2002; Parmesan 2006; Hulme 2009). It is widely reported in the literature that biological invasions provoke an increase in the frequency of local extinctions that threatens native species (Parker *et al.* 1999; Simberloff *et al.* 2013; Mollot *et al.* 2017), and this can be due to the alteration of the connectivity between populations (e.g. Iwai & Shoda-Kagaya 2012). On the contrary, native species could maintain in partially invaded areas if gene flow persists despite connectivity networks being altered (see e.g. Rowe & Zang 2015). More, local

extinctions could possibly differently impact gene flow in species with marked differences in dispersal capacities, even if their constitutive species share the same environment.

Amphibian species have very different ecological traits but many of them share a globally similar life cycle, and aggregate in ponds during the breeding period in Europe (Crump 2010). They are therefore particularly patchily-distributed organisms. This group is declining worldwide, threatened by a number of factors, notably habitat fragmentation (Beebee & Griffiths 2005). Indeed, many amphibians disperse over short distances only and exhibit a high site fidelity (Smith & Green 2005; Spear *et al.* 2005; Gamble *et al.* 2007) so that local extinctions can have disproportionate impacts on metapopulation dynamics. Besides, invasive species, and notably the red swamp crayfish, are often associated to dramatic declines in abundances or local extinctions of amphibian populations (Kats & Ferrer 2003; Bucciarelli *et al.* 2014), but the effects on metapopulation functioning remain unexplored.

The main idea of our study was to test whether coexistence between native and invasive species could be mediated by dispersal, by exploring the genetic structure of three amphibian species in a pond network partially invaded by the red swamp crayfish, and the consequences of this invasion on genetic diversity and structure of amphibian populations. First, we characterized the patterns of gene flow in the marbled newt, the palmate newt and the European tree frog in the same pond network and linked them to landscape features. Second, we tested whether there was evidence for direct impacts of the invasive crayfish on amphibian populations.

## **Material and methods**

### **1 Study location, sampling and molecular characterization**

The study took place in the dense pond network of a 15 km<sup>2</sup> window in a hedgerow landscape of northwestern France, in the Regional Natural Park of Brière (Figure 1). Around half of the ponds is invaded by the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, which naturally colonized ponds through waterways since its introduction in an adjacent marsh in the early

1980s (Tréguier *et al.* 2018). Marbled newts *Triturus marmoratus*, palmate newts *Lissotriton helveticus* and European tree frogs *Hyla arborea* were sampled in ponds based on previous knowledge of species presence from March 31<sup>st</sup> to May 24<sup>th</sup> in 2016. Newts were caught using wire mesh traps (described in Tréguier *et al.* 2018) and Ortmann's traps (Drechsler *et al.* 2010) in order not to damage the dense aquatic vegetation cover essential for newts reproduction. These traps were set approximately every 5-m on the shoreline and let over the night period. We intended to obtain 30 newts of each species per pond when present. Trapping was repeated for more nights until this number was attained, and we made a slight mark on the tail fin of each sampled individual using half a 2-mm biopsy punch to guarantee their recognition (average nights of sampling per pond: 3.8; average duration of sampling per pond: 13.8 days). In the marbled newt, we often repeatedly recaptured marked individuals and sometimes did not attain the number of 30 individuals. European tree frogs were captured by hand during male choruses, over one night per pond. We took non-invasive samples of buccal cells of amphibians using sterile cotton swabs (Pidancier *et al.* 2003; Broquet *et al.* 2007). In total, we sampled 486 marbled newts in 19 ponds (14-30 per pond), as well as 852 palmate newts in 30 ponds (20-30 per pond), and 326 European tree frogs in 12 ponds (22-30 per pond). The trapping design also allowed to capture crayfish and fish, whose presence was noted in each pond. This work was carried out under the license 07/2016 delivered by the Préfecture de la Loire-Atlantique and appropriate precautions were taken for trapping and handling amphibians.

DNA was extracted using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). DNA was successfully amplified at five microsatellite loci in the marbled newt (Tmar20, Tmar21, Tmar22, Costanzi *et al.* 2015; Tcri32, Tcri35, Krupa *et al.* 2002; Tcri32 modified in Jehle *et al.* 2001), six in the palmate newt (ThCa14, Johanet *et al.* 2009; Lh1, Lh6, Lh14, Lh16, Lh44, Drechsler *et al.* 2013), and six in the European tree frog (WHA1-20, WHA1-103, WHA1-104, WHA1-67, Arens *et al.* 2000; Ha-D115, Ha-A11, Berset-Brändli *et al.* 2008). We used a touchdown PCR program: 95°C for 15 min, then 20 cycles at 94°C for 45 seconds, 64°C for 45 seconds, 72°C for 60 seconds, with annealing temperatures decreasing by 0.5°C every cycle from 64°C to 54°C. The PCR reaction continued for 20 additional cycles at 94°C for 45 seconds, 54°C for 45 seconds, 72°C for 60 seconds. Amplified PCR products were sequenced

by the platform Gentyane (INRA, Clermont-Ferrand, France) and individuals were genotyped in GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

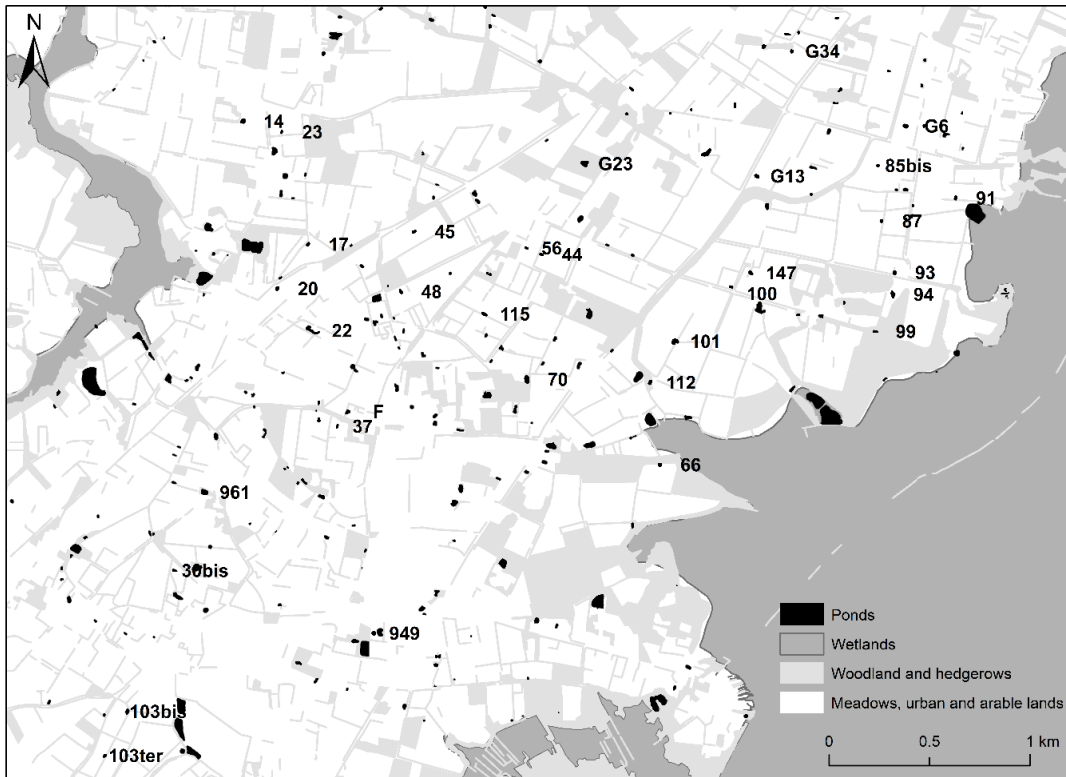


Figure 1. Spatial location of the amphibian populations sampled. Dark grey zones are the historical maximal flooded areas of the marshes, light grey polygons and lines are woodlands and hedgerows. Black polygons are ponds, and those that were sampled are named.

## 2 Genetic structure and pathways of gene flow

Datasets were handled using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995), and the R (R Core Team 2018) packages adegenet (Jombart 2008), pegas (Paradis 2010), hierfstat (Goudet & Jombart 2015), raster (Hijmans 2017) and gdistance (van Etten 2017). All permutation tests were done with 10 000 permutations.

Deviation from Hardy-Weinberg proportions was tested in each population for each locus with an exact test based on Monte-Carlo permutations of alleles. Population were characterized using gene diversity ( $H_s$ ), Wright's inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ), and  $\beta_{WT}$  (population-specific index of differentiation relative to the entire pool, Weir & Goudet 2017).

We also calculated genetic distances between populations using pairwise  $F_{ST}$ . Isolation-by-distance (IBD) pattern was tested using Euclidean distances between ponds. Because amphibians were shown to use woodlands and hedgerows as summer habitats and potential corridors for dispersal (Jehle & Arntzen 2000; Marty *et al.* 2005; Trochet *et al.* 2017), we expected ponds separated by forested areas to be genetically closer than populations separated by other habitats, for an equal geographic distance. A cartography of the study area (ponds, hedgerows, forests) was designed using ArcGis 10.1 (ESRI, 2011) based on an aerial photograph and field prospections. We explored the isolation-by-environment (IBE) pattern by testing whether least-cost paths (LCP) using woodlands provided a better proxy of genetic distances than geographical distances. We used costs of non-forested habitats 5, 10, 20, 50 and 100 times higher than that of ponds and woodlands. We tested the correlation between genetic distances (linearized pairwise  $F_{ST}$ , i.e.  $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ) and Euclidean distances or LCP using permutation Mantel tests. Effective population size ( $N_e$ ) were estimated using linkage disequilibrium ( $LDN_e$ ), as implemented in NeEstimator v2 (Do *et al.* 2014), an efficient method to estimate  $N_e$  both in case of isolated populations and in migration scenarios (Gilbert & Whitlock 2015).

### 3 Tests of the effect of a biological invasion

The software MIGRAINE (Leblois *et al.* 2014) was used to detect bottlenecks in amphibian populations since the invasion of the red swamp crayfish based on importance sampling algorithms with a generalized stepwise mutation model. MIGRAINE estimates the ancestral and actual effective population sizes and their confidence intervals, on the scale of mutation rates. The significance of demographic events that occurred in the population under study is tested by the ratio between these two parameters. We used the demographic model of an exponential change in population size until present while coercing the event to be searched in the last 10 generations of amphibians. Runs were conducted on the whole metapopulation of each species, using 200 trees, 500 points and 3 iterations. Estimates were back-transformed by the mutation rate  $5 \cdot 10^{-4}$  generally accepted for microsatellites (Ellegren 2000).

We tested whether crayfish presence induced a loss of genetic diversity or an increase in the genetic structure of native amphibians. We used linear mixed models using gene diversity and  $\beta_{WT}$  as response variable, against crayfish presence and species in interaction as fixed factors and pond as random factor.

## Results

### 1 Genetic structure of three amphibian species in a pond network

Genotypic frequencies did not show consistent deviations from Hardy-Weinberg proportions in any population or loci after Bonferroni corrections, and global  $F_{IS}$  were 0.018, 0.042 and 0.088 in the marbled newt, the palmate newt and the European tree frog, respectively (see  $F_{IS}$  per population in Table 1). Gene diversity varied between amphibian populations, but the three species showed comparable ranges of genetic diversity: from 0.41 to 0.67 in the marbled newt, from 0.55 to 0.64 in the palmate newt and from 0.45 to 0.63 in the European tree frog (Table 1). The degree of genetic structure of amphibian populations over the study area was the highest for the marbled newt (pairwise  $F_{ST}$  between 0 and 0.297, global  $F_{ST} = 0.074$ , see Table S1), the lowest for the palmate newt (pairwise  $F_{ST}$  between 0.002 and 0.030, global  $F_{ST} = 0.012$ , see Table S2), and intermediate for the European tree frog (pairwise  $F_{ST}$  between 0.007 and 0.055, global  $F_{ST} = 0.038$ , see Table S3). In the European tree frog, two populations were much more differentiated than the others relative to the entire pool: M87 ( $\beta_{WT} = 0.22$ ) and M94 ( $\beta_{WT} = 0.19$ ), and so was the case for M85bis in the marbled newt ( $\beta_{WT} = 0.36$ ).

### Chapitre 3 : Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés

Table 1. Genetic diversity and summary statistics for amphibian populations. N, number of individuals genotyped;  $H_s$ , expected heterozygosity;  $F_{IS}$ , Wright's coefficient of inbreeding;  $\beta_{WT}$ , population-specific differentiation relative to the entire pool following Weir and Goudet (2017).

Pond	Palmate newt				Marbled newt				European tree frog			
	N	$H_s$	$F_{IS}$	$\beta_{WT}$	N	$H_s$	$F_{IS}$	$\beta_{WT}$	N	$H_s$	$F_{IS}$	$\beta_{WT}$
M14	28	0.56	0.06	0.07	20	0.54	-0.05	0.17				
M17	29	0.60	0.02	0.00	28	0.62	0.10	0.04				
M20	30	0.61	-0.03	-0.02					30	0.55	0.16	0.05
M22	30	0.60	-0.05	-0.01	30	0.65	-0.01	0.00				
M23	29	0.62	-0.06	-0.04	17	0.58	0.00	0.10				
M30b									24	0.59	0.09	-0.02
M37	29	0.56	0.00	0.06					28	0.58	0.10	-0.01
M44	22	0.60	0.06	0.00	28	0.63	0.04	0.03				
M45	30	0.57	-0.03	0.05	16	0.67	-0.03	-0.04				
M48	29	0.55	0.08	0.08	30	0.62	0.00	0.04	30	0.61	0.14	-0.05
M56	30	0.57	0.10	0.06	30	0.64	0.00	0.01				
M66									30	0.63	0.14	-0.08
M70	29	0.58	0.02	0.04	23	0.57	-0.09	0.12				
M85bis	30	0.59	0.02	0.02	28	0.41	0.03	0.36				
M87	30	0.59	0.06	0.02	26	0.62	-0.07	0.04	9	0.45	0.03	0.22
M91	28	0.59	0.09	0.02								
M94	25	0.59	-0.03	0.02					26	0.47	0.15	0.19
M99	30	0.57	0.12	0.05								
M100	30	0.56	0.07	0.07	30	0.63	0.09	0.03				
M101	30	0.56	0.03	0.07	30	0.63	0.04	0.03	26	0.59	0.08	-0.03
M103bis	25	0.62	0.00	-0.03					30	0.61	-0.01	-0.05
M103ter									30	0.54	0.08	0.07
M112									30	0.54	0.08	0.06
M115	30	0.60	0.06	0.00	27	0.64	0.09	0.01				
M949	30	0.58	0.01	0.03								
M961	25	0.61	0.11	-0.01	25	0.56	-0.01	0.14				
MG6	28	0.59	-0.02	0.02					22	0.53	0.21	0.08
MG13	20	0.60	0.00	-0.01					22	0.53	0.15	0.08
MG23	27	0.64	0.00	-0.07	29	0.60	0.13	0.07				
MG34	30	0.63	0.01	-0.05	14	0.54	0.19	0.16				
MF	29	0.60	0.14	0.00								

The genetic distances between populations variably correlated to geographic distances: while the structure of populations of the European tree frog and the palmate newt were not affected by geographic distances over the study area ( $p > 0.05$ , Figure 2 a and b), the marbled newt showed a clear pattern of isolation-by-distance ( $y = 0.018 + 2.3 \cdot 10^{-5} x$ ,  $r = 0.57$ ,  $p = 0.001$ , Figure 2c), and genetic distances were even better explained by least-cost paths using hedgerows as corridors, with the best correlation for costs of the matrix 50 times higher than those of aquatic and forested habitats ( $y = 9.4 \cdot 10^{-3} + 1.2 \cdot 10^{-5} x$ ,  $r = 0.73$ ,  $p = 0.001$ , Figure 2d).

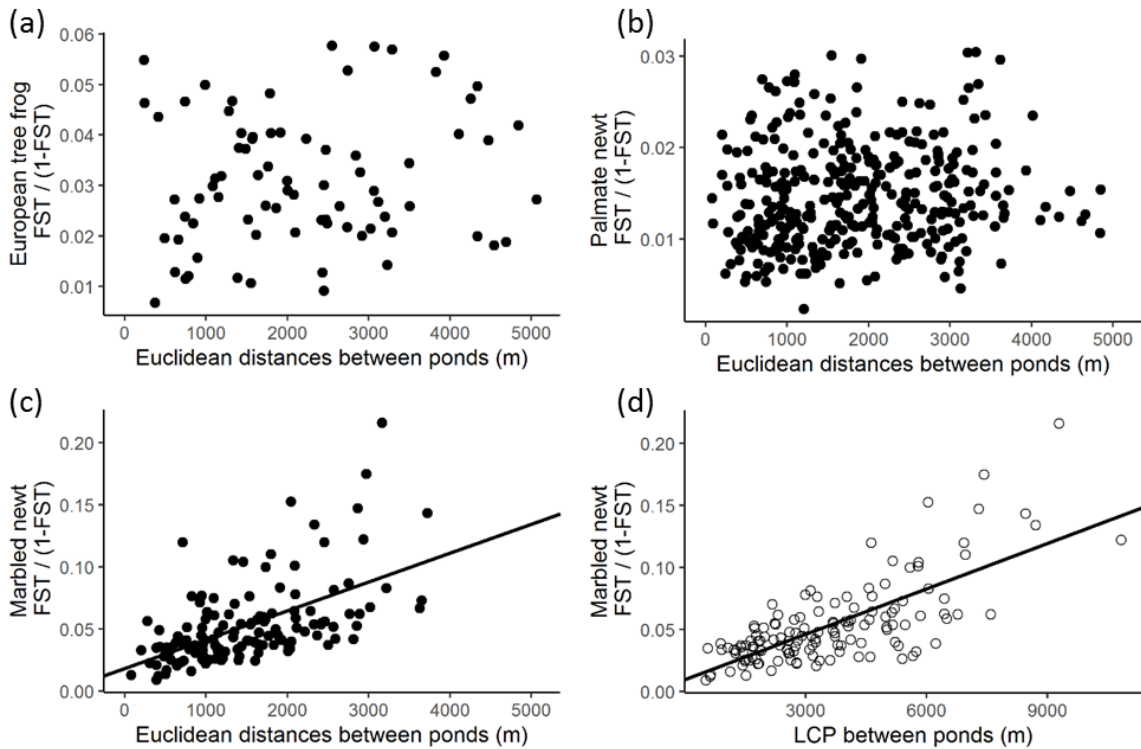


Figure 2. Variation of linearized genetic distances ( $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ) according to geographical distances in the three amphibian species. Absence of a significant isolation by distance in (a) European tree frog and (b) palmate newt, significant isolation by distance in (c) marbled newt, and (d) LCP in the marbled newt. Note that the scale of genetic distances (y axis) vary between species.

In the palmate newt, effective population sizes ( $N_e$ ) were higher than 100 in 80% of the populations and infinite in half the populations (Table 2). By contrast,  $N_e$  was very low in most marbled newt populations, often  $< 30$ , even if confidence intervals were often large. In the European tree frog,  $N_e$  was highly variable, from 1.6 to 269.4, with infinite estimates for four populations.

### Chapitre 3 : Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés

Table 2. Effective population sizes (95% confidence intervals) of amphibian populations, estimated using the linkage disequilibrium.

<b>Pond</b>	<b>Palmate newt</b>	<b>Marbled newt</b>	<b>European tree frog</b>
M14	27.9 (12.4 - 167.6)	14.5 (3.2 - 6907.2)	
M17	Inf. (38.9 - Inf.)	22.9 (7.2 - Inf.)	
M20	65.9 (22.3 - Inf.)		Inf. (69.7 - Inf.)
M22	Inf. (48 - Inf.)	29.7 (11.9 - 358)	
M23	Inf. (67.9 - Inf.)	Inf. (11.4 - Inf.)	
M30b			43.3 (9.6 - Inf.)
M37	Inf. (64.2 - Inf.)		50.3 (14.1 - Inf.)
M44	283.4 (23.2 - Inf.)	Inf. (51.3 - Inf.)	
M45	50.4 (18.5 - Inf.)	Inf. (25.6 - Inf.)	
M48	221.5 (28.3 - Inf.)	28.3 (10.7 - 554.7)	90.3 (20.5 - Inf.)
M56	Inf. (379.6 - Inf.)	36.2 (12.2 - Inf.)	
M66			56.7 (18.2 - Inf.)
M70	Inf. (49.5 - Inf.)	8.1 (1.9 - 90.6)	
M85bis	Inf. (274.9 - Inf.)	9.1 (1.9 - 114.1)	
M87	Inf. (830.5 - Inf.)	93.2 (10.4 - Inf.)	14.4 (1.7 - Inf.)
M91	Inf. (Inf. - Inf.)		
M94	Inf. (232.8 - Inf.)		Inf. (27.5 - Inf.)
M99	388 (26.8 - Inf.)		
M100	191.7 (28.3 - Inf.)	17 (6 - 93.7)	
M101	Inf. (220.7 - Inf.)	11.1 (4.3 - 28.8)	Inf. (32.3 - Inf.)
M103bis	403.1 (28.9 - Inf.)		8.7 (4.4 - 15.7)
M103ter			17.9 (8.7 - 50.1)
M112			1.6 (1.2 - 2.2)
M115	265.9 (28.4 - Inf.)	Inf. (22.7 - Inf.)	
M949	71.4 (20.2 - Inf.)		
M961	Inf. (31.5 - Inf.)	41.3 (10.2 - Inf.)	
MG6	Inf. (52.4 - Inf.)		269.4 (15.8 - Inf.)
MG13	91.1 (19.2 - Inf.)		Inf. (21.0 - Inf.)
MG23	541.3 (26.2 - Inf.)	Inf. (41.5 - Inf.)	
MG34	194.2 (30.2 - Inf.)	11.7 (2.1 - Inf.)	
MF	33 (13.6 - 970.9)		

2 Effects of a biological invasion on native amphibians through the lens of population genetics

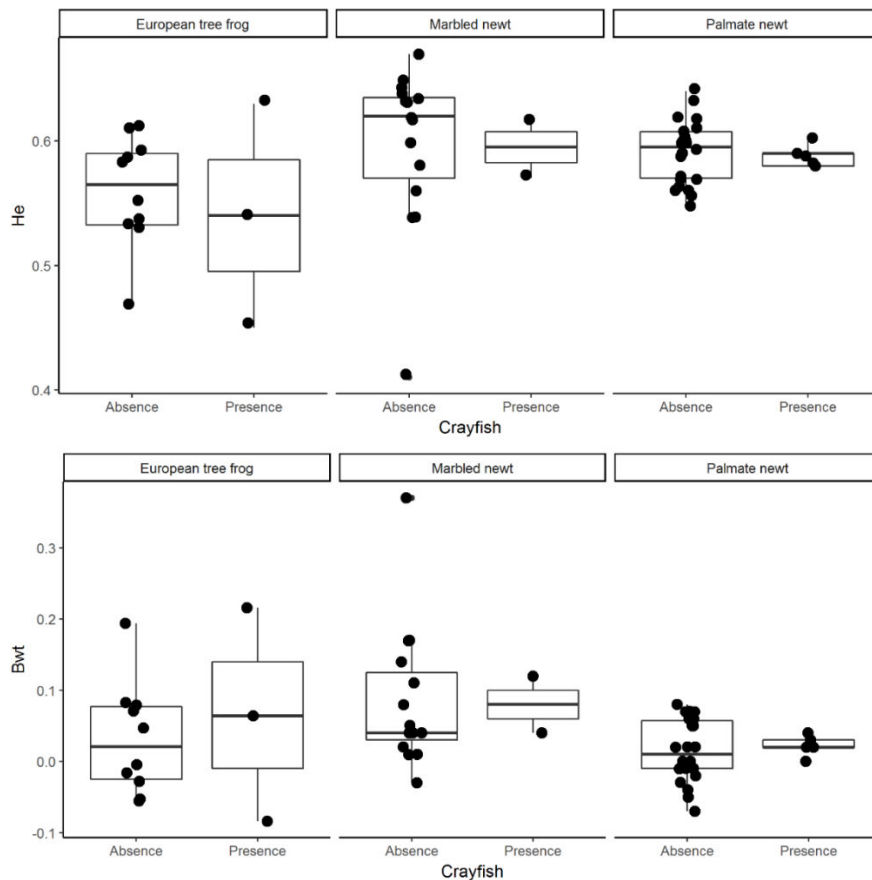


Figure 3. Comparison of amphibian populations between invaded and uninvaded ponds in the three amphibian species based on (a)  $H_e$  and (b)  $\beta_{WT}$ .

There was no trace of bottleneck in the palmate newt metapopulation in the last 10 generations, with a N-ratio estimated at 0.5 (95% confidence interval: NA - 5.03) in the last 30 generations. On the contrary, a bottleneck was found in the European tree frog estimated four generations ago (0.23 – 22.6), with ancestral  $N_e$  estimated at 4826 (3456 – 6476) and current  $N_e$  estimated at 334 (3.28 – 1928), for a N-ratio of 0.07 (0.0007 - 0.43). A bottleneck was also detected in the marbled newt 4.56 generations ago (0.81 – 25.6), with an ancestral  $N_e$  of 3864 (2704 – 5234) and current  $N_e$  of 566 (51.6 – 2254), for a N-ratio of 0.15 (0.015 – 0.632). Overall species, crayfish presence was not linked to  $H_e$  ( $p_{Crayfish} = 0.64$ ,  $p_{Species} = 0.04$ ,  $p_{interaction} = 0.89$ , see Figure 3a) nor to  $\beta_{WT}$  ( $p_{Crayfish} = 0.64$ ,  $p_{Species} = 0.01$ ,  $p_{interaction} = 0.86$ , see Figure 3b).

## Discussion

### 1 Variability of the genetic structure of amphibian populations in a pond network

The genetic structure of three amphibian species was studied in the same pond network, using 17, 27 and 13 populations of marbled newt, palmate newt and European tree frog, respectively. In the study area, the gene diversity of the three amphibian species was in the upper range or exceeded those reported in other studies in the same species, as gene diversity was comprised between 0.35 and 0.51, and 0.20 and 0.55 in other populations of marbled newts in western France (Jehle *et al.* 2005b; Costanzi *et al.* 2018), between 0.31 and 0.77 in the palmate newt (Johanet *et al.* 2011; Isselin-Nondedeu *et al.* 2017), and 0.27 to 0.71 in the European tree frog in Switzerland (Angelone & Holderegger 2009). It is probable that the well-preserved landscape of the RPNB and its high density of suitable ponds played a role in the conservation of a high genetic diversity, whereas other study areas may have suffered from fragmentation or habitat loss for instance.

The connectivity between populations was variable depending on the species. The degree of genetic structure was very low in the palmate newt, with an insignificant signal of IBD and generally large effective population sizes. The European tree frog showed intermediate levels of population differentiation that did not follow neither an IBD nor an IBE pattern and variable effective population sizes. Populations were the most structured in the marbled newt which generally had small effective population sizes. Additional populations of palmate newt and European tree frog do exist in the study area and probably played a role in the low genetic structure found in these species by allowing a stepping-stone functioning. By contrast, although we found a few marbled newts in other ponds, it is likely that we sampled most of the populations of the study area. The lower number of populations and, as a result, the greater distances between them may be responsible for the higher genetic differentiation of this species in the study area. Marbled newts migrate over very short distances, and are often found within 20 m of the pond edge (Jehle & Arntzen 2000; Marty *et al.* 2005), even if this distance can be higher in forested habitats (Trochet *et al.* 2017). Jehle *et al.* (2005b)

found a similar level of genetic structure in marbled newt populations at a comparable spatial scale. However, in a more recent study, marbled newt populations were not structured at a local scale (i.e. < 15 km) but only at regional scales, with genetic distances increasing with the interaction of the distance and the proportion of arable land between sites (Costanzi *et al.* 2018). Our findings validate the idea that hedgerows can facilitate amphibian dispersal, which is often evocated in amphibian studies and in particular for the marbled newt (Marty *et al.* 2005; Trochet *et al.* 2017). In other amphibian species however, gene flow is of higher intensity and even overcomes potential barriers such as highways (Prunier *et al.* 2014). In particular, the palmate newt showed little genetic differentiation over large distances such as the Loire river valley (Johanet 2009) and rapidly colonized restored ponds in a forested landscape (Isselin-Nondedeu *et al.* 2017). The European tree frog was known to have larger dispersal distances and low genetic structure at small spatial scale (Arens *et al.* 2006; Angelone & Holderegger 2009; Angelone *et al.* 2011; Krug & Pröhl 2013).

Amphibians, and marbled newts in particular, often constitute populations of under 100 individuals in ponds (Jehle *et al.* 2001) although it seems that their census size can sometimes be much higher (Guérin *et al.* 2017). Their effective population sizes were however very low in our study area, similarly as in other investigations where they ranged from 4.1 to 19.3 individuals (Jehle *et al.* 2001). Given the low effective population sizes of some populations of marbled newt and European tree frog, dispersal is crucial to the maintenance of populations in the metapopulation.

While the literature seeks for the generalization of community structure with dispersal capacities categorized by taxa or body size (De Bie *et al.* 2012), our results tend to warn against oversimplification. Amphibians have generally been considered as poor dispersers, displaying a high fidelity to their breeding site, until some examples showed that their dispersal capacities were sometimes underestimated (Smith & Green 2005). Our results provide evidence for a high variability of gene flow between amphibian populations depending on the species, in a same pond network.

## 2 Coexistence with an invasive species in a spatial context

Species coexistence is mainly mediated by two processes: interactions between species in local communities, and dispersal between communities (Leibold *et al.* 2004). Independent of local interactions, the connectivity between the amphibian populations found here likely promotes the coexistence of amphibians with the red swamp crayfish at the regional scale. If local impacts do occur in invaded populations, uninvaded ponds could constitute refuges for the amphibian populations. Overall, the presence of the red swamp crayfish was not linked to the genetic diversity nor to the genetic structure of amphibian populations, although the effect varied between species, and the number of amphibian populations in invaded ponds was low.

Additional investigations of the datasets will be conducted to explore more indirect effects of the red swamp crayfish on amphibian populations. Proximate causes of dispersal include population density, food availability and interspecific interactions (Bowler & Benton 2005). The presence of the red swamp crayfish could therefore influence the dispersal of amphibians in two opposed manners: (1) if the abundance or the reproductive output of amphibians is reduced in an invaded pond, the population may send fewer migrants than those of uninvaded populations, because of a lower intraspecific competition; (2) if the crayfish strongly modifies food availability in ponds or has aggressive interactions with amphibians (i.e. interference competition), amphibians could massively emigrate from invaded ponds. Besides, some populations could also be a source of migrants for populations in suboptimal habitats (i.e. source-sink functioning, or mass-effects in the metacommunity concept). In any case, the calculation of unidirectional rates of gene flow (see e.g. Kennington *et al.* 2003) is intended to evidence whether asymmetrical gene flow occur between invaded and uninvaded ponds. The active avoidance of invaded ponds has indeed been shown in Alpine newts with non-native fish (Winandy *et al.* 2015). Hence, invasive species could also impact native populations in uninvaded patches in subtle ways, such as altering metapopulation functioning, just like anthropogenic barriers do (Hitchings & Beebee 1997;

Keller & Largiader 2003; Holderegger & Di Giulio 2010). Indeed, the avoidance of invaded ponds could create genetic discontinuities, and cause native amphibians to struggle to maintain at the landscape level. Such disruptive effects of biological invasions have been already been recorded in other native species (Iwai & Shoda-Kagaya 2012; but see Rowe & Zanutta 2015; Ohnishi *et al.* 2017). They would be the most critical in populations of the marbled newt and European tree frog, in which the estimated effective population sizes were sometimes very low. Genetic discontinuities can be tested using the maximum difference Monmonier algorithm (see Manel *et al.* 2003), or by using Mantel tests to compare the genetic distances to adjacency matrix of two potential connectivity networks. The first matrix would consider all ponds as potential habitats, whereas the second matrix would only consider uninvaded ponds. It is possible that such effects occur in the study area, because three amphibian populations of uninvaded ponds but situated in the core of the invaded zone showed high values of genetic differentiation as compared to the other populations. To conclude, dispersal was not a limiting factor for the persistence of amphibians in the landscape, but could become so if the red swamp crayfish indirectly disrupts gene flow over time.

Finally, invasive species can elicit adaptive responses in native species (Mooney & Cleland 2001), so that in amphibians, life history traits such as time to and mass at metamorphosis for instance can be modified to escape more rapidly predation in invaded habitats (Richter-Boix *et al.* 2013; Nunes *et al.* 2014a). In such cases, gene flow counteracts the process of adaptation and is not necessarily beneficial to the population, a phenomenon known as migration load (Lenormand 2002; Bourne *et al.* 2014). The study of the effects of biological invasions could therefore find interesting perspectives from the fields of community genetics, i.e. the study of the genetic effects of the interactions between species, notably linked to selection pressures (Neuhauser *et al.* 2003) or its extension, the evolutionary metacommunity concept (Urban *et al.* 2008).

## Supplementary material

Table S1. Pairwise  $F_{ST}$  of marbled newt populations

	TM100	TM101	TM115	TM14	TM17	TM22	TM23	TM44	TM45	TM48	TM56	TM70	TM85B	TM87	TM961	TMG23
<b>TM101</b>	-0.001															
<b>TM115</b>	0.049	0.056														
<b>TM14</b>	0.080	0.087	0.135													
<b>TM17</b>	0.075	0.068	0.079	0.026												
<b>TM22</b>	0.089	0.093	0.051	0.117	0.072											
<b>TM23</b>	0.066	0.074	0.118	0.039	0.044	0.087										
<b>TM44</b>	0.044	0.044	0.008	0.088	0.044	0.033	0.079									
<b>TM45</b>	0.054	0.032	0.035	0.090	0.039	0.058	0.103	0.017								
<b>TM48</b>	0.042	0.045	0.053	0.071	0.048	0.038	0.057	0.030	0.024							
<b>TM56</b>	0.032	0.039	0.023	0.085	0.061	0.044	0.072	0.008	0.030	0.027						
<b>TM70</b>	0.048	0.056	0.047	0.132	0.095	0.087	0.086	0.049	0.097	0.072	0.059					
<b>TM85B</b>	0.122	0.159	0.157	0.297	0.218	0.182	0.254	0.156	0.204	0.179	0.165	0.223				
<b>TM87</b>	0.013	0.030	0.051	0.131	0.081	0.094	0.104	0.051	0.079	0.082	0.065	0.055	0.085			
<b>TM961</b>	0.061	0.083	0.072	0.072	0.061	0.038	0.046	0.057	0.090	0.031	0.044	0.085	0.208	0.100		
<b>TMG23</b>	0.034	0.026	0.039	0.099	0.059	0.052	0.065	0.006	0.041	0.031	0.011	0.050	0.156	0.059	0.049	
<b>TMG34</b>	0.084	0.088	0.058	0.125	0.061	0.102	0.109	0.026	0.083	0.106	0.055	0.117	0.191	0.076	0.111	0.035

### Chapitre 3 : Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés

Table S2. Pairwise  $F_{ST}$  of palmate newt populations

	TP100	TP101	TP103b	TP115	TP14	TP17	TP20	TP22	TP23	TP37	TP44	TP45	TP48	TP56	TP70	TP85b
<b>TP101</b>	0.012															
<b>TP103b</b>	0.013	0.012														
<b>TP115</b>	0.006	0.015	0.013													
<b>TP14</b>	0.015	0.024	0.016	0.018												
<b>TP17</b>	0.017	0.016	0.008	0.016	0.027											
<b>TP20</b>	0.021	0.019	0.010	0.023	0.021	0.019										
<b>TP22</b>	0.011	0.011	0.009	0.009	0.027	0.012	0.016									
<b>TP23</b>	0.009	0.016	0.009	0.007	0.017	0.017	0.013	0.009								
<b>TP37</b>	0.006	0.015	0.009	0.008	0.017	0.013	0.014	0.010	0.008							
<b>TP44</b>	0.010	0.008	0.010	0.008	0.022	0.006	0.016	0.006	0.008	0.008						
<b>TP45</b>	0.011	0.007	0.011	0.014	0.023	0.010	0.018	0.010	0.012	0.011	0.007					
<b>TP48</b>	0.005	0.007	0.013	0.009	0.024	0.011	0.021	0.005	0.011	0.005	0.006	0.007				
<b>TP56</b>	0.013	0.022	0.018	0.009	0.029	0.026	0.021	0.009	0.008	0.012	0.014	0.023	0.016			
<b>TP70</b>	0.012	0.017	0.017	0.012	0.029	0.013	0.019	0.009	0.012	0.011	0.006	0.011	0.007	0.011		
<b>TP85b</b>	0.015	0.016	0.012	0.010	0.025	0.018	0.016	0.006	0.011	0.013	0.009	0.018	0.014	0.010	0.012	
<b>TP87</b>	0.013	0.008	0.015	0.014	0.030	0.019	0.016	0.008	0.014	0.013	0.008	0.010	0.009	0.016	0.014	0.011
<b>TP91</b>	0.017	0.019	0.015	0.021	0.020	0.026	0.012	0.017	0.015	0.019	0.021	0.018	0.021	0.017	0.019	0.016
<b>TP94</b>	0.012	0.010	0.012	0.015	0.026	0.021	0.013	0.008	0.010	0.016	0.012	0.014	0.012	0.011	0.013	0.009
<b>TP949</b>	0.011	0.018	0.013	0.011	0.024	0.019	0.019	0.011	0.010	0.008	0.013	0.018	0.012	0.018	0.023	0.016
<b>TP961</b>	0.013	0.015	0.023	0.013	0.026	0.025	0.019	0.014	0.016	0.011	0.012	0.016	0.008	0.015	0.016	0.015
<b>TP99</b>	0.016	0.027	0.013	0.016	0.030	0.019	0.017	0.015	0.012	0.009	0.018	0.021	0.018	0.017	0.020	0.017
<b>TPF</b>	0.012	0.021	0.019	0.012	0.025	0.026	0.020	0.010	0.008	0.012	0.012	0.020	0.011	0.002	0.009	0.013
<b>TPG13</b>	0.009	0.016	0.012	0.011	0.020	0.018	0.013	0.008	0.008	0.008	0.010	0.016	0.008	0.011	0.009	0.010
<b>TPG23</b>	0.013	0.015	0.011	0.009	0.022	0.010	0.020	0.010	0.011	0.011	0.006	0.012	0.010	0.019	0.013	0.014
<b>TPG34</b>	0.017	0.014	0.013	0.015	0.024	0.021	0.010	0.008	0.014	0.015	0.011	0.016	0.015	0.014	0.018	0.009
<b>TPG6</b>	0.011	0.017	0.011	0.010	0.023	0.019	0.015	0.005	0.006	0.009	0.011	0.017	0.011	0.005	0.010	0.006

Chapitre 3 : Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés

Table S2. Continued

	<b>TP87</b>	<b>TP91</b>	<b>TP94</b>	<b>TP949</b>	<b>TP961</b>	<b>TP99</b>	<b>TPF</b>	<b>TPG13</b>	<b>TPG23</b>	<b>TPG34</b>
<b>TP91</b>	0.019									
<b>TP94</b>	0.010	0.009								
<b>TP949</b>	0.014	0.029	0.019							
<b>TP961</b>	0.007	0.023	0.017	0.012						
<b>TP99</b>	0.023	0.026	0.021	0.011	0.023					
<b>TPF</b>	0.017	0.017	0.012	0.017	0.022	0.020				
<b>TPG13</b>	0.012	0.016	0.010	0.014	0.013	0.017	0.011			
<b>TPG23</b>	0.016	0.023	0.018	0.010	0.020	0.017	0.018	0.015		
<b>TPG34</b>	0.007	0.016	0.009	0.015	0.013	0.020	0.019	0.012	0.017	
<b>TPG6</b>	0.014	0.016	0.009	0.012	0.017	0.012	0.007	0.007	0.014	0.011

### Chapitre 3 : Dispersion des espèces natives et coexistence dans les métacommunautés

Table S3. Pairwise  $F_{ST}$  of European tree frog populations

	<b>RV101</b>	<b>RV103b</b>	<b>RV103t</b>	<b>RV112</b>	<b>RV20</b>	<b>RV30b</b>	<b>RV37</b>	<b>RV48</b>	<b>RV66</b>	<b>RV87</b>	<b>RV94</b>	<b>RVG13</b>
<b>RV103b</b>	0.020											
<b>RV103t</b>	0.025	0.044										
<b>RV112</b>	0.052	0.054	0.054									
<b>RV20</b>	0.030	0.038	0.023	0.039								
<b>RV30b</b>	0.050	0.045	0.048	0.055	0.036							
<b>RV37</b>	0.025	0.033	0.028	0.038	0.011	0.029						
<b>RV48</b>	0.012	0.022	0.021	0.045	0.027	0.046	0.023					
<b>RV66</b>	0.013	0.020	0.026	0.042	0.020	0.036	0.020	0.011				
<b>RV87</b>	0.031	0.038	0.018	0.036	0.021	0.053	0.032	0.023	0.031			
<b>RV94</b>	0.030	0.047	0.018	0.043	0.028	0.050	0.035	0.029	0.039	0.007		
<b>RVG13</b>	0.027	0.039	0.020	0.027	0.009	0.033	0.013	0.025	0.023	0.019	0.015	
<b>RVG6</b>	0.038	0.040	0.027	0.039	0.014	0.045	0.023	0.025	0.027	0.019	0.022	0.012

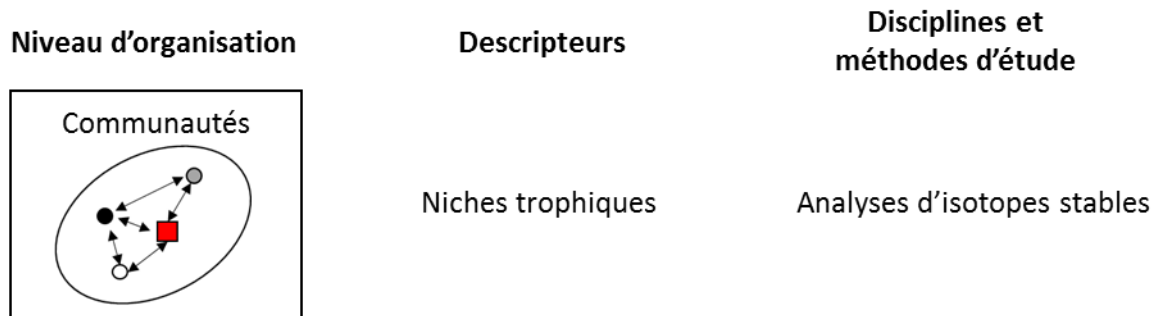
## CHAPITRE 4

### INTERACTIONS TROPHIQUES ENTRE ESPECES NATIVES ET INVASIVE

#### PARTIE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ECHANTILLONNAGE NON-LETALE DES AMPHIBIENS POUR LES ANALYSES D'ISOTOPES STABLES



Article 4 : **La nageoire est un substitut au muscle pertinent et non-létal pour des mesures d'isotopes stables chez les amphibiens**



Résumé:

Les analyses d'isotopes stables (AIS) sont maintenant largement utilisées en recherche en écologie pour quantifier les implications trophiques d'une large gamme de processus écologiques. Des méthodes d'échantillonnage non-létales ont été développées chez la plupart des vertébrés, mais une telle validation est absente chez les amphibiens. Il est crucial de combler cette lacune de façon à réduire le manque de connaissances sur l'écologie trophique de ce groupe menacé. La pertinence de la nageoire caudale comme substitut au muscle, un tissu régulièrement utilisé pour les AIS, a été évaluée chez quatre espèces d'amphibiens, incluant des têtards et des tritons, (1) en testant le lien entre les ratios isotopiques du carbone et de l'azote du muscle et de la nageoire, et en répondant à des questions pratiques comme (2) l'effet d'un anesthésique local sur les ratios isotopiques, et (3) des quantités minimales de nageoire nécessaires aux analyses isotopiques, dans le but de limiter la sévérité de l'échantillonnage. Les ratios isotopiques étaient hautement corrélés entre les deux tissus chez les quatre espèces. Des équations ont été fournies pour prédire les valeurs du muscle à partir de celles de la nageoire en considérant chaque espèce séparément et en les regroupant selon leur ordre taxonomique (anoures ou urodèles). L'anesthésique topique n'a pas influencé les ratios isotopiques, et la surface de nageoire nécessaire pour les AIS était faible. Nous concluons que la nageoire caudale des amphibiens peut être utilisée en tant que substitut au muscle pour les AIS, ce qui offre des perspectives prometteuses pour la recherche en écologie trophique des amphibiens, et potentiellement pour leur conservation.

## **Fins are relevant non-lethal surrogates for muscle to measure stable isotopes in amphibians**

Nadège Bélouard, Eric J. Petit, Dominique Huteau, Adrien Oger, Jean-Marc Paillisson

*Adapted from an article in revision in Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*

### **Abstract**

Stable isotope analysis (SIA) is now widely used in ecology research to quantify the trophic implications of a large range of ecological processes. Non-destructive sampling methods have been successfully developed for most vertebrates, but the validation of such technique is missing in amphibians. Filling this methodological gap is critical to reduce the significant lack of knowledge on the trophic ecology of this imperiled group. The relevance of tail fin as a surrogate for muscle, a tissue routinely used for SIA, was assessed in four amphibian species, including tadpoles and adult newts, by (1) testing the link between the isotope ratios of carbon and nitrogen in fin and muscle, and addressing the additional practical issues of (2) the effects of a topical anesthetic on isotope ratios, and (3) evaluating the minimum quantities of fin needed to limit the severity of sampling. The isotope ratios were highly correlated between the two tissues in all four species. Equations were provided to predict muscle estimates from fin values in all species, and generic equations for the grouped anuran and grouped urodele species represent a valuable solution for any other species. Topical anesthetics did not influence isotope ratios, and the surface of tail fin needed for SIA was small. We conclude that tail fin of amphibians can be used as a non-lethal surrogate for muscle in SIA, and this offers promising prospects for research on the trophic ecology of amphibians, and potentially on their conservation.

**Keywords:** fin biopsy, food web, newt, non-destructive sampling, tadpole

## Introduction

Stable isotope analysis (SIA) is now widely used by ecologists to study trophic-related issues (Fry 2006; Nielsen *et al.* 2018). These natural biomarkers provide time-integrated information on the trophic status of organisms and insights into species interactions notably because the isotopic signature of a consumer's tissues reflects its resources (Fry 2006; Michener & Lajtha 2007; Layman *et al.* 2012). More particularly, the stable isotope ratios of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) are the most commonly used tracers in food web studies (Fry 2006). They can be obtained from whole bodies, or internal tissues (*e.g.* muscle, liver, or bones) when their size is sufficient for stable isotope analyses, though non-destructive tissue collection is preferable for both ethical and epistemological reasons, especially when studying rare or vulnerable species (Hette-Tronquart *et al.* 2012). Non-lethal sampling methods also allow for repeated measurements on the same individuals, hence the possibility to address additional trophic questions. Exploring the path of alternative non-lethally sampled tissues is therefore highly needed. However, stable isotope ratios vary among tissues within a same individual depending on several factors including isotope routing, amino acid composition, and turnover rates (Fry 2006; Michener & Lajtha 2007; Martinez del Rio *et al.* 2009). It is thus essential to test whether alternative tissues provide stable isotope measurements similar to those of reference tissues in order to ensure that they can actually be substituted. In practice, food web studies require sampling tissues with low variation in stable isotope values, so that muscle became routinely used for SIA in vertebrates (Pinnegar & Polunin 1999). It is now virtually replaced by non-destructively sampled tissues, such as fish fins and scales (Jardine *et al.* 2011; *e.g.* Fincel *et al.* 2012; Hette-Tronquart *et al.* 2012), bird claws (Bearhop *et al.* 2003), reptile claws (Marques *et al.* 2011), and cetacean fins (Todd *et al.* 1997).

Surprisingly enough, research on the trophic ecology of amphibians is lagging behind that of other vertebrate taxa (Altig *et al.* 2007). Yet, amphibians likely play a pivotal role in the structure and functioning of aquatic food webs because they are both predators and preys (Schiesari *et al.* 2009; Solé & Rödder 2010). Furthermore, the remarkable biphasic life history of many amphibians contributes to energy flows between terrestrial and aquatic habitats (Solé & Rödder 2010; Trakimas *et al.* 2011). Amphibians also suffer severe global population

declines as a result of global changes (habitat destruction, pollution, or introduction of non-native species, etc., Beebee & Griffiths 2005) and are one of the most threatened vertebrate taxa (Baillie *et al.* 2004). Therefore, any information on their trophic ecology and its variation in fluctuating environments is relevant and of potential use for their conservation. The diet of tadpoles has been more investigated since Altig *et al.* (2007) called for more research (Trakimas *et al.* 2011; Schriever & Williams 2013; see e.g. Arribas *et al.* 2015; Carreira *et al.* 2016), but as for now relatively few SIA studies are related to the trophic ecology of amphibians. This is probably partly because non-lethal sampling methods are rarely used (Sepulveda *et al.* 2012; but see e.g. Gillespie 2013; Remon *et al.* 2016; Lejeune *et al.* 2018). Only one study thoroughly explored the relevance of tail clips for SIA, and showed that the carbon and nitrogen isotope ratios of the distal part of the tail was correlated to the carcass ratios in three salamander species, but with variable success (Milanovich & Maerz 2012). As compared to tail clips, the tail fin of amphibians appears as an ideal candidate for SIA because it is a homogeneous tissue, and its regeneration is frequently recorded in wild populations following injuries by predators (Nunes *et al.* 2010). Validating the relevance of fin biopsies for performing SIA in amphibians is therefore highly needed.

The major objectives of this study were: (1) to test whether the tail fin of amphibian species is relevant as a surrogate for muscle tissues and provide fin-derived corrective equations to estimate stable isotope ratios of carbon and nitrogen, and to address additional practical issues related to (2) the use of a topical anesthetic, recommended for minor surgeries (Gentz 2007; Mitchell 2009) likely to modify stable isotope ratios, and (3) the minimal quantities of fin needed to successfully perform SIA while limiting the severity of tail fin sampling. In doing so, we want to provide a non-destructive sampling method for stable isotope research in amphibians.

## Materials and Methods

### 1 Study area and sample collection

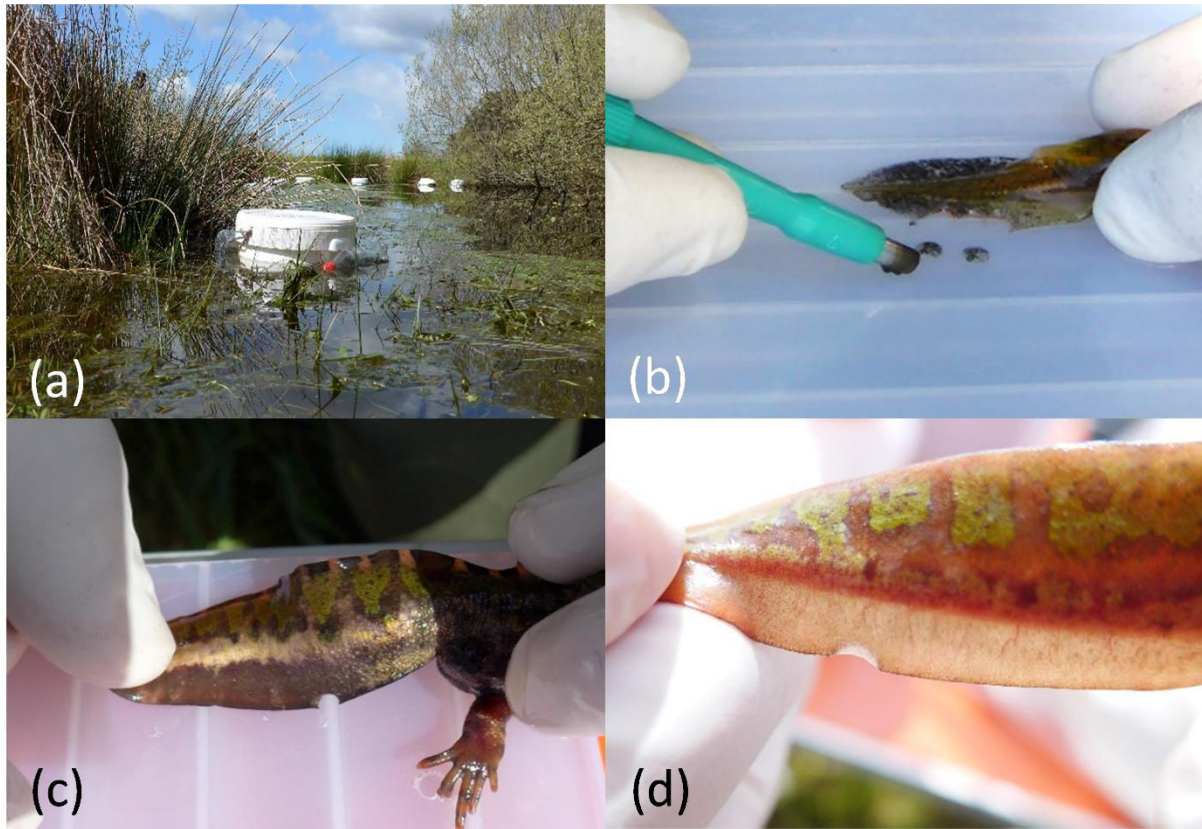


Figure 1. Habitat and fin sampling of amphibians: (a) Ortmann's traps set in a typical pond of the study area; (b) and (c): sampling of the fin of an agile frog tadpole and a marbled newt adult, respectively; (d): regeneration of the fin of a marbled newt, 10 days after sampling.

An extensive amphibian study took place over more than 150 ponds in the Regional Natural Park of Brière, northwestern France (47°23'N, 02°12'W), in 2015 and 2016 (see Tréguier *et al.* 2018 for a detailed description of the study area). Two types of funnel traps were set over the night period: wire mesh traps (Tréguier *et al.* 2018) and Ortmann's traps (Drechsler *et al.* 2010; Figure 1). Despite appropriate fieldwork precautions, 107 amphibians were found dead in the traps in 24 ponds, partly predated on by non-targeted trapped predators or for unknown causes, from the 14 April to the 22 May 2015 and from the 21 April to the 10 June 2016. We used all these animals in the present study. They were agile frog

tadpoles (*Rana dalmatina*, N = 29, one to 16 per pond from four ponds), European tree frog tadpoles (*Hyla arborea*, N = 14 from one pond), adult marbled newts (*Triturus marmoratus*, N = 30, one to nine per pond from nine ponds) and palmate newts (*Lissotriton helveticus*, N = 34, one to six per pond from 12 ponds), altogether representing < 1% of the amphibians caught over the two years. The developmental stages of tadpoles ranged from 26 to 42 (i.e; development of hind limbs, Gosner 1960). All the collected life stages were commonly present in the ponds for a time period long enough to play a critical role in aquatic food webs. As specimens were collected from different populations in ponds displaying a variety of environmental conditions, the consistency of the correlation of stable isotope ratios of carbon and nitrogen between fin and muscle across amphibian species would be a first step to the transfer of such relationships to other study sites. Specimens were preserved by freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  immediately after collection for further analysis.

## 2 Sample preparation and stable isotope analyses

In the laboratory, tail fins were rinsed with deionized water and then sampled using 2.5- and 3-mm diameter biopsy punches (Figure 1, and Table 1 for sample sizes). In tadpoles and palmate newts, biopsy samples were taken on the well-developed dorsal part of the tail fin. In marbled newts, the sampling of the ventral part of the fin was preferred so as not to damage the dorsal part which is of great importance for males during courtship. One to six samples were taken *per* individual when possible depending on the species (agile frog: 1–4, European tree frog: 3–5, palmate newt: 3–4, marbled newt: 3–6) to ensure that enough biological material was collected. Then, amphibians were dissected to sample their tail muscle. All samples were rinsed with deionized water before proceeding to the subsequent steps of sample preparation.

Local anesthetics can be used for minor surgical procedures such as fin biopsy in amphibians, to limit the handling time of animals and risks as compared to water anesthetics (Gentz 2007; Mitchell 2009). A prerequisite is to check beforehand whether the anesthetic affects stable isotope values. The effect of lidocaine, a common topical anesthetic recommended for amphibians (Wright 2001; Gentz 2007) was assessed by comparing the

carbon and nitrogen isotope ratios of samples treated with the anesthetic to those of control samples. Because we used most of the fin for exploring the relationships between fin and muscle, notably in palmate newts, the anesthetic experiment was done on an approximately 1-cm section of an intact part of the tail of individuals of the two newt species (N = 21, eight marbled newts and 13 palmate newts). For each individual, the tail sample was divided into two equal parts. On one part, lidocaine gel (2% solution) was applied on the integument for 5 minutes (the recommended latent period), then it was rinsed with deionized water to remove any lidocaine residues. The other part was only rinsed with deionized water and used as a control.

All samples were freeze-dried for 48h. Then they were ground to a homogeneous fine powder, except fin samples because of the small amount of tissue available. For a subset of individuals (17 agile frogs, 10 European tree frogs, 29 marbled newts and seven palmate newts), fin samples were individually weighed after freeze-drying to calculate mean density values ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) and ultimately to estimate the minimal fin surface required to successfully perform SIA. Fin samples were then gathered to constitute a unique sample per individual, except in nine marbled newts for which, due to large material supply, we analyzed three different samples of fin to assess intra-individual variations in stable isotope values (i.e. to explore whether the fin is a homogenous tissue). Each sample was packed into a tin capsule (mean  $\pm$  SD =  $415.6 \pm 17.3 \mu\text{g}$ ). SIA was performed by continuous-flow isotope-ratio mass spectrometry at the Stable Isotopes in Nature Laboratory (Fredericton, New Brunswick, Canada). Isotope ratios were reported as delta ( $\delta$ ) notations relatively to international standards (Vienna Peedee Belemnite for carbon, and atmospheric air for nitrogen). Maximum standard deviations of replicates from the International Atomic Energy Agency and working standards (i.e. the analytical errors) were  $\pm 0.10\text{‰}$  and  $0.25\text{‰}$  for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ , respectively. C:N was calculated as the ratio between elemental composition (%C:%N) of each sample.

Chapitre 4, partie 1 : Développement d'une méthode d'échantillonnage non-létale

Table 1. Mean differences in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  between fin and muscle values and linear models (equations, 95% confidence intervals (95% CI) of the estimate and the intercept) fitting muscle  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  as a function of the isotope ratios in fin tissue for each species or group of species (anuran tadpoles and urodele adults).  $\delta^{13}\text{C}$  values were corrected for the lipid content according to Caut *et al.* (2013). The significance of the mean differences and linear equations is indicated: NS: non-significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Species	N	Mean difference (fin - muscle)	Linear model			
			Equations	$\pm$ 95% CI estimate	$\pm$ 95% CI intercept	Adj.r <sup>2</sup>
$\delta^{13}\text{C}$						
Agile frog	29	0.44 $\pm$ 0.28***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.85 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 5.50$ ***	0.13	4.39	0.86
European tree frog	14	0.19 $\pm$ 0.20**	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.87 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 4.80$ ***	0.19	6.64	0.89
Marbled newt	30	- 0.13 $\pm$ 0.36 NS	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.70 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 7.43$ ***	0.18	4.64	0.68
Palmate newt	25	- 1.44 $\pm$ 0.86***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.71 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 7.03$ ***	0.17	4.65	0.77
Anuran tadpoles	43	0.36 $\pm$ 0.28***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.86 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 5.01$ ***	0.07	2.15	0.95
Urodele adults	55	- 0.73 $\pm$ 0.91***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.65 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 8.57$ ***	0.07	1.74	0.89
$\delta^{15}\text{N}$						
Agile frog	29	- 0.04 $\pm$ 0.36 NS	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} = 0.86 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{fin}} + 0.97$ ***	0.07	0.46	0.96
European tree frog	14	- 0.84 $\pm$ 0.30***	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} = 1.04 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{fin}} + 0.67$ **	0.43	1.77	0.67
Marbled newt	30	0.37 $\pm$ 0.45***	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} = 1.01 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{fin}} - 0.48$ ***	0.13	0.04	0.91
Palmate newt	25	0.43 $\pm$ 0.95*	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} = 0.89 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{fin}} + 0.40$ ***	0.15	1.19	0.86
Anuran tadpoles	43	- 0.30 $\pm$ 0.51***	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} = 0.79 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{fin}} + 1.54$ ***	0.06	0.36	0.95
Urodele adults	55	0.40 $\pm$ 0.72***	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} = 0.92 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{fin}} + 0.18$ ***	0.10	0.73	0.87

### 3 Data analysis

Variations in lipid content among tissues are known to bias  $\delta^{13}\text{C}$  values because lipid-rich tissues are depleted in  $^{13}\text{C}$ . The C:N ratio is routinely used as a proxy of the lipid content of a tissue, so that when working on aquatic animal tissues with C:N > 3.50, it is common to correct  $\delta^{13}\text{C}$  values using normalization equations (Post *et al.* 2007; e.g. Logan *et al.* 2008). The mean C:N values of fin and muscle were 3.47–3.88 and 3.37–3.53, respectively, across the four species. Two normalization equations were tested in parallel: one developed for aquatic animals (Post *et al.* 2007), and a second one specifically designed for amphibians (Caut *et al.* 2013). Both of them led to very similar results (differences < 1% in the  $\delta^{13}\text{C}$  values), so we used the amphibian-specific equation of Caut *et al.* (2013) for subsequent calculations. Results from the other method are provided in Supplementary Table S1.

Statistical analyses were performed with R software, version 3.3.5 (R Core Team 2018). The significance threshold was set to  $p = 0.05$ . We first tested whether  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values differed between fin and muscle for each species using paired t-tests (or Wilcoxon signed rank tests when data did not meet assumptions of normality) and also calculated the mean difference ( $\pm$  SD) between tissues. Linear models were used to test the link between muscle and fin isotope ratios for each species (specific models) and for grouped anuran or grouped urodele species (hereafter called generic models). The same statistical procedure was used to test the differences and then the link between treated and control samples in the anesthetic experiment. Finally, we assessed the importance of intra-individual variation in isotope ratios in marbled newts using one-way ANOVA with each individual as a factor.

## Results

After correcting  $\delta^{13}\text{C}$  for lipid contents (the range of the corrections was 0.11 to 0.40‰ for fin, and 0.10 to 0.23‰ for muscle), fin and muscle differed in their isotope ratios by  $-1.44$  to  $0.44$ ‰ for  $\delta^{13}\text{C}$ , and by  $-0.84$  to  $0.43$ ‰ for  $\delta^{15}\text{N}$ , depending on the species (Table 1). These differences were significant in all species, except for  $\delta^{13}\text{C}$  in the marbled newt and for  $\delta^{15}\text{N}$  in

the agile frog (Table 1). Whether fins were enriched or depleted in stable isotopes as compared to muscle varied among the species and between the elements (Figure 2):  $\delta^{13}\text{C}$  in the fin of anuran tadpoles, and specifically of agile frogs was generally higher than in their muscle, whereas it was the opposite in palmate newts;  $\delta^{15}\text{N}$  was generally higher in the fin of newts than in their muscle, as opposed to the European tree frogs.

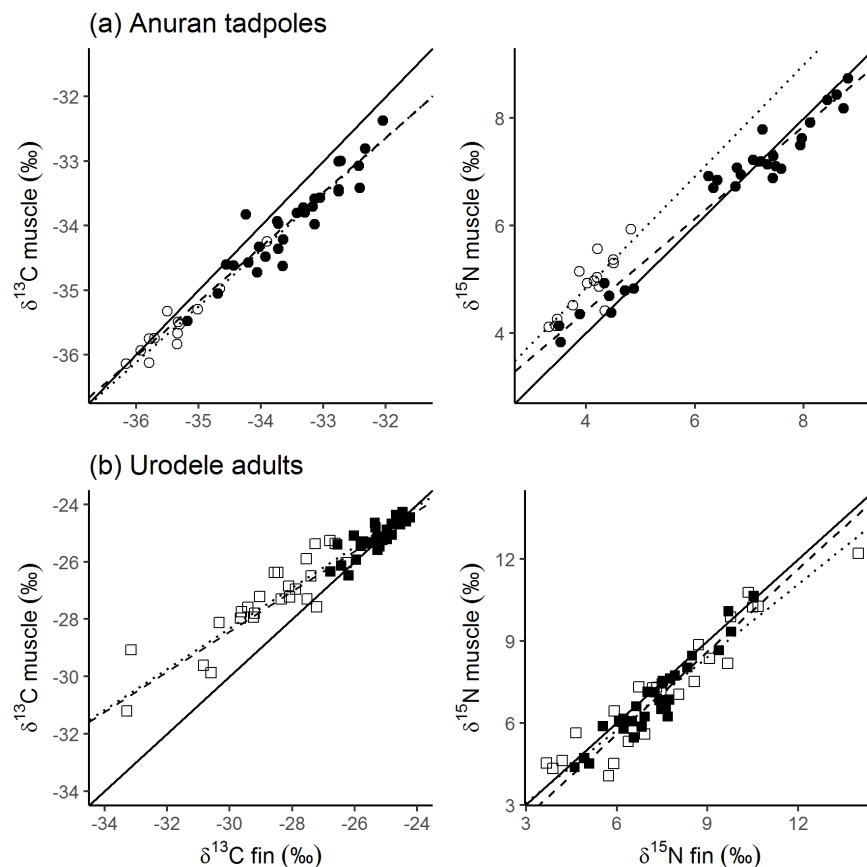


Figure 2. Linear regressions of  $\delta^{13}\text{C}$  (left) and  $\delta^{15}\text{N}$  (right) between muscle and fin in (a) anuran tadpoles, and (b) newt adults. Empty circles on dotted line represent the European tree frog, full circles on a dashed line the agile frog, empty squares on a dotted line and full squares on a dashed line the palmate newt and marbled newt, respectively. Plain lines represent  $y = x$ .

The isotope ratios of fin and muscle were strongly correlated independently of the species (Figure 2, Table 1). A substantial proportion of the total variance was explained by the specific models, ranging from 0.67 to 0.96 ( $> 0.80$  in 5 out of 8 models, Table 1). Despite no significant difference in  $\delta^{13}\text{C}$  between tissues in the marbled newt, the total variance of the

model was the lowest across species. The generic models also fitted well (explained variance: 0.87–0.95, see Table 1).

The application of lidocaine caused differences (mean  $\pm$  SD) in isotope ratios between the two tissues of  $-0.07 \pm 0.16$  ( $p = 0.06$ ) for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $-0.09 \pm 0.11\text{‰}$  ( $p = 0.002$ ) for  $\delta^{15}\text{N}$ . The equations linking control and treated samples (Figure 3) were  $\delta^{13}\text{C}_{\text{control}} = 1.01 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{lidocaine}} + 0.37$  ( $r^2 = 0.98$ ,  $p < 0.001$ ) and  $\delta^{15}\text{N}_{\text{control}} = 1.02 \times \delta^{15}\text{N}_{\text{lidocaine}} - 0.03$  ( $r^2 = 1$ ,  $p < 0.001$ ).

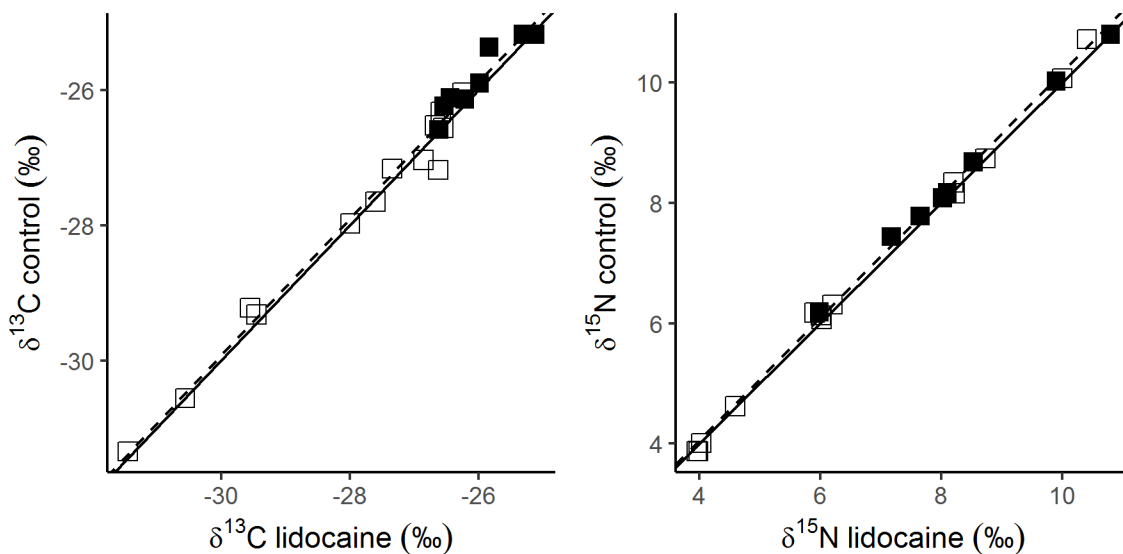


Figure 3. Relationships between control and lidocaine-treated samples for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ . Filled squares, marbled newt samples; empty squares, palmate newt samples. Dashed lines represent the linear model and plain lines indicate  $y = x$ .

Fin matter densities varied greatly among species, and were on average 2.75 to 7 times higher in adult newts than in tadpoles (Table 2). Differences in matter density were also recorded within species, with at least a two-fold factor between the lowest and the highest individual densities (see values in Table 2). In practice, average numbers of two 2.5-mm diameter fin biopsies were required to produce 100  $\mu\text{g}$  of freeze-dried matter (see Discussion regarding the minimal required mass to achieve accurate stable isotope measurements) for the agile frog, two 3-mm diameter fin biopsies for European tree frog tadpoles, and only one 2-mm diameter fin biopsy for adult marbled and palmate newts. Finally, the intra-individual

variations in isotope values recorded in marbled newts was very low (1.6% for  $\delta^{13}\text{C}$  and 1.7% for  $\delta^{15}\text{N}$ , 3 fin replicates  $\times$  9 newts; one-way ANOVA,  $p < 0.001$ ).

Tab 2. Density of amphibian tail fin, and conversion into the fin surface required to produce 100  $\mu\text{g}$  of freeze-dried matter (i.e. the minimum required mass required for nitrogen rich biological material for stable isotope measurements).

Species	Number of individuals (fin samples)	Freeze-dried matter density ( $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-2}$ )		Fin surface required ( $\text{mm}^{-2}$ )	
		Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD	Range
Agile frog	17 (62)	13.7 $\pm$ 4.7	6.9–22.7	9.0 $\pm$ 2.8	5.5–16.7
European tree frog	10 (39)	7.9 $\pm$ 2.4	5.1–12.4	14.4 $\pm$ 4.1	9.0–20.8
Marbled newt	29 (139)	55.3 $\pm$ 9.1	23.1–89.4	2.0 $\pm$ 0.4	1.0–4.4
Palmate newt	7 (23)	37.7 $\pm$ 4.2	25.4–62.2	3.0 $\pm$ 0.2	1.8–4.0

## Discussion

The tail fin of amphibians was found to be a highly relevant substitute for muscle tissue for conducting SIA. The strong relationships between the tail fin and muscle isotope ratios suggest that the two tissues had similar turnover rates and integrated comparable diet information. Mean differences in  $\delta^{15}\text{N}$  between the two tissues were low as compared to the trophic discrimination factors (TDF) found in several amphibian species ( $3.80 \pm 0.46\text{‰}$  in Caut *et al.* (2013),  $3.66 \pm 0.48\text{‰}$  and  $2.23 \pm 0.49\text{‰}$  in San Sebastián *et al.* (2015)). Moreover, these differences were marginal as compared to other sources of error, for example, the variability in the TDF which can be used to study food webs (see the values above, and also Martinez del Rio *et al.* 2009), even if the error was higher in the European tree frog than in the other studied species. For  $\delta^{13}\text{C}$ , the mean differences in  $\delta^{13}\text{C}$  between the two tissues were lower than the TDF values reported for amphibians in the literature, and comparable to the variability among them ( $1.19 \pm 0.31$  in Caut *et al.* (2013),  $1.56 \pm 0.64$  and  $0.91 \pm 0.49$  in San Sebastián *et al.* (2015)), except in the palmate newt where the difference was higher. As a result, the potential errors due to fin-muscle differences were probably too low to cause important misinterpretations in food web studies (see also Jardine *et al.* 2011); but this was not true for all species, especially for  $\delta^{13}\text{C}$  in the palmate newt and to a lesser extent for  $\delta^{15}\text{N}$  in the European tree frog. These specific results remain unexplained.

Both the specific and the generic equations were adequate to estimate muscle values from fin samples. By comparison, existing corrective equations built for tail clips in three salamander species were less powerful (Milanovich & Maerz 2012). One potential explanation could be that the tissue composition was more heterogeneous in their case. The equations we used for the two anuran species were very similar, and so were the equations for the two newt species. This is not surprising given that both anuran tadpoles are essentially phytophagous, and both newt species are predators. The fact that the amphibians came from different ponds with various environmental conditions (except the European tree frog) did not seem to affect the results. Therefore, it can be hypothesized that the relationship between fin and muscle was robust for other study areas, although further exploration of this question would be required. We recommend building specific equations for any new target species; nevertheless, the generic equations we implemented represent a valuable alternative depending on the diet of the concerned species.

The present study also answers important practical questions. Topical anesthetics are used for potentially painful surgical procedures on amphibians, but their application could influence the isotope ratios of the tissues. The deviations in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  due to the application of lidocaine (2% solution) were negligible as they did not exceed the commonly recorded analytical errors. Nonetheless, the adverse effects of anesthetics on the skin of amphibians are poorly known, and when a biopsy sample is very small, it is recommended to proceed without applying any chemical anesthetic (Wright 2001; Canadian Council on Animal Care 2004). This is the case for fin biopsies dedicated to SIA, because the minimal quantity of tail fin required to accurately measure  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  can be as low as 100  $\mu\text{g}$  for nitrogen-rich samples (depending on the analytic optimization of SIA platforms), corresponding to fin surfaces as small as 10–15  $\text{mm}^{-2}$  for tadpoles, and 2  $\text{mm}^{-2}$  for newts. We recommend sampling these minimum fin areas, or slightly greater areas in accordance to the instructions of SIA laboratories. These areas are far below the 30% tail clipping that did not affect larval survival in salamanders (Segev *et al.* 2015). Moreover, the tail of amphibians is a lure for predators and is routinely injured in the wild (Nunes *et al.* 2010). The low intra-individual variations in  $\delta^{13}\text{C}$  or  $\delta^{15}\text{N}$  in the marbled newt indicates that the fin is a relatively homogenous tissue, and we therefore suggest that sampling can be done on the part of the

fin that is considered as the least detrimental for the animals. Finally, additional field work showed that the tail fin fully regenerated in marbled newts, and sampled individuals were unrecognizable within 3 to 5 weeks after sampling (unpublished data, Figure 1).

Using SIA to address trophic issues used to be highly constrained in amphibians because it often implied destructive sampling techniques. The equations implemented in this study allow us to accurately estimate  $\delta^{13}\text{C}$  or  $\delta^{15}\text{N}$  in muscle, a reference tissue in SIA, from the non-lethal fin sampling of larvae and adults in several amphibian species. We hope that our findings will encourage new investigations on the trophic ecology of amphibians. Furthermore, exploring SIA using fin biopsy opens onto promising prospects, such as tracking trophic status changes at the individual level over time. More generally, a better understanding of the trophic ecology of amphibian populations is critical for predicting the consequences of global changes, and is undoubtedly of great interest for their conservation.

## **Acknowledgements**

This study was funded by the Agence Française pour la Biodiversité (research program supervised by JMP) and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (PhD Grant to NB). This work was carried out under the licenses 08/2015 and 07/2016 delivered by the Préfecture de la Loire-Atlantique. We thank the Parc Natural Régional de Brière, notably J.P. Damien, for supporting our research activities on amphibian ecology. The authors declare that they have no conflict of interest. We are also grateful to two anonymous reviewers for their constructive comments on an earlier version of the manuscript. A. Buchwalter edited the final version of the article.

**Supplementary material**

**Table S1.** Mean difference in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  between fin and muscle values and linear models (equations, 95% confidence intervals (95% CI) of the estimate and the intercept) fitting muscle  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  as a function of the isotope ratios in fin tissue for each species or group of species (anuran tadpoles and urodele adults).  $\delta^{13}\text{C}$  values were corrected for lipid content according to Post *et al.* (2007). The significance of the mean differences and linear equations is indicated: NS: not significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Species	N	Mean difference (fin - muscle)	Linear model			
			Equations	$\pm$ 95% CI estimate	$\pm$ 95% CI intercept	Adj.r <sup>2</sup>
$\delta^{13}\text{C}$						
Agile frog	29	0.52 $\pm$ 0.25***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.92 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 3.04$	0.13	4.39	0.88
European tree frog	14	0.41 $\pm$ 0.22***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.84 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 5.94$	0.20	7.14	0.86
Marbled newt	30	- 0.05 $\pm$ 0.36 NS	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.72 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 7.05$	0.18	4.64	0.69
Palmate newt	25	- 1.44 $\pm$ 0.87***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.70 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 7.09$	0.16	4.73	0.77
Anuran tadpoles	43	0.48 $\pm$ 0.24***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.93 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 3.03$	0.06	2.20	0.95
Urodele adults	55	- 0.68 $\pm$ 0.94***	$\delta^{13}\text{C}_{\text{muscle}} = 0.64 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{fin}} - 8.97$	0.06	1.77	0.88

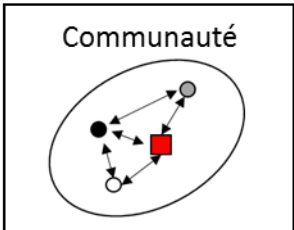
# CHAPITRE 4

## INTERACTIONS TROPHIQUES ENTRE ESPECES INVASIVE ET NATIVES

### PARTIE 2 : NICHES TROPHIQUES DES ESPECES INVASIVES ET NATIVES ET COEXISTENCE



**Article 5 : La partition de niche trophique entre les amphibiens et une écrevisse invasive favorise leur coexistence dans les mares**

Niveau d'organisation	Descripteurs	Disciplines et méthodes d'étude
	Cooccurrences Niches trophiques Relations interspécifiques	Analyses d'isotopes stables

Résumé :

La composition spécifique des communautés est largement modelée par les interactions locales, notamment car, dans le cadre de la théorie de la coexistence, deux espèces ayant la même niche écologique ne peuvent coexister. L'addition d'une nouvelle espèce dans une communauté entraîne inévitablement des changements dans les réseaux d'interactions, et les larges impacts des espèces invasives sont souvent liés à leurs interactions trophiques avec les espèces natives. En conséquence, les possibilités de coexistence entre espèces natives et invasives peuvent être estimées par les interactions entre elles, et des conséquences de la coexistence des espèces peuvent être vues par les changements dans l'utilisation des ressources par les espèces.

L'écrevisse de Louisiane, *Procambarus clarkii*, a envahi de larges régions à travers le monde, et il est considéré qu'elle altère fortement les communautés aquatiques, notamment parce qu'elle a une position centrale dans les réseaux trophiques associée à une grande flexibilité trophique, qui la prédisposent à interagir avec des espèces de plusieurs niveaux trophiques. Sa prédation sur les larves d'amphibiens et sa modification de la disponibilité des ressources a été montrée en conditions expérimentales, et étudier des écosystèmes naturels est nécessaire pour faire progresser la question de la coexistence entre cette écrevisse et les amphibiens dans des réseaux trophiques plus complexes. Ce travail avait pour but d'explorer les interactions trophiques entre l'écrevisse de Louisiane et quatre espèces d'amphibiens. Nous avons étudié les réseaux trophiques de 20 mares sur un gradient de densité d'écrevisse, par l'utilisation des analyses d'isotopes stables.

De larges variations ont été enregistrées dans la position et la taille de niche des amphibiens, mais la niche de l'écrevisse et celle des amphibiens ne se sont jamais recouvertes. Des changements dans la largeur de niche de deux espèces de têtards ont été associés à la présence de l'écrevisse, mais aussi aux abondances de triton marbré et à la restauration des mares. Ces résultats soulignent que la coexistence entre l'écrevisse de Louisiane et les amphibiens peut être possible car leurs interactions trophiques directes sont restreintes. Cependant, l'écrevisse peut affecter les amphibiens par des relations indirectes, comme la modification de la disponibilité des ressources, et des recherches supplémentaires devraient se concentrer sur ce point. Ces résultats soutiennent le fait que la théorie des niches est un moyen approprié pour estimer la coexistence des espèces dans des communautés envahies.

## **Trophic niche partitioning between amphibians and an invasive crayfish promotes their coexistence in pond ecosystems**

Nadège Bélouard, Eric J. Petit, Julien Cucherousset, Jean-Marc Paillisson

*Manuscript in preparation*

### **Abstract**

The species composition of communities is largely shaped by local interactions, notably because in the frame of the coexistence theory, two species with the same ecological niche cannot coexist. The addition of a new species to the community inevitably induce changes in the interactions between species, and the large impacts of invasive species are often linked to their trophic interactions with native species. As a result, the possibilities of coexistence between native and invasive species can be estimated by examining the interactions between them. More, species coexistence can be favoured by a change in the resource use of competing species in order to decrease the overlap of their niches.

The non-native red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, is considered to dramatically alter aquatic communities, notably because it has a central position in food webs associated to a high trophic flexibility that makes it potentially interacting with several trophic levels in food webs. Its predation on larval amphibians and the modification of resource availability have been shown in experimental conditions, and studying the food webs of natural ecosystems is needed to advance the issue of the coexistence between this crayfish and amphibians in more complex food webs. This work aimed at exploring the trophic interactions between the red swamp crayfish and four species of the amphibian community. We studied the food webs of 20 natural ponds over a gradient of crayfish density by the use of stable isotope analyses and the analyses of niche variation in amphibians and crayfish.

Large variations were recorded in the niche position and size in amphibians, but the niches of crayfish and amphibians never overlapped. Shifts in the niche of two tadpole species were associated to crayfish presence, but also marbled newt densities and pond restoration, while shifts in the niche of two species of adult newts were only associated with pond restoration. These results highlighted that the coexistence between the red swamp crayfish and amphibians may be possible because their direct trophic interactions are restricted. However, crayfish may affect amphibians by indirect relationships such as modifications of resource availability, and further research should be focused on this point. These findings support the view that the niche theory is an adequate way of estimating species coexistence in invaded communities.

**Keywords:** biological invasion, food web, niche partitioning, pond community, stable isotope analysis

## Introduction

Species interactions, particularly in food webs, are of major importance in structuring community composition and species coexistence (Chesson 2000; Leibold *et al.* 2004). The composition of local communities is currently affected by range shifts or range expansions of species due to climate change or human activities (Walther *et al.* 2002; Parmesan 2006). There is especially high concern relative to the ecological impacts of biological invasions (e.g. Ricciardi *et al.* 2013; Mollot *et al.* 2017; Cucherousset & Olden 2011; Vilà *et al.* 2011; Gallardo *et al.* 2016). Established non-native species become integrated in food webs and inevitably modify interaction networks either through additive effects, i.e. by creating new links with resident species, or non-additive effects, i.e. by modifying or disrupting existing links which propagate changes to the entire receiving community (David *et al.* 2017). The range of the interactions between invasive and native species is wide, including direct consumption (i.e. predation) and indirect trophic or non-trophic effects. The most striking impacts are certainly due to the predation exerted by invasive species, because of the lack of coevolution of native species with invasive predators and also because the latter tend to display higher

functional responses to prey availability than native predators (Bollache *et al.* 2008; Alexander *et al.* 2014). It has been found to result in massive species extinctions notably on islands (e.g. the Nile perch in lake Victoria, Ogutu-Ohwayo 1990; *Boiga irregularis* in Guam, Fritts & Rodda 1998). Indirect effects can range from exploitative competition, which occurs when invasive and native species use the same resource, leading to a decline in its availability (e.g. Vander Zanden *et al.* 1999), to interference competition (i.e. antagonistic interactions), but also habitat modification or behavioral changes such as the display of anti-predator strategies to increase the survival of prey species (Pearl *et al.* 2003). Overall, invasive species that invade the middle of food webs are those that have the widest range of interactions with native species because they cumulate multiple links in the recipient communities, including competition with species of a similar trophic level, predation with those of upper and lower trophic levels, that is potentially associated with changes in feeding behaviors of native preys, and sometimes, on top of that, habitat modifications (Jackson *et al.* 2017b).

The contemporary theory of niche coexistence predicts that two species can coexist in a community if the niche differences between species are higher than the relative difference in species fitness (Chesson 2000). Invasive species can attain higher fitness than native species, notably due to their higher functional responses to prey availability (Bollache *et al.* 2008; Alexander *et al.* 2014). As a result, coexistence between native and invasive species can arise from the partition of the trophic space, i.e. a low overlap in their resource use, either constitutive or induced (Chesson 2000), and from other substantial changes in species diet linked to resources availability or due to behavioral modifications. Overall, the study of trophic niches is therefore a good way to examine invasive and native species coexistence and to measure the changes induced in invaded communities. Niche theory also predicts that in a spatially structured landscapes, the outcome of trophic relationships varies depending on the environmental conditions (Chesson 2000). In the context of biological invasions, it includes notably habitat heterogeneity and the composition of the receiving community (Jackson *et al.* 2017b). As a result, while experiments in controlled environments provide a good basis to understand the relationships between invasive and native species, the heterogeneity of environmental conditions can make the impacts of invasive species much more variable in natural food webs. Consequently, studying natural food webs give more

realistic insights into the effects of biological invasions and other factors on trophic networks, although it is more difficult to disentangle their relative importance.

The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* is a widespread aquatic invasive species accused of major effects within receiving communities (e.g. Souty-Grosset *et al.* 2016; Nentwig *et al.* 2018). It is a benthic omnivorous and generalist species displaying a central position in food webs, associated to a high trophic flexibility (Gutiérrez-Yurrita *et al.* 1998; Correia 2002; Smart *et al.* 2002; Alcorlo *et al.* 2004; Ilhéu *et al.* 2007). Its diet is mainly composed of detritus, periphyton and macrophytes, but also of animal preys including macroinvertebrates and amphibians (Correia 2003; Cruz & Rebelo 2005; Cruz *et al.* 2006a). By its herbivory and its burrowing activity, it is able to substantially modify waterbodies and turn water from clear to turbid states (Carreira *et al.* 2014; Souty-Grosset *et al.* 2016). Several of these characteristics are able to impact amphibians, a vertebrate group declining worldwide (Baillie *et al.* 2004; Beebee & Griffiths 2005). Beyond the predation on amphibian eggs and tadpoles (Cruz & Rebelo 2005), crayfish also displays aggressive behavior toward adult amphibians (Gamradt *et al.* 1997) and can affect their reproduction because vegetation is essential for many amphibian species to lay eggs or as refuge sites. All these effects of crayfish on amphibians are supposed to occur together in the wild, but the influence of ecological factors on the trophic niche of amphibians is still very badly known (Altig *et al.* 2007; but see e.g. Caut *et al.* 2013; Carreira *et al.* 2016; Arribas *et al.* 2015). Ponds are ideal natural habitats to advance this issue because these small ecosystems are more homogeneous as compared to large lakes in which resources are differentiated between pelagic and littoral zones. Ponds are therefore expected to provide fewer ecological niches and, as a result, higher probabilities of niche overlaps between species. It is also supposed that the effects of the red swamp crayfish would rapidly spread to the entire food web in such small aquatic habitats ponds. More, the diversity in their environmental conditions and resident communities provide opportunities to explore the possible importance of the density of predators, competitors, or resource availability on the trophic changes in amphibians. However, this small size also induce that some species, and especially amphibians, naturally occur at low numbers, so that obtaining sample sizes high enough for statistical analyses can be challenging.

In the present study, we explored whether the apparent coexistence between amphibians and the red swamp crayfish in the pond networks of the Regional Natural Park of Brière after 30 years of invasion (Bélouard *et al.* 2018b; Tréguier *et al.* 2018) was accompanied by changes in the trophic niches in four amphibian species (two tadpole species and two adult newt species) using stable isotope analyses (SIA). Stable isotopes analyses can be used to map trophic links in food webs, because isotopic niches are used as a proxy of the trophic niche of species (Bearhop *et al.* 2004; Newsome *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2012). Tadpoles and newts differ in their diet: most tadpoles feed on particles of algae, macrophytes and detritus deposited on the substrate or suspended in the water column (Altig *et al.* 2007; Whiles & Altig 2010; Arribas *et al.* 2015), whereas adult newts are carnivorous and mostly feed on macroinvertebrates (Griffiths 1986; Fasola & Canova 1992; Denoël & Andreone 2003; Covaciu-Marcov 2010). Although the trophic niche might differ between species, we expected the two tadpole species to exhibit similar responses to ecological factors because of the similarity in their ecological traits and diets, and the same hypothesis was drawn for the two newt species. We specifically explored: (1) the interactions between the red swamp crayfish and amphibians, and we predicted large overlaps between the isotopic niche of the crayfish and those of all amphibians in ponds; (2) whether the niche of amphibians changed in position or in size with the presence or density of crayfish, or with other factors (potential predators, competitors, or resource availability). The extent to which the red swamp crayfish affects the isotopic niche of amphibians in ponds will advance the understanding of the impacts of biological invasions on native communities.

## **Material and methods**

### **1 Study area and study species**

The Regional Natural Park of Brière (northwestern France) includes large marshes and dense pond networks in a hedgerow landscape very suitable for amphibians (see a more detailed description of the study area in Tréguier *et al.* 2018). The study was conducted in 20 ponds in late May 2016 and 2017. The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* was

introduced in the early 1980s and colonized around half of the ponds of the study area (Tréguier *et al.* 2018). The amphibian community is composed of eight amphibian species (five anurans and three urodeles). Four of them are relatively common, sometimes present in high abundances, and are susceptible to interact with crayfish for a long period in invaded ponds: the agile frog *Rana dalmatina*, the European tree frog *Hyla arborea*, the palmate newt *Lissotriton helveticus*, and the marbled newt *Triturus marmoratus*. From March until June, larvae of these species develop in ponds, and adult newts also stay in the water for the breeding season while adult agile frogs and tree frogs only spend a few days in ponds to lay eggs and were not considered as part of the aquatic food webs (ACEMAV 2003). All these species are protected by law, and larval newts were too small to be non-lethally sampled for SIA, so we focused on tadpoles of agile frogs and tree frogs, and adult palmate and marbled newts. The 20 selected ponds were as far as possible representative of the variability in crayfish and amphibian density within the study area (but see the Discussion).

## 2 Data collection

Sampling for SIA occurred in May 2016 or May 2017 depending on ponds (see Table 1). In each pond, it began when tadpoles had hind limbs developed (Gosner stage above 38, Gosner 1960), which ensures they quitted their terrestrial maternal signature and attained a stable aquatic isotope signature (Trakimas *et al.* 2011; Caut *et al.* 2013). First, in each pond, we quantified the abundance of all animal taxa for which we had predictions of an effect with amphibians, as predators, competitors or resources (see below, and a summary in Table S1), or which we used to standardize the data (see Stable isotope analyses). We used pipe sampling, which consists in quickly plunging a 0.25-m<sup>2</sup> hollow cylinder through the water column into the sediment, thus providing a closed sampling unit (see Skelly & Richardson 2010). Four pipe samples replicates were regularly spaced on pond banks so as to represent the diversity of microhabitats in pond. Trapped macroinvertebrates and amphibians were sampled with a dip net of 4-mm mesh until depletion, and counted by taxa as follows, ordered by their hypothetical relationship with amphibians (Table S1): (1) predators of tadpoles and competitors of newts: *Dytiscidae* adults (genus *Acilius*, *Colymbetes*, *Dytiscus*), *Dytiscidae* larvae, *Odonata* larvae (genus *Aeshnidae* and *Libellulidae*, *Zygoptera*), and *Notonecta glauca*;

(2) predators of tadpoles: fish (black bullhead *Ameiurus melas*, common roach *Rutilus rutilus* and mosquitofish *Gambusia affinis*) and adult palmate newts, (3) competitors of tadpoles and resources of newts: tadpoles of agile frog and of European tree frog and *Corixidae*, (4) resources for newts only: larvae of *Chironomidae* (hereafter *Diptera*) and *Gammarus gammarus*, (5) data standardization: *Corbiculidae* and *Physa acuta*. Densities were calculated for all taxa based on these counts (individuals/m<sup>2</sup>). The abundance of larger organisms, adult marbled newts (predators of tadpoles) and red swamp crayfish (predators of tadpoles, competitors of tadpoles and newts), was better estimated using a 12-h trapping session, including the night period (funnel trap characteristics: length × width × height: 50 × 29 × 21 cm, 5.5-mm mesh size with two side entrances, 4-cm inner opening diameter) set roughly every 5 m along the shoreline in the limits of 4-20 per pond (mean pond perimeter: 66 m, range: 22-172 m). Abundances found using traps were expressed as catch-per-unit effort (CPUE), i.e. individuals/trap/12h

We delimited the aquatic food web of ponds by the potential basal food resources (aquatic macrophytes, filamentous green algae and leaf litter) and the resident aquatic consumers (amphibians and macroinvertebrates including crayfish), that we sampled for stable isotope analyses. We aimed at sampling 20 individuals of each target species (i.e. amphibians and crayfish) when present. Ontogenetic diet shifts have been shown in red swamp crayfish using stomach content analyses (Correia 2003) or SIA (Paillisson *et al.* 2011a), but they could be context-dependent (Alcorlo & Baltanás 2013). We therefore sampled both adult and juvenile crayfish when present. We also collected three samples of each of the other taxa composed of several individuals for macroinvertebrates smaller than *Dytiscus spp.* Since we did not aimed at evaluating the relative contribution of putative food resources to the diet of the focal species, we only sampled few basal organic resources: the dominant aquatic macrophytes, mainly *Callitriche*, *Glyceria*, *Potamogeton*, and *Juncus*, filamentous green algae and leaves at abscission from trees in the near proximity of ponds when present. In addition, we sampled zooplankton by filtering 50L of water per sample of zooplankton. Aquatic consumers (taxa as cited above) were sampled owing to the pipe and trapping sessions described above, but trapping continued and was completed by extensive manual research throughout each pond to obtain complementary samples. As a result, ponds were sampled

over a maximum period of 15 days. Red swamp crayfish, amphibians and fish were collected under the permits n°07/2016, 12/2017, 2016/SEE-Biodiversité/070, 2017/SEE-Biodiversité/1145 approved by the Préfecture de Loire-Atlantique. Because sampling was conducted in the late breeding season of amphibians, we assumed that the measurements of stable isotopes in amphibians reflect aquatic food resource assimilated in ponds. As the fin of amphibians is an adequate surrogate to muscle for stable isotope analyses (Bélouard *et al.* 2018a), each amphibian was sampled using one to two 2.5- or 3-mm diameter biopsies (see details and recommendations in Bélouard *et al.* 2018a) in accordance with ethics on animal care and permit n°APAFIS#3125-20152071140177v2, and immediately released back to the water. Crayfish and fish were euthanized following ethical guidelines stipulated in the permits. All samples were kept on ice during field collection, and then preserved by freezing at -20°C until further processing.

### 3 Environmental characteristics

Four habitat characteristics of ponds were considered as proxies of resources availability: (1) canopy cover (% of forested linear of shore), estimated during fieldwork, as a proxy of the successional stage of a pond, and which is also known to influence pond productivity (Skelly *et al.*, 2002; Schiesari, 2006); (2) pond area (m<sup>2</sup>), measured using aerial photointerpretation of a map provided by the General Council of Loire-Atlantique (BD ORTHO 2009) using ArcGIS 10 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, USA), which is a global proxy of the pond configuration and hydrology, and influences the composition of resident communities (Post *et al.* 2000); (3) aquatic vegetation cover (%), visual estimation, see its importance for amphibians in the Introduction); (4) pond management in the last 5 years (restored or not). Restoration consisted in reopening (removing trees and shrubs) and dredging ponds. Six from the 20 ponds were restored and chosen because they were occupied by marbled newts. Additionally, averaged values of physico-chemical parameters were measured during fieldwork to further characterize pond habitats: dissolved oxygen (mg), temperature (°C) and conductivity (µS/cm) at three locations in ponds (multiparameter probe HI98195, Hanna instruments), and turbidity (NTU) at four locations in ponds (TN-100, Eutech Instruments, Thermo Fisher Scientific).

#### 4 Stable isotope analyses

In the laboratory, crayfish were measured to the nearest millimeter from the tip of the rostrum to the end of the telson. Based on the bimodal distribution of length-frequency histograms, crayfish were classified as juveniles (< 1 year, mean ( $\pm$  SD) total length of  $42 \pm 9$  mm, range: 25-60 mm) or adults ( $92 \pm 10$  mm, range: 71-122 mm). Crayfish and fish were then dissected to sample abdomen muscle. We used the whole bodies of the other macroinvertebrates (gastropods without shells) for conducting stable isotope analyses (SIA). Zooplankton was sorted from the filtered water samples. Replicates consisted of single individuals for amphibians, crayfish, fish and adults and larvae of *Dytiscidae*, but a mixture of up to 15 individuals per sample was used for smaller macroinvertebrates depending on material supply (up to 23 for chironomids). We used up to 20 replicate samples for each target species, and up to three replicate samples for basal resources and other consumers. All samples were rinsed with deionized water, freeze-dried for 48h, and then grounded into powder to homogenize tissues except amphibian fins and zooplankton due to the small amount of material available. Each sample was packed in tin capsules: (mean  $\pm$  SD)  $372 \pm 63$   $\mu$ g per sample for amphibians,  $1\ 013 \pm 63$   $\mu$ g for crayfish,  $1\ 001 \pm 53$   $\mu$ g for fish,  $964 \pm 208$   $\mu$ g for macroinvertebrates,  $1\ 004 \pm 90$  for zooplankton,  $2\ 404 \pm 929$   $\mu$ g for leaf litter and  $2\ 998 \pm 58$   $\mu$ g for macrophytes and algae.

The stable isotopes of carbon and nitrogen, two elements typically used to study food webs (Fry 2006). were measured at the Cornell Isotope Laboratory (COIL, State, USA). Stable isotope ratios were expressed using conventional delta notations  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  relative to international standards, Vienna Pee Dee Belemnite for carbon and atmospheric air for nitrogen, respectively. C:N was calculated as the ratio of elemental composition (%C:%N). In-house standards resulted in a measurement precision (i.e. the analytical errors) of 0.14‰ for carbon and 0.07‰ for nitrogen.

The C:N ratio is routinely used as a proxy of the lipid content of a tissue which is known to bias  $\delta^{13}\text{C}$  values, lipid-rich tissues are indeed depleted in  $\delta^{13}\text{C}$  (Post et al. 2007). For aquatic animal tissues with C:N > 3.5, their  $\delta^{13}\text{C}$  values are generally corrected using normalization equations (e.g. Post *et al.* 2007). Here,  $\delta^{13}\text{C}$  ratios were lipid-corrected before subsequent

analyses following Post et al. (2007), except crayfish (mean  $\pm$  SE of C:N:  $3.14 \pm 0.06$  for adults, and  $3.25 \pm 0.09$  for juveniles) and fish ( $3.36 \pm 0.06$ ). The stable isotope values in amphibian muscle were estimated following the specific equations in Bélouard et al. (2018a). Since the isotope ratios of basal resources can show considerable variation between ponds, isotope ratios of all members of food webs were corrected to allow comparisons between ponds. Individual trophic positions (TP) were calculated using a baseline composed of primary consumers displaying relatively stable isotope estimates: the scrappers *Physa acuta* ( $n = 0-3$  samples), and the filterers *Corbicula* ( $n = 0-3$  samples), for a total of 2 to 6 samples per pond. Despite extensive sampling efforts, we did not find any individual of these two taxa in two ponds, so we used the most appropriate available primary consumers present to calculate the baseline: zooplankton ( $n = 3$ ) and *Gammarus gammarus* ( $n = 3$ ) in MK, and only zooplankton ( $n = 1$ ) in M949. Special attention was paid to verify that these two ponds were not responsible for any particular tendency in the subsequent statistical analyses. The trophic position was calculated as:

$$TP = \lambda + (\delta^{15}N_c - \delta^{15}N_b) / \Delta^{15}N,$$

where  $\lambda = 2$  is the trophic level of primary consumers,  $\delta^{15}N_c$  is the individual  $\delta^{15}N$  of the species considered,  $\delta^{15}N_b$  is the mean  $\delta^{15}N$  of the baseline and  $\Delta^{15}N$  the trophic discrimination factor (set to 3.4 like in Post 2002; Olsson *et al.* 2009). Carbon isotopic ratios were adjusted relative to variations in community width using all macroinvertebrates except crayfish. Taxa with the most extreme  $\delta^{13}C$  values within a pond community were generally zooplankton and *Gammarus gammarus*. The formula used was:

$$\delta^{13}C_{cor} = (\delta^{13}C_c - \delta^{13}C_{inv}) / (CR_{inv}),$$

where  $\delta^{13}C_c$  is the individual  $\delta^{13}C$  of the species considered,  $\delta^{13}C_{inv}$  is the mean  $\delta^{13}C$  of macroinvertebrates, and  $CR_{inv}$  is the range of  $\delta^{13}C$  values of macroinvertebrates.

For each population of target species, the mean trophic position and the mean  $\delta^{13}C_{cor}$  were calculated by averaging the isotope values of all individuals. The carbon range (CR), nitrogen range (NR), and total area (TA) of the isotopic niche were calculated as measures of isotopic niche width (Jackson *et al.* 2012). Because sample sizes differed and most extreme

individuals can influence those values, standard ellipse areas corrected for small sample sizes (SEAc) were calculated as a measure of core population isotopic niche (Jackson *et al.* 2012). The degree of overlap of isotopic space between species was calculated on SEAc as %overlap = area of overlap/niche area of the species considered. Niche metrics were calculated for each population of target species composed of  $n > 10$  individuals (following recommendations in Jackson *et al.* 2011). In five newt populations, we sampled  $< 10$  individuals despite intensive trapping (Table 1). The high rates of recaptures we found attested that populations were small (often observed in amphibians, Jehle *et al.*, 2001), and we calculated niche metrics for these populations as well. In pond M112, only five marbled newts were sampled and the isotopic niche metrics were much smaller than those in the other marbled newt populations, so we excluded this population from statistical analyses. We verified that the other small newt populations were not responsible for particular tendencies in the results.

## 5 Statistical analyses

We used Spearman's rank correlation tests to assess correlations between the three niche area metrics. TA and SEAc were highly correlated ( $\rho: 0.96, p < 0.001$ ), TA being on average  $2.63 \pm 0.49$  times higher than SEAc; we therefore retained only SEAc in subsequent analyses because it accounts for both variations in sample sizes and small sample sizes (Jackson *et al.* 2012). We tested the correlation between all the candidate predictors (the density of each taxa, habitat characteristics and physico-chemical parameters) using Spearman's rank correlation tests for quantitative variables and Mann-Whitney tests for qualitative variables.

Variations in niche position (mean TP and mean  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$ ) and niche width (NR, CR, SEAc, log-transformed to meet assumptions of normality) were tested using linear mixed models (LMM) against one predictor at a time (summarized in Table S1). We hypothesized that tadpoles of the two anuran species would exhibit similar responses to candidate factors because they have comparable ecological traits (Altig *et al.* 2007; Trakimas *et al.* 2011), and we pooled them for subsequent analyses. The same reasoning was applied for newts (see Griffiths 1986; Covaciu-Marcov 2010). Models were run including amphibian species as in interaction with the predictor and pond identity as a random factor. When the interaction

term was significant, the model was tested separately in each species using linear models, otherwise it was removed from the model to avoid overfitting. Significant models were ranked on AICc (Akaike Information Criterion corrected for small sample sizes) along with a null model, and models within  $\Delta\text{AICc} < 2$  were considered equivalent in their probability of being the best (Burnham & Anderson 2003). All analyses were conducted in R version 3.5.5 (R Core Team 2018) using the package *siar* (Parnell & Jackson 2013) and *lme4* (Bates *et al.* 2014).

## Results

### 1 Species occurrences and variations in predictors and habitat characteristics among ponds

The agile frog was detected in 17 ponds, the European tree frog in 12 ponds, the palmate newt in 13 ponds, and the marbled newt in 8 ponds (see co-occurrences in Table 1 and Table S2). The red swamp crayfish was detected in 14 ponds, and CPUE ranged from 0.11 to 3.55 crayfish/trap/12h.

Ponds varied a lot in most of their habitat characteristics (Table S3), but three quantitative variables were particularly correlated with the others (Table S4). The aquatic vegetation cover was positively correlated with the abundances of all four amphibian species, *Dytiscidae*, *Odonata* and *Corixidae* (rho: 0.52 to 0.71), and negatively correlated to densities of *Diptera* and abundances of red swamp crayfish (rho: -0.55 to -0.68). The abundances of crayfish were negatively correlated to *Dytiscidae*, *Odonata*, marbled newt and palmate newt (rho = -0.52 to -0.79) and positively correlated with water turbidity ( $r = 0.65$ ). *Odonata* was also correlated to agile frog, marbled newt and palmate newt (rho = 0.54 – 0.77) and canopy cover and turbidity (rho = -0.52 and -0.56). Few additional high correlations were detected, for instance between canopy cover and temperature (-0.52), agile frog and European tree frog (0.73), marbled newt and palmate newt (0.71). The abundances of marbled newts, the densities of *Dytiscidae* and *Odonata* and the aquatic vegetation cover were higher in uninvaded ponds,

and lower in restored ponds. The densities of palmate newt were lower in the presence of crayfish only.

Table 1. Number of samples used for stable isotope analyses for each taxa in the 20 studied ponds. Grey background indicates species that were found in low numbers, and that were not analyzed (empty cells) or for which niche metrics were not calculated.

Pond	Sampling year	Agile frog	European tree frog	Palmate newt	Marbled newt	Adult crayfish	Juvenile crayfish	Dytiscidae adults	Dytiscidae larvae	Notonectidea	Corixidae	Odonata	Gammarus	Corbiculidae	Diptera	Physa	Fish	Filamentous algae	Litter	Aquatic vegetation	Zooplankton
M17	2017	17	19	20	19			3	3	3	3	3		1		1		3	3	3	3
M22	2016		19	13	19			3	3	3	3	3				3			3	3	3
M48	2016	20	15	20	16			3	1	3	2	3			2	3		3	3	3	2
M56	2017	20	20	19	7			2	3	3	3	3		3		3		3	3	3	3
M87	2016	20	20	20	11			3	3	3	3	3	3	3	3			3	3	3	3
M94	2016	20	13	20	9			3	1	3	3	3			3	3			3	3	2
M70	2017	10		19	20	3		3	3	3	3	3	3	1	1	3			3		3
M66	2016	19	20	12		20	5	3	3	3	3	3	3		3	3			3	3	3
M949	2017	20	19	17		20	11	3	3	3	3	3							3	3	1
M91	2016	20	14	20		20	17	3	3	3	3	3	3	2	1	3			3	3	3
M888	2017	10				20				3	3	3			2	3			3	3	3
M1016	2016	20				20	11	3	1	3		3	3		3	3			3		3
M82	2017			5		20	6	3	3	3		3	3		2	3			3	3	3
M112	2017	20		9	6	18	12	3	3	3	3	3	3	1	2	3		3	3	3	3
M72	2016	15				19	9	3	3	3	3				3	3			3		1
M89	2017	20	20			20	20	3	3	3	3	3	3			3	3	3	3	3	2
M111	2016	20		20		10	26	3	3		3	1	3		3	3			3	3	3
MJ	2017					20	23		3		1		3		3	3			3	3	3
M88	2017					20	10	2		3	1	3	3		1	3	3		3	3	2
MK	2017					20	23						3				3		3	3	3

## 2 Variations in the isotopic position and niche size of target species

We performed SIA for 765 amphibians (271 agile frogs, 179 European tree frogs, 214 palmate newt and 107 marbled newts), 423 crayfish (173 juveniles and 250 adults), 129 plant samples (vegetation, leaf litter and algae), 9 fish and 368 macroinvertebrates samples

among the 20 ponds (Table 1). Niche metrics of amphibian populations were calculated in 5, 6, 6 and 6 uninvaded ponds as well as 10, 4, 7 and one invaded ponds, for the agile frog, European tree frog, palmate newt and marbled newt, respectively (Table 1). The values of the mean isotopic position and of niche metrics are available for each population in Table S5.

Table 2. Range (minimum-maximum across ponds) of the isotopic niche metrics for each group of target species.

	Mean TP	Mean $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$	NR	CR	SEAc
Agile frog	1.86 - 2.58	-0.96 - -0.04	0.13 - 0.75	0.19 - 1.03	0.01 - 0.12
European tree frog	1.49 - 2.95	-0.68 - 0.58	0.21 - 0.98	0.18 - 0.99	0.01 - 0.10
Marbled newt	2.09 - 3.22	-0.41 - 1.60	0.44 - 0.80	0.09 - 0.66	0.01 - 0.12
Palmate newt	1.93 - 3.10	-0.16 - 1.35	0.23 - 1.17	0.13 - 0.67	0.01 - 0.10
Adult crayfish	1.82 - 3.53	-0.14 - 0.68	0.29 - 1.38	0.21 - 0.89	0.01 - 0.12
Juvenile crayfish	1.88 - 2.79	-0.32 - 0.19	0.28 - 0.76	0.14 - 0.78	0.01 - 0.11

Despite important variations in isotopic values across ponds, the isotopic position of each target species was generally stable relative to the whole food web (Figure S1). The agile frog had low  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  and a low to intermediate TP, and while the niche of the European tree frog was generally close to these values, it sometimes took very different positions among food webs, both on the TP and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  (see the maximum values taken for the mean TP in Table 2 and Fig S1). The two newts had high  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  and intermediate to high TP. The niche of the two newt species were well differentiated with the marbled newt having higher signatures than the palmate newt for both isotope ratios. Both juveniles and adults red swamp crayfish were situated in a central position relative to the entire food web, and displayed large variations in TP, but they tended to have different isotopic values, and whether adult or juveniles had the highest trophic position depended on ponds. None of the tested variables were significantly correlated to the mean TP of tadpoles nor the mean  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  of newts. There were few significant relationships between predictors and the mean  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  of tadpoles (palmate newts, Table S6) or mean TP of newts (*Dytiscidae* adults, Table S7), but they were not better ranked than the null model.

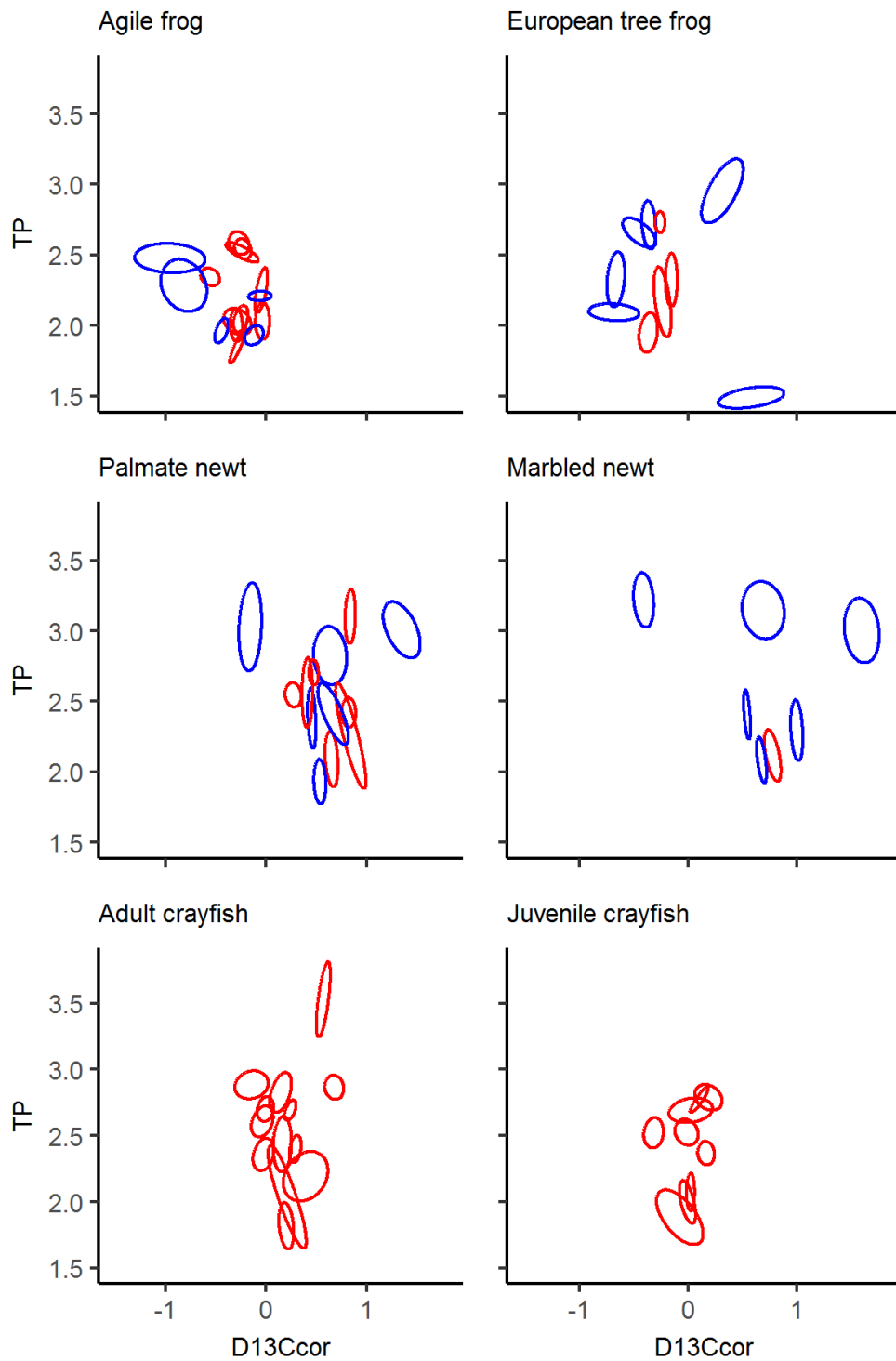


Figure 1. Representation of the standard ellipses corrected for small samples sizes (SEAc) of each population of target species. Uninhabited ponds are represented in blue, and invaded ponds in red.

The SEAc of target species varied by a factor of 10 within each species depending on ponds, and overall, the range of SEAc was comparable for all target amphibians (Table 2). The SEAc was generally smaller in the agile frog as compared to the European tree frog and the two newts, and smaller in the juvenile crayfish as compared to the adult crayfish (Figure 1). The SEAc of tadpoles was significantly correlated to six variables, among which crayfish abundance in ponds (mean  $\pm$  SE:  $-0.69 \pm 0.23$ ,  $p = 0.003$ ) and marbled newt abundances ( $1.25 \pm 0.42$ ,  $p = 0.003$ ) were the best ranked models ( $\Delta AICc < 2$ , Table S6, Figure 2). The SEAc of newts was influenced by pond restoration ( $0.79 \pm 0.33$ , Figure 2) but it was not better than the null model at explaining the data (Table S7).

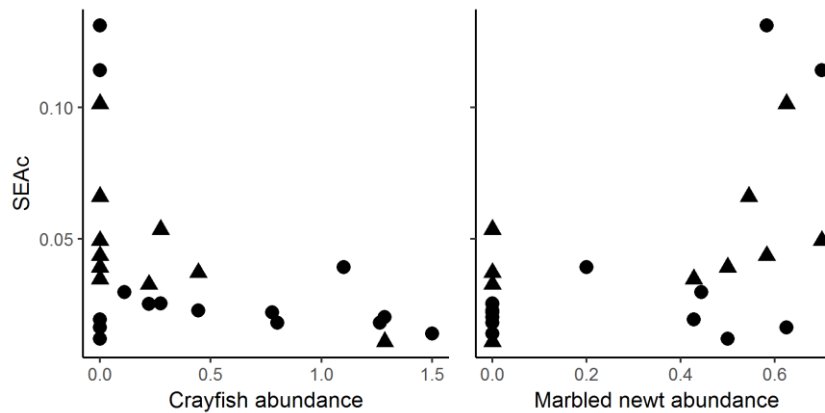


Figure 2 Variation in the isotopic position and niche size in the two tadpole species against the two significant predictors: crayfish abundance (a) and marbled newt abundance (b). Population values are represented by circles for the agile frog and triangles for the European tree frog.

The standard ellipses of the palmate newt and the marbled newt were very close but overlapped in only two of seven ponds where they co-occurred. The overlap represented 15% and 10% of the niche of the palmate newt and 13% and 8% of that of the marbled newt, in M48 and M22 respectively. The isotopic niche of tadpoles overlapped in three of the nine ponds where they co-occurred, and the shared niche area represented 7%, 8% and 50% of the niche of the agile frog and 23%, 20% and 31% of the niche of the European tree frog in ponds M17, M48 and M91, respectively. Isotopic niches of tadpoles and newts were generally very distant (Figure S1, Figure 1). The isotopic niche of juvenile and adult crayfish overlapped in three of nine ponds, and the overlap represented 2.4%, 46% and 52% of the niche of adult

crayfish and 2%, 54% and 65% of the niche of juvenile crayfish, in ponds M91, M89 and M949, respectively. Finally, the isotopic niche of crayfish and amphibians never overlapped whatever the ponds.

Although the isotopic niche of amphibians and crayfish had a comparable range of niche areas, variations in NR and CR were more contrasted between species (Table 2). NR was the lowest in the agile frog and juvenile crayfish, intermediate and the least variable in the marbled newt, and the most variable and reaching the highest values in the palmate newt and adult crayfish. No factor was retained to explain NR in newts nor tadpoles. Besides, CR was overall lower in newts than in crayfish and even more than in tadpoles. In tadpoles, CR was correlated with marbled newt density in ponds ( $1.07 \pm 0.13$ ,  $p = 0.001$ ), crayfish presence ( $-0.62 \pm 0.19$ ,  $p = 0.001$ ) and restoration ( $0.60 \pm 0.20$ ,  $p = 0.003$ , Figure 3). In newts, restoration explained CR ( $0.78 \pm 0.23$ ) as much as the null model.

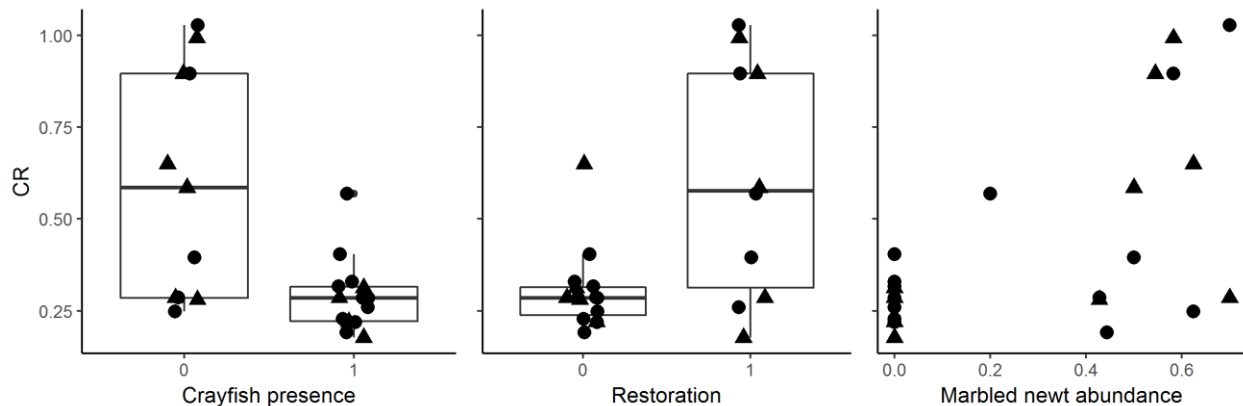


Figure 3 Variation in the CR of the tadpole species against the three significantly related descriptors of pond communities or habitats. Population values are represented by circles for the agile frog and triangles for the European tree frog.

## Discussion

We explored the issue of the effects of invasive species on native communities through local interactions by questioning whether the invasive red swamp crayfish induce changes in the trophic niches of four native amphibian species in 20 ponds, using SIA. The main

prediction was that the crayfish significantly interacted with all amphibians, due to its documented central position in food webs, so that the niche of the crayfish and amphibians should significantly overlap. We also expected changes in the resource use of amphibians to allow the coexistence with the crayfish, but also in response to the effects of other competitors, predators, and resource availability. While the first prediction was surprisingly not confirmed, crayfish and two other predictors would however influence the size of the trophic niche of amphibians as expected in the second prediction.

The isotopic niche position of amphibians and crayfish varied across ponds, although the position of each species relative to the entire food webs was generally comparable. Indeed, ponds were contrasted in their environmental conditions and in the relative abundances of species, so that species show a trophic flexibility under these different contexts that lead them to vary in their niche position. Although precautions were taken to sample ponds representative of all environmental conditions, sampling was constrained by the sample sizes needed to conduct SIA (see Introduction). As a result, some correlations appeared between the characteristics of the 20 ponds, with especially an inverse relationship between (1) pond restoration, aquatic vegetation cover, marbled newts, Dytiscidae, Odonata and (2) presence and abundance of crayfish and water turbidity. In particular, there was an almost complete dichotomy between non-restored ponds with crayfish and restored ponds with marbled newts. It is important to note that this dichotomy was not representative of species distribution in the study area, nor was the relationship between crayfish presence and aquatic vegetation cover or pond turbidity (Bélouard *et al.* 2018b; Tréguier *et al.* 2018).

The red swamp crayfish was very central in pond communities, suggesting an opportunistic omnivorous diet, concordant with the literature (Correia 2003; Alcorlo *et al.* 2004). Additionally, a significant ontogenetic change in the diet of crayfish occurred in all instances and confirms to some extent findings from other studies (Correia 2002; Alcorlo *et al.* 2004). The differentiation between juvenile and adult crayfish, added to the central position of the crayfish, increased even more the possibilities of interactions with other organisms in ponds which was our first prediction. We argue that this differentiation in the diet of juvenile and adult crayfish is poorly studied when investigating their ecological impacts, although the two stages could differently affect food webs.

The low trophic position of tadpoles in most cases was concordant with the expectation that they essentially feed on particles of algae, macrophytes and detritus (Altig *et al.* 2007; Whiles & Altig 2010; Arribas *et al.* 2015). However, in particular ponds, all European tree frogs took much higher trophic positions. This could be the mark of the maternal signature in their tissues, but studies have shown on several species that tadpoles attained an aquatic signature by the developmental stage at which European tree frog were sampled in this study (Trakimas *et al.* 2011; Caut *et al.* 2013). An alternative hypothesis could be that European tree frogs displayed an opportunistic feeding behaviour and more particularly were scavengers or cannibalistic in some ponds, a diet which is known in some tadpole species (Altig *et al.* 2007). The mean  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  of tadpoles was among the lowest in the communities with that of zooplankton for example, and its variation among ponds could simply reflect the variation in the width of the global community.

Newts had intermediate to high TP values, which indicates they feed on animal resources and this is concordant with the literature (Fasola & Canova 1992; Covaciu-Marcov 2010). Newts often had the highest mean  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$  within food webs, an atypical position for a generalist predator whose isotopic signature is supposed to be situated right above those of its sources. Resources enriched in  $\delta^{13}\text{C}$  were missing in the studied food webs to understand this position, and because the sampling of food resources in ponds was quasi-exhaustive, it is probable that these resources were terrestrial. Two hypotheses could explain that newts had a terrestrial signature in the trophic networks. First, although sampling was conducted as late as possible in the breeding season, it is possible that we sampled newts present in ponds for an insufficiently long period to exhibit an aquatic isotopic signature. Indeed, Guérin *et al.* (2017) showed that marbled newt individuals actually stay in ponds for only 3 weeks in males and less than 6 weeks in females, a period that could be too short to induce a pure aquatic signature in their tissues. This work was however conducted on a single pond with a very high density of newts. Second, breeding newts could also feed on terrestrial insects falling into the water (Fasola & Canova 1992; Covaciu-Marcov 2010) which could result in mixed aquatic-terrestrials isotopic values. We suggest this second hypothesis to be more plausible, because the abundance of newts was very low in the studied ponds.

The hypothesis that the two tadpole species and the two newt species had similar diet can be validated because their niches were very close. Importantly, in all ponds, the overlap of the core isotopic niche between the two newts or between the two tadpole species was often very limited or absent. This is probably a form of trophic partitioning to limit the intensity of the competition between ecologically similar species, which can be facilitated by body size in newts, as marbled newts can benefit from largest preys as compared to palmate newts (Covaciu-Marcov 2010). Similarly, juvenile crayfish may avoid competition with adult crayfish by a different resource use. Finally, the niche of crayfish did not overlap with any amphibian, suggesting that crayfish and amphibians differ in their resource use in ponds. Strong exploitative competition was therefore unlikely, but we cannot exclude that tadpoles constitute a part of the crayfish diet. Overall, despite the variety of trophic interactions that were suspected between crayfish and amphibians, most of them were very limited. This is surprising in small ecosystems such as ponds, where the structure of resources was expected to be lower than in lakes for example.

Highlighting relationships can be difficult in natural ecosystems, and although we accounted for the variation in the signature of the resources, we did not find strong relationships between amphibian niche position and individual candidate variables. A strong effect of crayfish on niche position can therefore be excluded, and the variation in niche position could be related to a resource having particularly variable isotope signatures among ponds, such as macrophytes. These parameters are better controlled in experimental studies, and indeed, Arribas *et al.* (2015) found that the niche position (especially the  $\delta^{13}\text{C}$ ) of tadpoles of several anuran species was strongly linked to the presence of a competitor or a predator, and especially the red swamp crayfish. However, variations in the core niche area of tadpoles were highly correlated to crayfish and marbled newt abundance, a result mainly due to variations in the CR encompassed by tadpoles, which was itself correlated to crayfish presence, marbled newt abundance and pond restoration. The collinearity between these three factors makes difficult to disentangle if one of these factors actually caused the observed variations in the isotopic niche width. Crayfish could be correlated with a decrease the niche area and the range of resources in tadpoles in different ways. First, the predation of crayfish could induce anti-predatory strategies in tadpoles that modify their diet (see the

behavioral response of tadpoles to crayfish in Nunes et al. 2013; Polo-Cavia & Gomez-Mestre 2014). Second, crayfish could strongly modify resource availability through its activity, notably by decreasing macrophyte density and increasing water turbidity (see also Carreira et al. 2014), both being deleterious to tadpoles that feed on suspended particles and macrophytes (Altig et al. 2007; Whiles & Altig 2010). Here, this habitat modifications could be responsible for the reduction of the range of resources used by tadpoles, and hence, a reduction in niche width. Instead, in mesocosms, this effect rather caused a shift in the resource used (Arribas et al. 2015). Interestingly, an effect of crayfish presence, but not abundances, was highlighted on CR, although crayfish sometimes occurred at very low abundances. This could be due to the impact of higher past populations that durably modified the ecosystems (Twardochleb et al. 2013; Strayer et al. 2017), as the abundances of crayfish significantly decreased in the last five years (data not shown, see the boom-and-bust phenomenon in Strayer et al. 2017). Finally, non-causal relationships could also be invoked, with crayfish being present mostly in ponds where amphibians are absent for unrelated environmental causes, such as pond aging. Besides, marbled newts were expected to be predators of tadpoles (ACEMAV 2003; Covaciu-Marcov 2010), and as such, decrease the isotopic niche of tadpoles because the display of anti-predator strategies (e.g. decreased activity levels, frequent use of refuges) diminishes the range of resources available. Therefore, the positive correlation observed between marbled newt and tadpoles was probably not a causal relationship. Rather, these species could be linked by their co-occurrence in highly suitable ponds (i.e. ponds vegetated with high levels of resources), among which restored ponds, that provide opportunities for amphibians to display high SEAc, and particularly, high CR values. The effect of pond restoration was somewhat unexpected because restoration occurred five years before sampling, and ponds went through the ecological succession ever since, with macrophytes development and deposition of organic material. It is however intended to allow more aquatic vegetation to occur, which could actually allow amphibians to use a wider range of resources. Given the effect of the marbled newt was opposed to our predictions, we put forward crayfish and pond restoration as the potential determinants of the niche size of tadpoles in ponds, an effect that probably occur through a variation in resource availability.

These findings show that although the red swamp crayfish was central in pond food webs, its isotopic niche did not overlap with those of amphibians, and their trophic interactions were probably weak, even in small ecosystems and in the variable environmental conditions encountered. While amphibian isotopic niches were very variable in position and size, only the niche size of tadpoles was associated to crayfish and pond restoration, whose effects were indiscernable across the samples. Further research is needed to disentangle their relative effects. With the novelty of studying the isotopic niches of amphibians in natural communities, our findings are in line with other studies that found that the major effects of the red swamp crayfish on amphibian communities in ponds were linked to the modification of its environment (Arribas et al. 2015; Souty-Grosset et al. 2016). The local coexistence between amphibians and the red swamp crayfish therefore seem to be possible based on the high differentiation of their niches in these very small ecosystems, and confirms previous results based on their widespread co-occurrence in the study area (Bélouard et al. 2018b). The framework of the coexistence theory should be more frequently applied to the case of biological invasions, especially in natural habitats, in order to examine the possibilities of stable coexistence between invasive and native species.

### **Acknowledgements**

This study was funded by the Agence Française pour la Biodiversité (research program supervised by JMP) and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (PhD Grant to NB). We thank the Parc Natural Régional de Brière, notably J.P. Damien, for supporting our research activities on amphibian ecology, and Adrien Oger and Dominique Huteau for their help in samples processing. The authors declare that they have no conflict of interest.

## Supplementary material

Table S1. Summary of the candidate variables tested in linear mixed models for each group of amphibian species (tadpoles of anuran species and adult newts), and the type of trophic interaction expected to occur to the two taxa. No newt population occurred in fish ponds.

Taxons	Tadpoles			Newts	
	Predation	Competition	Resource availability	Competition	Resource availability
Crayfish (CPUE)	X	X		X	
Crayfish (presence)	X	X		X	
<i>Dytiscidae</i> adults	X				X
<i>Dytiscidae</i> larvae	X				X
<i>Odonata</i>	X				X
<i>Notonecta</i>	X				X
Fish	X				
Palmate newt (adults)	X				
Marbled newt (adults)	X				
Agile frog		X			X
European tree frog		X			X
<i>Corixidae</i>		X			X
<i>Diptera</i>					X
<i>Gammarus</i>					X
Pond area			X		X
Pond canopy cover			X		X
Aquatic vegetation cover			X		X
Restoration (Yes/No)			X		X

Table S2. Abundances and densities of aquatic macroinvertebrates and amphibians in ponds. Densities for all taxa (individuals/m<sup>2</sup>), except crayfish, fish and marbled newt (trapping catch-per-unit-effort, individual/trap/12h).

Ponds	Agile frog	European tree frog	Palmate newt	Marbled newt (CPUE)	Crayfish (CPUE)	Dytiscidae adults	Dytiscidae larvae	Notonectidae	Corixidae	Odonata	Diptera	Gammarus	Physa	Fish (CPUE)
M17	12	30	8	0.58	0	1	3	7	41	201	0	0	0	0
M22	2	2	0	0.55	0	2	0	4	33	39	0	0	3	0
M48	0	0	7	0.7	0	3	0	4	0	130	4	0	26	0
M56	48	95	3	0.63	0	0	3	0	18	215	0	0	74	0
M66	10	106	1	0	0.22	2	3	28	37	10	35	19	196	0
M70	3	0	2	0.44	0.11	0	5	0	8	53	8	0	0	0
M72	0	0	0	0	1.26	0	9	6	17	0	356	0	0	0
M82	0	0	0	0	1.07	0	0	23	0	4	3	2	8	0
M87	13	23	5	0.43	0	0	14	4	170	54	5	9	1	0
M88	0	0	0	0	1.78	0	0	0	0	6	22	2	0	0.56
M89	22	0	0	0	1.29	0	8	0	29	129	51	0	23	0.14
M91	8	11	3	0	0.44	0	5	8	110	53	4	21	182	0
M94	1	0	4	0.5	0	3	0	36	32	91	22	0	5	0
M111	8	5	0	0	1.5	1	9	1	36	0	103	4	2	0
M112	4	3	1	0.2	1.1	0	0	10	6	105	5	41	7	0
M888	0	0	0	0	0.78	0	0	0	0	5	21	0	0	0
M949	2	12	1	0	0.28	1	0	2	13	22	0	0	0	0
M1016	2	0	0	0	0.8	0	0	30	1	0	35	92	1	0
MJ	1	0	0	0	1.77	0	0	0	1	0	18	5	3	0
MK	0	0	0	0	3.55	0	0	0	0	0	0	0	0	0.46

Table S3. Habitat characteristics and physico-chemical parameters among the 20 ponds

Pond	Invaded	Area (m <sup>2</sup> )	Canopy cover (%)	Aquatic vegetation cover (%)	Restoration	Dissolved O <sub>2</sub> (mg/L)	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm)	pH	Turbidity (NTU)
<b>M17</b>	No	143	0	90	Yes	2.36	17.2	358.0	6.84	9.33
<b>M22</b>	No	536	100	100	Yes	1.40	16.7	287.7	6.10	14.01
<b>M48</b>	No	166	0	90	Yes	6.53	20.8	266.7	6.77	4.5
<b>M56</b>	No	69	10	95	No	6.06	17.8	244.3	7.37	15.37
<b>M66</b>	Yes	144	30	0	No	3.83	16.4	168.0	6.47	5.11
<b>M70</b>	Yes	525	75	0	No	6.88	16.1	293.0	7.24	8.77
<b>M72</b>	Yes	460	70	0	No	1.78	18.0	159.3	6.71	15.59
<b>M82</b>	Yes	34	90	0	No	0.73	15.0	555.7	6.61	88.45
<b>M87</b>	No	105	70	80	No	1.53	16.9	317.3	7.07	10.18
<b>M88</b>	Yes	146	25	0	No	7.28	18.4	331.0	6.73	23.62
<b>M89</b>	Yes	90	25	5	Yes	4.75	19.1	311.3	6.95	17.6
<b>M91</b>	Yes	138	50	70	No	8.45	16.0	218.3	7.04	4.72
<b>M94</b>	No	300	15	10	Yes	5.70	19.6	164.6	6.82	9.62
<b>M111</b>	Yes	34	30	1	No	1.07	17.1	474.7	6.95	45.45
<b>M112</b>	Yes	179	30	80	Yes	4.58	16.8	228.3	6.80	11.93
<b>M888</b>	Yes	780	50	0	No	5.19	18.0	189.3	6.20	9.83
<b>M949</b>	Yes	208	20	100	No	4.49	16.8	142.6	6.08	3.45
<b>M1016</b>	Yes	1079	10	0	No	4.32	18.7	167.7	6.66	28.38
<b>MJ</b>	Yes	278	75	0	No	0.99	16.9	231.7	6.65	16.41
<b>MK</b>	Yes	249	100	0	No	1.73	18.4	2920.0	7.06	27.15

Table S4. Pairwise correlations between candidate predictors including densities of aquatic taxa and habitat characteristics of ponds.

	E. tree frog	Marbled newt	Palmate newt	Crayfish	Dytiscidae	Larval dytiscids	Notonectidae	Corixidae	Odonata	Gammarus	Diptera	Physa	Canopy cover	Area	Aquatic vegetation cover	Dissolved O <sub>2</sub>	Temperature	Conductivity	pH	Turbidity	
Agile frog	0.73	0.26	0.42	-0.36	0.01	0.61	0.03	0.77	0.54	0.21	-0.05	0.38	-0.28	-0.49	0.52	0.06	-0.24	0.06	0.47	-0.18	
E. tree frog		0.24	0.5	-0.45	0.26	0.37	0.19	0.71	0.39	0.22	-0.33	0.28	-0.24	-0.47	0.71	-0.06	-0.44	-0.05	0.14	-0.39	
Marbled newt			0.71	-0.79	0.42	-0.01	0.08	0.22	0.76	-0.37	-0.46	0.16	-0.33	-0	0.61	0.23	0.12	0.1	0.34	-0.4	
Palmate newt				-0.77	0.38	0.21	0.28	0.45	0.77	-0.09	-0.38	0.24	-0.49	-0.23	0.61	0.4	-0.03	-0.1	0.42	-0.73	
Crayfish					-0.52	-0.09	-0.33	-0.46	-0.68	0.26	0.4	-0.24	0.34	-0.02	-0.68	-0.22	0.1	0.22	-0.08	0.65	
Dytiscidae						-0.17	0.37	0.3	0.26	-0.26	-0.1	0.21	-0.36	0.03	0.55	-0.04	0.12	-0.17	-0.3	-0.45	
Larval dytiscids							-0.09	0.68	0.14	0.05	0.34	0.06	0.05	-0.44	0.05	-0.02	-0.16	0.14	0.56	-0.04	
Notonectidae								0.31	0.05	0.43	0.09	0.34	-0.21	0.02	0.18	-0.12	-0.15	-0.36	-0.25	-0.16	
Corixidae									0.35	0.15	0.04	0.26	-0.1	-0.34	0.52	-0.08	-0.3	-0.08	0.29	-0.32	
Odonata										-0.27	-0.38	0.38	-0.52	-0.32	0.7	0.5	0.08	0.03	0.4	-0.54	
Gammarus											0.28	0.33	0.05	-0.17	-0.15	-0.14	-0.34	-0.07	-0.04	0.2	
Diptera												0	-0.07	0.1	-0.55	0.03	0.3	-0.26	-0.07	0.29	
Physa													-0.16	-0.47	0.35	0.12	-0.16	-0.1	0.09	-0.12	
Canopy cover														0.17	-0.39	-0.47	-0.52	0.27	-0.08	0.29	
Area															-0.26	0.1	0.2	-0.51	-0.4	-0.15	
Aquatic vegetation cover																0.11	-0.14	-0.14	0.02	-0.56	
Dissolved O <sub>2</sub>																	0.25	-0.29	0.3	-0.5	
Temperature																		-0.06	0.13	0.18	
Conductivity																			0.43	0.47	
pH																					0.05

Table S5. Mean isotope position and niche metrics for each population of target species.

Species	Pond invasion	Pond	Mean TP	Mean $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$	TA	SEAc	NR	CR		
Agile frog	Not invaded	17	2.285	-0.818	0.349	0.123	0.642	0.896		
		48	2.478	-0.958	0.283	0.108	0.347	1.028		
		56	1.965	-0.443	0.044	0.015	0.238	0.249		
		87	1.931	-0.120	0.046	0.018	0.220	0.286		
		94	2.210	-0.062	0.033	0.011	0.126	0.395		
	Invaded	70	2.034	-0.036	0.051	0.026	0.412	0.191		
		66	2.252	-0.048	0.081	0.024	0.751	0.227		
		949	2.585	-0.269	0.058	0.024	0.223	0.317		
		91	2.005	-0.296	0.055	0.022	0.435	0.218		
		888	2.520	-0.238	0.038	0.020	0.192	0.405		
		1016	2.345	-0.557	0.043	0.017	0.223	0.330		
		112	2.029	-0.285	0.111	0.037	0.319	0.569		
		72	2.543	-0.231	0.039	0.017	0.235	0.285		
		89	2.049	-0.252	0.047	0.019	0.311	0.259		
		111	1.860	-0.282	0.035	0.013	0.430	0.284		
		European tree frog	Not invaded	17	2.095	-0.684	0.121	0.041	0.214	0.993
				22	1.490	0.580	0.147	0.062	0.239	0.896
				48	2.329	-0.665	0.111	0.046	0.621	0.285
56	2.955			0.316	0.299	0.096	0.945	0.650		
87	2.715			-0.360	0.090	0.033	0.557	0.280		
94	2.659			-0.450	0.086	0.036	0.309	0.585		
Invaded	66		2.326	-0.153	0.084	0.031	0.633	0.220		
	949		2.168	-0.234	0.150	0.051	0.982	0.285		
	91		1.951	-0.366	0.078	0.034	0.459	0.312		
	89		2.734	-0.259	0.033	0.010	0.245	0.177		
	Palmate newt		Not invaded	17	3.008	1.352	0.274	0.095	0.728	0.666
				22	2.825	0.639	0.243	0.098	0.759	0.528
48		3.030		-0.156	0.303	0.104	1.170	0.454		
56		2.381		0.456	0.063	0.025	0.775	0.133		
87		1.932		0.537	0.091	0.028	0.639	0.188		
94		2.413		0.668	0.155	0.064	0.843	0.663		
Invaded		70	2.093	0.654	0.105	0.037	0.641	0.260		
		66	2.706	0.475	0.029	0.012	0.257	0.155		
		949	2.564	0.412	0.097	0.039	0.736	0.218		
		91	2.423	0.824	0.077	0.022	0.369	0.320		
		82	2.257	0.844	0.076	0.066	0.817	0.329		
		112	2.547	0.271	0.033	0.019	0.228	0.265		
		111	3.104	0.840	0.077	0.030	0.602	0.190		

Table S5. Continued

Species	Pond invasion	Pond	Mean TP	Mean $\delta^{13}\text{C}_{\text{cor}}$	TA	SEAc	NR	CR
Marbled newt	Not invaded	17	3.003	1.600	0.330	0.109	0.631	0.330
		22	3.147	0.693	0.325	0.117	0.659	0.325
		48	3.220	-0.408	0.125	0.052	0.281	0.125
		56	2.408	0.544	0.019	0.013	0.086	0.019
		87	2.086	0.678	0.037	0.018	0.128	0.037
		94	2.296	1.003	0.062	0.032	0.166	0.062
		70	2.119	0.779	0.102	0.035	0.276	0.102
Adult crayfish	Invaded	66	2.694	0.242	0.033	0.011	0.240	0.033
		72	2.865	0.679	0.076	0.026	0.309	0.076
		82	2.437	0.164	0.200	0.057	0.385	0.200
		88	1.820	0.203	0.093	0.037	0.265	0.093
		89	2.608	-0.038	0.113	0.036	0.361	0.113
		91	2.401	0.292	0.051	0.017	0.209	0.051
		111	3.530	0.571	0.079	0.041	0.223	0.079
		112	2.884	-0.145	0.158	0.052	0.639	0.158
		888	2.701	-0.007	0.060	0.023	0.273	0.060
		949	2.826	0.146	0.133	0.044	0.379	0.133
		1016	2.358	-0.025	0.103	0.037	0.342	0.103
		J	2.194	0.394	0.303	0.120	0.785	0.303
		K	2.038	0.211	0.406	0.107	0.887	0.406
Juvenile crayfish	Invaded	88	2.076	0.023	0.030	0.015	0.139	0.030
		89	2.527	-0.015	0.096	0.031	0.414	0.096
		91	2.369	0.166	0.052	0.020	0.215	0.052
		111	2.773	0.102	0.035	0.011	0.341	0.035
		112	2.691	0.024	0.121	0.052	0.612	0.121
		949	2.789	0.187	0.074	0.034	0.413	0.074
		1016	2.522	-0.318	0.051	0.029	0.233	0.051
		J	2.000	-0.005	0.090	0.030	0.302	0.090
		K	1.885	-0.076	0.281	0.106	0.781	0.281

Chapitre 4, partie 2 : Niches trophiques et coexistence

Table S6. Selection of linear mixed models on isotope position or niche metrics for tadpoles, including only variables having significant estimates.

	(Intercept)	Palmate newt	Marbled newt	Crayfish abundance	Crayfish presence	Aquatic vegetation cover	Odonata	Area	Restoration	Larval dytiscids	df	AICc	delta	wAICc
<b>Mean <math>\delta^{13}C_{cor}</math></b>	-0.27										3	22	0	0.66
	-0.10	-0.07									4	23.3	1.33	0.34
<b>SEAc</b>														
	-3.80		1.25								4	54.21	0.00	0.53
	-3.18			-0.69							4	55.53	1.33	0.27
	-3.13				-0.59						4	57.95	3.74	0.08
	-3.81	0.13									4	59.00	4.80	0.05
	-3.46										3	59.25	5.04	0.04
	-3.99					0.01					4	60.15	5.95	0.03
	-3.75						<0.01				4	69.03	14.82	0.00
<b>NR</b>														
	-1.03										3	48.8	0	1.00
	-0.81							<0.01			4	61.4	12.61	0.00
<b>CR</b>														
	-1.30		1.07								4	41.75	0.00	0.42
	-0.65			-0.62							4	42.38	0.63	0.31
	-1.24							0.60			4	43.10	1.35	0.21
	-1.00										3	46.28	4.53	0.04
	-1.24	0.09									4	49.46	7.70	0.01
	-0.80									-0.05	4	50.58	8.83	0.01
	-1.29					0.01					4	54.85	13.09	0.00
	-1.25						<0.01				4	56.55	14.79	0.00

Table S7. Selection of linear mixed models on isotope position or niche metrics for newts, including only variables having significant estimates.

	(Intercept)	Dytiscidae	Restoration	Gammarus	European tree frog	Crayfish presence	Agile frog	df	AICc	delta	weight
<b>Mean TP</b>											
	2.58							3	15.00	0.00	0.72
	2.40	0.18						4	16.90	1.91	0.28
<b>SEAc</b>											
	-3.51		0.79					4	42.65	0.00	0.63
	-3.20							3	43.95	1.29	0.33
	-2.97			-0.03				4	49.12	6.46	0.03
	-2.96				-0.01			4	51.47	8.81	0.01
<b>NR</b>											
	-1.30							3	42.07	0.00	0.82
	-1.20					-0.22		4	45.24	3.17	0.17
	-1.25			-0.01				4	51.65	9.57	0.01
<b>CR</b>											
	-1.63		0.78					4	38.15	0.00	0.87
	-1.30							3	42.07	3.93	0.12
	-1.08						-0.02	4	47.71	9.56	0.01
	-1.10				-0.01			4	49.83	11.69	0.00

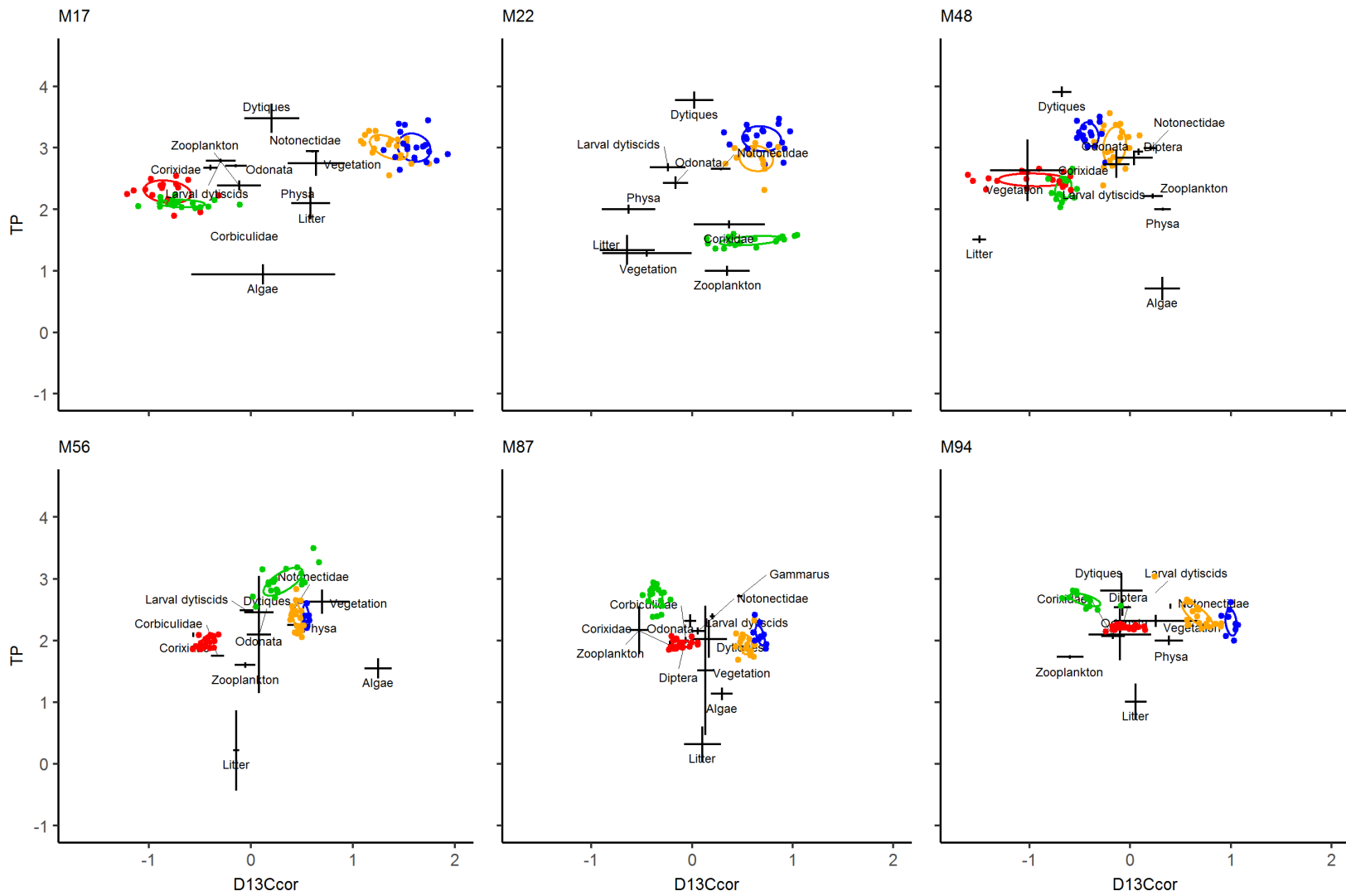


Figure S1. Plots of the mean  $\pm$  SE isotope signatures of each pond community, and standard ellipses (SEAc) for each target species. Agile frogs, red points, European tree frog, green points, palmate newts, orange points, marbled newts, blue points.

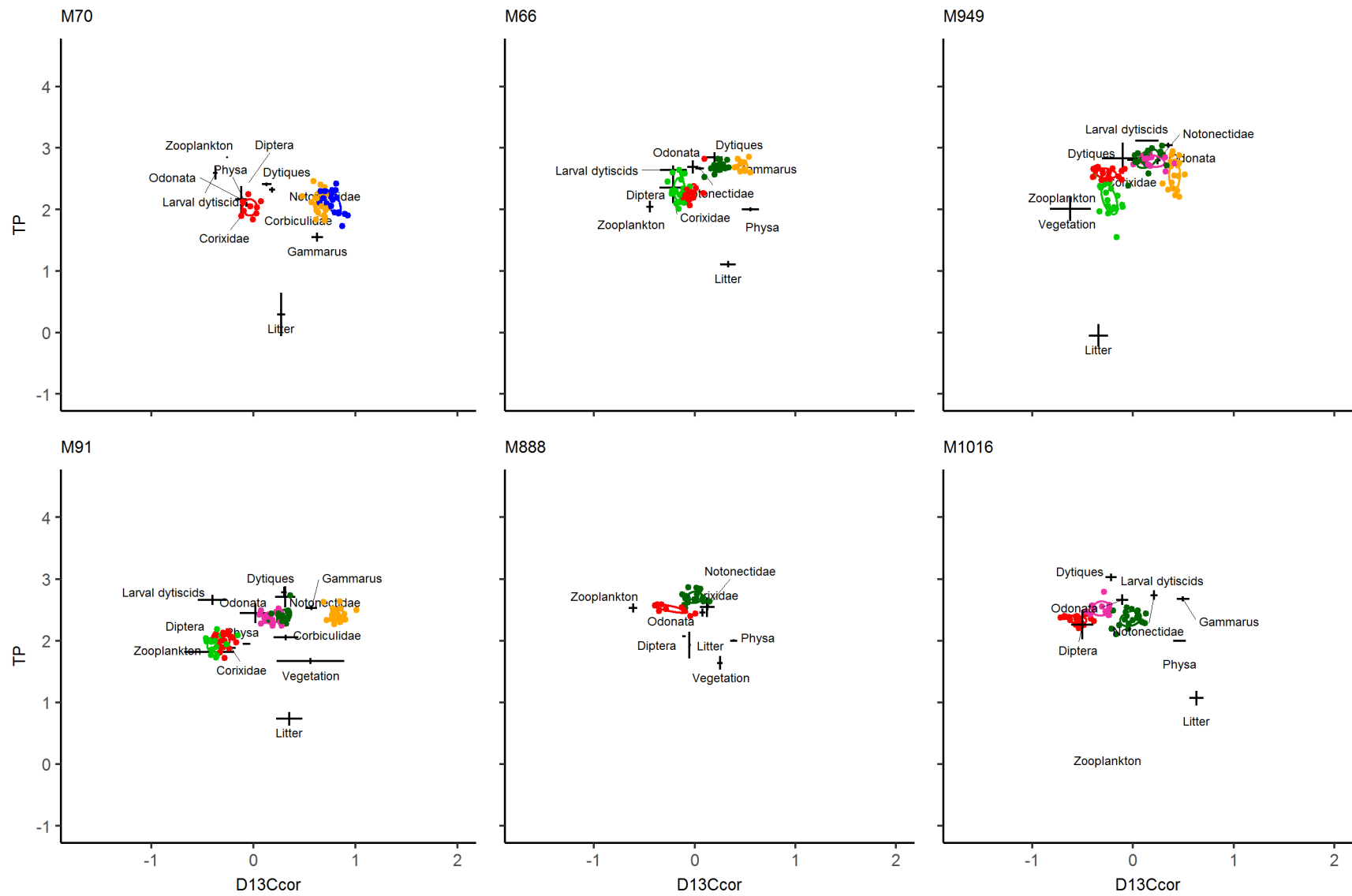


Figure S1. Continued

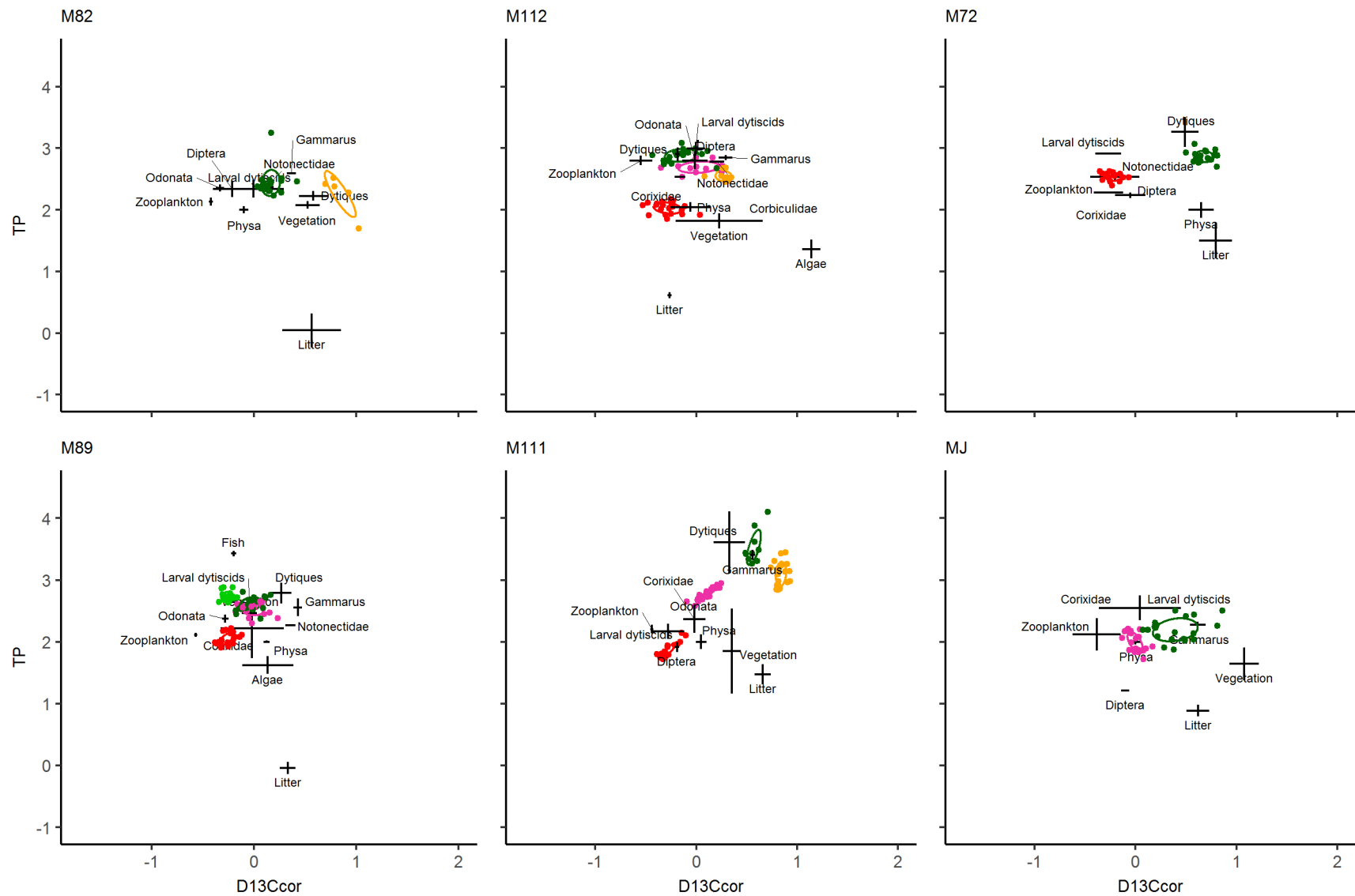


Figure S1. Continued

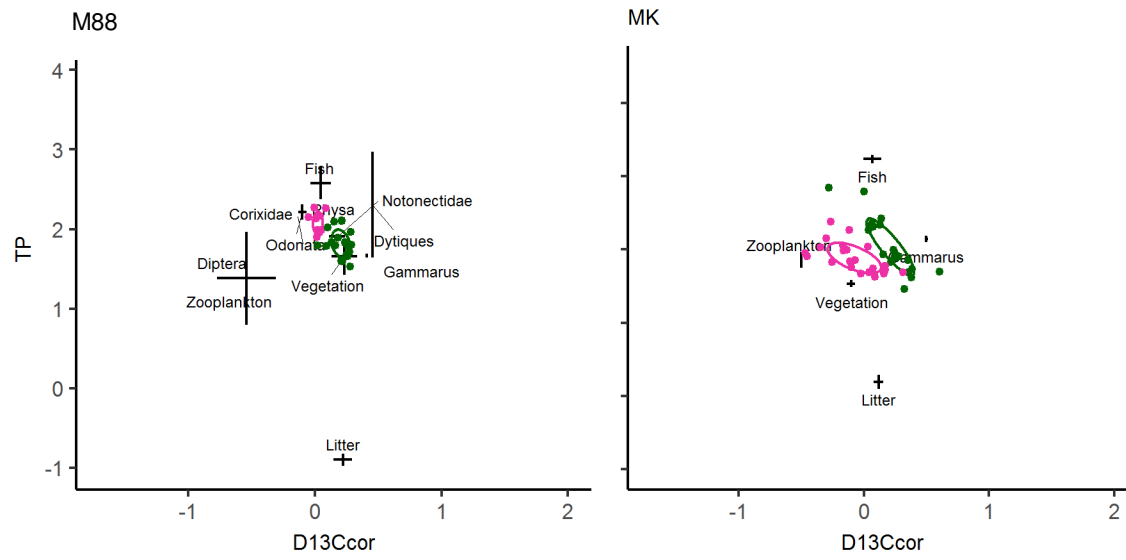


Figure S1. Continued



## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



Les invasions biologiques, le phénomène par lequel des espèces se propagent hors de la région dont elles sont natives (Richardson *et al.* 2000; Blackburn *et al.* 2011), sont parfois responsables de changements drastiques dans les régions envahies (Vilà *et al.* 2011; Simberloff *et al.* 2013; Mollot *et al.* 2017), et sont actuellement considérées comme l'une des principales menaces pesant sur la biodiversité (Vitousek *et al.* 1997). La compréhension des mécanismes par lesquels les espèces invasives agissent sur les communautés natives est toutefois seulement partielle, et ces effets gagnent à être étudiés au travers de concepts issus de l'écologie générale, tel que le concept de métacommunautés (Leibold *et al.* 2004; Holyoak *et al.* 2005; Howeth *et al.* 2010; Leibold & Chase 2017). Ce travail de thèse avait ainsi pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes de coexistence des espèces invasives et natives dans les métacommunautés, sous l'angle de deux partis pris qui constituent l'originalité de la thèse dans son ensemble : caractériser de façon indépendante les processus donnant lieu à l'assemblage des communautés, et cela, en considérant uniquement des approches observationnelles sur des réseaux de communautés naturelles.

L'étude a porté sur une espèce invasive emblématique, l'écrevisse de Louisiane (Savini *et al.* 2010; Souty-Grosset *et al.* 2016; Nentwig *et al.* 2018), et ses effets sur la communauté des amphibiens, des espèces en déclin à l'échelle mondiale notamment sous l'effet des invasions biologiques (Kats & Ferrer 2003; Beebee & Griffiths 2005; Bucciarelli *et al.* 2014) et à forte valeur conservatoire dans les réseaux de mares, les sites d'études retenus ici. L'étude des patrons de coexistence des espèces (abondances de larves et distribution) à la lumière des filtres environnementaux que sont l'habitat, le paysage et les autres taxons présents dans les communautés, a permis de montrer que l'écrevisse de Louisiane a une influence variable sur les amphibiens, qui s'ajoute à des effets bien présents des autres filtres environnementaux (e.g. couvert de canopée et végétation aquatique). L'étude des flux de gènes par la génétique des populations, utilisée à la fois chez l'espèce invasive et chez trois espèces de la communauté des amphibiens, a démontré que la connectivité entre populations est variable selon les espèces et facilitée par des éléments différents du paysage, induisant des conséquences contrastées pour la distribution et la coexistence de ces espèces. Les analyses de réseaux trophiques par les isotopes stables, par l'éclairage qu'elles apportent sur les niches trophiques, ont mis en évidence que l'écrevisse de Louisiane a des interactions

trophiques limitées avec les amphibiens, mais que ses effets indirects pourraient modifier l'étendue des ressources utilisées par les têtards, possiblement via la modification des habitats et notamment la diminution du recouvrement de la végétation aquatique.

Quelques éléments de discussion sont proposés ci-après dans le but de lier les conclusions tirées de chacun de ces travaux, d'en faire émerger des éléments globaux sur la coexistence des espèces natives avec une espèce invasive dans les métacommunautés que sont les réseaux de mares, et de proposer des perspectives pour la poursuite de la compréhension de la coexistence des espèces. Enfin, ces résultats peuvent constituer une aide à la décision pour la gestion des espèces étudiées ou de la connectivité des habitats, et quelques implications de ces travaux de thèse du point de vue de la conservation de la biodiversité seront discutées dans un dernier point.

## **1    Persistance de l'écrevisse de Louisiane dans les mares**

L'écrevisse de Louisiane est capable de se déplacer à la fois en milieu aquatique et en milieu terrestre, et cette caractéristique est supposée avoir largement facilité son expansion dans les régions où elle a été introduite (Loureiro *et al.* 2015; Souty-Grosset *et al.* 2016). De plus, les traits des espèces peuvent évoluer de façon rapide aux fronts d'invasion et faciliter l'expansion des espèces invasives (Excoffier *et al.* 2009; Phillips *et al.* 2010b; Lawson Handley *et al.* 2011). On s'attendait ainsi à ce que l'écrevisse de Louisiane colonise aisément de denses réseaux de mares comme ceux du PNR de Brière où elle a été introduite il y a environ 30 ans. Pourtant, sa distribution est restreinte à la moitié des 160 mares d'une fenêtre paysagère inférieure à 15 km<sup>2</sup>, alors que cette écrevisse a atteint de fortes abondances dans les marais attenants (Tréguier *et al.* 2018). Les travaux de génétique du paysage conduits dans le chapitre 2 ont montré que le processus de colonisation des mares a été fortement contraint par les discontinuités aquatiques, et que les flux de gènes entre populations sont désormais rares, sinon absents. Ces résultats étaient inattendus en regard de la faible structure génétique de cette espèce dans d'autres régions et à des échelles spatiales bien supérieures (> 100 km, Yue *et al.* 2010; Huang *et al.* 2017). Ce contraste s'explique au moins partiellement par le caractère continu des milieux aquatiques le plus souvent étudiés (marais, rizières,

rivières), et par la prévalence des introductions secondaires dans ces régions (e.g. Li *et al.* 2012; Huang *et al.* 2017). La seule étude ayant traité des flux de gènes de cette espèce dans un système peu connecté a en effet montré un effet de cette fragmentation sur la différenciation des populations, bien que cela n'aie pas été explicitement testé (Paulson & Martin 2014). De plus, l'évolution des fréquences alléliques au cours du temps n'avait jamais été questionnée chez les populations d'écrevisse de Louisiane, alors que les aspects temporels sont d'une grande importance dans le processus d'invasion biologique, ainsi que pour la compréhension de l'évolution des populations invasives et de leurs impacts (Strayer *et al.* 2006, 2017; Simberloff *et al.* 2013). Ici, les effets de l'isolement se sont cumulés aux effets de fondation dans les populations les plus éloignées des sources, laissant place à une dérive génétique si intense que ces populations présentent également des tailles efficaces extrêmement faibles et une perte de diversité génétique détectable en l'espace de deux générations seulement. Une chute des abondances a également été observée de façon généralisée durant les 6 dernières années de suivi de populations sur la zone d'étude.

Partant du constat de l'absence de flux de gènes en cas de discontinuité aquatique, et considérant que depuis le début de l'étude de la distribution de l'écrevisse dans ces réseaux (2011-2017), aucune nouvelle colonisation n'a été observée sur le front d'invasion, on pourrait penser que le processus d'invasion s'est interrompu et que l'écrevisse de Louisiane se maintiendra désormais dans les milieux à de faibles densités (Figure 29, scénario A). Toutefois, les espèces invasives présentent fréquemment une dynamique de « *boom-and-bust* », c'est-à-dire qu'après une phase de latence où la population introduite se maintient à de faibles niveaux d'abondance, a lieu une explosion démographique, suivie d'un crash des abondances (Figure 29, Strayer *et al.* 2017). C'est durant la période d'explosion démographique que sont attendus les plus grands épisodes de dispersion, en lien avec l'accroissement de la compétition intra-spécifique dans les milieux (Bowler & Benton 2005; Travis *et al.* 2009). Ce phénomène de boom-and-bust peut se reproduire à plusieurs reprises et s'apparenterait ainsi à des oscillations démographiques, malgré le caractère irrégulier des pics d'abondances (Strayer *et al.* 2017). On ne peut pas exclure l'hypothèse que cette dynamique existe dans les populations d'écrevisses, et en particulier dans les marais, où les populations sont toujours importantes en taille et en diversité génétique (Figure 29, scénario

B). Aussi, de nouvelles vagues de dispersion du marais vers les mares pourraient avoir lieu à l'avenir, et occasionner un sauvetage démographique et génétique (« *genetic rescue* ») en diminuant les effets de la dérive (voir l'hypothèse de sauvetage génétique proposée par Ingvarsson 2001; e.g. Madsen *et al.* 1999; Kanarek *et al.* 2015; Hufbauer *et al.* 2015). Un tel scénario permettrait aux populations secourues, au moins ponctuellement, de se disperser à leur tour, poursuivant ainsi le processus d'invasion des réseaux de mares.

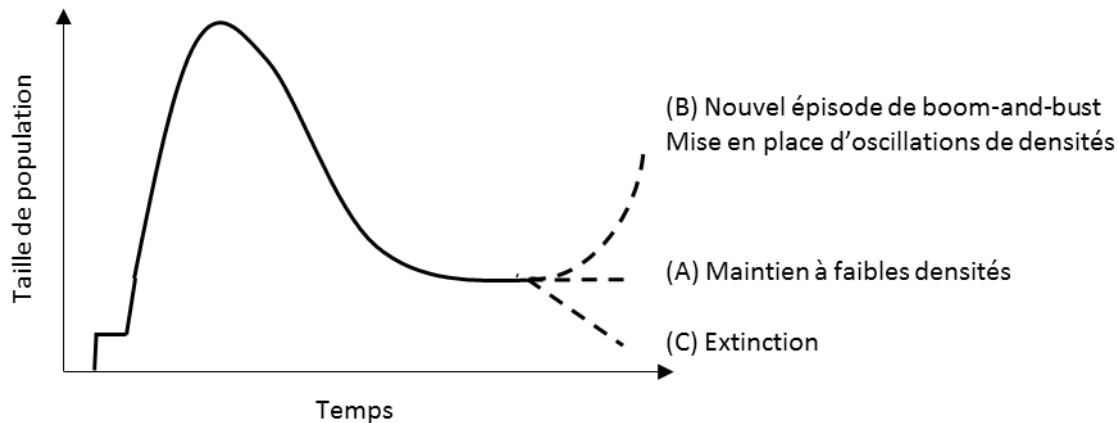


Figure 29. Evolution des abondances d'écrevisses dans les populations invasives. Introduction puis phénomène de boom-and-bust en trait plein, suivi en traitillés des scénarios possibles pour le futur.

Dans le cas contraire, la perte de diversité génétique liée à l'isolement des populations (aucun apport de migrants) pourrait conduire à une perte de fitness des individus et emprisonner la population dans une dynamique descendante appelée vortex d'extinction (Fagan & Holmes 2006), où les effets des facteurs génétiques et démographiques se renforcent et diminuent la taille de population, jusqu'à ce que les effets stochastiques (démographiques et environnementaux) ne la conduisent à l'extinction (Figure 29, scénario C ; Figure 30). Compte-tenu de la diminution des abondances d'écrevisses constatée, la dynamique du vortex d'extinction pourrait déjà être engagée dans les mares isolées. Pour déterminer si une telle dynamique a lieu, il s'agirait de tester si la fitness des individus est effectivement réduite dans les populations isolées comparé aux populations sources, par exemple par des programmes de suivi de dynamique locale par CMR individuelle *in situ* permettant d'évaluer notamment la survie interannuelle, et par des mesures de succès reproducteur (Coulson *et al.* 2006; Gimenez & Gaillard 2018). Le cas de l'écrevisse de

Louisiane en Brière serait alors le premier cas de vortex d'extinction démontré et expliqué chez une espèce invasive, même si l'extinction de populations invasives a parfois été constatée, en particulier sur des îles (Simberloff & Gibbons 2004).

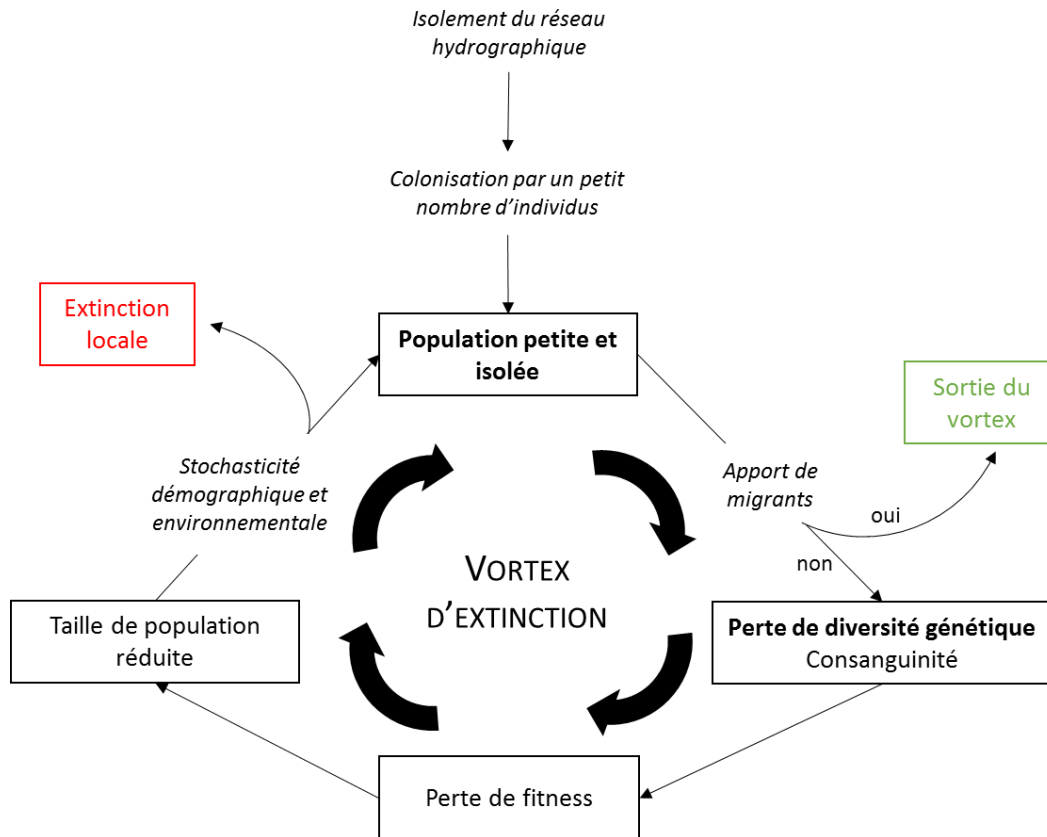


Figure 30. Concept de vortex d'extinction appliqué à la colonisation d'habitats fragmentés. Les éléments du vortex confirmés par les analyses génétiques sont indiqués en gras. Les éléments ayant une influence sur la mise en place et l'issue du vortex sont indiqués en italique. L'apport massif et/ou régulier de migrants peut faire sortir la population du vortex (modifié d'après Fagan & Holmes 2006).

Ces résultats ouvrent des perspectives en écologie évolutive et générale. D'une part, les raisons écologiques de l'isolement des populations restent partiellement incomprises. Le phénomène d'invasion biologique peut être bloqué par l'absence d'émigration des populations établies (barrière de dispersion, Figure 31, hypothèse 1), car les déterminants de la dispersion sont multiples (densité-dépendance, disponibilité des ressources, interactions interspécifiques... voir Bowler & Benton 2005), ou par la difficulté d'établissement de nouvelles populations (barrière de survie et de reproduction, Figure 31,

hypothèse 2) dans des petits milieux aux ressources potentiellement limitantes ou bien dont les communautés sont moins facilement colonisables (concept d'invasibilité ou de résistance biotique, e.g. Von Holle & Simberloff 2005; Richardson & Pyšek 2006; Melbourne *et al.* 2007; Howeth 2017), ou encore un cumul des deux. La probabilité de ces scénarios pourrait être évaluée par des expériences complémentaires en mésocosmes visant à comparer la dispersion dans des conditions de ressources limitantes ou non, à densité de population variable, ou encore chez des écrevisses issues de populations petites et isolées et de populations grandes et continues. Les liens entre la catégorie de population (isolée ou continue) et les traits morphologiques pourraient aussi être recherchés pour expliquer une différence dans les comportements de dispersion (concept de syndrome de dispersion, Clobert *et al.* 2009).

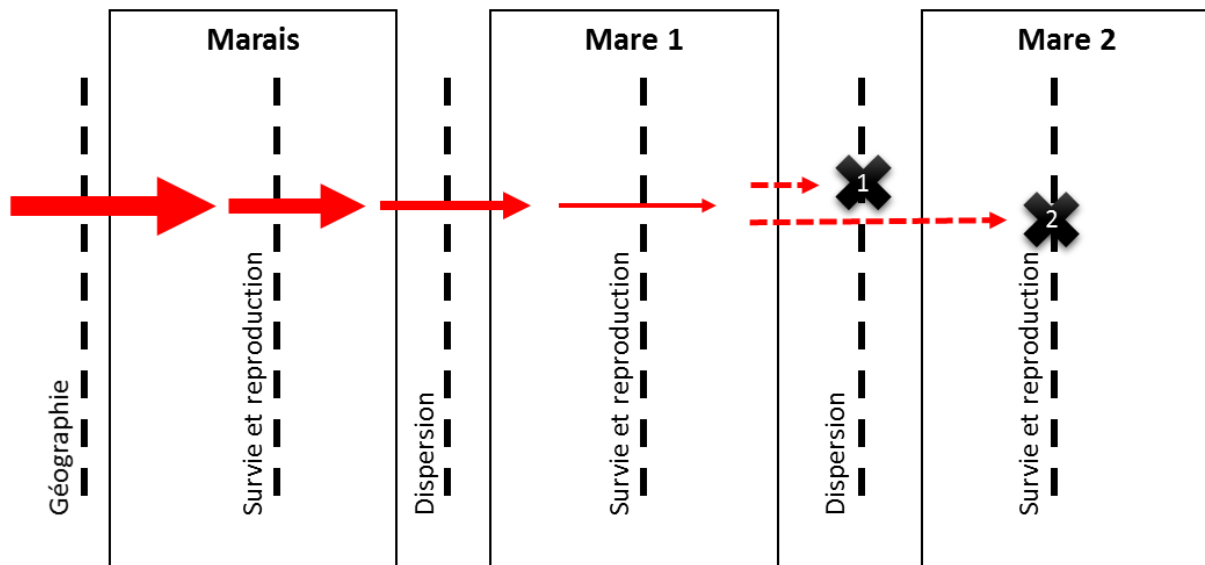


Figure 31. Processus d'invasion de l'écrevisse de Louisiane dans le cas de la Brière, sous l'hypothèse d'une colonisation des mares en série. Les barrières entre les étapes d'invasion sont symbolisées en traitillés verticaux noirs, et l'épaisseur des flèches est proportionnelle au nombre d'individus qui les franchissent. Les flèches en traitillés rouges symbolisent deux hypothèses de barrières pouvant expliquer la limitation de l'expansion de l'écrevisse de Louisiane sur la zone d'étude.

## **2 Relativité de l'isolement des patches au sein d'une métacommunauté**

Les amphibiens ont souvent été considérés comme de faibles disperseurs, présentant un fort taux de fidélité à leur mare de reproduction dont ils s'éloignent peu durant leurs migrations (Jehle & Arntzen 2000; Marty *et al.* 2005; Smith & Green 2005; Trochet *et al.* 2017). Toutefois, un nombre croissant de travaux tend à démontrer que le paysage influence fortement la distribution des amphibiens (e.g. Joly *et al.* 2001; Ficetola *et al.* 2009; Denoël *et al.* 2013), ce qui suggère que la connectivité du paysage joue un rôle dans les mouvements d'individus entre populations d'amphibiens. Ces mouvements entre populations peuvent être importants, même dans le cas de potentielles barrières (Semlitsch 2008; Prunier *et al.* 2014; Isselin-Nondedeu *et al.* 2017). Les trois espèces d'amphibiens étudiées ont montré des patrons de structure génétique contrastés, avec une importante connectivité des populations à l'échelle d'étude chez la rainette verte et le triton palmé, et plus faible et influencée par la longueur de haies chez le triton marbré (chapitre 3). Il avait aussi été identifié que la densité du réseau bocager autour de la mare favorisait la présence de cette espèce dans les analyses de distribution (chapitre 1).

Les travaux quantifiant simultanément la dispersion de plusieurs espèces sur un même territoire sont de plus en plus fréquents (e.g. Elliott 2003; Hoehn *et al.* 2007; Blanchet *et al.* 2010; Delaney *et al.* 2010), mais ce travail de thèse semble être le premier incluant à la fois des espèces natives et invasives. Ainsi, au sein d'un même réseau de mares à une petite échelle spatiale, quatre espèces, toutes capables de se disperser en milieu terrestre, dont trois issues d'un même taxon (les amphibiens), ont montré une connectivité bien différente entre les sous-unités des métacommunautés. De plus, la connectivité relative des populations des différentes espèces ne correspond pas au patron qui était attendu, puisque c'est finalement l'espèce invasive qui montre la plus forte structure génétique comparées aux amphibiens. Ces résultats mettent en évidence qu'il est nécessaire d'enrichir les modèles de métacommunautés avec des estimateurs de dispersion ainsi que des estimateurs de connectivité du paysage propres à chaque espèce, de façon à prendre en compte la diversité des stratégies de dispersion au sein d'une même métacommunauté. Ces différences de

dispersion ont en effet d'importantes conséquences pour la co-occurrence et la coexistence entre espèces natives et invasives à l'échelle d'une métacommunauté.

Ainsi, si l'écrevisse a un impact négatif sur les amphibiens dans les mares, comme le suggère la littérature (e.g. Cruz *et al.* 2006b; Witte *et al.* 2008; Ficetola *et al.* 2011), alors les mares inatteignables par l'écrevisse constituent, *a minima*, de potentiels refuges pour les espèces natives, et éventuellement peuvent même abriter de larges populations susceptibles d'alimenter en migrants des populations-puits (envahies), ce qui assurerait la coexistence entre les espèces natives et l'espèce invasive à l'échelle du paysage, avec néanmoins des conséquences à long terme variables pour la totalité de la métapopulation (voir les travaux de Mouquet & Loreau 2003). Des analyses complémentaires sont nécessaires pour étudier les flux de gènes de façon unidirectionnelle (i.e. tenir compte du fait qu'ils puissent être asymétriques) et pouvoir préciser le fonctionnement de la métacommunauté (voir par exemple la méthode utilisée dans Kennington *et al.* 2003).

Enfin, le contexte paysager dans le PNR de Brière est probablement particulièrement favorable aux amphibiens, avec une forte densité d'habitats aquatiques (pour la reproduction) et boisés (pour les phases de vie terrestres et la dispersion) et une faible pression anthropique. Cela peut expliquer la forte connectivité des populations d'amphibiens et favoriser leur persistance. A cet égard, il est possible que dans d'autres contextes, où les effets des invasions biologiques s'additionnent à ceux d'autres pressions anthropiques telles que la fragmentation du paysage, la persistance des espèces natives soit plus limitée (Fahrig 2003; Hoffmeister *et al.* 2005; Cushman 2006).

### **3 Intensité des interactions locales et persistance des espèces**

Les espèces invasives de milieu de réseau trophique, comme l'écrevisse de Louisiane, sont susceptibles de profondément modifier les réseaux trophiques dans lesquels elles s'insèrent. Elles établissent des liens avec plusieurs niveaux trophiques, pouvant ainsi toucher à la fois les amphibiens de bas niveau trophique, comme les têtards, ou de plus haut niveau trophique, comme les tritons adultes. Parmi la large gamme de conditions environnementales des mares étudiées, la niche isotopique de chaque espèce d'amphibien était bien différenciée et les

interactions trophiques entre l'écrevisse et les amphibiens étaient probablement très limitées (chapitre 4). Du point de vue de la théorie contemporaine de la coexistence des espèces (Chesson 2000; HilleRisLambers *et al.* 2012), l'absence de recouvrement entre les niches trophiques des amphibiens natifs et l'écrevisse invasive pourrait assurer leur coexistence. Ces résultats sont cohérents avec le fait qu'il n'y a pas de lien récurrent entre les abondances de larves d'amphibiens et l'abondance de l'écrevisse dans la zone d'étude, ni de dichotomie systématique entre la distribution de l'écrevisse et celle des amphibiens (chapitre 1).

En revanche, l'écrevisse pourrait indirectement diminuer la taille des niches trophiques des têtards, en diminuant l'étendue des ressources disponibles. L'analyse des réseaux trophiques de mares par les isotopes stables apporte ainsi un éclairage intéressant sur la nature des interactions entre des espèces natives et invasives réellement à l'œuvre parmi l'ensemble des possibles compte-tenu des traits écologiques de l'espèce invasive. Un effet de l'écrevisse de Louisiane sur la position trophique des larves d'amphibiens a déjà été obtenu dans une étude conduite en mésocosmes (Arribas *et al.* 2015). Ici, cet effet est toutefois incertain dû à la colinéarité de la présence de l'écrevisse avec l'absence du triton marbré et la restauration de mares. L'intérêt d'utiliser une approche observationnelle en milieu naturel résidait dans le fait de considérer l'effet d'une espèce invasive parmi les multiples effets des autres filtres environnementaux. Certains éléments de l'habitat (e.g. couvert de canopée et végétation aquatique) et certains taxons des mares (e.g. poissons et tritons adultes) ont en effet un rôle marqué dans la distribution ou l'abondance des espèces (chapitre 1). Cependant, la nécessité d'obtenir un nombre d'échantillons suffisant pour construire les niches isotopiques peut être problématique dans les petits écosystèmes naturels comme les mares, où les espèces sont souvent présentes à de faibles abondances. Ainsi, il est possible que les réseaux trophiques étudiés représentent des situations caricaturales où certaines espèces seulement sont abondantes, des cas moins représentatifs de la gamme réelle de variabilité des réseaux trophiques impliquant des espèces natives et invasives.

Pour compléter cette appréciation des interactions trophiques dans des communautés envahies, il sera nécessaire de tester cette fois la variation des métriques de niche trophique de l'écrevisse de Louisiane selon la densité des autres taxons ainsi que des variables

environnementales, puisque cette espèce possède une flexibilité trophique lui permettant d'utiliser une grande variété de ressources. La densité de l'écrevisse elle-même pourrait influencer sur sa taille de niche, via la compétition intraspécifique, et moduler son effet sur les communautés natives (voir le cas dans des gravières, Jackson *et al.* 2017a). Par ailleurs, un changement ontogénique de niche trophique a été mis en évidence chez l'écrevisse de Louisiane, confirmant les résultats obtenus dans quelques travaux sur ce point particulier (Correia 2002; Alcorlo *et al.* 2004; Alcorlo & Baltanás 2013). La niche des écrevisses juvéniles était systématiquement au moins partiellement différenciée de celle des adultes, bien que la nature de ce changement soit variable (i.e. ce ne sont pas toujours les juvéniles qui étaient les plus carnivores). La structure démographique des populations d'écrevisse de Louisiane pourrait influencer l'ampleur de ses impacts, un point non-documenté jusqu'ici (voir Werner & Gilliam 1984 pour l'influence des changements ontogéniques de niche sur les interactions entre espèces natives). Or, la structure démographique des populations pourrait évoluer avec l'âge de la colonisation et la densité de l'espèce, et considérer les impacts associés à différentes structures d'âge de populations permettrait de mieux apprécier les effets des espèces invasives dans un cadre temporel (un défaut de connaissance en la matière relevé dans Strayer *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2017b).

Enfin, la détermination de la contribution de chaque ressource dans le régime alimentaire d'un consommateur est possible via des modèles de mélange lorsque le nombre de ressources possibles est de  $n+1$  pour  $n$  isotopes considérés (Phillips 2001; Layman *et al.* 2012). Or, le nombre de ressources potentielles excède largement ce rapport chez l'écrevisse de Louisiane dans les mares, et les multiples ressources potentielles possèdent par ailleurs des signatures isotopiques relativement proches. Il est donc difficile de discriminer précisément la proportion de chaque taxon consommé par l'écrevisse dans les mares. D'autres méthodes, telles que l'analyse de contenus stomacaux (présenté dans Nielsen *et al.* 2018), permettraient d'apporter des informations supplémentaires sur la part que les têtards représentent dans le régime alimentaire de l'écrevisse dans les mares.

#### **4 Métacommunautés : coexistence des espèces natives avec une espèce invasive**

Caractériser directement l'effet des interactions locales et de la dispersion représente une opportunité intéressante pour estimer les possibilités de coexistence des espèces (Logue *et al.* 2011; Heino *et al.* 2015), une question d'un intérêt particulier dans le cas d'invasions biologiques. L'ensemble des travaux menés dans les quatre chapitres de thèse permet d'avoir une vision globale des possibilités de coexistence des espèces natives avec une espèce invasive. En liant les patrons de dispersion, les relations trophiques, et les patrons de cooccurrence à l'échelle locale et paysagère chez quatre espèces de la communauté des mares, il apparaît clairement que l'effet relatif des interactions locales et de la dispersion varie considérablement au sein d'une même communauté. La distribution de l'écrevisse ne semble liée à aucun filtre environnemental (Tréguier *et al.* 2018) ; compte-tenu des flux de gènes observés, la distribution de l'écrevisse est donc majoritairement limitée par sa dispersion, et répond donc entièrement à des effets spatiaux. *A contrario*, la distribution des amphibiens est peu limitée par leur dispersion dans cette fenêtre d'étude, et est principalement déterminée par les filtres environnementaux, notamment le paysage, l'habitat et certains taxons présents dans les mares, même si l'intensité de ces filtres est variable selon les espèces (chapitres 1 et 3). Chez le triton palmé, la dispersion est si intense qu'elle pourrait permettre à l'espèce d'outrepasser les filtres environnementaux et de se maintenir dans des habitats possiblement suboptimaux ; chez le triton marbré, la dispersion est limitante et se cumule à des filtres environnementaux pour déterminer sa distribution ; enfin, chez la rainette verte, l'intensité de la dispersion semble intermédiaire entre ces deux espèces. Les amphibiens sont influencés par les filtres environnementaux mais de façon différente selon leurs capacités de dispersion (Figure 32). Parmi ces filtres, la présence de l'écrevisse de Louisiane n'occupe qu'une place modérée, et variable selon les espèces, contrairement à ce qui était attendu en regard de la littérature. La coexistence entre l'écrevisse de Louisiane invasive et les amphibiens paraît donc possible sur la base de ces résultats.

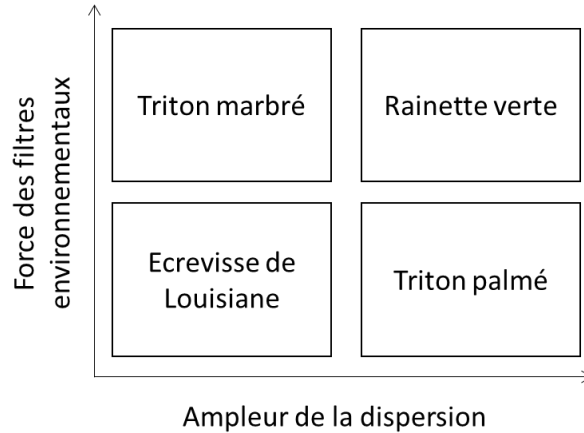


Figure 32. Synthèse des effets relatifs de la dispersion (basée sur les flux de gènes analysés par la génétique du paysage) et des filtres, incluant interactions biotiques (basées sur les analyses de réseaux trophiques par les isotopes stables) et effets environnementaux (basées sur les analyses de distribution des amphibiens), chez quatre espèces, natives et invasive, étudiées au sein d'une même métacommunauté.

Cependant, les conséquences à long terme de cette coexistence sur la fitness des amphibiens n'ont pas été abordées dans ces travaux de thèse, et seules les espèces les plus abondantes ont été étudiées. Pour aller plus loin, des travaux supplémentaires déjà initiés ont vocation à étendre l'étude de la coexistence entre espèces natives et espèce invasive à la communauté entière des amphibiens (voir Annexe). La technique de l'ADN environnemental, c'est-à-dire la détection moléculaire des espèces à partir d'échantillons d'environnement – ici, l'eau des mares – permettrait de détecter à la fois l'écrevisse et les amphibiens de façon plus performante que les techniques conventionnelles, et est particulièrement appropriée à large échelle spatiale (Tréguier *et al.* 2014; Valentini *et al.* 2016).

## 5 Implications pour la gestion

Les questions relevant de la gestion sont secondaires dans ce travail de thèse; néanmoins, d'intéressantes retombées peuvent être tirées des résultats et sont abordées ici.

Tout d'abord, il n'y a pas de réponse unique à la problématique des invasions biologiques, et chaque entité de gestion doit être traitée selon les intérêts qui lui sont attribués et qui varient selon la perception humaine. Si la volonté des gestionnaires est de conserver des

écosystèmes exempts d'espèces invasives, alors la gestion doit privilégier la prévention ou l'éradication précoce des espèces invasives (Hulme 2006; Simberloff *et al.* 2013). C'est le cas dans le PNR de Brière, où la lutte contre les espèces invasives constitue un des axes de la charte définissant les objectifs de gestion. Toute tentative de gestion doit impérativement être précédée de la prévention du recrutement dans l'écosystème en question. Cela passe d'abord par un travail de sensibilisation visant à éviter la dispersion passive des écrevisses (intentionnelle ou non) par les usagers de la zone envahie. En ce qui concerne la dispersion active, puisque les travaux de génétique des populations ont permis ici d'identifier les cours d'eau comme corridors de dispersion de l'écrevisse de Louisiane, il conviendrait de réduire la continuité hydrologique entre les mares, en les isolant physiquement des cours d'eau par exemple. Puisque la fragmentation des habitats est généralement considérée comme délétère pour la biodiversité (Fahrig 2003), cette mesure peut paraître contradictoire avec des objectifs de conservation, et notamment avec la politique de rétablissement des continuités écologiques initiée par la Trame Verte et Bleue depuis le Grenelle de l'Environnement de 2007. Toutefois, les mares étant par essence des écosystèmes isolés dans une matrice terrestre (Oertli *et al.* 2005), la plupart des taxons sont adaptés à la dispersion terrestre ou aérienne et ne devraient pas être impactés par ce changement – contrairement à l'écrevisse invasive.

En termes de gestion des populations invasives à proprement parler, si les tentatives d'éradication des écrevisses invasives par différentes méthodes (piégeage, biocontrôle, etc) parviennent effectivement à diminuer les abondances des populations, aucune n'a jusqu'ici permis d'éradiquer ces espèces (e.g. Hein *et al.* 2007; Aquiloni *et al.* 2010; Gherardi *et al.* 2011). Or, dans le cas des populations d'écrevisses de Louisiane étudiées dans cette thèse, la trajectoire suivie par certaines populations laisse à penser que des extinctions locales pourraient avoir lieu dans certains patches d'habitat, et notamment les plus isolés du réseau hydrographique (voir le concept de vortex d'extinction évoqué précédemment). Il serait toutefois possible d'augmenter la probabilité de ce phénomène (et de l'accélérer) en additionnant plusieurs méthodes d'éradication complémentaires, i.e. basées sur des processus différents, tels que l'activité des animaux avec le piégeage d'interception et la confusion de la reproduction par des phéromones sexuelles. Sur la zone d'étude, l'effet de

l'écrevisse de Louisiane sur les amphibiens et les habitats semble toutefois limité d'après les résultats de l'ensemble des travaux réalisés, couvrant une large gamme de variables et de processus écologiques. Dans cette perspective, on pourrait considérer qu'il n'est pas utile ni souhaitable de lutter contre cette l'espèce invasive dans l'unique but de conserver les populations d'amphibiens. En revanche, le principe de précaution ou d'autres raisons peuvent motiver la mise en place de mesures d'éradication, comme la destruction des berges par les terriers d'écrevisses dans le cas où les milieux envahis comportent des digues par exemple.

Le PNR de Brière est un territoire ayant vocation à être préservé des fortes pressions anthropiques, ce qui peut expliquer que, bien que les amphibiens soient en déclin à l'échelle mondiale (Baillie *et al.* 2004), et malgré l'invasion de l'écrevisse de Louisiane, les quatre espèces étudiées dans ce travail de thèse sont largement réparties sur la zone d'étude. Ailleurs, de multiples perturbations, telles que la destruction et la fragmentation des habitats, la prévalence de maladies telles que *Batrachochytridium dendrobatidis*, ou encore la pollution, peuvent se cumuler et causer la régression des amphibiens (Beebee & Griffiths 2005). Les analyses ont permis d'identifier quelques variables locales d'importance à la présence des amphibiens dans les mares, notamment un important recouvrement de végétation aquatique, un faible couvert de canopée et l'absence de poissons. Ces résultats sont déjà largement documentés (Skelly *et al.* 2002; ACEMAV 2003; Denoël *et al.* 2013; Boissinot *et al.* 2019), mais permettent d'identifier de simples actions de gestion pouvant favoriser le maintien des amphibiens dans les mares, et notamment l'importance d'un rajeunissement périodique des mares de façon à favoriser la végétation aquatique et limiter la fermeture du milieu. Sur ce territoire où la majorité des mares est située sur des terrains privés, la sensibilisation des propriétaires au maintien des mares à des stades successionnels jeunes est un levier inconditionnel au maintien de ces écosystèmes à long terme. Cela étant, il est souhaitable de maintenir de la diversité dans les différents profils de mare, de façon à favoriser la diversité de divers taxons dans des habitats différents, puisque c'est l'ensemble du réseau de mares qui fait sa richesse.

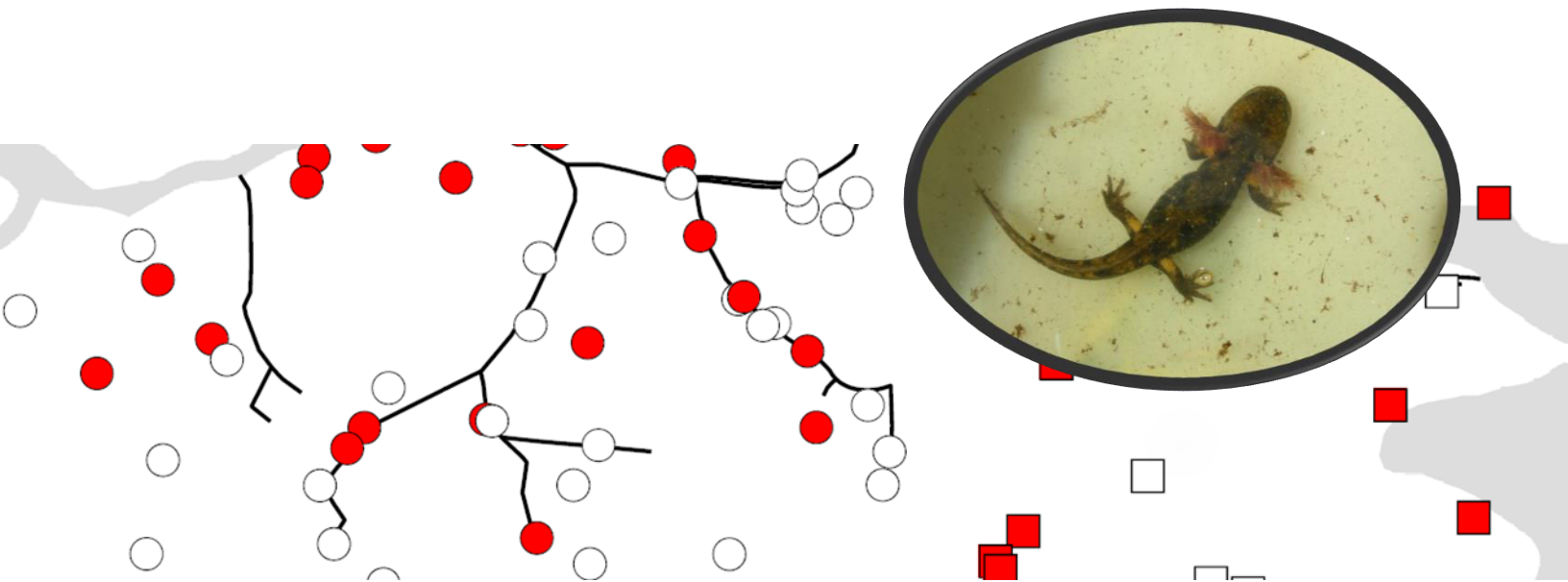
Au niveau du paysage, le réseau bocager présente une importance particulière pour la présence et la dispersion du triton marbré d'après les analyses de distribution et de

génétique des populations. Cela est, cette fois, tout à fait en accord avec la politique de la Trame Verte et Bleue de restauration des continuités écologiques. Ainsi, le maintien de petites parcelles entourées de haies doit être encouragé, et la création de haies peut être soutenue par des programmes de plantations, en favorisant des espèces végétales natives, créant différentes states de végétation, et adaptées aux caractéristiques locales.



## ANNEXE

Identification de la composition spécifique des communautés des mares par le métabarcoding d'ADN environnemental





Cette annexe contient quelques éléments du dernier volet de cette thèse, qui est en cours et qui à ce stade ne pouvait pas constituer un chapitre à part entière dans le manuscrit. Le contenu de cette annexe a donc vocation à présenter le travail effectué jusqu'ici, en explicitant de façon concise les objectifs et méthodes et en évoquant les premiers résultats obtenus.

## 1 Approche de la coexistence *via* la composition des communautés

Les travaux de cette thèse se sont concentrés sur l'analyse de la coexistence entre l'écrevisse de Louisiane et quatre espèces d'amphibiens largement distribuées sur la zone d'étude. Néanmoins, la communauté des amphibiens des mares étudiées comprend quatre autres espèces, nettement moins abondantes et détectées dans un faible nombre de mares : le pélodyte ponctué *Pelodytes punctatus*, la salamandre tachetée *Salamandra salamandra*, le crapaud commun *Bufo bufo* et le complexe des grenouilles vertes *Pelophylax spp.*, comprenant potentiellement sur la zone d'étude *P. esculentus*, *P. ridibundus* et *P. lessonae*. Les processus menant à la coexistence sont plus difficiles à tester sur ces espèces du fait de leur relative rareté ; mais c'est aussi pour cette raison que les effets de perturbations, comme les espèces invasives, pourraient être plus forts chez ces espèces. Considérer les patrons de variation de la richesse ou de la composition spécifique des amphibiens apporterait ainsi un support supplémentaire dans l'étude de la coexistence des espèces, selon le même cheminement que les travaux effectués sur les espèces les plus fréquentes (patrons de coexistence avec l'écrevisse de Louisiane, dispersion, et interaction avec les communautés locales et forces des conditions environnementales).

Par ailleurs, le suivi de l'expansion des espèces invasives nécessite de pouvoir détecter précocement la colonisation de nouveaux habitats (Hulme 2006), particulièrement dans des habitats discontinus comme les réseaux de mares. Dans le cas de l'étude de la dynamique des populations d'écrevisse de Louisiane en Brière, il y a également un intérêt à identifier si les populations se maintiennent dans les mares isolées, afin de confirmer ou infirmer l'hypothèse de vortex d'extinction dressée à partir des patrons de génétique des populations.

Ces deux objectifs majeurs nécessitent de déterminer précisément la distribution des amphibiens et de l'écrevisse de Louisiane dans les mares. Or, les espèces peu abondantes sont plus difficiles à détecter par les techniques conventionnelles d'échantillonnage reposant sur l'activité des individus (e.g. piégeage passif, points d'écoute). Cette détection imparfaite (i.e. le risque de « faux-négatifs ») peut biaiser les résultats des analyses (MacKenzie *et al.* 2004; Mazerolle *et al.* 2005). Ces méthodes requièrent également un investissement humain et logistique conséquent lors de l'étude de multiples sites, dû à la nécessité de réplication dans l'espace (e.g. multiples pièges) et dans le temps (e.g. plusieurs passages) afin d'obtenir une probabilité de détection acceptable. Des méthodes permettant de détecter les espèces de façon plus efficace, indépendamment de l'activité ou de l'abondance des espèces, sont bienvenues afin d'accéder à la composition spécifique des communautés.

## 2 Le métabarcoding d'ADN environnemental

De nouvelles techniques de détection d'espèces ont fait leur apparition depuis une dizaine d'années et se basent sur la persistance limitée de l'ADN d'espèces dans l'environnement pour identifier leur présence (Ficetola *et al.* 2008; Dejean *et al.* 2011; Thomsen *et al.* 2012). L'utilisation de telles techniques non invasives, ne nécessitant pas la capture des individus, constitue une avancée majeure pour le suivi d'espèces en milieu naturel. La technique du barcoding d'ADN environnemental (ADNe), qui permet de détecter la présence d'une espèce particulière à partir d'un échantillon d'environnement en utilisant un couple d'amorces propre à l'espèce-cible, s'est considérablement développée au cours des années 2000 et est désormais disponible chez de nombreuses espèces (e.g. chez des poissons, Foote *et al.* 2012; amphibiens et mammifères, Thomsen *et al.* 2012; écrevisses, Tréguier *et al.* 2014; serpents, Hunter *et al.* 2015; plantes, Fujiwara *et al.* 2016; ou encore virus, Hall *et al.* 2016). Plus récemment encore, le métabarcoding d'ADNe a étendu la puissance de cette approche moléculaire grâce aux techniques de séquençage nouvelle génération, permettant l'identification simultanée de multiples espèces dans un même échantillon, sans nécessité de connaissance préalable sur les espèces potentiellement présentes (Taberlet *et al.* 2012). Cette méthode consiste à amplifier l'ADN de taxons entiers grâce à des séquences d'ADN bien

conservées dans le génome, et à identifier les espèces ayant été amplifiées sur la base de séquences de reconnaissance appelées *barcodes*. Cette technique a été développée notamment chez les amphibiens et les poissons, et permet d'atteindre une probabilité de détection des espèces proche de 1 dans les milieux aquatiques comme les mares (Civade *et al.* 2016; Valentini *et al.* 2016). Ces techniques nécessitent toutefois encore des développements pour être applicables de façon généralisée (Roussel *et al.* 2015), et des précautions doivent être prises pour limiter ou identifier les faux-positifs (i.e. cas de détection d'une espèce alors qu'elle n'est pas présente, Ficetola *et al.* 2015, 2016).

Dans le cas présent, les enjeux méthodologiques étaient (1) de mettre au point un protocole permettant de détecter simultanément l'ADNe de l'écrevisse de Louisiane et celui de tous les amphibiens et (2) de vérifier l'efficacité de cette technique par rapport à une méthode conventionnelle dans ce cas d'étude. La réalisation du premier point a été grandement facilitée par le fait que la technique était déjà disponible indépendamment pour ces deux taxons : une paire d'amorces spécifiques de l'écrevisse de Louisiane (issue de Tréguier *et al.* 2014) et une paire d'amorces permettant d'amplifier tous les amphibiens (issue de Valentini *et al.* 2016), et il s'agissait de mettre au point un protocole d'amplification simultanée de ces taxons, i.e. une PCR en duplex.

### 3 Mise au point d'une PCR en duplex

Le protocole décrit dans Valentini *et al.* (2016) a été reproduit sur des extraits d'ADN de tissus des 8 espèces-cibles d'amphibiens séparément, puis sur un mélange d'ADN de toutes ces espèces. Toutes les espèces testées ont été amplifiées avec succès, et cette réussite a été validée dans un premier temps à l'aide d'électrophorèses sur gels d'agarose (Figure 33).

Il est important de noter que l'ADN de nombreuses autres espèces était également amplifié par les amorces destinées aux amphibiens, notamment des mammifères et des poissons dont l'ADN peut être trouvé dans les mares, et également l'ADN humain, malgré l'utilisation d'une amorce bloquante anti-humaine (Figure 33). Cela est probablement lié au caractère très conservé du gène 12S parmi les vertébrés et grâce auquel ont été conçues les amorces de

métabarcoding. Cela a toutefois pour conséquence de diminuer la proportion de séquences amplifiées correspondant réellement aux amphibiens dans les échantillons par rapport à la proportion de séquences non-voulues, et pourrait donc diminuer la puissance de cette technique. L'ADN d'écrevisse de Louisiane a également été amplifié avec succès par les amorces spécifiques.

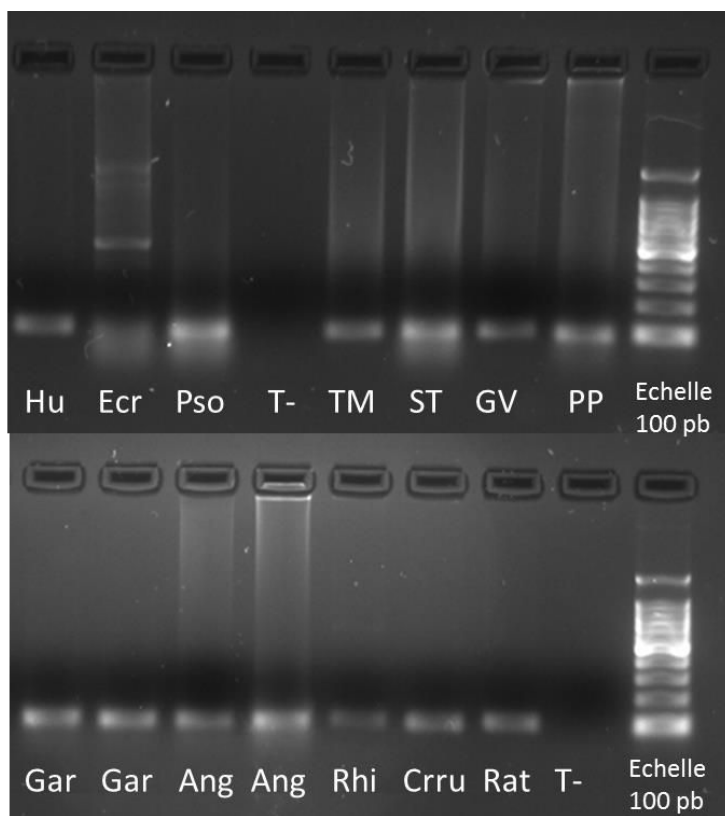


Figure 33. Profils d'amplification d'ADN de différentes espèces par les amorces d'amphibiens (Valentini *et al.* 2016) sur gel d'agarose. La taille des fragments attendus est de l'ordre de 100 paires de bases (pb). Hu = humain, Ecr = écrevisse de Louisiane, Pso = perche-soleil *Lepomis gibbosus*, T- = témoin négatif (eau pure), TM = triton marbré, ST = salamandre tachetée, GV = grenouille verte, PP = pélodyte ponctué, Gar = gardon *Rutilus rutilus*, Ang = anguille d'Europe *Anguilla anguilla*, Rhi = petit rhinolophe *Rhinolophus hipposideros*, Crru = crocidure commune *Crocidura russula*, Rat = *Rattus rattus*.

Dans un second temps, les produits d'amplification de PCR en duplex effectués sur un mélange d'ADN des huit espèces d'amphibiens et d'écrevisse de Louisiane ont été séquencés et ont permis de déterminer que toutes les espèces étaient effectivement amplifiées simultanément lors de l'association des deux amorces, à l'exception des grenouilles vertes.

En revanche, des séquences correspondant au barcode de la grenouille de Bedriaga, *P. bedriagae*, une espèce de grenouille verte présente en Turquie ont été identifiées. Il avait déjà été noté que la détermination à l'espèce était plus difficile chez les grenouilles vertes (Valentini *et al.* 2016). Pour les autres espèces, le nombre de séquences obtenues par espèce allait de 1358 à 17760, pour un total de 51226 séquences identifiées. L'utilisation d'une PCR en duplex a donc été validée.

Dans les deux témoins négatifs de PCR (échantillons d'eau pure amplifiés parmi les autres échantillons) et deux témoins négatifs de séquençage (échantillons d'eau pure séquencés), huit séquences au maximum ont été attribuées aux espèces-cibles, pour un nombre total de seulement 4222 séquences au maximum. La plus forte proportion de faux-positifs atteint 0.41% dans ces témoins.

#### 4 Stratégie d'échantillonnage des mares et niveaux de réplication

La totalité des 72 mares d'une fenêtre située dans la partie nord-ouest de la zone d'étude (Figure 34) ont été échantillonnées par un prélèvement d'eau, en 2016, dans le but d'identifier la présence d'écrevisse de Louisiane et des amphibiens. Le protocole utilisé pour les prélèvements d'eau comporte plusieurs niveaux de réplication, pour maximiser la probabilité de détection de toutes les espèces. Dans chacune des 72 mares, quatre échantillons d'eau de 500 mL ont été prélevés dans le bas de la colonne d'eau, à quatre endroits différents de la mare, de façon à tenir compte de la possible hétérogénéité de la mare. Cet échantillonnage a eu lieu en avril 2016, puis a été répété dans toutes les mares, un mois plus tard, pour obtenir deux répliquats temporels couvrant la période de présence et d'activité des différentes espèces dans les mares. Par ailleurs, chaque mare a été caractérisée par sa physico-chimie (oxygène dissous, température, conductivité, pH, turbidité) à trois points de la mare, et par son habitat (recouvrement de végétation aquatique, couvert arboré, profondeur maximale), pour étudier l'effet de ces variables sur la probabilité de détection des espèces mais aussi sur leur distribution.

Dans un sous-échantillon de 25 mares, l'échantillonnage d'eau pour l'ADNe a été couplé avec un protocole de piégeage réalisé après les prélèvements d'eau, en avril puis en mai, à raison d'une nasse grillagée et d'un piège Ortmann tous les 10 mètres de rive durant une nuit (jusqu'à un maximum de 20 pièges de chaque type). Cet échantillonnage complémentaire est utilisé pour comparer les résultats des deux techniques d'échantillonnage.



Figure 34. Emplacement des 72 mares échantillonnées pour les analyses d'ADNe sur la zone d'étude.

Les échantillons d'eau ont été filtrés au laboratoire, après une nuit de stockage en chambre froide et à l'obscurité, puis l'ADN extrait selon le protocole décrit dans Tréguier *et al.* (2014). Les détails opératoires ne sont volontairement pas mentionnés dans cette annexe afin de préserver son caractère concis. Pour chaque mare, les huit réplicats biologiques (2 dates  $\times$  4 échantillons) ont été combinés, puis ce pool a été amplifié en 12 PCR différentes selon le protocole décrit dans Valentini *et al.* (2016). Les produits de PCR ont ensuite été combinés. Plusieurs témoins négatifs ont été ajoutés à chaque étape (filtration, PCR, séquençage) de façon à détecter des faux-positifs (Ficetola *et al.* 2016). Des témoins positifs ont également été ajoutés : mélange d'ADN de toutes les espèces, et ADN de sole, une espèce absente de la

zone d'étude et utilisée comme mouchard pour identifier des erreurs d'attribution de séquence aux échantillons. Tous ces échantillons (72 mares + 17 témoins) ont ensuite été séquencés, puis le nombre de séquences attribuées à chaque espèce dans chaque mare a été comptabilisé.

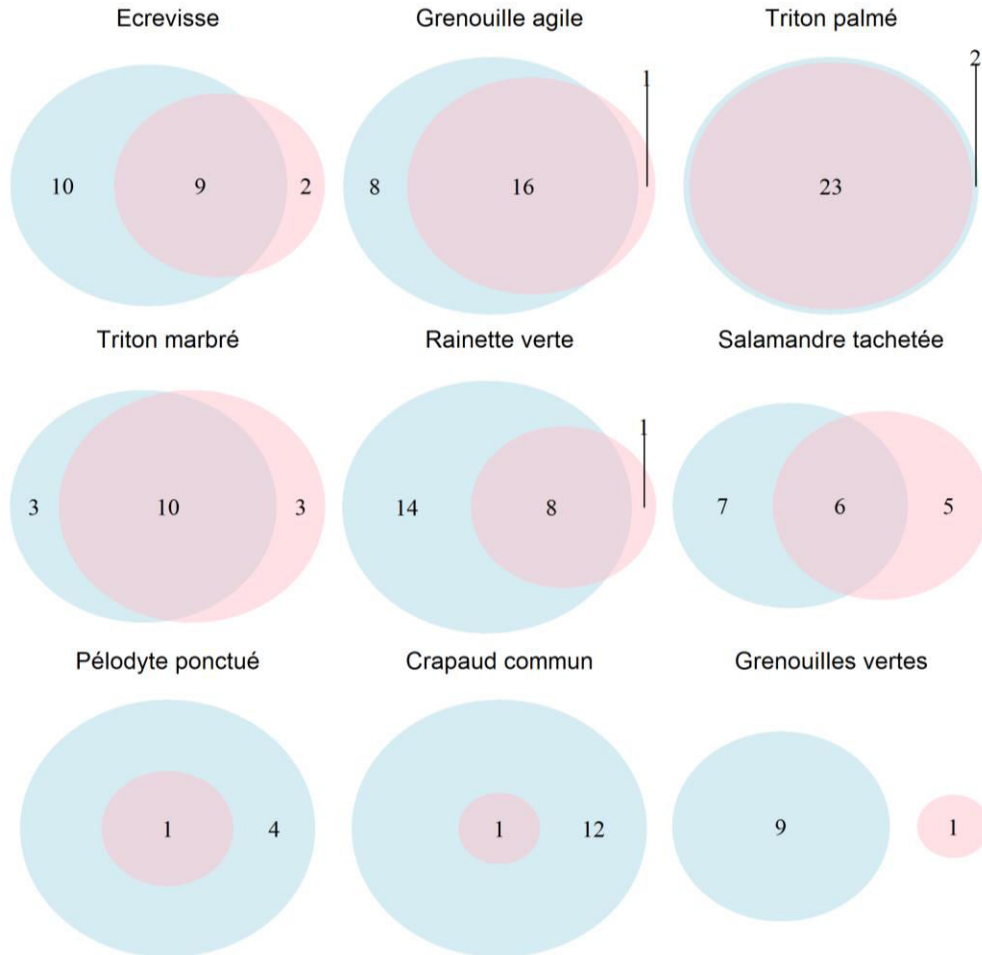


Figure 35. Diagrammes d'Euler de la détection de chaque espèce dans les 25 mares de calibration sur la base des données brutes de métabarcoding d'ADN environnemental et de piégeage. Les chiffres indiquent le nombre de mares où l'espèce est détectée par métabarcoding (en bleu), et par le piégeage (en rose). Le recouvrement des deux couleurs correspond au nombre de mares où l'espèce est détectée par les deux méthodes. La somme des chiffres est l'ensemble des mares parmi les 25 étudiées où l'espèce a été détectée par au moins une méthode.

## 5 Premières analyses de l'expérience de calibration

La comparaison des résultats bruts (i.e. sans appliquer de seuil de détection) entre la technique du métabarcoding d'ADNe et du piégeage montre des différences dans la détection des espèces par chacune des méthodes (Figure 35). Chez les espèces les plus communes, la concordance des deux méthodes est plus élevée que chez les espèces les plus rares. Quand les deux méthodes diffèrent, c'est généralement l'ADNe qui détecte les espèces là où le piégeage ne le fait pas, et parfois de manière très nette. Ce résultat peut être lié à une meilleure détection des espèces par l'ADNe ou à la présence de faux-positifs (Chambert *et al.* 2015; Ficetola *et al.* 2016), et c'est ce que la suite des analyses s'attachera à déterminer. Dans certaines études, il est proposé de « nettoyer les témoins », c'est-à-dire d'utiliser la fréquence des séquences attribuées à des espèces dans les témoins négatifs comme seuil de positivité (e.g. Valentini *et al.* 2016). Or, un témoin est supposé donner un nombre total de séquences faible comparé aux autres échantillons, auquel cas la moindre séquence attribuée conduira à un seuil de positivité très haut. L'utilisation de modèles d'occupation est une solution intéressante pour déterminer la probabilité de faux-positifs (e.g. Lahoz-Monfort *et al.* 2016), si elle peut répondre à l'objectif final, qui est de déterminer la composition des espèces dans les communautés.

Ces analyses sont en cours et permettront, *in fine*, des analyses des patrons de coexistence à l'échelle de la communauté.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- ACEMAV, coll. (2003). *Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. Parthénope. Biotope. Mèze, France.
- Adriaensen, F., Chardon, J.P., De Blust, G., Swinnen, E., Villalba, S., Gulinck, H., *et al.* (2003). The application of 'least-cost' modelling as a functional landscape model. *Landscape and Urban Planning*, 64, 233–247.
- Alcorlo, P. & Baltanás, A. (2013). The trophic ecology of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in Mediterranean aquatic ecosystems: a stable isotope study. *Limnetica*, 32, 121–138.
- Alcorlo, P., Geiger, W. & Otero, M. (2004). Feeding preferences and food selection of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in habitats differing in food item diversity. *Crustaceana*, 77, 435–453.
- Alcorlo, P., Geiger, W. & Otero, M. (2008). Reproductive biology and life cycle of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) in diverse aquatic habitats of South-Western Spain: Implications for population control. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie*, 173, 197–212.
- Alexander, M.E., Dick, J.T.A., Weyl, O.L.F., Robinson, T.B. & Richardson, D.M. (2014). Existing and emerging high impact invasive species are characterized by higher functional responses than natives. *Biology Letters*, 10, 20130946–20130946.
- Altig, R., Whiles, M.R. & Taylor, C.L. (2007). What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biology*, 52, 386–395.
- Anastácio, P.M., Ferreira, M.P., Banha, F., Capinha, C. & Rabaça, J.E. (2014). Waterbird-mediated passive dispersal is a viable process for crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquatic Ecology*, 48, 1–10.
- Angelone, S. & Holderegger, R. (2009). Population genetics suggests effectiveness of habitat connectivity measures for the European tree frog in Switzerland. *Journal of Applied Ecology*, 46, 879–887.
- Angelone, S., Kienast, F. & Holderegger, R. (2011). Where movement happens: scale-dependent landscape effects on genetic differentiation in the European tree frog. *Ecography*, 34, 714–722.
- Antao, T., Pérez-Figueroa, A. & Luikart, G. (2011). Early detection of population declines: high power of genetic monitoring using effective population size estimators. *Evolutionary Applications*, 4, 144–154.
- Aquiloni, L., Brusconi, S., Cecchinelli, E., Tricarico, E., Mazza, G., Paglianti, A., *et al.* (2010). Biological control of invasive populations of crayfish: the European eel (*Anguilla anguilla*) as a predator of *Procambarus clarkii*. *Biological Invasions*, 12, 3817–3824.
- Aquiloni, L., Ilhéu, M. & Gherardi, F. (2005). Habitat use and dispersal of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* in ephemeral water bodies of Portugal. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 38, 225–236.
- Arens, P., Bugter, R., van't Westende, W., Zollinger, R., Stronks, J., Vos, C.C., *et al.* (2006). Microsatellite variation and population structure of a recovering Tree frog (*Hyla arborea* L.) metapopulation. *Conservation Genetics*, 7, 825–835.
- Arens, P., Westende, W.V., Bugter, R., Smulders, M.J.M. & Vosman, B. (2000). Microsatellite markers for the European tree frog *Hyla arborea*. *Molecular Ecology*, 9, 1944–1946.
- Arnold, T.W. (2010). Uninformative parameters and model selection using Akaike's information criterion. *Journal of Wildlife Management*, 74, 1175–1178.

## Références bibliographiques

- Arntzen, J.W. & Wallis, G.P. (1991). Restricted gene flow in a moving hybrid zone of the newts *Triturus cristatus* and *T. marmoratus* in western France. *Evolution*, 45, 805–826.
- Arribas, R., Díaz-Paniagua, C., Caut, S. & Gomez-Mestre, I. (2015). Stable isotopes reveal trophic partitioning and trophic plasticity of a larval amphibian guild. *PLOS ONE*, 10, e0130897.
- Baguette, M., Blanchet, S., Legrand, D., Stevens, V.M. & Turlure, C. (2013). Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks: Dispersal, connectivity and networks. *Biological Reviews*, 88, 310–326.
- Baguette, M. & Van Dyck, H. (2007). Landscape connectivity and animal behavior: functional grain as a key determinant for dispersal. *Landscape Ecology*, 22, 1117–1129.
- Baillie, J., Hilton-Taylor, C. & Stuart, S.N. (2004). *2004 IUCN red list of threatened species: a global species assessment*. IUCN--The World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- Banha, F. & Anastácio, P.M. (2014). Desiccation survival capacities of two invasive crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 01.
- Barbaresi, S., Santini, G., Tricarico, E. & Gherardi, F. (2004). Ranging behaviour of the invasive crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Journal of Natural History*, 38, 2821–2832.
- Barton, K. (2009). MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.42.1. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv:1406.5823 [stat]*.
- Bearhop, S., Adams, C.E., Waldron, S., Fuller, R.A. & Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73, 1007–1012.
- Bearhop, S., Furness, R.W., Hilton, G.M., Votier, S.C. & Waldron, S. (2003). A forensic approach to understanding diet and habitat use from stable isotope analysis of (avian) claw material. *Functional Ecology*, 17, 270–275.
- Beebee, T.J.C. & Griffiths, R.A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125, 271–285.
- Beja, P. & Alcazar, R. (2003). Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biological Conservation*, 114, 317–326.
- Belfiore, N.M. & May, B. (2000). Variable microsatellite loci in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and their characterization in other crayfish taxa. *Molecular Ecology*, 9, 2231–2234.
- Bélouard, N., Petit, E.J., Huteau, D., Oger, A. & Paillisson, J.-M. (2018a). Fins are relevant non-lethal surrogates for muscle to measure stable isotopes in amphibians. Under review in *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*.
- Bélouard, N., Petit, E.J. & Paillisson, J.-M. (2018b). Variable effects of an invasive species on the reproduction and distribution of native species in pond networks. Accepted in *Freshwater Biology*.
- Ben-David, M. & Flaherty, E.A. (2012). Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *Journal of Mammalogy*, 93, 312–328.
- Benton, T.G. & Grant, A. (1999). Elasticity analysis as an important tool in evolutionary and population ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 467–471.

## Références bibliographiques

- Berset-Brändli, L., Jaquiéry, J., Broquet, T. & Perrin, N. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci for the European tree frog (*Hyla arborea*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1095–1097.
- Bertelsmeier, C. & Keller, L. (2018). Bridgehead effects and role of adaptive evolution in invasive populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 33, 527–534.
- Biek, R., Funk, W.C., Maxell, B.A. & Mills, L.S. (2002). What is missing in amphibian decline research: insights from ecological sensitivity analysis. *Conservation Biology*, 16, 728–734.
- Biggs, J., Williams, P., Whitfield, M., Nicolet, P. & Weatherby, A. (2005). 15 years of pond assessment in Britain: results and lessons learned from the work of Pond Conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 693–714.
- Blackburn, T.M., Essl, F., Evans, T., Hulme, P.E., Jeschke, J.M., Kühn, I., *et al.* (2014). A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS Biology*, 12, e1001850.
- Blackburn, T.M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., *et al.* (2011). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 333–339.
- Blanchet, S., Rey, O., Etienne, R., Lek, S. & Loot, G. (2010). Species-specific responses to landscape fragmentation: implications for management strategies. *Evolutionary Applications*, 3, 291–304.
- Boissinot, A., Besnard, A. & Lourdais, O. (2019). Amphibian diversity in farmlands: Combined influences of breeding-site and landscape attributes in western France. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 269, 51–61.
- Boissinot, A., Grillet, P., Besnard, A. & Lourdais, O. (2015). Small woods positively influence the occurrence and abundance of the common frog (*Rana temporaria*) in a traditional farming landscape. *Amphibia-Reptilia*, 36, 417–424.
- Boix, D., Biggs, J., Céréghino, R., Hull, A.P., Kalettka, T. & Oertli, B. (2012). Pond research and management in Europe: “Small is Beautiful.” *Hydrobiologia*, 689, 1–9.
- Bollache, L., Dick, J.T., Farnsworth, K.D. & Montgomery, W.I. (2008). Comparison of the functional responses of invasive and native amphipods. *Biology Letters*, 4, 166–169.
- Bonesi, L. & Macdonald, D.W. (2004). Differential habitat use promotes sustainable coexistence between the specialist otter and the generalist mink. *Oikos*, 106, 509–519.
- Bonte, D., Van Dyck, H., Bullock, J.M., Coulon, A., Delgado, M., Gibbs, M., *et al.* (2012). Costs of dispersal. *Biological Reviews*, 87, 290–312.
- Bourne, E.C., Bocedi, G., Travis, J.M.J., Pakeman, R.J., Brooker, R.W. & Schiffrers, K. (2014). Between migration load and evolutionary rescue: dispersal, adaptation and the response of spatially structured populations to environmental change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20132795–20132795.
- Bowler, D.E. & Benton, T.G. (2005). Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews*, 80, 205–225.
- Brannelly, L., McMahon, T., Hinton, M., Lenger, D. & Richards-Zawacki, C. (2015). *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural and farmed Louisiana crayfish populations: prevalence and implications. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112, 229–235.
- Brook, B., Sodhi, N. & Bradshaw, C. (2008). Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 453–460.

- Broquet, T., Berset-Braendli, L., Emaresi, G. & Fumagalli, L. (2007). Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8, 509–511.
- Broquet, T. & Petit, E.J. (2009). Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 193–216.
- Bruno, J.F., Fridley, J.D., Bromberg, K.D. & Bertness, M.D. (2005). Insights into biotic interactions from studies of species interactions. In: *Species invasions. Insights into ecology, evolution, and biogeography* (eds. Sax, D.F., Stachowicz, J. & Gaines, S.D.). Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, pp. 13–40.
- Bucciarelli, G.M., Blaustein, A.R., Garcia, T.S. & Kats, L.B. (2014). Invasion complexities: the diverse impacts of nonnative species on amphibians. *Copeia*, 2014, 611–632.
- Burel, F. & Baudry, J. (2003). *Landscape ecology: concepts, methods, and applications*. CRC Press.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R. (2003). *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer Science & Business Media.
- Calcagno, V. (2013). glmulti: Model selection and multimodel inference made easy. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=glmulti>.
- Canadian Council on Animal Care. (2004). Recommandations du CCPA spécifiques aux espèces : les amphibiens et les reptiles.
- Capinha, C., Brotons, L. & Anastácio, P. (2013). Geographical variability in propagule pressure and climatic suitability explain the European distribution of two highly invasive crayfish. *Journal of Biogeography*, 40, 548–558.
- Capinha, C., Leung, B. & Anastácio, P. (2011). Predicting worldwide invasiveness for four major problematic decapods: an evaluation of using different calibration sets. *Ecography*, 34, 448–459.
- Carreira, B.M., Dias, M.P. & Rebelo, R. (2014). How consumption and fragmentation of macrophytes by the invasive crayfish *Procambarus clarkii* shape the macrophyte communities of temporary ponds. *Hydrobiologia*, 721, 89–98.
- Carreira, B.M., Segurado, P., Orizaola, G., Gonçalves, N., Pinto, V., Laurila, A., *et al.* (2016). Warm vegetarians? Heat waves and diet shifts in tadpoles. *Ecology*, 97, 2964–2974.
- Catford, J.A., Jansson, R. & Nilsson, C. (2009). Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Diversity and Distributions*, 15, 22–40.
- Caughley, G. (1994). Directions in conservation biology. *The Journal of Animal Ecology*, 63, 215.
- Caut, S., Angulo, E. & Courchamp, F. (2009). Variation in discrimination factors ( $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$ ): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *Journal of Applied Ecology*, 46, 443–453.
- Caut, S., Angulo, E., Díaz-Paniagua, C. & Gomez-Mestre, I. (2013). Plastic changes in tadpole trophic ecology revealed by stable isotope analysis. *Oecologia*, 173, 95–105.
- Cayuela, H., Rougemont, Q., Prunier, J.G., Moore, J.-S., Clobert, J., Besnard, A., *et al.* (2018). Demographic and genetic approaches to study dispersal in wild animal populations: A methodological review. *Molecular Ecology*, 1–35.
- Chambert, T., Miller, D.A. & Nichols, J.D. (2015). Modeling false positive detections in species occurrence data under different study designs.

## Références bibliographiques

- Chase, J.M. & Bengtsson, J. (2010). Increasing spatio-temporal scales: metacommunity ecology. In: *Community ecology: processes, models, and applications* (eds. Verhoef, H.A. & Morin, P.J.). Oxford University Press, Oxford, pp. 57–80.
- Chesson, P. (2000). Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 31, 343–366.
- Chesson, P. & Kuang, J.J. (2008). The interaction between predation and competition. *Nature*, 456, 235–238.
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., *et al.* (2016). Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PloS one*, 11, e0157366.
- Clarke, B., Murray, J. & Johnson, M.S. (1984). The Extinction of Endemic Species by a Program of Biological Control. *Pacific Science*, 38, 97–103.
- Clavero, M. & Garcia-Berthou, E. (2005). Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 110–110.
- Clobert, J., Le Galliard, J.-F., Cote, J., Meylan, S. & Massot, M. (2009). Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. *Ecology Letters*, 12, 197–209.
- Colautti, R.I. & Lau, J.A. (2015). Contemporary evolution during invasion: evidence for differentiation, natural selection, and local adaptation. *Molecular Ecology*, 24, 1999–2017.
- Colautti, R.I. & MacIsaac, H.J. (2004). A neutral terminology to define ‘invasive’ species. *Diversity and Distributions*, 10, 135–141.
- Correia, A.M. (2001). Seasonal and interspecific evaluation of predation by mammals and birds on the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae) in a freshwater marsh (Portugal). *Journal of Zoology*, 255, 533–541.
- Correia, A.M. (2002). Niche breadth and trophic diversity: feeding behaviour of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal). *Acta Oecologica*, 23, 421–429.
- Correia, A.M. (2003). Food choice by the introduced crayfish *Procambarus clarkii*. *Annales Zoologici Fennici*, 40, 517–528.
- Costanzi, J.-M., Mège, P., Guérin, S., Petitcorps, Q.L., Carbonell, A., Kouassi, A.B., *et al.* (2015). Characterization of nine new microsatellite loci for the marbled newt, *Triturus marmoratus*. *Journal of Genetics*, 94, 63–64.
- Costanzi, J.-M., Mège, Pascal, M., Boissinot, A., Isselin-Nondedeu, F., Guérin, Sandra, G., Lourdais, O., *et al.* (2018). Agricultural landscapes and the Loire River influence the genetic structure of the marbled newt in Western France. *Scientific Reports*, 8.
- Cottenie, K. (2005). Integrating environmental and spatial processes in ecological community dynamics: Meta-analysis of metacommunities. *Ecology Letters*, 8, 1175–1182.
- Coulson, T., Benton, T., Lundberg, P., Dall, S.R., Kendall, B. & Gaillard, J.-M. (2006). Estimating individual contributions to population growth: evolutionary fitness in ecological time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 547–555.
- Covaciu-Marcov, S.D. (2010). Feeding of three syntopic newt species (*Triturus cristatus*, *Mesotriton alpestris* and *Lissotriton vulgaris*) from Western Romania. *North-Western Journal of Zoology*, 6, 95–108.

## Références bibliographiques

- Crump, M.L. (2010). Amphibian diversity and life history. In: *Amphibian ecology and conservation - A handbook of techniques* (ed. Dodd, C.K.J. (ed)). Oxford University Press, Oxford, pp. 3–19.
- Cruz, M., Pascoal, S., Tejado, M. & Rebelo, R. (2006a). Predation by an exotic crayfish, *Procambarus clarkii*, on natterjack toad, *Bufo calamita*, embryos: its role on the exclusion of this amphibian from its breeding ponds. *Copeia*, 2006, 274–280.
- Cruz, M., Rebelo, R. & Crespo, E. (2006b). Effects of an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, on the distribution of south-western Iberian amphibians in their breeding habitats. *Ecography*, 29, 329–338.
- Cruz, M.J. & Rebelo, R. (2005). Vulnerability of Southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. *Amphibia-Reptilia*, 26, 293–303.
- Cruz, M.J., Segurado, P., Sousa, M. & Rebelo, R. (2008). Collapse of the amphibian community of the Paul do Boquilobo Natural Reserve (central Portugal) after the arrival of the exotic American crayfish *Procambarus clarkii*. *The Herpetological Journal*, 18, 197–204.
- Cucherousset, J. & Olden, J.D. (2011). Ecological impacts of nonnative freshwater fishes. *Fisheries*, 36, 215–230.
- Cushman, S.A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128, 231–240.
- David, E., Thébault, E., Anneville, O., Duyck, P.F., Chapuis, E. & Loeuille, N. (2017). Impacts of invasive species on food webs: A review of empirical data. In: *Network of invasion: A synthesis of concepts* (eds. Bohan, D., Dumbrell, A.J. & Massol, F.). Academic Press, Oxford, pp. 1–60.
- Davis, M.A. (2009). *Invasion biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Davis, M.A., Anderson, M.D., Bock-Brownstein, L., Staudenmaier, A., Suliteanu, M., Wareham, A., *et al.* (2015). Little evidence of native and non-native species influencing one another's abundance and distribution in the herb layer of an oak woodland. *Journal of Vegetation Science*, 26, 1005–1012.
- Davis, M.A., Chew, M.K., Hobbs, R.J., Lugo, A.E., Ewel, J.J., Vermeij, G.J., *et al.* (2011). Don't judge species on their origins. *Nature*, 474, 153–154.
- De Bie, T., De Meester, L., Brendonck, L., Martens, K., Goddeeris, B., Ercken, D., *et al.* (2012). Body size and dispersal mode as key traits determining metacommunity structure of aquatic organisms. *Ecology Letters*, 15, 740–747.
- De Meester, L., Declerck, S., Stoks, R., Louette, G., Van De Meutter, F., De Bie, T., *et al.* (2005). Ponds and pools as model systems in conservation biology, ecology and evolutionary biology. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 715–725.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., *et al.* (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE*, 6, e23398.
- Delaney, K.S., Riley, S.P.D. & Fisher, R.N. (2010). A rapid, strong, and convergent genetic response to urban habitat fragmentation in four divergent and widespread vertebrates. *PLoS ONE*, 5, e12767.
- Denoël, M. & Andreone, F. (2003). Trophic habits and aquatic microhabitat use in gilled immature, paedomorphic and metamorphic Alpine newts (*Triturus alpestris apuanus*) in a pond in central Italy. *Belgian Journal of Zoology*, 133, 95–102.
- Denoël, M., Ficetola, G.F., Ćirović, R., Radović, D., Džukić, G., Kalezić, M.L., *et al.* (2009). A multi-scale approach to facultative paedomorphosis of European newts (*Salamandridae*) in

- the Montenegrin karst: distribution pattern, environmental variables, and conservation. *Biological Conservation*, 142, 509–517.
- Denoël, M. & Lehmann, A. (2006). Multi-scale effect of landscape processes and habitat quality on newt abundance: Implications for conservation. *Biological Conservation*, 130, 495–504.
- Denoël, M., Perez, A., Cornet, Y. & Ficetola, G.F. (2013). Similar local and landscape processes affect both a common and a rare newt species. *PLoS ONE*, 8, 1–11.
- Denoël, M. & Winandy, L. (2015). The importance of phenotypic diversity in conservation: Resilience of palmate newt morphotypes after fish removal in Larzac ponds (France). *Biological Conservation*, 192, 402–408.
- Díaz-Paniagua, C., Keller, C., Florencio, M., Andreu, A.C., Porthault, A., Gómez-Rodríguez, C., *et al.* (2014). Rainfall stochasticity controls the distribution of invasive crayfish and its impact on amphibian guilds in Mediterranean temporary waters. *Hydrobiologia*, 728, 89–101.
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J. & Ovenden, J.R. (2014). NEESTIMATOR v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14, 209–214.
- Drechsler, A., Bock, D., Ortmann, D. & Steinfartz, S. (2010). Ortmanns funnel trap—a highly efficient tool for monitoring amphibian species. *Herpetology Notes*, 3, 13–21.
- Drechsler, A., Geller, D., Freund, K., Schmeller, D.S., Künzel, S., Rupp, O., *et al.* (2013). What remains from a 454 run: estimation of success rates of microsatellite loci development in selected newt species (*Calotriton asper*, *Lissotriton helveticus*, and *Triturus cristatus*) and comparison with Illumina-based approaches. *Ecology and Evolution*, 3, 3947–3957.
- Dukes, J.S. & Mooney, H.A. (1999). Does global change increase the success of biological invaders? *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 135–139.
- Ellegren, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16, 551–558.
- Elliott, J.M. (2003). A comparative study of the dispersal of 10 species of stream invertebrates. *Freshwater Biology*, 48, 1652–1668.
- Estoup, A., Baird, S.J.E., Ray, N., Currat, M., Cornuet, J.-M., Santos, F., *et al.* (2010). Combining genetic, historical and geographical data to reconstruct the dynamics of bioinvasions: application to the cane toad *Bufo marinus*. *Molecular Ecology Resources*, 10, 886–901.
- Estoup, A., Ravigné, V., Hufbauer, R., Vitalis, R., Gautier, M. & Facon, B. (2016). Is there a genetic paradox of biological invasion? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47, 51–72.
- van Etten, J. (2017). R package gdistance: distances and routes on geographical grids. *Journal of Statistical Software*, 76, 1–21.
- Excoffier, L., Foll, M. & Petit, R.J. (2009). Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 481–501.
- Fagan, W.F. & Holmes, E.E. (2006). Quantifying the extinction vortex. *Ecology Letters*, 9, 51–60.
- Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487–515.

- Fasola, M. & Canova, L. (1992). Feeding habits of *Triturus vulgaris*, *T. cristatus* and *T. alpestris* (Amphibia, Urodela) in the northern apennines (Italy). *Bolletino di zoologia*, 59, 273–280.
- Ferrer, E.S., García-Navas, V., Bueno-Enciso, J., Barrientos, R., Serrano-Davies, E., Cáliz-Campal, C., *et al.* (2016). The influence of landscape configuration and environment on population genetic structure in a sedentary passerine: insights from loci located in different genomic regions. *Journal of Evolutionary Biology*, 29, 205–219.
- Ficetola, G., Siesa, M.E., Manenti, R., Bottoni, L., De Bernardi, F. & Padoa-Schioppa, E. (2011). Early assessment of the impact of alien species: differential consequences of an invasive crayfish on adult and larval amphibians. *Diversity and Distributions*, 17, 1141–1151.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, 423–425.
- Ficetola, G.F., Padoa-Schioppa, E. & De Bernardi, F. (2009). Influence of landscape elements in riparian buffers on the conservation of semiaquatic amphibians. *Conservation Biology*, 23, 114–123.
- Ficetola, G.F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., *et al.* (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15, 543–556.
- Ficetola, G.F., Siesa, M.E., De Bernardi, F. & Padoa-Schioppa, E. (2012). Complex impact of an invasive crayfish on freshwater food webs. *Biodiversity and Conservation*, 21, 2641–2651.
- Ficetola, G.F., Taberlet, P. & Coissac, E. (2016). How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources*, 16, 604–607.
- Fincel, M.J., Vandehey, J.A. & Chipps, S.R. (2012). Non-lethal sampling of walleye for stable isotope analysis: a comparison of three tissues. *Fisheries Management and Ecology*, 19, 283–292.
- Fisher, R.A. (1937). The wave of advance of advantageous genes. *Annals of Eugenics*, 7, 355–369.
- Fiske, I. & Chandler, R. (2011). unmarked: An R package for fitting hierarchical models of wildlife occurrence and abundance. *Journal of Statistical Software*, 43, 1–23.
- Foote, A.D., Thomsen, P.F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L.A., *et al.* (2012). Investigating the Potential Use of Environmental DNA (eDNA) for Genetic Monitoring of Marine Mammals. *PLoS ONE*, 7, e41781.
- Fritts, T.H. & Rodda, G.H. (1998). The role of introduced species in the degradation of island ecosystems: a case history of Guam. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 113–140.
- Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology*. Springer, New York, NY.
- Fujiwara, A., Matsushashi, S., Doi, H., Yamamoto, S. & Minamoto, T. (2016). Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. *Freshwater Science*, 35, 748–754.
- Gallardo, B., Clavero, M., Sánchez, M.I. & Vilà, M. (2016). Global ecological impacts of invasive species in aquatic ecosystems. *Global Change Biology*, 22, 151–163.
- Gamble, L.R., McGarigal, K. & Compton, B.W. (2007). Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*: Implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation*, 139, 247–257.

## Références bibliographiques

- Gamradt, S.C., Kats, L.B. & Anzalone, C.B. (1997). Aggression by non-native crayfish deters breeding in California newts. *Conservation Biology*, 11, 793–796.
- Gause, G.F. (1934). Experimental Analysis of Vito Volterra's Mathematical Theory of the Struggle for Existence. *Science, New Series*, 79, 16–17.
- Geiger, W., Alcorlo, P., Baltanas, A. & Montes, C. (2005). Impact of an introduced Crustacean on the trophic webs of Mediterranean wetlands. *Biological Invasions*, 7, 49–73.
- Gentz, E.J. (2007). Medicine and Surgery of Amphibians. *ILAR Journal*, 48, 255–259.
- Gherardi, F., Aquiloni, L., Diéguez-Uribeondo, J. & Tricarico, E. (2011). Managing invasive crayfish: is there a hope? *Aquatic Sciences*, 73, 185–200.
- Gherardi, F. & Barbaresi, S. (2000). Invasive crayfish: activity patterns of *Procambarus clarkii* in the rice fields of the Lower Guadalquivir (Spain). *Archiv für Hydrobiologie*, 150, 153–168.
- Gherardi, F., Tricarico, E. & Ilhéu, M. (2002). Movement patterns of an invasive crayfish, *Procambarus clarkii*, in a temporary stream of southern Portugal. *Ethology Ecology & Evolution*, 14, 183–197.
- Gilbert, K.J. & Whitlock, M.C. (2015). Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. *Evolution*, 69, 2154–2166.
- Gillespie, J.H. (2013). Application of stable isotope analysis to study temporal changes in foraging ecology in a highly endangered amphibian. *PLoS ONE*, 8, e53041.
- Gilpin, M.E. & Hanski, I.A. (1991). *Metapopulation Dynamics: Empirical and Theoretical Investigations*. Academic Press, London.
- Gimenez, O. & Gaillard, J.-M. (2018). Estimating individual fitness in the wild using capture–recapture data. *Population Ecology*, 60, 101–109.
- Gomez-Mestre, I. & Diaz-Paniagua, C. (2011). Invasive predatory crayfish do not trigger inducible defences in tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, 3364–3370.
- Gosner, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183–190.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*, 86, 485–486.
- Goudet, J. & Jombart, T. (2015). hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. *R package version 0.04-22*.
- Graves, T., Chandler, R.B., Royle, J.A., Beier, P. & Kendall, K.C. (2014). Estimating landscape resistance to dispersal. *Landscape Ecology*, 29, 1201–1211.
- Grey, J. & Jackson, M.C. (2012). 'Leaves and eats shoots': direct terrestrial feeding can supplement invasive red swamp crayfish in times of need. *PLoS ONE*, 7, e42575.
- Griffiths, R.A. (1986). Feeding niche overlap and food selection in smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in Mid-Wales. *Journal of Animal Ecology*, 55, 201–214.
- Groom, M.J. (2006). Threats to biodiversity. In: *Principles of conservation biology* (eds. Groom, M.J., Meffe, G.K. & Carroll, C.R.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, pp. 63–109.
- Guérin, S., Picard, D., Choquet, R. & Besnard, A. (2017). Advances in methods for estimating stopover duration for migratory species using capture-NDASH-recapture data. *Ecological Applications*.

- Guo, L.B. & Gifford, R.M. (2002). Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology*, 8, 345–360.
- Gurevitch, J. & Padilla, D. (2004). Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 470–474.
- Gutiérrez-Yurrita, P.J., Sancho, G., Bravo, M.A., Baltanas, A. & Montes, C. (1998). Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Doñana National Park temporary fresh-water marsh (Spain). *Journal of Crustacean Biology*, 18, 120–127.
- Hall, E.M., Crespi, E.J., Goldberg, C.S. & Brunner, J.L. (2016). Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molecular Ecology Resources*, 16, 423–433.
- Hastings, A., Cuddington, K., Davies, K.F., Dugaw, C.J., Elmendorf, S., Freestone, A., *et al.* (2005). The spatial spread of invasions: new developments in theory and evidence. *Ecology Letters*, 8, 91–101.
- Hecnar, S.J. & M'Closkey, R.T. (1997). The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution. *Biological conservation*, 79, 123–131.
- Hein, C.L., Vander Zanden, M.J. & Magnuson, J.J. (2007). Intensive trapping and increased fish predation cause massive population decline of an invasive crayfish. *Freshwater Biology*, 52, 1134–1146.
- Heino, J., Melo, A.S., Siqueira, T., Soininen, J., Valanko, S. & Bini, L.M. (2015). Metacommunity organisation, spatial extent and dispersal in aquatic systems: patterns, processes and prospects. *Freshwater Biology*, 60, 845–869.
- Hette-Tronquart, N., Mazeas, L., Reuilly-Manenti, L., Zahm, A. & Belliard, J. (2012). Fish fins as non-lethal surrogates for muscle tissues in freshwater food web studies using stable isotopes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26, 1603–1608.
- Hettyey, A., Thonhauser, K.E., Bókony, V., Penn, D.J., Hoi, H. & Griggio, M. (2016). Naive tadpoles do not recognize recent invasive predatory fishes as dangerous. *Ecology*, 97, 2975–2985.
- Hijmans, R.J. (2017). raster: geographic data analysis and modeling. *R package version 2.6-7*.
- HilleRisLambers, J., Adler, P.B., Harpole, W.S., Levine, J.M. & Mayfield, M.M. (2012). Rethinking community assembly through the lens of coexistence theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 227–248.
- Hitchings, S.P. & Beebee, T.J.C. (1997). Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity*, 79, 117–127.
- Hobbs, R.J. (2016). Degraded or just different? Perceptions and value judgements in restoration decisions. *Restor Ecol*, 24, 153–158.
- Hobbs, R.J., Arico, S., Aronson, J., Baron, J.S., Bridgewater, P., Cramer, V.A., *et al.* (2006). Novel ecosystems: theoretical and management aspects of the new ecological world order. *Global Ecology and Biogeography*, 15, 1–7.
- Hoehn, M., Sarre, S.D. & Henle, K. (2007). The tales of two geckos: does dispersal prevent extinction in recently fragmented populations? *Molecular Ecology*, 16, 3299–3312.
- Hoffmann, B.D. & Courchamp, F. (2016). Biological invasions and natural colonisations: are they that different? *NeoBiota*, 29, 1–14.

## Références bibliographiques

- Hoffmeister, T.S., Vet, L.E., Biere, A., Holsinger, K. & Filser, J. (2005). Ecological and evolutionary consequences of biological invasion and habitat fragmentation. *Ecosystems*, 8, 657–667.
- Holderegger, R. & Di Giulio, M. (2010). The genetic effects of roads: A review of empirical evidence. *Basic and Applied Ecology*, 11, 522–531.
- Holling, C.S. (1965). The functional response of predators to prey density and its role in mimicry and population regulation. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 97, 5–60.
- Holyoak, M., Leibold, M.A. & Holt, R.D. (2005). *Metacommunities: spatial dynamics and ecological communities*. University of Chicago Press, Chicago (IL).
- Howeth, J.G. (2017). Native species dispersal reduces community invasibility by increasing species richness and biotic resistance. *Journal of Animal Ecology*, 86, 1380–1393.
- Howeth, J.G., Derry, A.M. & Reitzel, A.M. (2010). Metacommunity biology as an eco-evolutionary framework for understanding exotic invasion in aquatic ecosystems. *Eco-DAS VIII - Symposium Proceedings*, 93–109.
- Huang, J., Tang, S., Cai, F., Lin, Y. & Wu, Z. (2017). Microsatellite evidence of dispersal mechanism of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in the Pearl River basin and implications for its management. *Scientific Reports*, 7.
- Hufbauer, R.A., Szűcs, M., Kasyon, E., Youngberg, C., Koontz, M.J., Richards, C., *et al.* (2015). Three types of rescue can avert extinction in a changing environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 10557–10562.
- Hulme, P.E. (2006). Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. *Journal of Applied Ecology*, 43, 835–847.
- Hulme, P.E. (2009). Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46, 10–18.
- Hunter, M.E., Oyler-McCance, S.J., Dorazio, R.M., Fike, J.A., Smith, B.J., Hunter, C.T., *et al.* (2015). Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive Burmese pythons. *PLoS ONE*, 10, e0121655.
- Ilhéu, M., Bernardo, J.M. & Fernandes, S. (2007). Predation of invasive crayfish on aquatic vertebrates: the effect of *Procambarus clarkii* on fish assemblages in Mediterranean temporary streams. In: *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats* (ed. Gherardi, F.). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 543–558.
- Ingvarsson, P.K. (2001). Restoration of genetic variation lost - the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 62–63.
- Isselin-Nondedeu, F., Trochet, A., Joubin, T., Picard, D., Etienne, R., Chevalier, H.L., *et al.* (2017). Spatial genetic structure of *Lissotriton helveticus* L. following the restoration of a forest ponds network. *Conservation Genetics*, 18, 853–866.
- Iwai, N. & Shoda-Kagaya, E. (2012). Population structure of an endangered frog (*Babina subaspera*) endemic to the Amami Islands: possible impacts of invasive predators on gene flow. *Conservation Genetics*, 13, 717–725.
- Jackson, A.L., Inger, R., Parnell, A.C. & Bearhop, S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER – Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, 80, 595–602.
- Jackson, M.C. & Britton, J.R. (2014). Divergence in the trophic niche of sympatric freshwater invaders. *Biological Invasions*, 16, 1095–1103.

## Références bibliographiques

- Jackson, M.C., Donohue, I., Jackson, A.L., Britton, J.R., Harper, D.M. & Grey, J. (2012). Population-level metrics of trophic structure based on stable isotopes and their application to invasion ecology. *PLoS ONE*, 7, e31757.
- Jackson, M.C., Evangelista, C., Zhao, T., Lecerf, A., Britton, J.R. & Cucherousset, J. (2017a). Between-lake variation in the trophic ecology of an invasive crayfish. *Freshwater Biology*, 62, 1501–1510.
- Jackson, M.C., Grey, J., Miller, K., Britton, J.R. & Donohue, I. (2016). Dietary niche constriction when invaders meet natives: evidence from freshwater decapods. *Journal of Animal Ecology*, 85, 1098–1107.
- Jackson, M.C., Wasserman, R.J., Grey, J., Ricciardi, A., Dick, J.T.A. & Alexander, M.E. (2017b). Novel and disrupted trophic links following invasion in freshwater ecosystems. In: *Networks of invasion. 2. Band: Empirical evidence and case studies*, Advances in ecological research (eds. Bohan, D.A., Dumbrell, A.J. & Massol, F.). Elsevier ; Academic Press, an imprint of Elsevier, Oxford London Cambridge San Diego, pp. 55–97.
- Jardine, T.D., Hunt, R.J., Pusey, B.J. & Bunn, S.E. (2011). A non-lethal sampling method for stable carbon and nitrogen isotope studies of tropical fishes. *Marine and Freshwater Research*, 62, 83.
- Jehle, R. & Arntzen, J.W. (2000). Post-breeding migrations of newts (*Triturus cristatus* and *T. marmoratus*) with contrasting ecological requirements. *Journal of Zoology*, 251, 297–306.
- Jehle, R., Arntzen, J.W., Burke, T., Krupa, A.P. & Hodl, W. (2001). The annual number of breeding adults and the effective population size of syntopic newts (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). *Molecular Ecology*, 10, 839–850.
- Jehle, R., Burke, T. & Arntzen, J.W. (2005a). Delineating fine-scale genetic units in amphibians: Probing the primacy of ponds. *Conservation Genetics*, 6, 227–234.
- Jehle, R., Wilson, G.A., Arntzen, J.W. & Burke, T. (2005b). Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*): Gene flow and drift in newts. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 619–628.
- Jeschke, J.M., Bacher, S., Blackburn, T.M., Dick, J.T.A., Essl, F., Evans, T., et al. (2014). Defining the impact of non-native species. *Conservation Biology*, 28.
- Jeschke, J.M. & Heger, T. (2018). *Invasion biology: hypotheses and evidence*. CABI 2018. Boston, MA.
- Jeschke, J.M. & Pyšek, P. (2018). Tens Rule. In: *Invasion biology: hypotheses and evidence* (eds. Jeschke, J.M. & Heger, T.). Boston, MA.
- Johanet, A. (2009). Flux de gènes inter- et intra-spécifiques chez des espèces de vallées alluviales : cas des tritons palmés et ponctués en vallée de la Loire. *Thèse de doctorat, Université d'Angers*, 266.
- Johanet, A., Picard, D., Garner, T.W.J., Dawson, D.A., Morales-Hojas, R., Jehle, R., et al. (2009). Characterization of microsatellite loci in two closely related Lissotriton newt species. *Conservation Genetics*, 10, 1903–1906.
- Johanet, A., Secondi, J. & Lemaire, C. (2011). Widespread introgression does not leak into allotopy in a broad sympatric zone. *Heredity*, 106, 962–972.
- Joly, P., Miaud, C., Lehmann, A. & Grolet, O. (2001). Habitat matrix effects on pond occupancy in newts. *Conservation Biology*, 15, 239–248.

- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405.
- Kanarek, A.R., Webb, C.T., Barfield, M. & Holt, R.D. (2015). Overcoming Allee effects through evolutionary, genetic, and demographic rescue. *Journal of Biological Dynamics*, 9, 15–33.
- Kärnä, O.-M., Grönroos, M., Antikainen, H., Hjort, J., Ilmonen, J., Paasivirta, L., *et al.* (2015). Inferring the effects of potential dispersal routes on the metacommunity structure of stream insects: as the crow flies, as the fish swims or as the fox runs? *Journal of Animal Ecology*, 84, 1342–1353.
- Kats, L.B., Bucciarelli, G., Vandergon, T.L., Honeycutt, R.L., Mattiasen, E., Sanders, A., *et al.* (2013). Effects of natural flooding and manual trapping on the facilitation of invasive crayfish-native amphibian coexistence in a semi-arid perennial stream. *Journal of Arid Environments*, 98, 109–112.
- Kats, L.B. & Ferrer, R.P. (2003). Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions*, 9, 99–110.
- Keller, I. & Largiader, C.R. (2003). Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 417–423.
- Keller, S.R. & Taylor, D.R. (2008). History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters*, 11, 852–866.
- Kelly, M.H., Hagar, W.G., Jardine, T.D. & Cunjak, R.A. (2006). Nonlethal sampling of sunfish and slimy sculpin for stable isotope analysis: how scale and fin tissue compare with muscle tissue. *North American Journal of Fisheries Management*, 26, 921–925.
- Kennington, W.J., Gockel, J. & Partridge, L. (2003). Testing for asymmetrical gene flow in a *Drosophila melanogaster* body-size cline. *Genetics*, 165, 667–673.
- Kerby, J.L., Riley, S.P.D., Kats, L.B. & Wilson, P. (2005). Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in southern California streams. *Biological Conservation*, 126, 402–409.
- Kleunen, M.V., Weber, E. & Fischer, M. (2010). A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecology Letters*, 13, 235–245.
- Kratina, P., Vos, M. & Anholt, B.R. (2007). Species diversity modulates predation. *Ecology*, 88, 1917–1923.
- Krug, A. & Pröhl, H. (2013). Population genetics in a fragmented population of the European tree frog (*Hyla arborea*). *Amphibia-Reptilia*, 34, 95–107.
- Krupa, A.P., Jehle, R., Dawson, D.A., Gentle, L.K., Gibbs, M., Arntzen, J.W., *et al.* (2002). Microsatellite loci in the crested newt (*Triturus cristatus*) and their utility in other newt taxa. *Conservation genetics*, 3, 85–87.
- Laha, M. & Mattingly, H.T. (2006). Identifying environmental conditions to promote species coexistence: an example with the native barrens topminnow and invasive western mosquitofish. *Biological Invasions*, 8, 719–725.
- Lahoz-Monfort, J.J., Guillera-Aroita, G. & Tingley, R. (2016). Statistical approaches to account for false-positive errors in environmental DNA samples. *Molecular Ecology Resources*, 16, 673–685.

- Lawson Handley, L.-J., Estoup, A., Evans, D.M., Thomas, C.E., Lombaert, E., Facon, B., *et al.* (2011). Ecological genetics of invasive alien species. *BioControl*, 56, 409.
- Layman, C.A., Araujo, M.S., Boucek, R., Hammerschlag-Peyer, C.M., Harrison, E., Jud, Z.R., *et al.* (2012). Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biological Reviews*, 87, 545–562.
- Layman, C.A., Arrington, D.A., Montaña, C.G. & Post, D.M. (2007). Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology*, 88, 42–48.
- Leblois, R., Pudlo, P., Néron, J., Bertaux, F., Reddy Beeravolu, C., Vitalis, R., *et al.* (2014). Maximum-likelihood inference of population size contractions from microsatellite data. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 2805–2823.
- Leibold, M.A. & Chase, J.M. (2017). *Metacommunity ecology*. Princeton University Press.
- Leibold, M.A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J.M., Hoopes, M.F., *et al.* (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7, 601–613.
- Lejeune, B., Sturaro, N., Lepoint, G. & Denoël, M. (2018). Facultative paedomorphosis as a mechanism promoting intraspecific niche differentiation. *Oikos*, 127, 427–439.
- Lenormand, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 183–189.
- Levine, J.M., Vila, M., Antonio, C.M., Dukes, J.S., Grigulis, K. & Lavorel, S. (2003). Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 775–781.
- Li, Y., Guo, X., Cao, X., Deng, W., Luo, W. & Wang, W. (2012). Population genetic structure and post-establishment dispersal patterns of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in China. *PLoS ONE*, 7, e40652.
- Li, Y., Guo, X., Chen, L., Bai, X., Wei, X., Zhou, X., *et al.* (2015). Inferring invasion history of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in china from mitochondrial control region and nuclear intron sequences. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 14623–14639.
- Lipcius, R.N. & Hines, A.H. (1986). Variable functional responses of a marine predator in dissimilar homogeneous microhabitats. *Ecology*, 67, 1361–1371.
- Liu, G., Zhou, L., Li, X. & Lu, D. (2013). Population genetic structure of the invasive red swamp crayfish in china revealed by its 1 variation. *Biochemical Genetics*, 51, 841–852.
- Liu, X., Wang, S., Ke, Z., Cheng, C., Wang, Y., Zhang, F., *et al.* (2018). More invaders do not result in heavier impacts: The effects of non-native bullfrogs on native anurans are mitigated by high densities of non-native crayfish. *Journal of Animal Ecology*.
- Lockwood, J.L., Cassey, P. & Blackburn, T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 223–228.
- Lockwood, J.L., Hoopes, M.F. & Marchetti, M.P. (2007). *Invasion ecology*. Blackwell Publishing Ltd.
- Logan, J.M., Jardine, T.D., Miller, T.J., Bunn, S.E., Cunjak, R.A. & Lutcavage, M.E. (2008). Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modelling methods. *Journal of Animal Ecology*, 77, 838–846.
- Logue, J.B., Mouquet, N., Peter, H. & Hillebrand, H. (2011). Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 482–491.

- Loureiro, T.G., Anastácio, P.M.S.G., Araujo, P.B., Souty-Grosset, C. & Almerão, M.P. (2015). Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion - an overview. *Nauplius*, 23, 1–19.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M. & Bazzaz, F.A. (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, 10, 689–710.
- MacKenzie, D.I. & Bailey, L.L. (2004). Assessing the fit of site-occupancy models. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 9, 300–318.
- MacKenzie, D.I., Bailey, L.L. & Nichols, J. (2004). Investigating species co-occurrence patterns when species are detected imperfectly. *Journal of Animal Ecology*, 73, 546–555.
- MacKenzie, D.I., Nichols, J.D., Hines, J.E., Knutson, M.G. & Franklin, A.B. (2003). Estimating site occupancy, colonization, and local extinction when a species is detected imperfectly. *Ecology*, 84, 2200–2207.
- Madsen, T., Shine, R., Olsson, M. & Wittzell, H. (1999). Conservation biology: restoration of an inbred adder population. *Nature*, 402, 34.
- Manel, S., Gaggiotti, O. & Waples, R. (2005). Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 136–142.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 189–197.
- Marques, M., Banha, F., Águas, M. & Anastácio, P. (2015). Environmental cues during overland dispersal by three freshwater invaders: *Eriocheir sinensis*, *Pacifastacus leniusculus*, and *Procambarus clarkii* (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiologia*, 742, 81–93.
- Marques, T.S., Tassoni-Filho, M., Ferronato, B.O., Guardia, I., Verdade, L.M. & Camargo, P.B. de. (2011). Isotopic signatures ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) of muscle, carapace and claw in *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Zoologia (Curitiba, Impresso)*, 28, 407–410.
- Martinez del Rio, C., Wolf, N., Carleton, S.A. & Gannes, L.Z. (2009). Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, 84, 91–111.
- Marty, P., Angélibert, S., Giani, N. & Joly, P. (2005). Directionality of pre- and post-breeding migrations of a marbled newt population (*Triturus marmoratus*): implications for buffer zone management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 215–225.
- Mazerolle, M. (2017). AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). R package version 2.1-1. <https://cran.r-project.org/package=AICcmodavg>.
- Mazerolle, M.J., Desrochers, A. & Rochefort, L. (2005). Landscape characteristics influence pond occupancy by frogs after accounting for detectability. *Ecological Applications*, 15, 824–834.
- Mazerolle, M.J., Perez, A. & Brisson, J. (2014). Common reed (*Phragmites australis*) invasion and amphibian distribution in freshwater wetlands. *Wetlands Ecology and Management*, 22, 325–340.
- McCutchan, J.H., Lewis, W.M., Kendall, C. & McGrath, C.C. (2003). Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, 102, 378–390.
- McRae, B.H. & Beier, P. (2007). Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19885–19890.
- Medina, F.M., Bonnaud, E., Vidal, E., Tershy, B.R., Zavaleta, E.S., Josh Donlan, C., et al. (2011). A global review of the impacts of invasive cats on island endangered vertebrates. *Global Change Biology*, 17, 3503–3510.

- Meek, R. (2018). Temporal trends in agile frog *Rana dalmatina* numbers: results from a long-term study in western France. *Herpetological Journal*, 28, 117–122.
- Melbourne, B.A., Cornell, H.V., Davies, K.F., Dugaw, C.J., Elmendorf, S., Freestone, A.L., *et al.* (2007). Invasion in a heterogeneous world: resistance, coexistence or hostile takeover? *Ecology Letters*, 10, 77–94.
- Miaud, C. & Muratet, J. (2004). *Identifier les oeufs et les larves des amphibiens de France*. Editions Quae.
- Michener, R.H. & Lajtha, K. (2007). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Ecological methods and concepts series. 2nd ed. Blackwell Pub, Malden, MA.
- Milanovich, J. & Maerz, J.C. (2012). Assessing the use of non-lethal tail clips for measuring stable isotopes of plethodontid salamanders. *Herpetological Conservation and Biology*, 7, 67–74.
- Milligan, W.R., Jones, M.T., Kats, L.B., Lucas, T.A. & Davis, C.L. (2017). Predicting the effects of manual crayfish removal on California newt persistence in Santa Monica Mountain streams. *Ecological Modelling*, 352, 139–151.
- Mitchell, M.A. (2009). Anesthetic considerations for amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18, 40–49.
- Mollot, G., Pantel, J.H. & Romanuk, T.N. (2017). The effects of invasive species on the decline in species richness: a global meta-analysis. In: *Network of invasion: A synthesis of concepts* (eds. Bohan, D., Dumbrell, A.J. & Massol, F.). Academic Press, Oxford, pp. 61–83.
- Mooney, H.A. & Cleland, E.E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 5446–5451.
- Mouquet, N. & Loreau, M. (2003). Community patterns in source-sink metacommunities. *The American Naturalist*, 162, 544–557.
- Murcia, C., Aronson, J., Kattan, G.H., Moreno-Mateos, D., Dixon, K. & Simberloff, D. (2014). A critique of the ‘novel ecosystem’ concept. *Trends in Ecology & Evolution*, 29, 548–553.
- Murphy, G.E.P. & Romanuk, T.N. (2014). A meta-analysis of declines in local species richness from human disturbances. *Ecology and Evolution*, 4, 91–103.
- Naimi, B., Hamm, N., Groen, T., Skidmore, A. & Toxopeus, A. (2014). Where is positional uncertainty a problem for species distribution modelling. *Ecography*, 37, 191–203.
- Nentwig, W., Bacher, S., Kumschick, S., Pyšek, P. & Vilà, M. (2018). More than “100 worst” alien species in Europe. *Biological Invasions*, 20, 1611–1621.
- Neuhauser, C., Andow, D.A., Heimpel, G.E., May, G., Shaw, R.G. & Wagenius, S. (2003). Community genetics: expanding the synthesis of ecology and genetics. *Ecology*, 84, 545–558.
- Newsome, S.D., Rio, C.M. del, Bearhop, S. & Phillips, D.L. (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5, 429–436.
- Nielsen, J.M., Clare, E.L., Hayden, B., Brett, M.T. & Kratina, P. (2018). Diet tracing in ecology: Method comparison and selection. *Methods in Ecology and Evolution*, 9, 278–291.
- Nunes, A.L., Cruz, M.J., Tejedo, M., Laurila, A. & Rebelo, R. (2010). Nonlethal injury caused by an invasive alien predator and its consequences for an anuran tadpole. *Basic and Applied Ecology*, 11, 645–654.
- Nunes, A.L., Orizaola, G., Laurila, A. & Rebelo, R. (2014a). Morphological and life-history responses of anurans to predation by an invasive crayfish: an integrative approach. *Ecology and Evolution*, 4, 1491–1503.

## Références bibliographiques

- Nunes, A.L., Orizaola, G., Laurila, A. & Rebelo, R. (2014b). Rapid evolution of constitutive and inducible defenses against an invasive predator. *Ecology*, 95, 1520–1530.
- Nunes, A.L., Richter-Boix, A., Laurila, A. & Rebelo, R. (2013). Do anuran larvae respond behaviourally to chemical cues from an invasive crayfish predator? A community-wide study. *Oecologia*, 171, 115–127.
- Ochocki, B.M. & Miller, T.E.X. (2017). Rapid evolution of dispersal ability makes biological invasions faster and more variable. *Nature Communications*, 8, 14315.
- Oertli, B., Biggs, J., Céréghino, R., Grillas, P., Joly, P. & Lachavanne, J.-B. (2005). Conservation and monitoring of pond biodiversity: introduction. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 535–540.
- Oertli, B. & Frossard, P.-A. (Eds.). (2013). *Mares et étangs : écologie, gestion, aménagement et valorisation*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Collection : Ingénierie de l'Environnement.
- Ogutu-Ohwayo, R. (1990). The decline of the native fishes of lakes Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch, *Lates niloticus*, and the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Biology of Fishes*, 27, 81–96.
- Ohnishi, N., Kobayashi, S., Nagata, J. & Yamada, F. (2017). The influence of invasive mongoose on the genetic structure of the endangered Amami rabbit populations. *Ecological Research*, 32, 735–741.
- Olsson, K., Stenroth, P., Nyström, P. & Granéli, W. (2009). Invasions and niche width: does niche width of an introduced crayfish differ from a native crayfish? *Freshwater Biology*, 54, 1731–1740.
- Orizaola, G. & Brana, F. (2003). Oviposition behaviour and vulnerability of eggs to predation in four newt species (genus *Triturus*). *Herpetological Journal*, 13, 121–124.
- Paillisson, J.-M., Roussel, J.M., Tréguier, A., Surzur, G. & Damien, J.P. (2011a). Préservation de la biodiversité face aux invasions de l'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*), rapport ONEMA/INRA.
- Paillisson, J.-M., Soudieux, A. & Damien, J.-P. (2011b). Capture efficiency and size selectivity of sampling gears targeting red-swamp crayfish in several freshwater habitats. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 06.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419–420.
- Parker, I.M., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Goodell, K., Wonham, M., Kareiva, P.M., *et al.* (1999). Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biological Invasions*, 1, 3–19.
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 637–669.
- Parmesan, C. & Matthews, J. (2006). Biological impacts of climate change. In: *Principles of conservation biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, pp. 333–374.
- Parmesan, C. & Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421, 37–42.
- Parnell, A. & Jackson, A. (2013). siar: Stable Isotope Analysis in R.R package version 4.2. <https://CRAN.R-project.org/package=siar>.

## Références bibliographiques

- Paulson, E.L. & Martin, A.P. (2014). Discerning invasion history in an ephemeral connected system: landscape genetics of *Procambarus clarkii* in Ash Meadows, Nevada. *Biological Invasions*, 16, 1719–1734.
- Pearl, C.A., Adams, M.J., Schuyttema, G.S. & Nebeker, A.V. (2003). Behavioral responses of anuran larvae to chemical cues of native and introduced predators in the Pacific northwestern United States. *Journal of Herpetology*, 37, 572–576.
- Pease, K.M. & Wayne, R.K. (2014). Divergent responses of exposed and naive Pacific tree frog tadpoles to invasive predatory crayfish. *Oecologia*, 174, 241–252.
- Pejchar, L. & Mooney, H. (2009). Invasive species, ecosystem services, and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 497–504.
- Pellet, J., Guisan, A. & Perrin, N. (2004). A concentric analysis of the impact of urbanization on the threatened European tree frog in an agricultural Landscape: *Effects of Urbanization on Tree Frogs*. *Conservation Biology*, 18, 1599–1606.
- Peters, J.A. & Lodge, D.M. (2013). Habitat, predation, and coexistence between invasive and native crayfishes: prioritizing lakes for invasion prevention. *Biological Invasions*, 15, 2489–2502.
- Phillips, B.L. (2015). Evolutionary processes make invasion speed difficult to predict. *Biological Invasions*, 17, 1949–1960.
- Phillips, B.L., Brown, G.P. & Shine, R. (2010a). Evolutionarily accelerated invasions: the rate of dispersal evolves upwards during the range advance of cane toads. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 2595–2601.
- Phillips, B.L., Brown, G.P. & Shine, R. (2010b). Life-history evolution in range-shifting populations. *Ecology*, 91, 1617–1627.
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Webb, J.K. & Shine, R. (2006). Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, 439, 803.
- Phillips, D.L. (2001). Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia*, 127, 166–170.
- Pidancier, N., Miquel, C. & Miaud, C. (2003). Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal*, 13, 175–178.
- Pinnegar, J.K. & Polunin, N.V.C. (1999). Differential fractionation of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Functional ecology*, 13, 225–231.
- Polo-Cavia, N. & Gomez-Mestre, I. (2014). Learned recognition of introduced predators determines survival of tadpole prey. *Functional Ecology*, 28, 432–439.
- Post, D.M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83, 703–718.
- Post, D.M., Layman, C.A., Arrington, D.A., Takimoto, G., Quattrochi, J. & Montaña, C.G. (2007). Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*, 152, 179–189.
- Post, D.M., Pace, M.L. & Hairston, N.G. (2000). Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature*, 405, 1047–1049.
- Primack, R.B. (2010). *Essentials of conservation biology*. Fifth edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Prunier, J., Kaufmann, B., Grolet, O., Picard, D., Pompanon, F. & Joly, P. (2012). Skin swabbing as a new efficient DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite

- markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*). *Molecular Ecology Resources*, 12, 524–531.
- Prunier, J.G., Kaufmann, B., Léna, J.-P., Fenet, S., Pompanon, F. & Joly, P. (2014). A 40-year-old divided highway does not prevent gene flow in the alpine newt *Ichthyosaura alpestris*. *Conservation Genetics*, 15, 453–468.
- Quan, A. (2014). Origins of the invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in the Santa Monica Mountains. *Aquatic Invasions*, 9, 211–219.
- R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramalho, R.O. & Anastácio, P.M. (2015). Factors inducing overland movement of invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in a ricefield habitat. *Hydrobiologia*, 746, 135–146.
- Ramamonjisoa, N., Rakotonjoely, H. & Natuhara, Y. (2018). Differential vulnerability of two sympatric tadpoles to an invasive crayfish predator. *Hydrobiologia*, 818, 119–127.
- Reading, C.J., Loman, J. & Madsen, T. (1991). Breeding pond fidelity in the common toad, *Bufo bufo*. *Journal of Zoology*, 225, 201–211.
- Remon, J., Bower, D.S., Gaston, T.F., Clulow, J. & Mahony, M.J. (2016). Stable isotope analyses reveal predation on amphibians by a globally invasive fish (*Gambusia holbrooki*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26, 724–735.
- Ricciardi, A. & Atkinson, S.K. (2004). Distinctiveness magnifies the impact of biological invaders in aquatic ecosystems: Distinctiveness magnifies impact of invaders. *Ecology Letters*, 7, 781–784.
- Ricciardi, A., Hoopes, M.F., Marchetti, M.P. & Lockwood, J.L. (2013). Progress toward understanding the ecological impacts of nonnative species. *Ecological Monographs*, 83, 263–282.
- Ricciardi, A. & MacIsaac, H.J. (2011). Impacts of biological invasions in freshwater ecosystems. In: *Fifty years of invasion ecology: the legacy of Charles Elton* (ed. Richardson, D.M.). Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 221–224.
- Richardson, D.M. & Pyšek, P. (2006). Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography*, 30, 409–431.
- Richardson, D.M., Pyšek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D. & West, C.J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, 6, 93–107.
- Richardson, D.M. & Ricciardi, A. (2013). Misleading criticisms of invasion science: a field guide. *Diversity and Distributions*, 19, 1461–1467.
- Richter-Boix, A., Garriga, N., Montori, A., Franch, M., San Sebastián, O., Villero, D., *et al.* (2013). Effects of the non-native amphibian species *Discoglossus pictus* on the recipient amphibian community: niche overlap, competition and community organization. *Biological Invasions*, 15, 799–815.
- Rodriguez, L.F. (2006). Can invasive species facilitate native species? Evidence of how, when, and why these impacts occur. *Biological Invasions*, 8, 927–939.
- Rodriguez-Perez, H., Cayuela, H., Hilaire, S., Olivier, A. & Mesleard, F. (2014). Is the exotic red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) a current threat for the Mediterranean tree frog (*Hyla meridionalis*) in the Camargue (Southern France)? *Hydrobiologia*, 723, 145–156.
- Ronce, O. (2007). How Does It Feel to Be Like a Rolling Stone? Ten Questions About Dispersal Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 231–253.

## Références bibliographiques

- Roussel, J.-M., Paillisson, J.-M., Treguier, A. & Petit, E. (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology*, 52, 823–826.
- Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219–1228.
- Rowe, M.T. & Zanatta, D.T. (2015). Investigating the genetic variation and structure of a native unionid mussel in the Laurentian Great Lakes following an invasion of dreissenid mussels. *Biological Invasions*, 17, 351–364.
- Russel, J.C. & Blackburn, T.M. (2017). The rise of invasive species denialism. *Trends in Ecology & Evolution*, 32.
- Sagoff, M. (2005). Do non-native species threaten the natural environment? *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 18, 215–236.
- San Sebastián, O., Navarro, J., Llorente, G.A. & Richter-Boix, Á. (2015). Trophic strategies of a non-native and a native amphibian species in shared ponds. *PLOS ONE*, 10, e0130549.
- Savini, D., Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., Tricarico, E., Gherardi, F., Olenin, S., *et al.* (2010). The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 1–7.
- Sax, D., Stachowicz, J., Brown, J., Bruno, J., Dawson, M., Gaines, S., *et al.* (2007). Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 465–471.
- Sax, D.F., Stachowicz, J.J. & Gaines, S.D. (Eds.). (2005). *Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Schiesari, L. (2006). Pond canopy cover: a resource gradient for anuran larvae. *Freshwater Biology*, 51, 412–423.
- Schiesari, L., Werner, E.E. & Kling, G.W. (2009). Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology*, 54, 572–586.
- Schlaepfer, M.A., Sax, D.F. & Olden, J.D. (2011). The potential conservation value of non-native species. *Conservation Biology*, 25, 428–437.
- Schmidt, B.R., Feldmann, R. & Schaub, M. (2005). Demographic processes underlying population growth and decline in *Salamandra salamandra*: demography of population decline and stability. *Conservation Biology*, 19, 1149–1156.
- Schmidt, K., Blanchette, M.L., Pearson, R.G., Alford, R.A. & Davis, A.M. (2017). Trophic roles of tadpoles in tropical Australian streams. *Freshwater Biology*, 62, 1929–1941.
- Schriever, T.A. & Williams, D.D. (2013). Ontogenetic and individual diet variation in amphibian larvae across an environmental gradient: *Diet variation in amphibian larvae*. *Freshwater Biology*, 58, 223–236.
- Segev, O., Polevikove, A., Blank, L., Goedbloed, D., Küpfer, E., Gershberg, A., *et al.* (2015). Effects of tail clipping on larval performance and tail regeneration rates in the near eastern fire salamander, *Salamandra infraimmaculata*. *PLOS ONE*, 1, 12.
- Semlitsch, R.D. (2002). Critical elements for biologically based recovery plans of aquatic-breeding amphibians. *Conservation Biology*, 16, 619–629.
- Semlitsch, R.D. (2008). Differentiating migration and dispersal processes for pond-breeding amphibians. *Journal of Wildlife Management*, 72, 260–267.
- Sepulveda, A.J., Lowe, W.H. & Marra, P.P. (2012). Using stable isotopes to test for trophic niche partitioning: a case study with stream salamanders and fish. *Freshwater Biology*, 57, 1399–1409.

## Références bibliographiques

- Shea, K. & Chesson, P. (2002). Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 170–176.
- Siesa, M.E., Padoa-Schioppa, E., Ott, J., De Bernardi, F. & Ficetola, G.F. (2014). Assessing the consequences of biological invasions on species with complex life cycles: Impact of the alien crayfish *Procambarus clarkii* on *Odonata*. *Ecological Indicators*, 46, 70–77.
- Simberloff, D. (2005). Non-native species DO threaten the natural environment! *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 18, 595–607.
- Simberloff, D. (2011). Non-natives: 141 scientists object. *Nature*, 475, 36–36.
- Simberloff, D. & Gibbons, L. (2004). Now you see them, now you don't!—population crashes of established introduced species. *Biological Invasions*, 6, 161–172.
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., *et al.* (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in ecology & evolution*, 28, 58–66.
- Simmons, A.D. & Thomas, C.D. (2004). Changes in dispersal during species' range expansions. *The American Naturalist*, 164, 378–395.
- Skellam, J.G. (1951). Random dispersal in theoretical populations. *Biometrika*, 38, 196.
- Skelly, D.K., Freidenburg, L.K. & Kiesecker, J.M. (2002). Forest canopy and the performance of larval amphibians. *Ecology*, 83, 983–992.
- Skelly, D.K. & Richardson, J.L. (2010). Larval sampling. In: *Amphibian ecology and conservation - A handbook of techniques* (ed. Dodd, C.K. Jr). Oxford University Press, Oxford, pp. 55–70.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236, 787–792.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47, 264.
- Slatkin, M. & Excoffier, L. (2012). Serial founder effects during range expansion: a spatial analog of genetic drift. *Genetics*, 191, 171–181.
- Smart, A.C., Harper, D.M., Malaisse, F., Schmitz, S., Coley, S. & Beauregard, A.G.D. (2002). Feeding of the exotic Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Crustacea, Decapoda), in an African tropical lake: Lake Naivasha, Kenya. *Hydrobiologia*, 488, 129–142.
- Smith, G.R., Rettig, J.E., Mittelbach, G.G., Valiulis, J.L. & Schaack, S.R. (1999). The effects of fish on assemblages of amphibians in ponds: a field experiment. *Freshwater Biology*, 41, 829–837.
- Smith, K.G. (2006). Keystone predators (eastern newts, *Notophthalmus viridescens*) reduce the impacts of an aquatic invasive species. *Oecologia*, 148, 342–349.
- Smith, M.A. & Green, D.M. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, 28, 110–128.
- Solé, M. & Rödder, D. (2010). Dietary assessments of adult amphibians. In: *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques* (ed. Dodd, C.K.). Oxford University Press, pp. 167–184.
- Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C., *et al.* (2016). The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 58, 78–93.

- Spear, S.F., Peterson, C.R., Matocq, M.D. & Storfer, A. (2005). Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, 14, 2553–2564.
- Strayer, D.L., D’Antonio, C.M., Essl, F., Fowler, M.S., Geist, J., Hilt, S., *et al.* (2017). Boom-bust dynamics in biological invasions: towards an improved application of the concept. *Ecol Lett*, 20, 1337–1350.
- Strayer, D.L., Eviner, V.T., Jeschke, J.M. & Pace, M.L. (2006). Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 645–651.
- Szücs, M., Vahsen, M.L., Melbourne, B.A., Hoover, C., Weiss-Lehman, C. & Hufbauer, R.A. (2017). Rapid adaptive evolution in novel environments acts as an architect of population range expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 13501–13506.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21, 2045–2050.
- Tablado, Z., Tella, J.L., Sanchez-Zapata, J.A. & Hiraldo, F. (2010). The paradox of the long-term positive effects of a north american crayfish on a european community of predators. *Conservation Biology*, 24, 1230–1238.
- Tassin, J., Thompson, K., Carroll, S.P. & Thomas, C.D. (2017). Determining whether the impacts of introduced species are negative cannot be based solely on science: a response to Russel and Blackburn. *Trends in Ecology & Evolution*, 32, 230–231.
- Taylor, P.D., Fahrig, L., Henein, K. & Merriam, G. (1993). Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*, 68, 571–573.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., *et al.* (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 2565–2573.
- Todd, S., Ostrom, P., Lien, J. & Abrajano, J. (1997). Use of biopsy samples of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) skin for stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) determination. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 22, 71–76.
- Tóth, Z., Hoi, H. & Hettyey, A. (2011). Kin discrimination during egg-cannibalism in smooth newts: does competition matter? *Journal of Zoology*, 284, 46–52.
- Trakimas, G., Jardine, T.D., Barisevičiūtė, R., Garbaras, A., Skipitytė, R. & Remeikis, V. (2011). Ontogenetic dietary shifts in European common frog (*Rana temporaria*) revealed by stable isotopes. *Hydrobiologia*, 675, 87–95.
- Tran, T.N.Q., Jackson, M.C., Sheath, D., Verreycken, H. & Britton, J.R. (2015). Patterns of trophic niche divergence between invasive and native fishes in wild communities are predictable from mesocosm studies. *Journal of Animal Ecology*, 84, 1071–1080.
- Traveset, A. & Richardson, D. (2006). Biological invasions as disruptors of plant reproductive mutualisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 208–216.
- Travis, J.M.J., Mustin, K., Benton, T.G. & Dytham, C. (2009). Accelerating invasion rates result from the evolution of density-dependent dispersal. *Journal of Theoretical Biology*, 259, 151–158.
- Tréguier, A. (2013). Invasibilité de réseaux de mares par l’écrevisse de Louisiane *Procambarus clarkii* : rôle du paysage, de l’habitat et des interactions biotiques. Dissertation, Agrocampus Ouest, Rennes.

- Tréguier, A., Paillisson, J.-M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M.A. & Roussel, J.-M. (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 51, 871–879.
- Tréguier, A., Roussel, J.-M., Bélouard, N. & Paillisson, J.-M. (2018). Is it a hindrance for an invasive aquatic species to spread across scattered habitat patches? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28, 610–618.
- Trochet, A., Le Chevalier, H., Calvez, O., Barthe, L., Isselin-Nondedeu, F., Picard, D., *et al.* (2017). Postbreeding movements in marbled newts (*Caudata, Salamandridae*): a comparative radiotracking study in two habitat types. *Herpetologica*, 73, 1–9.
- Trochet, A., Moulherat, S., Calvez, O., Stevens, V., Clobert, J. & Schmeller, D. (2014). A database of life-history traits of European amphibians. *Biodiversity Data Journal*, 2, e4123.
- Twardochleb, L.A., Olden, J.D. & Larson, E.R. (2013). A global meta-analysis of the ecological impacts of nonnative crayfish. *Freshwater Science*, 32, 1367–1382.
- Urban, M., Leibold, M., Amarasekare, P., Demeester, L., Gomulkiewicz, R., Hochberg, M., *et al.* (2008). The evolutionary ecology of metacommunities. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 311–317.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., *et al.* (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25, 929–942.
- Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J.-C. & Simberloff, D. (2008). In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biological Invasions*, 10, 1345–1351.
- Vander Zanden, M.J., Casselman, J.M. & Rasmussen, J.B. (1999). Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lake. *Nature*, 401, 464–467.
- Vellend, M. (2010). Conceptual Synthesis in Community Ecology. *The Quarterly Review of Biology*, 85, 183–206.
- Verhoef, H.A. & Olff, H. (2010). Trophic dynamics of communities. In: *Community ecology: processes, models, and applications* (eds. Morin, P.J. & Verhoef, H.A.). Oxford University Press, Oxford, pp. 25–36.
- Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., *et al.* (2010). How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8, 135–144.
- Vilà, M., Espinar, J.L., Hejda, M., Hulme, P.E., Jarošík, V., Maron, J.L., *et al.* (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems: Ecological impacts of invasive alien plants. *Ecology Letters*, 14, 702–708.
- Vitousek, P.M., D'antonio, C.M., Loope, L.L., Rejmanek, M. & Westbrooks, R. (1997). Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology*, 21, 1–16.
- Von Holle, B. & Simberloff, D. (2005). Ecological resistance to biological invasion overwhelmed by propagule pressure. *Ecology*, 86, 3212–3218.
- Vonesh, J.R. & De la Cruz, O. (2002). Complex life cycles and density dependence: assessing the contribution of egg mortality to amphibian declines. *Oecologia*, 133, 325–333.
- Walsh, P., Metzger, D. & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506–513.

## Références bibliographiques

- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., *et al.* (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416, 389–395.
- Walther, G.-R., Roques, A., Hulme, P.E., Sykes, M.T., Pyšek, P., Kühn, I., *et al.* (2009). Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends in ecology & evolution*, 24, 686–693.
- Weir, B.S. & Goudet, J. (2017). A unified characterization of population structure and Relatedness. *Genetics*, 206, 2085–2103.
- Weiss-Lehman, C., Hufbauer, R.A. & Melbourne, B.A. (2017). Rapid trait evolution drives increased speed and variance in experimental range expansions. *Nature Communications*, 8, 14303.
- Werner, E.E. & Gilliam, J.F. (1984). The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15, 393–425.
- Werner, E.E., Skelly, D.K., Relyea, R.A. & Yurewicz, K.L. (2007). Amphibian species richness across environmental gradients. *Oikos*, 116, 1697–1712.
- Whiles, M.R. & Altig, R. (2010). Dietary assessments of larval amphibians. In: *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. Oxford University Press, pp. 71–86.
- Wilbur, H.M., Morin, P.J. & Harris, R.N. (1983). Salamander predation and the structure of experimental communities: anuran responses. *Ecology*, 64, 1423–1429.
- Williams, J.L., Kendall, B.E. & Levine, J.M. (2016). Rapid evolution accelerates plant population spread in fragmented experimental landscapes. *Science*, 353, 482–485.
- Williamson, M. (1996). *Biological Invasions*. Springer Science & Business Media.
- Wilson, D.S. (1992). Complex interactions in metacommunities, with Implications for Biodiversity and Higher Levels of Selection. *Ecology*, 73, 1984–2000.
- Wilson, J.D. & Gibbons, J.W. (2010). Drift fences, coverboards, and other traps. In: *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques* (ed. Dodd, C.K.). Oxford University Press, pp. 229–245.
- Wilson, J.R.U., Dormontt, E.E., Prentis, P.J., Lowe, A.J. & Richardson, D.M. (2009). Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 136–144.
- Wilson, J.R.U., García-Díaz, P., Cassey, P., Richardson, D.M., Pyšek, P. & Blackburn, T.M. (2016). Biological invasions and natural colonisations are different – the need for invasion science. *NeoBiota*, 31, 87–98.
- Winandy, L., Darnet, E. & Denoël, M. (2015). Amphibians forgo aquatic life in response to alien fish introduction. *Animal Behaviour*, 109, 209–216.
- Winandy, L. & Denoël, M. (2013). Introduced goldfish affect amphibians through inhibition of sexual behaviour in risky habitats: an experimental approach. *PLoS ONE*, 8, 1–11.
- Winandy, L. & Denoël, M. (2015). The aggressive personality of an introduced fish affects foraging behavior in a polymorphic newt. *Behavioral Ecology*, ar101.
- Winandy, L., Legrand, P. & Denoël, M. (2017). Habitat selection and reproduction of newts in networks of fish and fishless aquatic patches. *Animal Behaviour*, 123, 107–115.
- Winegardner, A.K., Jones, B.K., Ng, I.S.Y., Siqueira, T. & Cottenie, K. (2012). The terminology of metacommunity ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 253–254.
- Witte, C.L., Sredl, M.J., Kane, A.S. & Hungerford, L.L. (2008). Epidemiologic analysis of factors associated with local disappearances of native ranid frogs in Arizona. *Conservation Biology*, 22, 375–383.

## Références bibliographiques

- Wright, K.M. (2001). Surgical techniques. In: *Amphibian medicine and captive husbandry* (eds. Wright, K.M. & Whitaker, B.R.). Malabar FL: Krieger Publishing Company, pp. 273–283.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97–159.
- Yi, S., Li, Y., Shi, L., Zhang, L., Li, Q. & Chen, J. (2018). Characterization of population genetic structure of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in china. *Scientific Reports*, 8.
- Yue, G.H., Li, J., Bai, Z., Wang, C.M. & Feng, F. (2010). Genetic diversity and population structure of the invasive alien red swamp crayfish. *Biological Invasions*, 12, 2697–2706.
- Zhu, B.F., Huang, Y., Dai, Y.G., Bi, C.W. & Hu, C.Y. (2013). Genetic diversity among red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) populations in the middle and lower reaches of the Yangtze River based on AFLP markers. *Genetics and Molecular Research*, 12, 791–800.





**Titre :** Coexistence d'espèces dans des habitats discontinus. Le cas d'espèces natives et invasives dans des réseaux de mares

**Mots clés :** dispersion, interactions trophiques, invasion biologique, métacommunauté, *Procambarus clarkii*

**Résumé :** La question de la coexistence entre espèces est cruciale dans le contexte des changements globaux, où certaines espèces colonisent de nouveaux écosystèmes, tel le cas des espèces invasives. Dans les habitats discontinus, la coexistence entre espèces invasives et natives gagne à être considérée à la lumière de la théorie des métacommunautés, et en particulier en examinant séparément les processus de dispersion et les interactions locales afin de déterminer leurs effets relatifs. Les approches observationnelles en milieux naturels permettent par ailleurs la prise en compte de la complexité des relations possibles. C'est le travail abordé dans cette thèse à travers l'exemple de l'effet de l'invasion de l'écrevisse de Louisiane sur les amphibiens natifs dans des réseaux de mares. La densité des larves et la distribution des amphibiens ont

montré la cooccurrence avec l'écrevisse dans les mares. Grâce à la génétique du paysage, la dispersion de l'écrevisse s'est révélée fortement contrainte par le caractère discontinu des habitats, contrairement à celle des amphibiens, bien qu'elle ait été variable parmi les trois espèces étudiées. Les analyses d'isotopes stables ont montré que malgré sa position centrale dans les réseaux trophiques, l'écrevisse n'avait pas de fortes interactions trophiques avec les amphibiens, tout au plus un effet indirect par la modification de l'habitat. Sur la base des mécanismes considérés ici, la coexistence entre les amphibiens natifs et l'écrevisse invasive semble ainsi envisageable. Des suites de ce travail sont envisageables à l'échelle des communautés grâce à l'ADN environnemental.

**Title:** Species coexistence in patchy habitats. The study case of native and invasive species in pond networks.

**Keywords:** biological invasion, dispersal, metacommunity, *Procambarus clarkii*, trophic interactions

**Abstract:** The question of species coexistence is crucial in the context of global changes, where some species colonize new ecosystems, such as the case of invasive species. In patchy habitats, the coexistence between invasive and native species gains at being considered in the light of the metacommunity theory, and particularly by examining separately the processes of dispersal and local interactions to determine their relative effects. Besides, observational approaches in natural habitats allow to account for the complexity of the possible relationships. It is the work tackled in this thesis through the example of the effect of the red swamp crayfish on native amphibians in pond networks. The density of larvae and the distribution of native amphibians showed the

co-occurrence with the crayfish in ponds. Owing to landscape genetics, the dispersal of crayfish was shown to be highly constrained by the patchy nature of habitats, contrary to that of amphibians, although it was variable among the three species considered. The stable isotope analyses showed that, despite its central position in the food webs, the crayfish did not have strong trophic interactions with amphibians, all the more an indirect effect through habitat modification. On the basis of the mechanisms considered here, the coexistence between native amphibians and the invasive crayfish seems possible. Perspectives from this work are envisaged at the community scale using environmental DNA.