

Rapport d'étude



DREAL Centre



Conseil régional de la région Centre



ADN environnemental

Détection de l'Espèce Exotique Envahissante Grenouille taureau

Sologne
France

Gabriel MICHELIN chargé d'études faune
Xavier HECKLY chargé d'études faune
Benjamin RIGAUX, service civique volontaire

Novembre 2011



Sommaire

I.	Contexte de l'étude.....	3
II.	Matériel et méthodes	3
II.1	Sélection des sites.....	3
II.2	Méthodes d'analyse.....	6
III.	Résultats	7
IV.	Comparaison financière et temporaire entre les deux méthodes	13
IV.1	Différence de temps.....	14
IV.2	Différence de budget.....	15
V.	Conclusion.....	19
VI.	Annexe	20
	Rapport SPYGEN.....	20
	Figure 1 : Présentation des sites analysés.....	4
	Figure 2 : Résultats de l'analyse ADN environnemental	8
	Tableau 1 : Liste des sites analysés.....	5
	Tableau 2 : Résultats test ADN	7
	Tableau 3 : Comparatif temps méthodes	13
	Tableau 4 : Budgets théoriques équipe ingénieurs	17
	Photo 1 : Prélèvement d'eau	6
	Photo 2 : Echantillonnage des prélèvements	6
	Photo 3 : Etang Grand Boussay.....	11
	Photo 4 : Juvénile g.taureau.....	11
	Photo 5 : Mare aux cerfs	12
	Photo 6 : Etang ferme de Chancay Nord.....	12
	Photo 7 : Prospection nocturne	15
	Photo 8 : Echantillonnage ADN.....	15

I. Contexte de l'étude

La Grenouille taureau, espèce originaire Amérique du Nord a été introduite dans de nombreux pays. En Sologne, cette espèce exotique envahissante crée des déséquilibres sur les écosystèmes aquatiques colonisés à cause de son régime alimentaire, de la maladie qu'elle transmet aux autres amphibiens et à l'absence de prédateur naturel. Depuis sa découverte en 2002, des actions sont entreprises par le Syndicat d'Entretien du Bassin du Beuvron (SEBB), le Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement de Loir-et-Cher (CDPNE) et l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) afin d'éliminer la Grenouille taureau en Sologne. Après 8 années de lutte, nous observons une diminution importante du poids moyen des adultes ainsi qu'une réduction des effectifs reproducteurs par site colonisé.

La détection de l'espèce est devenue une priorité sur les étangs et mares en périphérie de la zone colonisée. Nos moyens actuels de détection de l'espèce sont les observations diurnes, nocturnes et les écoutes des mâles chanteurs. Ces moyens ont une réussite densité-dépendante, elles deviennent également chronophages quand les sites possèdent une surface importante.

Confronté à cette situation dans le cadre des programmes de lutte contre les populations de Grenouille taureau dans le Sud-ouest et le Centre de la France, le Laboratoire d'Ecologie Alpine a développé, en partenariat avec le Parc naturel régional Périgord-Limousin, une nouvelle méthode de détection des espèces aquatiques à l'aide d'outils moléculaires. Cette méthode appelée « ADN environnemental » a été utilisée en 2011 en Sologne.

II. Matériel et méthodes

Des chercheurs du laboratoire d'écologie alpine (LECA) ont mis au point une nouvelle technique pour évaluer la distribution d'espèces rares dans des environnements où elles sont difficiles à recenser. Cette méthode basée sur la persistance de l'ADN en milieu aquatique a déjà été appliquée à la Grenouille taureau en Dordogne. En 2011, le Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement a souhaité l'utiliser pour vérifier son efficacité.

II.1 Sélection des sites

Des sites aquatiques ont été sélectionnés sur et en dehors de la zone colonisée connue. Leur surface varie entre 0.3 et 10 hectares. Nous avons choisi 32 sites à analyser. Ils sont répartis en 3 catégories :

(cf. tableau page suivante)

- les sites colonisés en 2011 (10)
- les sites ayant été colonisés ou possédant un fort potentiel de l'être (10)
- les sites non colonisés depuis 2 ans ou n'ayant jamais été découverts colonisés (12).

Cf. carte page suivante.

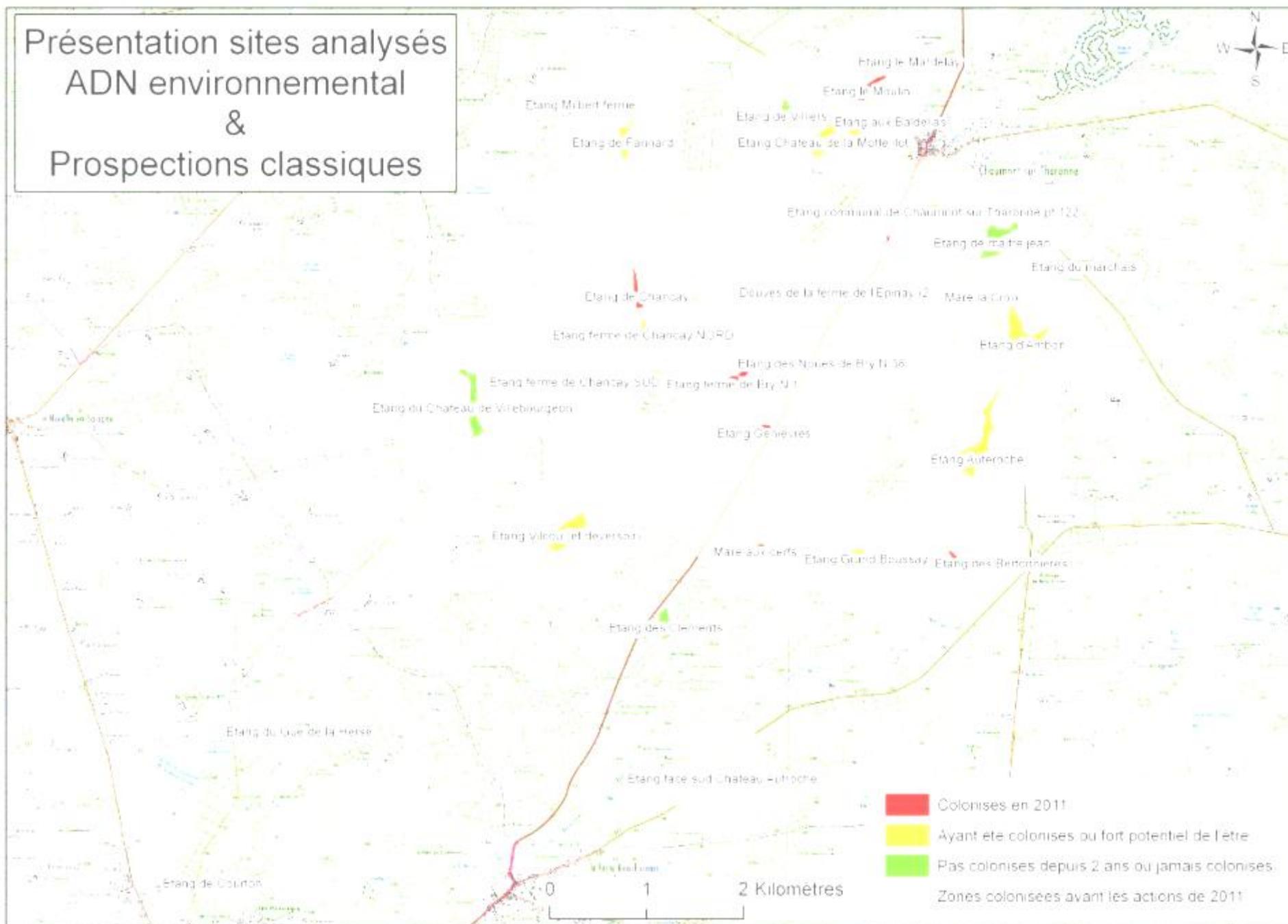


Figure 1 : Présentation des sites analysés

Tableau 1 : Liste des sites analysés

site	Sites colonisés 2010	Surface en m ²	Périmètre en m	Nombre analyse
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	3127	320	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	4726	575	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	6471	321	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	7266	327	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	8512	508	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	10209	437	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	13259	665	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	13927	464	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	19652	1064	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	24722	937	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	8338	531	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	11332	429	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	12964	617	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	15844	553	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	22683	1089	2
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	24396	841	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	52003	1388	2
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	75137	1764	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	81375	1749	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	106609	2321	5
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	3415	252	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	4140	258	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	7561	390	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	9326	387	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	12330	723	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	15670	746	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	24771	730	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	31986	889	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	55712	1845	3
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	61229	1363	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	9208	451	1
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	300	80	1
32 sites	16 colonisés	75,8 ha	25 km	40

Nous avons effectué au minimum une analyse par site. Certains sites, ayant une surface très importante, ont subi plusieurs analyses allant de 2 à 5.

II.2 Méthodes d'analyse

La méthode permet de détecter la Grenouille taureau dans l'eau car elle y dépose son ADN. Nous avons donc prélevé de l'eau en pied de berge des sites aquatiques sélectionnés. Une analyse représente 20 prélèvements de 50 ml d'eau. Nous avons espacé les prélèvements d'environ une vingtaine de mètres. Les berges ensoleillées et possédant une végétation aquatique abondante ont été ciblées prioritairement car elles sont recherchées par les amphibiens.



Photo 1 : Prélèvement d'eau



Photo 2 : Echantillonnage des prélèvements

Les 20 prélèvements sont vidés dans une bouteille stérile d'un litre qui sera ensuite homogénéisée avant d'être sous échantillonnée dans 6 flacons contenant un mélange empêchant la dégradation de l'ADN (alcool et tampon). Les flacons sont ensuite envoyés au laboratoire SPYGEN. Celui-ci ne connaît pas le degré de colonisation des sites analysés. Nous avons uniquement donné un code de 1 à 40 pour identifier les noms des sites sur les échantillons prélevés. Ainsi, SPYGEN a travaillé en simple aveugle sur les échantillons.

Les sites aquatiques ayant bénéficié d'une analyse, ont un périmètre de 650 mètres en moyenne. Les prélèvements permettent une analyse de 400 mètres de berge ciblés sur l'habitat préférentiel des amphibiens.

Quatre sites aquatiques ont bénéficié d'une analyse multiple. Les berges ont ainsi été fractionnées selon le nombre d'analyses effectuées (entre 2 et 5).

Au total, 40 analyses ont été effectuées sur 32 sites pendant la dernière semaine d'août.

L'objectif de cette étude est de vérifier la sensibilité de la méthode « ADN environnemental » et de comparer son efficacité par rapport à nos méthodes de détection classique de l'espèce. Pour cela, nous avons effectué une veille environnemental classique sur les 32 sites sélectionnés de juillet à août. Cette veille s'effectue par des écoutes et prospections nocturnes au phare ou des observations diurnes aux jumelles. Un tableau permet de comparer les résultats de détection classique avec ceux de la méthode ADN.

III. Résultats

Les échantillons ont été envoyés début septembre au laboratoire SPYGEN. 15 jours ont été nécessaires pour obtenir les résultats des sites « non découverts colonisés » par nos méthodes classiques. En Octobre, nous avons les résultats complets.

Tableau 2 : Résultats test ADN

Site analysés	Présence avérée en prospection classique	Actions d'éradication avant analyse ADN	Détection ADN	Actions d'éradication après résultats ADN
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	à venir
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Non
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Non
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Non
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Oui	Oui	Oui	Non
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Oui	Oui
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Non	
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Non	Non	Oui	Oui
32 sites	16 colonisés	16 sites	14 positifs	9 sites

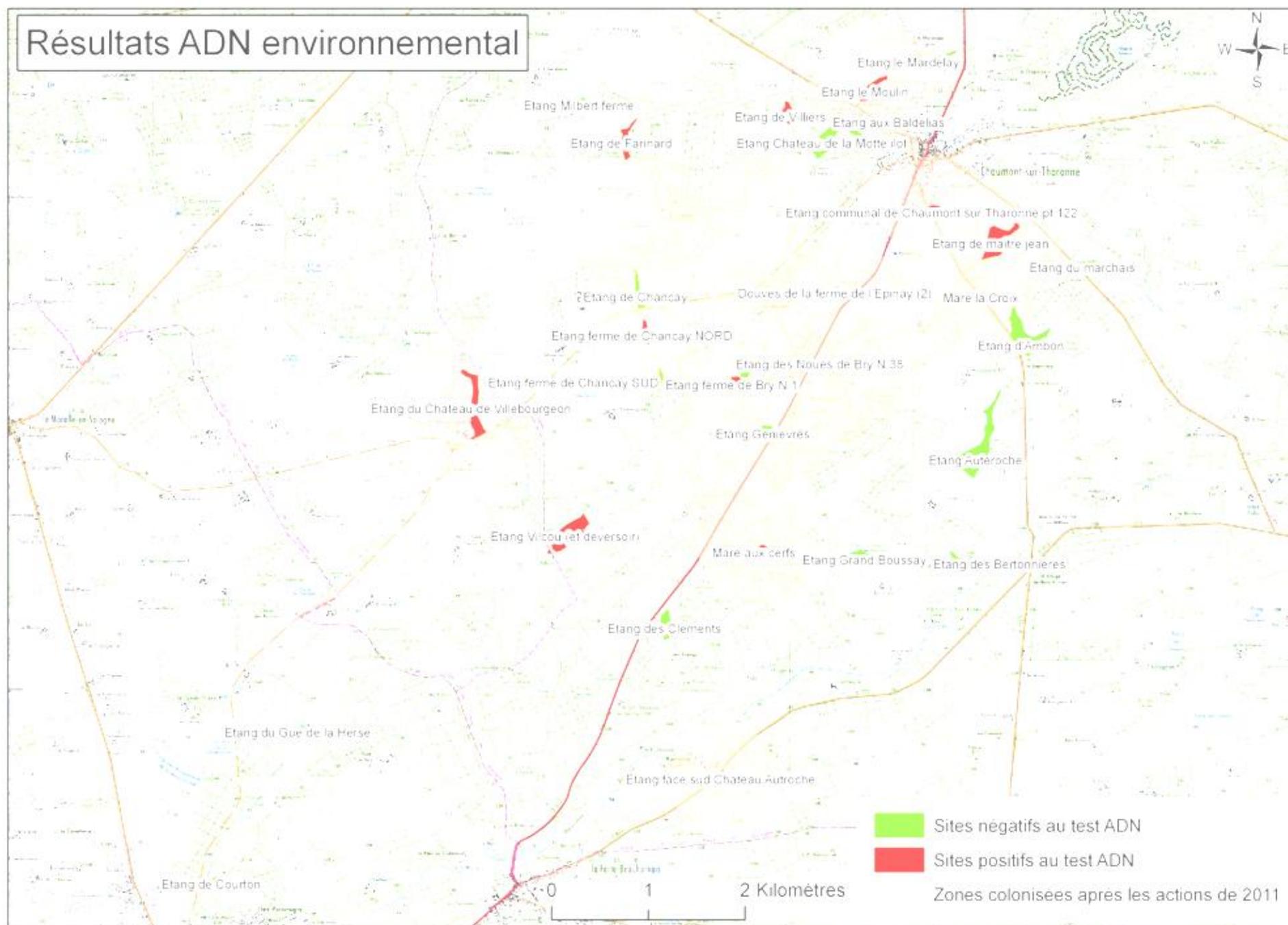


Figure 2 : Résultats de l'analyse ADN environnemental

En plus des sites découverts colonisés par nos méthodes classiques en 2011, les analyses ADN ont permis de découvrir **6 sites supplémentaires**.

Il s'agit des sites suivant :

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Suite à ces résultats, des actions d'éradication ont été mises en place sur ces sites.

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Une prospection diurne et une nocturne, aucun individu observé.

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Une prospection diurne et deux nocturnes, aucun individu observé.

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Deux prospections diurnes et une nocturne, aucun individu observé.

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Une prospection diurne et une nocturne, aucun individu observé.

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Une prospection diurne et un individu observé mais non éliminé.

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Une prospection diurne et une nocturne, deux individus observés et éliminés



Commentaires sur ces 6 nouveaux sites découverts :

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le fait de ne pas avoir observé un ou plusieurs individus sur ces sites malgré une réponse positive à l'ADN :

- la détection visuelle est densité-dépendante, il reste toujours difficile de trouver l'espèce si elle est présente en très petit nombre sur un grand site.
- certains sites possèdent une végétation dense en berge qui complique les recherches et facilite la cache de l'espèce
- les individus peuvent s'être déplacés entre l'analyse ADN et les actions d'éradication
- le ou les individus, ayant laissé leur ADN, ont très bien pu être prédatés s'ils étaient de petite taille.

Il est intéressant de noter l'intérêt de la méthode ADN dans l'anticipation des déplacements de la population invasive. Ce procédé permet ainsi d'orienter notre surveillance future.

Les analyses ADN ont également permis de constater l'absence de l'espèce suite à des actions d'éradication mises en place cette année. Ainsi, 8 sites aquatiques colonisés en 2011 en début de campagne ne le sont plus à la fin du mois d'août.

Il s'agit des sites suivants :

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX



Photo 3 : Etang Grand Boussay

Toutefois, concernant l'étang de Genièvres, la réponse négative à l'ADN est faussée par la nature de l'eau. En effet, lors des prélèvements d'eau sur ce site, nous avons observé quelques juvéniles Grenouille taureau dans l'eau. L'analyse aurait dû révéler leur présence.



Photo 4 : Juvénile g.taureau

L'eau étant chargée en matière organique argileuse, la silice ainsi présente fixe l'ADN en suspension dans l'eau. Lors du traitement en laboratoire, les échantillons sont filtrés et seul le filtrat est analysé. Dans ce cas précis, les résidus de silice restés dans le filtre ont gardé l'ADN de Grenouille taureau. Depuis cette réponse, un nouveau protocole d'extraction de l'ADN sur les échantillons a été mis en place afin que l'argile en suspension relargue l'ADN qu'elle fixe.

Etant donné que les autres sites analysés ne possédaient pas une eau aussi turbide (forte concentration en matière organique en suspension), il n'y a donc pas de raison de remettre en cause la validité des autres réponses ADN.

Commentaires sur ces 8 sites découverts éradiqués en 2011 après action :

- Cette méthode peut permettre de juger de l'efficacité des opérations d'éradication.
- L'analyse doit prendre en compte la persistance de l'ADN dans l'eau une fois l'individu éliminé ou déplacé, généralement 15 jours.

Suite aux résultats d'analyse ADN, certains sites aquatiques ayant une réponse positive n'ont pas bénéficié d'actions d'éradication supplémentaires.

Il s'agit des sites suivants :

- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

En effet, nous avons effectué des actions d'éradications avant d'avoir les résultats ADN car l'espèce avait été détectée par nos méthodes classiques. Ces opérations ont permis d'éliminer tous les individus visibles.

Cette réponse positive malgré l'élimination de l'espèce peut s'expliquer par la persistance de l'ADN dans l'eau douce qui est de 15 jours (Dejean *et al.* 2011).

Enfin, les opérations d'éradication nocturnes en septembre sont très peu appréciées par les propriétaires ayant une activité cynégétique sur leur étang, nous nous efforçons dans la mesure du possible d'éviter des actions de tirs si elles ne sont pas justifiées. Par exemple : si il ne reste pas d'individu vivant après la dernière opération de tir, nous n'en faisons pas une supplémentaire.



Photo 6 : Etang ferme de Chancay Nord



Photo 5 : Mare aux cerfs

Les opérations d'éliminations de la Grenouille taureau débutent généralement au début du mois de juin et se terminent à la fin du mois de septembre. Cette période est en lien avec l'activité sonore des mâles et la présence habituelle de cette espèce sur les sites aquatiques.

IV. Comparaison financière et temporaire entre les deux méthodes

Si la méthode ADN environnemental permet une détection plus précise de l'espèce que nos méthodes de surveillance classique, il est nécessaire de connaître les différences de temps et de budget entre ces deux méthodes.

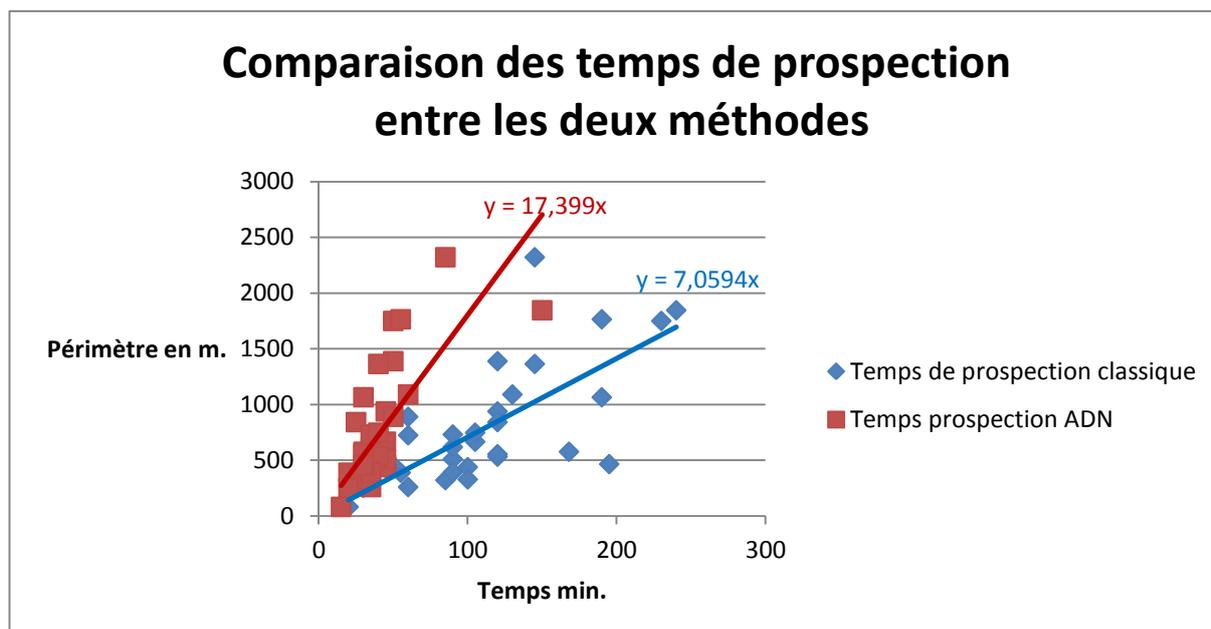
Tableau 3 : Comparatif temps méthodes

site	Temps de prospection classique par équipe en minute (*)	Périmètre en mètre	Temps prélèvement et préparation échantillons en minute(*)	Transect de prélèvement en mètres (**)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	168	575	30	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	190	1064	30	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	25	321	30	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	195	464	45	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	105	665	45	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	100	437	45	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	90	508	45	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	120	937	45	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	85	320	25	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	100	327	30	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	230	1749	50	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	145	2321	85	2000
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	45	429	35	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	90	617	35	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	120	531	40	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	120	1388	50	800
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	130	1089	60	800
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	190	1764	55	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	120	841	25	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	120	553	30	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	55	387	20	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	60	723	35	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	30	252	20	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	145	1363	40	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	90	730	35	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	60	889	50	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	240	1845	90	1200
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	60	258	35	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	105	746	40	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	90	390	35	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	50	451	30	400
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	20	80	15	400
	3493	25014	1385	16000

(*) temps terrain en minute par rapport aux fiches rédigées

(**) transect de prélèvement, 400 m pour 1 analyse, 800 m pour 2 ... 2000 m pour 5.

IV.1 Différence de temps



Le graphique ci-dessus permet de comparer la répartition des temps selon la méthode utilisée.

La série en rouge représente le temps nécessaire au prélèvement de l'eau pour l'analyse ADN selon le périmètre de l'étang. La série bleue représente le temps nécessaire à une prospection classique pour ces mêmes sites.

En comparant les deux séries de points, celle de la méthode ADN occupe une plage horaire plus restreinte que celle occupée par l'inventaire classique. Cela nous informe visuellement que la nouvelle méthode est plus rapide.

Pour comparer les deux méthodes, nous avons tracé la courbe de tendance linéaire des deux séries et comparé ensuite leur coefficient directeur.

X = temps en minute et Y = périmètre en mètre.

Pour la prospection ADN : $y = 17.399x$
 Pour la prospection classique : $y = 7.0594x$
 Soit, $17.399 / 7.0594 = 2.46$

Ainsi, pour les 32 sites prospectés, la méthode ADN a demandé 2.5 fois moins de temps que la méthode classique.

IV.2 Différence de budget

En partant du principe que la méthode ADN demande 2.5 fois moins de temps que la méthode classique sur le terrain, et sachant le coût d'une analyse ADN en laboratoire, nous pouvons connaître la méthode la plus rentable.

Le montant des 40 analyses effectuées sur les 32 sites s'élève à 4784€ TTC, soit 119.60€ TTC par analyse. Nous avons effectué 5 jours de prélèvement à deux chargés d'études à 538€ TTC la journée par personne, soit un montant de 5382€ TTC uniquement pour la phase terrain en journée.

La méthode ADN a donc représenté un coût 10 166€ TTC pour 32 sites, soit un peu moins de 318€ TTC par site (temps de prélèvement et coût analyse en laboratoire compris).

L'inventaire classique a demandé 12 jours à deux chargés d'études (538€TTC/pers.), soit 12 912€ TTC. Cet inventaire, ayant été effectué principalement la nuit afin d'avoir une détection plus fine, nécessite de rajouter un temps de récupération des équipes de terrain qui est d'une journée par nuit effectuée (12 912 x 2), soit 807€ TTC par site en prospection nocturne (25 824€ / 32 sites).

La méthode classique représente un effort financier 2.5 plus important et avec une détection moins précise de l'espèce que celle apportée par l'ADN.

Cette comparaison a été effectuée sans prendre en compte les temps de déplacement des véhicules et sans compter le temps nécessaire pour la prise de contact avec les propriétaires des sites analysés. En effet, quelque soit la méthode utilisée, ces opérations sont indispensables.



Photo 8 : Echantillonnage ADN



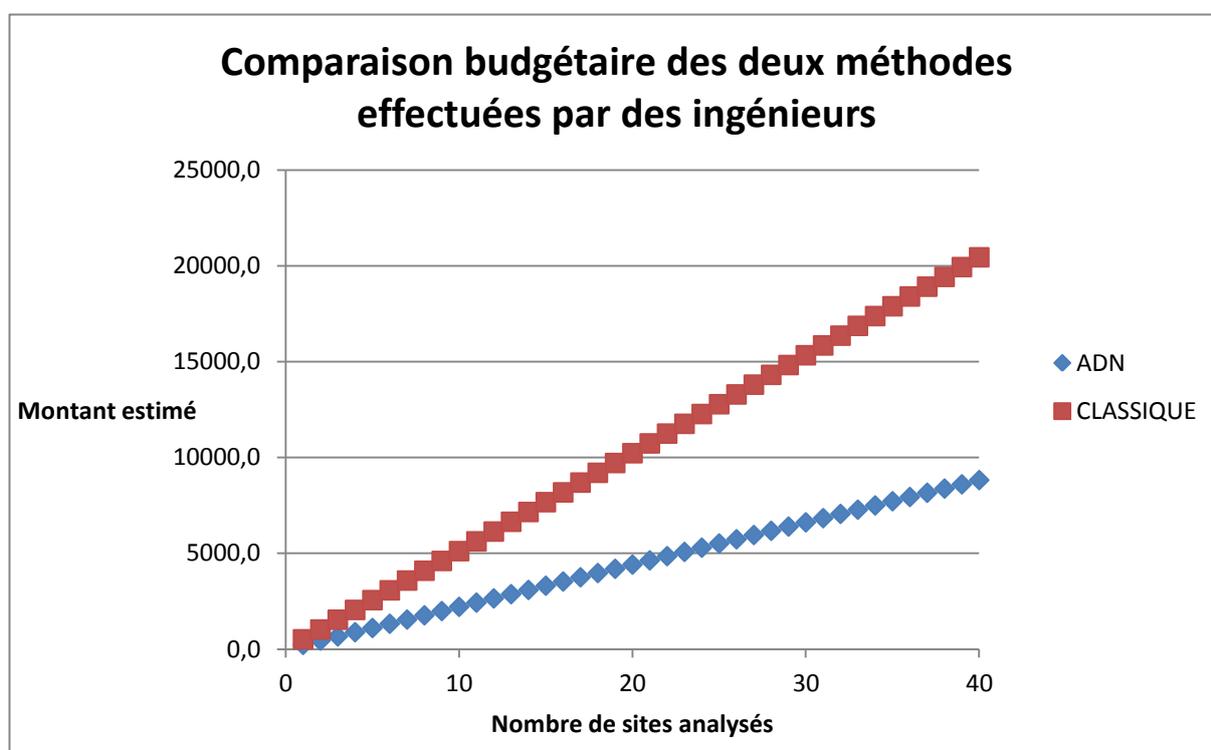
Photo 7 : Prospection nocturne

- **Comparaison théorique des deux méthodes pour une équipe de deux ingénieurs**

Un site fait en moyenne 800 mètres de périmètre, il faudra 0.75 heures pour qu'une équipe effectue le prélèvement d'eau pour l'analyse ADN et 1.90 heures pour prospecter au phare. Il reste à ajouter le prix d'une analyse ADN en laboratoire (119.60€ TTC).

Le coût journalier d'un ingénieur est de 538€ TTC, 1 076 TTC par équipe de deux. La même équipe de nuit demande le double si nous comptons les journées de récupération soit 2 153€ TTC.

Ci-dessous un graphique comparant le budget approximatif et théorique des deux méthodes de détection effectuées par une équipe de deux ingénieurs.



La différence budgétaire entre les deux méthodes avoisine les 12 000€ TTC en faveur de l'analyse ADN. Cette méthode novatrice permet une économie importante car les opérations de terrain sont réalisées le jour.

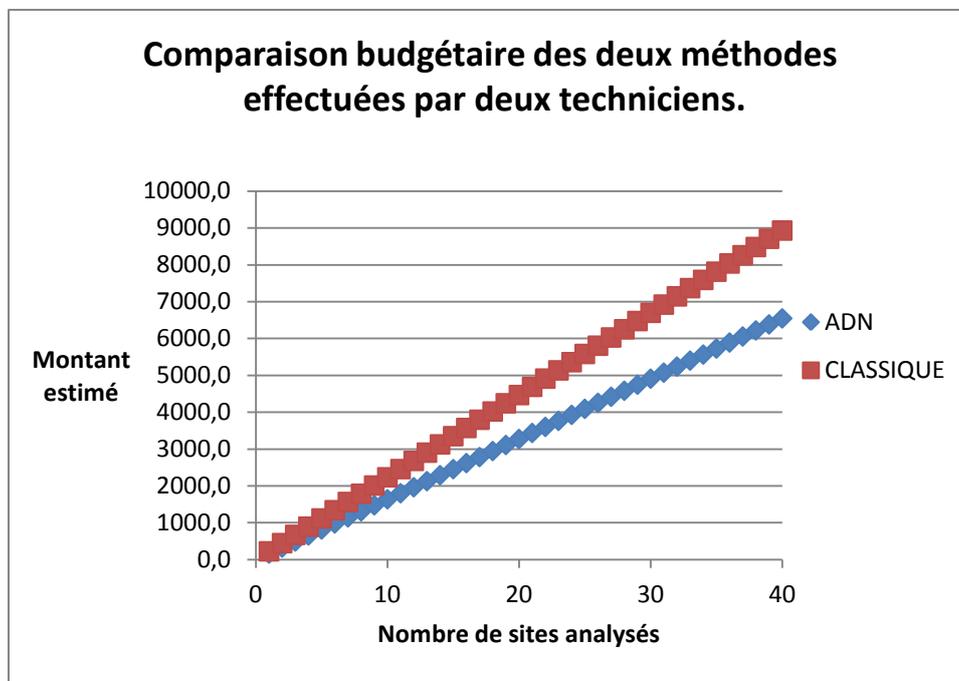
Le tableau en page suivante récapitule les calculs effectués.

Tableau 4 : Budgets théoriques équipe ingénieurs

Equipe : 2 ingénieurs										
Nombre de site	Analyse ADN diurne					Inventaire classique nocturne				Différence
	Analyse en € TTC	Temps en h pour faire 800 m en ADN	Soit en journée de 8h	coût équipe ingénieurs jour (538€*2)	ADN	Temps en h pour faire 800 en CLASSIQUE	Soit en journée de 8h	coût équipe ingénieurs jour (538€*4)	CLASSIQUE	
1	119,6	0,75	0,09	1076	220,5	1,9	0,24	2152	511,1	290,6
2	239,2	1,5	0,19	1076	441,0	3,8	0,48	2152	1022,2	581,3
3	358,8	2,25	0,28	1076	661,4	5,7	0,71	2152	1533,3	871,9
4	478,4	3	0,38	1076	881,9	7,6	0,95	2152	2044,4	1162,5
5	598	3,75	0,47	1076	1102,4	9,5	1,19	2152	2555,5	1453,1
6	717,6	4,5	0,56	1076	1322,9	11,4	1,43	2152	3066,6	1743,8
7	837,2	5,25	0,66	1076	1543,3	13,3	1,66	2152	3577,7	2034,4
8	956,8	6	0,75	1076	1763,8	15,2	1,90	2152	4088,8	2325,0
9	1076,4	6,75	0,84	1076	1984,3	17,1	2,14	2152	4599,9	2615,6
10	1196	7,5	0,94	1076	2204,8	19	2,38	2152	5111,0	2906,3
11	1315,6	8,25	1,03	1076	2425,2	20,9	2,61	2152	5622,1	3196,9
12	1435,2	9	1,13	1076	2645,7	22,8	2,85	2152	6133,2	3487,5
13	1554,8	9,75	1,22	1076	2866,2	24,7	3,09	2152	6644,3	3778,1
14	1674,4	10,5	1,31	1076	3086,7	26,6	3,33	2152	7155,4	4068,8
15	1794	11,25	1,41	1076	3307,1	28,5	3,56	2152	7666,5	4359,4
16	1913,6	12	1,50	1076	3527,6	30,4	3,80	2152	8177,6	4650,0
17	2033,2	12,75	1,59	1076	3748,1	32,3	4,04	2152	8688,7	4940,6
18	2152,8	13,5	1,69	1076	3968,6	34,2	4,28	2152	9199,8	5231,3
19	2272,4	14,25	1,78	1076	4189,0	36,1	4,51	2152	9710,9	5521,9
20	2392	15	1,88	1076	4409,5	38	4,75	2152	10222,0	5812,5
21	2511,6	15,75	1,97	1076	4630,0	39,9	4,99	2152	10733,1	6103,1
22	2631,2	16,5	2,06	1076	4850,5	41,8	5,23	2152	11244,2	6393,8
23	2750,8	17,25	2,16	1076	5070,9	43,7	5,46	2152	11755,3	6684,4
24	2870,4	18	2,25	1076	5291,4	45,6	5,70	2152	12266,4	6975,0
25	2990	18,75	2,34	1076	5511,9	47,5	5,94	2152	12777,5	7265,6
26	3109,6	19,5	2,44	1076	5732,4	49,4	6,18	2152	13288,6	7556,2
27	3229,2	20,25	2,53	1076	5952,8	51,3	6,41	2152	13799,7	7846,9
28	3348,8	21	2,63	1076	6173,3	53,2	6,65	2152	14310,8	8137,5
29	3468,4	21,75	2,72	1076	6393,8	55,1	6,89	2152	14821,9	8428,1
30	3588	22,5	2,81	1076	6614,3	57	7,13	2152	15333,0	8718,7
31	3707,6	23,25	2,91	1076	6834,7	58,9	7,36	2152	15844,1	9009,4
32	3827,2	24	3,00	1076	7055,2	60,8	7,60	2152	16355,2	9300,0
33	3946,8	24,75	3,09	1076	7275,7	62,7	7,84	2152	16866,3	9590,6
34	4066,4	25,5	3,19	1076	7496,2	64,6	8,08	2152	17377,4	9881,2
35	4186	26,25	3,28	1076	7716,6	66,5	8,31	2152	17888,5	10171,9
36	4305,6	27	3,38	1076	7937,1	68,4	8,55	2152	18399,6	10462,5
37	4425,2	27,75	3,47	1076	8157,6	70,3	8,79	2152	18910,7	10753,1
38	4544,8	28,5	3,56	1076	8378,1	72,2	9,03	2152	19421,8	11043,8
39	4664,4	29,25	3,66	1076	8598,5	74,1	9,26	2152	19932,9	11334,4
40	4784	30	3,75	1076	8819,0	76	9,50	2152	20444,0	11625,0

- Comparaison pour une équipe de deux techniciens

Les calculs ont été effectués en prenant comme coût journalier une base de 235€ TTC par technicien, soit 470€ TTC par équipe de jour et 940€ TTC pour les nuits en comptant une journée de récupération par nuit effectuée.



La méthode ADN permet une économie de 2 383€ TTC par rapport à un inventaire optimal nocturne si deux techniciens effectuent les opérations de terrain.

Commentaires :

- La méthode ADN est plus rentable que la prospection optimale nocturne à l'aide d'un phare quelque-soit le statut de l'équipe effectuant les opérations de terrain.
- La méthode classique de prospection nocturne permet d'avoir une réponse moins précise si la densité de population de Grenouille taureau sur le site est faible mais elle apporte une réponse quasi-immédiate de l'état de la colonisation alors que l'analyse ADN demande un temps de latence justifié par les analyses effectuées en laboratoire.

V. Conclusion

L'étude de comparaison entre les méthodes actuelles de détection de l'espèce exotique envahissante Grenouille taureau nous a permis de constater les avantages et inconvénients pour chacune d'elles.

La méthode de prospection nocturne, bien que chronophage, permet d'avoir une réponse immédiate de l'état de colonisation d'un site. Cette réponse est malheureusement densité-dépendante. Ainsi, les probabilités de découvrir une petite population sur un site sont réduites quand celui-ci possède une grande surface.

A l'inverse, la méthode novatrice de détection par « ADN environnemental » est plus rapide à réaliser sur le terrain mais demande un temps de latence incompressible à cause des manipulations réalisées en laboratoire. Par contre, la réponse est plus précise car cette méthode permet de détecter la colonisation d'un site même si la population présente est faible. La preuve en est que certains sites positifs à l'ADN n'ont pas été détecté par nos méthodes classiques. Néanmoins ce type de réponse nous permet d'orienter nos futures opérations de veille environnementale.

VI. Annexe

Rapport SPYGEN



SPYGEN[®]
la biodiversité
à la loupe



Détection de la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) grâce à l'ADN environnemental

CDPNE – Octobre 2011

www.spygen.fr



1°) Description du projet :

Code étude : P110060

Client : Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement de Loir-et-Cher (CDPNE)

- ✓ **Adresse :** Centre Administratif, Porte B, 34 avenue Maunoury, 41011 BLOIS
- ✓ **Contact :** Gabriel MICHELIN (Chargé d'études)
- ✓ **Téléphone :** 02 54 51 56 70 - **Fax :** 02 54 51 56 71 - **Email :** gabrielmichelin.cdpne@orange.fr

Responsables de l'étude : Tony DEJEAN (Président) - tony.dejean@spygen.fr (contact principal)
Dr Alice VALENTINI (Ingénieur R & D)

Type d'analyse : Détection d'une espèce cible en milieu aquatique stagnant grâce à l'ADN environnemental

Espèce cible : Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*)

Nombre de sites : 40



2°) Protocole d'analyse et contrôle qualité :

Les analyses ont été effectuées en suivant le protocole Ficetola *et al.* 2008 (voir annexe). Les extractions ont été réalisées dans une salle dédiée à l'ADN rare ou dégradé. Des contrôles négatifs ont été analysés simultanément, à chaque étape du protocole, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de détecter des contaminations croisées au cours de la manipulation. L'amplification de l'ADN, par Polymerase Chain Reaction (PCR), a été effectuée avec un couple d'amorces spécifiques pour la Grenouille taureau. Un contrôle positif (tissu de Grenouille taureau) a été analysé au cours de cette étape afin de contrôler les conditions d'amplifications.

➤ **Contrôles négatifs :**

Extraction - Nombre : 2 - Positifs ; Négatifs

PCR - Nombre : 2 - Positifs ; Négatifs

➤ **Contrôle positif :**

PCR : Positif : - Négatif :

1/2

Détection de la Grenouille taureau grâce à l'ADN environnemental - CDPNE - Octobre 2011



3°) Résultats :

N° échantillon	Détection de la Grenouille taureau	Nombre de réplicats positifs
1	non	0/8
2	non	0/8
3	oui	1/8
4	oui	7/8
5	non	0/8
6	non	0/8
7	oui	3/8
8	non	0/8
9	oui	2/8
10	non	0/8
11	oui	5/8
12	non	0/8
13	oui	1/8
14	non	0/8
15	oui	1/8
16	oui	2/8
17	non	0/8
18	non	0/8
19	non	0/8
20	non	0/8

N° échantillon	Détection de la Grenouille taureau	Nombre de réplicats positifs
21	non	0/8
22	non	0/8
23	non	0/8
24	non	0/8
25	oui	1/8
26	oui	2/8
27	non	0/8
28	oui	2/8
29	non	0/8
30	oui	1/8
31	non	0/8
32	non	0/8
33	non	0/8
34	oui	1/8
35	non	0/8
36	oui	2/8
37	non	0/8
38	non	0/8
39	non	0/8
40	non	0/8

4°) Commentaires :

La persistance de l'ADN environnemental dans un écosystème d'eau douce est d'environ 15 jours (Dejean *et al.* 2011 - voir annexe). Pour les sites où la présence de la Grenouille taureau a été détectée, cela signifie donc que l'espèce était présente lors de l'échantillonnage ou au maximum 15 jours avant la réalisation des prélèvements d'eau.

Le protocole d'échantillonnage (20 prélèvements d'eau) a été optimisé pour permettre la détection d'un individu peu mobile sur un site dont la surface est inférieure ou égale à un hectare. Sur des sites nouvellement colonisés par la Grenouille taureau ou sur lesquels des actions de lutte ont été menées, l'espèce peut être présente à une très faible densité de population. Sur les plans d'eau de grande taille (> 1 ha), nous recommandons donc d'augmenter le nombre de prélèvements (à définir selon la taille et la typologie du site).

Le Bourget du Lac, le 07 Octobre 2011

Tony DEJEAN
Président

Dr Alice VALENTINI
Ingénieur R & D

2/2

Détection de la Grenouille taureau grâce à l'ADN environnemental - CDPNE - Octobre 2011