



*LA DETECTION DES ESPECES
PAR L'ADN ENVIRONNEMENTAL :*

*VERS UN NOUVEL OUTIL DE
VEILLE ECOLOGIQUE DES
MILIEUX AQUATIQUES
STAGNANTS*

PAR PAULINE JEAN



Membres du jury :

M. Tony DEJEAN
Président de SPYGEN

M. Hervé PIEGAY
Directeur de recherches CNRS

M. Pierre SAGNES
Maître de conférences à
l'Université Lyon 1

Organisme d'accueil :

SPYGEN®

17, rue du Lac Saint-André
Bâtiment Koala
Savoie Technolac
73375 Le Bourget du Lac

Crédits photos :

Du coin supérieur gauche au coin inférieur droit :

Cistude d'Europe (Emys orbicularis), Photo : SPYGEN

Zwetschgenmatte dans la Réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne, Photo : Pauline Jean

Orthétrum reticulé (Orthetrum cancellatum), Photo : Pauline Jean

La Heïd dans la Réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne, Photo : Pauline Jean

Ecrevisse de Louisiane (Procambarus clarkii), Photo : <http://www.eau-artois-picardie.fr/Les-especes-invasives.html>

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps Tony DEJEAN, président de la société SPYGEN, pour m'avoir accueillie au sein de sa structure, pour m'avoir épaulée tout au long de ces six mois et pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions.

Merci à Alice VALENTINI et à Coline GABORIAUD, pour m'avoir formée et aidée lors des analyses en laboratoire.

Un grand merci également à toute l'équipe de la société SPYGEN : les trois personnes citées précédemment, Eva BELLEMAIN, Delphine COLOMBET, ainsi que Damien FONTAINE et Raphael CIVADE, pour leur bonne humeur quotidienne et leur gentillesse. Beaucoup de choses apprises avec eux dans des domaines divers, notamment grâce à la « minute culture » à chaque repas !

Puis, dans le désordre, je tiens à remercier les personnes extérieures à la société : Nicolas POULET (ONEMA) et Jessica THEVENOT (MNHN) pour leur aide durant les entretiens ; Anthony OLIVIER (Tour du Valat), Sébastien FICHEUX (Tour du Valat), Claire KOENIG (Tour du Valat), Christiane JAKOB (ONCFS), Jean-Yves GEORGES (IPHC) et Guillaume BAZIN (IPHC) pour leur accueil et leur aide lors des prélèvements des échantillons d'eau en Camargue et en Petite Camargue Alsacienne et pour la réalisation des inventaires classiques en parallèle ; Pierre SAGNES (Université Lyon 1) pour son accompagnement universitaire ; et enfin toutes les personnes qui ont pris le temps de répondre à mon questionnaire.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 3 |
| 1 Introduction | 6 |
| 1.1 <i>Présentation de la structure d'accueil</i> | 6 |
| 1.2 <i>Synthèse bibliographique : la détection des espèces en milieu aquatique, une nouvelle approche basée sur l'adn environnemental</i> | 6 |
| 1.2.1 Le statut des espèces aquatiques et les méthodes d'inventaire existantes | 7 |
| 1.2.1.1 Les espèces menacées et protégées | 7 |
| 1.2.1.2 Les espèces exotiques et exotiques envahissantes | 8 |
| 1.2.1.3 Des espèces parfois difficiles à détecter | 10 |
| 1.2.2 Une nouvelle méthode pour la détection des espèces aquatiques : l'ADN environnemental (ADNe) | 11 |
| 1.2.2.1 Qu'est-ce que l'ADN environnemental? | 11 |
| 1.2.2.2 Les utilisations de l'ADN environnemental | 11 |
| 1.2.2.3 Les étapes d'un projet d'ADN environnemental | 14 |
| 1.2.2.4 Les intérêts et les limites de la méthode d'ADN environnemental | 16 |
| 1.2.3 Conclusion et Perspectives | 17 |
| 1.3 <i>Description de l'étude</i> | 18 |
| 2 Entretiens | 19 |
| 2.1 <i>Protocole d'entretien</i> | 19 |
| 2.1.1 But des entretiens | 19 |
| 2.1.2 Population étudiée | 19 |
| 2.1.3 Processus d'entretien | 21 |
| 2.1.3.1 Les questions posées | 21 |
| 2.1.3.2 Mise en œuvre des entretiens | 21 |
| 2.1.3.3 Traitement des résultats | 21 |
| 2.2 <i>Analyse des résultats</i> | 22 |
| 2.2.1 Objectif 1 : Déterminer les groupes taxonomiques à suivre dans le cadre d'un outil de veille écologique. | 22 |
| 2.2.2 Objectif 2 : Identifier les structures qui pourraient intégrer l'outil de veille écologique dans leur programme et qui souhaiteraient devenir partenaires du réseau ADNe. | 23 |
| 2.2.3 Objectif 3 : Déterminer l'utilité d'une carte de répartition des espèces pour les différentes personnes interrogées. | 25 |
| 2.3 <i>Vision critique des entretiens</i> | 27 |
| 2.4 <i>Synthèse des entretiens</i> | 27 |
| 3 Etudes comparatives | 29 |
| 3.1 <i>Introduction</i> | 29 |
| 3.2 <i>Matériel et Méthodes</i> | 30 |
| 3.2.1 Méthodes d'inventaire utilisées | 30 |
| 3.2.1.1 Les méthodes d'inventaire classiques | 30 |
| 3.2.1.2 Les méthodes d'inventaire basées sur l'étude de l'ADNe | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2 Analyses en laboratoire | 34 |
| 3.2.2.1 Extraction d'ADN et tests d'inhibition | 34 |
| 3.2.2.2 Amplification de l'ADN par PCR quantitative et analyse des résultats pour la méthode de barcoding ADNe | 34 |
| 3.2.2.3 Amplification de l'ADN par PCR classique, séquençage et analyses bioinformatiques pour la méthode de métabarcoding ADNe | 35 |
| 3.3 Résultats..... | 36 |
| 3.3.1 Comparaison entre deux méthodes de barcoding ADNe et les méthodes d'inventaire classiques | 36 |
| 3.3.1.1 Les deux méthodes de barcoding ADNe | 36 |
| 3.3.1.2 Les méthodes de barcoding ADNe et les méthodes d'inventaire classique | 37 |
| 3.3.2 Comparaison entre la méthode de métabarcoding ADNe et les méthodes d'inventaire classiques .. | 39 |
| 3.3.2.1 Etude sur les Odonates | 39 |
| 3.3.2.2 Etude sur les Poissons | 40 |
| 3.4 Discussion et Perspectives..... | 42 |
| 3.4.1 Efficacité des méthodes d'inventaire basées sur l'étude de l'ADNe | 42 |
| 3.4.1.1 Dans le cas du barcoding ADNe | 42 |
| 3.4.1.2 Dans le cas du métabarcoding ADNe : | 42 |
| 3.4.2 Vers un nouvel outil de veille écologique..... | 44 |
| 4 Valorisation des données : création d'une carte interactive..... | 46 |
| 4.1 Introduction..... | 46 |
| 4.2 Présentation des maquettes proposées pour les différentes vues de la carte interactive | 47 |
| 4.2.1 Distribution d'une espèce cible | 47 |
| 4.2.2 Liste d'espèces présentes sur une maille donnée | 51 |
| 4.3 Perspectives | 51 |
| 5 Conclusion Générale | 54 |
| Bibliographie | 55 |
| Liste des figures..... | 60 |
| Liste des tableaux..... | 61 |

1 INTRODUCTION

1.1 PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

SPYGEN est un laboratoire d'analyse et de recherche spécialisé dans l'étude de l'ADN environnemental (ADNe). Il propose des expertises visant à détecter la présence d'espèces animales, végétales ou de micro-organismes à partir de traces d'ADN contenues dans des échantillons environnementaux (eau, sol, fèces). La technologie SPYGEN s'appuie sur le savoir-faire développé depuis plus de 10 ans par le Laboratoire d'Ecologie Alpine (CNRS - Université de Grenoble - Université de Savoie) et sur 6 brevets internationaux. Pour la réalisation de ses études, SPYGEN dispose d'une plateforme technologique de 200 m² spécialisée pour l'étude de l'ADN environnemental. L'entreprise emploie à l'heure actuelle cinq personnes réparties dans 3 pôles : Expertises terrestres, Expertises aquatiques et Recherche & Développement.

- le Pôle « Expertises terrestres » prend en charge les analyses liées à l'étude de la biodiversité du sol, aux régimes alimentaires d'espèces animales à partir de fèces ou à l'identification d'espèces à partir de poils ou de fèces.

- le Pôle « Expertises aquatiques » gère les analyses sur la détection d'espèces aquatiques ou semi-aquatiques (espèces rares, menacées ou envahissantes) à partir de prélèvements d'eau.

- le Pôle « Recherche & Développement » est centré sur l'amélioration des protocoles de terrain et de laboratoire existants et sur le développement de nouvelles expertises, aussi bien sur les milieux terrestres que sur les milieux aquatiques.

Mon stage a été réalisé au sein du Pôle « Recherche & Développement ».

Les clients de la société sont variés : associations, parcs naturels régionaux, parcs nationaux, entreprises, bureaux d'études,...

1.2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : LA DÉTECTION DES ESPÈCES EN MILIEU AQUATIQUE, UNE NOUVELLE APPROCHE BASÉE SUR L'ADN ENVIRONNEMENTAL

Les écosystèmes d'eau douce couvrent moins d'1% de la planète, mais ils sont considérés comme des hotspots de la biodiversité, avec environ 10% des espèces et un tiers des vertébrés actuellement connus (Vié *et al.* 2009, Strayer et Dudgeon 2010). Ils font partie des habitats les plus menacés sur Terre, avant les écosystèmes terrestres et marins, notamment à cause des impacts anthropiques générant une importante perte d'espèces (Dudgeon *et al.* 2006, Vié *et al.* 2009, Strayer et Dudgeon 2010, Hamblen *et al.* 2011). La perte de la biodiversité est l'un des plus grands problèmes auquel doit faire face la société d'aujourd'hui. A l'échelle mondiale, ce sont ainsi près de 4700 espèces animales d'eau douce qui sont considérées comme menacées ou récemment éteintes, soit plus d'un quart de la faune aquatique recensée jusqu'à présent (IUCNredlist 2013). Les menaces sont variées : surexploitation, pollution de l'eau, modification voire interruption du débit des cours d'eau, destruction ou fragmentation de l'habitat, prolifération d'espèces invasives, changements climatiques ... (Dudgeon *et al.* 2006, Vié *et al.* 2009).

Limiter la perte de la biodiversité est un réel défi du fait du manque de connaissances sur la distribution des espèces et sur leur taux de disparition (Magurran *et al.* 2010). Ainsi, de nombreuses espèces aquatiques sont encore classées en « Données insuffisantes » dans la liste rouge à cause du peu de connaissances sur leur répartition (Vié *et al.* 2009). Par exemple, à l'échelle française, 22

espèces de Poissons ne présentent pas assez de données pour permettre leur évaluation (UICN France *et al.* 2010).

De façon plus générale, les connaissances sur la biodiversité, aussi bien au niveau de la diversité des espèces que de leur répartition, est primordiale pour la mise en place d'actions de gestion adaptées, pour la définition d'aires de conservation, mais également dans le cas d'études d'impact environnemental où les inventaires de la biodiversité sont obligatoires. Cela est d'autant plus vrai pour des espèces à enjeux telles que les espèces menacées et/ou protégées, qui nécessitent des actions pour maintenir leurs populations, et pour les espèces exotiques et/ou exotiques envahissantes qui doivent être contrôlées ou même éradiquées pour éviter la dégradation des écosystèmes aquatiques et du cortège d'espèces qui leur est associé. Afin de garantir l'exhaustivité de ces connaissances, la probabilité de détection des espèces doit être élevée, même lorsqu'elles sont présentes en faible abondance. Or, dans ce dernier cas ou bien en présence d'espèces cryptiques, les techniques actuelles sont souvent peu efficaces (Hulme 2006, Dejean *et al.* 2012). Une méthode innovante, basée sur l'étude de l'ADN environnemental, permet de pallier à ce problème (Ficetola *et al.* 2008, Taberlet *et al.* 2012). Cette technique permet de détecter la présence d'une ou plusieurs espèces aquatiques, uniquement à partir de prélèvements d'eau, sans avoir besoin de capturer des organismes.

Cette synthèse est divisée en deux principales parties. Dans un premier temps, je définirai les termes d'espèces menacées ou protégées et d'espèces exotiques ou exotiques envahissantes, puis j'expliquerai les problèmes liés à la détection de ces espèces par des méthodes classiques. Dans un second temps, je présenterai la nouvelle méthode de détection des espèces basée sur l'ADN environnemental, en développant les différentes utilisations de cette méthode, les étapes à réaliser (sur le terrain et en laboratoire) ainsi que les limites de cette approche.

1.2.1 Le statut des espèces aquatiques et les méthodes d'inventaire existantes

1.2.1.1 Les espèces menacées et protégées

Le degré de menace d'une espèce est donné par la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN). Une espèce est considérée comme menacée si elle fait partie d'une des trois catégories suivantes : vulnérable, en danger et en danger critique. Ces catégories sont définies à l'aide de cinq critères (UICN 2012 ; *cf.* Annexe 1) :

- A. Réduction de la taille de population,
- B. Faible répartition géographique (zone d'occurrence et/ou zone d'occupation),
- C. Petite population et déclin,
- D. Population très petite ou restreinte,
- E. Forte probabilité d'extinction.

En 2004, Stuart *et al.* ont par exemple montré que les Amphibiens présentaient un déclin et un risque d'extinction supérieur à celui des Oiseaux et des Mammifères, avec 1856 espèces menacées sur un total de 5743 à l'échelle mondiale. Ces résultats n'ont pas évolué dans le bon sens depuis, puisque d'après le comité français de l'UICN (2012), plus de 20% des Amphibiens et des Poissons sont actuellement menacés en France métropolitaine.

Les espèces protégées sont quant à elles définies d'après plusieurs textes réglementaires. A une échelle européenne, les espèces inscrites dans la directive « Habitats, Faune, Flore » nécessitent la mise en place d'une protection stricte dans le cas de l'annexe IV et la mise en place de zones spéciales de conservation dans le cas de l'annexe II. A l'échelle française, le code de l'environnement (articles L. 411-1 et L. 411-2) fixe des interdictions portant sur « la destruction ou l'enlèvement des œufs ou des nids, la mutilation, la destruction, la capture ou l'enlèvement, la perturbation intentionnelle, la naturalisation d'animaux de ces espèces ou, qu'ils soient vivants ou morts, leur transport, leur colportage, leur utilisation, leur détention, leur mise en vente, leur vente ou leur achat », ainsi que sur la destruction, l'altération ou la dégradation de leurs habitats. La liste de ces espèces est définie par des arrêtés interministériels pour chaque groupe taxonomique : les Amphibiens et les Reptiles, les Ecrevisses, les Insectes, les Mammifères, les Mollusques, les Oiseaux, les Poissons et les espèces végétales (Puissauve 2012) (cf. Annexe 2).

1.2.1.2 Les espèces exotiques et exotiques envahissantes

Les invasions biologiques ont été reconnues par le Millenium Ecosystem Assessment (2005) comme étant une des cinq principales causes de la perte de la biodiversité. De plus en plus d'espèces sont introduites, volontairement ou non, et peuvent ainsi causer des dommages aux écosystèmes dans lesquels elles s'établissent.

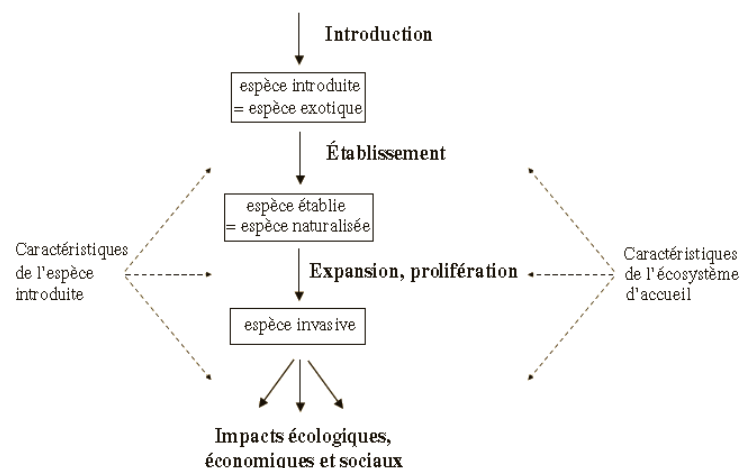
Dans un premier temps, il est important de définir les termes "espèce exotique" et "espèce exotique envahissante" car le sens de ces notions diffère parfois selon leur utilisateur.

Une espèce exotique est une espèce introduite volontairement ou accidentellement en dehors de son aire de répartition naturelle (Pysek *et al.* 2009, Thévenot *et al.* 2013).

Pour passer d'une espèce exotique à une espèce exotique envahissante (EEE), traduit de l'anglais "Invasive Alien Species" (IAS), différentes étapes sont nécessaires. L'espèce exotique ou espèce introduite doit s'établir en dehors de son aire de répartition naturelle, proliférer, puis avoir des impacts négatifs sur la diversité biologique, la santé humaine ou encore l'économie (cf. Figure 1 ; Lodge *et al.* 2006, Goudard 2007, Thévenot *et al.* 2013). Dans ce rapport, le terme « espèce invasive » sera synonyme du terme « espèce exotique envahissante ». Ce n'est cependant pas toujours le cas, les opinions scientifiques étant divergentes quant à la prise en compte des impacts dans la définition d'une espèce invasive (Thévenot *et al.* 2013).

Les espèces exotiques sont donc aussi importantes à surveiller que les espèces exotiques envahissantes puisque leur potentiel invasif peut se révéler après un certain temps.

Figure 1 : D'une espèce introduite à une espèce invasive : les différents stades d'une invasion biologique et les facteurs d'influence (Goudard 2007).



L'Écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) est un bon exemple d'espèce exotique envahissante en milieu aquatique. Originaires du Mexique et de l'Est des États-Unis, elle a été introduite à des fins commerciales en Europe à partir des années 1970. L'Écrevisse de Louisiane possède un large spectre alimentaire qui a pour conséquence une modification importante de la structure des communautés aquatiques (Ilhéu *et al.* 2007). Elle a un impact négatif sur les Écrevisses natives via l'exclusion compétitive et la transmission d'un champignon pathogène (*Aphanomyces astaci*), mais également sur de nombreux autres organismes tels que les Amphibiens, les Poissons et les Invertébrés benthiques via la prédation (*e.g.* Rudnick et Resh 2005, Ilhéu *et al.* 2007). De plus, MacMahon *et al.* (2013) ont montré que l'Écrevisse de Louisiane pouvait être un porteur sain d'un champignon pathogène (*Batrachochytrium dendrobatidis*), responsable de la chytridiomycose, maladie infectieuse décimant les populations d'Amphibiens (Skerratt *et al.* 2007).

De nouvelles approches ont émergé afin d'évaluer les impacts des espèces invasives en termes économiques (Pysek et Richardson 2010). Les coûts engendrés par les espèces invasives comprennent à la fois les impacts sur la biodiversité, sur les services écosystémiques et les dépenses liées au contrôle de ces espèces et à la limitation de leurs dégâts.

A l'aide de la base de données DAISIE (Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe), Vilà *et al.* (2010) ont identifié 481 espèces invasives dans la faune et la flore d'eau douce européenne. Quatre espèces aquatiques ou semi-aquatiques font partie des espèces invasives présentant le plus d'impacts : le Ragondin (*Myocastor coypus*), le Saumon de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), l'Érismature rousse (*Oxyura jamaicensis*) et l'Écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) (Vilà *et al.* 2010). L'Érismature rousse et le Ragondin (*Myocastor coypus*) font partie des 10 espèces qui génèrent le plus de coûts (Vilà *et al.* 2010). Ainsi, les actions de contrôle du Ragondin et la réparation de ses dégâts sont revenues à 2.85 millions d'euros par an en Italie entre 1995 et 2000 (Panzacchi *et al.* 2007).

Différentes actions peuvent être successivement menées dans le cadre de la gestion des espèces invasives : prévenir l'introduction d'espèces présentant un risque d'invasion, détecter précocement ces espèces et agir rapidement ou bien gérer les espèces par l'éradication ou le contrôle (Hulme 2006, Pysek et Richardson 2010, Simberloff *et al.* 2012). Dans le cadre de la prévention, deux arrêtés ont été mis en place sur le territoire métropolitain français : le premier date du 2 mai 2007 et interdit la commercialisation, l'utilisation et l'introduction dans le milieu naturel de la Jussie à grandes fleurs (*Ludwigia grandiflora*) et de la Jussie rampante (*Ludwigia peploides*); le deuxième date du 30 juillet 2010 et interdit l'introduction dans le milieu naturel de certains Vertébrés avec entre autres la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) et toutes les espèces de Tortues du genre *Trachemys*. Une liste des espèces de Poissons, de Crustacés et de Grenouilles susceptibles de provoquer des déséquilibres biologiques dans les milieux aquatiques, dont font par exemple partie l'Écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) et à nouveau la Grenouille taureau, a également été mise en place (Article R432-5 du Code de l'Environnement). D'après l'étude de Panzacchi *et al.* (2007), l'éradication est une solution efficace et rentable sur le long terme comparée au contrôle des populations dans le cas du Ragondin (5 millions d'euros dépensés sur 11 ans contre 14 millions d'euros sur 6 ans). Cependant, l'éradication est surtout réalisable dans les premiers stades de l'invasion, quand les populations sont petites et localisées (Scalera et Zaghi 2004). Cela nécessite donc d'avoir rapidement détecté l'espèce, ce qui est souvent difficile lorsqu'elle est présente en faible densité (Pysek et Richardson 2010).

1.2.1.3 Des espèces parfois difficiles à détecter

La détection des espèces peut se révéler compliquée dans les milieux où elles sont peu visibles, notamment dans les écosystèmes aquatiques. Trois principales méthodes de détection sont à différencier : la détection à vue, la détection par le chant et la détection par le piégeage. Ces trois méthodes sont actuellement largement utilisées mais elles présentent quelques inconvénients. McClintock *et al.* (2010) ont par exemple montré que la détection des Anoures par le chant pouvait amener à des erreurs (aussi bien en termes de faux négatifs que de faux positifs). Ces erreurs seraient principalement dues à plusieurs facteurs : la distance entre l'émetteur du chant et l'observateur, la période et l'heure d'observation, le bruit ambiant et les capacités de reconnaissance des chants de l'observateur (McClintock *et al.* 2010). Une autre étude, menée par Tanadini et Schmidt (2011) sur 6 espèces d'Amphibiens (4 espèces d'Anoures et 2 espèces d'Urodèles) a démontré que même en combinant plusieurs méthodes (inventaires à vue et au chant), la probabilité de détection dépendait de la taille de la population et des conditions climatiques. Les Amphibiens sont en effet plus actifs et donc plus facilement observables durant les nuits chaudes et humides. Chez les Poissons, les inventaires sont souvent réalisés par piégeage, à partir de pêches aux filets ou de pêches électriques. L'échantillonnage à l'aide de filets maillants peut avoir des impacts négatifs sur les populations de Poissons présentes puisqu'elles entraînent souvent la mort des individus capturés. Ces méthodes présentent également une faible probabilité de capture par organisme, ne se révèlent exhaustives que pour des espèces présentes en moyenne ou en forte densité et conduisent souvent à des faux négatifs pour les espèces rares (Magnuson *et al.* 1994). De plus, avec ces différentes méthodes d'inventaires, les risques de contamination entre sites (transmission de pathogènes ou d'espèces exotiques envahissantes) sont non négligeables.

Dans le cas des espèces invasives, où la solution idéale pour une meilleure gestion est la détection précoce, l'incapacité de détection en dessous d'un certain seuil de densité est un réel problème (Hulme 2006; Harvey *et al.* 2009). Or, plus le nombre d'individus présents est élevé, plus les impacts sur l'écosystème d'accueil seront importants et plus les coûts d'éradication et de contrôle seront élevés (Hulme 2006). L'augmentation de l'intensité d'échantillonnage permettrait un abaissement du seuil de détection mais cela engendrerait une augmentation considérable des coûts, sans réelle garantie sur les résultats. Par exemple, dans l'étude de Harvey *et al.* (2009), malgré les 100 échantillons prélevés, la Puce d'eau recherchée (*Cercopagis pengoi*), n'a pas été retrouvée dans le lac Ontario lorsque les densités étaient faibles. Il est donc important de trouver des techniques adaptées permettant une détection exhaustive des espèces présentes, même si les individus sont peu abondants.

D'autres problèmes viennent s'ajouter aux difficultés de détection. Une fois un organisme détecté, il n'est pas toujours facile de déterminer à quelle espèce il appartient, notamment pour des espèces cryptiques (Knowlton 1993). De plus, dans certains cas, les clés de détermination sont adaptées uniquement à un stade larvaire ou à un sexe. C'est le cas des Diptères, pour lesquels la détermination des espèces est principalement basée sur les organes génitaux mâles (Hennig 1976, d'après Valentini *et al.* 2008).

Des approches génétiques permettent de pallier à ces problèmes de détection et de détermination. A partir de prélèvements d'eau, il est maintenant possible de détecter des espèces ou des groupes taxonomiques préalablement ciblés. Cette nouvelle méthode, basée sur l'étude de l'ADN environnemental, a été initiée en 2008 dans les milieux aquatiques continentaux et se révèle très prometteuse (Ficetola *et al.* 2008).

1.2.2 Une nouvelle méthode pour la détection des espèces aquatiques : l'ADN environnemental (ADNe)

1.2.2.1 Qu'est-ce que l'ADN environnemental?

Le terme d'« ADN environnemental » (ADNe), défini comme étant l'ADN pouvant être extrait d'échantillons environnementaux tels que le sol, l'eau ou l'air, sans avoir besoin d'isoler au préalable des individus cibles, a été cité pour la première fois en 1987 par des microbiologistes (Ogram *et al.* 1987). Ce terme a réellement émergé dans les années 2000, avec diverses études menées sur les microorganismes présents dans le sol et dans l'eau (e.g. Rondon *et al.* 2000). Ce n'est que par la suite que les études ont été étendues à la méiofaune puis à la macrofaune (Bhadury *et al.* 2006, Ficetola *et al.* 2008).

L'ADNe est constitué d'un mélange d'ADN intracellulaire provenant de cellules vivantes et d'ADN extracellulaire issu de cellules dont la structure a été dégradée (Taberlet *et al.* 2012). Il est caractérisé par un mélange complexe d'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique provenant de différents organismes.

La technique de détection d'espèces par ADNe est aussi bien utilisée pour les milieux terrestres (avec entre autres l'analyse des fèces, des poils ou même du sol) que pour les milieux aquatiques, seuls traités dans la suite de ce rapport.

1.2.2.2 Les utilisations de l'ADN environnemental

La détection de l'ADN d'un organisme dans un environnement témoigne de la présence actuelle ou très récente de cet organisme dans le milieu échantillonné. En effet, l'ADNe ne persiste qu'entre 1 et 25 jours en milieu aquatique, la durée exacte étant dépendante entre autres de l'environnement, de l'exposition aux rayons UV, de l'acidité et de la température de l'eau et de la présence d'endo ou d'exonucléases (Dejean *et al.* 2011, Thomsen *et al.* 2012a et b).

L'ADNe peut être utilisé à de multiples fins : dans le cas d'une approche spécifique (barcoding ADNe) afin de détecter une espèce cible (espèce rare, cryptique, menacée ou invasive) ou bien dans le cas d'une approche multispécifique (metabarcoding ADNe) afin d'évaluer la biodiversité d'un milieu en s'intéressant à un ou plusieurs groupes taxonomiques (Taberlet *et al.* 2012).

Les termes « barcoding ADN » et « metabarcoding ADN » ont été à l'origine largement utilisés pour l'identification à un niveau spécifique à l'aide de marqueurs standards. Ce type de marqueur a été notamment créé pour les animaux (région de 658 bases du gène mitochondrial CO1, Hebert *et al.* 2003) et pour les plantes (2 fragments chloroplastiques *rbcl* et *matk*, CBoL Plant Working Group 2009). Les termes « barcoding ADNe » et « metabarcoding ADNe » ont ensuite été utilisés pour référer à l'ADNe, via l'utilisation de « mini-barcodes » permettant l'amplification d'ADN dégradé.

- **L'approche spécifique (barcoding ADNe)**

Diverses études utilisant l'ADNe ont été réalisées sur des espèces ciblées (*cf.* Tableau 1). Ces études avaient deux principaux objectifs : tester la méthode ADNe en comparaison avec des méthodes traditionnelles de terrain ou bien détecter des espèces rares, cryptiques, en danger d'extinction ou exotiques envahissantes. Plusieurs milieux aquatiques ont été étudiés à ce jour : les systèmes aquatiques continentaux lenticules (étangs, mares) et lotiques (ruisseaux, rivières) mais aussi les milieux marins.

Tableau 1 : Etudes utilisant l'approche barcoding ADN pour le suivi d'une espèce cible en milieu aquatique. Les espèces exotiques envahissantes sont indiquées en rouge, les espèces patrimoniales en vert (modifié d'après Pilliod et al. 2012).

| Espèce cible | Environnement | Méthode d'échantillonnage et de conservation | Source |
|--|--------------------------|--|-----------------------------|
| Grenouille taureau (<i>Lithobates catesbeianus</i>) | Aquariums (31) Etangs | 3 échantillons de 15ml d'eau par site + 1.5ml d'acétate de sodium + 33ml d'éthanol absolu. Echantillons conservés à température ambiante à court terme (quelques jours) puis au réfrigérateur sur des périodes plus longues (jusqu'à 1 mois). | Ficetola <i>et al.</i> 2008 |
| | Etangs et rivières | Même protocole que Ficetola <i>et al.</i> 2008. | Lloyd and Cunningham 2009 |
| | Etangs | 10ml d'eau collectés et placés directement sur de la glace puis conservée au congélateur (-20°C). | Lloyd and Cunningham 2011 |
| | Etangs | Même protocole que Ficetola <i>et al.</i> 2008. | Dejean <i>et al.</i> 2012 |
| Carpe à grosse tête (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>) Carpe argentée (<i>H. molitrix</i>) | Large rivières et canaux | 2l d'eau collectés, placés sur de la glace puis filtrés au laboratoire dans les 6h suivant la collecte à l'aide d'un filtre en fibre de verre (porosité 1.5µm). | Jerde <i>et al.</i> 2011 |
| Salamandre géante d'Idaho (<i>Dicamptodon aterrimus</i>) Grenouille-à-queue des Rocheuses (<i>Ascaphus montanus</i>) | Ruisseaux | 5l et 10l d'eau filtrés directement sur le terrain à l'aide d'un filtre en nitrate de cellulose (pores de 0.45µm). Le filtre est ensuite conservé dans de l'alcool à 95%. | Goldberg <i>et al.</i> 2011 |
| Hydrobie des antipodes (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>) | Rivières | 4l d'eau prélevés sur le terrain et filtrés dans les 12h à l'aide d'un filtre en nitrate de cellulose (pores de 0.45µm). Le filtre est ensuite conservé dans de l'alcool à 95%. | Goldberg <i>et al.</i> 2013 |
| Pelobate commun (<i>Pelobates fuscus</i>) Triton crêté (<i>Triturus cristatus</i>) Loche d'étang (<i>Misgurnus fossilis</i>) Loutre eurasiennne (<i>Lutra lutra</i>) Leucorrhine à gros thorax (<i>Leucorhinia pectoralis</i>) Lépidure (<i>Lepidurus apus</i>) | Etangs | Même protocole que Ficetola <i>et al.</i> 2008. | Thomsen <i>et al.</i> 2012a |
| Esturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) | Etangs | Même protocole que Ficetola <i>et al.</i> 2008. | Dejean <i>et al.</i> 2011 |

| Espèce cible | Environnement | Méthode d'échantillonnage et de conservation | Source |
|--|-----------------------|--|---|
| Carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i>) | Aquariums Etangs | 2l d'eau filtrés directement sur le terrain à l'aide d'un filtre de polycarbonate (porosité 3.0µm) ou d'un pré-filtre de polycarbonate (porosité 0.8µm). Filtres conservés sur la glace puis au congélateur au laboratoire (-18°C à -25°C). | Takahara <i>et al.</i> 2012 |
| Crapet arlequin (<i>Lepomis macrochirus</i>) | Etangs | 1l d'eau prélevé puis filtré au laboratoire selon un protocole identique à Takahara <i>et al.</i> 2012. | Takahara <i>et al.</i> 2013 |
| Salamandre-alligator (<i>Cryptobranchus a. alleganiensis</i>) | Rivières et ruisseaux | Même protocole que Jerde <i>et al.</i> 2011. | Olson <i>et al.</i> 2012 |
| Loche d'étang (<i>Misgurnus fossilis</i>) | Etangs | 20 échantillons de 40 ml collectés et mélangés dans un sac stérile. Après homogénéisation, 6 sous échantillons de 15ml prélevés et conservés dans des tubes de 50ml avec 1.5ml d'acétate de sodium et 33ml d'éthanol. Echantillons conservés à température ambiante à court terme (quelques jours) puis au réfrigérateur sur des périodes plus longues (jusqu'à 1 mois). | Herder <i>et al.</i> 2012 Protocole développé par SPYGEN |
| Marsouin commun (<i>Phocoena phocoena</i>) | Mer | 1 échantillon de 15ml d'eau par site collecté à 50cm de profondeur + 1.5ml d'acétate de sodium + 33ml d'éthanol absolu. | Foote <i>et al.</i> 2012 |

La première étude de barcoding ADNe à partir d'échantillons d'eau a été réalisée sur la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), une espèce exotique envahissante (Ficetola *et al.* 2008). Après évaluation de la distribution de l'espèce en France, 9 sites de densités différentes ont été choisis : 3 plans d'eau où la Grenouille taureau était présente en forte densité (des douzaines d'individus adultes et des centaines de têtards observés), 3 où elle était présente en faible densité (un ou deux individus adultes observés, pas de reproduction) et 3 où elle était absente. Trois prélèvements d'eau ont été réalisés sur chacun de ces 9 sites, et les analyses d'ADN effectuées en laboratoire ont montré une adéquation avec les résultats issus des inventaires classiques. Cette étude a permis une validation de la méthode d'ADNe pour la détection de la Grenouille taureau, même lorsque celle-ci était présente en faible densité.

Sur cette même espèce, une autre étude a montré que la méthode d'ADNe semblait plus performante que des méthodes d'inventaire d'amphibiens classiques en termes de sensibilité et d'effort d'échantillonnage (Dejean *et al.* 2012). En effet, à l'aide d'analyses ADNe, 38 des 49 sites étudiés se sont révélés positifs à la présence de la Grenouille taureau, contre 7 d'après les inventaires diurnes et nocturnes. Les résultats issus de l'approche ADNe ont été confirmés par la suite à l'aide d'un effort d'échantillonnage plus important.

L'approche de barcoding ADNe a également été testée chez les Invertébrés. Une espèce d'Odonate bénéficiant de divers statuts de protection dont la convention de Berne de 1979 et la Directive Habitats de 1992, la Leucorrhine à gros thorax (*Leucorrhinia pectoralis*), a été détectée par l'ADNe dans 9 des 11 mares où sa présence était avérée (Thomsen *et al.* 2012a). Dans cette même étude, une espèce de Branchiopode, le Lépidure (*Lepidurus apus*), a été détectée sur les 10 sites où elle avait été recensée.

L'étude de l'ADNe est donc une méthode efficace pour détecter une espèce présente en faible abondance, cryptique, menacée ou exotique envahissante.

- **L'approche multispécifique (metabarcoding ADN)**

Afin d'inventorier les espèces présentes dans un milieu pour un groupe taxonomique donné, le metabarcoding ADN est utilisé. Cette approche multispécifique permet d'identifier à la fois la biodiversité ordinaire, mais également les espèces menacées ou les espèces invasives présentes sur un site donné. L'ADN peut donc être utilisé comme outil d'inventaire ou de veille environnementale.

A ce jour, une seule étude a été publiée sur les milieux aquatiques avec cette approche. A partir de 3 prélèvements de 1.5l d'eau de mer, Thomsen *et al.* (2012b) ont détecté 15 espèces de Poissons provenant de 11 familles et de 9 ordres différents. La méthode d'ADN a été comparée à 9 autres méthodes plus classiques telles que des plongées de nuit pendant deux heures ou la mise en place de deux verveux. Ces dernières méthodes permettent de comptabiliser autant ou moins d'espèces que l'approche de metabarcoding ADN.

Une étude comparative sur les Poissons en milieu lotique, menée par SPYGEN en collaboration avec l'ONEMA, a montré des résultats prometteurs, en détectant avec l'ADN une diversité d'espèces relativement similaire à celle obtenue avec la pêche électrique sur chacun des 7 cours d'eau testés (Dejean *et al.* in prep).

1.2.2.3 Les étapes d'un projet d'ADN environnemental

- **Diverses stratégies d'échantillonnage**

Plusieurs stratégies d'échantillonnage en milieu aquatique ont été proposées dans la littérature (*cf.* Tableau 1) :

- Collecte de 3 échantillons de 15ml d'eau conservés dans un tube de 50ml contenant 33ml d'éthanol absolu et 1.5ml d'acétate de sodium (3M) (Ficetola *et al.* 2008),
- Collecte de 5l d'eau filtrés directement sur le terrain à l'aide d'un filtre en nitrate de cellulose (pores de 0.45µm) (Goldberg *et al.* 2011),
- Collecte de 2l d'eau puis filtration dans les 24 heures à l'aide d'un filtre en fibre de verre (pores de 1.5µm) (Jerde *et al.* 2011),
- Collecte de 2l d'eau filtrés rapidement au laboratoire sur membrane en acétate de cellulose (pores de 3.0µm) (Takahara *et al.* 2012).

La stratégie d'échantillonnage doit être en priorité adaptée à l'environnement (milieux continentaux lotiques/lentiques, milieux marins). Thomsen *et al.* (2012a) ont ainsi montré une différence de probabilité de détection entre les milieux lotiques (entre 27 et 54 % pour les deux espèces considérées) et les milieux lentiques (entre 82 et 100% pour les cinq espèces considérées). Dans ces deux types de milieux, les prélèvements ont été effectués comme préconisé dans l'étude de Ficetola *et al.* 2008. Cette technique fonctionne bien dans les milieux aquatiques stagnants, mais peu dans les milieux courants où l'ADN est transporté et dilué par le courant. La méthode de filtration paraît donc mieux adaptée dans ce dernier cas car de plus grands volumes d'eau sont échantillonnés, ce qui augmente la probabilité de détection d'ADN.

Les prélèvements doivent également être adaptés à la biologie des espèces ou du groupe cible. La présence d'un écologue est donc indispensable pour savoir où la probabilité de trouver l'espèce, ou le groupe cible, est la plus grande dans le milieu échantillonné.

- **Analyses en laboratoire**

Après la collecte sur le terrain, l'échantillon environnemental transmis au laboratoire est en premier lieu soumis à une étape d'extraction (cf. Figure 2).

Dans le cas du barcoding ADN :

L'extrait d'ADN est ensuite amplifié à l'aide d'un couple d'amorces adapté à l'espèce ciblée. Ce couple d'amorces doit amplifier une région inférieure à 150 paires de bases (pb) spécifique à l'espèce étudiée. Les résultats (présence/absence de l'espèce recherchée) sont obtenus directement à la suite d'une amplification par PCR classique ou par PCR en temps réel.

Dans le cas du metabarcoding ADN :

L'extrait d'ADN est amplifié à l'aide d'un couple d'amorces adapté au groupe taxonomique ciblé. Ce dernier doit répondre à plusieurs critères (Valentini *et al.* 2008) :

- amplifier une région de l'ADN inférieure à 150 pb
- amplifier de manière équivalente l'ensemble des espèces cibles
- avoir une bonne résolution taxonomique (idéalement à l'espèce)

Une fois la PCR classique effectuée, les fragments amplifiés sont séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération (cf. Figure 2). Cette étape permet de générer des millions de séquences ADN. Ces séquences sont ensuite comparées à des bases de données de référence (où les séquences sont connues et attribuées à des espèces) à l'aide d'outils bioinformatiques afin d'obtenir la liste des espèces présentes dans l'échantillon.

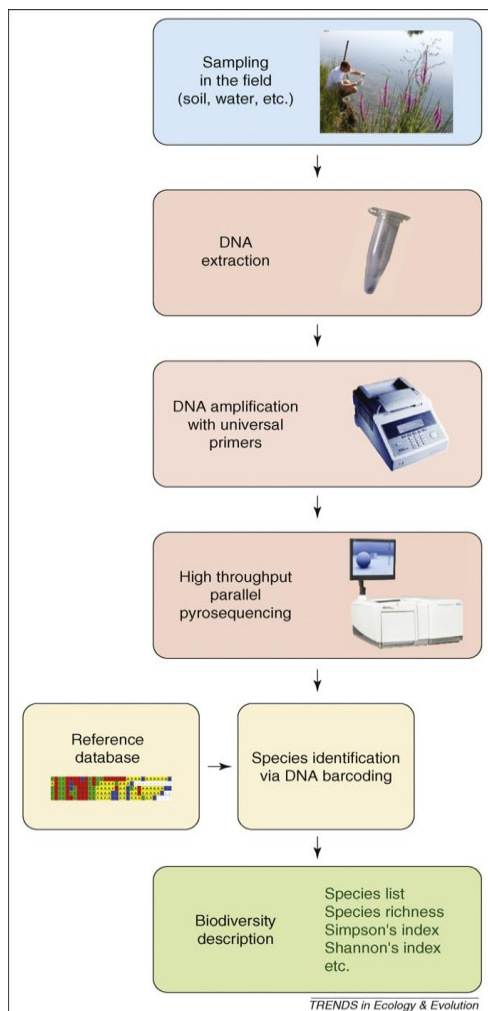


Figure 2 : Protocole pour l'analyse de la biodiversité à partir d'un échantillon environnemental par la méthode du metabarcoding ADN (Valentini *et al.* 2008).

1.2.2.4 Les intérêts et les limites de la méthode d'ADN environnemental

Avant tout, la méthode ADNe présente l'avantage de détecter des espèces qui sont difficilement observables par des méthodes plus classiques (espèces rares, cryptiques, menacées, exotiques envahissantes) (*e.g.* Ficetola *et al.* 2008, Valentini *et al.* 2008, Thomsen *et al.* 2012a).

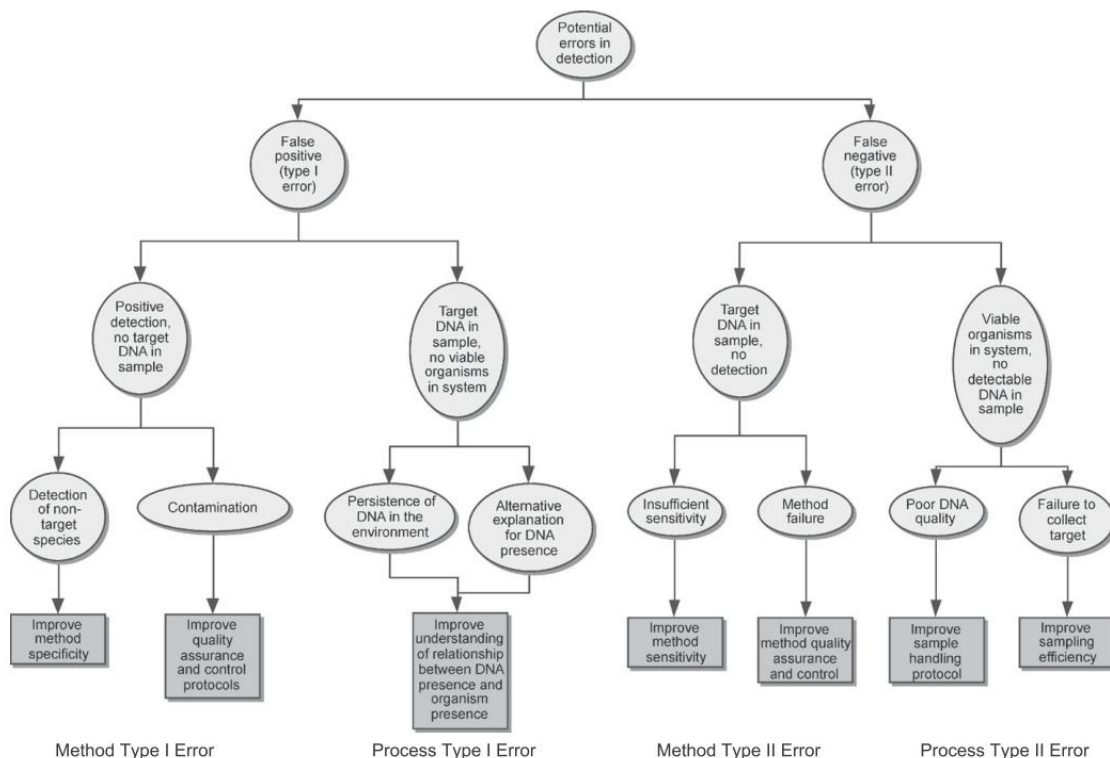
De plus l'ADNe est une méthode non invasive puisqu'elle ne nécessite pas la capture des organismes recherchés (Beja-Pereira *et al.* 2009). Elle évite ainsi tout impact sur l'écosystème et tout risque de transmission de pathogènes ou d'espèces exotiques envahissantes. Elle est également souvent plus facile et plus rapide à mettre en œuvre sur le terrain et permet de limiter les coûts des inventaires.

Pependant, la fiabilité de la méthode ADNe, comme toute autre méthode de détection d'espèces, peut être compromise par l'obtention de résultats erronés qui se divisent en deux catégories : les « faux positifs » (l'espèce est détectée alors qu'elle n'est pas présente) ou « faux négatifs » (l'espèce n'est pas détectée alors qu'elle est en réalité présente) (*cf.* Figure 3, Darling et Mahon 2011, Wilcox *et al.* 2013).

- Les erreurs induisant des « faux positifs » peuvent être causées par une mauvaise spécificité des amorces utilisées pour l'amplification ADN ou par une contamination (sur le terrain et/ou en laboratoire).

- Les erreurs induisant des « faux négatifs » peuvent être causées par une trop faible quantité d'ADN de l'espèce cible présente dans le milieu, par une faible efficacité de l'échantillonnage, par la perte de l'ADN pendant le transport de l'échantillon ou pendant la phase d'extraction en laboratoire, par la présence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons ou bien par des amorces non adaptées à l'amplification de l'espèce cible.

Figure 3 : Les sources potentielles d'erreur de détection dans les protocoles basés sur l'ADN environnemental. Les erreurs peuvent être attribuées spécifiquement à la méthode de détection employée (« method error ») ou bien au processus d'échantillonnage (« process error ») (Darling et Mahon 2011).



Afin d'éviter ce type d'erreurs, certaines consignes doivent être respectées :

- Le protocole d'échantillonnage doit être préalablement validé dans des conditions variées (taille, typologie des sites, espèces ciblées,...). De plus, les contaminations croisées entre sites peuvent être évitées en réalisant les prélèvements à partir de la berge.
- En laboratoire, les risques de contamination peuvent être réduits par la séparation des salles d'extraction et d'amplification, la mise en place de pressions atmosphériques différentes entre les salles, un renouvellement d'air fréquent,... De plus, des contrôles négatifs doivent être effectués à chaque étape du protocole afin de mettre en évidence la présence d'éventuelles contaminations.
- La fiabilité des amorces, leur robustesse et leur spécificité doit être évaluée avant toute analyse génétique par des tests *in silico*, *in vitro* et *in situ*.

1.2.3 Conclusion et Perspectives

La méthode d'ADNe est prometteuse pour la détection des espèces rares, cryptiques, menacées ou invasives. Dans ce dernier cas, elle peut être utile à trois périodes de l'invasion d'une espèce exotique (Wilcox *et al.* 2013) : lorsque l'espèce s'établit sur un nouveau territoire et qu'elle n'est présente qu'en faible densité, lorsque l'espèce exotique se révèle invasive et que les espèces natives se retrouvent en faible abondance et enfin lorsque des actions d'éradication de l'espèce invasive ont été mises en place et que son absence doit être confirmée. Les intérêts sont similaires pour les espèces menacées et protégées, leur détection permettant aux écologues de mettre en œuvre des actions de gestion adaptées. En 2013, la méthode de détection par l'ADNe a ainsi été reconnue comme étant l'une des techniques émergentes ayant le plus d'avenir dans la conservation de la diversité biologique, en aidant à la préservation des espèces menacées et à la gestion des espèces invasives (Sutherland *et al.* 2013).

Cette méthode permet d'obtenir rapidement des premiers résultats de présence/absence d'espèces sur un site mais elle ne fournit pas de données quantitatives telles que le nombre d'individus présents, leur âge, leur taille ou leur poids. C'est pourquoi l'ADNe n'a pas pour but de remplacer les actuelles méthodes d'inventaires de la biodiversité, mais permet au contraire de les compléter (Yoccoz 2012).

La détection des espèces par l'étude de l'ADNe offre de nombreuses opportunités, notamment en termes de veille écologique. Cependant, comme expliqué précédemment, les études ont principalement été réalisées, jusqu'à ce jour, sur la détection d'espèces cibles chez les Poissons et chez les Amphibiens (*cf.* Tableau 1). Deux axes de développement sont aujourd'hui envisagés afin de mettre en place un outil de veille écologique des milieux aquatiques basé sur l'étude de l'ADNe. Tout d'abord, le metabarcoding ADNe permet d'acquérir un plus grand nombre de données que le barcoding ADNe. Une augmentation des études avec cette approche multispécifique permettrait donc d'accroître plus rapidement les connaissances sur la répartition des espèces. Ensuite, le développement de cette technique pour des groupes taxonomiques différents des Poissons et des Amphibiens, tels que les Mammifères, souvent difficiles à détecter, les Reptiles, avec notamment la Tortue de Floride et la Cistude, respectivement invasive et protégée, ou même pour des Invertébrés avec les Ecrevisses ou les Odonates, est une perspective intéressante.

1.3 DESCRIPTION DE L'ÉTUDE

Ce stage s'inscrit dans un projet plus vaste, prévu sur la période 2013-2015, en partenariat étroit entre l'ONEMA, IRSTEA (Antony et Aix-en-Provence), le Laboratoire d'Ecologie Alpine de Grenoble et la société SPYGEN. Ce projet global a pour but de développer une méthode opérationnelle pour l'inventaire de la biodiversité aquatique basée sur l'ADNe.

Mon stage a consisté à étudier la mise en place d'un outil de veille écologique des milieux aquatiques continentaux stagnants basé sur l'ADN environnemental, à valider cette approche pour plusieurs groupes taxonomiques, et à proposer un outil de valorisation des données obtenues à l'aide de cette technique. Seuls les milieux lenticques ont été pris en compte dans le cadre de mon travail compte tenu du manque de connaissances actuel sur l'ADNe dans les milieux lotiques, notamment en ce qui concerne la provenance du signal, et de l'absence de méthode fiable d'échantillonnage.

L'objectif de cet outil de veille écologique serait de détecter les espèces présentes sur un site donné pour des groupes taxonomiques ciblés, et notamment les espèces menacées et invasives. Par la suite, une carte interactive à l'échelle nationale pourrait être créée afin de valoriser les données acquises par la méthode ADNe, sous forme de mailles de 10 km par 10 km.

Ce rapport, tout comme l'organisation du stage, est divisé en trois parties. Ces trois parties sont dépendantes les unes des autres. En effet, les résultats acquis lors de la première partie (« Entretiens ») ont permis la réalisation de la deuxième (« Etudes comparatives »). Ces deux parties ont ensuite permis l'élaboration de la dernière (« Valorisation des données »).

- 1) Une concertation entre les différents acteurs de la gestion et de la conservation des espèces aquatiques est nécessaire afin de proposer des outils cohérents et pouvant répondre aux attentes de chacun. Des entretiens ont donc été réalisés afin de connaître l'avis de différentes structures vis-à-vis de l'outil de veille environnementale proposé et de la valorisation des données. Elles ont permis d'identifier les groupes taxonomiques importants à suivre avec cet outil, mais aussi de déterminer l'utilité d'une carte interactive.
- 2) A partir des résultats issus des enquêtes, certains groupes taxonomiques ont été choisis pour réaliser des études comparatives. Le but de ces études a été de valider la méthode ADNe en comparant ses résultats à ceux des méthodes classiques. Ces études ont également permis de tester deux techniques d'échantillonnage pour la méthode ADNe.
- 3) Des cartes de répartition des espèces existent actuellement à différentes échelles géographiques, mais sont peu actualisées et ne regroupent pas toutes les espèces (notamment lorsqu'elles sont difficilement détectables). C'est pourquoi le but de cette partie a été de proposer un outil de valorisation des données issues de la méthode ADNe sous la forme d'une carte interactive. A partir des remarques émises par les personnes enquêtées et des données de présence acquises pour les espèces issues des groupes taxonomiques étudiés dans la deuxième partie, une maquette de carte a donc été créée à l'échelle française.

2 ENTRETIENS

2.1 PROTOCOLE D'ENTRETIEN

2.1.1 But des entretiens

L'objectif premier de ces entretiens était de recueillir l'avis de différentes structures sur les groupes taxonomiques à suivre dans le cadre de cet outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants et ainsi de définir pour la suite de ce travail les taxons pour lesquels il convenait de valider l'approche par ADNe.

Ces entretiens ont également été réalisés avec deux autres objectifs :

- Identifier des structures qui pourraient être intéressées par le développement et l'utilisation de cet outil et savoir de quelle façon il pourrait être intégré dans leurs programmes,
- Recueillir l'avis des différentes structures sur la valorisation des données acquises par ADNe par la mise en place d'une carte interactive.

2.1.2 Population étudiée

Toutes les personnes contactées exercent un métier en lien avec les espèces et les milieux aquatiques et proviennent de structures très diverses. Ces structures ont été regroupées en 6 catégories : établissements publics, organismes de recherche, parcs (nationaux et naturels régionaux), associations et ONG, bureaux d'études et industriels.

Au total, 70 personnes ont été contactées, réparties dans 64 structures différentes (cf. Annexe 3). Au sein de certaines structures, comme par exemple l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) ou le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), plusieurs personnes ont été interrogées car elles présentaient des profils différents. Au final, 45 personnes ont répondu au questionnaire, pour un total de 37 structures (soit 64% des personnes et 58% des structures interrogées). La liste de ces structures est donnée ci-dessous :

- **Les établissements publics**

- Agence de l'Eau Adour Garonne
- Agence de l'Eau Artois Picardie
- Agence de l'Eau Rhin Meuse
- Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse
- DREAL Aquitaine
- DREAL Pays de la Loire
- Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) - Service du Patrimoine Naturel (SPN)
- Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS)
- Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA)

- **Les organismes de recherche**

- INRA Montpellier
- Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg
- IRSTEA Aix en Provence

- IRSTEA Antony
- IRSTEA Bordeaux
- Laboratoire d'Ecologie Alpine de Savoie
- Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et de l'Environnement de Toulouse
- Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) - CNRS
- Tour du Valat

- **Les parcs**

- Parc National du Mercantour
- Parc National des Ecrins
- Parc Naturel Régional de Brière
- Parc Naturel Régional du Gâtinais français
- Parc Naturel Régional Scarpe-Escaut
- Parc Naturel Régional des Boucles de la Seine Normande

- **Les associations et ONG**

- Bufo
- Cistude Nature
- Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement de Loir et Cher (CDPNE)
- Conservatoire des Espaces Naturels de Haute-Savoie (ASTERS)
- Conservatoire des Espaces Naturels de Bourgogne
- NatureParif
- Société Herpétologique de France (SHF)
- Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN)

- **Les bureaux d'études**

- Eco-Med
- Ecosphère
- Ouest'am
- ERBIO

- **Les industriels**

- Autoroutes Paris-Rhin-Rhône (APRR)
- EDF

2.1.3 Processus d'entretien

2.1.3.1 Les questions posées

Le questionnaire comprend 3 questions composées chacune de 2 sous-questions (*cf.* Annexe 4). Ces questions correspondent aux objectifs cités précédemment, à savoir :

- Connaître les groupes taxonomiques pertinents à suivre dans le cadre d'un outil de veille écologique,
- Identifier les structures intéressées par le développement et l'utilisation d'un tel outil,
- Déterminer l'utilité d'une carte de répartition des espèces pour les différentes personnes interrogées.

2.1.3.2 Mise en œuvre des entretiens

Les entretiens se sont déroulés entre mi-avril et mi-juin 2013, soit par téléphone, soit par échange de mails (*cf.* Annexe 3).

Les 38 personnes interrogées lors d'un entretien téléphonique ont préalablement été contactées par mail. Chacune de ces personnes a ainsi eu le temps de prendre connaissance du questionnaire et de l'étude menée. Les questions étaient là pour guider l'entretien, mais elles n'étaient pas fermées, laissant la possibilité à l'interlocuteur de s'exprimer librement.

Certaines structures n'ont été contactées que par mail. Ainsi, un mail accompagné du questionnaire a été envoyé aux sièges de la Fédération des Conservatoires des Espaces Naturels (FCEN), regroupant 29 Conservatoires, et de la Fédération des Parcs Naturels Régionaux (FPNR), rassemblant 48 Parcs. De plus, deux des personnes contactées, Nicolas Poulet (ONEMA) et Jessica Thévenot (MNHN-SPN) ont aimablement accepté de diffuser le questionnaire à leur réseau, respectivement au groupe des Invasions Biologiques en Milieu Aquatique (IBMA) et au groupe d'experts référents sur les espèces invasives. Un total de 7 réponses me sont ainsi parvenues par retour de mail.

2.1.3.3 Traitement des résultats

Les données recueillies oralement ont été retranscrites après l'entretien afin de garder une trace écrite des réponses aux questions. Ces données ont ensuite été analysées de façon qualitative par question, sous la forme d'une grille d'entretien, mais aussi de façon quantitative dans la mesure du possible.

Les réponses aux questions ont été étudiées dans un premier temps pour la totalité des personnes interrogées, puis en fonction des 6 catégories (établissements publics, organismes de recherche, parcs, associations et ONG, bureaux d'études, et industriels) afin de déterminer si des tendances différentes étaient observées selon les types de structures interrogées.

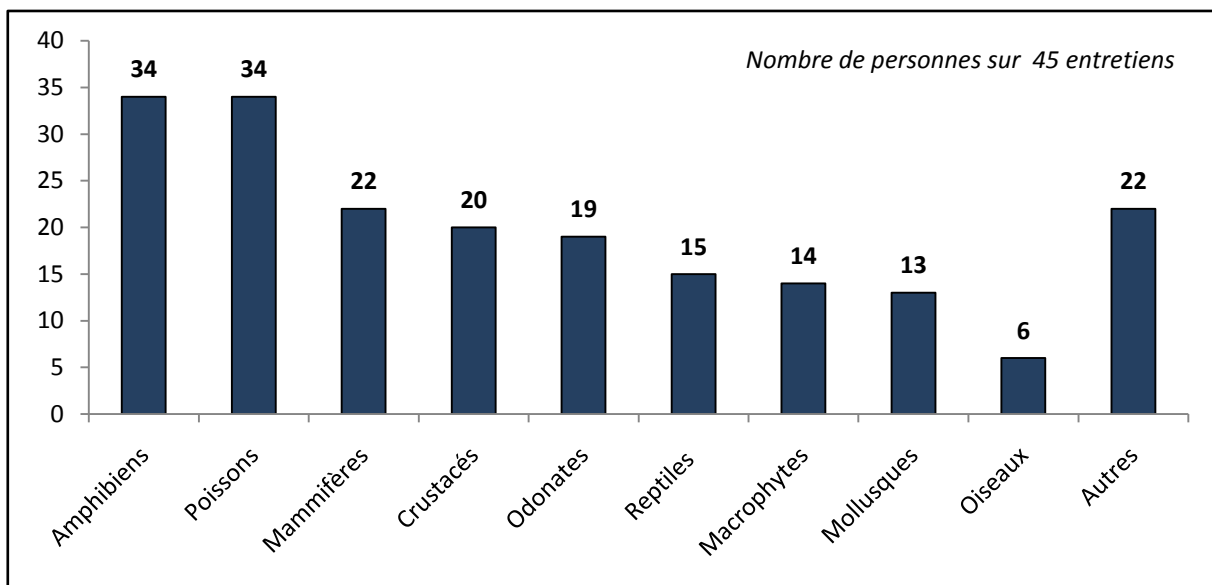
2.2 ANALYSE DES RÉSULTATS

2.2.1 Objectif 1 : Déterminer les groupes taxonomiques à suivre dans le cadre d'un outil de veille écologique.

- **Question 1 a)** D'après vous, quels groupes taxonomiques serait-il pertinent de suivre dans le cadre de cet outil de veille écologique?

Les trois quarts des personnes interrogées, réparties de façon relativement homogène dans les six catégories définies ci-dessus, citent les Amphibiens et les Poissons comme groupes importants à suivre dans le cadre d'un outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants (cf. Figure 4). Viennent ensuite les Mammifères, les Crustacés (en sachant que sur les 20 personnes qui ont parlé de ce groupe, 16 ont abordé les Ecrevisses) et les Odonates pour un peu moins de la moitié des enquêtés. Ces taxons ont été évoqués pour moins d'un tiers des parcs et des organismes de recherche. Les Crustacés et les Odonates ont également été peu cités respectivement par les bureaux d'études et par les établissements publics. Les Reptiles, les Macrophytes et les Mollusques recueillent un tiers des voix. Les Oiseaux, souvent considérés comme des animaux facilement visibles, sont moins cités. La moitié des personnes interrogées ont cité d'autres groupes taxonomiques, avec les Invertébrés aquatiques pour 19 enquêtés (dont la moitié des établissements publics et des organismes de recherche), les Diatomées, les Cyanobactéries ou les champignons pathogènes.

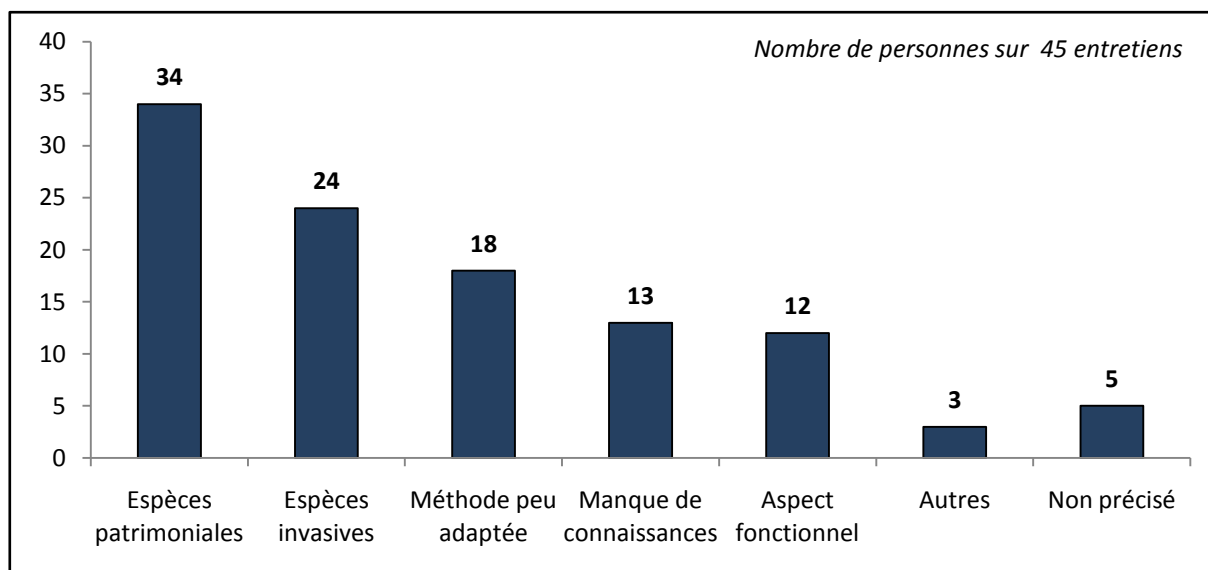
Figure 4 : Groupes taxonomiques à choisir dans le cadre d'un outil de veille environnementale d'après les personnes interrogées.



- **Question 1 b)** Pourquoi ?

Le choix s'est orienté sur des groupes taxonomiques comprenant des espèces patrimoniales pour les trois quarts des enquêtés et sur les espèces invasives pour plus de la moitié d'entre eux, les voix étant réparties de façon homogène dans les différentes catégories (cf. Figure 5). Les taxons cités étaient alors les Amphibiens, les Poissons, les Mammifères, les Crustacés, les Odonates et les Reptiles. Pour ces mêmes groupes, un peu moins de la moitié des enquêtés ont évoqué des problèmes avec les méthodes d'inventaires classiques (méthodes chronophages, difficultés de

Figure 5 : Raisons évoquées pour le choix des groupes taxonomiques.



détection) et ont trouvé que l'ADNe était une méthode complémentaire satisfaisante. Enfin, près d'un quart des enquêtés ont parlé d'un manque de connaissances sur les espèces et sur leur répartition, ce constat concernant la plupart des groupes taxonomiques cités, et de l'aspect fonctionnel de certains taxons tels que les Invertébrés aquatiques, les Poissons, les Diatomées et les Macrophytes. Ce dernier point a surtout été évoqué par les établissements publics et les organismes de recherche.

- **Discussion de l'objectif 1 :**

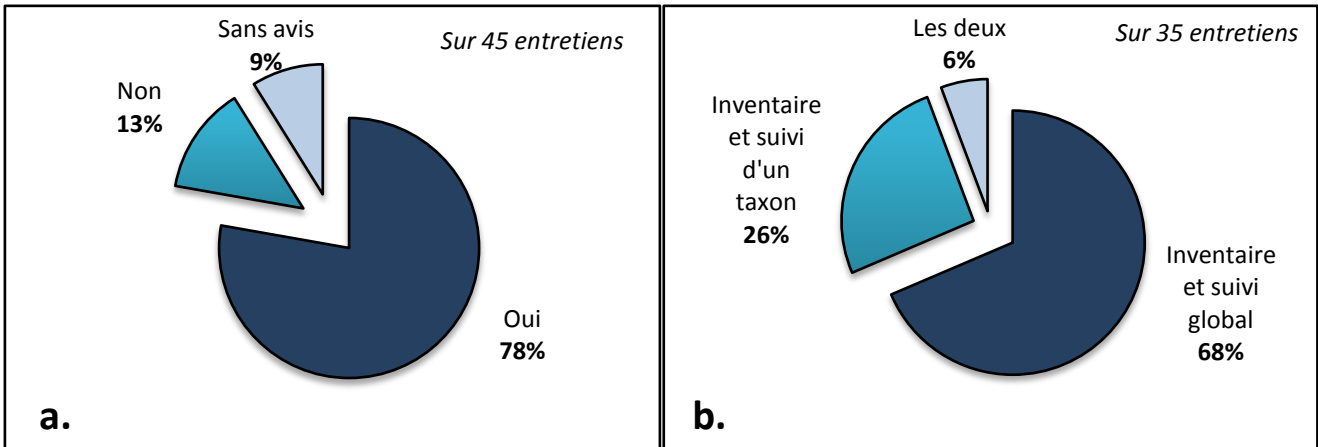
Les principaux groupes taxonomiques cités par les enquêtés possèdent pour la plupart leur propre liste rouge et comprennent des espèces à la fois menacées, protégées et envahissantes. Certains taxons, moins bien connus, sortent de ce cadre. Les invertébrés aquatiques (hors Crustacés et Odonates) ont par exemple été cités par un quart des personnes interrogées et sont surtout reliés à la caractérisation de l'état d'un milieu aquatique. Ces résultats montrent l'intérêt de développer plusieurs outils : un outil de veille écologique centré sur les espèces menacées et menaçantes et un outil de bioindication centré sur des taxons indicateurs de l'état de santé d'un écosystème. Même si la méthode employée est la même (la détection par l'ADNe), les objectifs sont différents.

2.2.2 Objectif 2 : Identifier les structures qui pourraient intégrer l'outil de veille écologique dans leur programme et qui souhaiteraient devenir partenaires du réseau ADNe.

- **Question 2 a)** Cet outil pourrait-il être intégré à certains de vos programmes ou actions ? Lesquels ?

Plus de trois quarts des personnes interrogées pensent que l'outil pourrait être intégré à leurs programmes ou actions (cf. Figure 6a.). La plupart des réponses négatives proviennent des établissements publics et notamment des Agences de l'Eau, qui travaillent plus sur la bioindication, liée à la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), que sur des problématiques de biodiversité.

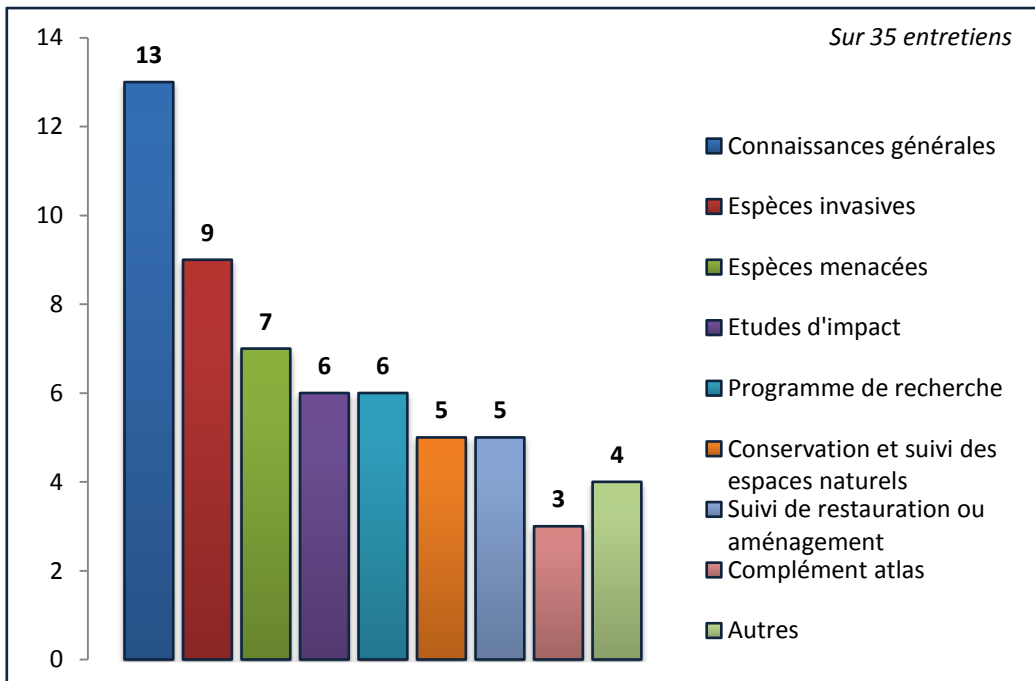
Figure 6 : a. Intégration de l'outil dans les programmes, b. Le type de programme.



Au sein des personnes intéressées par l'outil de veille écologique, un peu moins des trois quarts souhaitent réaliser des inventaires et des suivis globaux de la biodiversité, alors que le quart restant souhaite uniquement connaître la répartition d'une espèce ou d'un groupe taxonomique ciblé (cf. Figure 6b.). Les associations, les établissements publics et les industriels semblent être plus intéressés par un suivi global, alors que les résultats sont plus mitigés pour les autres catégories.

Parmi tous ces programmes, plus d'un tiers ont pour but d'acquérir des connaissances générales sur la répartition des différentes espèces recherchées (cf. Figure 7), surtout dans le cas des associations et des établissements publics. Un peu moins d'un tiers sont mis en place pour détecter précocement des espèces invasives ou des espèces menacées. Les études d'impact, associées essentiellement au travail des bureaux d'études et des industriels, ont également été citées.

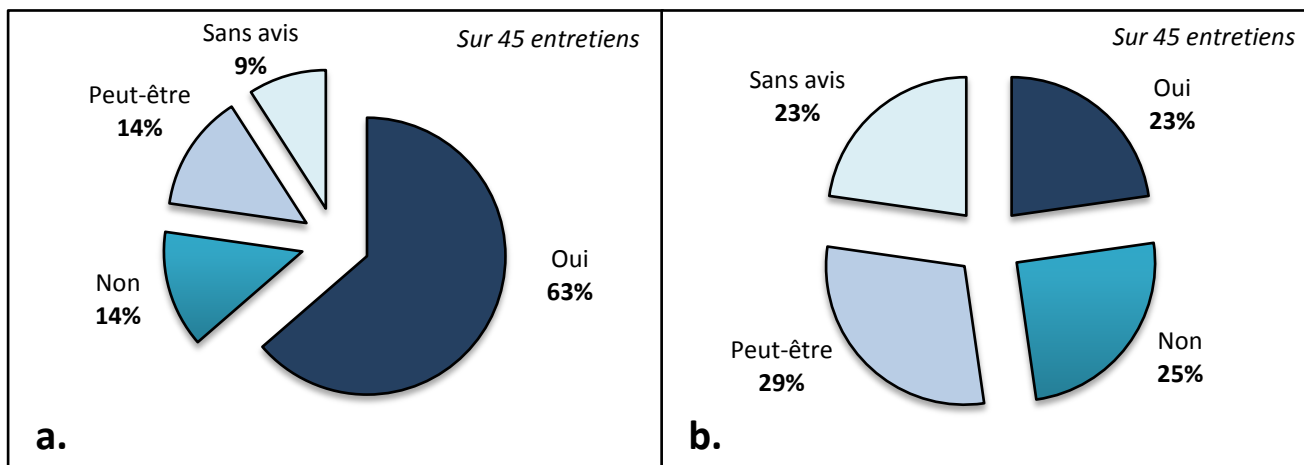
Figure 7 : Les objectifs des programmes des enquêtés.



- **Question 2 b)** Souhaiteriez-vous devenir partenaire de ce réseau (en termes technique et/ou financier)?

Les deux tiers des personnes interrogées sont intéressées par le projet et souhaitent devenir partenaire technique du « réseau ADNe », c'est-à-dire participer aux prélèvements, partager leurs connaissances sur leur territoire et sur la répartition actuellement connue des espèces (cf. Figure 8a.). Ainsi, les trois quarts des bureaux d'études, industriels, organismes de recherche et parcs sont favorables à un partenariat. Les résultats sont un peu plus mitigés pour les associations et pour les établissements publics. Au niveau financier, les avis sont beaucoup plus partagés, avec un quart des enquêtés qui sont favorables à cette idée (dont la majorité sont des bureaux d'étude), un deuxième quart qui envisagent cette idée mais qui attendent de voir le développement du projet ces prochaines années, et le dernier quart qui ne peuvent pas apporter leur soutien du fait du manque d'argent à allouer (principalement des associations, des établissements publics et des parcs) (cf. Figure 8 b.). L'aspect financier est ici abordé en termes de prestations ou via des apports directs pour aider au développement et/ou au maintien de l'outil de veille écologique.

Figure 8 : Enquêtés souhaitant devenir **a. Partenaires techniques, b. Partenaires financiers.**



- **Discussion de l'objectif 2 :**

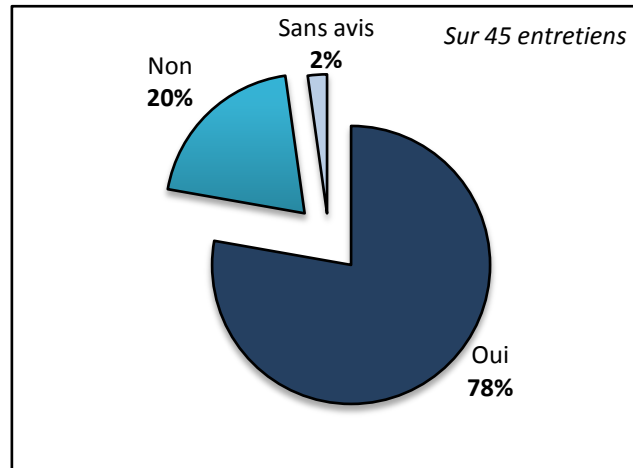
La plupart des structures interrogées sont intéressées par la méthode ADNe et par l'outil. Elles voient une application directe dans le cadre de leur travail et souhaitent devenir partenaire (en termes technique ou financier). Le problème étant que les enquêtés sont parfois plus intéressés par la méthode en elle-même que par l'outil de veille écologique, dans le sens où plus d'un quart des personnes pouvant intégrer l'outil dans leurs programmes ont parlé uniquement de projets sur une espèce ou un groupe taxonomique ciblé, et non sur des inventaires plus complets.

2.2.3 Objectif 3 : Déterminer l'utilité d'une carte de répartition des espèces pour les différentes personnes interrogées.

- **Question 3 a)** Une carte de vigilance à l'échelle nationale pourrait-elle vous être utile ?

Plus de deux tiers des enquêtés pensent que la valorisation des données par la création d'une carte peut être utile (cf. Figure 9), soit directement pour eux, soit pour les gestionnaires. Cette tendance est similaire pour toutes les catégories, hormis les parcs pour lesquels la moitié des personnes interrogées n'en voient pas l'utilité.

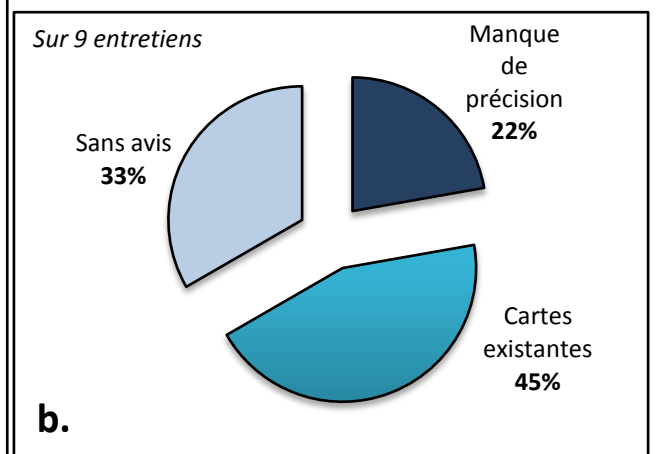
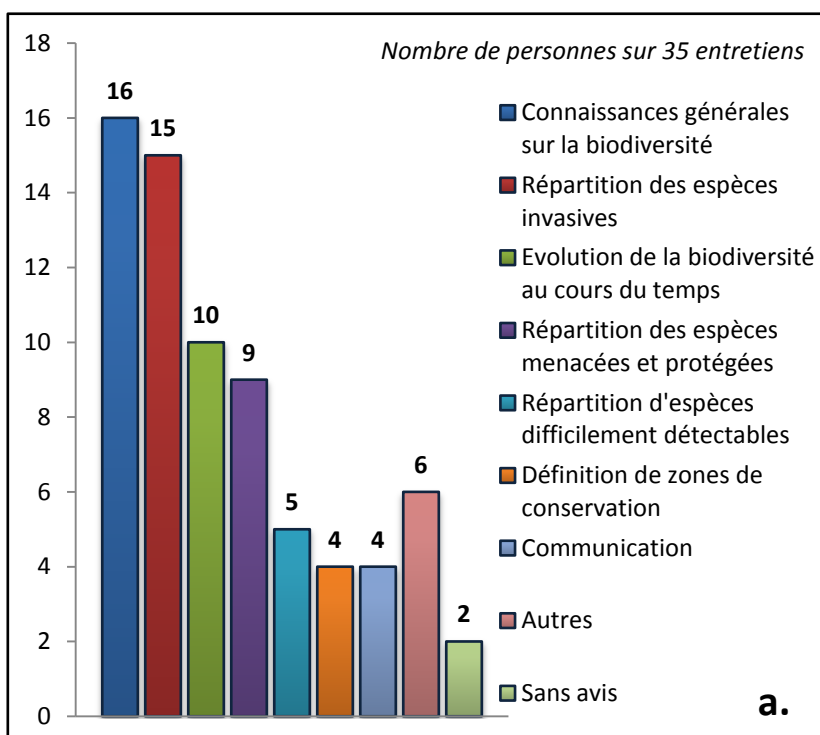
Figure 9 : Utilité d'une carte de vigilance.



• Question 3 b) Dans quel sens ?

Les intérêts de la mise en place d'une telle carte sont relativement similaires aux objectifs des programmes évoqués par les enquêtés lors de la question 2 et se répartissent de façon homogène entre les catégories. Ainsi, sur toutes les personnes qui trouvent une utilité à cette carte, un peu moins de la moitié parlent de l'acquisition de connaissances générales sur la biodiversité et sur la répartition des espèces invasives (cf. Figure 10a.). Pour ce deuxième point, les informations acquises sur les fronts de colonisation des espèces invasives permettent de mettre en place des actions de surveillance voire d'éradication et ainsi d'éviter leur propagation. Plus d'un quart des enquêtés favorables à cette carte ont également évoqué l'intérêt d'un suivi temporel de la biodiversité et de la connaissance des espèces menacées et protégées, notamment pour donner les premières indications au moment de la mise en place d'aménagements.

Figure 10 : Les intérêts (a.) ou non (b.) d'une carte de vigilance.



Parmi les avis négatifs sur cette carte, formulés par moins d'un quart des personnes enquêtées, les raisons évoquées sont doubles : des atlas ou des cartes interactives existent déjà et sont suffisantes dans le cadre de leur travail, et la précision envisagée de la carte de vigilance (10km par 10 km) est trop peu précise pour leur être utile (cf. Figure 10b.).

- **Discussion de l'objectif 3 :**

L'idée d'une carte est en général bien appréciée par les personnes interrogées, cela permettant de valoriser les données et de faciliter la communication entre les personnes travaillant sur la gestion ou la conservation des espèces et des milieux aquatiques et les personnes moins informées sur le sujet. A la vue des réponses obtenues, la représentation de la répartition des espèces semble nécessaire, notamment en termes de connaissances et de surveillance des espèces invasives et menacées/protégées.

2.3 VISION CRITIQUE DES ENTRETIENS

Deux principales critiques peuvent être formulées concernant ces enquêtes :

- Une disparité existe au niveau du nombre de personnes contactées et interrogées au sein de chaque catégorie. Ainsi, moins d'avis ont été recueillis au sein des parcs, des bureaux d'études et surtout des industriels. Cette différence est principalement due au fait que la majorité des personnes contactées étaient des « contacts de contacts », et ces personnes étaient moins nombreuses dans les trois catégories citées précédemment.
- Sur les 45 entretiens, 38 ont été réalisés sous forme de rendez-vous téléphonique et les 7 autres par échange de mail. Dans ce deuxième cas, les informations acquises étaient beaucoup moins importantes que lors d'une conversation menée de vive-voix. Il aurait été préférable de réaliser tous les entretiens de la même façon, mais les conditions de réalisation de cette enquête ne l'ont pas permis.

2.4 SYNTHÈSE DES ENTRETIENS

La grande majorité des personnes enquêtées ont déjà entendu parler de la méthode d'inventaire par ADNe et se montrent très intéressées par son application.

La méthode en elle-même et ses possibilités semblent parfois plus importantes pour les enquêtés qu'un outil standardisé de veille écologique. En effet, chaque catégorie de structure, et même les personnes interrogées au sein de ces catégories ont des projets et des objectifs différents, concernant des espèces ou des groupes taxonomiques variés. Ce sont surtout les bureaux d'études et les industriels qui envisagent des inventaires de plusieurs groupes taxonomiques dans le cadre d'études d'impact environnemental ou de suivis d'aménagement. Les groupes intéressants pour eux sont alors principalement ceux qui contiennent des espèces menacées et protégées, selon les listes rouges, la directive habitat faune flore et les arrêtés interministériels. Pour les autres types de structure, des inventaires globaux peuvent être envisagés, mais avec des taxons variés selon les programmes.

Il est donc nécessaire pour la création d'un outil standardisé de veille écologique de choisir les groupes taxonomiques les plus importants pour le plus grand nombre. D'après cette enquête, les 6 groupes qui ont recueillis chacun plus d'un tiers des voix et qui pourraient être choisis dans le cadre

de cet outil sont : les Amphibiens, les Poissons, les Mammifères, les Crustacées, les Odonates et les Reptiles.

De plus, la création d'une carte interactive pour valoriser les données sur la répartition des espèces aquatiques acquises avec la méthode par ADNe, semble être pertinente au vu des réponses des personnes enquêtées.

3 ETUDES COMPARATIVES

3.1 INTRODUCTION

Les résultats des enquêtes ont révélé les six principaux groupes taxonomiques à suivre dans le cadre d'un outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants : les Amphibiens, les Poissons, les Mammifères, les Crustacés, les Odonates et les Reptiles. La détection de ces groupes taxonomiques par l'étude de l'ADNe doit être validée avant la mise en place d'un tel outil. A ce jour, les études se sont principalement attachées au suivi d'espèces ciblées d'Amphibiens et de Poissons (e.g. Ficetola *et al.* 2008, Goldberg *et al.* 2011, Jerde *et al.* 2011, cf. Tableau 1). Seules deux études ont considéré d'autres groupes taxonomiques au sein des milieux aquatiques continentaux : Thomsen *et al.* (2012a) ont ainsi pris pour modèles biologiques un Mammifère, la Loutre eurasienne (*Lutra lutra*), un Odonate, la Leucorrhine à gros thorax (*Leucorrhinia pectoralis*) et un Crustacé, le Lépidure (*Lepidurus apus*), alors que Goldberg *et al.* (2013) se sont intéressés à l'Hydrobie des antipodes (*Potamopyrgus antipodarum*), une espèce de Mollusques. Si la validation de la méthode ADNe, via une approche de barcoding ADNe, a été publiée pour ces espèces-là, cela reste à étudier chez des espèces d'Ecrevisses ou de Reptiles. Quant à l'approche de metabarcoding ADNe, elle n'a été testée que chez les Poissons en milieu marin (Thomsen *et al.* 2012b) et nécessiterait donc d'être testée pour tous les groupes taxonomiques d'intérêt en milieu aquatique continental.

Des études sont actuellement en cours pour la validation de l'approche de metabarcoding ADNe chez les Amphibiens et chez les Mammifères (Dejean comm. pers.). Dans le cadre de mon travail, je me suis donc intéressée aux autres groupes taxonomiques identifiés lors des entretiens, à savoir les Reptiles, les Crustacés, les Poissons et les Odonates. Une approche de barcoding ADNe a été menée sur les deux premiers groupes et a ciblé deux espèces :

- la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*), protégée au niveau européen par la directive Habitats Faune Flore (annexes II et IV), au niveau national par l'arrêté du 19 novembre 2007, et concernée par un plan national d'actions pour la période 2011-2015. Cette espèce a vu son aire de répartition fortement diminuer à cause de la pollution, des activités humaines et de l'expansion de la Tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*).
- l'Ecrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*), considérée comme une des cent espèces les plus invasives d'Europe d'après DAISIE (2013). Elle a un impact négatif sur les Ecrevisses natives via l'exclusion compétitive et la transmission d'un champignon pathogène (*Aphanomyces astaci*), mais également sur la structure globale des communautés aquatiques de par son large spectre alimentaire.

Une approche de metabarcoding ADNe a également été menée chez les Poissons et les Odonates.

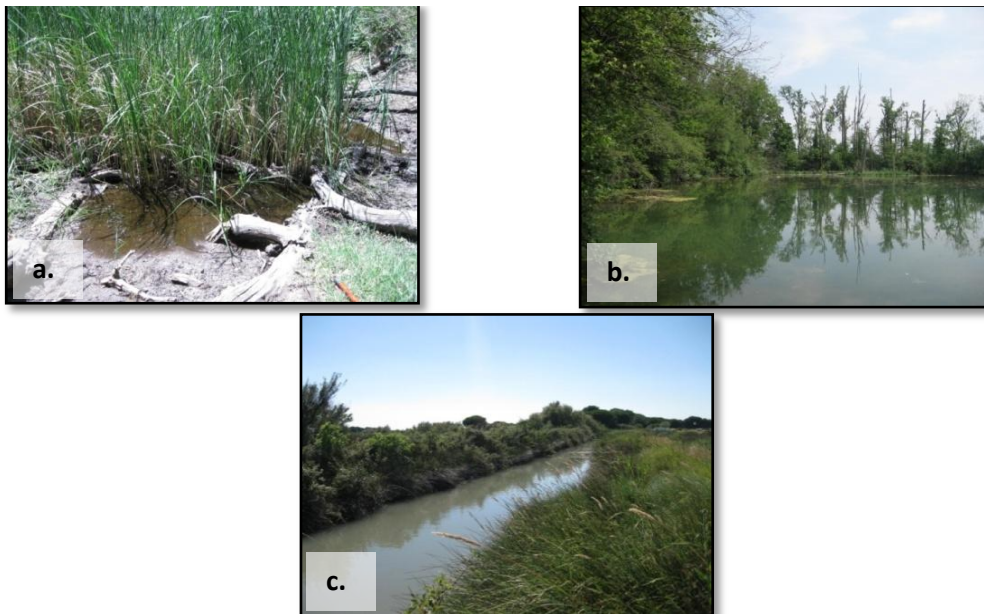
La validation de la méthode ADNe pour ces deux espèces et ces deux groupes taxonomiques a été réalisée sur des marais en Camargue et dans la Réserve Naturelle de la Petite Camargue Alsacienne. La méthode ADNe, pour laquelle deux techniques d'échantillonnage ont été testées, a été comparée à des méthodes d'inventaire classiques.

3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.2.1 Méthodes d'inventaire utilisées

Les inventaires ont été réalisés entre mars et fin juillet 2013 sur 15 points d'eau répartis sur trois entités géographiques différentes : dans le Sud-Est de la France, en Camargue, avec le Petit Saint Jean et la Tour du Valat et dans le Nord-Est de la France, dans la réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne (cf. Tableau 2). Ces sites correspondent à des mares (temporaires ou non), des étangs et des roubines (petits canaux contenant de l'eau stagnante, destinés à l'irrigation) d'une taille allant de quelques m² à quelques hectares et sont souvent interconnectés au sein d'une même entité (cf. Figure 11). Sur chacun de ces sites, une ou deux espèces et/ou un ou deux groupes taxonomiques ont été étudiés (cf. Tableau 2). Des méthodes d'inventaire différentes, décrites ci-dessous, ont été utilisées selon le taxon et le site considérés.

Figure 11 : Les trois types de milieux aquatiques stagnants étudiés : a. Mare, b. Etang, c. Roubine.



3.2.1.1 Les méthodes d'inventaire classiques

Les méthodes d'inventaire classiques ont été mises en œuvre en parallèle des méthodes basées sur l'étude de l'ADNe par des structures partenaires de SPYGEN : la Tour du Valat pour les points d'eau situés en Camargue et l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg pour ceux situés dans la réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne.

- **La détection à vue**

Deux méthodes de détection à vue ont été mises en place :

- En Camargue, sur les deux points d'eau où les Odonates ont été étudiés, un transect a été réalisé mi-juillet, le but étant de parcourir les étangs et de lister toutes les espèces adultes observées pendant une trentaine de minutes. Les données acquises par cette méthode sont uniquement qualitatives.

Tableau 2 : Espèces ou groupes taxonomiques et méthodes (classiques et ADNe) testées pour les 15 sites étudiés. Des précisions sur la localisation des sites, leur type (mare, étang ou roubine) et leur surface approximative sont également données. Dans cette dernière colonne, les sites qui n'ont été que partiellement échantillonnés sont annotés (1) ; la surface donnée correspond à celle qui a été échantillonnée.

| Sites | | Type | Taille | Espèces ou groupes taxonomiques étudiés | | | | Méthodes classiques utilisées | | | | Méthodes ADNe testées | |
|----------------------------|-------------------------|---------|------------------------|---|------------------------|----------|----------|-------------------------------|-------|-------------|---------|-----------------------|---|
| | | | | Cistude d'Europe | Ecrevisse de Louisiane | Poissons | Odonates | Transect | A vue | Piégeage | 6 tubes | Filtration | |
| | | | | | | | | | | Observation | | | |
| Petit Saint Jean | Mare forestière 3 | Mare | 30 m ² | x | | | | | | | x | | x |
| | Mare forestière 5c | Mare | 20 m ² | x | x | | | | | | x | | x |
| | Station linéaire 6 | Roubine | 600 m ² (1) | x | x | x | | | | | x | | x |
| | Station linéaire 7 | Roubine | 800 m ² (1) | x | x | x | | | | | x | | x |
| | Station linéaire 15 | Roubine | 200 m ² (1) | x | x | x | | | | | x | | x |
| Camargue | Marais des Iris | Etang | 800 m ² (1) | x | x | x | x | | | | x | | x |
| | Esquiveau a | Roubine | 200 m ² (1) | x | x | x | | | | | x | | x |
| | Esquiveau c | Roubine | 200 m ² (1) | x | x | x | | | | | x | | x |
| | Cerisière des Relongues | Etang | 5000 m ² | | | | x | | | | | | x |
| Petite Camargue Alsacienne | La heid | Mare | 300 m ² | x | | | | | | | x | | |
| | Gravière de la heid | Mare | 300 m ² | x | | | | | | | x | | |
| | Bout du Marais | Etang | 800 m ² (1) | x | | | | | | | x | | |
| | Petit triangle | Etang | 200 m ² (1) | x | | | | | | | x | | |
| | Zwetschenmatte | Etang | 300 m ² (1) | x | | | | | | | x | | |
| | Etang en U | Etang | 800 m ² (1) | x | | | | | | | x | | |

- Dans la réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne, des observations d'environ 15 minutes ont été menées sur plusieurs jours (entre 3 et 18) pendant les mois de mars, de juin et de juillet sur les 6 sites étudiés afin de savoir quelles espèces de tortues étaient présentes et en quel nombre.

Figure 12 : *Verveux mis en place sur une mare en Camargue.*



- **La détection par piégeage**

Dans les points d'eau étudiés en Camargue, des verveux (avec des mailles de 20 mm) ont été utilisés pour la capture des Cistudes d'Europe, dans le cadre d'un suivi par CMR (Capture Marquage Recapture) de cette espèce par la Tour du Valat (*cf.* Figure 12). Cette méthode est également efficace pour l'inventaire d'autres taxons, notamment les Ecrevisses de Louisiane et les Poissons. Quatre sessions de piégeage de quatre jours ont été réalisées entre avril et juillet, mais seules les deux dernières ont été prises en compte dans la comparaison entre les méthodes. Les individus de ces différents taxons ont été comptés et enlevés des filets chaque jour. Les Cistudes d'Europe étant marquées individuellement, le nombre exact d'individus différents capturés au cours des deux sessions a pu être calculé. Ce nombre est plus approximatif pour les Ecrevisses de Louisiane et les Poissons puisque le même individu a pu être capturé plusieurs fois.

Dans la réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne, des nasses avec des appâts ont été mises en place en juillet sur 5 des 6 sites (*cf.* Tableau 2), après avoir prélevé les échantillons d'eau pour la méthode ADNe. Les pièges ont été laissés une dizaine de jours sur chaque site et vérifiés quotidiennement.

3.2.1.2 Les méthodes d'inventaire basées sur l'étude de l'ADNe

Les deux stratégies d'échantillonnage présentées ci-dessous ont été développées par SPYGEN et ont été mise en place dans le cadre de ce stage entre fin juin et mi-juillet. Elles sont non invasives et permettent d'éviter les contaminations croisées entre les sites puisque les prélèvements sont réalisés depuis le bord de chaque point d'eau. Afin d'être le plus exhaustif possible, les prélèvements ont été réalisés sur des faciès différents au sein de chaque point d'eau.

- **la technique « 6 tubes » :**

La technique d'échantillonnage actuellement utilisée par la société SPYGEN est la méthode « 6 tubes ». Cette méthode consiste à prélever, à l'aide d'une louche de capacité 40ml, 20 échantillons

Figure 13 : Méthode « 6 tubes ».



d'eau tout autour du point d'eau étudié et à les rassembler dans un sac stérile (cf. Figure 13). Après avoir mélangé le contenu du sac, 6 prélèvements de 15ml sont effectués à l'aide d'une pipette afin de remplir un kit de 6 tubes contenant 35ml d'un mélange d'acétate de sodium et d'alcool (pour précipiter et conserver l'ADN). Les tubes sont ensuite fermés et agités puis stockés au frais avant d'être analysés en laboratoire.

Cette technique a été utilisée sur la totalité des points d'eau étudiés (cf. Tableau 2).

- **la technique par filtration :**

Afin d'éviter les contraintes liées au temps passé à la préparation des kits « 6 tubes », à leur analyse, et au transport d'alcool, une nouvelle technique a été testée au cours de mon stage : la filtration. Une seringue est utilisée afin de réaliser 20 prélèvements d'eau de 100ml tout autour du point d'eau étudié. Après chaque prélèvement, l'eau est expulsée à travers une capsule contenant un filtre en polyethersulfone à faible porosité (0,45 μ m) (cf. Figure 14). Une fois les prélèvements terminés, 50ml de tampon sont rajoutés dans la capsule afin de conserver l'ADN. Les capsules sont ensuite fermées puis stockées au frais avant d'être analysées en laboratoire.

Cette technique a été testée sur 8 points d'eau de Camargue pour la détection de la Cistude d'Europe et de l'Ecrevisse de Louisiane (cf. Tableau 2).

Figure 14 : Méthode « Filtration ».



3.2.2 Analyses en laboratoire

Etant donné la très faible quantité d'ADN présent dans les échantillons d'eau, les analyses doivent être effectuées avec des précautions similaires à celles utilisées dans les études d'ADN ancien (Cooper et Poinar 2000), c'est-à-dire dans un environnement isolé avec des stocks de consommables dédiés. Au sein des laboratoires de SPYGEN, les salles d'extraction et d'amplification sont séparées physiquement. De plus, des pressions atmosphériques différentielles sont appliquées dans les différents laboratoires (positive pour les salles d'extraction d'ADN, négative pour les salles d'amplification). Un renouvellement d'air fréquent, afin d'éviter une concentration d'ADN trop élevée dans l'air, et un traitement UV sont également mis en place.

Les personnes responsables des analyses doivent suivre des règles de bonne conduite de laboratoire, notamment en respectant un ordre de passage dans les salles (par exemple ne jamais aller dans une salle d'extraction après être passé dans une salle d'ADN amplifié afin d'éviter les contaminations croisées) et en portant un équipement adapté (combinaison, gants, masque, charlotte et surchaussures à usage unique). Toutes ces conditions ont été respectées durant les analyses décrites ci-dessous.

3.2.2.1 Extraction d'ADN et tests d'inhibition

La première étape en laboratoire a consisté à extraire l'ADN à partir des échantillons d'eau prélevés sur le terrain. Les échantillons issus de la méthode par filtration ont préalablement été transférés dans des tubes similaires à ceux utilisés pour la méthode « 6 tubes ». Afin de récupérer l'ADN précipité et/ou les cellules restantes, chaque tube a été centrifugé et le surnageant a été jeté. L'extraction de l'ADN a ensuite été réalisée à partir des différents culots. Après avoir rajouté du tampon lyse et de la protéinase K, chaque échantillon a été transféré sur une colonne contenant une membrane de silice. Dans un premier temps, l'ADN a été adsorbé sur la membrane, puis les protéines et autres impuretés ont été éliminées par deux lavages successifs. Enfin, l'ADN a été récupéré dans un tube stérile à l'aide d'un tampon d'élution. Des contrôles d'extraction ont été inclus dans toutes les extractions d'ADN et se sont révélés négatifs lors des amplifications d'ADN par PCR.

Des tests d'inhibition ont ensuite été effectués sur chaque échantillon afin de vérifier la présence potentielle d'inhibiteurs qui pourraient occasionner un faux négatif. Pour cela, une quantité connue d'un gène de synthèse a été ajoutée dans l'extrait d'ADN, puis analysée par PCR quantitative. Une quantité détectée plus faible que la quantité attendue témoigne de la présence d'inhibiteurs. Les échantillons inhibés ont été dilués avant d'être analysés.

Les couples d'amorces choisis pour la Cistude d'Europe, l'Ecrevisse de Louisiane, les Poissons et les Odonates ainsi que les sondes utilisées en PCR quantitative pour les deux premiers taxons ont préalablement été testés *in silico* et *in vitro*. Dans le cas de l'Ecrevisse de Louisiane et des Poissons, les couples d'amorces ont également été optimisés.

3.2.2.2 Amplification de l'ADN par PCR quantitative et analyse des résultats pour la méthode de barcoding ADNe

Des PCR quantitatives ont été effectuées respectivement pour les 14 et les 8 échantillons où la Cistude d'Europe et l'Ecrevisse de Louisiane ont été étudiées par la méthode « 6 tubes » et pour les 8 échantillons où les deux espèces ont été étudiées par la méthode « Filtration », avec 12 répliques PCR

pour chacun des échantillons. 6 contrôles négatifs ont été ajoutés dans toutes les PCR et n'ont révélé aucune contamination.

Les résultats obtenus à l'issue des PCR quantitatives correspondent à la proportion de répliques positifs par échantillon. Un test de Student pour données appariées par permutations a été réalisé afin de savoir si la proportion de répliques positifs était différente selon les deux techniques d'échantillonnage testée pour la méthode de barcoding ADN. Des pourcentages de détectabilité ont ensuite été calculés pour ces deux méthodes en fonction des résultats de présence obtenus par les méthodes classiques. Enfin, des relations entre la proportion de répliques positifs et la densité des individus de Cistude d'Europe et d'Ecrevisse de Louisiane observée par les méthodes classiques ont été étudiées. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de R version 2.14.2. (2012) et du package RVAideMemoire (Hervé 2013).

3.2.2.3 Amplification de l'ADN par PCR classique, séquençage et analyses bioinformatiques pour la méthode de metabarcoding ADN

Des PCR classiques ont été effectuées respectivement pour les 6 et 2 échantillons où les Poissons et les Odonates ont été étudiés par la méthode « 6 tubes », avec 8 répliques PCR pour chacun des échantillons. Les amorces universelles Poissons et Odonates ont été préalablement rallongées de 7 nucléotides sur leur extrémité 5'. Ce « tag » a été créé pour chaque échantillon afin de permettre l'assignation des séquences lues lors du séquençage à leur échantillon d'origine.

L'amplification de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse capillaire. Les produits PCR positifs ont ensuite été purifiés, puis séquencés à l'aide du séquenceur Miseq (Illumina) par un prestataire externe. Cette étape a préalablement été optimisée pour les Poissons mais constitue un premier test pour les Odonates.

Les fichiers de séquences obtenus pour les 6 échantillons de Poissons et les 2 échantillons d'Odonates ont été analysés par des outils bioinformatiques : les OBITools¹. Ces outils correspondent à des scripts écrits en Python et créés afin de simplifier la manipulation et l'analyse des fichiers de séquences. Les différentes étapes ainsi que le nom des scripts utilisés sont décrits ci-dessous :

- **1^{ère} étape** : les résultats pour chacun des deux projets ont été reçus sous forme de deux fichiers de séquences, le premier contenant les lectures des séquences d'ADN à partir de l'extrémité 5' et le deuxième à partir de l'extrémité 3'. L'outil *illuminapairedend* a été utilisé pour aligner ces deux fragments et reconstruire les séquences complètes.
- **2^{ème} étape** : chaque lecture a été assignée à son échantillon d'origine, d'après la séquence de son tag et celle du couple d'amorces, en utilisant l'outil *ngsfilter*.
- **3^{ème} étape** : La même séquence peut avoir été lue plusieurs fois par le séquenceur. C'est pourquoi l'outil *obiuniq* a été utilisé afin d'obtenir un fichier avec toutes les séquences identifiées et le nombre de fois où elles ont été lues.

Les deux prochaines étapes ont consisté à supprimer les erreurs dues à la PCR ou au séquençage.

- **4^{ème} étape** : L'outil *obigrep* a été utilisé afin de supprimer les séquences rares, qui ont été lues moins de 10 fois.

¹ <http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>

- **5^{ème} étape** : Certaines séquences non éliminées par le filtre précédent mais possédant un nombre de lectures peu élevées, peuvent avoir quelques nucléotides de différence avec des séquences très représentées. L'outil *obiclean* a été utilisé afin d'identifier ces séquences et de les supprimer.
- **6^{ème} étape** : Les séquences restantes ont ensuite été comparées à des bases de données de référence (la base de données Poissons, contenant 83 espèces européennes, créée par SPYGEN et la base de données Odonates de GenBank¹) à l'aide de l'outil *ecoTag*, de façon à ce qu'un nom d'espèce soit attribué à chaque séquence.
- **7^{ème} étape** : Le fichier *ecoTag* obtenu est transformé en fichier tabulaire à l'aide de l'outil *obitab*.
- **8^{ème} étape** : Les séquences dont la correspondance avec les séquences de référence est inférieure à 98% sont éliminées à l'aide de R version 2.14.2 (2012).

Ainsi, le fichier final contient le nom des espèces identifiées et le nombre de lectures associées pour chaque échantillon.

Un test de Student pour données appariées par permutations a été effectué afin de savoir si le nombre d'espèces trouvées par site était différent entre la méthode classique et la méthode de metabarcoding ADNe. Ce test a été réalisé uniquement pour les Poissons car seuls deux sites ont été étudiés pour les Odonates. Des pourcentages de détectabilité ont ensuite été calculés pour ces deux méthodes en fonction du nombre total d'espèces trouvées sur chaque site. Enfin, une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été effectuée sur la liste de présence/absence des différentes espèces trouvées pour chaque site afin d'identifier si des sites provenant d'une même entité géographique (Petit Saint Jean ou Tour du Valat) possédaient une liste d'espèces plus proche que des sites provenant d'entités géographiques différentes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de R version 2.14.2 (2012) et du package *ade4* (Dray et Dufour 2007).

3.3 RÉSULTATS

3.3.1 Comparaison entre deux méthodes de barcoding ADNe et les méthodes d'inventaire classiques

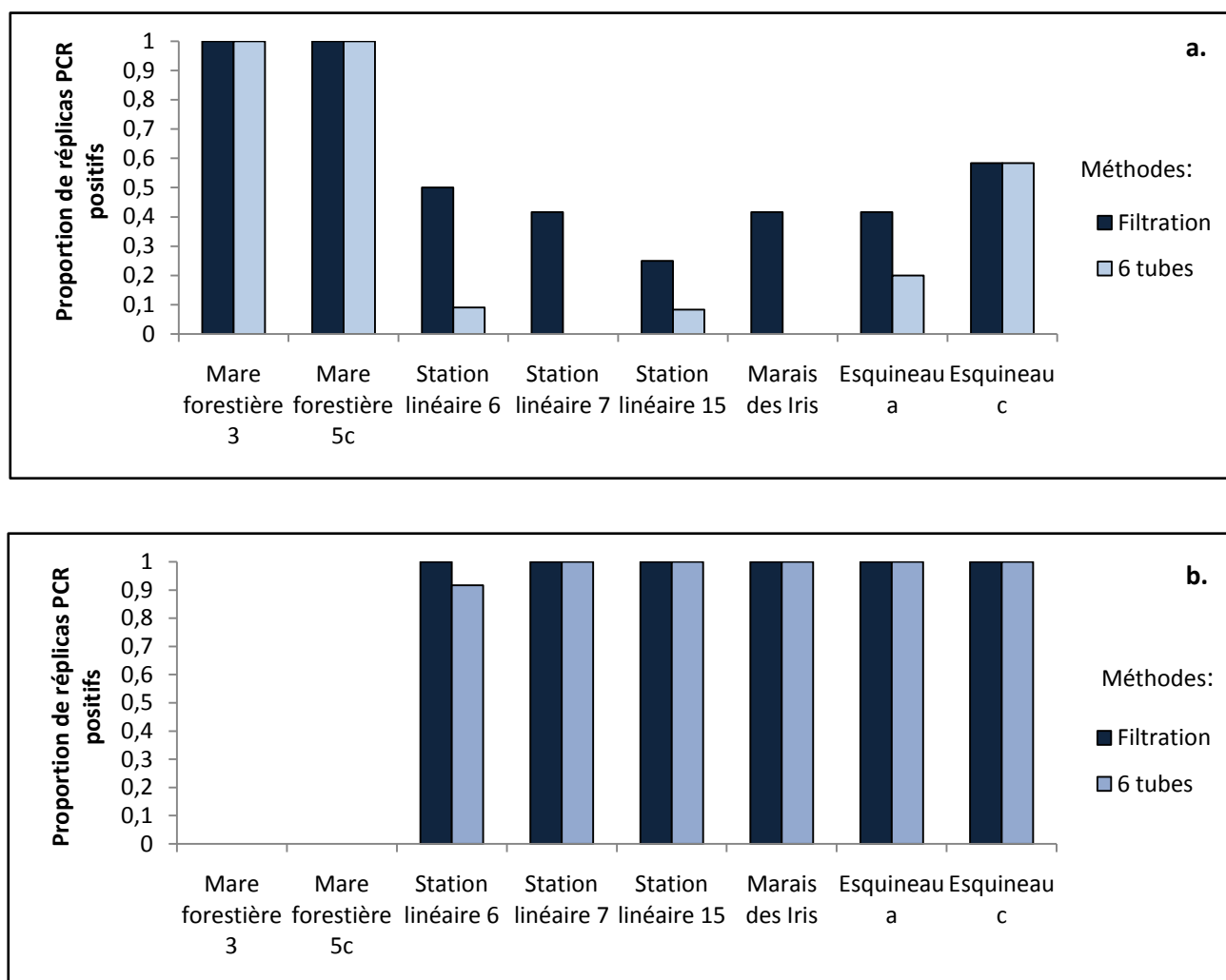
3.3.1.1 Les deux méthodes de barcoding ADNe

La méthode « Filtration » et la méthode « 6 tubes » ont été comparées sur 8 points d'eau en Camargue pour la Cistude d'Europe et pour l'Ecrevisse de Louisiane. Les résultats obtenus sont différents selon les méthodes : la méthode « Filtration » détecte la Cistude d'Europe sur les 8 sites étudiés, alors que la méthode « 6 Tubes » ne la détecte que sur 6 sites. Pour l'Ecrevisse de Louisiane, la détectabilité est la même selon les deux méthodes (6 sites sur les 8 étudiés).

Dans le cas de la Cistude d'Europe, le nombre de répliques PCR positifs semble supérieur avec la technique de filtration (test de Student pour séries appariées par permutations : $t = -2.9887$, $p\text{-value} = 0.078$; cf. Figure 15a.) alors que dans le cas de l'Ecrevisse de Louisiane, aucune différence significative n'est observée entre les deux méthodes (test de Student pour séries appariées par permutations : $t = -1$, $p\text{-value} = 1$; cf. Figure 15b.)

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Figure 15 : Proportion de répliques PCR positifs pour chaque site selon la méthode « Filtration » et la méthode « 6 tubes » pour **a.** la Cistude d'Europe et **b.** l'Ecrevisse de Louisiane.



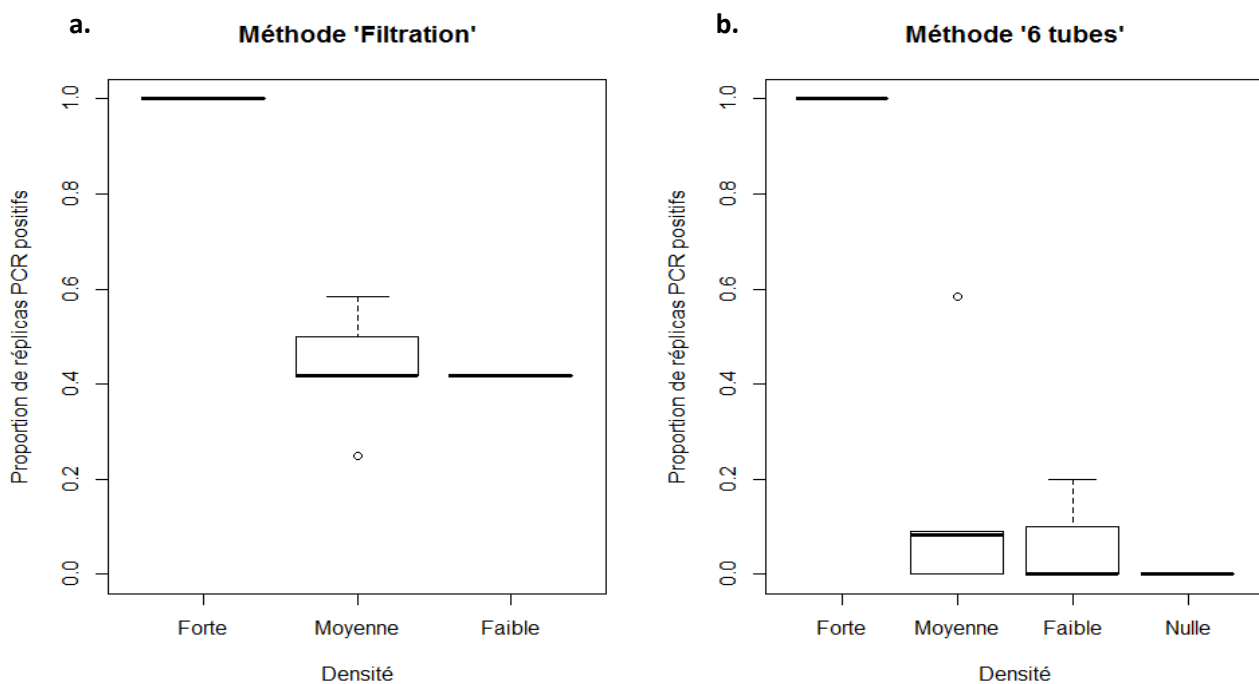
3.3.1.2 Les méthodes de barcoding ADNe et les méthodes d'inventaire classiques

Les inventaires réalisés par les méthodes classiques (verveux, nasses, observations), ont révélé la présence de la Cistude d'Europe sur 10 sites (pour un total de 14 sites étudiés) : tous les sites étudiés en Camargue et deux sites de la Petite Camargue Alsacienne (La Heid et La Gravière de la Heid) (cf. Annexe 5). Un individu a été observé sur le site du Bout du Marais en mars, mais n'a plus été aperçu par la suite et n'a pas été capturé en juillet dans les nasses. Sur les trois sites restants (Petit Triangle, Zwetschgenmatte et Etang en U), aucun individu n'a été observé ou capturé entre mars et juillet. L'Ecrevisse de Louisiane a été capturée sur 6 des 8 points d'eau où elle a été étudiée en Camargue (cf. Annexe 5). La méthode « Filtration » a permis la détection de la Cistude d'Europe et de l'Ecrevisse de Louisiane sur tous les sites où ces espèces étaient présentes (100% de détectabilité, avec respectivement 8 sites sur 8 et 6 sites sur 6). La méthode « 6 tubes » a été moins performante : elle n'a détecté la Cistude d'Europe que sur 6 sites (60% de détectabilité, avec 6 sites sur 10), mais elle a détecté l'Ecrevisse de Louisiane sur tous les sites où elle était présente (100% de détectabilité, avec 6 sites sur 6).

Dans le cas de la Cistude d'Europe, les individus étaient plus ou moins nombreux selon les sites étudiés. La densité était faible pour les deux sites où l'espèce a été observée en Petite Camargue Alsacienne et pour le site de l'Esquineau a en Camargue, avec de 1 à 3 individus (*cf.* Annexe 5). Au contraire, deux sites en Camargue, les mares forestières 3 et 5c, ont présenté une forte densité de Cistudes, avec respectivement 13 et 17 individus relevés lors des deux sessions de captures. Les 5 sites restants ont présenté une densité moyenne avec de 6 à 9 individus capturés. Dans le cas de l'Ecrevisse de Louisiane, un grand nombre d'individus, entre 22 et 82 au total, ont été relevés pendant les deux sessions de captures sur les 6 sites où l'espèce était présente (*cf.* Annexe 5).

Le nombre de répliques PCR positifs semble être lié à la densité des Cistudes d'Europe présentes à la fois pour la méthode « Filtration » et pour la méthode « 6 Tubes » (*cf.* Figure 16a. et b.). Les répliques PCR sont en effet tous positifs pour les deux sites de densité forte quelle que soit la méthode. Au contraire, les sites à densités moyenne et faible ont une proportion de répliques plus faible, notamment pour la méthode « 6 tubes » pour laquelle la présence de l'espèce n'a pas été détectée sur plusieurs sites. Entre ces deux densités, peu de différences sont observées. Les sites à densité nulle se sont révélés négatifs pour tous les répliques PCR. La significativité de ces tendances n'a pu être testée à cause du faible nombre de données par catégorie. Aucune analyse statistique n'a été réalisée pour l'Ecrevisse de Louisiane du fait de la faible variabilité des résultats PCR : les répliques étaient soit tous positifs lorsque la densité observée était forte (sauf dans un cas), soit tous négatifs lorsqu'elle était nulle, ceci pour les deux méthodes (*cf.* Annexe 5).

Figure 16 : Relation entre la proportion de répliques PCR positifs et la densité de Cistudes d'Europe observées
a. pour la méthode « Filtration » et **b.** pour la méthode « 6 tubes ».



3.3.2 Comparaison entre la méthode de metabarcoding ADNe et les méthodes d'inventaire classiques

3.3.2.1 Etude sur les Odonates

L'inventaire réalisé pour les Odonates à partir de l'observation des adultes le long d'un transect a permis de détecter 3 espèces sur le Marais des Iris et 6 espèces sur la Cerisière des Relongues (cf. Figure 17). Aucune séquence d'Odonates n'a été trouvée par la méthode basée sur l'étude de l'ADNe pour le Marais des Iris. En revanche, 51 020 séquences ont été identifiées pour la Cerisière des Relongues et correspondent à 3 espèces différentes (cf. Figures 17 et 18). Au total, ce sont 8 espèces qui ont été détectées sur ce dernier site avec seulement une espèce en commun pour les deux méthodes. La détectabilité est donc meilleure par les méthodes classiques (100 % et 75%) que par le metabarcoding ADNe (0% et 38 %) (cf. Annexe 6).

Figure 17 : Nombre d'espèces d'Odonates détectées pour chaque site étudié selon la méthode classique d'observation par transect et la méthode de metabarcoding ADNe.

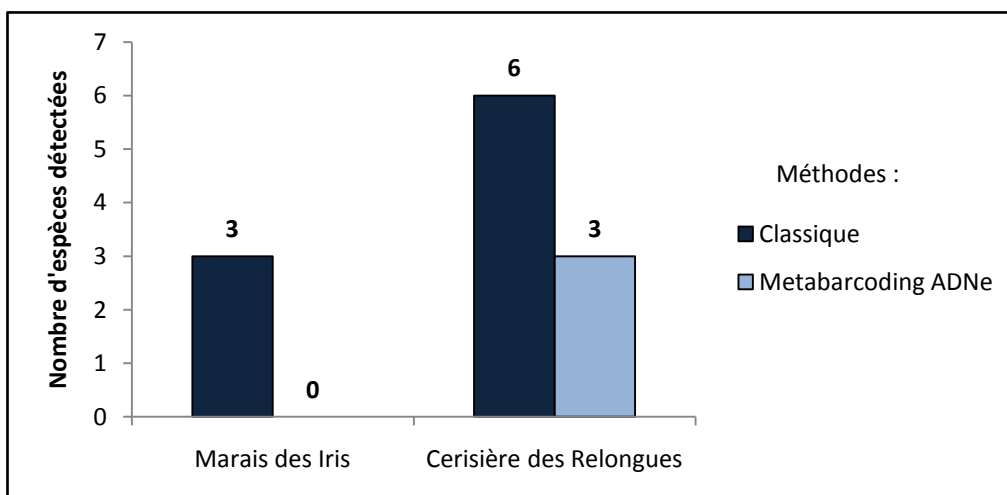
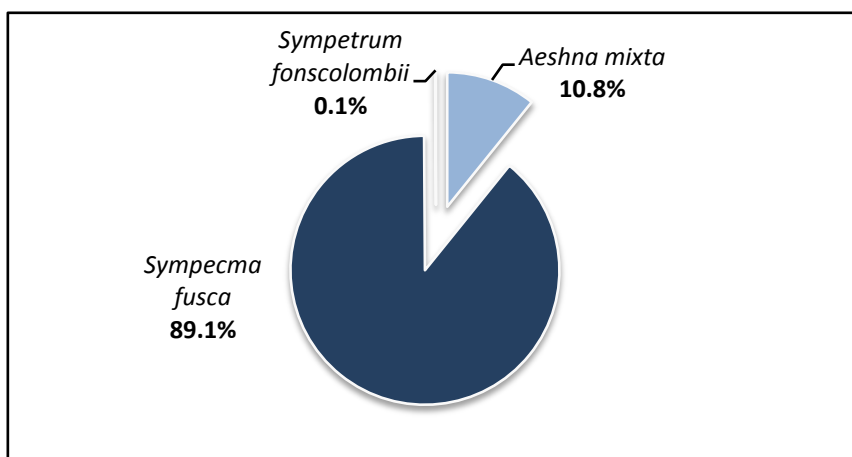


Figure 18 : Pourcentage des séquences ADN attribuées aux 3 espèces détectées sur la Cerisière des Relongues.



3.3.2.2 Etude sur les Poissons

Les verveux ont permis la capture de 0 à 4 espèces de Poissons au sein des 6 sites concernés, pour un total de 4 espèces différentes : le Poisson-chat (*Ameiurus melas*), la Perche soleil (*Lepomis gibbosus*), l'Anguille (*Anguilla anguilla*) et le Carassin (*Carassius carassius*). La méthode d'inventaire par metabarcoding ADN est plus performante (test de Student pour séries appariées par permutation : $t = 5,653$, $p\text{-value} = 0.039$), avec de 4 à 16 espèces identifiées selon les sites, pour un total de 19 espèces différentes (cf. Figures 19 et 20). Le nombre d'espèces rencontrées semble plus important pour le Petit Saint Jean (entre 11 et 16) que pour la Tour du Valat (entre 4 et 7) (cf. Figures 19 et 20). Les espèces capturées dans les verveux pour chaque site sont toutes détectées par la méthode de metabarcoding ADN, sauf pour l'Esquiveau a, où les séquences ADN du Poisson-Chat n'ont pas été trouvées. La détectabilité de la méthode par piégeage varie entre 0 et 27% selon les sites alors que celle de la méthode par metabarcoding ADN varie entre 83 et 100% (cf. Annexe 7).

Globalement, les espèces dont les séquences sont les plus représentées sont le Pseudorasbora (*Pseudorasbora parva*), la Gambusie (*Gambusia affinis*), la Perche soleil, et le Poisson-chat. Ces deux dernières espèces étaient également les plus présentes dans les verveux (cf. Annexe 7).

Figure 19 : Nombre d'espèces de Poissons détectées pour chaque site étudié selon la méthode classique de capture par verveux et la méthode de metabarcoding ADN.

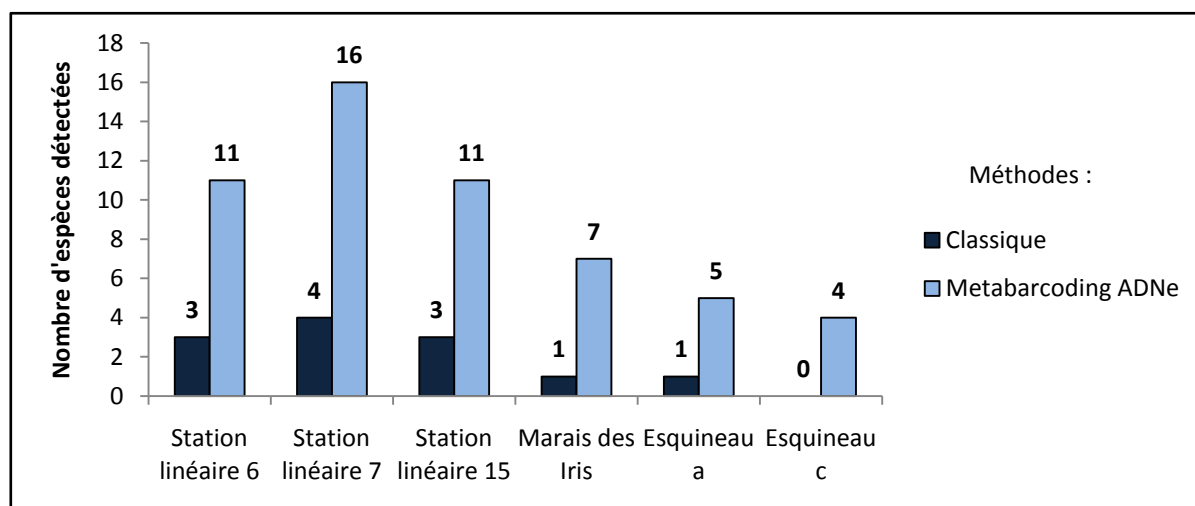


Figure 20 : Pourcentage des séquences ADN de chaque espèce détectée sur les 6 sites étudiés.

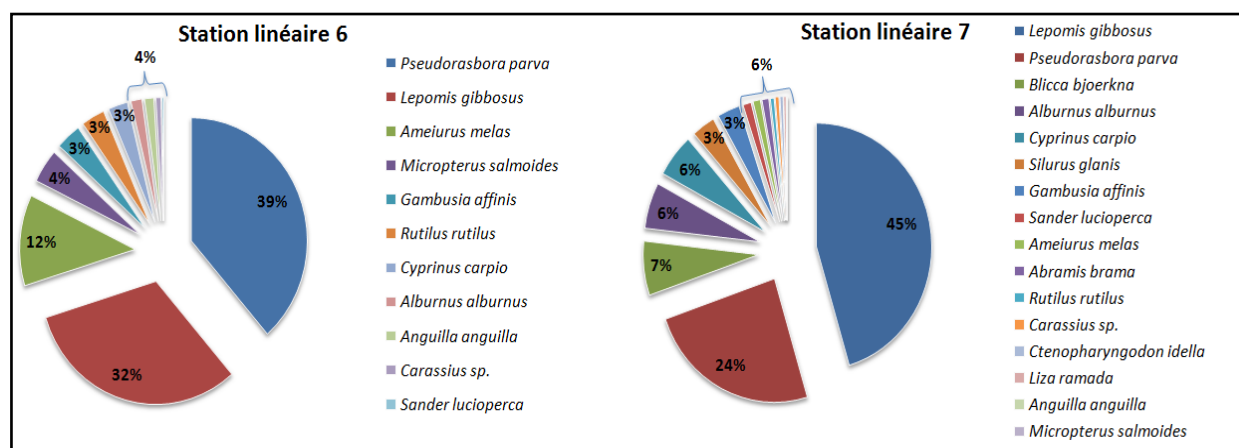
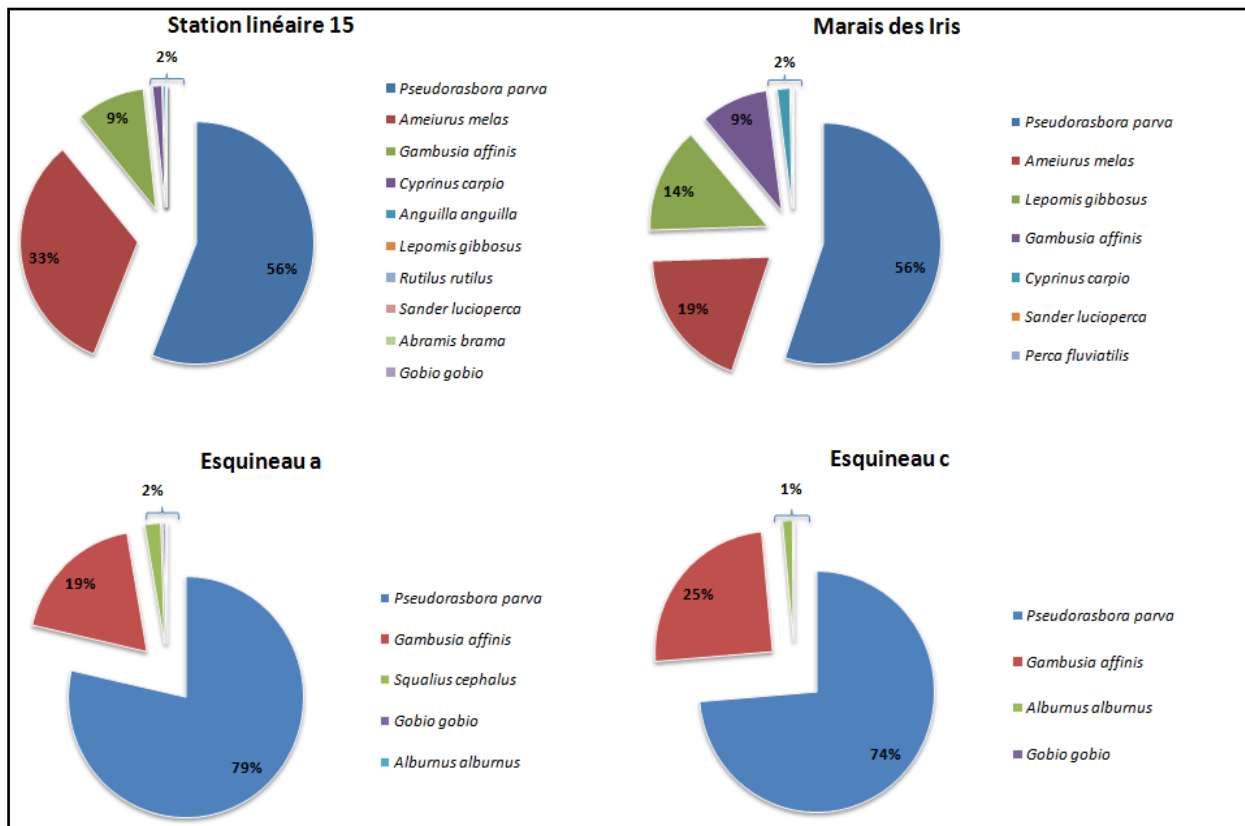
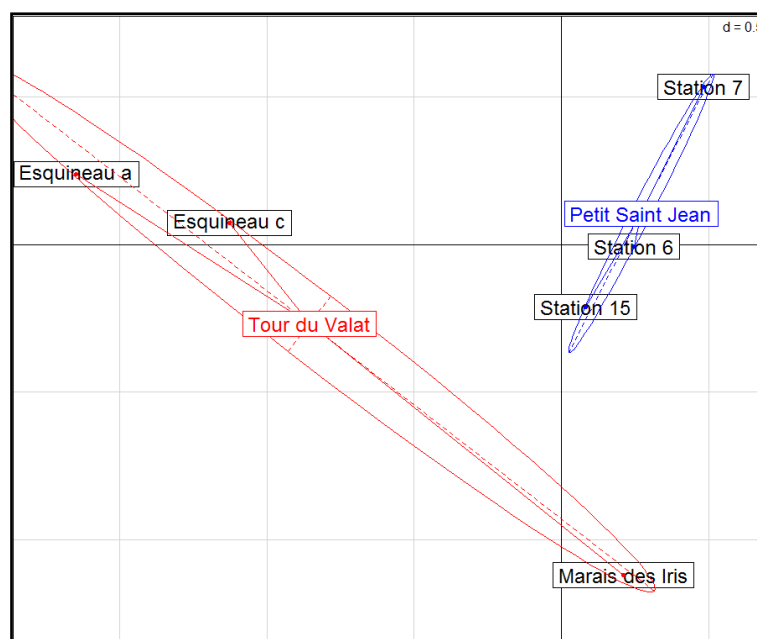


Figure 20 (suite) : Pourcentage des séquences ADN de chaque espèce détectée sur les 6 sites étudiés.



Les résultats de l'AFC ont montré que les listes d'espèces de Poissons étaient relativement similaires entre les trois sites du Petit Saint Jean (cf. Figure 21). Par contre, au sein de la Tour du Valat, les espèces semblent différentes entre le Marais des Iris et les deux sites de l'Esquineau.

Figure 21 : Résultats de l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) effectuée sur la liste de présence/absence des espèces de Poissons en fonction des six sites étudiés, selon les deux premiers axes de plus grande variabilité.



3.4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

3.4.1 Efficacité des méthodes d'inventaire basées sur l'étude de l'ADNe

3.4.1.1 Dans le cas du barcoding ADNe

La détection de la Cistude d'Europe et de l'Ecrevisse de Louisiane par le barcoding ADNe (méthode « Filtration » ou méthode « 6 Tubes ») s'est révélée positive sur la majorité des sites où l'espèce était présente d'après les méthodes d'inventaire classiques. Pour deux des sites de la réserve naturelle de la Petite Camargue Alsacienne où des Cistudes d'Europe ont été observées et capturées, les résultats des analyses génétiques, effectuées après un échantillonnage selon la méthode « 6 tubes », étaient cependant négatifs. Cette méthode d'échantillonnage a montré quelques difficultés à détecter les Cistudes lorsque celles-ci étaient présentes en moyenne ou en faible densité. De précédentes études réalisées avec des méthodes similaires ont cependant montré que la détection d'espèces ciblées était possible même lorsque celles-ci étaient présentes en faible densité (Ficetola *et al.* 2008, Dejean *et al.* 2012). Les espèces ciblées dans ces études font partie du groupe des Amphibiens et rejettent potentiellement plus d'ADN que des Reptiles pour deux principales raisons. Tout d'abord, la peau des Amphibiens sécrète un mucus leur permettant notamment de rester un certain temps hors de l'eau, ce qui n'est pas le cas des Reptiles. De plus, ces animaux ont un comportement plus actif, entraînant une meilleure dispersion de leur ADN et ainsi une plus forte probabilité de détection. Il convient donc d'améliorer la stratégie d'échantillonnage afin de détecter des espèces plus discrètes, en multipliant les échantillons ou bien en utilisant une autre méthode, telle que la méthode « Filtration », également testée dans le cadre de ce travail.

La méthode « Filtration » semble en effet plus performante que la méthode « 6 tubes » sur la majorité des sites étudiés pour la Cistude d'Europe. Elle a permis la détection de cette espèce sur tous les points d'eau échantillonnés à des densités fortes, moyennes et faibles. La filtration, surtout utilisée dans les milieux courants (Goldberg *et al.* 2011, Jerde *et al.* 2011), permet d'échantillonner de plus grands volumes d'eau et ainsi d'augmenter la probabilité de détection de l'ADN des espèces recherchées. La méthode « Filtration » utilisée dans ce rapport présente d'autres avantages : peu de temps de préparation avant le terrain, un transport facilité vers les pays étrangers grâce à l'absence d'alcool, et une extraction d'ADN plus rapide puisque les tubes sont moins nombreux que pour la méthode « 6 tubes » (au nombre maximum de 3).

Il serait intéressant de tester en parallèle la méthode « Filtration » et la méthode « 6 tubes » sur un nombre de sites plus conséquent, possédant des densités d'individus variées (fortes, faibles et nulles) de façon à confirmer la tendance observée dans le cadre de mon travail. Ces tests devraient être réalisés sur la Cistude d'Europe, mais aussi sur d'autres espèces ou groupes taxonomiques. Une nouvelle étude sur l'Ecrevisse de Louisiane est également souhaitable, car même si sa détection s'est révélée maximale, tous les sites considérés présentaient soit une forte densité des individus, soit une densité nulle. Il est important de tester si les méthodes fonctionnent aussi bien pour des sites à densité plus faible.

3.4.1.2 Dans le cas du metabarcoding ADNe

La méthode de metabarcoding ADNe s'est révélée peu performante pour la détection des Odonates, mais très efficace pour la détection des Poissons.

Dans le cas des Odonates, un plus grand nombre d'espèces ont en effet été détectées par l'observation des adultes par transect. Une espèce menacée à l'échelle européenne, le Leste à grands stigmas (*Lestes macrostigma*), a ainsi été identifiée à la Cerisière des Relongues, sur le domaine de la Tour du Valat. Les résultats de metabarcoding ADNe sont peu nombreux, notamment pour le marais des Iris ou aucune espèce n'a été détectée. Il est cependant difficile de comparer les résultats des deux méthodes puisque la méthode par transect permet d'observer la présence des espèces à leur état adulte, alors que le metabarcoding ADNe détecte la présence des larves. Les méthodes classiques portant sur la détection des larves sont cependant peu efficaces en milieu stagnant. La stratégie utilisée lors des inventaires des Odonates est de combiner plusieurs méthodes à différentes périodes de l'année : carottages, filet surber, collecte des exuvies, pièges à émergence, transects (Jakob 2011). Dans notre cas, il est donc possible que la différence des espèces détectées entre les deux méthodes soit due à la phénologie des Odonates, fortement variable selon l'espèce et le lieu considérés. En effet, les six espèces observées lors des transects : le Crocothémis écarlate (*Crocothemis erythrea*), l'Orthétrum bleuisant (*Orthetrum coerulescens*), le Sympétrum de Fonscolombe (*Sympetrum fonscolombii*), l'Agrion élégant (*Ischniura elegans*), le Leste sauvage (*Lestes barbarus*) et le Leste à grands stigmas, étaient en période de reproduction au début du mois de juillet (Grand et Boudot 2006). Ces espèces revenaient se nourrir et se reproduire sur les sites et avaient donc très probablement émergé depuis plusieurs semaines (Jakob C. comm. pers.). Par contre, l'Aeshne mixte (*Aeshna mixta*) et le Leste brun (*Sympecma fusca*), détectés par metabarcoding ADNe, sont des espèces tardives dont les larves étaient encore présentes en juillet (Grand et Boudot 2006). Le Sympétrum de Fonscolombe a toutefois également été détecté par la méthode génétique, mais avec un faible pourcentage de séquences ADN identifiées. Il est donc possible que certaines larves, n'émergeant que l'année d'après, aient été présentes sur le site de la Cerisière des Relongues.

Le manque de résultats observés pour la méthode de metabarcoding ADNe peut également être dû à plusieurs facteurs, aussi bien au niveau de l'échantillonnage que lors des analyses génétiques. Tout d'abord, seule la méthode « 6 tubes » a été utilisée. Or, cette méthode s'est révélée moins performante pour la détection de la Cistude d'Europe et pourrait être la cause du peu d'espèces d'Odonates trouvées sur les deux sites. Ensuite, le couple d'amorces utilisé s'est révélé peu spécifique puisqu'il a aussi amplifié des séquences de Plécoptères, Coléoptères et Ephéméroptères (résultats non montrés). Il se pourrait également que l'ADN de certaines espèces d'Odonates n'ait pas été amplifié. Enfin, la base de données de séquences de référence actuellement disponible pour ce taxon est GenBank. Or, cette banque de séquences est incomplète et parfois peu fiable. Cette étude constitue un premier test du couple d'amorces et de séquençage pour les Odonates, contrairement aux Poissons pour lesquels ces deux points ainsi que la base de référence ont déjà été optimisés. Des améliorations restent donc à mener à ce niveau avant de pouvoir valider l'approche pour ce groupe taxonomique.

Dans le cas des Poissons, la méthode de metabarcoding ADNe s'est révélée plus performante que la méthode de piégeage par verveux traditionnellement utilisée dans les marais. Les quatre espèces trouvées dans les verveux : le Poisson-Chat (*Ameiurus melas*), la Perche soleil (*Lepomis gibbosus*), l'Anguille (*Anguilla anguilla*) et le Carassin (*Carassius carassius*) ont également été trouvées par la méthode génétique, sauf pour le site de l'Esquineau a, où le Poisson-chat n'a pas été détecté. Deux individus de cette espèce ont été capturés respectivement le 13 et le 14 juin. Aucun autre individu n'a été capturé avant ou après, ce qui laisse penser à des individus isolés. De plus, les prélèvements d'eau pour la méthode génétique ont été réalisés plus de deux semaines après ces

captures. Or, Dejean *et al.* (2011) ont montré que la probabilité de ne pas détecter l'ADN d'une espèce de Poisson, l'Esturgeon sibérien (*Acipenser baerii*), était supérieure à 95 % au-delà de 17 jours après son retrait. L'hypothèse selon laquelle l'ADN du Poisson-chat n'était plus détectable au moment des prélèvements peut donc être avancée.

Bien que les sites échantillonnés soient stagnants, des connexions hydrologiques existent entre eux au sein des entités géographiques du Petit Saint Jean et de la Tour du Valat, ce qui laisse à penser que les Poissons peuvent circuler librement entre ces sites. Les listes d'espèces sont effectivement similaires entre les trois sites du Petit Saint Jean. La présence de 5 des 17 espèces non capturées par les verveux sur cette entité : la Carpe commune (*Cyprinus carpio*), le Silure glane (*Silurus glanis*), la Gambusie (*Gambusia affinis*), le Pseudorasbora (*Pseudorasbora parva*) et la Brème commune (*Abramis brama*) a été confirmée (Blanchon T. comm. pers.). Les 13 espèces restantes sont présentes à proximité des sites étudiés d'après l'atlas des poissons d'eau douce de France métropolitaine (Keith *et al.* 2011). Les listes d'espèces sont également similaires sur la Tour du Valat, entre les sites de l'Esquineau a et de l'Esquineau c, mais ces deux sites semblent avoir des espèces différentes du Marais des Iris et en plus faible nombre. Cela peut s'expliquer par le fait que les marais des Iris et de l'Esquineau sont maintenus en eau par le canal d'irrigation de l'Aube de Bouic et que les deux sites de l'Esquineau sont plus éloignés de l'arrivée d'eau et moins profonds (Olivier A. comm. pers.). Les 9 espèces détectées par le metabarcoding ADNe et non capturées par les verveux correspondent à certaines espèces trouvées dans ce canal (Poizat *et al.* 1999 ; Crivelli A comm. pers.).

Parmi la liste des espèces détectées sur les sites, la méthode de metabarcoding ADNe a mis en évidence une espèce menacée, l'Anguille européenne (*Anguilla anguilla*), et 7 espèces exotiques, l'Amour blanc (*Ctenopharyngodon idella*), le Pseudorasbora (*Pseudorasbora parva*) (considérée comme une des cent espèces les plus invasives d'Europe d'après DAISIE (2013)), la Perche-soleil (*Lepomis gibbosus*), le Poisson-chat (*Ameiurus melas*) (ces deux dernières espèces figurant sur la liste des espèces susceptibles de provoquer des déséquilibres biologiques d'après l'article R432-5 du Code de l'Environnement), le Black-bass (*Micropterus salmoides*), le Sandre (*Sander lucioperca*) et le Silure glane (*Silurus glanis*).

D'après les résultats du metabarcoding ADNe, les espèces détectées présentant le plus de séquences sont le Pseudorasbora, la Perche soleil, la Gambusie et le Poisson-chat. Ces résultats concordent avec les captures des verveux puisque la Perche soleil et le Poisson-chat ont été les plus observés. L'absence de la Gambusie et du Pseudorasbora dans les pièges peut s'expliquer par leur petite taille, qui leur a permis de passer à travers les mailles des verveux utilisés.

Il serait intéressant d'effectuer de nouveaux tests sur les Odonates et les Poissons, avec à la fois la méthode « Filtration » et la méthode « 6 tubes » sur une dizaine de sites et de comparer les résultats à plusieurs méthodes classiques afin d'avoir une meilleure idée de toutes les espèces présentes sur chaque site à différentes périodes de l'année. De plus, la création d'une nouvelle base de référence pour les Odonates serait très utile, notamment pour attribuer de façon plus fiable des noms d'espèces aux séquences d'ADN obtenues après séquençage.

3.4.2 Vers un nouvel outil de veille écologique

Ces études comparatives ont permis de montrer que la méthode d'inventaire basée sur l'étude de l'ADNe était prometteuse et en constante amélioration. En effet, les méthodes d'échantillonnage utilisées en milieu stagnant ont déjà été modifiées depuis la première étude sur l'ADNe dans les

milieux aquatiques de Ficetola *et al.* (2008). Dans cette étude, seulement trois prélèvements de 15ml étaient effectués sur chaque site. La méthode a par la suite été améliorée avec la technique « 6 tubes », permettant de prélever plus d'eau à plus d'endroits différents et ainsi d'optimiser la détection de l'ADNe de l'espèce recherchée. Cette méthode a cependant présenté quelques difficultés pour la détection de la Cistude d'Europe comme l'a montré le présent rapport, et une autre méthode, dite de « filtration » semble donner de meilleurs résultats.

L'étude de l'ADNe semble être une bonne méthode pour détecter l'Ecrevisse de Louisiane et les Poissons, mais nécessite des améliorations en ce qui concerne la Cistude d'Europe et les Odonates. En parallèle de ces études, d'autres projets sont menés, notamment sur les Amphibiens et sur les Mammifères. Pour les Amphibiens, 38 sites ont été étudiés à la fois par la méthode de metabarcoding ADNe et par des méthodes d'inventaire classiques diurnes et nocturnes. Les résultats montrent une nette supériorité de la méthode génétique avec une moyenne de 98% de détectabilité des espèces sur tous les sites considérés contre 59 % pour les méthodes classiques (Dejean comm. pers.). De la même façon, l'étude en cours chez les mammifères a permis de détecter des espèces rares telle que la Loutre d'Europe (*Lutra lutra*) (Dejean comm. pers.).

Avant la mise en place d'un outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants basé sur l'étude de l'ADNe, des études sont encore à mener, de façon à ce que la méthode soit jugée fiable pour tous les groupes taxonomiques souhaités (les Amphibiens, les Poissons, les Mammifères, les Crustacés, les Odonates et les Reptiles), mais aussi pour améliorer la compréhension autour des phénomènes de sécrétion, de dégradation et de persistance de l'ADNe. Ces facteurs sont encore peu connus mais semblent dépendre des espèces considérées (et même des individus au sein de chaque espèce), des conditions environnementales, de la densité des animaux et de leur temps de résidence dans l'eau (Pilliod *et al.* 2013).

4 VALORISATION DES DONNEES PAR LA CREATION D'UNE CARTE INTERACTIVE

4.1 INTRODUCTION

Les données acquises par les inventaires de la biodiversité peuvent être valorisées par la création de cartes de répartition des espèces. De telles cartes permettent de partager les connaissances et d'avoir une vision plus globale sur la distribution des espèces, afin de mettre en place des actions de gestion adaptées. Des atlas existent actuellement pour certains groupes taxonomiques, mais sont peu actualisés compte tenu du temps nécessaire à l'acquisition des données. Des cartes interactives sont également disponibles sur le web, à des échelles différentes et avec des données obtenues par des méthodes variées.

Ainsi, à une échelle mondiale, la "map of life" a pour but de rassembler toute la connaissance de la distribution de la biodiversité en une seule carte¹ (Jetz *et al.* 2012). Cette carte interactive permet d'effectuer une recherche par espèce ou par zone, via différents rayons (50, 100 ou 300 km), pour différents groupes taxonomiques. Cette carte, actuellement en cours de développement, propose dans un premier temps des informations mondiales sur les oiseaux, les mammifères et les amphibiens, puis des informations plus locales relatives à l'Amérique du Nord pour les poissons d'eau douce et les reptiles. Le projet est ambitieux puisqu'il regroupe des données à une échelle mondiale, mais très intéressant de par les connaissances qu'il pourra apporter.

A une échelle européenne, plusieurs cartes ont été créées mais restent encore peu précises et difficiles d'utilisation. Un projet cartographique intéressant est en cours de développement par les créateurs du réseau Bee-secured², dédié à la collecte de paramètres environnementaux et liés aux abeilles (entre autres la pollution, le pollen, la météo, la biodiversité et l'écologie). Cette carte aura pour but de représenter les données de 30 000 ruches déployées sur l'Europe par des mailles de 3km par 3km.

Enfin, à l'échelle française, le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) est le responsable scientifique du programme de synthèse de la connaissance de la biodiversité (article L411-5 du Code de l'Environnement). Le Service du Patrimoine Naturel (SPN), dépendant du Muséum, travaille sur la gestion et la conservation de la nature, et est gestionnaire de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN). Sur le site web de l'INPN³, des fiches sont disponibles pour chaque espèce et présentent la distribution de l'espèce en France (métropolitaine ou outre-mer) selon des données issues de différents inventaires. Ces données sont bien souvent affichées selon un maillage de 10km par 10km, un standard de l'INPN, mais d'autres niveaux de synthèse peuvent être rencontrés : département, commune, espace protégé.

Des idées ont été reprises à partir de chacune des cartes évoquées précédemment (dont la liste n'est pas exhaustive) et à partir des discussions avec les personnes enquêtées (*cf.* 2. Entretiens). Le but n'est pas de faire une carte isolée de celles déjà existantes, mais plutôt de représenter des données acquises par une méthode unique : l'étude de l'ADN environnemental, via des outils simples d'utilisation. Les données pourront ensuite être ajoutées et/ou comparées à des données

¹ <http://www.mappinglife.org/>

² <http://www.bee-secured.com/fr/accueil>

³ <http://inpn.mnhn.fr/accueil/index>

préexistantes. Cette carte, utilisée uniquement pour les milieux terrestres et aquatiques stagnants, couvrira dans un premier temps toute l'Europe et se décomposera en mailles de 10 km par 10 km.

Les maquettes de cartes présentées ci-dessous représentent à titre d'exemple la France et les données nouvellement acquises par l'étude de l'ADN environnemental dans le cadre de ce travail (cf. 3. Etudes comparatives). La méthode n'étant pas encore suffisamment performante pour tous les groupes taxonomiques, seules les données de présence seront considérées dans un premier temps.

4.2 PRESENTATION DES MAQUETTES PROPOSEES POUR LES DIFFERENTES VUES DE LA CARTE INTERACTIVE

Les objectifs de la carte interactive sont doubles :

- 1. connaître la distribution d'une espèce cible
- 2. connaître les espèces présentes sur une maille donnée.

L'interface d'accueil présente les deux possibilités : un espace dans le coin supérieur gauche de la carte permet d'effectuer une recherche par espèce en écrivant directement le nom de l'espèce recherchée et un deuxième espace dans le coin supérieur droit de la carte permet de basculer du mode "OFF" au mode "ON" de la recherche par maille (cf. Figure 21). Cet écran possède également les outils de zoom et de déplacement sur la carte, situés sur le côté gauche.

4.2.1 Distribution d'une espèce cible

Au départ, les espèces soumises à la recherche seront peu nombreuses puisque les données seront acquises au cours du temps. Dans un premier temps, un menu déroulant sera donc disponible en dessous de l'entrée "Recherche par espèce", afin de choisir parmi les groupes taxonomiques proposés les espèces qui peuvent être recherchées (cf. Figure 22).

Une fois une de ces espèces sélectionnée, des informations apparaissent avec sa photo, son nom latin, son nom commun, sa taxonomie (classe, ordre, famille), son statut de menace et de protection, et un lien vers un site internet plus complet (cf. Figure 23 avec l'exemple de la Cistude d'Europe).

Parallèlement, les mailles de 10 km par 10 km contenant des données de présence ou d'absence de l'espèce apparaissent, avec des couleurs différentes selon les cas suivants :

- une donnée de présence inférieure à 5 ans en rouge
- une donnée de présence supérieure à 5 ans en orange
- une donnée d'absence inférieure à 5 ans en vert
- une donnée d'absence supérieure à 5 ans en bleu

Dans notre cas, seulement deux mailles correspondant au Petit Saint Jean et à la Tour du Valat apparaissent en rouge. La date de dernière observation et l'échantillonneur sont indiqués lorsque le curseur est situé sur une de ces deux mailles.

Les données d'absence sont à prendre avec précaution. En effet, une absence détectée sur un point d'eau ne signifie pas forcément que l'espèce considérée est absente de toute la maille.

Figure 22 : Interface d'accueil.

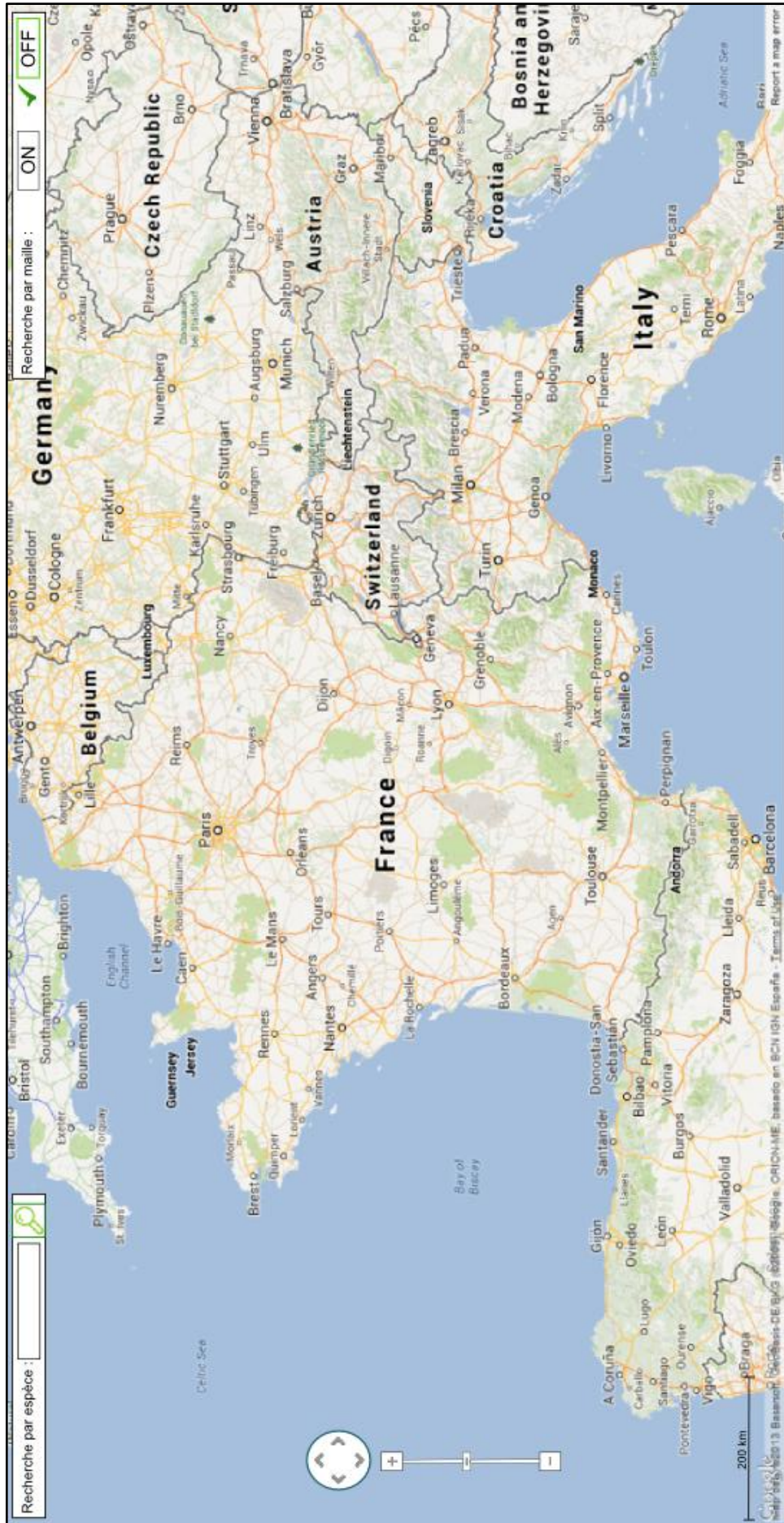


Figure 23 : Recherche par espèce, données disponibles.

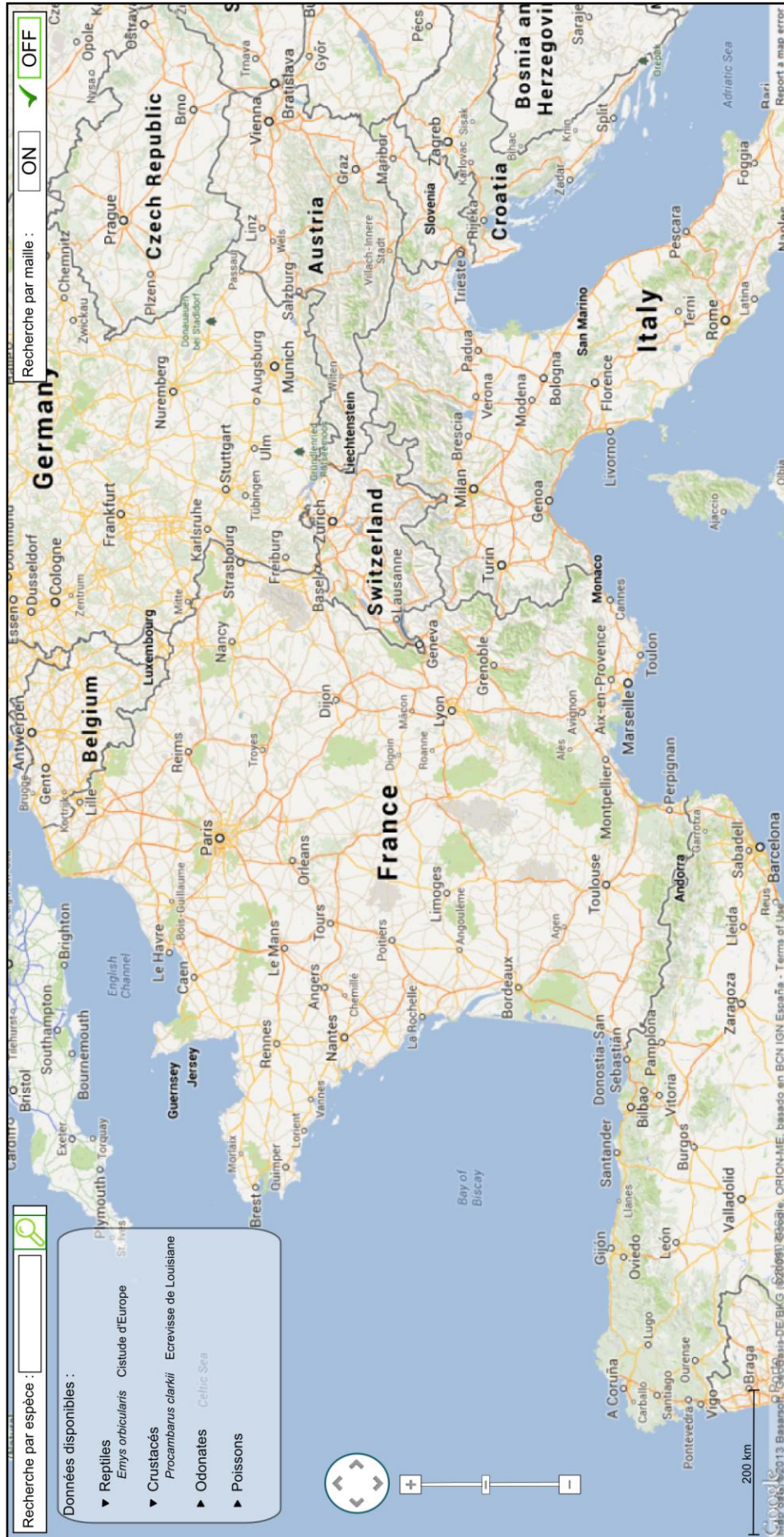
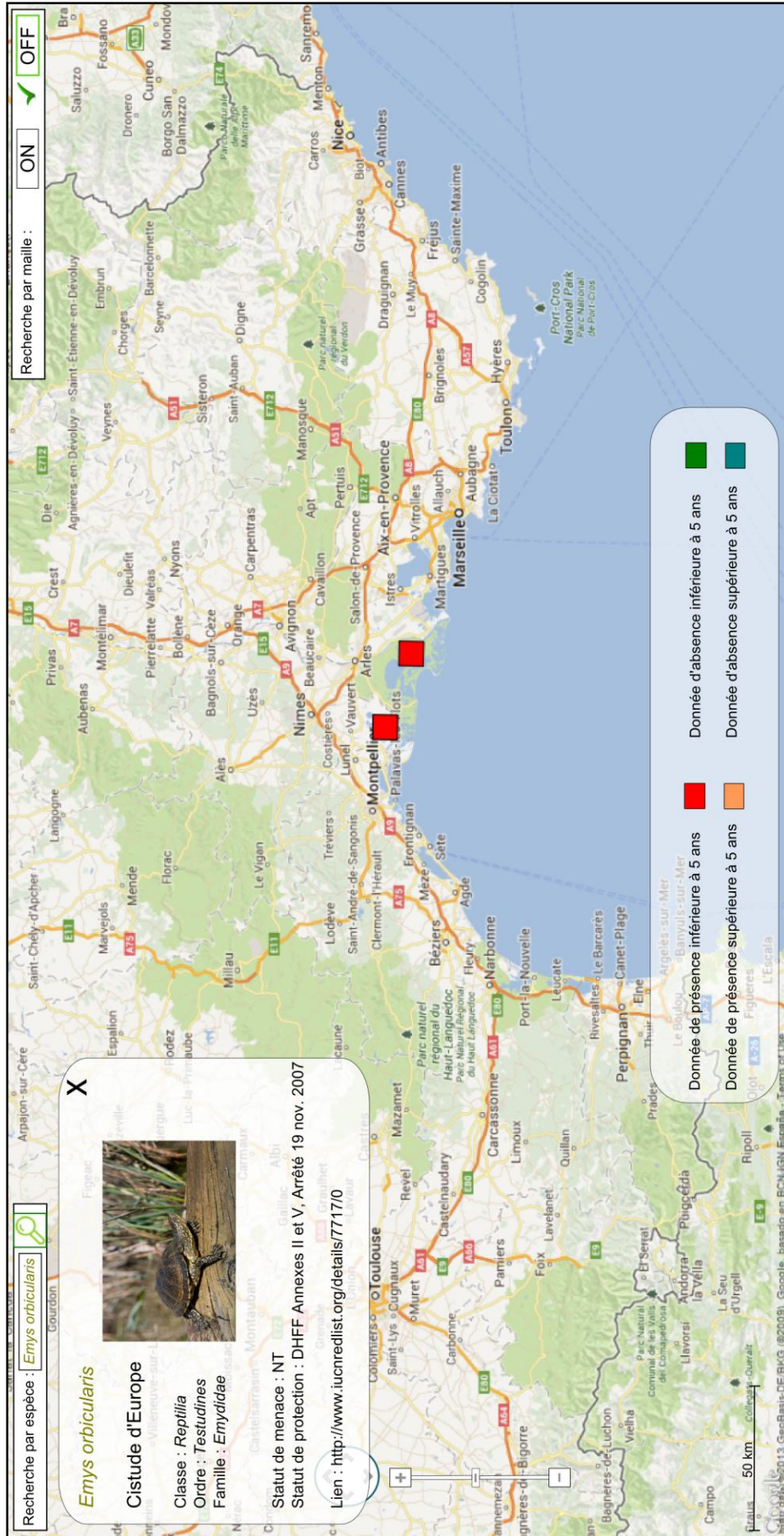


Figure 24 : Recherche par espèce, exemple de la Cistude d'Europe.



4.2.2 Liste d'espèces présentes sur une maille donnée

Le mode "Recherche par maille" doit être activé avant de pouvoir cliquer sur une maille (mode ON, cf. Figure 24). Le maillage de 10 km par 10 km apparaît alors sur toute la France, et les mailles contenant des données apparaissent en jaune.

Une fois qu'une maille est sélectionnée, une nouvelle fenêtre apparaît avec l'image de la maille, son numéro et la liste d'espèces associée (cf. Figure 25 avec l'exemple de la maille du Petit Saint Jean). Pour chaque espèce, plusieurs informations sont ensuite données: sa taxonomie (classe, ordre, famille), son nom latin, son nom commun, ses statuts de menace de protection, son origine, sa dernière année d'observation, l'échantillonneur et un lien vers un site internet plus complet. Des couleurs sont également appliquées pour les espèces menacées ou protégées (en bleu) et pour les espèces exotiques ou exotiques envahissantes (en rose).

Ces cartes ont été reprises pour un site web en cours d'élaboration.

4.3 PERSPECTIVES

A plus long terme, le but serait d'avoir un suivi régulier de certaines mailles. Avec des mailles de 10km par 10km, au nombre de 5000 en France, il est difficile de réaliser un suivi complet chaque année, surtout que, dans un souci d'exhaustivité, plusieurs mares seraient à échantillonner au sein d'une même maille. Il faudrait alors mettre en place un plan d'échantillonnage à l'échelle française, avec un pourcentage de mailles échantillonnées et des résultats pour plusieurs mares par mailles. Ce type d'échantillonnage doit être réfléchi avec les différents partenaires de la société, qui connaissent leur terrain et peuvent privilégier des zones de plus grande importance pour les échantillonnages. Un tel plan d'échantillonnage, répété par exemple tous les trois ans, permettrait d'avoir des données temporelles et de suivre l'évolution des espèces dans un endroit donné.

Une carte de vigilance pourrait alors être créée, avec une classe de vigilance associée à chaque maille selon le nombre d'espèces menacées/protégées et exotiques/exotiques envahissantes présentes.

Figure 25 : Recherche par maille, données disponibles.

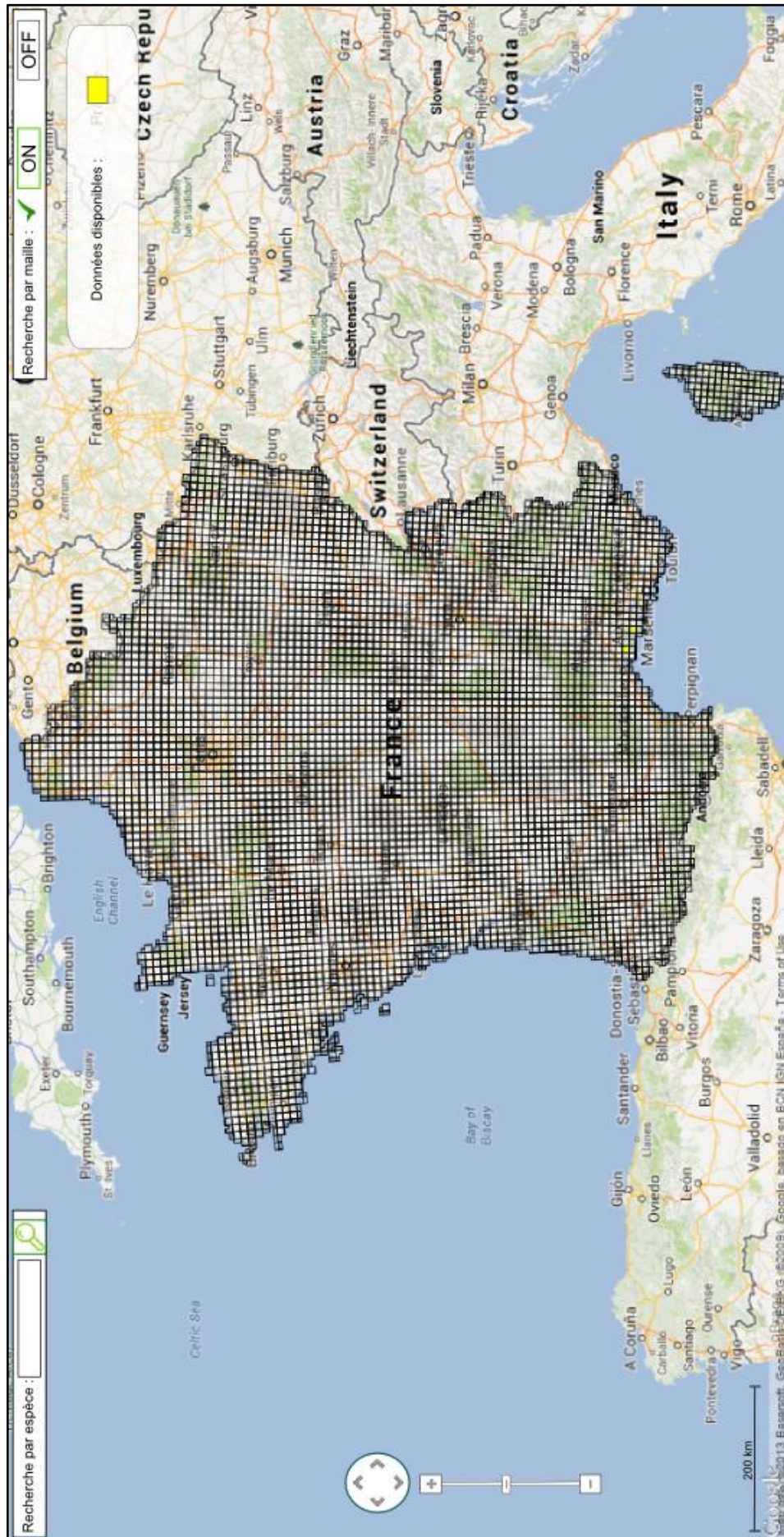


Figure 26 : Recherche par maille, exemple de la maille du Petit Saint Jean.

Recherche par espèce :

Recherche par maille : ON OFF

Données disponibles : Focussé Global

Maille 10km E083N626

Esèces menacées ou protégées : ■

Esèces exotiques ou envahissantes : ■

| Classe | Ordre | Famille | Nom latin | Nom commun | Menace | Protection | Exotique | Dernière obs. | Echantillonnage | Lien |
|----------------|--------------------|---------------|--------------------------------|------------------------|--------|---|----------|---------------|------------------------|---|
| Actinopterygii | Anguilliformes | Anguillidae | <i>Anguilla anguilla</i> | Anguille d'Europe | CR | CR | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/50344/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Abramis brama</i> | Breme commune | LC | LC | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/135656/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Alburnus alburnus</i> | Ablette | LC | LC | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/789/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Blicca blicca</i> | Breme boréalière | LC | LC | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/789/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Carassius sp.</i> | Carassin sp. | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.fishbase.org/summary/79 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Ctenopharyngodon idella</i> | Amour blanc | NA | NA | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/6180/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Cyprinus carpio</i> | Carpe commune | LC | LC | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/18448/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Gobio gobio</i> | Goujon | DD | DD | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/166136/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Pseudorasbora parva</i> | Pseudorasbora | NA | NA | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/19787/0 |
| Actinopterygii | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Rutilus rutilus</i> | Gardouille | LC | LC | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/166562/0 |
| Actinopterygii | Cyprinodontiformes | Poeciliidae | <i>Gambusia affinis</i> | Gambusie | / | / | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/135714/0 |
| Actinopterygii | Mugiliformes | Mugilidae | <i>Liza ramada</i> | Mulet porc | LC | LC | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/202555/0 |
| Actinopterygii | Perciformes | Centrarchidae | <i>Lepomis gibbosus</i> | Perche soleil | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/51265/0 |
| Actinopterygii | Perciformes | Centrarchidae | <i>Micropterus salmoides</i> | Black-bass | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/20860/0 |
| Actinopterygii | Perciformes | Percidae | <i>Sander lucioperca</i> | Sandre | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/202674/0 |
| Actinopterygii | Sturioniformes | Ictaluridae | <i>Ameiurus nebulosus</i> | Poisson-chat | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/40713/0 |
| Actinopterygii | Sturioniformes | Siluridae | <i>Silurus glanis</i> | Silure glane | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/153977/0 |
| Malacostraca | Decapoda | Cambaridae | <i>Procambarus clarkii</i> | Écrevisse de Louisiane | NA | NA | Oui | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/153977/0 |
| Reptilia | Testudines | Emydidae | <i>Emys orbicularis</i> | Cistude d'Europe | NT | DHFF Annexes II et IV, Arrêté du 19 nov. 2007 | Non | 2013 | SPiGEN / Tour du Valet | http://www.iucnredlist.org/details/7717/0 |

5 CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce stage m'a permis d'avoir une vision globale sur la détection des espèces aquatiques par l'étude de l'ADNe, en partant du recueil des avis des personnes concernées par la problématique, puis en passant par des études concrètes comprenant échantillonnage sur le terrain, analyses génétiques en laboratoire suivies d'analyses bioinformatiques et statistiques dans la mesure du possible, et enfin en réfléchissant à un outil de valorisation des données acquises par cette méthode.

La première partie de ce rapport, « Entretiens », a permis de déterminer les six principaux groupes taxonomiques à suivre dans le cadre d'un outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants basé sur l'étude de l'ADNe : les Amphibiens, les Poissons, les Mammifères, les Crustacés, les Odonates et les Reptiles. Ces groupes contiennent des espèces menacées, protégées et exotiques et ne sont pas toujours faciles à détecter par des méthodes d'inventaire classiques. Après discussion avec les personnes enquêtées, la valorisation des données par la création d'une carte interactive semble également être une idée pertinente, et permettrait la diffusion simple des connaissances sur la biodiversité.

La deuxième partie, « Etudes comparatives », a permis de montrer que l'étude de l'ADNe était performante pour la détection de deux nouveaux taxons : l'Ecrevisse de Louisiane et les Poissons, mais qu'elle restait encore à améliorer dans le cas de la Cistude d'Europe et des Odonates. Dans tous les cas, des études supplémentaires sont nécessaires sur ces taxons afin d'identifier la meilleure technique d'échantillonnage. En effet, la méthode « Filtration », mise en place pour la première fois dans le cadre de ce stage, semble mieux fonctionner que la méthode « 6 tubes », actuellement utilisée par SPYGEN.

La troisième et dernière partie, « Valorisation des données », a permis la création d'un concept de cartes interactives regroupant les données acquises par barcoding ou metabarcoding ADNe. Un site web en cours d'élaboration reprenant ces cartes constituera ainsi un outil simple de communication et d'information sur la répartition des espèces.

Les méthodes de barcoding et de metabarcoding ADNe sont en plein développement et connaissent actuellement un fort engouement, notamment pour la détection d'espèces rares, invasives, et difficilement détectables par les méthodes d'inventaire classiques. Ces méthodes vont permettre dans un futur proche l'amélioration de la connaissance sur la biodiversité et pourront être intégrées dans un nouvel outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants. Cependant, la mise en place d'un tel outil nécessite la validation de ces méthodes pour tous les groupes taxonomiques souhaités et une meilleure compréhension des facteurs affectant la dispersion de l'ADNe, sa dégradation et sa persistance. Il est aujourd'hui envisagé que je poursuive ces recherches dans le cadre d'une thèse CIFRE avec la société SPYGEN.

BIBLIOGRAPHIE

- Beja-Pereira A., Oliveira R., Alves P.C., Schwartz M.K., Luikart G., 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*, 9:1279-1301.
- Bhadury P., Austen M.C., Bilton D.T., Lamshead P.J.D., Rogers A.D., Smerdon G.R., 2006. Molecular detection of marine nematodes from environmental samples : overcoming eukaryotic interference. *Aquatic Microbial Ecology*, 44:97-103.
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:12794-12797.
- Cooper A., Poinar H.N., 2000. Ancient DNA : do it right or not at all. *Science*, 289: 1139-1139.
- Darling J.A., Mahon A.R., 2011. From molecules to management : adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111:978-988.
- Dejean T., Valentini A., Duparc A., Pellier-Cuit S., Pompanon F., Taberlet P., Miaud C., 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 6:e23398.
- Dejean T., Valentini A., Miquel C., Taberlet P., Bellemain E., Miaud C., 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding : the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49:953-959.
- Dray S., Dufour A.B., 2007. The ade4 package : implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22:1-20.
- Dudgeon D., Arthington A., Gessner M., Kawabata Z., Knowler D., Leveque C., Naiman R., Prieur-Richard A., Soto D., Stiassny M., Sullivan C., 2006. Freshwater biodiversity : importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81:163-182.
- Ficetola G.F., Miaud C., Pompanon F., Taberlet P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4:423-425.
- Foote A.D., Thomsen P.F., Sveegaard S., Wahlberg M., Kielgast J., Kyhn L.A., Salling A.B., Galatius A., Orlando L., Gilbert M.T.P., 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS One*, 7:e41781.
- Goldberg C.S., Pilliod D.S., Arkle R.S., Waits L.P., 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water : a demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho Giant Salamanders. *PloS One*, 6:e22746.
- Goldberg C.S., Sepulveda A., Ray A., Baugmardt J., Waits L.P., 2013. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32:792-800.

Goudard A., 2007. Fonctionnement des écosystèmes et invasions biologiques. Importance de la biodiversité et des interactions interspécifiques. Thèse, 216p.

Grand D., Boudot J.-P., 2006. Les Libellules de France, Belgique et Luxembourg. Biotope, Mèze (collection Parthénope), 480 p.

Hambler C., Henderson P.A., Speight M.R., 2011. Extinction rates, extinction-prone habitats, and indicator groups in Britain and at larger scales. *Biological Conservation*, 144:713-721.

Harvey C.T., Qureshi S.A., Maclsaac H.J., 2009. Detection of a colonizing, aquatic, non-indigenous species. *Diversity and Distributions*, 15:429-437.

Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 270:313-321.

Hennig W., 1976. 63a. Anthomyiidae. In *Die Fliegen der Palaearktischen Region*. Schweizerbart, ed. Lindner E., pp. 329-376.

Herder J., Valentini A., Kranenborg J., 2012. Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. *H2O* 45, 25.

Hervé M., 2013. RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9-27, URL : <http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>.

Hulme P.E., 2006. Beyond control : wider implications for the management of biological invasions. *Journal of Applied Ecology*, 48:835-847.

Ilhéu M., Bernardo J.M., Fernandez S., 2007. Predation of invasive crayfish on aquatic vertebrates : the effect of *Procambarus clarkii* on fish assemblages in Mediterranean temporary streams. En: Gherardi F., ed. *Biological invaders in inland waters : Profiles, distribution, and threats*. Springer, pp. 543-558.

IUCNredlist, 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. IUCNredlist, URL : <http://www.iucnredlist.org/>. Consulté le 25 juillet 2013.

Jakob C., 2011. Résultats du suivi écologique en parallèle à des opérations de démoustication au BTI sur le périmètre du Parc Naturel Régional de Camargue : Partie Odonates, Rapport final 2007 à 2011. Parc Naturel Régional de Camargue, 18p.

Jerde C.L., Mahon A.R., Chadderton W.L., Lodge D.M., 2011. « Sight-unseen » detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4:150-157.

Jetz W., McPherson J.M., Guralnick R.P., 2012. Integrating biodiversity distribution knowledge : toward a global map of life. *Trends in Ecology and Evolution*, 27:151-159.

Keith P., Persat H., Feunteun E., Allardi J., 2011. Les Poissons d'eau douce de France. Biotope, Mèze, et Publications scientifiques du Muséum, Paris (collection Inventaires & Biodiversité), 552p.

- Knowlton N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecological Systematics*, 24:189-216.
- Lloyd R.E., Cunningham A.A., 2009. Evaluation of existing and novel methods for detecting invasive amphibians and pathogens in the environment. Rapport to Natural England, n.p.
- Lloyd R.E., Cunningham A.A., 2011. Refinement of a laboratory test for environmental detection of invasive amphibians. Rapport to Natural England, n.p.
- Lodge D.M., Williams S., MacIsaac H.J., Hayes K.R., Leung B., Reichard S., Mack R.N., Moyle P.B., Smith M., Andow D.A., Carlton J.T., McMichael A., 2006. Biological invasions : Recommendations for U.S. policy and management. *Ecological Applications*, 16:2035-2054.
- Magnuson J.J., Benson B.J., McLain A.S., 1994. Insights on species richness and turnover from long-term ecological research : fishes in north temperate lakes. *American Zoologist*, 34:437-451.
- Magurran A.E., Baillie S.R., Buckland S.T., Dick J.McP., Elston D.A., Scott E.M., Smith R.I., Somerfield P.J., Watt A.D., 2010. Long-term datasets in biodiversity research and monitoring : assessing change in ecological communities through time. *Trends in Ecology and Evolution*, 25:574-582.
- McClintock B.T., Bailey L.L., Pollock K.H., Simons T.R., 2010. Experimental investigation of observation error in anuran call surveys. *Journal of Wildlife Management*, 74:1882-1893.
- McMahon T.A., Brannelly L.A., Chatfield M.W.H., Johnson P.T.J., Joseph M.B., McKenzie V.J., Richards-Zawacki C.L., Venesky M.D., Rohr J.R., 2013. Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:210-215.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and human well-being : biodiversity synthesis. World Resources Institute, Washington, 100p.
- Ogram A., Sayler G.S., Barkay T., 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7:57-66.
- Olson Z.H., Briggler J.T., Williams R.N., 2012. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research*, 39:629-636.
- Panzacchi M., Bertolino S., Cocchi R., Genovesi P., 2007. Population control of coypu *Myocastor coypus* in Italy compared to eradication in UK : a cost-benefit analysis. *Wildlife Biology*, 13:159-171.
- Pilliod D.S., Goldberg C.S., Laramie M.B., Waits L.P., 2012. Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species. U.S. Geological Survey Fact Sheet 2012-3146, 4p.
- Pilliod D.S., Goldberg C.S., Arkle R.S., Waits L.P., 2013. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling Amphibian. doi : 10.1111/1755-0998.12159.

Poizat G., Chauvelon P., Rosecchi E., Crivelli A.J., 1999. Passage de poissons du Rhône par les pompes d'irrigation de Camargue : premiers résultats. Bulletin français de la Pêche et de la Pisciculture, 352 :31-43.

Puissauve R., 2012. Conception de fiches d'information sur les espèces aquatiques protégées : Méthodologie et fiches modèles. MNHN & ONEMA, 41p.

Pyšek P., Hulme P.E., Nentwig W., 2009. Glossary of the main technical terms used in the handbook. DAISIE, The Handbook of alien species in Europe. Springer, Berlin, pp 375-381.

Pyšek P., Richardson D.M., 2010. Invasive species, environmental change and management, and health. Annual Review of Environment and Resources, 35:25-55.

R Development Core Team, 2012. R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL : <http://www.R-project.org/>.

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M., 2000. Cloning the soil metagenome : a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 66:2541-2547.

Rudnick D., Resh V., 2005. Stable isotopes, mesocosms and gut content analysis demonstrate trophic differences in two invasive decapod Crustacea. Freshwater Biology, 50: 1323-1336.

Scalera R., Zaghi D., 2004. Alien species and nature conservation in the EU. The role of the LIFE program. Brussels, Belgium : European Commission.

Simberloff D., Martin J.L., Genovesi P., Maris V., Wardle D.A., Aronson J., Courchamp F., Galil B., García-Berthou E., Pascal M., Pyšek P., Sousa R., Tabacchi E., Vilà M., 2012. Impacts of biological invasions : what's what and the way forward. Trends in Ecology and Evolution, 28:58-66.

Skerratt L.F., Berger L., Speare R., Cashins S., McDonald K.R., Phillott A.D., Hines H.B., Kenyon N., 2007. Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. EcoHealth, 4:125-134.

Strayer D.L., Dudgeon D., 2010. Freshwater biodiversity conservation : recent progress and future challenges. Journal of the North American Benthological Society, 29:344-358.

Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L., Waller R.W., 2004. Status and trends of Amphibian declines and extinctions worldwide. Science, 306:1783-1786.

Sutherland W.J., Bardsley S., Clout M., Depledge M.H., Dicks L.V., Fellman L., Fleishman E., Gibbons D.W., Keim B., Lickorish F., Margerison C., Monk K.A., Norris K., Peck L.S., Prior S.V., Scharlemann J.P.W., Spalding M.D., Watkinson A.R., 2013. A horizon scan of global conservation issues for 2013. Trends in Ecology and Evolution, 28:16-22.

- Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M., Rieseberg L.H., 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21:1789-1793.
- Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z., 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS One* 7:e35868.
- Takahara T., Minamoto T., Doi H., 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PloS One* 8:e56584.
- Tanadini L.G., Schmidt B.R., 2011. Population size influences amphibian detection probability : implication for biodiversity monitoring programs. *PLoS One*, 6:e28244.
- Thévenot J., 2013. Synthèse et réflexions sur des définitions relatives aux invasions biologiques. Préambule aux actions de la stratégie nationale sur les espèces exotiques envahissantes (EEE) ayant un impact négatif sur la biodiversité. Service du Patrimoine naturel, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 31p.
- Thomsen P.F., Kielgast J., Iversen L.L., Wiuf C., Rasmussen M., Gilbert M.T.P., Orlando L., Willerslev E., 2012a. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21:2565-2573.
- Thomsen P.F., Kielgast J., Iversen L.L., Moller P.R., Rasmussen M., Willerslev E., 2012b. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7:e41732.
- UICN France, MNHN, SFI et ONEMA, 2010. La liste rouge des espèces menacées en France – Chapitre Poissons d'eau douce de France métropolitaine. Paris, 12p.
- UICN, 2012. Catégories et Critères de la Liste rouge de l'UICN : Version 3.1. Deuxième édition. Gland, Suisse et Cambridge, Royaume-Uni : UICN, 40p.
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P., 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24:110-117.
- Vié J., Hilton-Taylor C., Stuart S., 2009. Wildlife in a changing world. An analysis of the 2008 IUCN red list of threatened species. World Conservation Union, Gland, Switzerland, 194p.
- Vilà M., Basnou C., Pyšek P., Josefsson M., Genovesi P., Gollasch S., Nentwig W., Olenin S., Roques A., Roy D., Hulme P.E., DAISIE partners, 2010. How well do we understand the impacts of alien species on ecological services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8:135-144.
- Wilcox T.M., McKelvey K.S., Young M.K., Jane S.F., Lowe W.H., Whiteley A.R., Schwartz M.K., 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA : the importance of primer specificity. *PloS One*, 8:e59520.
- Yoccoz N.G., 2012. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology*, 21:2031-2038.

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : D'une espèce introduite à une espèce invasive : les différents stades d'une invasion biologique et les facteurs d'influence (Goudard 2007)..... | 8 |
| Figure 2 : Protocole pour l'analyse de la biodiversité à partir d'un échantillon environnemental par la méthode du metabarcoding ADNe (Valentini <i>et al.</i> 2008)..... | 15 |
| Figure 3 : Les sources potentielles d'erreur de détection dans les protocoles basés sur l'ADN environnemental. Les erreurs peuvent être attribuées spécifiquement à la méthode de détection employée (« method error ») ou bien au processus d'échantillonnage (« process error ») (Darling et Mahon 2011). | 16 |
| Figure 4 : Groupes taxonomiques à choisir dans le cadre d'un outil de veille environnementale d'après les personnes interrogées. | 22 |
| Figure 5 : Raisons évoquées pour le choix des groupes taxonomiques..... | 23 |
| Figure 6 : a. Intégration de l'outil dans les programmes, b. Le type de programme. | 24 |
| Figure 7 : Les objectifs des programmes des enquêtés. | 24 |
| Figure 8 : Enquêtés souhaitant devenir a. Partenaires techniques, b. Partenaires financiers. | 25 |
| Figure 9 : Utilité d'une carte de vigilance. | 26 |
| Figure 10 : Les intérêts (a.) ou non (b.) d'une carte de vigilance. | 26 |
| Figure 11 : Les trois types de milieux aquatiques stagnants étudiés : a. Mare, b. Etang, c. Roubine. . | 30 |
| Figure 12 : Verveux mis en place sur une mare en Camargue..... | 32 |
| Figure 13 : Méthode « 6 tubes »..... | 33 |
| Figure 14 : Méthode « Filtration »..... | 33 |
| Figure 15 : Proportion de réplicas PCR positifs pour chaque site selon la méthode « Filtration » et la méthode « 6 tubes » pour a. la Cistude d'Europe et b. l'Ecrevisse de Louisiane. | 37 |
| Figure 16 : Relation entre la proportion de réplicas PCR positifs et la densité de Cistudes d'Europe observées a. pour la méthode « Filtration » et b. pour la méthode « 6 tubes ». | 38 |
| Figure 17 : Nombre d'espèces d'Odonates détectées pour chaque site étudié selon la méthode classique d'observation par transect et la méthode de metabarcoding ADNe. | 39 |
| Figure 18 : Pourcentage des séquences ADN attribuées aux 3 espèces détectées sur la Cerisière des Relongues. | 39 |
| Figure 19 : Nombre d'espèces de Poissons détectées pour chaque site étudié selon la méthode classique de capture par verveux et la méthode de metabarcoding ADNe..... | 40 |
| Figure 20 : Pourcentage des séquences ADN de chaque espèce détectée sur les 6 sites étudiés..... | 40 |
| Figure 21 : Résultats de l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) effectuée sur la liste de présence/absence des espèces de Poissons en fonction des six sites étudiés, selon les deux premiers axes de plus grande variabilité. | 41 |

| | |
|--|----|
| Figure 22 : Interface d'accueil. | 48 |
| Figure 23 : Recherche par espèce, données disponibles. | 49 |
| Figure 24 : Recherche par espèce, exemple de la Cistude d'Europe. | 50 |
| Figure 25 : Recherche par maille, données disponibles..... | 52 |
| Figure 26 : Recherche par maille, exemple de la maille du Petit Saint Jean..... | 53 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Etudes utilisant l'approche barcoding ADN pour le suivi d'une espèce cible en milieu aquatique. Les espèces exotiques envahissantes sont indiquées en rouge, les espèces patrimoniales en vert (modifié d'après Pilliod <i>et al.</i> 2012)..... | 12 |
| Tableau 2 : Espèces ou groupes taxonomiques et méthodes (classiques et ADN) testées pour les 15 sites étudiés. Des précisions sur la localisation des sites, leur type (mare, étang ou roubine) et leur surface approximative sont également données. Dans cette dernière colonne, les sites qui n'ont été que partiellement échantillonnés sont annotés (1) ; la surface donnée correspond à celle qui a été échantillonnée..... | 31 |

ANNEXES

Annexe 1 : Résumé des cinq critères (A à E) utilisés pour évaluer l'appartenance d'un taxon à l'une des catégories du groupe « menacé » de la liste rouge de l'UICN (En danger critique, En danger, Vulnérable) (UICN 2012).

Annexe 2 : Liste des arrêtés interministériels relatifs à la protection des espèces au titre des articles L.411-1 et L.411-2 du code de l'Environnement. Seuls les taxons aquatiques et semi-aquatiques sont cités (Puissauve *et al.* 2012).

Annexe 3 : Liste des structures et des personnes contactées et ayant répondu au questionnaire, soit par entretien téléphonique, soit par mail.

Annexe 4 : Questionnaire envoyé aux personnes contactées dans le cadre des entretiens.

Annexe 5 : Résultats obtenus sur chaque site pour la Cistude d'Europe et l'Ecrevisse de Louisiane par les méthodes classiques (en nombre d'individus) et par les méthodes de barcoding ADNe « 6 tubes » et « Filtration » (en proportion de répliques PCR positifs). Les densités (forte, moyenne, faible ou nulle) sont données en fonction du nombre d'individus capturés par site.

Annexe 6 : Présence (1) / absence (0) d'espèces d'Odonates en fonction de deux méthodes : une méthode classique par transect et une méthode de metabarcoding ADNe pour les deux sites étudiés.

Annexe 7 : Les espèces de Poissons détectées selon deux méthodes : une méthode classique par piégeage (en nombre d'individus) et une méthode de metabarcoding ADNe (en nombre de séquences ADN lues par le séquenceur) pour les six sites étudiés.

Annexe 1 : Résumé des cinq critères (A à E) utilisés pour évaluer l'appartenance d'un taxon à l'une des catégories du groupe « menacé » de la liste rouge de l'UICN (En danger critique, En danger, Vulnérable) (UICN 2012).

| A. Réduction de la taille de la population. Réduction (mesurée sur la plus longue des deux durées : 10 ans ou 3 générations) sur la base d'un ou plusieurs des critères A1 à A4 | | | |
|--|--|-------------------------|---|
| | En danger critique | En danger | Vulnérable |
| A1 | ≥ 90% | ≥ 70% | ≥ 50% |
| A2, A3 & A4 | ≥ 80% | ≥ 50% | ≥ 30% |
| <p>A1 Réduction de la population constatée, estimée, déduite ou supposée, dans le passé, lorsque les causes de la réduction sont clairement réversibles ET comprises ET ont cessé.</p> <p>A2 Réduction de la population constatée, estimée, déduite ou supposée, dans le passé, lorsque les causes de la réduction n'ont peut-être pas cessé OU ne sont peut-être pas comprises OU ne sont peut-être pas réversibles.</p> <p>A3 Réduction de la population prévue, déduite ou supposée dans le futur (sur un maximum de 100 ans) [(a) ne peut pas être utilisé pour A3].</p> <p>A4 Réduction de la population constatée, estimée, déduite, prévue ou supposée, sur une période de temps devant inclure à la fois le passé et l'avenir (sur un maximum de 100 ans dans le futur), lorsque les causes de la réduction n'ont peut-être pas cessé OU ne sont peut-être pas comprises OU ne sont peut-être pas réversibles.</p> | <i>en se basant sur l'un des éléments suivants :</i> | | <p>(a) l'observation directe [excepté A3]</p> <p>(b) un indice d'abondance adapté au taxon</p> <p>(c) la réduction de la zone d'occupation (AOO), de la zone d'occurrence (EOO) et/ou de la qualité de l'habitat</p> <p>(d) les niveaux d'exploitation réels ou potentiels</p> <p>(e) les effets de taxons introduits, de l'hybridation, d'agents pathogènes, de substances polluantes, d'espèces concurrentes ou parasites</p> |
| B. Répartition géographique, qu'il s'agisse de B1 (zone d'occurrence) ET/OU B2 (zone d'occupation) | | | |
| | En danger critique | En danger | Vulnérable |
| B1. Zone d'occurrence (EOO) | < 100 km ² | < 5 000 km ² | < 20 000 km ² |
| B2. Zone d'occupation (AOO) | < 10 km ² | < 500 km ² | < 2 000 km ² |
| ET au moins 2 des 3 conditions suivantes : | | | |
| (a) Sévèrement fragmentée OU nombre de localités | = 1 | ≤ 5 | ≤ 10 |
| (b) Déclin continu constaté, estimé, déduit ou prévu de l'un des éléments suivants : (i) zone d'occurrence, (ii) zone d'occupation, (iii) superficie, étendue et/ou qualité de l'habitat, (iv) nombre de localités ou de sous-populations, (v) nombre d'individus matures | | | |
| (c) Fluctuations extrêmes de l'un des éléments suivants : (i) zone d'occurrence, (ii) zone d'occupation, (iii) nombre de localités ou de sous-populations, (iv) nombre d'individus matures | | | |

| C. Petite population et déclin | | | |
|--|--|--|---|
| | En danger critique | En danger | Vulnérable |
| Nombre d'individus matures | < 250 | < 2 500 | < 10 000 |
| ET au moins un des sous-critères C1 ou C2 : | | | |
| C1. Un déclin continu constaté, estimé ou prévu (sur un maximum de 100 ans dans le futur) d'au moins : | 25% en 3 ans ou 1 génération (sur la plus longue des deux durées) | 20% en 5 ans ou 2 générations (sur la plus longue des deux durées) | 10% en 10 ans ou 3 générations (sur la plus longue des deux durées) |
| C2. Un déclin continu constaté, estimé, prévu ou déduit ET au moins 1 des 3 conditions suivantes : | | | |
| (a) (I) Nombre d'individus matures dans chaque sous-population : | ≤ 50 | ≤ 250 | ≤ 1 000 |
| (II) % d'individus matures dans une sous-population = | 90–100% | 95–100% | 100% |
| (b) Fluctuations extrêmes du nombre d'individus matures | | | |
| D. Population très petite ou restreinte | | | |
| | En danger critique | En danger | Vulnérable |
| D. Nombre d'individus matures | < 50 | < 250 | D1. < 1 000 |
| D2. <i>Pour la catégorie VU uniquement</i> Zone d'occupation restreinte ou nombre de localités limité et susceptibles d'être affectées à l'avenir par une menace vraisemblable pouvant très vite conduire le taxon vers EX ou CR. | - | - | D2. en règle générale : AOO < 20 km ² ou nombre de localités ≤ 5 |
| E. Analyse quantitative | | | |
| | En danger critique | En danger | Vulnérable |
| Indiquant que la probabilité d'extinction dans la nature est : | ≥ 50% sur 10 ans ou 3 générations, sur la plus longue des deux durées (100 ans max.) | ≥ 20% sur 20 ans ou 5 générations, sur la plus longue des deux durées (100 ans max.) | ≥ 10% sur 100 ans |

Annexe 2 : Liste des arrêtés interministériels relatifs à la protection des espèces au titre des articles L.411-1 et L.411-2 du code de l'Environnement. Seuls les taxons aquatiques et semi-aquatiques sont cités (Puissauve et al. 2012).

- **Amphibiens et Reptiles** : Arrêté du 19 novembre 2007 (consolidé le 19 décembre 2007) fixant les listes des Amphibiens et des Reptiles protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. Les mesures de protection sont variables suivant les espèces, avec entre autres la protection des œufs, des nids et des animaux dans leur milieu naturel et l'interdiction de perturbation intentionnelle (articles 2 et 3), et la protection des sites de reproduction et des aires de repos des animaux (article 2).
- **Ecrevisses** : Arrêté du 21 juillet 1983 relatif à la protection des Ecrevisses autochtones (modifié par l'arrêté du 18 janvier 2000). Cet arrêté interdit la dégradation des milieux particuliers à l'Ecrevisse à pieds rouges (*Astacus astacus*), l'Ecrevisse à pieds blancs (*Austropotamobius pallipes*) et l'Ecrevisse des torrents (*Austropotamobius torrentium*). L'importation, le transport et la commercialisation de l'Ecrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) à l'état vivant sont soumis à autorisation.
- **Espèces végétales** : Arrêté du 20 janvier 1982 (modifié par l'arrêté du 31 juillet 1995 puis par l'arrêté du 14 décembre 2006 et consolidé le 24 février 2007) fixant la liste des espèces végétales protégées sur l'ensemble du territoire national. Les mesures de protection sont variables suivant les espèces, avec entre autres : l'interdiction de détruire, couper, cueillir, utiliser vendre ou acheter tout ou partie des spécimens sauvages des espèces végétales citées.
- **Insectes** : Arrêté du 23 avril 2007 (consolidé le 6 mai 2007) fixant les listes des Insectes protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. Les mesures de protection sont variables suivant les espèces, avec entre autres : la protection des œufs, larves, nymphes et animaux dans leur milieu naturel et l'interdiction de perturbation intentionnelle (articles 2 et 3) et la protection des sites de reproduction et des aires de repos des animaux (article 2).
- **Mammifères** : Arrêté du 23 avril 2007 (modifié par l'arrêté du 15 septembre 2012 et consolidé le 7 octobre 2012) fixant la liste des Mammifères terrestres protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. Les mesures de protection concernent la protection des animaux dans leur milieu naturel et l'interdiction de perturbation intentionnelle (article 2) et la protection des sites de reproduction et des aires de repos des animaux (article 2).
- **Mollusques** : Arrêté du 23 avril 2007 fixant les listes des mollusques protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. Les mesures de protection sont variables suivant les espèces, avec entre autres : la protection des œufs et des animaux dans leur milieu naturel et l'interdiction de perturbation intentionnelle (articles 2 et 3) et la protection des sites de reproduction et des aires de repos des animaux (article 2).
- **Oiseaux** : Arrêté du 29 octobre 2009 fixant la liste des oiseaux protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. Les mesures de protection sont variables

suivant les espèces, avec entre autres : la protection des œufs, des nids et des animaux dans leur milieu naturel et l'interdiction de perturbation intentionnelle (articles 3 et 4) et la protection des sites de reproduction et des aires de repos des animaux (article 3).

- **Poissons** : Arrêté du 8 décembre 1988 fixant la liste des espèces de Poissons protégées sur l'ensemble du territoire national. Les mesures de protection portent sur l'interdiction de destruction ou d'enlèvement des œufs et sur la protection des sites de reproduction. A cette liste s'est rajouté l'Esturgeon (*Acipenser sturio*), via l'arrêté du 20 décembre 2004 (consolidé le 7 janvier 2005).

Annexe 3 : Liste des structures et des personnes contactées et ayant répondu au questionnaire, soit par entretien téléphonique, soit par mail.

| Structure | Catégorie | Nombre de personnes contactées par mail | Nombre de réponses par entretien téléphonique | Nombre de réponses par mail |
|---|-------------------------|---|---|-----------------------------|
| Agence de l'Eau Adour-Garonne | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| Agence de l'Eau Artois-Picardie | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| Agence de l'Eau Loire-Bretagne | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| Agence de l'Eau Rhin-Meuse | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée et Corse | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| Agence de l'Eau Seine-Normandie | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| DREAL Aquitaine | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| DREAL Corse | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| DREAL Franche Comté | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| DREAL Languedoc-Roussillon | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| DREAL Midi-Pyrénées | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| DREAL des Pays de la Loire | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| DREAL PACA | Etablissements publics | 1 | 0 | 0 |
| Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie - Bureau de la Faune et de la Flore | Etablissements publics | 2 | 0 | 0 |
| Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) - Service du Patrimoine Naturel (SPN) | Etablissements publics | 4 | 4 | 0 |
| Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) | Etablissements publics | 1 | 1 | 0 |
| Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) | Etablissements publics | 4 | 2 | 0 |
| Etablissements publics, sous-total : | | 24 | 13 | 0 |
| INRA Montpellier | Organismes de recherche | 1 | 0 | 1 |
| INRA Rennes | Organismes de recherche | 1 | 0 | 0 |
| Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg | Organismes de recherche | 1 | 1 | 0 |
| IRSTEA Aix en Provence | Organismes de recherche | 1 | 1 | 0 |
| IRSTEA Antony | Organismes de recherche | 1 | 1 | 0 |
| IRSTEA Bordeaux | Organismes de recherche | 1 | 1 | 0 |
| Laboratoire d'Ecologie Alpine de Savoie | Organismes de recherche | 1 | 1 | 0 |
| Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et de l'Environnement de Toulouse | Organismes de recherche | 1 | 1 | 1 |
| Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux de l'Université de Lorraine | Organismes de recherche | 1 | 0 | 0 |
| Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) - UMR Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques | Organismes de recherche | 0 | 0 | 1 |
| Tour du Valat | Organismes de recherche | 1 | 1 | 0 |
| Organismes de recherche, sous-total : | | 10 | 7 | 3 |
| Parc National des Ecrins | Parcs | 1 | 1 | 0 |
| Parc National du Mercantour | Parcs | 1 | 1 | 0 |
| Parc National des Pyrénées | Parcs | 1 | 0 | 0 |
| Parc National de la Vanoise | Parcs | 1 | 0 | 0 |
| Parc Naturel Régional des Boucles de la Seine Normande | Parcs | 0 | 1 | 1 |
| Parc Naturel Régional de la Brière | Parcs | 1 | 0 | 0 |
| Parc Naturel Régional du Gâtinais français | Parcs | 0 | 0 | 1 |
| Parc Naturel Régional Scarpe-Escaut | Parcs | 0 | 0 | 1 |
| Parcs, sous-total : | | 5 | 3 | 3 |

| Structure | Catégorie | Nombre de personnes contactées par mail | Nombre de réponses par entretien téléphonique | Nombre de réponses par mail |
|--|---------------------|---|---|-----------------------------|
| Bufo | Associations et ONG | 1 | 1 | 0 |
| Cistude nature | Associations et ONG | 1 | 1 | 0 |
| Comité Départemental de la Protection de la Nature et de l'Environnement de Loir et Cher (CDPNE) | Associations et ONG | 1 | 1 | 0 |
| Conservatoire des Espaces Naturels (CEN) Rhône-Alpes | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| Conservatoire des Espaces Naturels (CEN) Haute-Savoie | Associations et ONG | 2 | 1 | 0 |
| Conservatoire des Espaces Naturels (CEN) Bourgogne | Associations et ONG | 1 | 1 | 0 |
| Fédération des Conservatoires Botaniques Nationaux (FCBN) | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| Fédération Rhône Alpes de Protection de la Nature (FRAPNA) | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| Ligue de Protection des Oiseaux (LPO) | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| NatureParif | Associations et ONG | 2 | 2 | 0 |
| Office pour les insectes et leur environnement (OPIE) | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères (SFEPM) | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| Société Herpétologique de France (SHF) | Associations et ONG | 1 | 1 | 0 |
| Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) | Associations et ONG | 1 | 1 | 0 |
| WWF | Associations et ONG | 1 | 0 | 0 |
| Associations et ONG, sous-total : | | 17 | 9 | 0 |
| Asconit | Bureaux d'étude | 1 | 0 | 0 |
| Eco-Med | Bureaux d'étude | 1 | 1 | 0 |
| Ecosphère | Bureaux d'étude | 3 | 2 | 0 |
| ERBIO | Bureaux d'étude | 0 | 0 | 1 |
| Hydrosphère | Bureaux d'étude | 1 | 0 | 0 |
| Ouest'am | Bureaux d'étude | 1 | 1 | 0 |
| SAFEGE | Bureaux d'étude | 1 | 0 | 0 |
| Bureaux d'étude, sous-total : | | 8 | 4 | 1 |
| Autoroutes Paris-Rhin-Rhône (APRR) | Industriels | 1 | 1 | 0 |
| Autoroutes du Sud de la France (ASF) | Industriels | 1 | 0 | 0 |
| EDF | Industriels | 1 | 1 | 0 |
| EIFFAGE | Industriels | 1 | 0 | 0 |
| Réseau Ferré de France (RFF) | Industriels | 1 | 0 | 0 |
| SITA | Industriels | 1 | 0 | 0 |
| Industriels, sous-total : | | 6 | 2 | 0 |
| Total | | 70 | 38 | 7 |
| Pour un total de 45 réponses | | | | |



Annexe 4 : Questionnaire envoyé aux personnes contactées dans le cadre des entretiens.



Dans le contexte de changement global et de perte de la biodiversité, il est important de mettre en place des outils capables de détecter les espèces menacées et invasives, même lorsqu'elles sont présentes en faible abondance et à des stades de vie précoces. C'est pourquoi une étude est actuellement menée sur la mise en place d'un outil de veille écologique des milieux aquatiques continentaux stagnants basé sur l'ADN environnemental (ADN pouvant être extrait d'échantillons environnementaux, tels que le sol, l'eau ou l'air, sans avoir besoin d'isoler au préalable des individus cibles). Cet outil permettrait de suivre à pas de temps régulier les espèces présentes sur un site donné pour des groupes taxonomiques ciblés, dont les espèces menacées et invasives. Par la suite, les données pourraient être synthétisées sous forme de carte de vigilance à l'échelle nationale : la France serait divisée en mailles de 10km x 10km, et pour chaque maille, une classe de vigilance serait assignée (faible, moyenne, forte) selon le nombre d'espèces menacées et invasives présentes.

Le questionnaire suivant a été créé dans le cadre de cette étude, afin de définir les attentes de chaque structure vis-à-vis de cet outil et leur contribution potentielle.

Nom & Prénom :

Structure :

Question 1 **a. D'après vous, quels groupes taxonomiques serait-il pertinent de suivre dans le cadre de cet outil de veille écologique?**

b. Pourquoi ?

Question 2 **a. Cet outil pourrait-il être intégré à certains de vos programmes ou actions ?
Lesquels ?**

b. Si oui, souhaiteriez-vous devenir partenaire de ce réseau (en termes technique et/ou financier)?

Question 3 **a. Une carte de vigilance à l'échelle nationale pourrait-elle vous être utile ?**

b. Si oui, dans quel sens ?

Annexe 5 : Résultats obtenus sur chaque site pour la Cistude d'Europe et l'Ecrevisse de Louisiane par les méthodes classiques (en nombre d'individus) et par les méthodes de barcoding ADNe « 6 tubes » et « Filtration » (en proportion de répliquas PCR positifs). Les densités (forte, moyenne, faible ou nulle) sont données en fonction du nombre d'individus capturés par site.

| | | Site | Cistude d'Europe | | | | Ecrevisse de Louisiane | | | |
|----------------------------|---------------------|---------------------|------------------|-----------|----------------|-------------------|------------------------|-----------|----------------|-------------------|
| | | | Densité | Méthode | | | Densité | Méthode | | |
| | | | | Classique | ADNe "6 tubes" | ADNe "Filtration" | | Classique | ADNe "6 tubes" | ADNe "Filtration" |
| Camargue | Petit Saint Jean | Mare forestière 3 | Forte | 17 | 1 | 1 | Nulle | 0 | 0 | 0 |
| | | Mare forestière 5c | Forte | 13 | 1 | 1 | Nulle | 0 | 0 | 0 |
| | | Station linéaire 6 | Moyenne | 9 | 0,09 | 0,5 | Forte | 79 | 0,92 | 1 |
| | | Station linéaire 7 | Moyenne | 6 | 0 | 0,42 | Forte | 54 | 1 | 1 |
| | | Station linéaire 15 | Moyenne | 8 | 0,08 | 0,25 | Forte | 58 | 1 | 1 |
| | Tour du Valat | Marais des Iris | Moyenne | 8 | 0 | 0,42 | Forte | 82 | 1 | 1 |
| | | Esquineau c | Moyenne | 6 | 0,58 | 0,58 | Forte | 22 | 1 | 1 |
| | | Esquineau a | Faible | 1 | 0,2 | 0,42 | Forte | 51 | 1 | 1 |
| Petite Camargue Alsacienne | La Heïd | Faible | 3 | 0 | / | / | / | / | / | |
| | Gravière de la Heïd | Faible | 1 | 0 | / | / | / | / | / | |
| | Bout du Marais | Nulle | 0 | 0 | / | / | / | / | / | |
| | Petit triangle | Nulle | 0 | 0 | / | / | / | / | / | |
| | Zwetschgenmatte | Nulle | 0 | 0 | / | / | / | / | / | |
| | Etang en U | Nulle | 0 | 0 | / | / | / | / | / | |

Annexe 6 : Présence (1) / absence (0) d'espèces d'Odonates en fonction de deux méthodes : une méthode classique par transect et une méthode de metabarcoding ADNe pour les deux sites étudiés.

| Sous-ordre | Famille | Espèce | Marais des Iris | | Cerisière des Relongues | |
|--|----------------|-------------------------------|-----------------|------|-------------------------|------|
| | | | Classique | ADNe | Classique | ADNe |
| Anisoptera | Aeshnidae | <i>Aeshna mixta</i> | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Anisoptera | Libellulidae | <i>Crocothemis erythraea</i> | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Anisoptera | Libellulidae | <i>Orthetrum coerulescens</i> | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Anisoptera | Libellulidae | <i>Sympetrum fonscolombii</i> | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Zygoptera | Coenagrionidae | <i>Ischnura elegans</i> | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Zygoptera | Lestidae | <i>Lestes barbarus</i> | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Zygoptera | Lestidae | <i>Lestes macrostigma</i> | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Zygoptera | Lestidae | <i>Sympecma fusca</i> | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Nombre d'espèces par méthode et par site | | | 3 | 0 | 6 | 3 |
| Nombre total d'espèces par site | | | 3 | | 8 | |
| Détectabilité par méthode et par site | | | 100% | 0% | 75% | 38% |

Annexe 7 : Les espèces de Poissons détectées selon deux méthodes : une méthode classique par piégeage (en nombre d'individus) et une méthode de metabarcoding ADNe (en nombre de séquences ADN lues par le séquenceur) pour les six sites étudiés.

| Famille | Nom latin | Nom commun | Station linéaire 6 | | Station linéaire 7 | | Station linéaire 15 | | Marais des Iris | | Esquineau a | | Esquineau c | |
|--|--------------------------------|---------------------|--------------------|-------|--------------------|--------|---------------------|--------|-----------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | | | Classique | ADNe | Classique | ADNe | Classique | ADNe | Classique | ADNe | Classique | ADNe | Classique | ADNe |
| Anguillidae | <i>Anguilla anguilla</i> | Anguille européenne | 4 | 2801 | 10 | 273 | 10 | 3099 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Abramis brama</i> | Brème commune | 0 | 0 | 0 | 3878 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Alburnus alburnus</i> | Ablette | 0 | 3342 | 0 | 24565 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 212 | 0 | 1552 |
| Cyprinidae | <i>Blicca bjoerkna</i> | Brème bordelière | 0 | 0 | 0 | 28951 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Carassius sp.</i> | Carassin | 0 | 1543 | 1 | 2174 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Ctenopharyngodon idella</i> | Amour blanc | 0 | 0 | 0 | 1809 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Cyprinus carpio</i> | Carpe | 0 | 5863 | 0 | 23046 | 0 | 11702 | 0 | 3162 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Gobio gobio</i> | Goujon | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 351 | 0 | 159 |
| Cyprinidae | <i>Pseudorasbora parva</i> | Pseudorasbora | 0 | 83066 | 0 | 98707 | 0 | 504176 | 0 | 99839 | 0 | 86119 | 0 | 83681 |
| Cyprinidae | <i>Rutilus rutilus</i> | Gardon | 0 | 7042 | 0 | 2177 | 0 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyprinidae | <i>Squalius cephalus</i> | Chevaine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2427 | 0 | 0 |
| Poeciliidae | <i>Gambusia affinis</i> | Gambusie | 0 | 7562 | 0 | 12725 | 0 | 83769 | 0 | 16658 | 0 | 20528 | 0 | 28144 |
| Mugilidae | <i>Liza ramada</i> | Mulet porc | 0 | 0 | 0 | 1387 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Centrarchidae | <i>Lepomis gibbosus</i> | Perche soleil | 47 | 68068 | 15 | 184924 | 4 | 665 | 0 | 25712 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Centrarchidae | <i>Micropterus salmoides</i> | Black-bass | 0 | 9584 | 0 | 228 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Percidae | <i>Perca fluviatilis</i> | Perche commune | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 263 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Percidae | <i>Sander lucioperca</i> | Sandre | 0 | 586 | 0 | 4727 | 0 | 16 | 0 | 303 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ictaluridae | <i>Ameiurus melas</i> | Poisson-chat | 10 | 25720 | 50 | 4194 | 17 | 294928 | 1 | 34676 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Siluridae | <i>Silurus glanis</i> | Silure glane | 0 | 0 | 0 | 13366 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nombre d'espèces par méthode et par site | | | 3 | 11 | 4 | 16 | 3 | 10 | 1 | 7 | 1 | 5 | 0 | 4 |
| Nombre total d'espèces par site | | | 11 | | 16 | | 10 | | 7 | | 6 | | 4 | |
| Déteçtabilité par méthode et par site | | | 27% | 100% | 25% | 100% | 30% | 100% | 14% | 100% | 17% | 83% | 0% | 100% |