

# Contributions de l'ADN environnemental à la conservation de la biodiversité

RENCONTRES NATURALISTES D'OCCITANIE  
2<sup>ème</sup> édition

Iris Lang, Daniel Marc & Johan Michaux

15, 16 et 17  
**MARS 2024**  
*Palais des Congrès  
de Gruissan (Aude)*



# Introduction

**Etude de la biodiversité pour une meilleure action conservatoire et un meilleur accompagnement des politiques publiques.**

**I/ Exemples de contributions et travaux du CEN**

**II/ Nouvelle méthode d'étude de l'Ecrevisse à pattes blanches : résultats préliminaires**

# Introduction

Etude de la biodiversité pour une meilleure action conservatoire et un meilleur accompagnement des politiques publiques.

## Outils disponibles



Capture/piégeage

Détermination morphologique



Prospection visuelle/acoustiques des individus

Prospection visuelle d'indices de présence (crottes, poils, empreintes, gîtes...)



Prélèvements et analyses ADN environnemental



Pièges photos et enregistreurs acoustiques



# Introduction

Etude de la biodiversité pour une meilleure action conservatoire et un meilleur accompagnement des politiques publiques.

## Outils disponibles



Capture/piégeage

Détermination morphologique



Prospection visuelle/acoustiques des individus

Prospection visuelle d'indices de présence (crottes, poils, empreintes, gîtes...)

Pièges photos et enregistreurs acoustiques



Prélèvements et analyses ADN environnemental

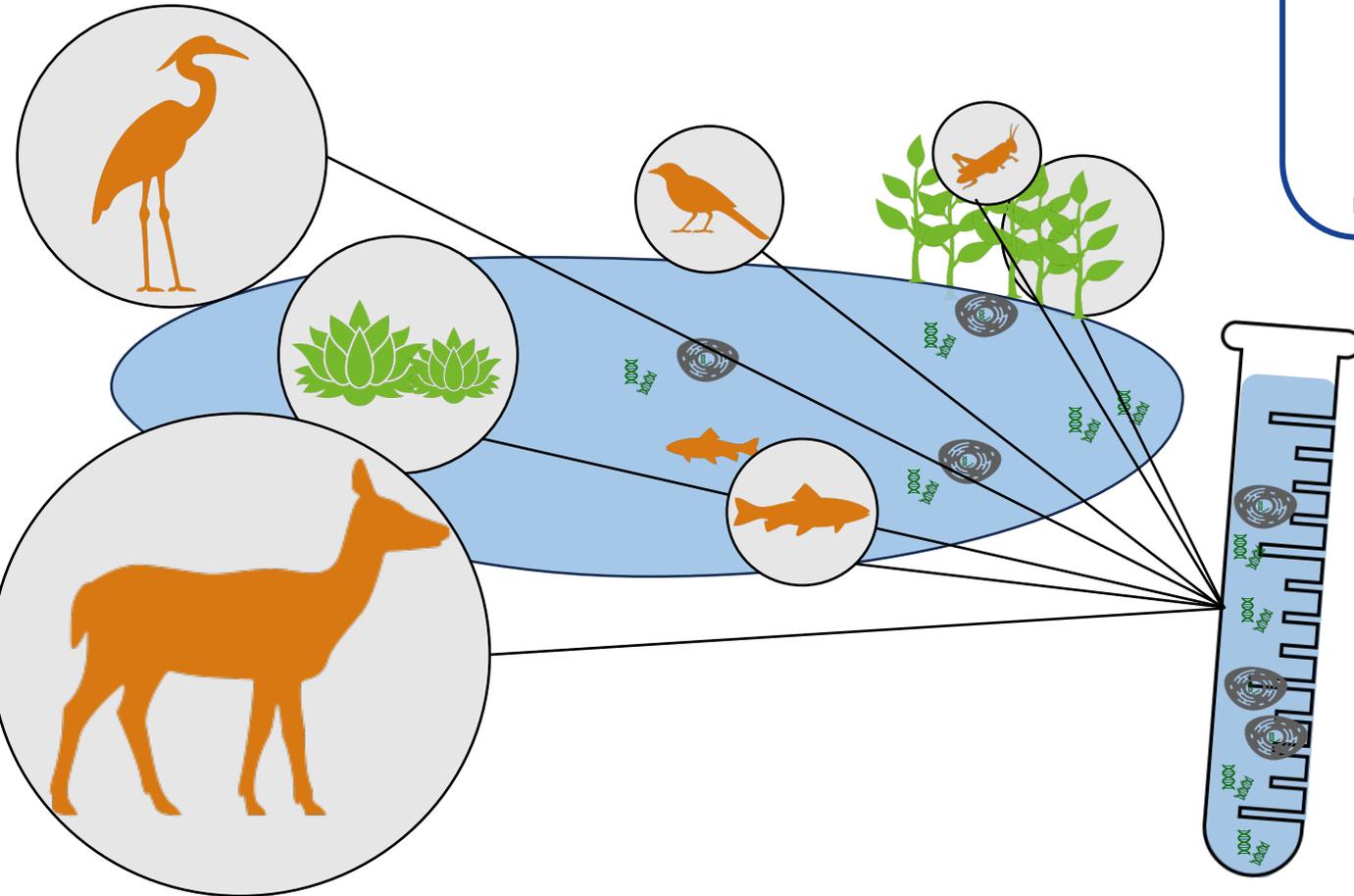


Méthodes plus ou moins invasives et destructrices, et plus ou moins coûteuses en temps et en argent.

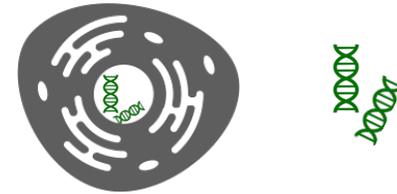
# Introduction



L'ADN environnemental : qu'est-ce que c'est ?



ADN contenu dans une cellule ou fragment libre que l'on retrouve dans l'environnement. Pas collecté directement sur l'individu.

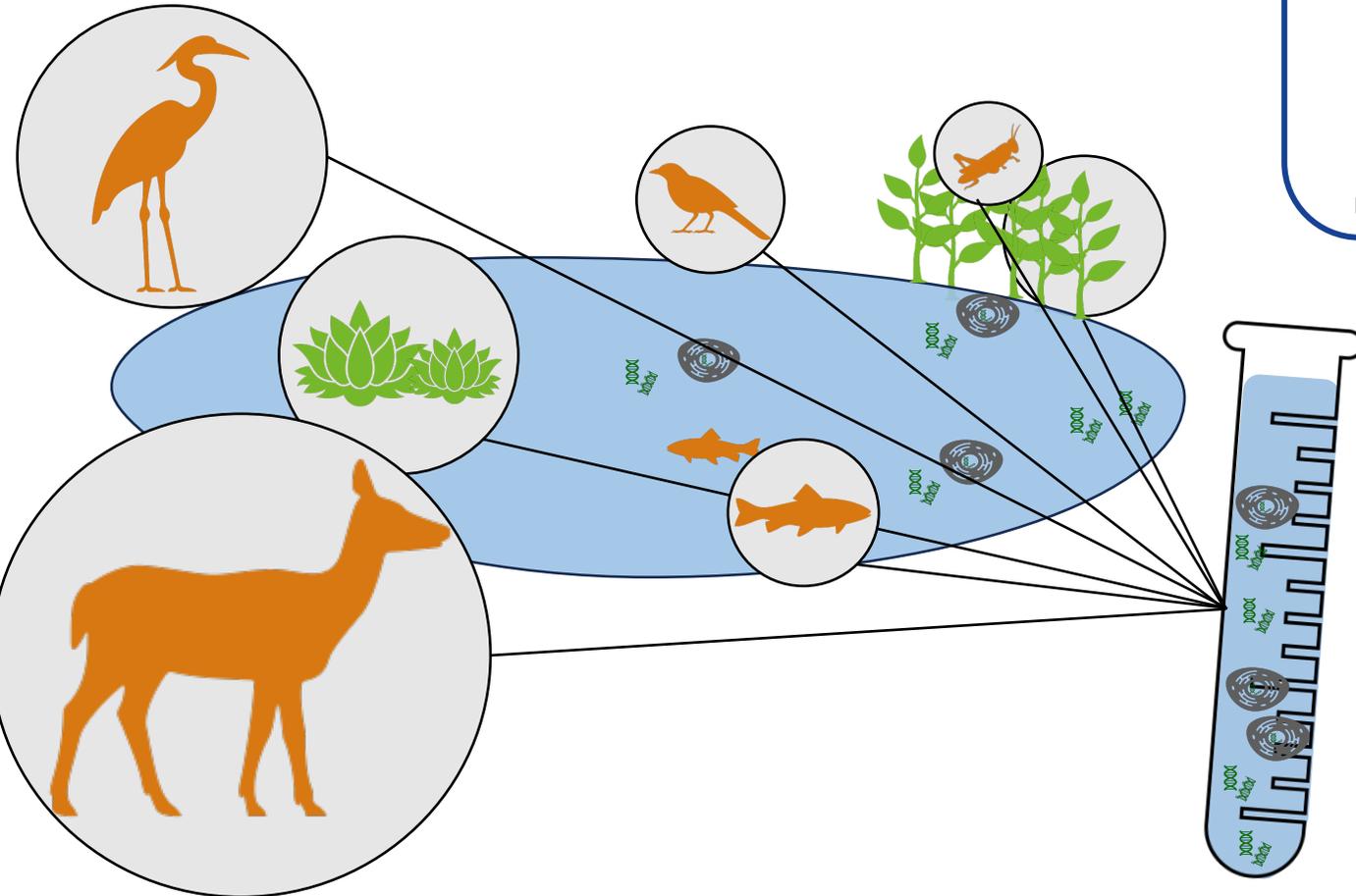


Poulet & Basilio, 2019

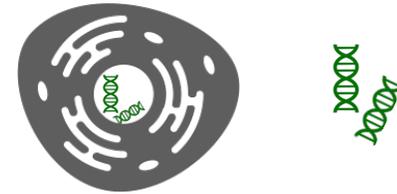
# Introduction



L'ADN environnemental : qu'est-ce que c'est ?



ADN contenu dans une cellule ou fragment libre que l'on retrouve dans l'environnement. Pas collecté directement sur l'individu.



Poulet & Basilio, 2019

## Matrices principales

Eau



Sols



Fèces

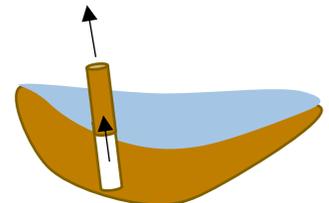


Mais aussi

Biofilms



Sédiments





# Introduction



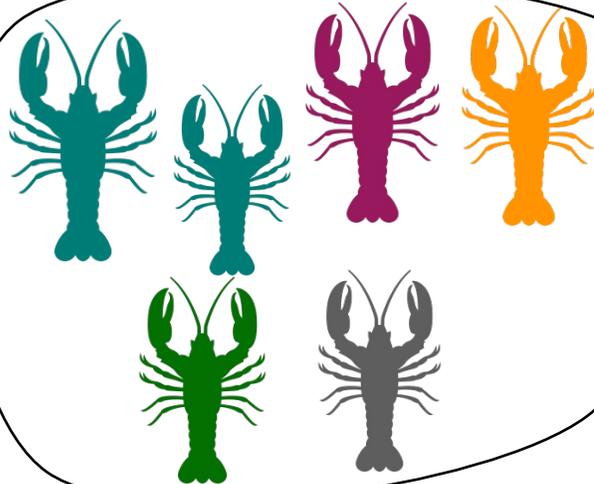
L'ADN environnemental : à quoi ça sert ?

## Barcoding

Rechercher la présence (ou l'absence) d'une espèce

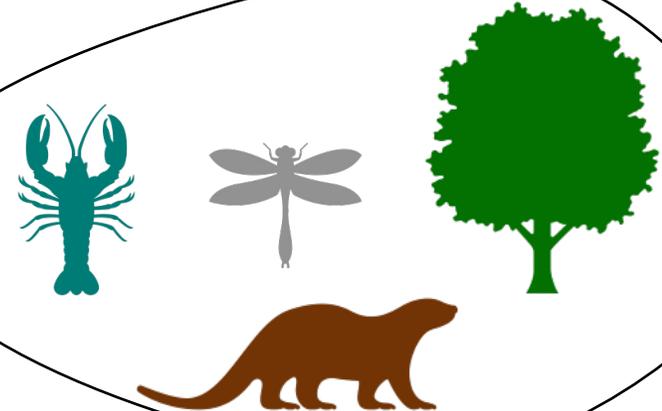


Caractériser la variabilité intraspécifique (individus)



## Metabarcoding

Caractériser la biodiversité au niveau spécifique (inventaire)



# Exemples de contributions et travaux du CEN

Vers une nouvelle méthode de détection des espèces de mammifères semi-aquatiques : étude pilote et approche « Metabarcoding ADN »



Matrice : eau

Barcoding

Recherche présence/absence

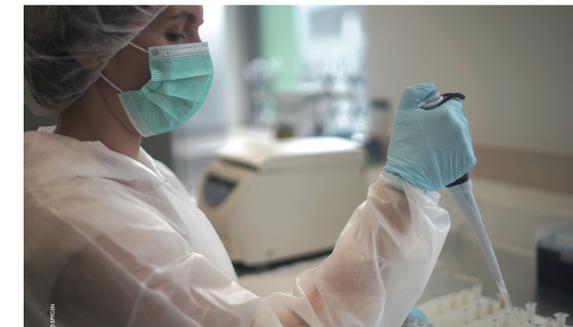
**Tableau 3** Projet 1 : test de détectabilité selon les espèces.

Espèce cible	Nombre de prélèvements	Nombre de détections
Campagnol amphibie	4	4
Castor d'Eurasie	3	3
Desman des Pyrénées	1	0
Loutre d'Europe	1	0
Vison d'Europe	3	0
Putois d'Europe	1	0
Ragondin	1	1
Crossope aquatique	2	0
Vison d'Amérique	2	0
Rat musqué	-	-
Raton laveur	2	2
Rat surmulot	-	-

Espèces cibles : mammifères semi-aquatiques (dont le Desman des Pyrénées)

→ Pas de succès pour les espèces présentes en faible densité

→ Tests en cours pour améliorer la technique : dans le cadre de la thèse de Loan Arguel.

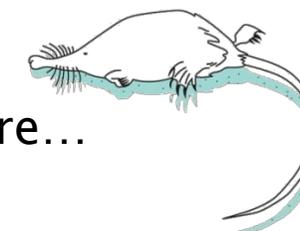


JULIEN STEINMETZ<sup>1</sup>,  
SANDRINE RUETTE<sup>2</sup>,  
THOMAS RUVY<sup>3</sup>,  
PAULINE JEAN<sup>4</sup>,  
TONY DEJEAN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ONCFS, Délégation régionale Occitane, Cellule technique Sud-Ouest - Toulouse.  
<sup>2</sup>ONCFS, Direction de la recherche et de l'expertise, Unité Prédateurs et animaux dépendants - Brieux.  
<sup>3</sup>Citadelle Nature - Chemin du Moulinat, 33185 Le Haillan.  
<sup>4</sup>SPICEA - 75, rue du Lac-Saint-André, 73370 Le Bourget-du-Lac.

Le développement de techniques permettant la détection de fragments d'ADN présents dans l'environnement ouvre des perspectives nouvelles pour l'étude et le suivi de la biodiversité. Ces méthodes d'investigation de pointe ont déjà donné des résultats très prometteurs pour de nombreux groupes d'espèces en milieu aquatique. Devant les attentes d'amélioration des connaissances sur la répartition de certaines espèces de mammifères, notamment le vison d'Europe, nous avons cherché à évaluer les possibilités d'application de ces techniques au groupe des mammifères semi-aquatiques.

[Steinmetz et al. 2018](#)



A suivre...

# Exemples de contributions et travaux du CEN



Matrice : eau

Recherche présence/absence

Barcoding

Recherche d'espèces patrimoniales : découverte de populations de Grande Mulette confirmées par des plongées. [Prié et al 2019](#)

- ↳ Caractérisation des populations de ces espèces
- ↳ Arrêt de travaux prévus en rivière (Arros, 32)
- ↳ Classement ENS



[Prié, V. 2020.](#) – La Mulette perlière dans l'Agout – recherche par analyse de l'ADN environnemental. CEN Midi-Pyrénées, 4 pp



Une Grande Mulette à très faible profondeur, au niveau du moulin d'Espalanque ([Prié, V. & F. Néri 2016](#)). Recherche de la Grande Mulette *Margaritifera auricularia* sur l'Arros (Gers). Conservatoire d'Espaces Naturels Midi-Pyrénées – Biotope

# Exemples de contributions et travaux du CEN



Matrice : eau

Recherche présence/absence

Barcoding

Détection précoce d'espèces exotiques envahissantes : recherche de la [Grenouille taureau](#) au nord de Toulouse suite à une alerte.

+ prospections classiques

→ Résultats négatifs ! 😞

En savoir plus sur les stratégies EEE



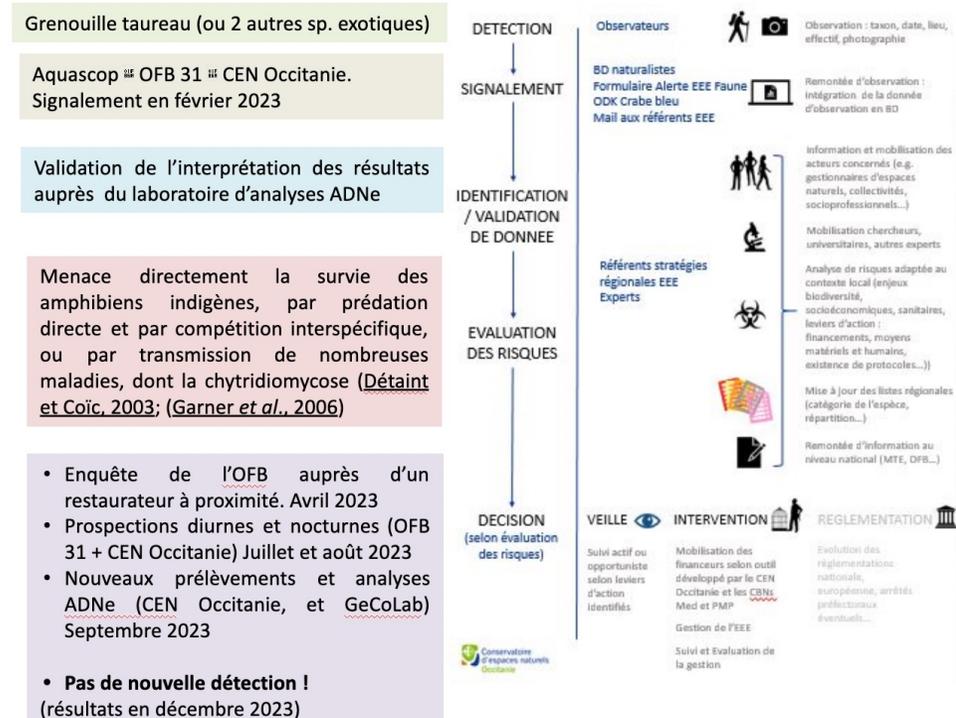
Prévention



© Cdr EEE



© Laurent Pontcharraud



Grenouille taureau (ou 2 autres sp. exotiques)

Aquascop <sup>III</sup> OFB 31 <sup>III</sup> CEN Occitanie. Signalement en février 2023

Validation de l'interprétation des résultats auprès du laboratoire d'analyses ADNe

Menace directement la survie des amphibiens indigènes, par prédation directe et par compétition interspécifique, ou par transmission de nombreuses maladies, dont la chytridiomycose (Détaint et Coïc, 2003; (Garner et al., 2006))

- Enquête de l'OFB auprès d'un restaurateur à proximité. Avril 2023
- Prospections diurnes et nocturnes (OFB 31 + CEN Occitanie) Juillet et août 2023
- Nouveaux prélèvements et analyses ADNe (CEN Occitanie, et GeColab) Septembre 2023

• Pas de nouvelle détection ! (résultats en décembre 2023)

■ En 2024, actions de prospections du Xénope lisse au Sud de Toulouse

# Exemples de contributions et travaux du CEN

## Matrice : sols



### Caractériser la biodiversité

Caractériser la diversité de la fonge et la faune du sol dans des contextes de peuplements forestiers avec des historiques de gestion contrastés.

↳ Création d'indices permettant de caractériser le fonctionnement du sol et notamment la productivité

↳ Vers un outil de diagnostic de sensibilité de la biodiversité des sols ?

↳ Amélioration de la compréhension des liens entre gestion forestière et biodiversité des sols pour une meilleure prise en compte de la vie des sols par les forestiers.

*Une suite en cours...*



(Emberger et al., 2023)

Metabarcoding

Pour chaque plateau :

<b>Description peuplement :</b> - Surface terrière par essence - Structure (répartition diamètres)	<b>Flore (vasculaire + bryophytes) :</b> - Espèces présentes par strates - Coefficients de recouvrement	<b>Formes d'humus : Descriptions par horizon :</b> - Aspects des feuilles - Taux et nature des MO - Abondance mycelium/racines - Transition - Structure horizon A
<b>Localisation</b> - Point GPS - % de perturbation	<b>Macrofaune du sol :</b> - Taxons présents (ordre - familles) - Abondances	

Pour chaque placette (site) :

<b>Description peuplement :</b> - Hauteur moyenne - Hauteur dominante	<b>Description station</b> - Pente - Altitude - Exposition - Situation topographique - Forme versant (concave...) - Pierrosité de surface (% nature) - Nature roche mère (carte géol.)	<b>Analyses physico-chimiques</b> - échantillon composite 0-10 cm - Horizon sous-jacent fosse - Teneurs en cations - CEC, S, S/T - pH eau et KCl - P205 - NH4+, NO3- - % N, %C, C/N - Granulo 5 fractions
<b>ADN faune - fonge</b> (échantillon composite 0-10cm) - OTU/espèces présents	<b>Description fosse</b> (jusqu'à 50 cm, puis tarière) Par horizon : - Epaisseur - Structure - Compacité - Texture - Eléments grossiers (% nature) - Abondance racines - Couleur	
<b>Nématodes</b> (échantillon composite 0-10cm) - Taxons présents - Abondance - Indices nématofauniques	<b>Electromagnétisme*</b> - Susceptibilité magn. - Viscosité magn.	<b>Minéralisation potentielle azote</b>

# Exemples de contributions et travaux du CEN



Matrice : fèces

Barcoding

Loutre d'Europe

Caractériser les populations (clusters génétiques)

ADNe pas nécessaire en soi pour la présence/absence, car identification aisée par les épreintes

↳ Preuve d'un brassage génétique entre populations

↳ Succès de la méthode !

↳ Identification des causes du déclin ( agriculture intensive –et donc pollution et qualité d'habitat–plutôt que les continuités écologiques

Changement de priorité dans les actions menées dans le PNA Loutre

[Pigneur et al, 2018, 2019](#)

© Johan Michaux

# natura e

2018 • 6

Apport de la génétique pour l'étude de la dynamique des populations de Loutre d'Europe *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) en France

Lise-Marie PIGNEUR, Johan MICHAUX, Gaëlle CAUBLOT, Pascal FOURNIER, Daniel MARC, Franck SIMONNET & Gwébaël JACOB

Conservation Genetics  
<https://doi.org/10.1007/s10992-019-01199-9>

RESEARCH ARTICLE  
**Current genetic admixture between relictual populations might enhance the recovery of an elusive carnivore**

Lise-Marie Pigneur<sup>1</sup>, Gaëlle Caublot<sup>2</sup>, Christine Fournier-Chambillon<sup>3</sup>, Pascal Fournier<sup>4</sup>, Gloria Giralda-Carrera<sup>4</sup>, Xavier Grémillet<sup>5</sup>, Bruno Le Roux<sup>6</sup>, Daniel Marc<sup>7</sup>, Franck Simonnet<sup>8</sup>, Nathalie Smitz<sup>1,8</sup>, Eric Sourp<sup>9</sup>, Julien Steinmetz<sup>10</sup>, Fermin Urra-Maya<sup>11</sup>, Johan R. Michaux<sup>1,12</sup>

art. 2018 (6) — Publi  
[www.revue-naturaef.fr](http://www.revue-naturaef.fr)

Connaissance & gestion des espèces  
**Dynamique régionale de la loutre en Midi-Pyrénées**

Biological Conservation 279 (2023) 109927

Contents lists available at ScienceDirect

Biological Conservation

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioco](http://www.elsevier.com/locate/bioco)

Intensive agriculture as the main limiting factor of the otter's return in southwest France

Thibaut Couturier<sup>a</sup>, Julien Steinmetz<sup>b,1</sup>, Pierre Defos du Rau<sup>c</sup>, Daniel Marc<sup>d,4</sup>, Emma Trichet<sup>b</sup>, Régis Gomes<sup>b</sup>, Aurélien Besnard<sup>b</sup>

JULIEN STEINMETZ<sup>a</sup>, DANIEL MARC<sup>c</sup>, FRÉDÉRIC NÉMI<sup>a</sup>, EMMA TRICHET<sup>b</sup>, AURÉLIEN BESNARD<sup>b</sup>, PIERRE DEFOS DU RAU<sup>c</sup>, JULIE BOON<sup>d</sup>

<sup>a</sup> CNRS - Délégation Interdisciplinaire Sud-Ouest  
<sup>b</sup> Conservatoire d'espaces naturels de Midi-Pyrénées  
<sup>c</sup> EHEC - Centre d'écologie fonctionnelle et évolutive  
<sup>d</sup> UMR 5175

# Exemples de contributions et travaux du CEN



## Matrice : fèces

Barcoding

Metabarcoding

## Desman des Pyrénées

Amélioration des connaissances sur la répartition de l'espèce, l'utilisation de l'espace, son régime alimentaire et la structuration génétique des populations en France.

Crédits photos Lucas Santucci Agence Zeppein



Étude comparative de la densité et du déplacement des Desmans des Pyrénées *Galemys pyrenaicus* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811) par une méthode non invasive

Melody LIM, Frédéric BLANC, Johan MICHAUX, Lise-Marie PIGNEUR, François GILLET, Daniel MARC, Émile PONCET & Mélanie NÉMOZ

→ Succès de la méthode

→ Facilitation de la détection de l'espèce.

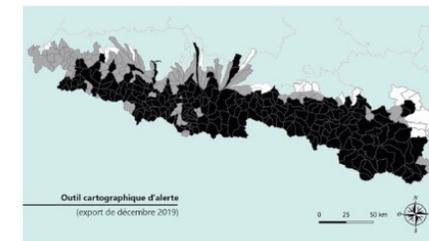
Adaptation de l'action publique selon la zone hydrologique dans le cadre d'une **gestion cohérente sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce**. Publication de 4 livrets techniques de recommandations concrètes pour la prise en compte concrète du Desman.



Inscription du Desman des Pyrénées comme « **Vulnérable** » (VU) dans la liste rouge des mammifères de France métropolitaine depuis 2017.



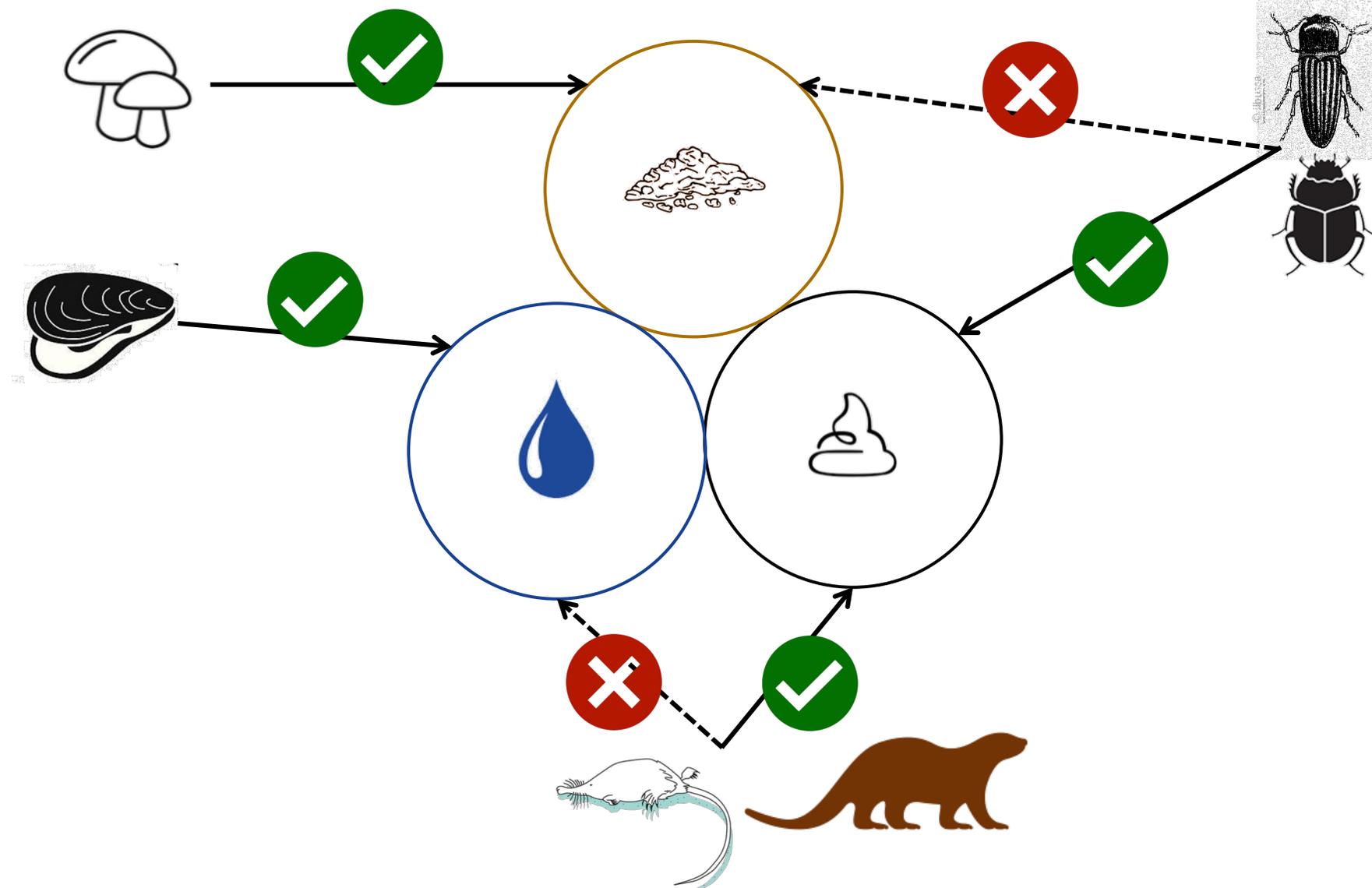
→ Mise en place d'un **outil cartographique d'alerte** pour systématiser la prise en compte de l'espèce lors de travaux.



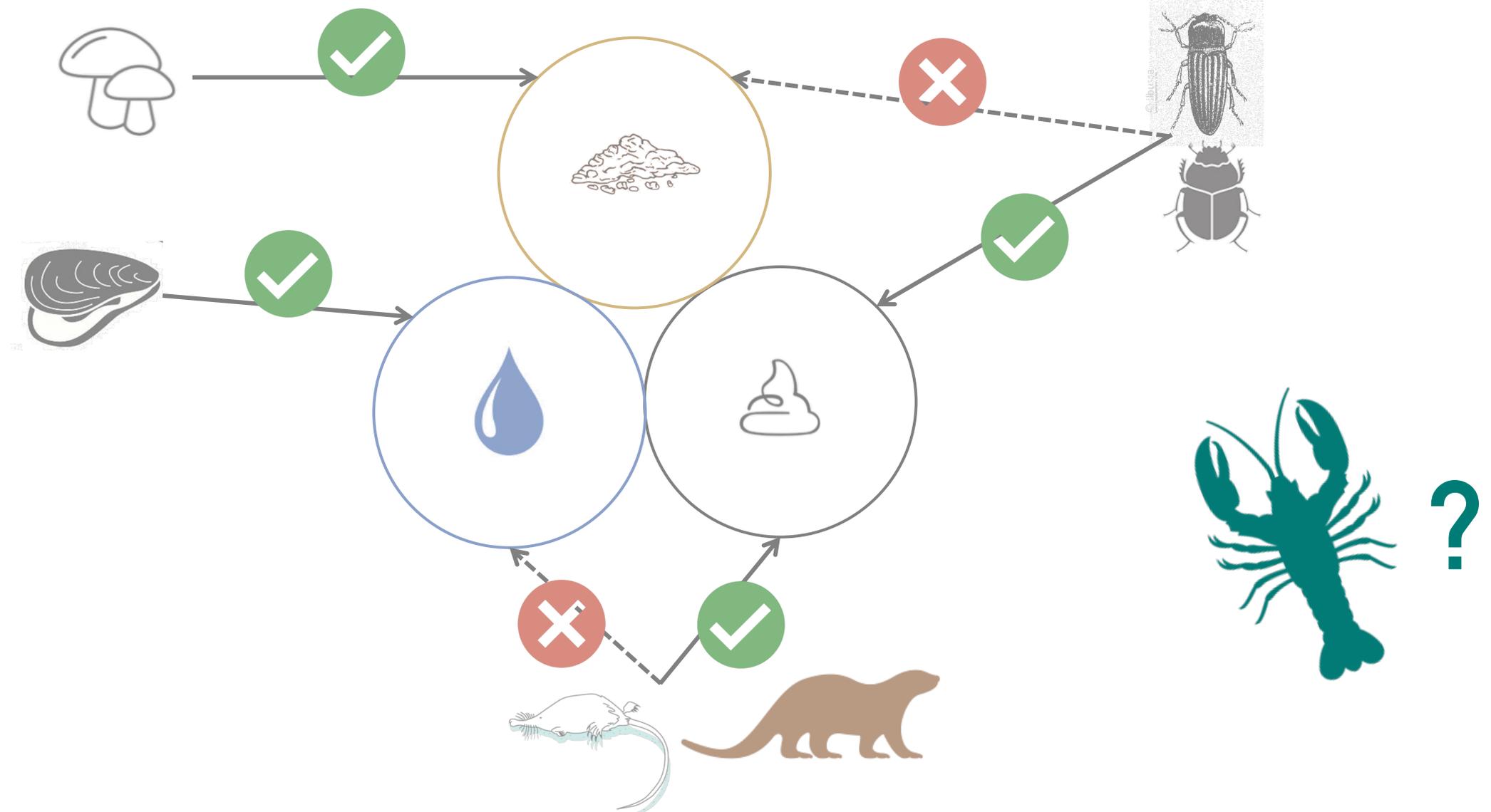
(Légende - Noir : Desman présent actuellement, Gris : Desman présent historiquement, Blanc : Desman absent historiquement)



# Exemples de contributions et travaux du CEN



# Exemples de contributions et travaux du CEN



# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



Restauration du réservoir biologique des ruisseaux et zones humides du bassin versant de la Justale et du Louch Rieumajou, dans une démarche concertée



# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



## Contexte

Ruisseaux du piémont pyrénéen (Comminges) en mauvais état dans contexte très agricole (piétinement, pas d'entretiens ou coupes de ripisylve...).

Enjeu *Austropotamobius pallipes*.

## Objectif

Améliorer la détection de l'espèce en simplifiant les protocoles.

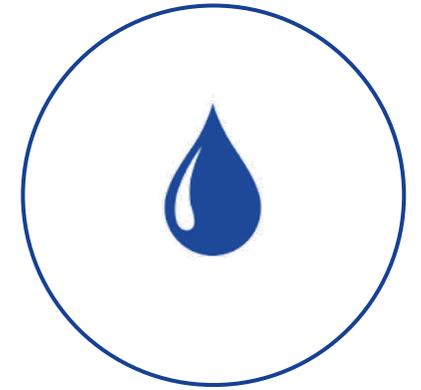
# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches

Utilisation de l'ADNe pour la détection de l'Écrevisse à pattes blanches (et des écrevisses en général)

Analyses réalisées sur prélèvements d'eau (de 150ml à 14L).

Prélèvements nécessitant du matériel coûteux (pompes péristaltiques, filtres...) et souvent au moins 30 minutes par réplication.

([Tréguier et al., 2014](#) ; [Ikeda et al. 2017](#) ; [Larson et al., 2017](#); [Mauvisseau et al., 2016](#) ; [Agersnap et al., 2017](#) ; [Larsson et al., 2017](#) ; [Dougherty et al., 2016](#) ; [Cai et al., 2017](#); [Rusch et al., 2020](#); [Atkinson et al., 2020](#), [Chucholl et al., 2021](#).; [Baudry et al., 2023](#)); [Grandjean](#))



# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches

Capacité des biofilms à capter l'ADNe

✓ Macroinvertébrés

✓ Poissons

✓ Diatomées

[\(Rivera et al., 2021; Rivera et al., 2022\)](#)

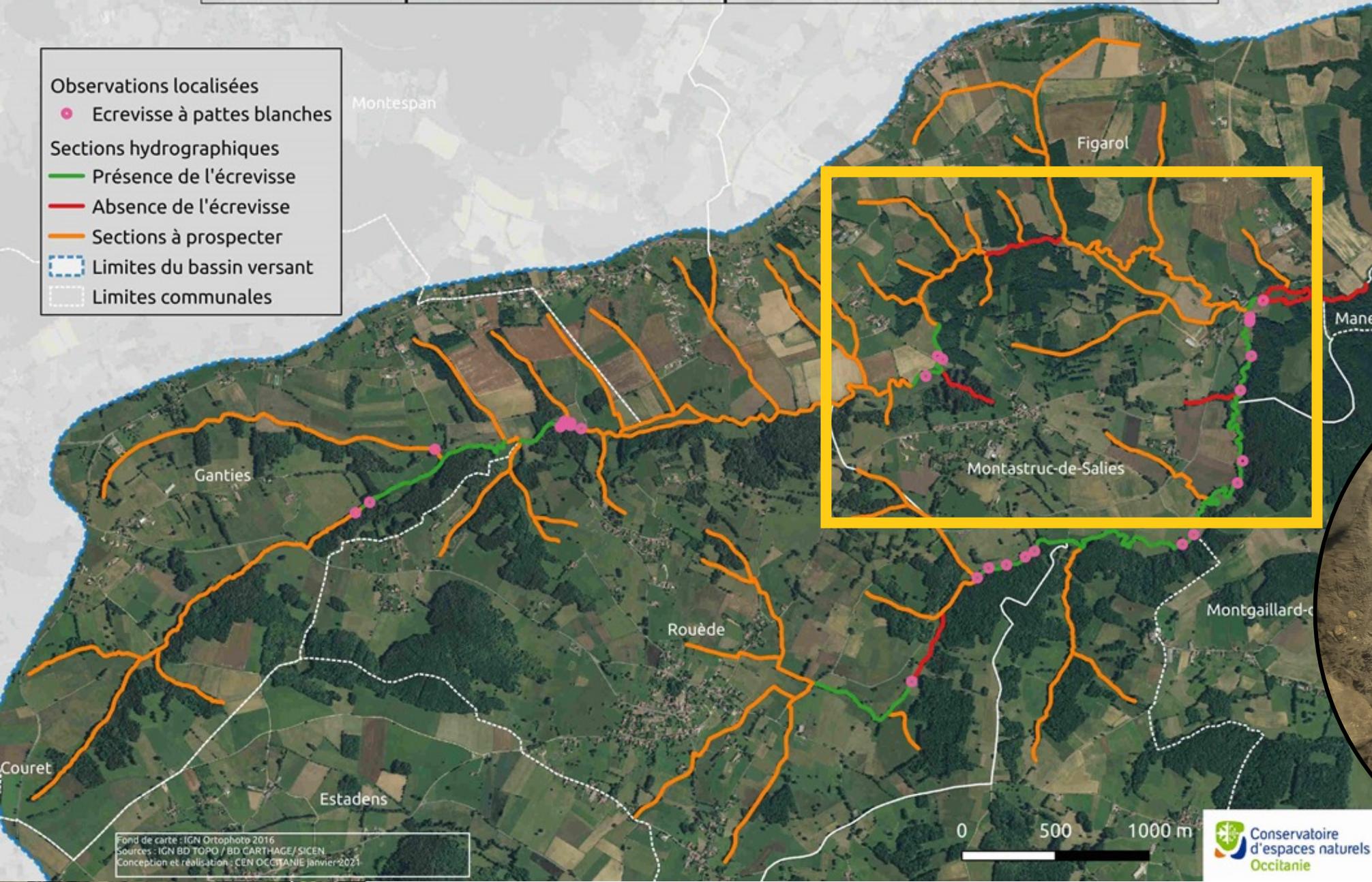
↪ Écrevisses ?



# État de la connaissance de la répartition de l'Écrevisse à pattes blanches (*Austropotamobius pallipes*) sur les ruisseaux de la Justale et du Louch-Rieumajou d'après les données collectées par le CEN Occitanie en 2020



- Observations localisées
- Écrevisse à pattes blanches
- Sections hydrographiques
- Présence de l'écrevisse
- Absence de l'écrevisse
- Sections à prospecter
- ▭ Limites du bassin versant
- ▭ Limites communales





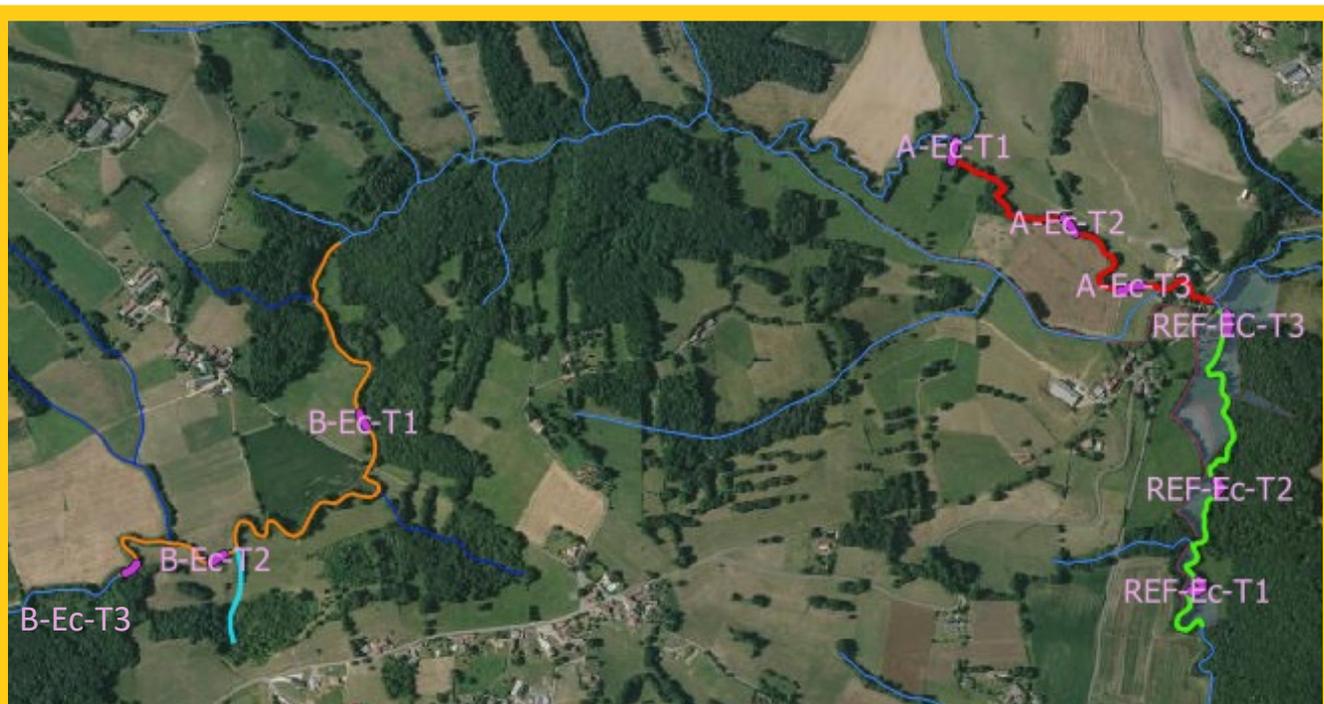
Justale (Référence) – Suivis en 2021, 2022 et 2023 (1000ml)  
Rieumajou A (Aval) – Suivis en 2021, 2022 et 2023 (1000ml)  
Rieumajou B (Amont) – Suivis en 2022 et 2023 (1500ml)

# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



## Protocole en bref

- **Prospections écrevisses pédestres nocturnes** à 2 opérateurs sur 3 segments de 30 ml sur pour chaque tronçon

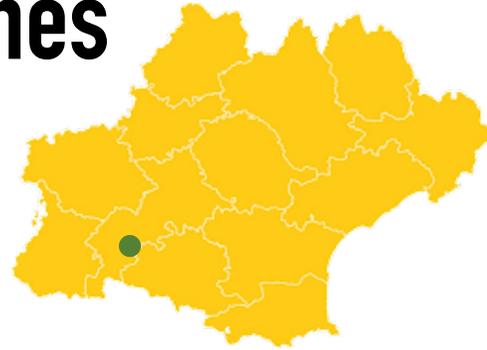


Justale (Référence) – Suivis en 2021, 2022 et 2023 (1000ml)

Rieumajou A (Aval) – Suivis en 2021, 2022 et 2023 (1000ml)

Rieumajou B (Amont) – Suivis en 2022 et 2023 (1500ml)

# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



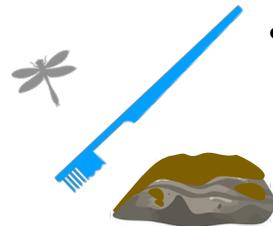
## Protocole en bref

- **Prospections écrevisses pédestres nocturnes** à 2 opérateurs sur 3 segments de 30 ml sur pour chaque tronçon



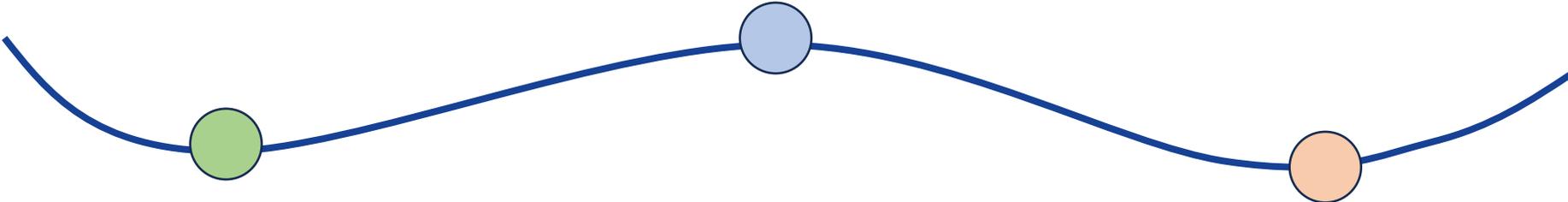
3 points par tronçon placés sur les segments suivis d'*A. pallipes* en diversifiant les faciès d'écoulement :

- **Caractérisation de l'habitat** (conditions abiotiques et biotiques) de jour
- **Prélèvement de macroinvertébrés** au Surber de jour
- **Prélèvement de biofilms** (grattage de 3 à 5 cailloux par point et conservation dans l'éthanol à 96% au frais) de jour et/ou de nuit

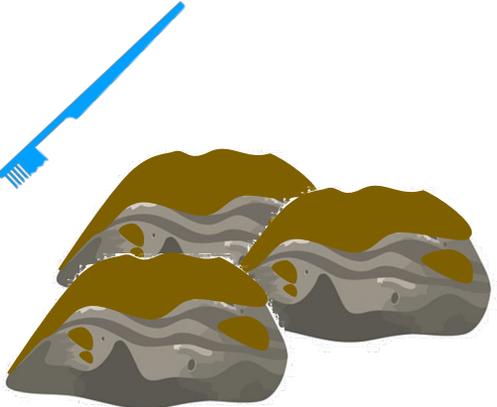


# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches

*Protocole analyses génétiques*



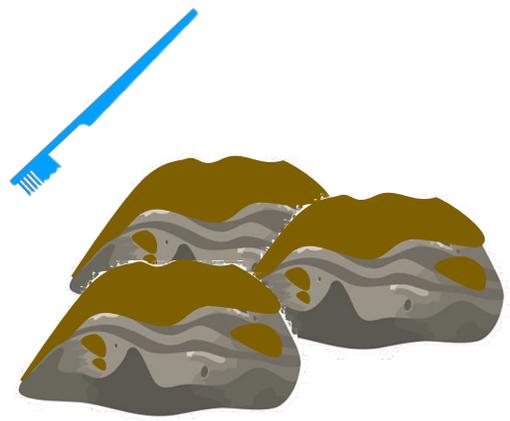
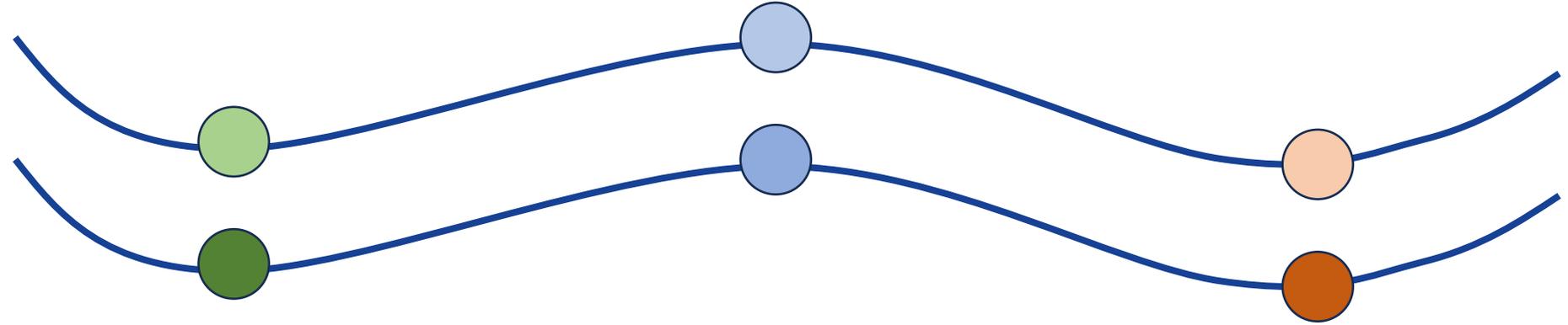
Prélèvements  
de biofilms  
Année n



# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches

*Protocole analyses génétiques*

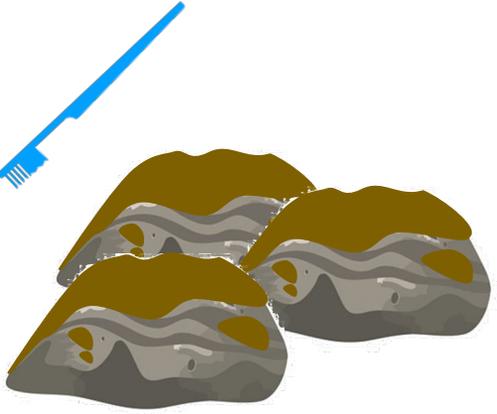
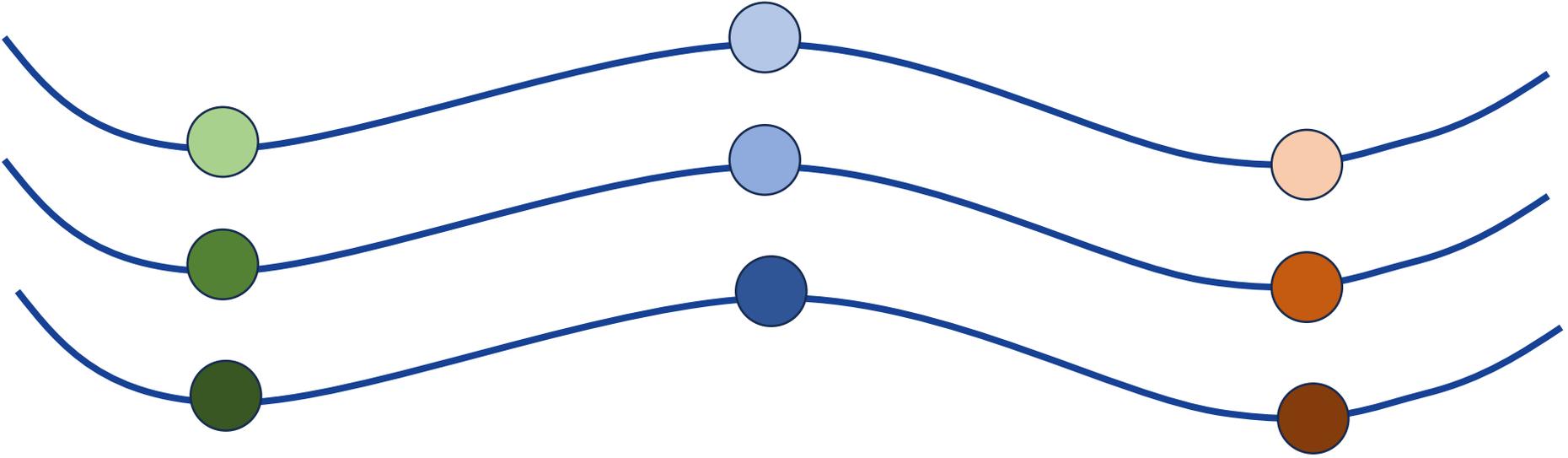
Prélèvements  
de biofilms  
Année n



# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches

*Protocole analyses génétiques*

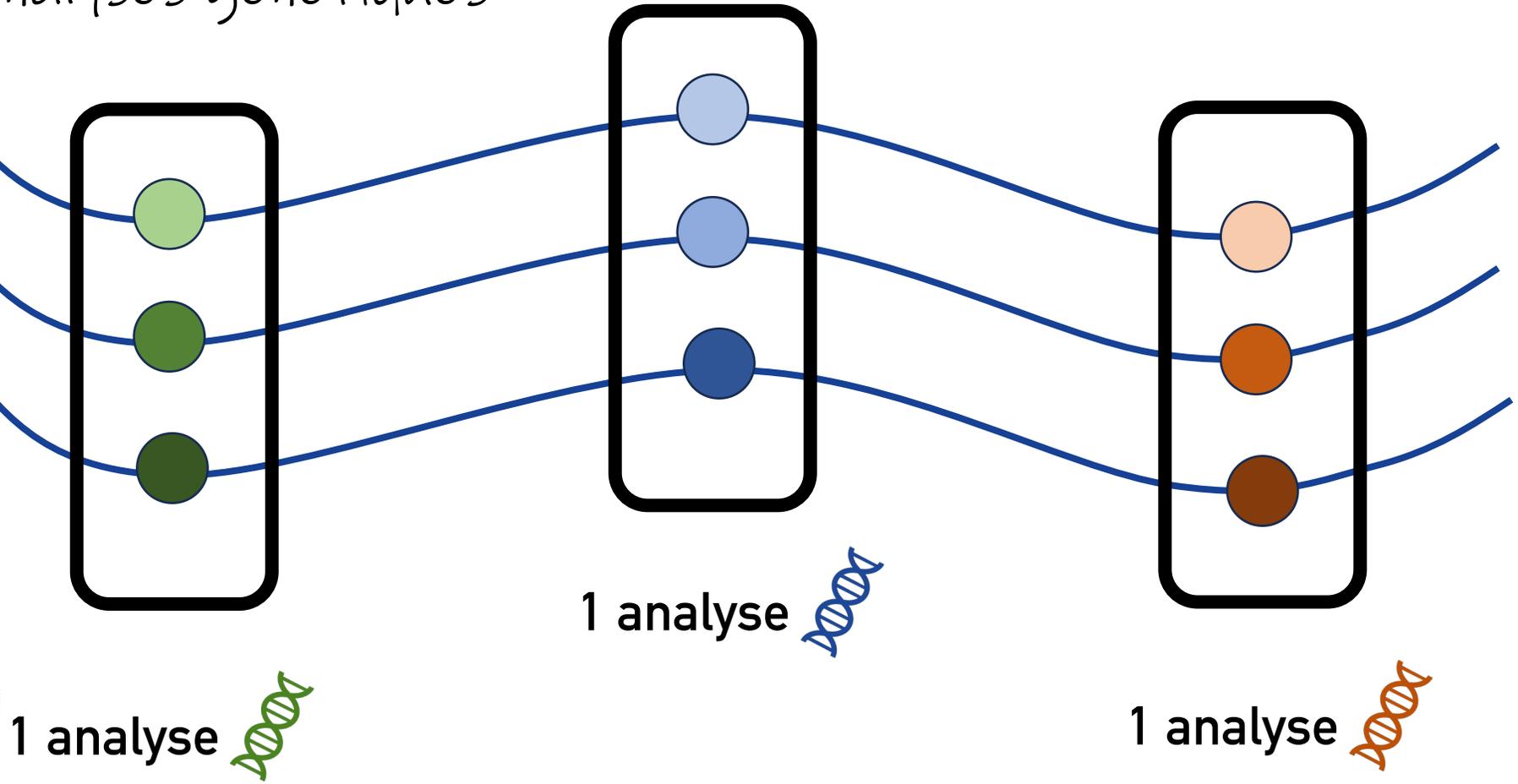
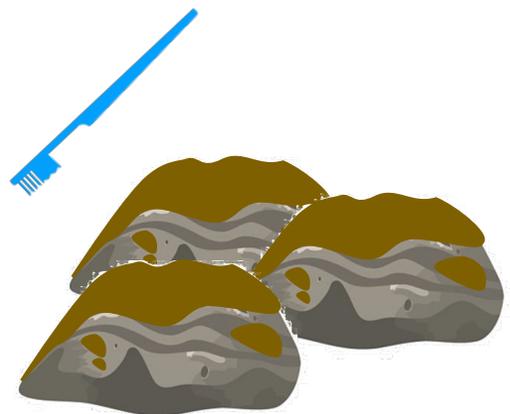
Prélèvements  
de biofilms  
Année n



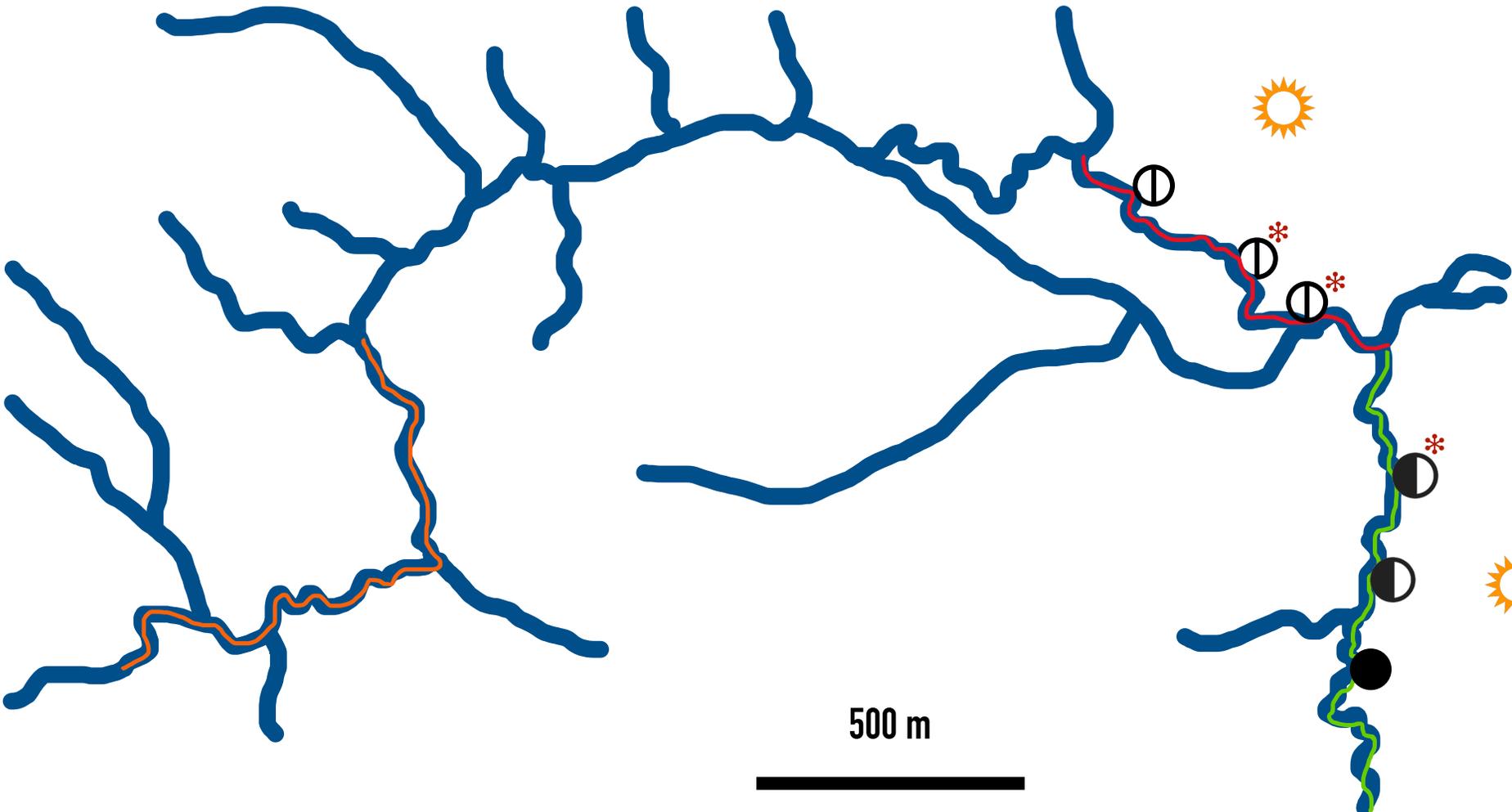
# Nouvelle méthode d'étude de l'Ecrevisse à pattes blanches

*Protocole analyses génétiques*

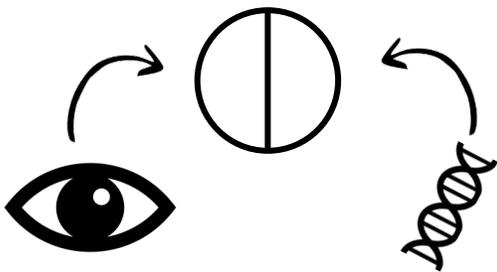
Prélèvements  
de biofilms  
Année n



# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



Type de détection



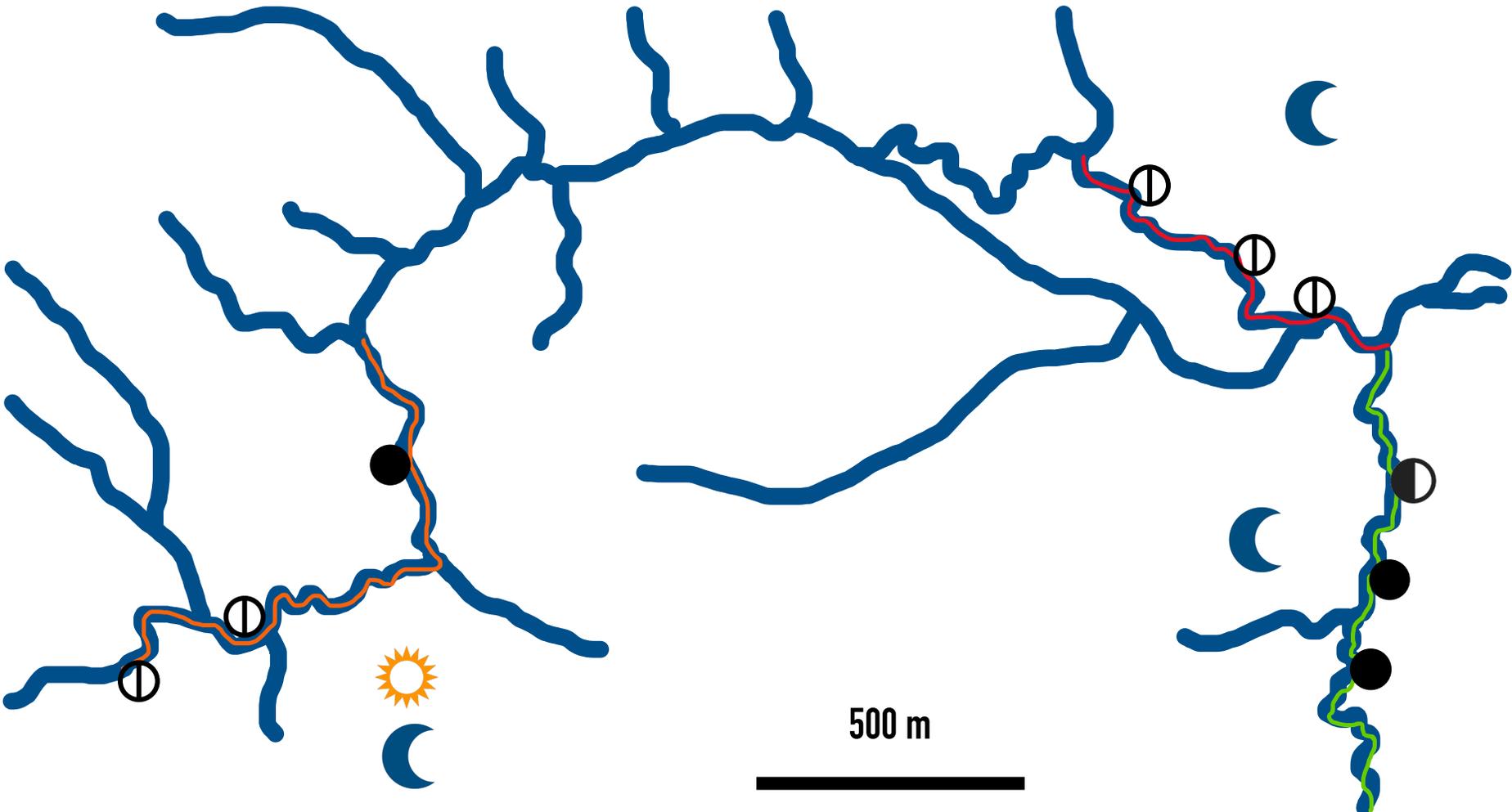
\* Très peu de séquences d'ADN ont été mises en évidence.

Prélèvements de biofilms diurnes

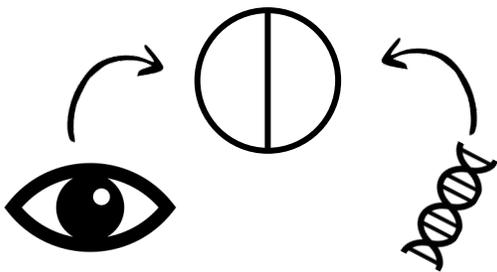


2021

# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



Type de détection



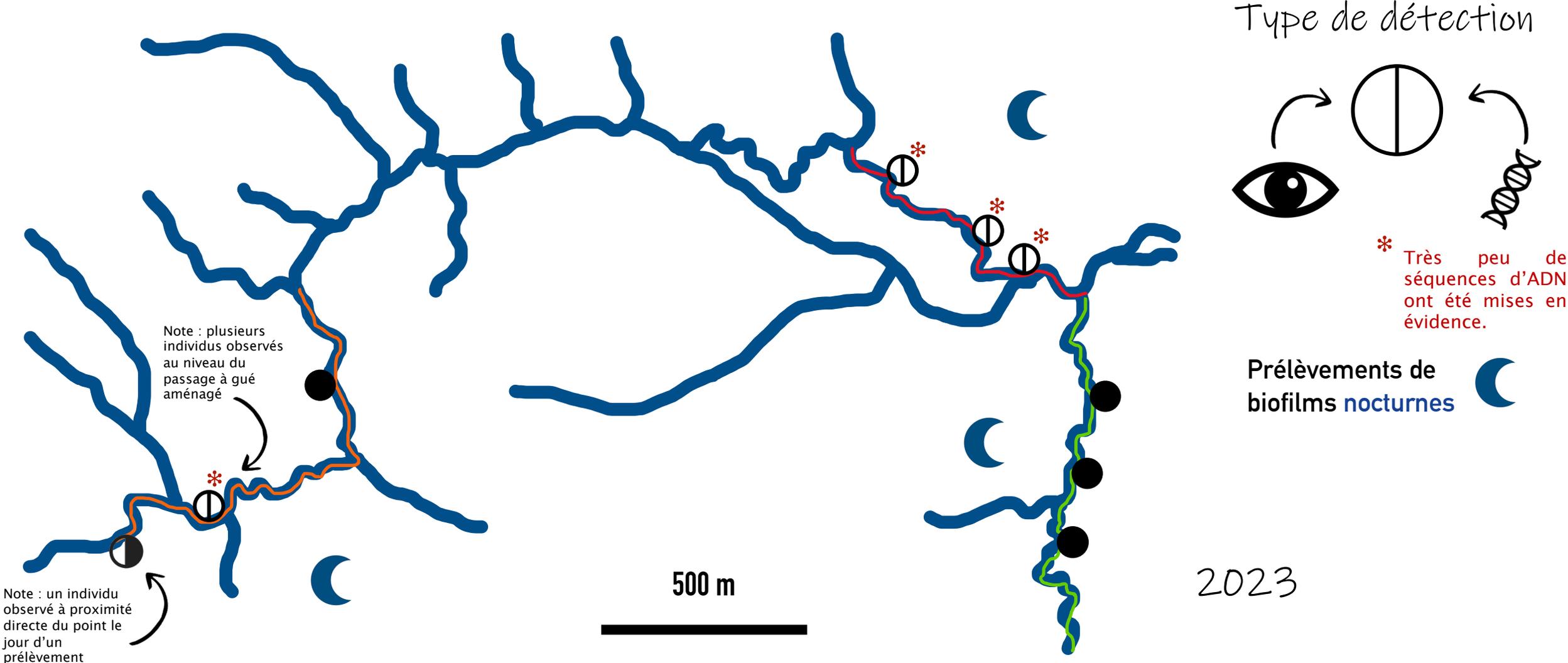
\* Très peu de séquences d'ADN ont été mises en évidence.

Prélèvements de biofilms **diurnes** et **nocturnes**

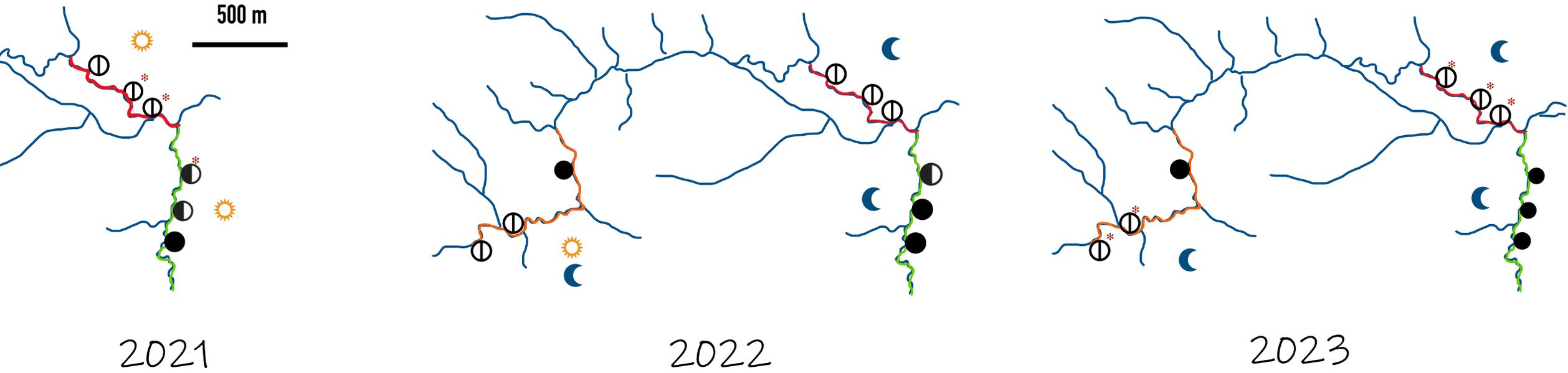


2022

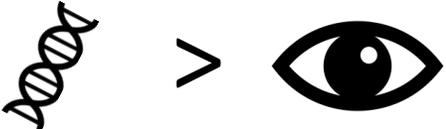
# Nouvelle méthode d'étude de l'Écrevisse à pattes blanches



# Nouvelle méthode d'étude de l'Ecrevisse à pattes blanches

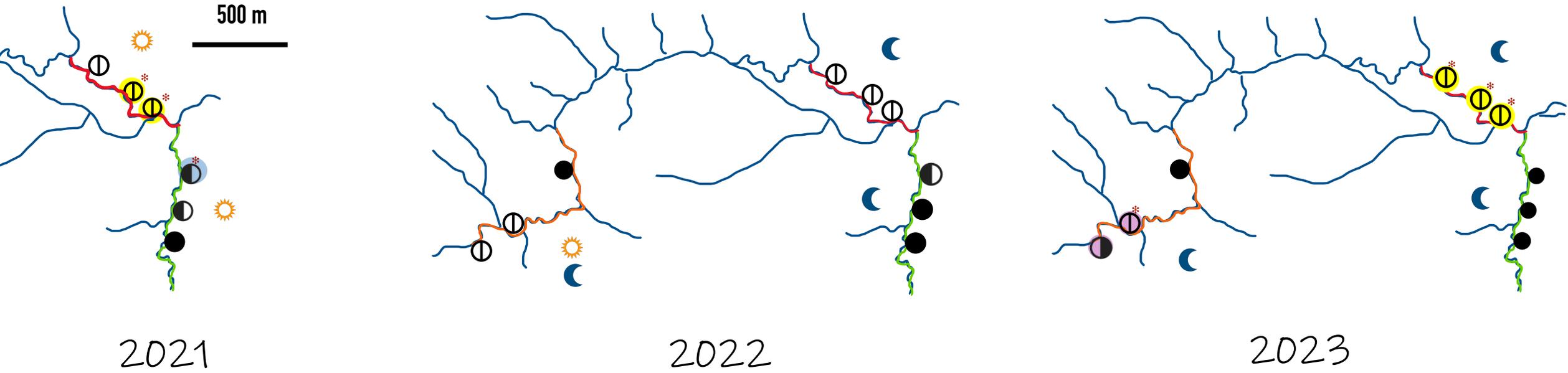


Inventaire classique : **46%** des tronçons positifs  
Détection par ADNe : **66%** des tronçons positifs



**58 %** de résultats concordants ( ● / ⊕ ) entre suivis classiques et résultats d'analyses génétiques. (14 résultats sur 24)

# Nouvelle méthode d'étude de l'Ecrevisse à pattes blanches



**29%** (7 sur 24) négatifs en suivis classiques et positifs avec les analyses génétiques.

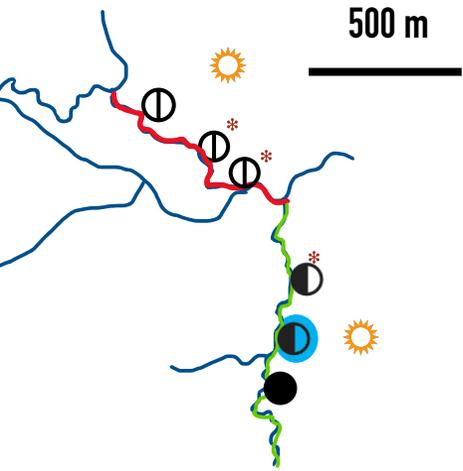
**5** (détectés faibles en génétique) peuvent s'expliquer par une population à l'amont,

**2** vérifiées par des observations hors protocole (détectés faible et forte).

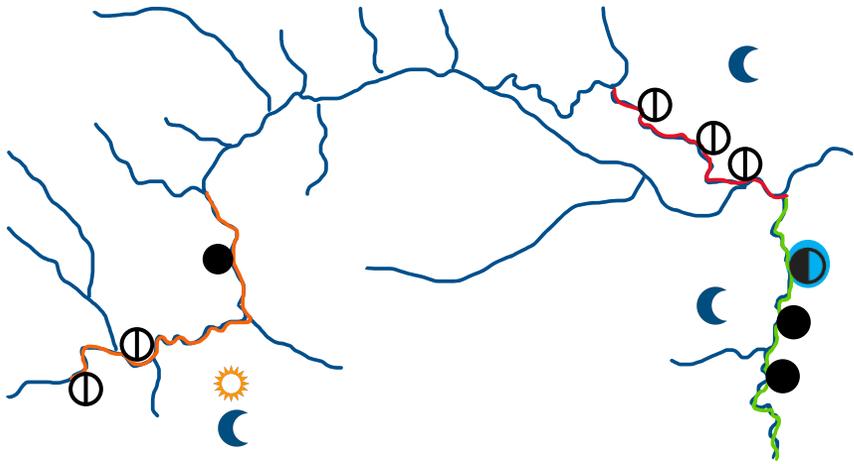
**Mais aussi 1** cas positif en suivi classique (en faible effectif) et détecté faiblement par la génétique.



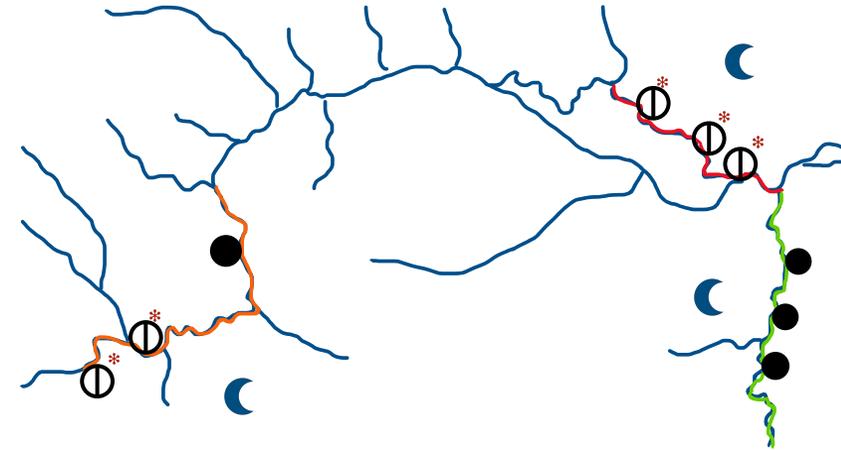
# Nouvelle méthode d'étude de l'Ecrevisse à pattes blanches



2021



2022



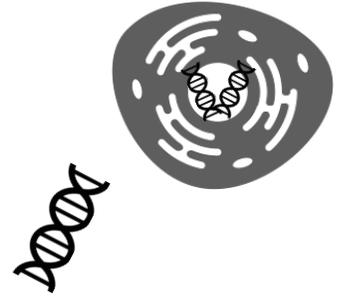
2023

↪ 33% de résultats expliqués facilement.

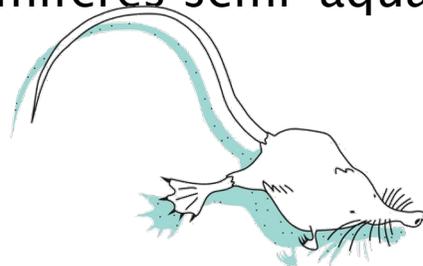
↪ 8% (2 sur 24) faux négatifs : positifs en suivis classiques mais négatifs via l'ADNe.

# Nouvelle méthode d'étude de l'Ecrevisse à pattes blanches

## Conclusion et perspectives



- Comme souvent, ADNe et inventaires classiques sont complémentaires : meilleure efficacité de détection de l'ADNe, estimation de l'abondance par inventaires classiques.
- Outil pertinent à utiliser en amont d'un programme de conservation de l'espèce sur un bassin-versant par exemple, pour prioriser les tronçons à prospector.
- Tester la capacité des biofilms pour d'autres groupes pour lesquels les résultats sont négatifs dans la matrice eau : mammifères semi-aquatiques (test en cours pour le Desman des Pyrénées)



# Merci pour votre attention



[iris.lang@cen-occitanie.org](mailto:iris.lang@cen-occitanie.org)  
[daniel.marc@cen-occitanie.org](mailto:daniel.marc@cen-occitanie.org)  
[johan.michaux@uliege.be](mailto:johan.michaux@uliege.be)



Union des Associations  
Naturalistes d'Occitanie



# Exemples d'opérations conduites par le CEN

Matrice : Fèces/Eau

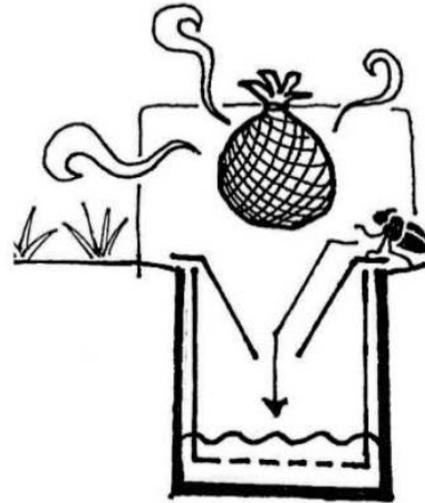


**Coléoptères  
coprophages #bousiers**

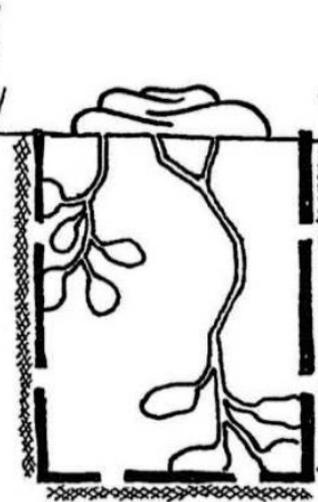
En moyenne, 60% de similitudes entre listes par détermination morphologiques et listes issues des résultats d'analyses d'ADNe.



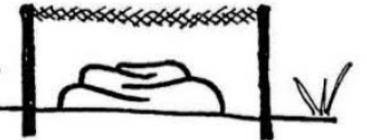
**1) Piège barber ADNe**



**2) Excrément sur cylindre enterré**



**3) Excrément témoin**



# Bilan des opérations conduites par le CEN

**Questions que l'on se pose, et à laquelle l'ADNe peut répondre.**

**Traduction en actions de gestion.**

Eau

Mammifères semi aquatiques : Ne fonctionne pas sauf pour les animaux qui relarguent beaucoup de matière et dont on voit directement les indices de présence sans avoir besoin d'analyses d'ADNe.

Naïades (*Margaritifera* spp.): utile pour décrire les populations, en découvrir de nouvelles

Espèces exotiques envahissantes : utile pour la détection d'EEE et vérification en plus de prospections classiques.

Sol

Détection des coléoptères dans cavités arbres

InsylbioS : détection non invasive d'espèces protégées ou relativement rares. Permet d'obtenir des proxys pour la richesse en biodiversité des sols forestiers.

Fèces

Desman : génétique des populations, caractérisation des populations, caractérisation du régime alimentaire...(cf rapport scientifique)

Loutre : historique de l'état des populations, et dynamiques..et identification des causes du déclin ( agriculture intensive -et donc pollution et qualité habitat-plutôt que continuités écologiques, comme mis en avant dans le PNA)