natagora

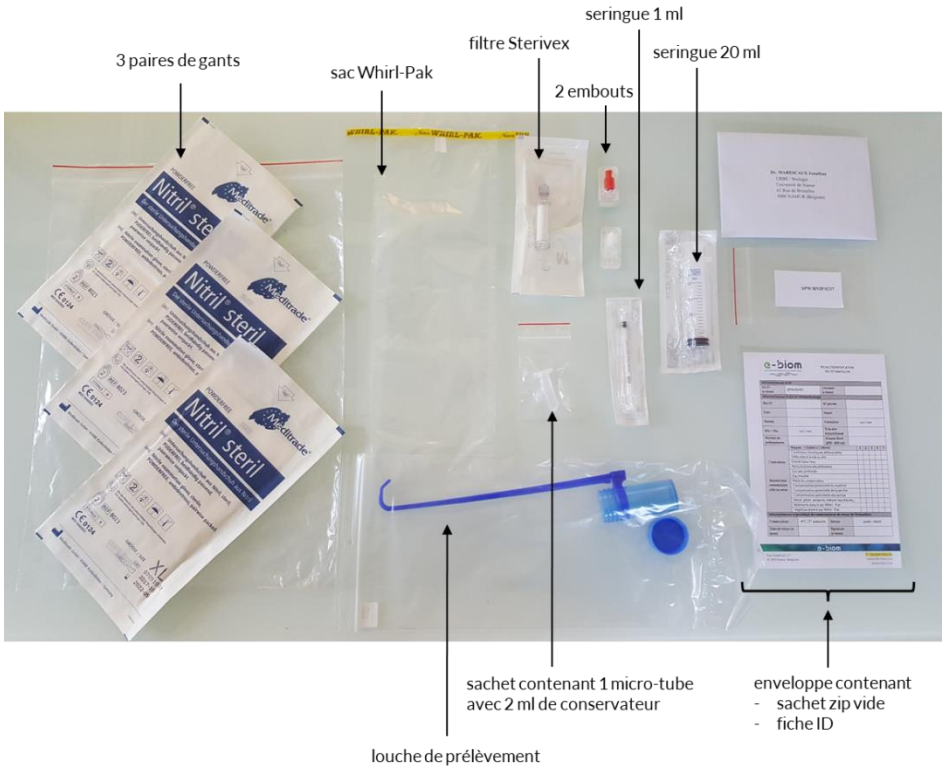
La nature avec vous

Campagne d'inventaire par ADN environnemental 2018-2019

2 espèces visées, 1 méthode

ADN environ-nemental

Objectif: 1000 mares

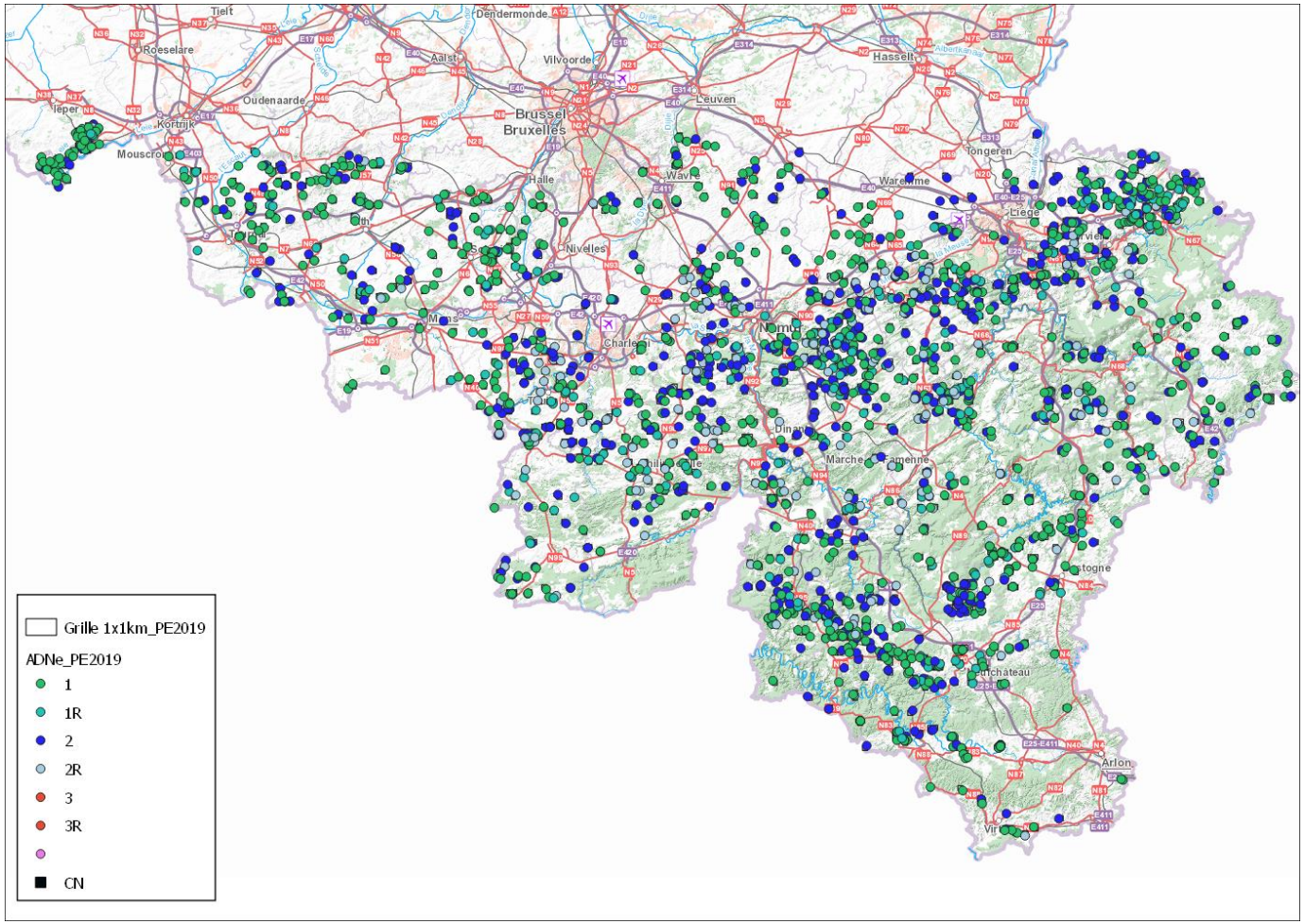


Objectifs poursuivis

- Echantillonnage pour l'analyse ADN
  - Amélioration de l'état des connaissances sur la répartition de deux espèces
- Caractérisation de l'habitat « Mare »
  - Constitution d'une BD Mare évolutive
  - Identification des réseaux de mare disponibles au Triton crêté
  - Support à la rédaction et mise en œuvre du plan de gestion
- En 2019:
  - Pose de nasses dans les sites positifs pour le Triton crêté en 2018 afin de valider les données
  - Ecouvillonnage des individus de Triton crêté pour une future étude phylogénétique

Méthode de l'ADNe

Plan d'échantillonnage



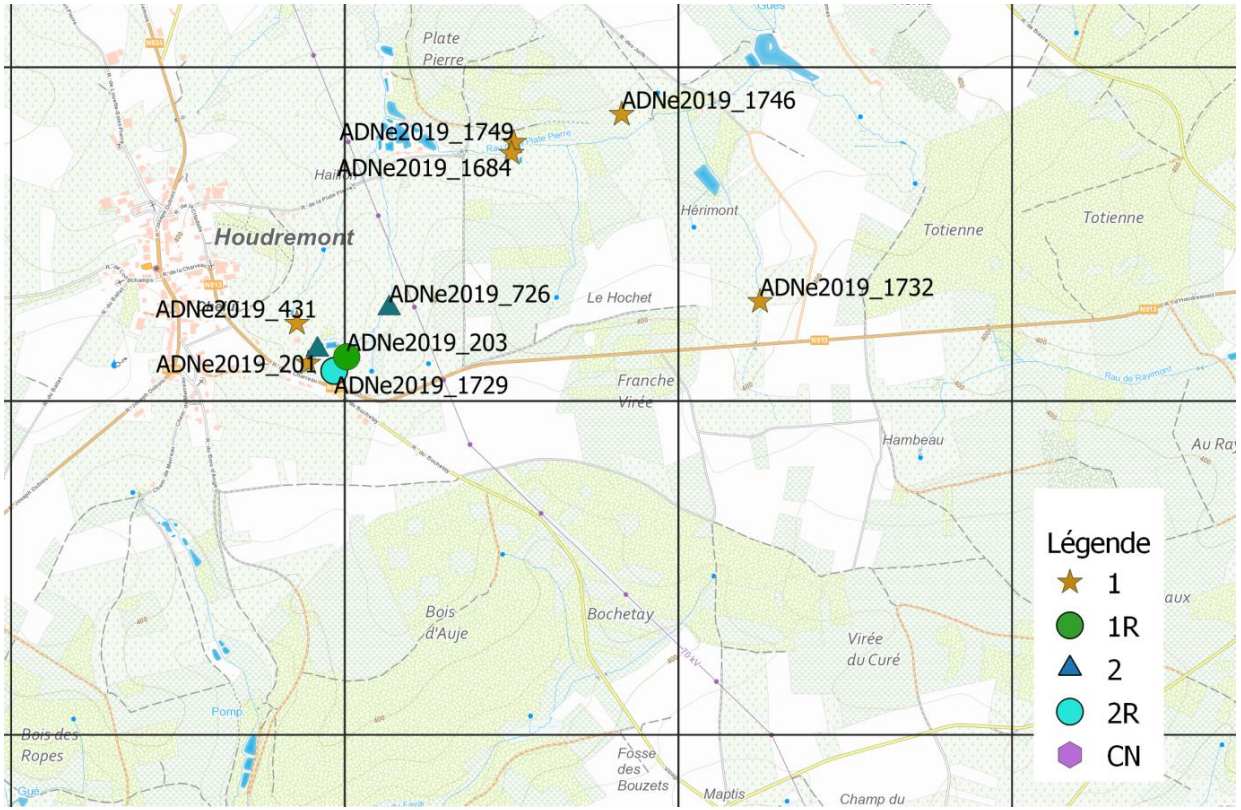
BD mare de + de 50.000 mares: 4000 mares priorisées

1094 mares en priorité 1

Objectifs:
350 en 2018
750 en 2019

Sélection finale des mares in situ

Sélection des mares in situ



1 seule mare par maille de 1km/1km; la meilleure

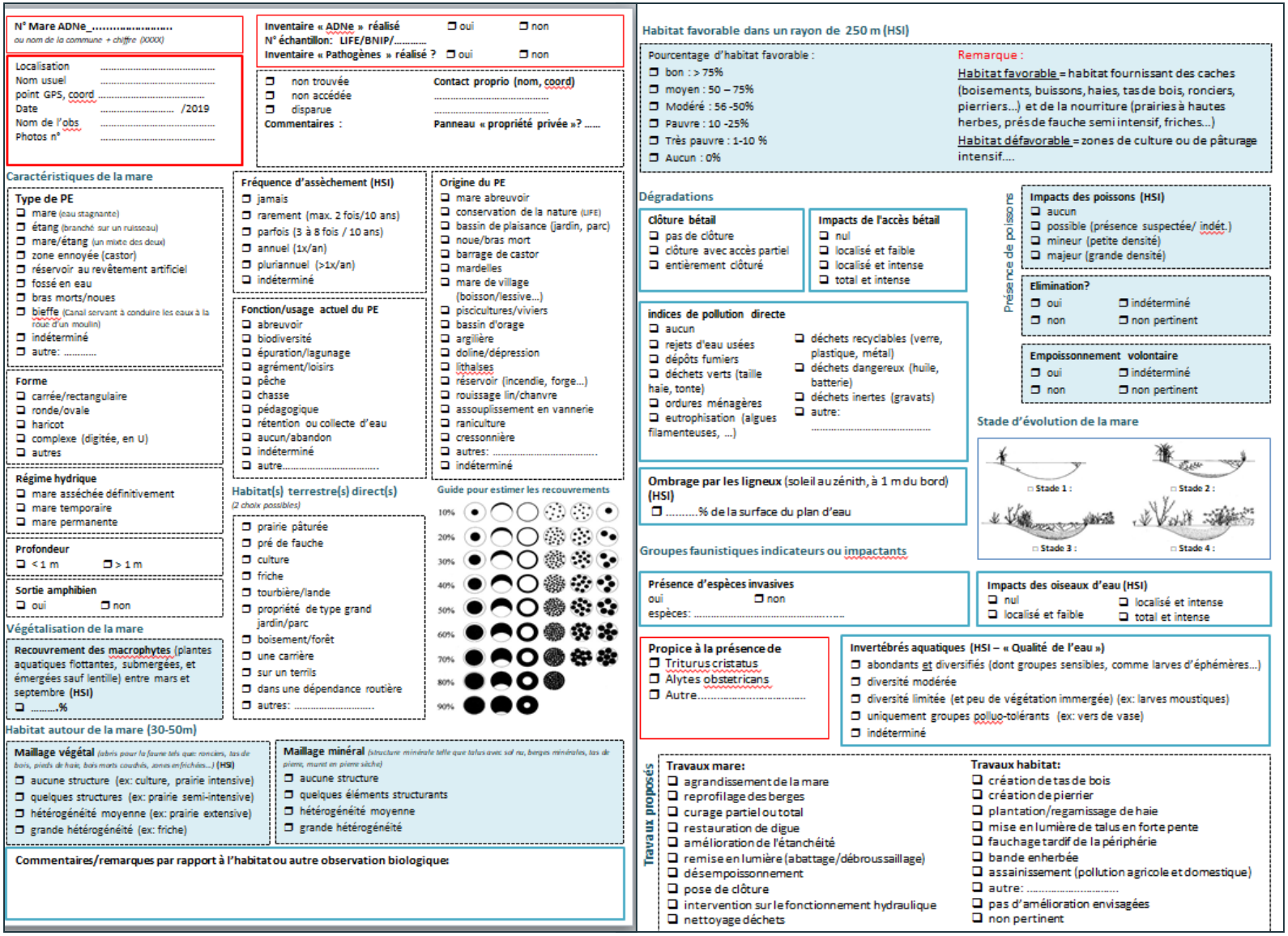
Critères de sélection en fonction des exigences écologiques de TC

natagora

natagora

Plus de 2000 mares actuellement caractérisées

Fiche habitat



N° Mare ADNe .....
ou nom de la commune + chiffre (XXXX)

Localisation .....
Nom usuel .....
point GPS, coord .....
Date ..... /2019
Nom de l'obs .....
Photos n° .....

Inventaire « ADNe » réalisé ❒ oui ❒ non
N° échantillon: LIFE/BNIP/.....
Inventaire « Pathogènes » réalisé ? ❒ oui ❒ non

❒ non trouvée
❒ non accédée
❒ disparue
Commentaires :

Contact proprio (nom, coord)
.....
.....
Panneau « propriété privée »? .....

Caractéristiques de la mare

Type de PE
❒ mare (eau stagnante)
❒ étang (branché sur un ruisseau)
❒ mare/étang (un mixte des deux)
❒ zone ennoyée (castor)
❒ réservoir au revêtement artificiel
❒ fossé en eau
❒ bras morts/noues
❒ bieffe (Canal servant à conduire les eaux à la roue d'un moulin)
❒ indéterminé
❒ autre: .....

Forme
❒ carrée/rectangulaire
❒ ronde/ovale
❒ haricot
❒ complexe (digitée, en U)
❒ autres

Régime hydrique
❒ mare asséchée définitivement
❒ mare temporaire
❒ mare permanente

Profondeur
❒ < 1 m ❒ > 1 m

Sortie amphibien
❒ oui ❒ non

Fréquence d'assèchement (HSI)
❒ jamais
❒ rarement (max. 2 fois/10 ans)
❒ parfois (3 à 8 fois / 10 ans)
❒ annuel (1x/an)
❒ pluriannuel (>1x/an)
❒ indéterminé

Fonction/usage actuel du PE
❒ abreuvoir
❒ biodiversité
❒ épuration/lagunage
❒ agrément/loisirs
❒ pêche
❒ chasse
❒ pédagogique
❒ rétention ou collecte d'eau
❒ aucun/abandon
❒ indéterminé
❒ autre.....

Origine du PE
❒ mare abreuvoir
❒ conservation de la nature (LIFE)
❒ bassin de plaisance (jardin, parc)
❒ noue/bras mort
❒ barrage de castor
❒ mardelles
❒ mare de village (boisson/lessive...)
❒ pisciculture/viviers
❒ bassin d'orage
❒ argillière
❒ doline/dépression
❒ lithalses
❒ réservoir (incendie, forge...)
❒ rouissage lin/chanvre
❒ assouplissement en vannerie
❒ raniculture
❒ cressonnière
❒ autres: .....
❒ indéterminé

Végétalisation de la mare

Recouvrement des macrophytes (plantes aquatiques flottantes, submergées, et émergées sauf lentille) entre mars et septembre **(HSI)**
❒ .....%

Habitat(s) terrestre(s) direct(s)

(2 choix possibles)

❒ prairie pâturée
❒ pré de fauche
❒ culture
❒ friche
❒ tourbière/lande
❒ propriété de type grand jardin/parc
❒ boisement/forêt
❒ une carrière
❒ sur un terrils
❒ dans une dépendance routière
❒ autres: .....

Guide pour estimer les recouvrements

Habitat autour de la mare (30-50m)

Maillage végétal *(abris pour la faune tels que: rondiers, tas de bois, pieds de haie, bois morts couchés, zones enfrichées...)* **(HSI)**
❒ aucune structure (ex: culture, prairie intensive)
❒ quelques structures (ex: prairie semi-intensive)
❒ hétérogénéité moyenne (ex: prairie extensive)
❒ grande hétérogénéité (ex: friche)

Maillage minéral *(structure minérale telle que talus avec sol nu, berges minérales, tas de pierre, muret en pierre sèche)*
❒ aucune structure
❒ quelques éléments structurants
❒ hétérogénéité moyenne
❒ grande hétérogénéité

Commentaires/remarques par rapport à l'habitat ou autre observation biologique:

Habitat favorable dans un rayon de 250 m (HSI)

Pourcentage d'habitat favorable :
❒ bon : > 75%
❒ moyen : 50 – 75%
❒ Modéré : 56 -50%
❒ Pauvre : 10 -25%
❒ Très pauvre : 1-10 %
❒ Aucun : 0%

Remarque :
Habitat favorable = habitat fournissant des caches (boisements, buissons, haies, tas de bois, ronciers, pierriers...) et de la nourriture (prairies à hautes herbes, prés de fauche semi intensif, friches...)
Habitat défavorable = zones de culture ou de pâturage intensif....

Dégradations

Clôture bétail
❒ pas de clôture
❒ clôture avec accès partiel
❒ entièrement clôturé

Impacts de l'accès bétail
❒ nul
❒ localisé et faible
❒ localisé et intense
❒ total et intense

indices de pollution directe
❒ aucun
❒ rejets d'eau usées
❒ dépôts fumiers
❒ déchets verts (taille haie, tonte)
❒ ordures ménagères
❒ eutrophisation (algues filamenteuses, ...)
❒ déchets recyclables (verre, plastique, métal)
❒ déchets dangereux (huile, batterie)
❒ déchets inertes (gravats)
❒ autre: .....

Ombrage par les ligneux (soleil au zénith, à 1 m du bord) **(HSI)**
❒ .....% de la surface du plan d'eau

Présence de poissons

Impacts des poissons (HSI)
❒ aucun
❒ possible (présence suspectée/ indét.)
❒ mineur (petite densité)
❒ majeur (grande densité)

Elimination?
❒ oui ❒ indéterminé
❒ non ❒ non pertinent

Empoissonnement volontaire
❒ oui ❒ indéterminé
❒ non ❒ non pertinent

Stade d'évolution de la mare

Groupes faunistiques indicateurs ou impactants

Présence d'espèces invasives
oui ❒ non
espèces: .....

Impacts des oiseaux d'eau (HSI)
❒ nul ❒ localisé et intense
❒ localisé et faible ❒ total et intense

Propice à la présence de
❒ Triturus cristatus
❒ Alytes obstetricans
❒ Autre.....

Invertébrés aquatiques (HSI – « Qualité de l'eau »)
❒ abondants et diversifiés (dont groupes sensibles, comme larves d'éphémères...)
❒ diversité modérée
❒ diversité limitée (et peu de végétation immergée) (ex: larves moustiques)
❒ uniquement groupes polluo-tolérants (ex: vers de vase)
❒ indéterminé

Travaux proposés

Travaux mare:
❒ agrandissement de la mare
❒ reprofilage des berges
❒ curage partiel ou total
❒ restauration de digue
❒ amélioration de l'étanchéité
❒ remise en lumière (abattage/débroussaillage)
❒ désempoissonnement
❒ pose de clôture
❒ intervention sur le fonctionnement hydraulique
❒ nettoyage déchets

Travaux habitat:
❒ création de tas de bois
❒ création de pierrier
❒ plantation/regarnissage de haie
❒ mise en lumière de talus en forte pente
❒ fauchage tardif de la périphérie
❒ bande enherbée
❒ assainissement (pollution agricole et domestique)
❒ autre: .....
❒ pas d'amélioration envisagées
❒ non pertinent

Deux années de campagne: quelques chiffres

De 2018 à 2019

- **2.560 mares visitées dont plus de 686 inaccessibles**
- **663 mares échantillonnées**
- **304 jours de travail soit 608 ho/jour**
- **+/- 20 stagiaires en 2 ans**
- **Plus de 55.000 km parcourus**
- **De nombreux partenariat:** LIFE LIQ, PNPE, PNBM, PNHP, CRD, CREL
- **22% des échantillons consacrés à des tests (spécificité, sensibilité et validation de données)**

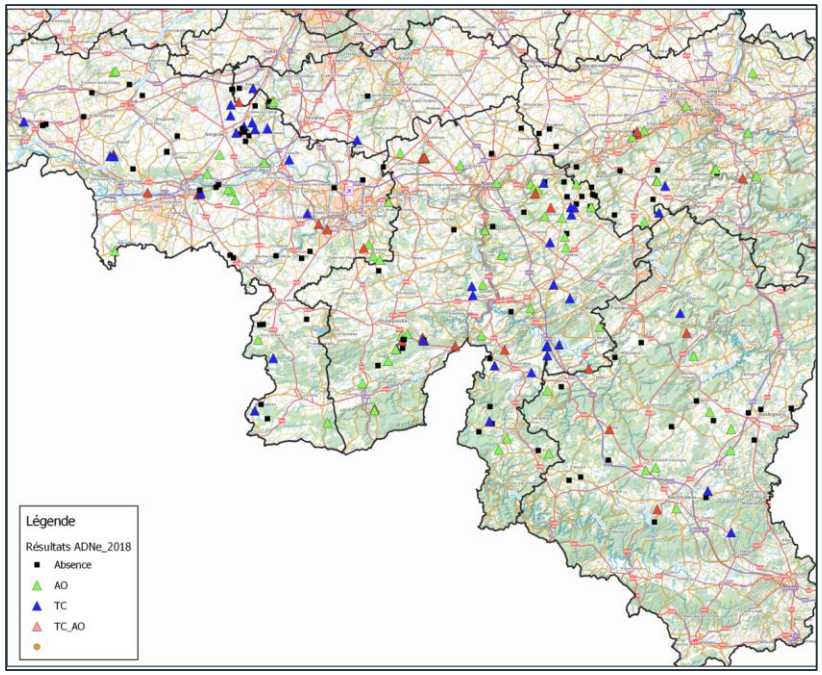
Taux de prélèvement: **35%**

Nombre moyen de mare visitée/jour: **8,42**

Nombre moyen de mare échantillonnée/ jour: **2,18**

Résultats 2018

Résultats PE 2018		TC	AO
Nombre d'échantillons	**169**		
Présence		**39**	**61**
Absence		130	108
Prévalence		**23%**	**64%**



Mais: Certains résultats aberrants

Contamination possible des échantillons lors des prélèvements

En 2019:

- Mise en place d'un protocole de nettoyage du matériel et d'un suivi des perches utilisées de manière à retracer le cheminement de celles-ci en cours de campagne
- Validation des données pour 62/80 mares :
  - Échantillonnage ADN
  - Pose de nasse/point d'écoute
    - En 3 passages, 1 nuit /passage
    - Dès qu'1 individu est observé le protocole s'arrête

Résultats des validations

Validation des données pour *Triturus cristatus* (TC)		Validation par nasses	Non validation par nasses	Site non inventorié par nasse	Nbre de données validées
Nbre de site prévu	**36**				
Nbre de site contrôlé	**29**				
Validation ADNe		**6**	**5**	**0**	**12**
Non validation ADNe		**1**	17	0	

Taux de validation TC: 41%

Validation des données pour *Alytes obstetricans* (AO)		Validation par écoute	Non validation par écoute	Site non inventorié par écoute	Nbre de données validées
Nbre de site prévu	**49**				
Nbre de site contrôlé	**37**				
Validation ADNe		0	**2**	**10**	**13**
Non validation ADNe		**1**	17	7	

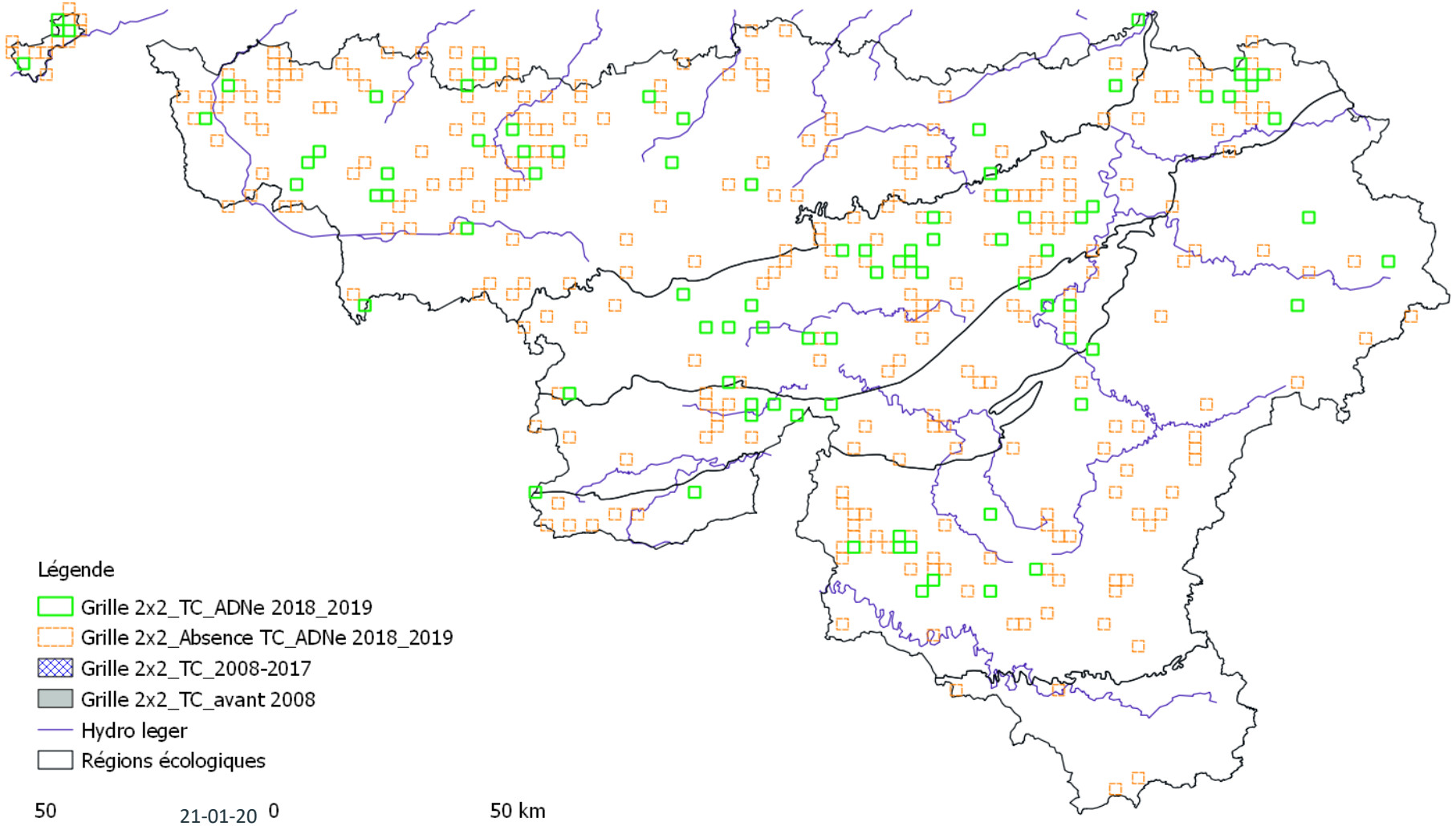
Taux de validation AO: 35%

Synthèse des résultats

Triton crêté :
91 stations

Prévalence :
19%

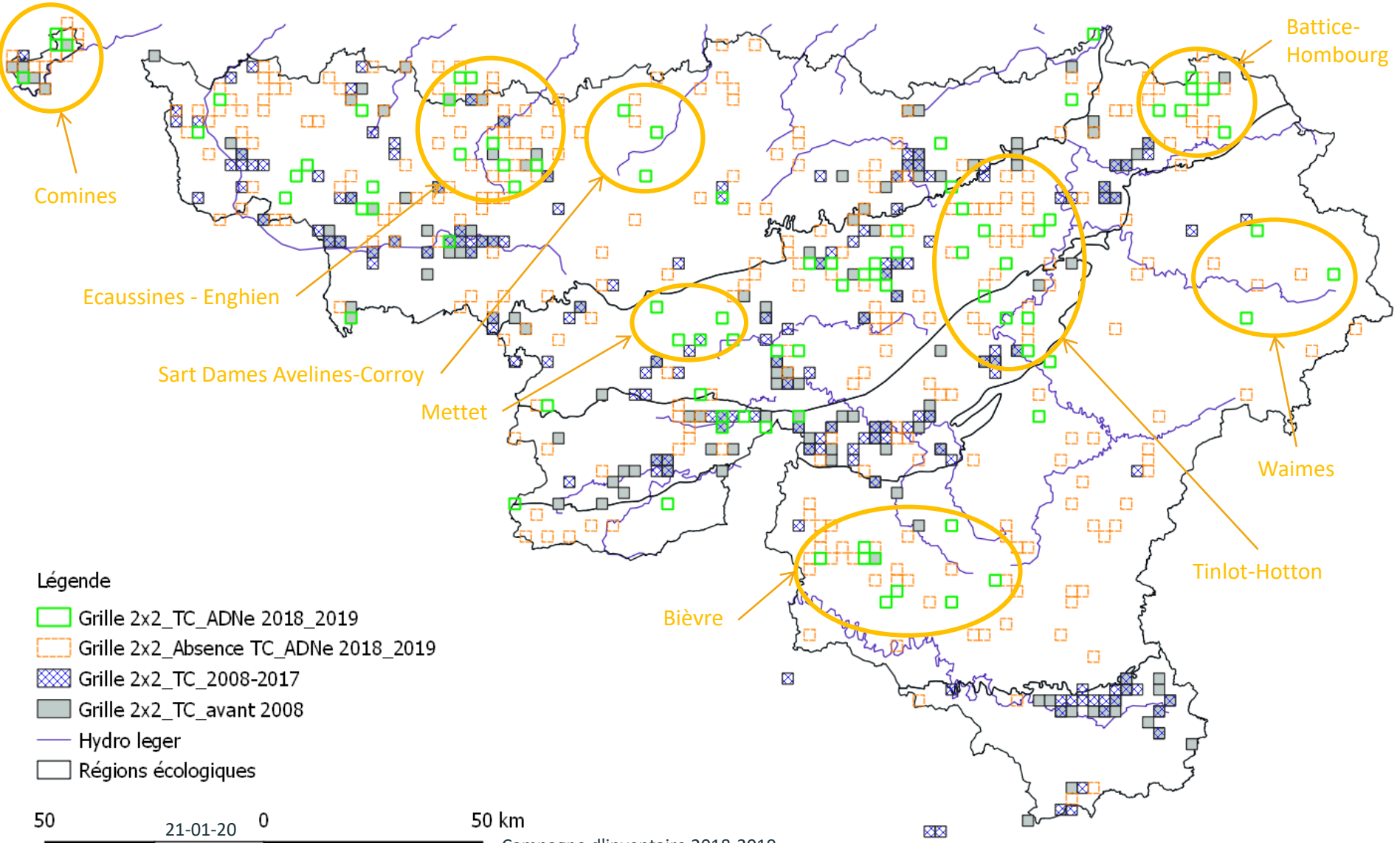
Absence:
467 stations



Campagne d'inventaire 2018-2019

Depuis 1971…

Maille 2*2 km	2018-2019	2008-2017	Avant 2008	Absence
TC	87	155	159	306
Recouvrement de maille 2018-2019// 2008-2017	5			5
Recouvrement de maille 2008-2017// avant 2008		64		
Recouvrement de maille 2018-2019// avant 2008	10			21



Alyte:
136 stations

Prévalence:
21%

Absence:
423 stations

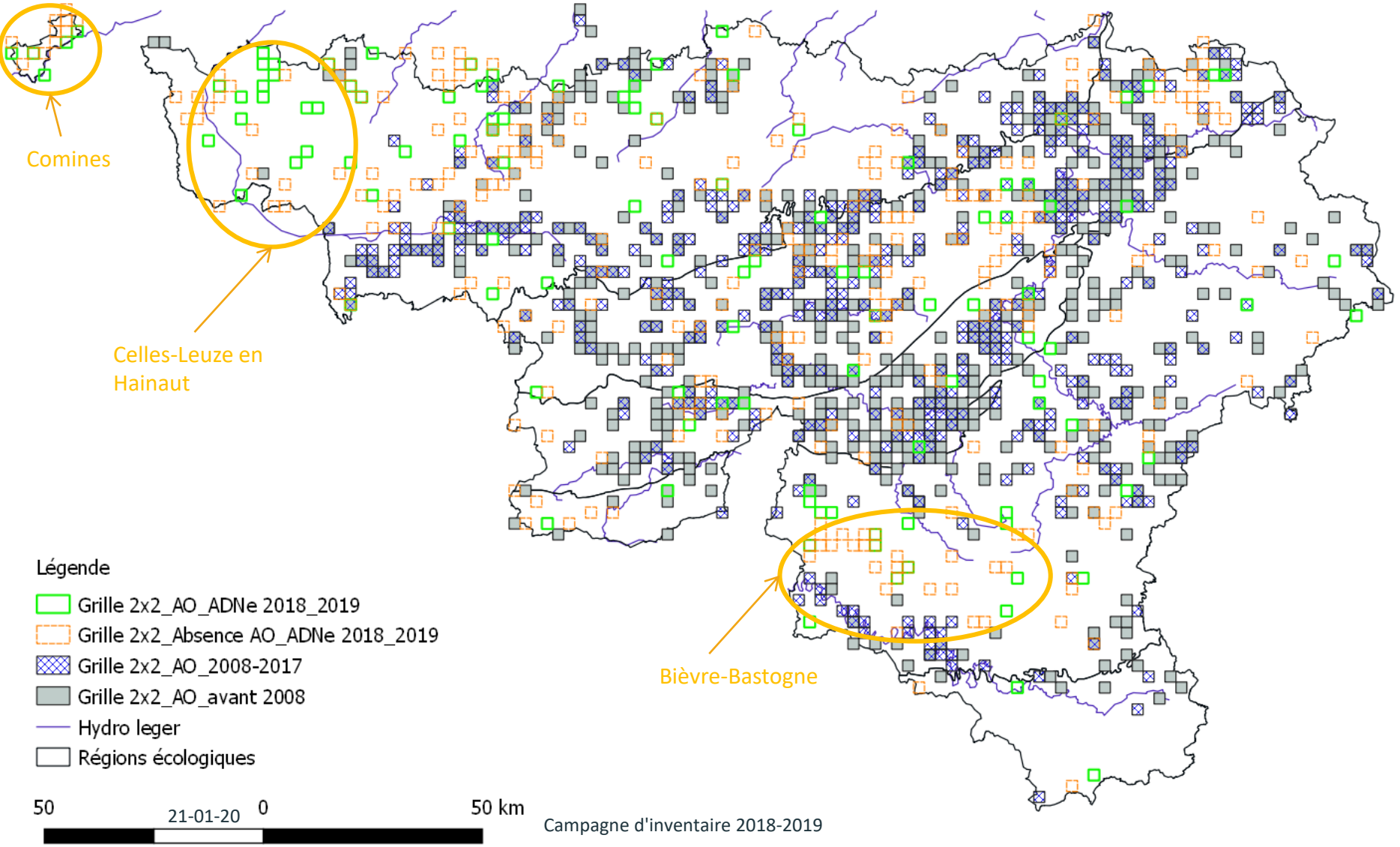
Légende

- Hydro leger
- Régions écologiques
- Grille 2x2_AO_ADNe 2018_2019
- Grille 2x2_Absence AO_ADNe 2018_2019

50 0 50 km

Depuis 1963…

Maille 2*2 km	2018-2019	2008-2017	Avant 2008	Absence
AO	113	460	651	279
Recouvrement de maille 2018-2019// 2008-2017	14			39
Recouvrement de maille 2008-2017// avant 2008		245		
Recouvrement de maille 2018-2019// avant 2008	18			63



Campagne d'inventaire 2018-2019

Tests de la méthode

Test de sensibilité (Faux négatifs)

Tests de sensibilité (2018)	TC
Nbre d'échantillon réalisé	36
Nbre de résultat positif	29
Nbre de résultat erroné	7

Sensibilité TC: 81%

Tests de sensibilité (2018)	AO
Nbre d'échantillon réalisé	21
Nbre de résultat positif	20
Nbre de résultat erroné	1

Sensibilité AO: 95%

Test de spécificité (Faux positifs)

Tests de spécificité (2019)	TC
Nbre d'échantillon réalisé (25)	16
Nbre de résultats positif	2

Spécificité TC: 13%

Tests de spécificité (2019)	AO
Nbre d'échantillon réalisé (25)	16
Nbre de résultats positif	2

Spécificité AO: 13%

Discussion de la méthode

- Méthode de screening rapide
- Temps d'échantillonnage relativement réduit: 1h/mare
- Induit des faux positifs/négatifs
- Nécessitant des validations par méthodes traditionnelles
- Limitée aux espèces recherchés
- Réponse en présence/absence

Problématiques	ADN	Nasse
Consommation en eau	-	+
Consommation en produit désinfectant	-	+
Production de déchet	++	-
encombrement du matériel (volume à transporter)	+	++
Espace de rangement	+	++
Espace de nettoyage	-	++
Kilomètre	+ à ++	++ à +++
Temps de manutention (mise en place)	+	++ à +++
Temps de manipulation (espèces/echantillonnage)	+	++ à +++
Homme/jour	++	+++ à ++++
Intrusivité de la méthode	--	++
Risque de dissémination de pathogène	+	++
Connaissances naturalistes	-	++
Formation à la méthode	+	+
Collecte de données biologiques	+	+++
Estimation des tailles de population	-	++
Estimation de la structure de population	-	++
Taux de détection	++	+
Faux positifs	+	-
Faux négatifs	+	+

Coût de la méthode

Coût / méthode	Virkon (en g)	Petit matériel	Kit d'échantillonnage + analyse	Kilomètres parcourus	Homme/jour	Total/Mare
ADNe	x1	x1	x1	X1	x2	
Unité/mare	0,14		1	21,60	0,24	
Total campagne	260	134,97		55300	608	
Nbre de mare	1874	437		2560	2560	
Prix /unité	0,04 €		165,00 €	0,34 €	100,00 €	
Prix/mare	**0,01 €**	**0,31 €**	**165,00 €**	**7,26 €**	**47,50 €**	**220,08 €**
Remarques		bacs trempage, bidon, colson		frais kilométrique salarié	salaire journalier salarié	

Coût / méthode	Virkon (en g)	Petit matériel	Nasses	Kilomètres parcourus	Homme/jour	Total/Mare
Nasses	X3	x1; /3	x1; /3	x4	x4	
Unité/mare	44,00		10	21,60	0,50	
Total campagne		607,78		55300	31	
Nbre de mare		62		2560	62	
Prix /unité	0,04 €		4,66 €	0,34 €	100,00 €	
Prix/mare	**5,48 €**	**3,27 €**	**15,53 €**	**29,06 €**	**200,00 €**	**253,34 €**
Remarques	300 nasses/3 passages/90càc /90l de nettoyage, changer entre chaque 150 nasses	Amorti sur 3 ans/ bacs de transport/bacs de nettoyage	moyenne de 10 nasses/mare	frais kilométrique salarié	salaire journalier salarié	

Pistes d'amélioration

- Améliorer l'accessibilité des sites mais comment?
- Réduire les critères de sélection in situ des sites
- Barcoding/metabarcoding?

Etude phylogénétique

Etude phylogénétique

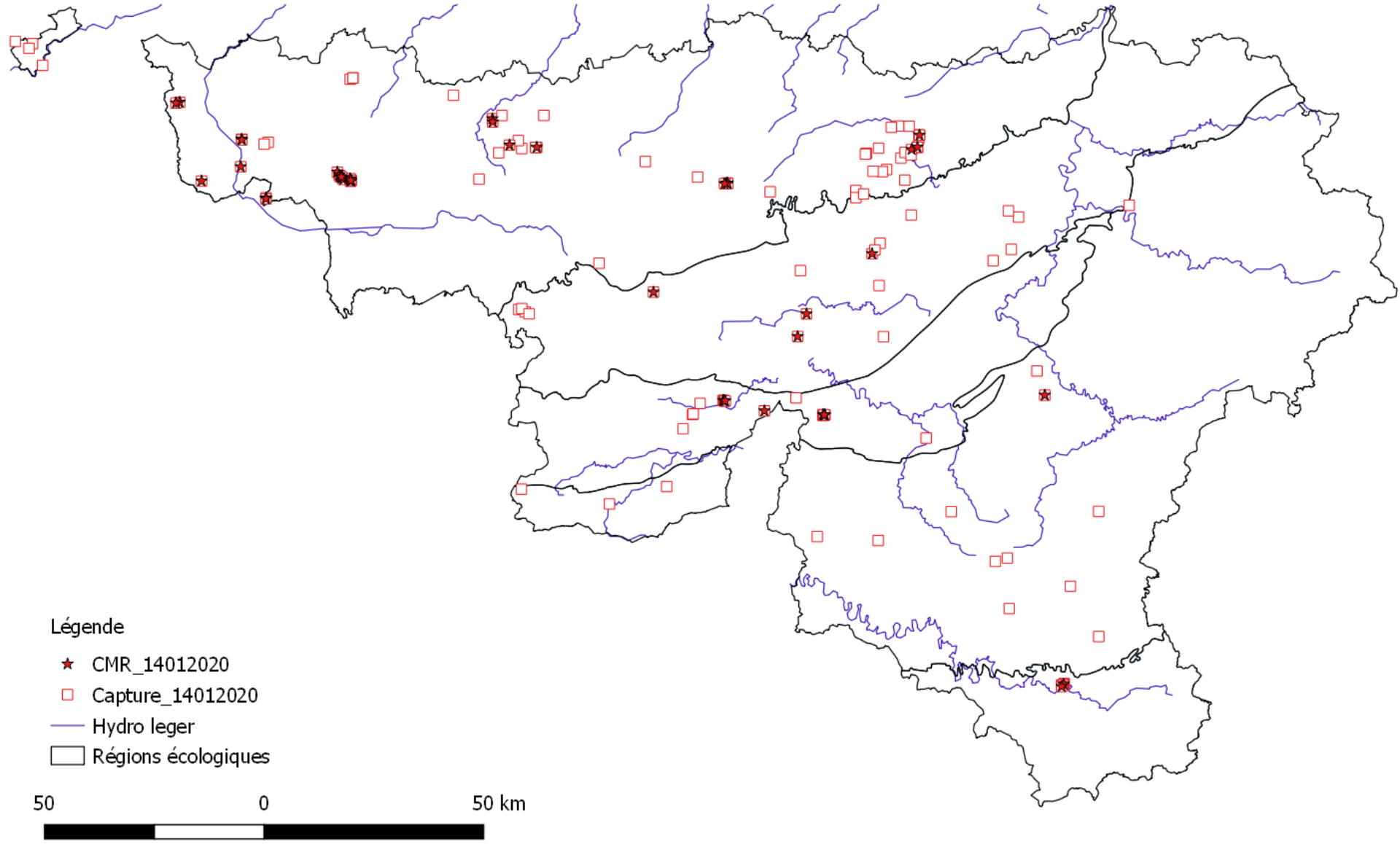
- Profitez des pose de nasses (la validation des données 2018) pour entamer la récolte d'échantillon individuel
- Par écouvillonnage buccal
- Max 20 individus /site
- En 1 à 3 passages, selon le temps disponible
- Méthode CMR pour la reconnaissance des individus (d'un passage sur l'autre ou d'une année à l'autre)

766 individus capturés

232 individus échantillonnés

43 sites concernés

Etude phylogénétique



Perspectives 2020

- **Cahier des charges pour étude phylogénétique**
  - Analyse des 232 premiers échantillons
  - Première analyse des résultats et définition d'un plan d'échantillonnage pour 2021?
- **ADNe environnemental: 3ème campagne**
  - Objectif: 337 mares
- **Validation des données 2019 pour Alytes obstetricans**
- **Finalisation des plans d'action**

natagora

La nature avec vous

Merci