

METHODOLOGIE RÉSEAU

PLAN D'ÉCHANTILLONNAGE, ANALYSES ET INTERPRÉTATION DES RESULTATS



ÉTAT : AVRIL 2024



KASERNENSTRASSE 37, CH-9100 HERISAU
TEL. +41 (0)71 366 00 50, FAX +41 (0)71 366 00 51
SANDOR VEGH STRASSE 9, A-5020 SALZBURG
TEL. +43 (0)662 823 440, FAX +43 (0)662 823 690
www.arnal.ch | www.arnal.at

Sommaire

Bureaux accrédités 2024	2
Contacts	2
1. Introduction	3
2. Chaîne de collaboration « Réseau »	4
3. Problématiques possibles	5
4. Plan d'échantillonnage	6
5. Autorisation de prélèvement	7
6. Méthode d'échantillonnage	8
7. Espèce pouvant être étudiées	12
8. Analyses de laboratoire, dépouillement statistique et élaboration des résultats	16
9. Exemple pratique	17
10. Glossaire	22
11. Coûts	23
12. Commande	24

Proposition de citation : ARNAL et al. (état : avril 2024). Méthodologie Réseau – Plan d'échantillonnage, analyses et interprétation des résultats

Bureaux accrédités 2024

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG
Info fauna karch
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer

Herisau, Salzburg
Neuchâtel
Ottenbach

Contacts

Informations générales :	Envoi des échantillons pour analyse :
ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG Kasernenstrasse 37 9100 Herisau assistenz@arnal.ch (objet : Réseau) 071 366 00 50	ecogenics GmbH / Microsynth AG Schützenstrasse 15 9436 Balgach myproject@microsynth.ch

1. Introduction

Connecter les habitats et leurs populations pour les intégrer dans un grand réseau (Figure 1) est un but essentiel de la protection de la nature (infrastructure écologique). Il n'est cependant pas facile de constater si des populations sont en contact et s'il y a des échanges d'individus, et donc de gènes, entre elles. La plupart des projets de conservation prévoient des mesures de type structurel (p. ex. habitats relais, haies, surfaces de promotion de la biodiversité). Souvent, il reste pourtant impossible de déterminer si ces mesures se traduisent par une mise en réseau fonctionnelle, car les études nécessaires sont coûteuses. La génétique de la conservation apporte une contribution importante lorsqu'on se demande si des populations sont interconnectées et font donc partie intégrante d'un réseau. Pour l'instant, il s'agit de la seule méthode que l'on peut appliquer de manière généralisée à (presque) tous les groupes d'organismes, et à des coûts raisonnables, pour déterminer l'interconnexion ou l'isolement des populations (en tenant compte de la structure du paysage).



Figure 1 : Mesures de mise en réseau dans le corridor faunistique de Suret (canton AG ; photos Martin C. Fischer).

Le but du produit Réseau est donc d'offrir aux acteurs de la protection de la nature (autorités, bureaux de planification, ONG, etc.) un guide simple qui permette de recourir à la génétique de la conservation de manière standardisée pour évaluer les interconnexions ou le morcellement des milieux, ou pour déterminer l'efficacité des mesures de mise en réseau qui ont été réalisées. Pour plus d'informations sur le projet CTI, nous vous renvoyons au site www.naturschutzgenetik.ch.

2. Chaîne de collaboration « Réseau »

La présente méthodologie décrit le déroulement des opérations, le matériel requis, la manipulation des échantillons ainsi que les différentes analyses possibles. La Figure 2 présente de manière schématique le déroulement d'une étude et les partenaires du projet actifs au sein de la chaîne de collaboration « Réseau ».

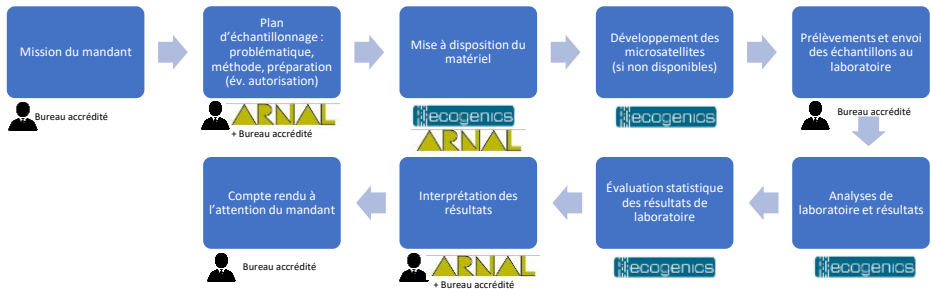


Figure 2 : Chaîne de collaboration « Réseau ».

Un fois que le bureau accrédité a accepté une mission, il faut établir un plan d'échantillonnage répondant aux besoins de la problématique (chap. 3 et 4). Le plan d'échantillonnage décrit les principes à respecter pour la sélection des populations à étudier et à échantillonner, et fixe le nombre d'individus sur lesquels il faut faire des prélèvements. Le chapitre 7 présente une liste d'espèces cibles appartenant à divers groupes d'organismes qui se prêtent bien à l'étude des réseaux, en fonction de divers types d'habitats. ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG, apporte son soutien aux bureaux accrédités pour la définition du plan d'échantillonnage.

Le développement des microsattellites, l'analyse et l'évaluation statistique des résultats de laboratoire (chap. 8) sont du ressort d'ecogenics GmbH / Microsynth AG.

L'interprétation des résultats dans l'optique du projet est effectuée par le bureau accrédité, en collaboration avec ARNAL AG (chap. 8). Il s'agit ici de mettre en relation les évaluations statistiques avec les facteurs environnementaux et géographiques prévalant sur le lieu des prélèvements. L'interprétation est illustrée à l'exemple d'un projet réel (chap. 9).

Le compte rendu ainsi que la communication avec le mandant incombent au bureau accrédité pendant l'ensemble du processus.

3. Problématiques possibles

La chaîne de collaboration Réseau permet de répondre à de nombreuses questions importantes et fréquentes qui se posent dans la cadre de la concrétisation de mesures de mise en réseau, comme :

- Les populations d'une espèce importantes pour la protection de la nature sont-elles reliées entre elles (**conservation des espèces**) ?
- Les populations d'une espèce typique d'un habitat auquel s'intéresse la protection de la nature (p. ex. sites secs, espace urbain, etc.) sont-elles reliées entre elles (**connectivité des habitats**) ?
- Des populations séparées dans l'espace sont-elles isolées ou intégrées dans un réseau (**métapopulation**) ?
- Quelles populations sont des populations sources et lesquelles sont des populations réceptrices (**importance des populations dans le réseau**) ?
- Quels éléments du paysage favorisent ou font obstacle aux échanges d'individus entre les populations (**infrastructure écologique**) ?
- La création d'éléments structurels supplémentaires est-elle souhaitable (**projets de mise en réseau**) ?
- La création de nouveaux éléments structurels ou de liaison, tels que des zones relais, conduit-elle à la mise en réseau des populations d'une espèce importante pour la protection de la nature (**contrôle des résultats**) ?

4. Plan d'échantillonnage

Un plan d'échantillonnage doit être défini pour chaque espèce faisant l'objet d'une étude dans un paysage donné. Il n'existe pas de plan d'échantillonnage standard, mais des principes généraux qui s'appliquent pour déterminer le nombre de populations qu'il convient de soumettre à des analyses génétiques et à quels endroits.

Une **population** représente l'ensemble des individus d'une espèce qui vivent dans un habitat clairement délimité dans l'espace (autrement dit, tous les individus d'une espèce en un lieu), comme les tritons crêtés d'un étang ou d'un groupe d'étangs proches les uns des autres, ou les orchis pyramidaux d'une prairie sèche.

Afin de pouvoir déterminer quelles populations d'une espèce il convient d'étudier dans un paysage, il faut connaître la répartition et la présence de cette espèce dans le territoire examiné. Il convient donc de définir les paramètres suivants :

- échelle territoriale (à définir correctement en fonction du mode de vie de l'espèce étudiée) ;
- présence de barrières ou d'éléments de liaison ;
- populations de référence ;
- distances géographiques ;
- nombre de populations à étudier.

La Figure 3 montre quelques exemples de plans d'échantillonnage. ARNAL AG apporte son soutien pour l'élaboration du plan d'échantillonnage.

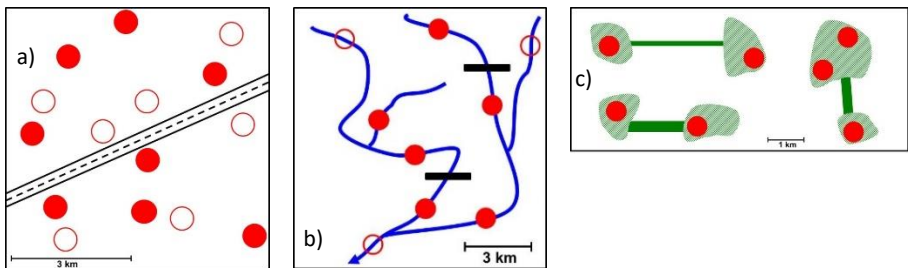


Figure 3 : Exemples de plans d'échantillonnage.

a) Plan d'échantillonnage incluant un élément morcelant le paysage.

b) Plan d'échantillonnage incluant un obstacle dans un système hydrologique.

c) Plan d'échantillonnage incluant des couloirs de mise en réseau.

(Points rouges = populations échantillonnées ; points blancs = populations non échantillonnées)

Combien d'individus par population sont échantillonnés ?

Il est important d'échantillonner le plus petit nombre possible d'individus, car les espèces visées sont souvent rares, voire menacées, et le prélèvement de matériel génétique peut porter atteinte aux animaux et même entraîner leur mort. Des simulations réalisées avec des séries de données génétiques réelles de plusieurs espèces ont montré que le nombre de microsatellites utilisés lors des analyses de laboratoire était plus déterminant que le nombre d'individus examinés par population. Avec quinze microsatellites, les résultats sont déjà stables pour une quinzaine d'échantillons individuels par population. **Il convient donc d'échantillonner environ quinze individus par population.** Si le nombre d'individus qui peuvent être échantillonnés n'est pas limité, il est préférable de porter le nombre d'individus à vingt par population. Si, en revanche, il faut échantillonner le plus petit nombre possible d'individus, une douzaine d'échantillons par population suffit tout juste.

Le nombre d'individus échantillonnés devrait être le même pour toutes les populations examinées, que celles-ci soient nombreuses ou non. Dans la mesure du possible, les individus doivent être prélevés sur l'ensemble de la surface occupée par la population examinée (Figure 4). Cela permet, notamment pour les espèces qui se reproduisent de manière végétative (p. ex. plantes à stolons), de réduire le risque d'échantillonner plusieurs fois le même individu.

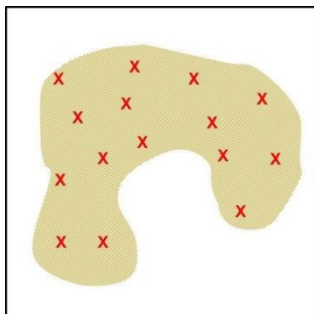


Figure 4 : Les individus échantillonnés (croix) sont prélevés sur l'ensemble de la surface (en brun) occupée par une population.

5. Autorisation de prélèvement

Avant de procéder à une campagne de prélèvements, le bureau accrédité doit se procurer les autorisations requises, soit les autorisations de prélèvement et les autorisations exigées en vertu de la législation sur la protection des animaux. Il est important de respecter l'aide à l'exécution de l'OFEV sur la capture, le marquage et le prélèvement d'échantillons sur des animaux sauvages publiée en 2018¹.

¹ Gerner T. (2018). Capture, marquage et prélèvement d'échantillons sur des animaux sauvages. Aide à l'exécution pour la surveillance des populations et le contrôle d'efficacité. Office fédéral de l'environnement, Berne. Série L'environnement pratique, UV-1829. 52 p.

6. Méthode d'échantillonnage

Les méthodes d'échantillonnage pratiquées pour les différents groupes d'organismes sont présentées ici de manière succincte. Les instructions peuvent varier d'une espèce à l'autre et doivent être vérifiées avant de se rendre sur le terrain. La définition de la méthode d'échantillonnage est centrale pour le succès de l'étude et elle constitue une importante source d'erreurs. ARNAL AG peut fournir son soutien en s'appuyant sur l'expérience acquise dans le cadre du projet CTI.

Plantes

- Prélever des feuilles fraîches, les plus jeunes possibles. Il faut au moins 100 mg par individu (poids frais), ce qui correspond environ à la taille de l'ongle du pouce (Figure 5).
- Mettre le matériel de chaque individu dans des sachets en papier différents. Conserver tous les échantillons d'une population dans un sachet hermétique étiqueté, avec du gel de silice.
- Stocker à température ambiante et à l'abri de la lumière ou au congélateur
- Selon l'espèce, il est possible d'utiliser d'autres parties de la plante d'intérêt avec ecomicrosynth GmbH / Microsynth AG (p. ex. carotte de sondage pour les arbres, s'il est trop compliqué de prélever des feuilles).

Insectes, arachnides et crustacés (arthropodes)

Grands animaux

- Selon la taille de l'animal, une patte (cuisse incluse) permet de recueillir suffisamment d'ADN, p. ex. chez les papillons diurnes et les sauterelles. Pour les animaux de plus grande taille, une partie de la patte peut suffire.
- Détacher soigneusement la patte avec des brucelles et la mettre dans une éprouvette (avec ou sans alcool ; Figure 6).

Petits animaux

- Les animaux de petite ou de très petite taille doivent être tués pour pouvoir recueillir suffisamment d'ADN.
- Mettre l'animal entier dans une éprouvette avec de l'alcool.

Larves, chenilles ou œufs

- Récolter les larves, les chenilles ou les œufs (il est parfois plus facile de trouver des individus à ce stade de développement).
- Mettre l'animal entier dans une éprouvette avec de l'alcool.

Exuvies

- Il est parfois impossible de recueillir de l'ADN des animaux vivants. On peut alors se reporter sur des exuvies fraîches, p. ex. pour les libellules (collecte non invasive).
- Mettre l'exuvie dans une éprouvette avec de l'alcool.
- Les analyses de laboratoire des échantillons recueillis selon un procédé non invasif sont plus longues et coûtent donc plus cher. Il ne faudrait donc y recourir qu'exceptionnelle-

ment (notamment pour des espèces très rares et en danger). Dans tous les cas, il est judicieux de prendre contact avec ecogenics GmbH / Microsynth AG avant de procéder à un prélèvement non invasif.

Mollusques

- Les mollusques doivent être tués, car les frottis de mucus ne contiennent pas suffisamment de matériel exploitable, y compris chez les gros mollusques.
- Mettre l'animal entier (le cas échéant avec sa coquille) dans une éprouvette suffisamment grande avec de l'alcool et congeler le plus rapidement possible. Expédier ou apporter les animaux congelés au laboratoire.

Amphibiens

- Capturer d'abord le nombre d'animaux nécessaires et les mettre dans un seau puis procéder au prélèvement des échantillons. Cette méthode permet d'éviter d'échantillonner deux fois le même individu.
- Faire un frottis de la muqueuse buccale avec un coton-tige que l'on met ensuite dans une éprouvette spéciale. Faire quelques allers-retours en frottant la muqueuse (Figure 7). Un plectre de guitare (disponible en magasin de musique) peut être utile pour ouvrir la bouche des petits animaux (p. ex. tritons).
- Réfrigérer les cotons-tiges juste après le prélèvement.
- Il est également possible de capturer des larves d'amphibiens. Celles-ci doivent être déterminées soigneusement puis tuées conformément aux dispositions sur la protection des animaux. Les échantillons sont mis dans des éprouvettes contenant de l'alcool.

Reptiles

- Faire un frottis de la muqueuse buccale avec un coton-tige que l'on met ensuite dans une éprouvette spéciale. Cette méthode, qui est la même que pour les amphibiens, est également usuelle pour les reptiles. Chez les reptiles aussi, il faut veiller à ne pas échantillonner deux fois les mêmes individus.

Poissons

- Prélever sur chaque individu trois ou quatre écailles ou un petit bout de la nageoire dorsale ou caudale, que l'on met dans une éprouvette avec de l'alcool. Entreposer à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- On peut aussi faire un frottis de la muqueuse buccale avec un coton-tige que l'on met dans une éprouvette spéciale (même procédé que pour les amphibiens).

Oiseaux

- Les oiseaux doivent être capturés et manipulés par des ornithologues expérimentés afin de limiter au maximum le stress subi par les animaux. En Suisse, seuls les vétérinaires et les personnes dûment formées peuvent prélever des échantillons sanguins.

Prise de sang

- Mélanger le sang prélevé (0,2-0,5 ml) avec 1 ml d'alcool dans une éprouvette, ou sécher 2 à 4 gouttes de sang sur un papier-filtre. Entreposer à température ambiante.

Frottis de la muqueuse buccale

- Faire un frottis de la muqueuse buccale avec un coton-tige que l'on met ensuite dans une éprouvette spéciale (même procédé que pour les amphibiens). Adapter le type de coton-tige à la taille de l'espèce.
- Les échantillons de tissus ou de sang fournissent généralement plus d'ADN que les frottis de la muqueuse buccale.

Plumes, coquilles d'œufs, excréments

- Procédé de collecte non invasif (la matière recueillie doit être la plus fraîche possible). Les analyses génétiques des échantillons recueillis de cette manière sont plus longues et plus chères. Il faut donc bien réfléchir avant de choisir cette méthode. De plus, pour les échantillons d'excréments il faut généralement déterminer l'appartenance à l'espèce par un procédé de barcoding génétique, ce qui augmente les coûts d'autant.

Mammifères

- Les mammifères doivent être capturés et manipulés par des spécialistes de la faune expérimentés afin de limiter au maximum le stress subi par les animaux. En Suisse, seuls les vétérinaires et les personnes dûment formées peuvent prélever des échantillons sanguins.

Prise de sang

- Mélanger le sang prélevé (0,5 ml) avec de l'alcool dans une éprouvette, ou sécher 2 à 4 gouttes de sang sur un papier-filtre. Entreposer à température ambiante.

Frottis de la muqueuse buccale

- Faire un frottis de la muqueuse buccale avec un coton-tige que l'on met ensuite dans une éprouvette spéciale (même procédé que pour les amphibiens). Adapter le type de coton-tige à la taille de l'espèce.

Échantillons de tissus

- Mettre l'échantillon de tissus (env. 50-100 mg ou env. 8 mm³) dans une éprouvette avec de l'alcool. Ce type d'échantillon peut être prélevé sur des animaux victimes d'accidents de la route ou tués à la chasse (Figure 8).

Poils, excréments

- Procédé de collecte non invasif (la matière recueillie doit être la plus fraîche possible). Refroidir immédiatement l'échantillon et l'expédier le jour-même au laboratoire (Figure 9). Les analyses génétiques des échantillons recueillis de cette manière sont plus longues et plus chères. Il faut donc bien réfléchir avant de choisir cette méthode. De plus, pour les échantillons d'excréments il faut généralement déterminer l'appartenance à l'espèce par un procédé de barcoding génétique, ce qui augmente les coûts d'autant.

Remise des échantillons à ecogenics GmbH / Microsynth AG

L'ensemble des échantillons sera expédié ou remis à ecogenics GmbH / Microsynth AG directement après les prélèvements ou à la fin d'une campagne de prélèvements.



Figure 5 : Échantillon de matière végétale (photo : ARNAL AG).



Figure 6 : Les pattes des arthropodes peuvent être conservées dans des éprouvettes avec ou sans alcool (photo : ARNAL AG).



Figure 7 : Frottis de la muqueuse buccale d'un sonneur à ventre jaune. La taille du coton-tige doit être adaptée à l'espèce (photo : ARNAL AG).



Figure 8 : Échantillon de tissus de mammifère, ici une oreille de lièvre variable tué à la chasse (photo : Sabine Brodbeck).



Figure 9 : Excréments de mammifères dans des éprouvettes (photo : Sabine Brodbeck).

7. Espèce pouvant être étudiées

En principe, les analyses génétiques d'un réseau peuvent être effectuées sur **toutes les espèces**. Les espèces du réseau que l'on veut étudier devraient avoir des populations n'ayant qu'un seul type d'habitat, n'être pas trop fréquentes mais pas trop rares non plus, ne pas être trop mobiles (par conséquent, les oiseaux et les mammifères s'y prêtent moins bien), être faciles à déterminer dans le terrain et couvrir différents étages altitudinaux du territoire de la Suisse. Le Tableau 1 présente une liste d'espèces répondant à ces critères, qui se prêtent donc bien à l'analyse des réseaux d'habitats.

Tableau 1 : Habitats et espèces proposées pour l'analyse génétique des réseaux d'habitats. Microsatellites (MS) : 0 = inexistant ; 1 = existant dans la littérature ; 2 = existant et testé pour la Suisse.

Habitat	Groupe	Espèce	MS
Lacs, étangs, rivages	Libellules	Petite nymphe au corps de feu (<i>Pyrhosoma nymphula</i>)	0
		Brunette hivernale (<i>Sympecma fusca</i>)	0
	Sauterelles	Criquet des clairières (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0
	Amphibiens	Crapaud commun (<i>Bufo bufo</i>)	1
	Reptiles	Couleuvre à collier (<i>Natrix natrix</i>)	1
	Plantes	Iris jaune (<i>Iris pseudacorus</i>)*	1
Laïche à utricules contractés en bec (<i>Carex rostrata</i>)*		1	
Petits cours d'eau, mares	Libellules	Orthétrum brun (<i>Orthetrum brunneum</i>)	0
	Sauterelles	Conocéphale bigarré (<i>Conocephalus fuscus</i>)	2
	Amphibiens	Crapaud calamite (<i>Bufo calamita</i>)	1
		Sonneur à ventre jaune (<i>Bombina variegata</i>)	2
Plantes	Jonc des crapauds (<i>Juncus bufonius</i>)*	0	
Rives des cours d'eau	Libellules	Caloptéryx éclatant (<i>Calopteryx splendens</i>)	1
	Sauterelles	Criquet des clairières (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0
	Amphibiens	Salamandre tachetée (<i>Salamandra salamandra</i>)	1
	Crustacés	Écrevisse à pattes blanches (<i>Austropotamobius pallipes</i>)	1
Bas-marais, marécages	Papillons diurnes	Nacré de la Sanguisorbe (<i>Brenthis ino</i>)	1
		Mélictée noirâtre (<i>Melitaea diamina</i>)	0
	Libellules	Sympétrum déprimé (<i>Sympetrum depressiusculum</i>)	0
	Sauterelles	Grillon des marais (<i>Pteronemobius heydenii</i>)	0
		Conocéphale bigarré (<i>Conocephalus fuscus</i>)	2
		Criquet des clairières (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0

Habitat	Groupe	Espèce	MS	
		Criquet ensanglanté (<i>Stethophyma grossum</i>)	2	
		Criquet palustre (<i>Chorthippus montanus</i>)	1	
	Plantes	Gentiane à feuilles d'asclépiade (<i>Gentiana asclepiadea</i>)	0	
		Pimprenelle officinale (<i>Sanguisorba officinalis</i>)*	1	
		Laîche de Davall (<i>Carex davalliana</i>)*	0	
		Succise des prés (<i>Succisa pratensis</i>)	1	
Hauts-marais	Papillons diurnes	Nacré de la Canneberge (<i>Boloria aquilonaris</i>)	1	
	Reptiles	Lézard vivipare (<i>Zootoca vivipara</i>)	1	
	Plantes	Linaigrette engainante (<i>Eriophorum vaginatum</i>)	0	
		Rosolis à feuilles rondes (<i>Drosera rotundifolia</i>)	0	
		Canneberge (<i>Vaccinium oxycoccos</i>)	1	
		Airelle des marais (<i>Vaccinium uliginosum</i>)	1	
	Prairies et pâtures secs	Papillons diurnes	Demi-Deuil (<i>Melanargia galathea</i>)	1
			Zygène de la Filipendule (<i>Zygaena filipendulae</i>)	0
Hespérie de l'Alcée (<i>Carcharodus alceae</i>)			0	
Zygène du Mélilot (<i>Zygaena viciae</i>)			0	
Sauterelles		Grillon champêtre (<i>Gryllus campestris</i>)	1	
		Criquet de la Palène (<i>Stenobothrus lineatus</i>)	0	
Abeilles sauvages		Bourdon variable (<i>Bombus humilis</i>)	1	
Reptiles		Lézard des souches (<i>Lacerta agilis</i>)	1	
Plantes		Esparcette commune (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	1	
		Petite pimprenelle (<i>Sanguisorba minor</i>)	0	
		Orchis pyramidal (<i>Anacamptis pyramidalis</i>)	0	
Gastéropodes		Bulime zébré (<i>Zebrina detrita</i>)	3	
Prairies humides alpines		Plantes	Saxifrage à feuilles rondes (<i>Saxifraga rotundifolia</i>)	0
			Dauphinelle élevée (<i>Delphinium elatum</i>)	0
	Papillons diurnes	Semi-Apollon (<i>Parnassius mnemosyne</i>)	1	
Pelouses maigres alpines	Papillons diurnes	Argus bleu-nacré (<i>Polyommatus coridon</i>)	1	
		Grand Nacré (<i>Argynnis aglaja</i>)	0	
		Moiré sylvicole (<i>Erebia aethiops</i>)	0	

Habitat	Groupe	Espèce	MS
	Abeilles sauvages	Bourdon danois (<i>Bombus soroeensis</i>)	0
	Plantes	Nigritelle noirâtre (<i>Nigritella nigra</i>)*	0
		Aster des Alpes (<i>Aster alpinus</i>)*	0
Prairies et pâturages gras extensifs	Papillons diurnes	Demi-Deuil (<i>Melanargia galathea</i>)	1
	Sauterelles	Grillon champêtre (<i>Gryllus campestris</i>)	1
	Plantes	Sauge des prés (<i>Salvia pratensis</i>)	0
		Campanule étalée (<i>Campanula patula</i>)	0
Ourlets herbeux	Papillons diurnes	Aurore (<i>Anthocharis cardamines</i>)	0
	Sauterelles	Phanérotère commun (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Reptiles	Orvet fragile (<i>Anguis fragilis</i>)	1
Haies, bosquets	Papillons diurnes	Aurore (<i>Anthocharis cardamines</i>)	0
	Sauterelles	Phanérotère commun (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Coléoptères	Lepture tachetée (<i>Leptura maculata</i>)	0
	Abeilles sauvages	Heriades truncorum (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Bourdon variable (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptiles	Orvet fragile (<i>Anguis fragilis</i>)	1
Lisières de forêt	Sauterelles	Phanérotère commun (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Coléoptères	Lepture tachetée (<i>Leptura maculata</i>)	0
	Abeilles sauvages	Heriades truncorum (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Bourdon variable (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptiles	Orvet fragile (<i>Anguis fragilis</i>)	1
		Lézard vivipare (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
	Plantes	Anthéric rameux (<i>Anthericum ramosum</i>)*	0
Hêtraies xérothermophiles	Reptiles	Lézard vivipare (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
		Lézard des souches (<i>Lacerta agilis</i>)	1
	Plantes	Céphalanthère à longues feuilles (<i>Cephalanthera longifolia</i>)	0
Pinèdes à molinie	Papillons diurnes	Moiré sylvicole (<i>Erebia aethiops</i>)	0
	Reptiles	Lézard vivipare (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
		Lézard des souches (<i>Lacerta agilis</i>)	1

Habitat	Groupe	Espèce	MS	
	Plantes	Aster amelle (<i>Aster amellus</i>)*	1	
		Laïche humble (<i>Carex humilis</i>)	0	
		Lis martagon (<i>Lilium martagon</i>)	0	
		Mélitte à feuilles de mélisse (<i>Melittis melissophyllum</i>)	2	
Vignobles, vergers	Sauterelles	Grillon champêtre (<i>Gryllus campestris</i>)	1	
	Plantes	Ail des vignes (<i>Allium vineale</i>)*	0	
		Abeilles sauvages	Heriades trunctorum (<i>Heriades trunctorum</i>)	0
			Abeille xylocope (<i>Xylocopa violacea</i>)	0
			Bourdon variable (<i>Bombus humilis</i>)	1
Espace urbain	Papillons diurnes	Hespérie de l'Alcée (<i>Carcharodus alceae</i>)	0	
		Abeilles sauvages	Osmie crochue (<i>Osmia adunca</i>)	0
	Reptiles	Heriades trunctorum (<i>Heriades trunctorum</i>)	0	
		Orvet fragile (<i>Anguis fragilis</i>)	1	
		Lézard des souches (<i>Lacerta agilis</i>)	1	
Jachères florales et de rotation	Abeilles sauvages	Osmie crochue (<i>Osmia adunca</i>)	0	
		Heriades trunctorum (<i>Heriades trunctorum</i>)	0	
	Arachnides	Epeire fasciée (<i>Argiope bruennichi</i>)	1	
Gravières	Abeilles sauvages	Osmie crochue (<i>Osmia adunca</i>)	0	
	Amphibiens	Crapaud calamite (<i>Bufo calamita</i>)	1	

* Espèces de plantes présentant une polyploïdie. Le développement de microsattellites doit être examiné au cas par cas.

8. Analyses de laboratoire, dépouillement statistique et élaboration des résultats

Des marqueurs microsatellites spécifiques sont développés en laboratoire pour les espèces sélectionnées – pour autant qu'ils n'existent pas encore. On choisit entre 12 et 16 marqueurs par espèce et l'on développe une méthode PCR qui permette d'amplifier plusieurs loci par espèce (jusqu'à 5) en une seule étape.

Les tissus échantillonnés sont analysés à l'aide des marqueurs microsatellites développés. Ecomics GmbH / Microsynth AG est responsable des analyses.

Le dépouillement statistique des données génétiques débouche sur les analyses et interprétations standard suivantes :

- groupes génétiques ;
- échanges sur plusieurs générations et isolement par la distance ;
- taux d'échange au cours des dernières générations ;
- individus migrants actuels ;
- effet barrière.

ARNAL AG est responsable du dépouillement et de l'interprétation des données.

9. Exemple pratique

Échantillonnage de sonneurs à ventre jaune, entre 11 et 14 individus sur six sites, dans le cadre du projet CTI (Figure 10).

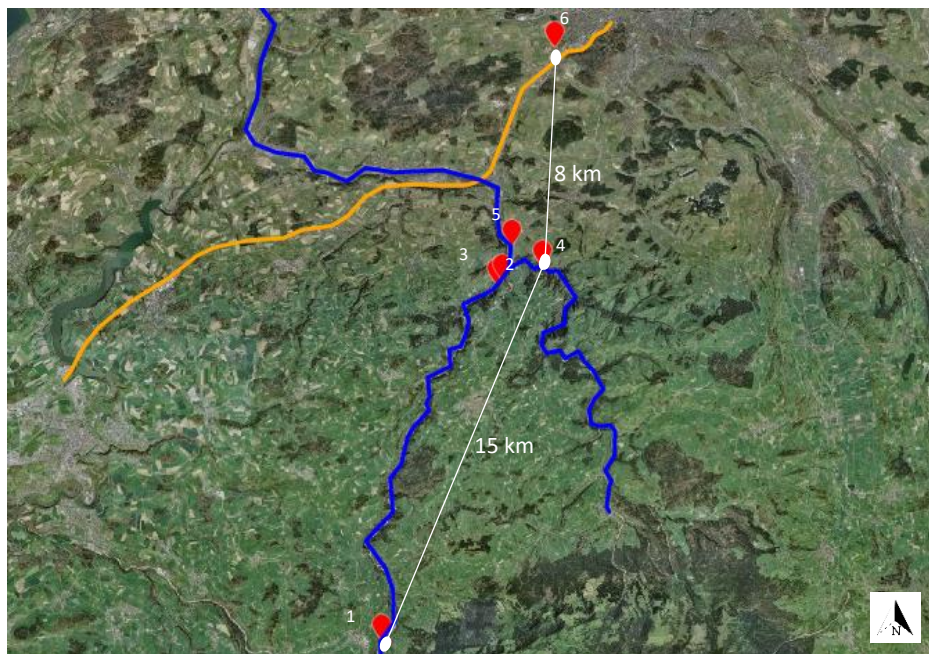


Figure 10 : Sites d'échantillonnage des populations de sonneurs à ventre jaune (rouge), cours d'eau (bleu), autoroute (orange) (source orthophotographie : map.geo.admin.ch).

Problématique : *les populations connues de sonneurs à ventre jaune de la région sont-elles reliées entre elles (connectivité des habitats) ?*

Liste de matériel

- Cotons-tiges d'échantillonnage avec conteneur spécial
- Autocollants à codes QR (pour l'étiquetage des échantillons)
- Gants jetables
- Glacière
- Seau avec couvercle revêtu d'un sac en plastique (pour la collecte des animaux)
- Filet à papillons / épuisette
- Plectres de guitare
- Solution alcoolique à 70 % ou Virkon (pour la désinfection du matériel)
- Lampe frontale

Une autorisation de prélèvement du service cantonal de protection de la nature et du paysage compétent était également nécessaire.

Procédure

- Capture du nombre d'individus nécessaires (11-14) à la main (gants indispensables) ou avec une épuisette.
- Conservation des animaux dans un seau avec couvercle garni d'un sac en plastique.
- Prélèvement de l'échantillon de salive (2 cotons-tiges par individu) ; ouvrir la bouche avec un plectre de guitare et prélever l'échantillons de salive avec le coton-tige (manipulation à effectuer à deux, si possible).
- Conservation des individus échantillonnés dans un deuxième seau, jusqu'à ce que les prélèvements soient terminés (afin d'exclure des doublons, au cas où il faudrait encore capturer quelques individus).
- Changement de plectre pour chaque individu.
- Conservation des échantillons dans la glacière ou le coffre de surgélation et expédition au laboratoire.
- Désinfection de l'ensemble des instruments et de l'équipement avec de la solution alcoolique à 70 % ou du Virkon après chaque visite de site, afin d'éviter la propagation du chytride (et d'autres agents pathogènes) par les bottes ou les outils utilisés.
- Réalisation des analyses génétiques avec 19 marqueurs microsatellites.

Les photos ci-dessous (Figure 11) illustrent l'utilisation des principaux instruments de prélèvement.



Figure 11 : Ouverture de la bouche à l'aide d'un plectre de guitare et prélèvement d'un échantillon de salive avec un coton-tige (photo : ARNAL AG, 2017).

Résultats

Groupes génétiques

Les populations examinées (Figure 12) appartiennent à trois groupes génétiques différents et peuvent être réparties en deux unités génétiques (appartenance génétique). La population 6, qui est implantée au nord, est caractérisée par une « part bleue » prédominante. Les cinq autres populations (1-5) présentent des compositions génétiques semblables, qui les distinguent nettement de la population 6.

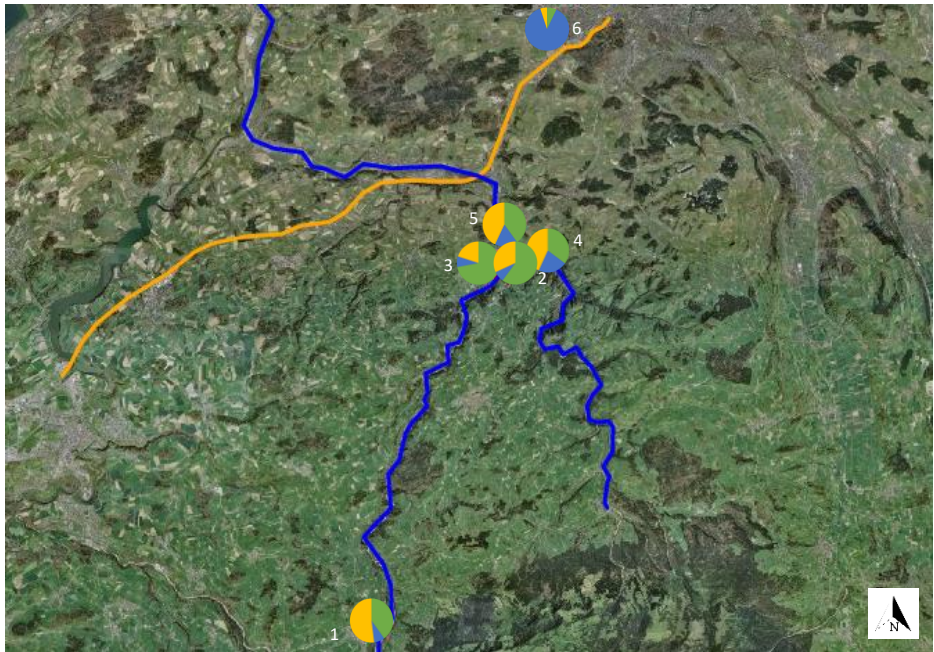


Figure 12 : Groupes génétiques des populations de sonneurs à ventre jaune examinées. Les couleurs des camemberts indiquent la composition génétique d'une population (STRUCTURE, $k=3$). Cours d'eau (bleu), autoroute (orange) (source orthophotographie : map.geo.admin.ch).

Isolement par la distance et échanges sur plusieurs générations

Un simple test de Mantel ($r=0,36$, $p=0,41$) montre qu'il n'y a pas d'isolement dû à la distance (Figure 13). Cela veut dire que la seule distance géographique qui sépare les populations n'explique pas leurs similitudes ou leur diversité, qui dépendent donc d'autres facteurs paysagers.

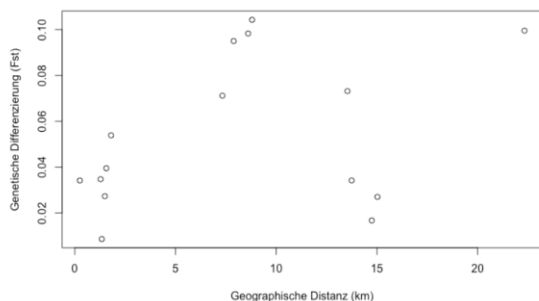


Figure 13 : Indice de différenciation génétique (Fst) en fonction de la distance géographique (km).

Tableau 2 : Comparaison des valeurs Fst (différenciation génétique).

Population	6	5	4	3	2	1
6						
5	0,071***					
4	0,095***	0,009 ^{ns}				
3	0,104***	0,027*	0,054**			
2	0,098***	0,034*	0,039**	0,034**		
1	0,099***	0,027*	0,016 ^{ns}	0,073***	0,034*	

ns : non significatif ; * : signification statistique, $p \leq 0,05$; ** : signification statistique moyenne, $p \leq 0,01$; *** : signification statistique forte, $p \leq 0,001$.

On constate une assez forte différenciation génétique entre la population 6 et toutes les autres populations (Tableau 2). Celle-ci n'est pas due à un isolement qui s'expliquerait par la distance géographique (Figure 13). La différenciation génétique est faible entre presque toutes les autres populations, y compris pour la population 1 qui est très éloignée (Figure 12).

Migration des dernières générations

Le taux de migration élevé de la population 1 vers toutes les autres populations est remarquable (Tableau 3) et signifie peut-être qu'il s'agit de la population d'origine des autres populations. Les autres populations sont toutes caractérisées par un taux de migration relativement faible.

Tableau 3 : Taux de migration des dernières générations. Les populations sources sont indiquées dans la colonne de gauche et les populations réceptrices, dans la ligne de titre.

Pop. sources / réceptrices	6	5	4	3	2	1
6		0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
5	0,02		0,02	0,02	0,02	0,02
4	0,02	0,03		0,02	0,02	0,02
3	0,02	0,02	0,02		0,02	0,02
2	0,02	0,02	0,02	0,02		0,02
1	0,14	0,23	0,25	0,25	0,24	

Individus migrants actuels

On n'a détecté aucun individu migrant d'une population à l'autre dans la génération actuelle. C'est un résultat courant, car il est difficile d'identifier génétiquement un individu migrant avec un aussi petit nombre de prélèvement (comme c'est le cas ici).

Effet barrière

Pour tester statistiquement un effet barrière, il faut concevoir le plan d'échantillonnage en conséquence. Dans cette étude, l'effet barrière de l'autoroute qui s'étire au sud de la population 6 n'était pas la question centrale. Si l'on prévoit un modèle statistique, l'autoroute constitue une barrière aux échanges entre les populations (Tableau 4). En raison du plan d'échantillonnage, il y a toutefois une très forte corrélation entre les variables « séparation par l'autoroute » et « implantation le long du cours d'eau », de sorte qu'il n'est pas possible de déterminer si l'effet de barrière est dû à la séparation par l'autoroute ou à l'absence de connexion par le cours d'eau. Pour pouvoir examiner l'effet barrière de l'autoroute, il aurait fallu échantillonner plusieurs populations de part et d'autre de l'autoroute.

La distance géographique (Tableau 4) est sans effet, exactement comme dans le test de la distance utilisé pour mesurer l'isolement des populations (Figure 13).

Tableau 4 : Évaluation statistique de l'effet barrière (valeurs B).

Distance géographique	>0,001 ^{ns}
Barrière (autoroute)	0,056 ^{**}

ns : non significatif ; * : signification statistique, $p \leq 0,05$; ** : signification statistique moyenne, $p \leq 0,01$; *** : signification statistique forte, $p \leq 0,001$.

Conclusions

Les populations 1, 2, 3, 4 et 5 ont une structure génétique analogue, leur différenciation génétique est faible et elles ont connu des échanges génétiques au cours des dernières générations ; la population 1 est celle dont le plus grand nombre d'individus ont migré vers d'autres populations. La population 1 revêt donc une importance capitale et cette migration s'est vraisemblablement produite en suivant le cours de la rivière.

La population 6, la plus au nord, a globalement peu d'échanges génétiques avec les autres populations, alors qu'elle est plus proche des populations 2, 3, 4 et 5 que la population 1. Les échanges génétiques ne dépendent donc pas tant de la distance géographique entre les populations que des structures et des obstacles qui les séparent les unes des autres. La population 6 appartient à un autre groupe génétique que les autres populations et la différenciation génétique est considérable. L'autoroute pourrait être une barrière aux échanges entre la population 6 et les autres populations. Pour une analyse plus approfondie de cet effet barrière, d'autres prélèvements sur plusieurs populations situées de part et d'autre de cette infrastructure seraient nécessaires.

10. Glossaire

Individus migrants actuels	Individus de la génération actuelle qui ont migré d'une population vers une autre.
Échanges au cours des dernières générations	Taux de migration parmi les individus des dernières générations (≤ 5), qui indique le pourcentage d'une population qui a migré vers une autre. Cela permet aussi de détecter les populations sources et réceptrices.
Échanges sur plusieurs générations	Détermination de la diversité génétique entre deux populations sur de nombreuses générations (résumé et dans les deux directions). Les valeurs F_{st} ne doivent pas être interprétées comme des taux d'échange entre les populations. Une valeur F_{st} montre si deux populations ont des divergences génétiques (dues p. ex. à la construction d'une autoroute entre les deux populations il y a une vingtaine d'années). Pour une petite population, des différences apparaîtront après peu de temps, mais pour une grande population cela dure plus longtemps.
Visite	Visite sur le terrain dans le but de prélever des échantillons de laboratoire.
Unité génétique	Ensemble de populations qui présentent des groupes génétiques identiques ou semblables. Plus les groupes génétiques de populations différentes sont semblables, plus ils peuvent être attribués à une unité génétique et plus la probabilité que les populations soient interconnectées est grande.
Groupe génétique	Groupe de population déterminé par la seule composition génétique de ses individus, sans tenir compte de leur provenance (coordonnées géographiques). Le nombre de groupes génétiques est défini par les seules données génétiques et n'est (généralement) pas fixé à l'avance. Les résultats se présentent sous la forme de camemberts indiquant la part de chacun des groupes génétiques déterminés dans une population.
Isolement par la distance	Lorsque le dépouillement génétique de toutes les populations étudiées dans un territoire examiné met en évidence un isolement par la distance, la distance géographique doit être prise en compte dans l'interprétation des liens de parenté. Si aucun isolement par la distance n'est mis en évidence, ce sont d'autres paramètres du paysage qui sont à l'origine des différences génétiques.
Échantillon de laboratoire	Échantillon d'ADN dans une éprouvette pourvue d'un code QR.
Microsatellite	Courte séquence d'ADN formée par une répétition continue de nucléotides. Grâce à la combinaison de plusieurs microsatellites, chaque individu a une empreinte génétique unique.

11. Coûts

Coût de la conception du plan d'échantillonnage (ARNAL AG)

Suivant la complexité du cas, la conception du plan d'échantillonnage demande entre une demi-journée et une journée de travail (CHF 600–CHF 1200).

Coût des analyses de laboratoire avec des microsatellites existants (ecogenics GmbH / Microsynth AG)

Plusieurs exemples de prix sont donnés dans le Tableau 5. Ils se réfèrent à des analyses de tissus, de matériel sanguin, de frottis de la muqueuse buccale ou de matériel végétal. Si les analyses de laboratoire doivent être effectuées avec des échantillons plus complexes (excréments ou autres prélèvements non invasifs), les coûts sont plus élevés. Les exemples de prix portent sur l'analyse de 13 à 16 microsatellites. Si le nombre de microsatellites est plus élevé, les coûts augmentent en conséquence. D'une manière générale, les coûts des analyses par individu diminuent à mesure que le nombre d'individus augmente. En tout état de cause, les valeurs fournies dans le Tableau 5 sont purement indicatives et les prix peuvent varier d'un projet à l'autre. Les prix incluent l'évaluation statistique standard des données.

Tableau 5 : Exemples de coûts des analyses de laboratoire avec marqueurs microsatellites existants, y compris évaluation statistique standard (source : ecogenics GmbH / Microsynth AG).

Nombre de populations	Nombre d'individus par population	Nombre total d'individus	Nombre de microsatellites	Coûts y c. analyse des données [hors TVA]	Prix par échantillon [hors TVA]
6	15	90	13-16	6500.00	72.22
6	20	120	13-16	7850.00	65.42
6	25	150	13-16	9100.00	60.67
10	15	150	13-16	9100.00	60.67
10	20	200	13-16	11 500.00	57.50
10	25	250	13-16	13 500.00	54.00

Prix indicatifs hors TVA.

Coûts de laboratoire pour le développement de microsatellites manquants (ecogenics GmbH / Microsynth AG)

S'il n'existe pas encore de microsatellites pour une espèce examinée, ou s'il n'existe aucune publication à ce sujet, il faut prévoir des coûts supplémentaires de l'ordre de CHF 12 000 (hors TVA) pour le développement des microsatellites. Ce prix inclut l'identification des microsatellites, un filtrage (*screening*) pour identifier les microsatellites présentant une diversité génétique suffisante et l'établissement de la méthode de laboratoire correspondante (*multiplex PCR*), l'objectif étant de connaître entre 13 et 16 microsatellites par espèce (ce chiffre pouvant différer en fonction de la variabilité des microsatellites de chaque espèce).

Coût de l'interprétation des données (ARNAL AG)

ARNAL AG, est responsable du dépouillement et de l'interprétation des données (environ deux jours de travail par analyse, soit CHF 2400). Ce travail est effectué en collaboration avec le bureau accrédité. ARNAL AG offre également ses services pour l'interprétation de résultats spécifiques dans le cadre d'un réseau d'habitats (coût : CHF 150/h) et peut, en cas de nécessité, transmettre la demande à des généticiens spécialisés d'un institut de recherche partenaire.

12. Commande

Veillez adresser les demandes d'analyse en décrivant la problématique à ARNAL AG, qui se chargera d'établir le plan d'échantillonnage.

Les quantités de matériel d'usage nécessaires seront calculées en fonction du plan d'échantillonnage et mises à disposition par ecogenics GmbH / Microsynth AG et ARNAL AG..

Renseignements :

Courriel : assistenz@arnal.ch (Objet : Réseau)

071 366 00 50

ARNAL AG, Kasernenstrasse 37, 9100 Herisau