



Protocole d'échantillonnage simple permettant d'évaluer la présence et l'importance des *Myrmica* au sein des communautés de fourmis

B. KAUFMANN*, J.-L. MERCIER°, R. ITRAC-BRUNEAU# et G. CHMARGOUNOF*

* UMR CNRS 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1, bernard.kaufmann@univ-lyon1.fr

° UMR CNRS 7261 IRBI Université François Rabelais Tours, jean-luc.mercier@univ-tours.fr

OPIE, BP 30, 78041 Guyancourt Cedex, raphaelle.itrac-bruneau@insectes.org

Financement Conseil Général de l'Isère (Pôle Biodiversité) pour BK et GC.

Objectifs du protocole

Chez les fourmis d'Europe, le genre *Myrmica* revêt une importance particulière car il est, avec une plante, l'un des hôtes obligatoires des papillons du genre *Maculinea*. En leur absence, il apparaît impossible pour ces papillons d'assurer la totalité de leur cycle de vie ; en cas de trop faible densité de *Myrmica*, la survie à long terme des populations de *Maculinea* est incertaine. Ces derniers sont donc fortement dépendants de la présence et de la densité des fourmis-hôtes sur la station considérée. Menacés par l'abandon du pastoralisme, la gestion inadaptée des stations et la fragmentation de leurs habitats, ces papillons figurent parmi les espèces les plus sensibles de notre faune. Protégés sur l'ensemble du territoire national, les *Maculinea* bénéficient d'un Plan national d'actions (PNA), dont le but est d'améliorer les connaissances sur leur biologie, leur répartition et leur écologie, ainsi que de consolider leur état de conservation ou même de favoriser d'éventuelles réintroductions.

Ce protocole d'échantillonnage commun et normalisé vise à permettre à des non spécialistes d'établir 1) la présence de fourmis du genre *Myrmica*, 2) leur répartition spatiale à l'échelle d'une parcelle et 3) la diversité de la communauté de fourmis à laquelle les *Myrmica* sont confrontées. Ces trois éléments sont nécessaires à une meilleure appréhension de l'état de conservation des populations de *Maculinea* et des possibilités de ré-introduction ou de renforcement des populations.

Ce protocole ne permet pas 1) d'estimer des abondances ou des densités ponctuelles et 2) un échantillonnage exhaustif de toutes les espèces de fourmis. Il est biaisé en faveur des *Myrmica* (probabilité de détection ponctuelle à 70% contre <50% pour les autres espèces).

Le protocole est utilisable dans tous les milieux ouverts et pour toutes les espèces de *Myrmica* liées aux *Maculinea*.

Organisation des échantillonnages

Le protocole proposé est basé sur un échantillonnage par appâts (Fig. 1) placés tous les 4m en transect ou en grille (ou combinaison des deux), pouvant être intégral sur de petites parcelles (40m x 40m) ou représentatif sur de plus grandes parcelles. Des parcelles dépassant les 10 ha ou présentant une certaine hétérogénéité peuvent faire l'objet de plusieurs répétitions du protocole. Chaque échantillonnage doit comprendre au moins 70 appâts pour apporter une information de qualité ; un nombre optimal de 100 appâts est préconisé si l'on veut avoir une vision réaliste de la communauté de fourmis présente, avec un effort d'échantillonnage le plus limité possible.

En termes de quantité et d'organisation spatiale, leur positionnement doit être adapté au terrain et à la question posée :

- si l'objectif est uniquement de tester la viabilité d'un site pour des *Maculinea*, il faut concentrer l'échantillonnage autour des plantes hôtes uniquement. Les transects composant l'échantillonnage devront alors parcourir un maximum de patches de plantes hôtes. Si les plantes hôtes sont réparties de façon diffuse sur une grande surface, le mieux est alors d'échantillonner la zone entière soit en lignes parallèles soit en croix. Des exemples d'échantillonnages réalisés sont joints à ce protocole (Fig. 3 à 6). Il est recommandé de planifier les transects sur photographie aérienne et en fonction des habitats avant d'aller sur le terrain.
- si l'objectif est d'évaluer sur la totalité d'un site, l'importance des *Myrmica* au sein des communautés de fourmis, alors l'échantillonnage sera réalisé sur une surface la plus représentative possible du milieu.

Dates et horaires favorables au protocole

Pour maximiser les chances de capturer des *Myrmica* tout en ayant une vision aussi réaliste que possible de la communauté, il faut bien choisir les dates et horaires d'échantillonnage. L'activité annuelle des fourmis est en général maximale entre le 15/04 et le 15/07. Les *Myrmica* sont des espèces préférant des températures d'activité relativement basses. Il faut donc éviter à tout prix les heures les plus chaudes de la journée, tout en évitant la tombée de la nuit, certaines autres espèces importantes interrompant totalement leur activité en l'absence de lumière suffisamment verticale.

Le créneau horaire optimal de récolte est donc le matin, mais varie légèrement en fonction de la température journalière. En début de saison (avril) il vaut mieux effectuer le premier passage lorsque la température dépasse 15°C, soit entre 9h et 10h et le deuxième entre 10h et 11h. En milieu de saison (mai-juin), le plus efficace est d'effectuer le premier passage entre 8h et 9h et le second entre 9h et 10h. En fin de saison (juin-juillet), lorsque les températures maximales journalières dépassent les 30°C, les meilleures heures de récolte sont les plus fraîches, de 7h à 10h. En règle générale, une température comprise entre 17° et 22°C mesurée au sol et à l'ombre au moment de la pose des appâts semble idéale pour l'ensemble des espèces et du territoire français.

Prélèvement, préparation et conservation des échantillons

Les échantillons seront prélevés à l'aide d'un aspirateur à bouche et transférés dans un tube de récolte (Fig 2). Ces tubes de terrain ou piluliers doivent avoir un diamètre compatible avec celui de l'aspirateur utilisé, de manière à accélérer le transfert de l'aspirateur au tube. L'aspirateur comme le tube devront être petits, diamètre entre 2 et 4cm, volume 10-20ml. Des tubes polypropylène translucides sont les plus pratiques. Les fourmis récoltées sont transférées dans le tube de terrain auquel on a ajouté au préalable de l'alcool à 70°.

Chaque tube est numéroté par une étiquette placée à l'intérieur. Les étiquettes des tubes peuvent indiquer la date de l'échantillonnage, le site et le numéro du tube. Elles doivent résister à l'alcool, il faut donc utiliser l'impression laser ou le crayon mine graphite. Une version simplifiée donne le numéro de placement « logique » sur le transect, avec le nom du site si plusieurs sites sont échantillonnés. En général, nous posons autour de 100 appâts, les tubes sont numérotés de 101 à 200 (ou si nécessaire de 1001 à 1100) pour le premier passage, et de 201 à 300 pour le second (et 2001-2100 si nécessaire). Par exemple, le tube 1023 correspond à l'appât 23, premier passage et le tube 2023 au deuxième passage.

De retour de terrain, les échantillons récoltés sont transférés dans des tubes à centrifuger de 1,5mL (type Eppendorf). Ceux-ci seront complètement remplis d'alcool à 96°, qui permet d'assurer la meilleure conservation possible, même à long terme. La même numérotation doit être utilisée sur les étiquettes des tubes de récolte et celles des tubes à centrifuger. Attention, l'étiquette doit être mise au fond du tube pour ne pas qu'elle reste coincée au niveau du bouchon et afin d'éviter toute évaporation de l'alcool. Les tubes sont ensuite conservés de préférence au congélateur, dans des boîtes en carton compartimentées. L'alcool mis dans les piluliers peut être réutilisé après avoir été débarrassé par filtrage sur papier filtre des poussières aspirées pendant les relevés.

Dans le cas d'une identification chimique des espèces de *Myrmica* présentes, il est nécessaire de prélever en plus une dizaine d'ouvrières vivantes dans un troisième tube (on peut les isoler directement à partir du prélèvement effectué à l'aide de l'aspirateur, avant de rajouter de l'alcool). Ces fourmis seront placées directement au congélateur et tuées par le froid une fois de retour de terrain. Elles pourront ensuite être envoyées à sec pour identification.

Identification des fourmis

L'identification des fourmis au niveau du genre est assez aisée et l'ouvrage « Fourmis de France », de R. BLATRIX, C. GALKOWSKI et C. LEBAS, 2013, Editions Delachaux et Niestlé, est parfait pour cette tâche. Après quelques échantillonnages et un peu d'identification en laboratoire, il devient relativement facile de distinguer les genres directement sur le terrain. Une loupe binoculaire (x40 au moins) est nécessaire une fois les fourmis dans l'alcool. L'identification à l'espèce est délicate pour la plupart des genres. Pour les *Myrmica*, le plus sage est de contacter l'association AntArea (en particulier C. GALKOWSKI) afin d'obtenir une clé plus précise et de l'aide pour l'identification (sur envoi d'échantillons). Il est aussi possible d'identifier les *Myrmica* en utilisant des méthodes moléculaires (ADN) ou chimiques (hydrocarbures cuticulaires), qui accélèrent considérablement la procédure, mais en augmentant le coût et le degré de technicité. Il ne faut pas hésiter à contacter les auteurs du protocole pour davantage de précisions sur le sujet.

L'analyse des données issues du protocole peut se limiter dans un premier temps à une liste d'espèces ou à leur répartition spatiale. D'autres analyses possibles feront l'objet d'une seconde fiche de protocole.



Figure 1 : ouvrières de *Myrmica sabuleti* sur un appât (photo B. KAUFMANN)

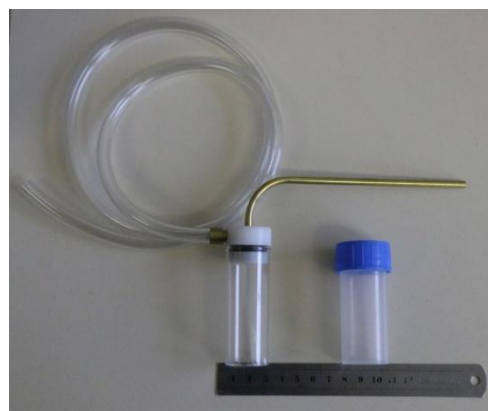


Figure 2 : aspirateur à bouche et tube de récolte (photo B. KAUFMANN)

Procédure

1. Préparation des transects

Les lignes sont réalisées à l'aide de décamètres (50 ou 60m) fixés par des piquets. Nous utilisons donc 8 décamètres pour disposer de 400m au moins de longueur de transect. Du fil de cordeau de maçon ou du topofil étalonné tous les mètres à l'aide des décamètres préalablement mis en place peuvent être utilisés si la longueur de transect est très importante.

2. Préparation des appâts et des tubes

Les appâts sont préparés sur des plateaux à l'abri du vent.

Une goutte de miel de 1 cm de diamètre au maximum est déposée au centre d'un carré bristol de 3x3 cm. A côté du miel est placée de la rilette de saumon bien tassée, sur environ 0,5cm. Les tubes prévus pour récupérer les fourmis sont remplis avec environ 1 cm d'alcool à 70° et sont numérotés (étiquette à l'intérieur du tube ou scotchée à l'extérieur du tube). Prévoir 2 tubes pour chaque appât. Si une identification chimique est envisagée, prévoir aussi sur soi des tubes de récolte vides pour prélever (au maximum) une dizaine de *Myrmica* sur les pièges où elles sont nombreuses, et penser à les étiqueter sur le terrain.

3. Pose des appâts (Fig. 1)

Les appâts sont placés à 4 mètres les uns des autres. Ils sont déposés au sol ; il faut que les appâts soient bien à plat, avec un maximum de leur surface en contact avec le sol. En cas de végétation très dense, il est parfois nécessaire de dégager celle-ci juste sous l'appât.

A côté (50cm) de chaque appât, près de la ligne de mesure, on dépose les deux tubes, pour recueillir les fourmis lors des relevés. L'heure de dépôt du premier appât doit être notée.

4. 1^{er} relevé

Le premier relevé se fait 30 min après la pose du premier appât.

A l'aide de l'aspirateur à bouche, aspirer les fourmis présentes sur l'appât (inutile d'en prendre plus de 20 d'une même forme et d'une même couleur), sous l'appât, ainsi que les fourmis de forme et de couleur différentes dans un rayon de 10cm autour de l'appât sont récoltées. Les fourmis sont placées dans le tube destiné à accueillir les fourmis du 1^{er} relevé. L'appât est replacé avant de passer à l'appât suivant. Si une identification chimique est prévue, penser à prélever une dizaine de *Myrmica* dans les tubes prévus à cet effet.

5. 2nd relevé

Le second relevé commence 1h après le début du premier relevé. Il se passe dans les mêmes conditions que le relevé précédent. Les fourmis prélevées seront placées dans le second tube à côté de l'appât. Il faut récupérer tous les tubes encore présents près de l'appât.

Matériel :

- | | |
|---|---|
| - Appât : rillettes de saumon + miel | - Aspirateur à bouche |
| - Carré bristol 3x3 cm | - Décamètres 50 ou 60m (ceux de 100m sont TRÈS fragiles). |
| - Ethanol à 70° | - Piquets |
| - Tubes (piluliers) préparés à l'avance | - Thermomètre |
| - Plateaux/boîtes pour organiser les appâts | |

Remarque : toute personne ayant fait la manipulation au moins une fois est capable de s'occuper de 24 à 36 appâts dans les temps impartis (pose et prélèvements). Il est donc conseillé de faire un premier essai avec 12 appâts par personne.

Exemples d'échantillonnages complexes en Isle Crémieu (Isère) sur orthophotographies IGN



Figure 3 : photo aérienne du site de Moirieu et localisation des nids de *Myrmica sabuleti*



Figure 4 : photo aérienne du site de l'étang de Ry et localisation des nids de *Myrmica sabuleti*

Ce protocole a fait l'objet d'une validation par les membres du 2nd Comité de pilotage national du PNA *Maculinea*.



Figure 5 : photo aérienne du site de St Julien et localisation des nids de *Myrmica sabuleti*

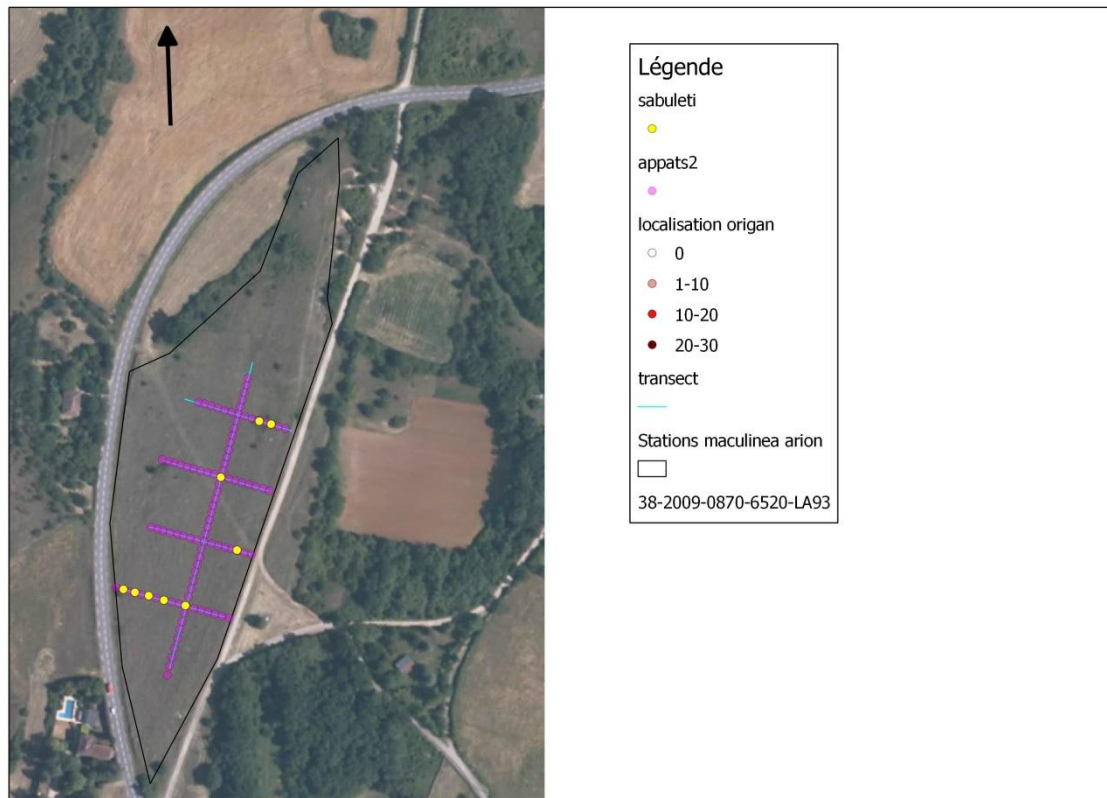


Figure 6 : photo aérienne du site de Leyrieu et localisation des nids de *Myrmica sabuleti*