Analyse moléculaire de la diversité des vers de terre arboricoles endémiques de Martinique

Carla-Marie Brunet

Master 2 – Ecologie et Evolution 2020-2021

Université Toulouse 3 Paul Sabatier

Stage de recherche co-encadré par Lise Dupont (MCF UPEC) et Mathieu Coulis (Chercheur CIRAD, Martinique).

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de mon stage et à la rédaction de ce mémoire.

En premier lieu, je souhaite remercier très sincèrement mes maîtres de stage **Lise Dupont**, maître de conférences à l'UPEC de Créteil, et **Mathieu Coulis**, chercheur au CIRAD de Martinique, pour m'avoir accompagnée tout le long de ce stage. Merci à Mathieu pour m'avoir fait découvrir le terrain en Martinique, ainsi que pour m'avoir fait profiter de tes qualités de naturaliste, et également pour m'avoir accompagnée sur les terrains lorsque tu étais disponible. Merci pour avoir tout mis en œuvre pour que mon séjour en Martinique se déroule dans les meilleures conditions.

Merci à Lise pour avoir su m'accompagner à distance pendant les 2 premiers mois de mon stage et pour avoir su rester présente et investie malgré les 6 heures de décalage horaire. Merci également pour m'avoir formée aux techniques de laboratoire et surtout merci pour tous les conseils que tu as pu me donner, que ce soient des méthodes de réflexions ou de rédaction, ils me seront très précieux pour la suite de mon projet professionnel.
Un grand merci à tous les deux pour le temps que vous avez su m'accorder. Je ressors de ce stage très enrichie grâce à vous.

Je tiens particulièrement à remercier **Quentin Gabriac**, VSC au CIRAD qui a réussi à me supporter lors tous ces terrains réalisés ensemble, je le remercie également pour m'avoir fait découvrir l'identification morphologique des vers de terre, et également pour m'avoir très bien intégrée dès mon arrivée sur l'île.

Un grand merci à **Alexis Delaplace**, thésard du CIRAD pour le temps qu'il a consacré à m'aider avec la programmation R, ainsi que pour son aide et son expertise en cartographie.

Je remercie également **Nelly**, technicienne du CIRAD pour m'avoir aidée en générant les données de biomasse qui m'a fait gagner un temps précieux.

Je remercie également tous les autres membres du CIRAD qui ont pris de leur temps pour m'aider sur le terrain : **Alexis, Meryem, Benjamin** (merci également pour toutes les identifications de Broméliacées que tu as réalisées), **Hugo, Christiane** technicienne du CIRAD, **Lucas** (je te remercie aussi pour tes nombreux conseils en rédaction) et **Maeva** (merci également pour m'avoir aidée sur R et m'avoir soutenue moralement tout au long de mes campagnes d'échantillonnage).

Enfin je tiens à remercier le laboratoire du CIRAD ainsi que l'UPEC de Créteil pour avoir pu faire partie du projet FEDER REBIOS et pour m'avoir accueillie pendant mes cinq mois de stage.

Résumé

La Martinique est une zone insulaire possédant deux vastes zones naturelles protégées qui peuvent être considérées comme des réservoirs de biodiversité : la Montagne Pelée et les Pitons du carbet. Le premier objectif de ce stage était de combler le manque de connaissances taxonomiques chez les espèces de vers de terre tropicaux en estimant la diversité spécifique présente en Martinique. Cette analyse a été réalisée en utilisant une méthode de code barre ADN (ou barcoding ADN) en se focalisant sur les espèces de vers qui ne vivent pas au sol mais qui occupent des micro-habitats à des hauteurs plus élevées de la canopée ; elles sont qualifiées d'espèces « arboricoles ». Une étude de l'effet de la pression anthropique sur la diversité des espèces arboricoles dans les zones perturbées par l'activité humaine a ensuite été réalisée. Un résultat majeur de cette analyse est la présence en forte abondance de *Dichogaster andina*, espèce supposée invasive, dans les micro-habitats récoltés au niveau du sol et jusqu'à 6,8 mètres de hauteur dans la canopée. Ce succès de colonisation peut être expliqué par un mode de reproduction parthénogénétique tel que c'est le cas pour d'autres espèces invasives de vers de terre comme *Pontoscolex corethrurus*. Trois espèces putatives ont été identifiées et sont probablement endémiques de l'île, mais leur présence est rare dans la zone échantillonnée. Ces espèces sont présentes uniquement dans des zones préservées à fort couvert forestier et ne sont pas observées dans la matrice agricole où, au contraire, *D. andina* est très abondante. Ces résultats suggèrent un remplacement des espèces natives par *D. andina* . L'absence de ces espèces putatives « arboricoles » en zones anthropisées permet de penser que leur capacité à disperser entre les deux réservoirs de biodiversité est compromise dans les zones à fortes pressions anthropiques.

Mots-clefs : Vers de terre – Arboricole – Diversité – Barcode – Espèces invasives

Abstract

The island of Martinique in the Lesser Antilles has two vast protected natural areas in which can be found a huge pool of biodiversity: La "montagne Pelée" and "les Pitons du Carbet". The first objective of this internship was to fill the lack of taxonomic knowledge in tropical earthworm taxonomy with an assess of the Martinique species diversity. This analysis was carried out using a method of DNA barcoding, focusing on species of worms that do not live-in soil, but which occupy micro-habitats at higher levels in the canopy; they are called "arboricolous" species. A study of the effect of anthropogenic pressures on the diversity of arboricolous species in areas disturbed by human activity was carried out. A major result of this analysis is the presence in high abundance of *Dichogaster andina*, probably an invasive species. This species have been found in micro-habitats collected at ground level and up to 6.8 meters high in the canopy. This colonization success can be explained by a parthenogenetic mode of reproduction, it has been already reported for others invasive earthworm species such as *Pontoscolex corethrurus*. Three putative species have been identified and are probably endemic of the island, but their presence is rare in the sampled area. These species are present only in preserved zones with high forest cover and are not observed where agriculture activities are important, the opposite situation was observed with *D. andina*. These results suggest a replacement of the three native species by *D. andina*. The absence of these putative "arboricolous" species in perturbed areas suggests that their ability to disperse between the two reservoirs of biodiversity is compromised in areas with strong anthropogenic pressure.

Keywords: Earthworms - Arboricolous - Diversity - Barcode - Invasive species

CONTRIBUTION PERSONNELLE

Sujet de stage :

Le projet de stage avait été défini au préalable par mes deux encadrants de stage. Les hypothèses ont été formulées avec mes encadrants au fur et à mesure de l'avancée du stage.

Jeu de données :

Données génétiques :

Afin de caractériser la diversité globale des vers de terre présents en Martinique, j'ai récupéré des individus provenant d'une ancienne session d'échantillonnage qui avait été réalisée par M. Coulis et M. Luce en 2020 (respectivement mon encadrant de stage et son ancien stagiaire). J'ai réalisé l'extraction et l'amplification d'ADN sur les vers de terre récoltés par M. Coulis et M. Luce, ainsi que sur les vers que j'ai personnellement récoltés pendant mon stage. Le séquençage a été réalisé par un laboratoire Allemand « Eurofins Genomics ». J'ai ensuite traité les séquences récupérées sous format ab1.

Pour analyser mes données, j'ai également utilisé des séquences ADN de Guadeloupe qui avait été séquencées par S. James, taxonomiste américain, ainsi que des séquences de Guyane, séquencées par T. Decaens disponibles dans la base de données Genbank.

Données paysagères :

Les couches paysagères utilisées n'ont pas été construites pendant le stage mais ont été récupérées sur L'Institut national de l'information géographique et forestière (IGN) et sur Géomartinique. J'ai réalisé l'analyse des buffers avec l'aide d'un doctorant du CIRAD Alexis Delaplace.

Terrain :

J'ai construit le protocole d'échantillonnage de chasse à vue avec l'aide et l'approbation de mes deux encadrants de stage, Lise Dupont et Mathieu Coulis. Les sites à échantillonner ont été présélectionnés par mes co-encadrants et moi-même. J'ai moi-même réalisé l'échantillonnage des individus pour les 18 terrains effectués, accompagnée par des membres du laboratoire.

COVID-19

La pandémie n'a pas causé d'impacts négatifs sur le déroulement de mon stage.

Initialement, une collecte de vers de terre aurait dû être réalisée avant mon arrivée à la Martinique (en novembre 2020) mais le confinement a empêché cette mission. Cette première prospection aurait dû me permettre d'identifier l'espèce la plus répandue de Martinique et facilement identifiable sur le terrain pour réaliser une analyse de diversité génétique au sein de cette espèce. Le sujet a été modifié avant le début de mon stage et j'ai finalement réalisé une étude sur la diversité globale des vers de terre de Martinique. Je n'ai pas eu de problème pour me rendre en Martinique ni pour réaliser mes terrains pendant ces deux mois. La suite de mon stage s'est déroulée à l'UPEC de Créteil où j'ai pu réaliser mes manipulations en laboratoire et effectuer mes analyses en présentiel sans problème.

1 | Introduction

Le changement climatique et la perte d'habitat forestier ont des conséquences importantes sur le déclin de la biodiversité en zone tropicale (Deutsch et al. 2008). Ce déclin est d'autant plus difficile à évaluer pour les taxons dont la diversité est encore assez mal connue dans ces régions tropicales, tel que les vers de terre. Ce manque de connaissances est notamment dû à un effort d'échantillonnage de ces taxons moins important dans les tropiques qu'en milieu tempéré, ainsi qu'à la taxonomie problématique des vers de terre (James et al. 2021). Contrairement aux espèces des milieux tempérés qui peuvent être relativement facilement identifiées à l'aide de caractères morphologiques externes, l'identification des espèces tropicales nécessite une étude anatomique détaillée par dissection du spécimen. Le manque d'experts taxonomistes capables de décrire les caractéristiques internes de ces espèces par dissection constitue un frein à l'étude de ces espèces. Un outil intéressant pour pallier ce problème est le barcoding moléculaire (ou code barre ADN). Cette méthode permet d'obtenir des données génétiques standardisées pour chaque espèce à partir d'un court marqueur d'ADN. Le barcode ADN permet de délimiter des individus en unités moléculaires taxonomiques opérationnelles (MOTUs) sans identification morphologiques préalables (Smith et al. 2005, Porco et al. 2013). Les MOTUs pourront être approximés comme étant des espèces si des critères anatomiques, morphologiques ou écologiques confirment le regroupement d'individus. Des études récentes utilisant cet outil ont été réalisées en Guyane Française (Decaens et. al 2016, Maggia et al. 2020) et ont montré une diversité insoupçonnée, notamment dans les habitats arboricoles où 23 MOTUs ont été identifiées. Ces MOTUs ont été prélevés exclusivement dans des micro-habitats autres que le sol tels que les troncs en décomposition ou des habitats épiphytes (ex : Broméliacées). Des individus dont le mode de dispersion reste aujourd'hui encore inconnu, ont été observés dans ces habitats atypiques jusqu'à 40 mètres au-dessus du sol (Decaens et al. 2016). La présence d'espèces de vers de terre vivant dans un milieu arboricole a été observée dans de nombreuses autres régions tropicales (Argentine (Adis et Righi 1989), Guadeloupe (James 2016), Mexique (Fragoso et Rojas-Fernández 1996, Lavelle et Kohlmann1984)) mais peu de données sur la diversité au sein de ces habitats et sur l'écologie de ces espèces sont disponibles.

Dans le cadre de ce stage, nous nous sommes intéressés à la diversité des espèces de vers de terre arboricole de la Martinique. L'île possède deux vastes zones naturelles protégées qui peuvent être considérées comme des réservoirs de biodiversité : la Montagne Pelée et les Pitons du carbet. Ces espaces à fort couvert forestier abritent de nombreuses espèces

endémiques et emblématiques de l'île. Du fait de la forte biodiversité qu'ils abritent, ces espaces ont été proposés à l'inscription au patrimoine de l'Unesco en 2018. De nombreuses espèces présentes sont menacées d'extinction selon l'UICN, les perturbations d'origines anthropiques en sont une des raisons principales. En effet, les espaces forestiers du nord de la Martinique sont fragmentés par l'utilisation des terres pour l'agriculture et l'urbanisation. Cette perte d'habitat forestier est un frein à la dispersion des espèces et peut avoir des conséquences importantes sur la diversité des espèces, par exemple en diminuant trop fortement la taille efficace de leurs populations. Les introductions d'espèces invasives sont particulièrement à surveiller car elles sont facteur important d'extinctions d'espèces à travers le monde (UICN France 2015). Dans les régions tropicales, certaines études sur la diversité des vers de terre constatent la présence en fort effectif d'espèces invasives même dans des zones préservées telle que la réserve des Nouragues en Guyane française (*Dichogaster bolaui* et *andina*, cf Decaens et. al (2016) et Maggia et al. (2020)). Un autre ver de terre invasif fréquemment retrouvée dans ces régions tropicales est *Pontoscolex corethrurus* (Taheri et al. 2018). Identifier les espèces natives et introduites de la Martinique est une première étape nécessaire afin de mener des actions réfléchies de gestion et de conservation de la biodiversité.

Malgré quelques études traitant du rôle écologique d'espèces du sol (Blanchart et al., 2004), Loranger et al., 1998), la diversité spécifique des vers de terre du sol n'a que très peu été explorée en Martinique, et aucune étude sur les vers arboricoles n'a encore été publiée. En 2020, des données préliminaires ont été recueillies dans mon laboratoire d'accueil en Martinique (CIRAD), sur les espèces de vers de terre arboricoles prélevées dans les habitats préservés de l'île : la Montagne Pelée et les Pitons du Carbet. Ces données sont issues d'un précédent stage (Luce, 2020) qui visait à comprendre l'effet de l'altitude sur les communautés de vers de terre de Martinique en comparant les communautés sols-Broméliacées. Lors de ce stage, les individus ont été classés par morphoespèces mais des analyses sur données moléculaires n'ont pas été réalisées. De plus, l'étude était focalisée sur les espaces préservés de l'île, on s'attend donc à retrouver dans ces milieux une diversité spécifique plus importante qu'en zone perturbée par l'activité humaine.

Les objectifs de ce stage sont, dans un premier temps de caractériser la diversité des vers de terre en Martinique par barcoding ADN en se focalisant sur les espèces arboricoles, et, dans un second temps, d'étudier l'effet de la pression anthropique sur la diversité des espèces arboricoles dans les zones perturbées par l'activité humaine, avec un focus sur les espèces exotiques.

2 | Matériel et méthodes

Une première partie du stage avait pour objectif de construire une base de données de MOTUs correspondant à des espèces putatives de vers de terre majoritairement arboricoles provenant de Guyane et des Antilles. La deuxième partie du stage avait pour objectif de caractériser la structure des communautés de vers de terre occupant un habitat arboricole dans un milieu anthropisé, à partir de l'assignation des spécimens récoltés aux MOTUS délimités à partir de la librairie de référence.

2.1 Identification des MOTUS présents en Guyane et dans les Antilles

2.1.1 Construction de la librairie de référence de code barre ADN

La première étape du stage a été la construction d'une librairie de référence de code barre ADN du gène mitochondrial de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI), de vers de terre tropicaux provenant de Guyane et des Antilles. Cette librairie de référence est constituée de 257 séquences COI qui proviennent de trois sources différentes. La première source est l'étude de Decaens et al. (2016) réalisée en Guyane, 25 séquences COI correspondant à des MOTUs de vers de terre arboricoles ont été récupérées dans la base de données Genbank. Il s'agit des seules séquences connues de la littérature qui proviennent d'individus récoltés en milieu arboricole et qui sont dans une région tropicale proche de la Martinique. A ces séquences, sont ajoutées 90 séquences COI de vers de terre de Guadeloupe qui nous ont été transmises par Samuel James, taxonomiste américain spécialiste des vers de terre. Ces séquences provenant de vers de terre récoltés dans le sol et les milieux arboricoles dans une île des Petites Antilles proche de la Martinique aideront à déterminer si des espèces de Martinique pourraient être endémiques. La troisième source de cette librairie correspond aux vers de terre collectés dans le cadre du stage de Mathieu Luce (2020), dans six sites différents, au niveau des deux zones protégées de Martinique : la montagne Pelée et les Pitons du Carbet (repères verts fig. 1). L'ADN de ces vers de terre a été extrait et le fragment du COI séquencé, au cours de mon stage, selon les protocoles décrits ci-dessous, ce qui a permis d'obtenir 142 séquences. Ces séquences provenant d'individus échantillonnés en zones préservées permettent de caractériser la diversité spécifique globales des espèces arboricoles de Martinique. L'ensemble des séquences utilisées ont été regroupées par haplotype en utilisant l'outil « Generate Haplotype data file » du logiciel DNA Sequence polymorphism version 6.12.03 (DNAsp). Tous les haplotypes ont été comparés aux séquences présentes dans la base de données BOLD (Ratnasingham et Hebert, 2013) en utilisant

l'outil « Bold identification system ». Cette étape permet d'identifier les espèces des vers de terre déjà recensées dans la base de données. Cette librairie sera ensuite utilisée pour assigner les nouvelles séquences obtenues pendant mon stage aux MOTUs délimités lors de cette première étape.

2.1.2 Délimitation de MOTUs

Afin de regrouper les haplotypes en MOTUs, la méthode de délimitation ASAP: Assemble species by automatic partitioning (Puillandre et al. 2020) a été utilisée sur les haplotypes de la librairie de référence de codes-barres ADN. Cette méthode repose sur le calcul du « barcode gap », qui correspond à la valeur de la plus grande distance intraspécifique et de la plus petite distance interspécifique calculée au sein d'un ensemble de séquence. Les distances sont mesurées en utilisant le modèle de substitution Kimura 2 paramètres (Kimura 1980).

2.2 Analyse de structuration des communautés de vers de terre arboricoles en milieux perturbés

2.2.1 Choix des sites

Afin de comprendre la structuration des communautés de vers de terre arboricoles dans la région située entre les deux zones protégées de la montagne Pelée et des Pitons du Carbet précédemment étudiées dans le cadre du stage de M. Luce (repères verts sur la fig. 1), dix-huit sites (repères violets sur la fig. 1) ont été échantillonnées, au cours de mon stage, autour de la ville de Morne Rouge au nord de la Martinique, qui s'étend des Pitons du Carbet en limite sud et jusqu'à la montagne Pelée en limite nord. Les sites ont été présélectionnés en utilisant des critères paysagés suivant : présence de forêt tropicale humide, présence de linéaire de haie, de ravine longée de patch forestier ; en émettant l'hypothèse que les évènements de dispersion de ces espèces, d'un site protégé à l'autre nécessite la présence de ces habitats. Plusieurs sessions de prospections sur le terrain ont permis de confirmer la présence des micro-habitats recherchés c'est-à-dire : plantes à phytotelme (Broméliacées et inflorescence d'Heliconia en décomposition), habitats arboricoles (aisselles des branches d'arbres, bois mort au sol, bois mort sur pied, pétioles de fougère arborescente), mousse épiphyte, feuille de cocotier. Au total, la collecte des vers a été menée sur 8 sites dits « sources » (i.e. forêt primaire ou secondaire), ainsi que sur 10 sites en milieu plus anthropisés (i.e. présence de routes, zones urbanisées ou zones agricoles).

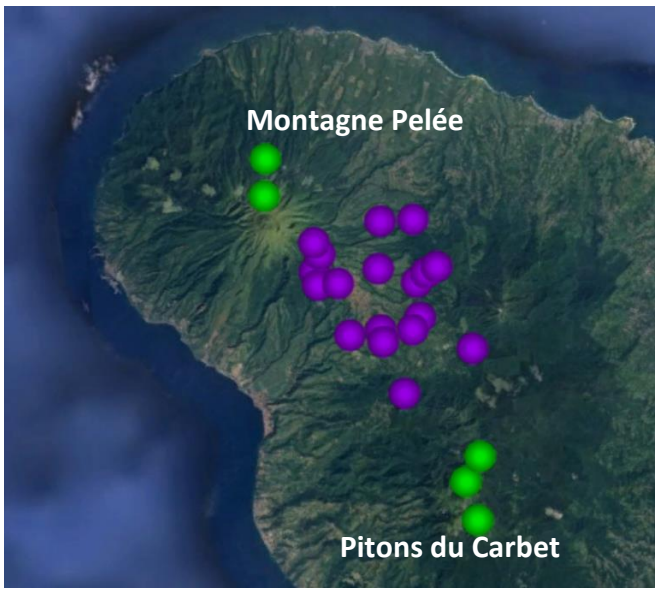


Figure 1: Carte Google earth du nord de la Martinique avec en vert les sites échantillonnés en 2020 par M. Luce en zones protégées, et en violet les sites échantillonnés en 2021 par CM. Brunet en zones perturbées.

2.2.2 Protocole d'échantillonnage

La surface échantillonnée est définie par un rayon de 10m centrée sur un point prédéfini. La collecte de vers de terre est réalisée en chasse à vue pendant une durée de 1h dans le but de prélevé tous les individus matures ou juvéniles observés. La chasse à vue a été réalisée dans les milieux accessibles par l'homme ou atteignables à l'aide d'une perche pour atteindre des habitat pouvant aller jusqu'à 7m de hauteur.

Les individus collectés sur le terrain sont stockés dans une boite contenant de la matière organique provenant du micro-habitat dans lequel ils ont été récolté. Les boites sont stockées dans une glacière jusqu'au laboratoire. Les vers de terre sont ensuite nettoyés dans une coupelle d'eau, puis tué de manière douce dans de l'alcool à 10%. Chaque ver est ensuite épongé sur du papier absorbant afin de retirer l'excédent de mucus, puis scanné pour obtenir une image du ver encore vif. Les vers sont ensuite tués dans une solution d'éthanol à 70% puis stockés dans des tubes individuels au congélateur pour assurer une préservation optimale en vue des analyses moléculaires.

2.2.3 Variables mesurées

Au niveau des sites, sur le terrain, les données d'altitude et les coordonnées GPS de chaque site sont enregistrées via l'application Carnat reliée à l'outil de gestion de données naturalistes en ligne Cardobs. Un capteur d'humidité a été positionné durant la chasse à vue pour mesurer l'humidité relative de l'air moyenne durant l'heure d'échantillonnage. Ensuite, une analyse des variables paysagère a été réalisée à l'aide du logiciel R. Des zones de 200 mètres de rayons (appelé Buffer) ont été créées autour des 18 sites d'échantillonnage en utilisant le package R tmap version 3.3.1 (Tennekes, 2018). Un indice de fragmentation est calculé en faisant le rapport de la longueur des bordures de forêt sur la surface totale de forêts dans le buffer. A partir des couches *occupation sol* et *évolution forêt 2004-2017*, couches récupérées respectivement sur L'Institut national de l'information géographique et forestière (IGN) et sur Géomartinique, la proportion de zones urbanisées, de zones agricoles et de couverture forestière au sein des buffer ont été calculées en utilisant le package tmap. Les buffers et les différentes couches paysagères sont visualisés avec le logiciel QGIS 3.12.1.

Au niveau du micro-habitat, la température du micro-habitat et de l'air ont été mesurées pour chaque échantillon en utilisant un thermomètre à sonde afin de calculer le pourcentage d'augmentation de la température du micro-habitat (T_{mh}) par rapport à la température de l'air (T_{air}) : $((T_{air}-T_{mh})/T_{air})*100$. La hauteur au sol de chaque micro-habitat a été mesurée à l'aide d'un télémètre laser. Chaque Broméliacées et Heliconia ont été prises en photo afin d'être identifiées à posteriori à l'espèce par Benjamin Ferlay botaniste au conservatoire botanique de Martinique. La plus grande feuille de chaque broméliacées a été prélevée puis a été mesurée en laboratoire.

Au niveau des individus, la biomasse de chaque vers a été estimée à partir du scan réalisé en laboratoire. Chaque vers présent sur le scan a été mesuré à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ, les valeurs de longueur et de largeur de chaque individus ont ensuite été utilisées pour calculer le volume puis la biomasse fraiche à l'aide de l'équation allométrique suivante « ln(masse) = 0.99*ln(volume)-0.18 » (Coulis et al., 2017).

2.2.4 Protocole d'extraction ADN et séquençage sanger

A partir de mes campagnes d'échantillonnage réalisées de février à avril 2021, 260 individus ont été prélevés dans leur micro-habitat arboricoles. Sur chacun des 232 individus, un échantillon de tissu a été prélevé pour en extraire l'ADN et séquencer un fragment du gène COI, les 28 individus restant n'ont pas été barcodés car ils ont pu être identifiés avec certitude sur la base de critères morphologiques (il s'agit d'espèces exotiques bien connues). Pour chacun des

individus destinés à être séquencés, un morceau de tégument d'environ 4mm2 a été collecté et conservé dans de l'éthanol pur dans des plaques de 96 puits.

L'extraction de l'ADN ainsi que les réactions d'amplification en chaine par polymérase (PCR) ont été réalisées au laboratoire de Créteil. L'ADN a été extrait en utilisant le kit Nucleospin de Macherey-Nagel soit en plaque de 96, soit en colonnes individuelles, en respectant les recommandations du fournisseur mis à part pour l'étape de l'élution ou deux fois moins de solvant a été utilisé dans le but d'obtenir une concentration d'ADN plus importante. La concentration et la pureté de l'ADN a été mesurée avec le Nanodrop. Pour réaliser la PCR, 2µL d'ADN est ajouté à 23µL de mélange de tampon Promega 1x, de MgCl2 à 2,5 mM, de dNTP à 0,5 mM, d'un cocktail d'amorces LCO1490 / HCO2198 (Folmer et al., 1994) à 0,2µM chacune, et enfin de l'ADN polymérase FlexiTaq Promega 1u. Quarante cycles PCR ont été effectués. Une électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 1% afin de vérifier que l'amplification ait fonctionnée. Le séquençage des brins sens et anti-sens COI a été effectué en Allemagne au laboratoire Eurofins Genomics. Une première étape de nettoyage des séquences a été réalisé puis les séquences ont été alignées entre elles sous MEGA-X (Kumar et al, 2018).

2.2.5 Assignation des MOTUS

Une méthode d'assignation implémentée dans le package BarcodingR version 1.0.3 (Zhang et al., 2017) dans Rstudio Version 1.2.5042 a été utilisée pour assigner les 232 séquences de milieux perturbés (soit 18 haplotypes après l'analyse DNAsp) aux MOTUs définis dans la première partie du stage. La méthode dite de « back-propagation neural networks » (BP) (Zhang et Savolainen, 2009) a été utilisée avec la fonction barcoding.spe.identify et l'option «BpNewTrainingOnly».

Les 18 haplotypes provenant d'individus vivants en milieu perturbé ont été assigné à une liste de référence comprenant un haplotype sélectionné aléatoirement par MOTU identifié lors de la première analyse de délimitation ASAP. Un deuxième cycle de délimitation des espèces avec ASAP a été effectué sur l'ensemble de données, c'est-à-dire la bibliothèque de référence de 201 codes-barres ADN et les 18 codes-barres ADN nouvellement générés (au totale 219 haplotypes), afin de vérifier la cohérence des sorties de délimitation. Une deuxième assignation est réalisée avec la librairie de référence de l'étape 1 à laquelle est rajouté les 18 haplotypes de ce stage. La comparaison des deux séries de délimitations d'espèces et d'assignation d'espèce

a permis de vérifier si les MOTUs attribuées par les méthodes d'attribution des spécimens correspondent aux MOTUs données.

Pour visualiser les relations de parenté entre les MOTUS, un arbre phylogénétique des haplotypes est construit sous MEGA-X, en utilisant une méthode de Neighbour Joining (Saitou et Nei, 1987) et le modèle d'estimation des distances génétiques Kimura 2 paramètres. La robustesse des branches a été évaluée avec une analyse de Bootstrap de 1000 réplicas. L'arbre phylogénétique et l'assignation au MOTU sont visualisés avec le package ggtree version 2.4.1 (Yu, 2020) sous Rstudio. Un arbre circulaire représentant les MOTUs est représenté à l'aide du logiciel iTOL v5 (Letunic and Bork, 2021).

2.3 Analyse de structuration des communautés

Une courbe d'accumulation de MOTUs en fonction du nombre de sites échantillonnées a été réalisée avec le package vegan dans le but d'évaluer l'effort d'échantillonnage. La composition en MOTUs des micro-habitats a été représenté par des diagrammes de Venn à partir du package VennDiagram afin de mettre en évidence MOTUs communs et uniques entre les différents micro-habitats. Un test de Krustal Walis a été réalisé pour tester si les MOTUs sont distribués de manière aléatoire ou si au moins deux MOTUs sont répartis à des hauteurs significativement différentes. La normalité de la distribution des échantillons a été testé avec le test de Shapiro-Wilk.

La normalité de la distribution des variables paysagères a été testé avec un test de Shapiro-Wilk. Les variables telles que la proportion de forêts, la proportion de zones urbanisées, la longueur des cours d'eau, et l'indice de fragmentation et leur lien avec la richesse spécifique du site ou bien avec la proportion d'espèce exotique a été testée en utilisant le test de corrélation de Spearman.

3 | Résultats

3.1. Délimitation des MOTUs et identification des espèces

3.1.1. Base de données des MOTUS présents en Guyane et dans les Petites Antilles

La librairie de référence constituée des haplotypes de Martinique (n=93), Guadeloupe (n=83) et Guyane (n=25) a été regroupée en 57 MOTUs lors de l'analyse de délimitation (fig. 3). Le barcode gap se situe à un seuil de 5,6% (annexe fig. 2). Parmi les MOTUs identifiés, seulement 10 ont pu être assignés à une espèce présente dans la base de données BOLD (Tableau 1). *Pontoscolex corethrurus* a été attribué à deux MOTUs différents.

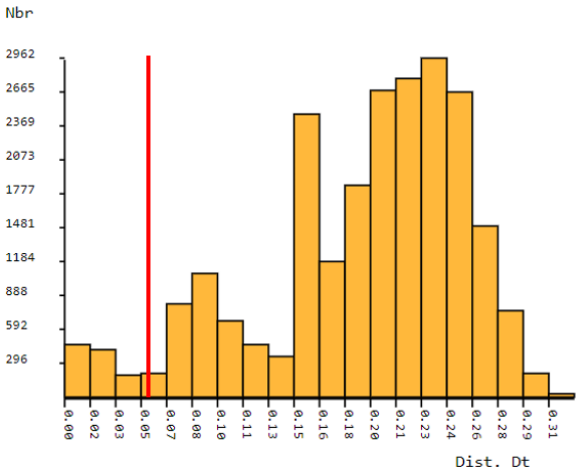


Figure 2: Histogramme de la distribution des distances par paire d'haplotype des 201 séquences de codes-barres d'ADN de la librairie. La ligne rouge représente la valeur seuil de distance entre les paires d'individus intra-MOTU (gauche) et inter-MOTU (droite), ASAP (5,6%).

Tableau 1 : Sortie des meilleures correspondances de l'analyse BOLD sur les MOTUs de la librairie de référence, en gris sont représentés les MOTUs présents en Martinique.

MOTU	Meilleure identification	Top %	Low %
5	*Dichogaster andina*	98.92	83.8
6	*Dichogaster annae*	100	83.18
8	*Dichogaster bolaui*	99.84	86.37
9	*Eudrilus eugeniae*	100	82.72
17	*Travoscolides chengannures*	99.5	84.52
18	*Pontoscolex corethrurus*	100	100
23	*Perionyx excavatus*	99.54	84.06
25	*Pontoscolex spiralis*	99.68	83.42
28	*Pontoscolex corethrurus*	100	82.25
32	*Amynthas rodericensis*	99.69	86.01
57	*Dichogaster bolaui*	100	83.33

3.1.2. Analyse des MOTUs collectés lors de mon stage

Sur les 18 sites échantillonnés pendant mon stage, 231 séquences COI de 658 paires de bases ont été obtenues (une séquence ayant échoué au séquençage). Les séquences ont été

regroupées en 18 haplotypes d'après l'analyse DNAsp. L'assignation BarcodingR regroupe ces haplotypes avec 9 MOTUs différents au sein de la librairie de référence (Tableau 2). La deuxième série de délimitation d'espèces confirme l'assignation car elle donne les mêmes résultats que l'analyse d'assignation: même nombre de MOTUs et même regroupement. Néanmoins, les haplotypes 7 et 16 (Tableau 2) ont une probabilité faible d'être regroupés avec le MOTU qui leur a été assigné.

Tableau 2 : Résultats de l'assignation des 18 haplotypes aux MOTUs de la librairie de référence pour les deux étapes de l'assignation avec la probabilité associée. En gras sont représentés les haplotypes pour lesquels l'assignation est supportée par une faible probabilité.

Haplotypes	MOTUs étape1	MOTUs étape2	proba étape1	proba étape2
1	*5 Dichogaster andina*	*5 Dichogaster andina*	0.953	0.953
2	*9 Eudrilus eugeniae*	*9 Eudrilus eugeniae*	0.950	0.951
3	*32 Amynthas rodericensis*	*32 Amynthas rodericensis*	0.970	0.891
4	*32 Amynthas rodericensis*	*32 Amynthas rodericensis*	0.969	0.586
5	*18 Pontoscolex corethrurus*	*18 Pontoscolex corethrurus*	0.954	0.951
6	7	7	0.915	0.984
7	**16**	**16**	**0.446**	**0.716**
8	7	7	0.839	0.976
9	1	1	0.935	0.920
10	7	7	0.819	0.969
11	*6 Dichogaster annae*	*6 Dichogaster annae*	0.947	0.947
12	1	1	0.938	0.872
13	*32 Amynthas rodericensis*	*32 Amynthas rodericensis*	0.969	0.586
14	5	7	0.750	0.958
15	1	1	0.927	0.926
16	***23 Perionyx excavatus***	**1**	**0.816**	**0.447**
17	1	1	0.927	0.840
18	5	7	0.954	0.963

3.1.3. Diversité des MOTUS en Martinique

L'ensemble des séquences de la Martinique générées à partir des échantillons collectés par M. Luce et de ceux collectés pendant mon stage, sont regroupées en 22 MOTUs représentés sur la figure 4. Huit des MOTUs sont identifiés par l'analyse BOLD (tableau 1). Le MOTU n°5 (*Dichogaster Andina*) est représenté par 192 individus et ne possède pas de diversité intra-MOTU (clade représenté par un triangle plat). Cette observation peut être faite également sur les autres MOTUs assignés à des espèces invasives (MOTUs n°32 : *Amynthas rodericensis,* n°8 *Dichogaster bolaui*, n°18 *Pontoscolex corethrurus,* n°6 *Dichogaster annae*, n°9 *Eudrilus*

eugeniae, n°17 *Travoscolides chengannures)*. Au contraire, les Motus n°1, 16 et 7 possèdent une diversité intra-MOTU plus importante (triangle étendu).

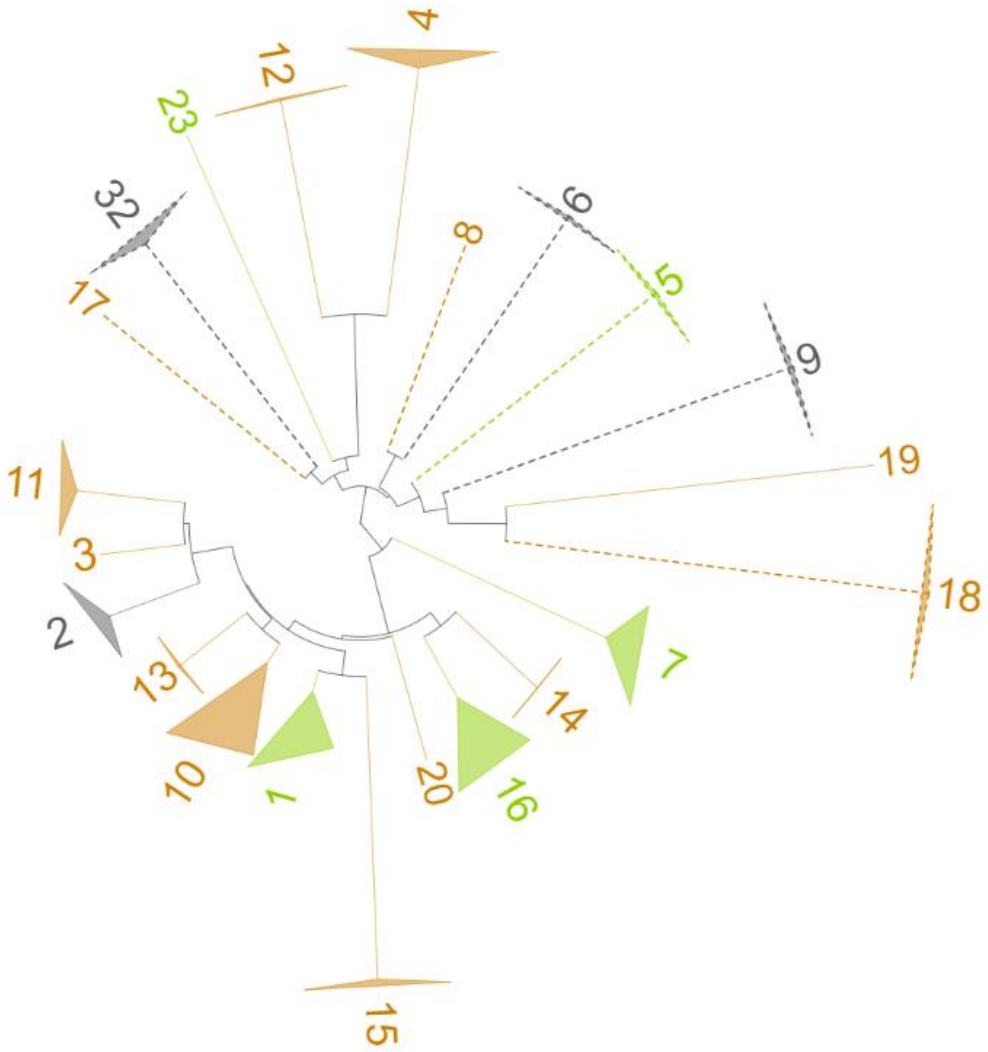


Figure 4 : Arbre phylogénétique en Neighbor Joining des 111 haplotypes obtenus à partir des vers de terre récoltés sur deux zones protégées (n=93) de Martinique, et entre ces deux zones (n= 18). Les haplotypes sont regroupés en MOTUs et sont représentés par des triangles dont la tailles des cotés est proportionnelle à la divergence des haplotypes de ce clade. Les MOTUs en vert indiquent des vers dit « arboricoles » qui ont été collectés majoritairement (à plus de 90%) dans les Broméliacées et les *Heliconia*; Les MOTUs en marron indiquent des vers du « sol » qui ont été collecté majoritairement (à plus de 90%) dans le sol, la litière ou des micro-habitats à moins d'1,5 mètre du niveau du sol ; Les MOTUs en gris sont composés à la fois de vers « arboricoles » et du « sol ». Les clades représentés en pointillés indiquent les espèces invasives (voir les correspondances tableau 1).

3.2. Analyse des communautés de vers de terre à l'échelle du micro-habitat

A partir des neuf MOTUs identifiés entre les deux zones sources de Martinique, une analyse de communautés à l'échelle du micro-habitat a été réalisée. Cinq parmi les neuf MOTUs sont retrouvés uniquement dans les Broméliacées et *Heliconia*. *Pontoscolex corethrurus* (MOTU n°18) est retrouvé uniquement dans le bois mort, et *Eudrilus eugeniae* et *Amynthas rodericensis* ont été échantillonnés dans plusieurs micro-habitats différents. Le MOTU n°5 est représenté par 192 individus soit 74% des vers de terre récoltés. Au contraire, les MOTUs n°6, 9, 16, 23 et 32 sont rares, représentés par uniquement 2 à 6 individus.

Tableau 3 : Tableau descriptif des MOTUs collectés pendant mon stage. Les MOTUs assignés à des espèces exotiques sont indiqués en gras.

MOTUs	Proportion d'individus « arboricoles »	Biomasse moyenne (mg)	Nombre d'individus collectés
1	1	242	13
5	**0.94**	**90**	**192**
6	**1**	**60**	**6**
7	1	69	17
9	**0.33**	**1212**	**3**
16	1	80	2
18	**0**	**275**	**21**
23	**1**	**110**	**2**
32	**0.33**	**742**	**3**

Cinq MOTUs sont retrouvés uniquement dans un seul type de micro-habitat (fig. 5), trois autres n'ont été observés que dans deux micro-habitats et un seul est présent dans chacun des types de micro-habitats explorés : *Dichogaster andina* (MOTUs n°5). Deux MOTUs sont spécifiques aux Broméliacées, un motus a été retrouvé uniquement dans des *Heliconia* et deux MOTUs n'ont jamais été collectés dans les Broméliacées et *Heliconia* : *Pontoscolex corethrurus* et *Amynthas rodericensis*.

Le MOTU n°5 (*Dichogaster andina*) est retrouvé sur la plus large gamme de hauteur dans la canopée (de 0 à 6,80 mètres au-dessus du sol, fig.6). Les MOTUs 1 et 7 et 16 sont récoltés le plus haut dans la canopée avec aucun individu observé en dessous de 1,44 mètres.

La hauteur au sol moyenne à laquelle les individus ont été récoltés diffère significativement entre les MOTUs (test de Kruskal-Wallis, pvalue = $1{,}28.10^{-10}$).

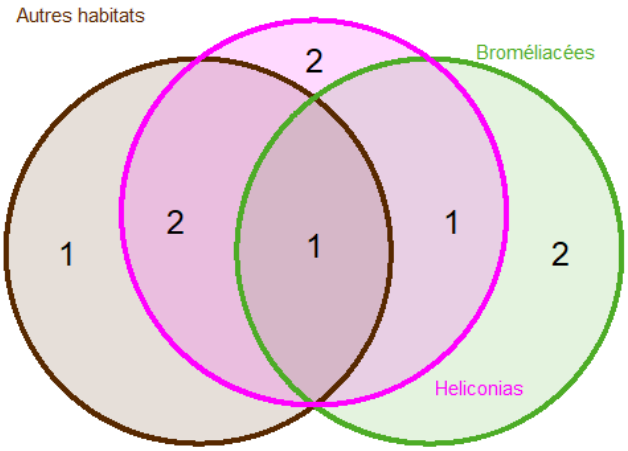


Figure 5 : Diagramme de Venn montrant la répartition des MOTUs entre les micro-habitats dans lequel les individus ont été trouvé. Le cercle rose représente les MOTUs collectés dans les Heliconia (n=4). Le cercle vert représente les MOTUs collectés dans les Broméliacées (n=4) La catégorie « autres habitats » en marron regroupe les bois morts et autres micro-habitats situés à moins d'1,5 mètre du sol. Le nombre total de MOTUs différents dans ces habitat est 3. La superposition de cercles indique que les MOTUs ont été collectés dans plusieurs micro-habitats.

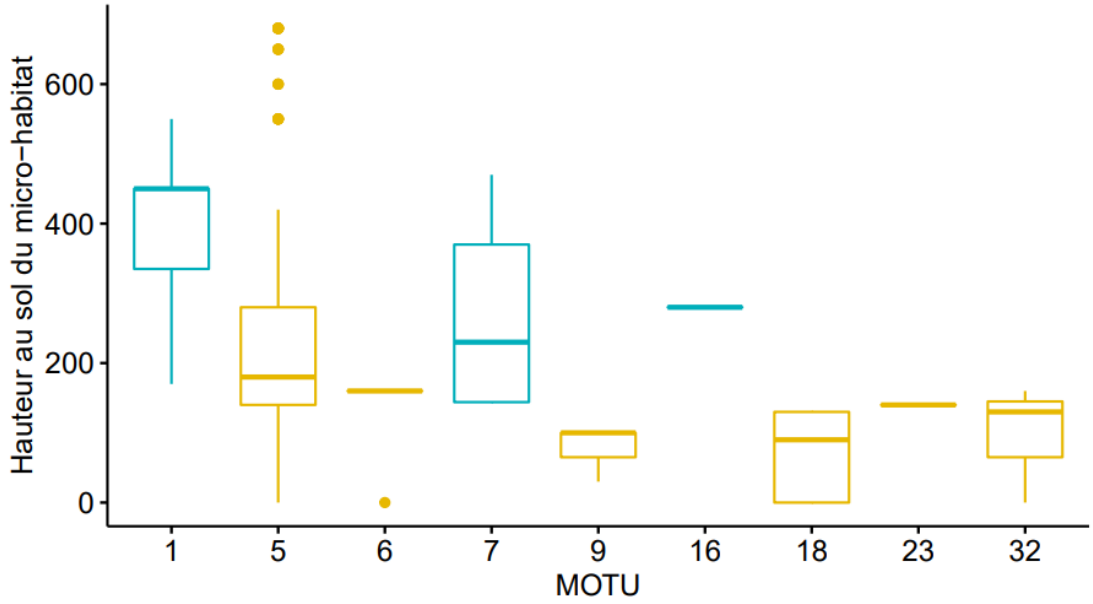


Figure 6 : Boite à moustache représentant la hauteur à laquelle les MOTUs ont été récoltés. En jaune sont représentés les MOTUs associés à des espèces invasives d'après l'analyse Bold.

Certains micro-habitats ont été sous-échantillonnés par rapport à d'autres comme les cocotiers ou les fougères arborescentes (Tableau 4). Cette différence s'explique par l'hétérogénéité de la présence de ces micro-habitats sur l'ensemble des sites. Les Broméliacées constituent l'habitat épiphyte que l'on retrouve le plus haut dans la canopée, avec ici un échantillonnage jusqu'à 6,80 mètres de hauteur. La moyenne des températures mesurées dans les Broméliacées, bois morts sur pieds et bois morts au sol sont inférieures à la température de l'air. Les *Heliconia* ont quant à elle en moyenne une température interne proche de la température de l'air. Exceptés les cocotiers, les deux habitats dans lesquels on retrouve en moyenne le plus grand nombre de vers sont les Broméliacées et *Heliconia*. La biomasse moyenne de vers de terre par Broméliacée est de 248 mg, certaines Broméliacées ont atteint une biomasse totale de vers de terre de 1550 mg avec plus de 20 vers récoltés dans une seule plante. Les vers de terre dans les bois morts ont été échantillonnés dans une zone de 30cm^2 environ, ils possèdent une biomasse moyenne plus importante que ceux récoltés dans d'autre milieu.

Tableau 4 : Description des micro-habitats échantillonnés et des communautés de vers de terre présentes dans chaque micro-habitat

Micro-habitat	Nombre de micro-habitat explorés	Hauteur au sol moyenne (cm)	Température relative moyenne (%)	Nombre de vers de terre moyen	Biomasse moyenne (mg)	Richesse spécifique	Nombre d'espèce exotique
Bois mort sur pied	20	105 (+/- 62)	-2.4	1.1 (+/- 2.3)	396	4	4
Broméliacée	52	354 (+/- 172)	-3.6	2.2 (+/- 3.4)	248	4	1
Bois mort au sol	13	2 (+/- 8)	-3.3	0.7 (+/- 0.9)	195	3	3
Cocotier	2	80 (+/- 85)	1.8	2 (+/- 2.8)	140	1	1
Fougère arborescente	15	97 (+/- 59)	-3.2	0.5 (+/- 1)	102	3	3
Heliconia	62	156 (+/- 60)	0.5	1.7 (+/- 2.1)	145	6	5
Autre végétation épiphyte	4	152 (+/- 36)	-0.2	0	0	0	0

3.3. Analyse des communautés de vers de terre à l'échelle du paysage

La courbe d'accumulation (fig. 7) de l'accroissement du nombre de MOTUs en fonction de l'augmentation du nombre de sites échantillonnés permet de supposer que la diversité globale calculée est proche de la diversité globale réelle. La zone prospectée semble donc avoir été assez bien explorée, les différences observées entre les sites sont probablement dues au paysage. Comme première observation on remarque que la richesse spécifique estimée dans les sites

situés dans la matrice agricole (en jaune, fig. 8) est distribuée de façon plus homogène par rapport à la richesse spécifique estimée en milieu plus conservé (forêt primaire ou secondaire).

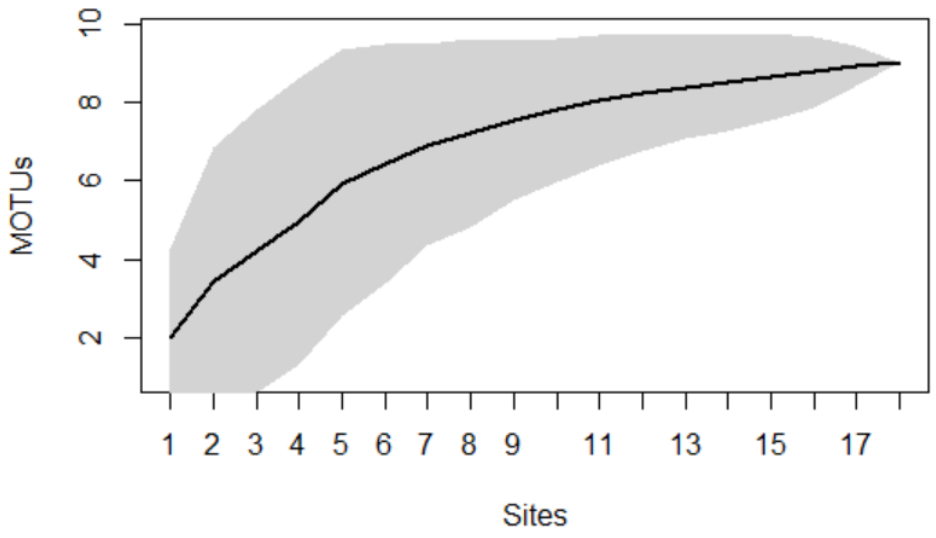


Figure 7 : Courbe d'accumulation de MOTUs en fonction du nombre de sites échantillonnés au sein de la zone perturbée de Martinique.

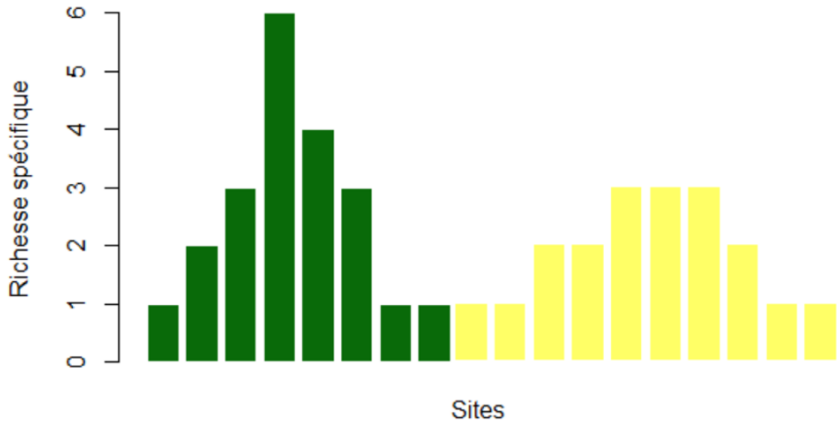


Figure 8 : Diagramme en bâton de la richesse spécifique dans les sites situés en forêts primaire ou secondaire à priori non perturbés (en vert) *versus* les sites situés dans la matrice agricole (en jaune).

La cartographie générée par Qgis (fig. 9) a permis de récupérer la proportion des différentes variables paysagères au sein de chaque buffer. Il n'y a pas de corrélation entre la richesse spécifique et l'indice de fragmentation calculé sur chacun des sites (Spearman, pvalue = 0.0539), ni entre la richesse spécifique et la proportion de forêt dans la zone (Spearman,

pvalue = 0.9223) (fig. 10). La proportion d'espèces exotiques par site est corrélée avec la proportion de forêt dans la zone (Spearman, pvalue = 0.046, rho = -0.47), et avec la longueur des cours d'eau au sein des sites (Spearman, pvalue = 0.032, rho = 0.5045) (fig. 10). La proportion d'espèces exotiques augmente avec la proportion de zones agricoles dans le buffer (Spearman, pvalue = 0.023, rho = 0.53) (donnée non montrée).

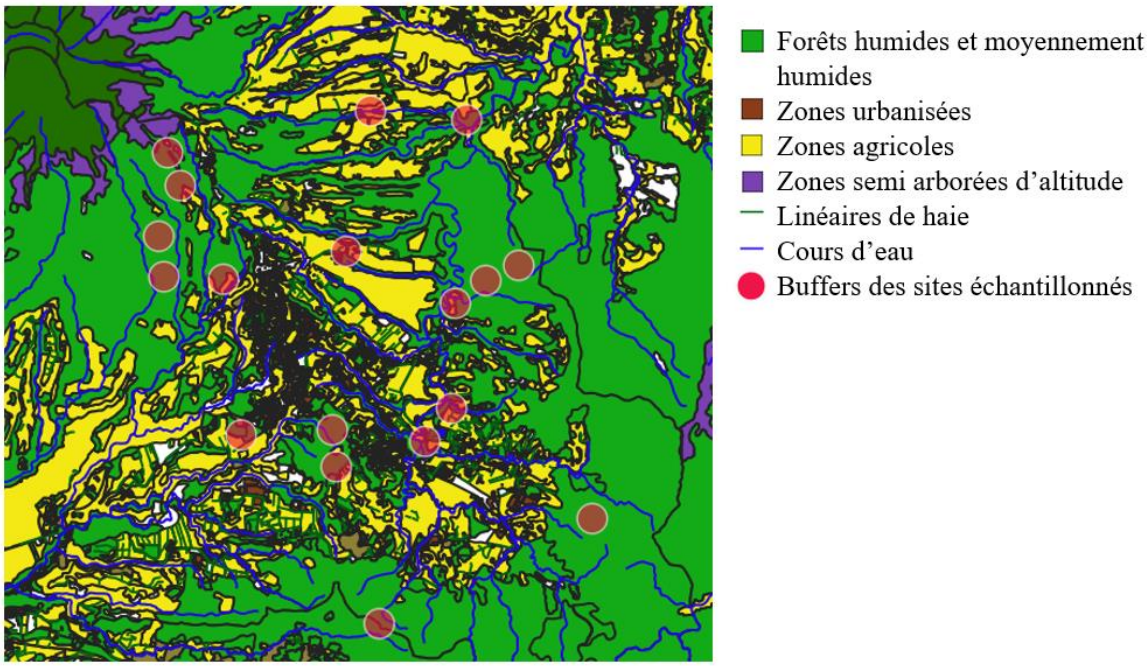


Figure 9 : Cartographie générée par Qgis représentant les buffers et les différentes couches paysagères utilisées.

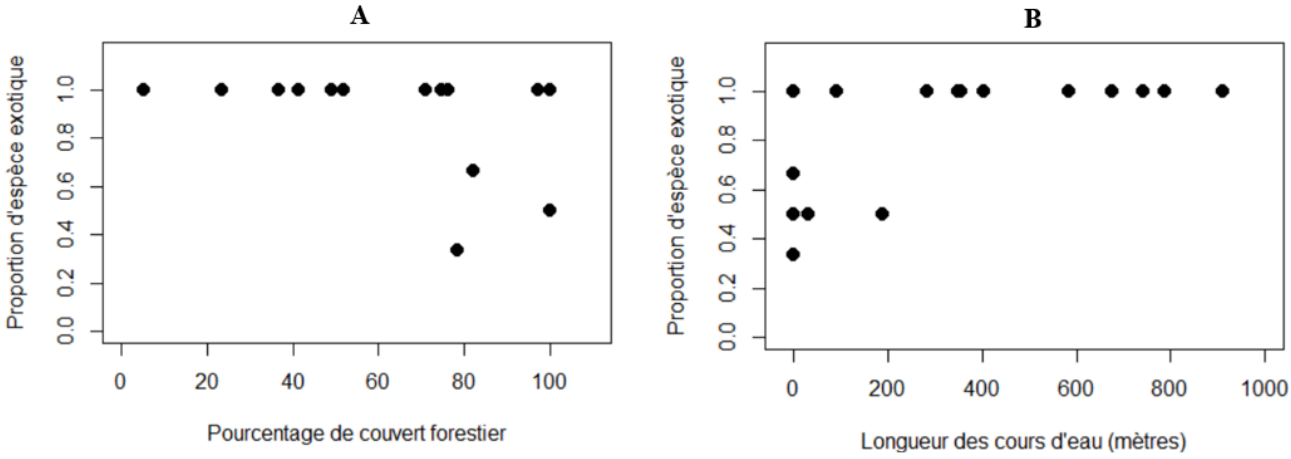


Figure 10 : Graphique représentant la proportion d'espèces invasives par site en fonction (**A**) du pourcentage de couvert forestier dans le buffer, (**B**) de la longueur des cours d'eau à l'intérieur du buffer.

4 | Discussion

Le premier objectif de ce stage était de caractériser la diversité des vers de terre en Martinique par barcoding ADN en se focalisant sur les espèces arboricoles. Le barcode mesuré lors de l'analyse de délimitation d'espèce est de 5,6%. Il est inférieur au barcode gap habituellement observé chez les vers de terre (14% Decaens et al., 2016 ; 10% Rougerie et al., 2009). Le manque de diversité génétique intraspécifique entraine une mauvaise délimitation de MOTUs (Kekkonen et al., 2015). Les espèces exotiques sont représentées par une faible diversité intra-spécifique par rapport aux espèces natives, ce qui peut expliquer la valeur de ce barcode gap inhabituel. Malgré cette incertitude au niveau de barcode gap, l'étude par Barcode ADN procure des avantages non négligeables. En effet, les espèces de vers de terre tropicaux sont difficiles à identifier morphologiquement car composées de nombreuses espèces cryptiques (King et al., 2008 ; James et al., 2010). De plus l'identification par critère anatomique est laborieuse et demande l'intervention d'expert. Chez les individus juvéniles l'identification jusqu'à l'espèce est d'autant plus compliquée que les marques génitales, principales caractéristiques utilisées dans l'identification d'espèces, ne sont pas encore visibles. Les individus récoltés durant ce stage sont composés à 83% de juvéniles, autant d'individus qui n'auraient donc pas pu être identifiés sans l'approche de barcode ADN. En effet, il a été démontré que l'utilisation de barcode ADN améliore grandement la fiabilité de l'étude de diversité (Richard et al., 2010).

Parmi les 22 MOTUs identifiés en Martinique, seulement 7 ont été assignés à des espèces déjà répertoriées dans la base de données BOLD. Ainsi les 15 MOTUs restants n'ont jamais été soumis à des analyses génétiques publiées, même s'il reste possible que les espèces aient été décrites morphologiquement. L'hypothèse selon laquelle ces 15 espèces putatives sont des espèces nouvelles pour la science est soutenue par l'analyse effectuée. Pour la valider, des analyses par barcode ADN, ainsi que des descriptions morphologiques et écologiques d'individus dans d'autres milieux tropicaux devront être effectuées. L'assignation des haplotypes de Martinique à la librairie de référence ne regroupe pas d'haplotype avec des MOTUs composés d'individus collectés en Guyane ou en Guadeloupe. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les individus collectés appartiennent à des espèces endémiques de l'île. Des données moléculaires plus approfondies notamment par l'étude du génome nucléaire des vers de terre ainsi qu'une analyse biogéographique sur une échelle plus large sont nécessaires pour espérer comprendre l'histoire de colonisation de ces espèces et ainsi valider leur caractère endémique.

Les vers de terre arboricoles tropicaux ont déjà été décrits dans différentes études (Adis et Righi, 1989 ; James, 2016 ; Fragoso et Rojas-Fernández, 1996 ; Rodriguez et al., 2007), mais l'utilisation de barcode ADN a permis de découvrir une diversité insoupçonnée de ces espèces en Guyane (23 MOTUs dans la réserve naturelle de Nouragues). L'analyse réalisée pendant ce stage permet d'identifier 3 MOTUs entre les deux sites préservés de Martinique. Ils sont retrouvés uniquement sur des sites avec un couvert forestier important et aucun de ces MOTUs n'est retrouvé dans la matrice agricole. On remarque que les MOTUs arboricoles n°1 et 7 sont présents de manière plus abondante quand *Dichogaster andina* est absent et inversement. Ces observations suggèrent un remplacement des espèces natives par *Dichogaster andina*. Un autre résultat intéressant de cette étude est la présence d'une diversité intra-MOTU importante au sein de ces 3 MOTUs dit « arboricoles ». La diversité de micro-habitats disponible (quatre espèces de Broméliacées, deux espèces d'*Heliconia*, et une espèce de fougère arborescente) pourrait être à l'origine de la diversité intra-MOTU observée. Ces trois MOTUs ont été retrouvés en grande majorité dans les Broméliacées ou *Heliconia*, mais pour deux d'entre eux, un petit nombre d'individus a été récolté au niveau du sol. Ces observations suggèrent que les micro-habitats « arboricoles » sont probablement colonisés par des individus se dispersant en passant par le sol. Les mêmes conclusions ont été faites lors de l'étude de Decaens et al. (2016), les auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle la colonisation des micro-habitats arboricoles est le résultat d'un déplacement aléatoire d'individu à la recherche de ressources, ou bien d'une dispersion active en réponse à un stress environnemental (Mathieu et al., 2010). Par exemple une quantité d'eau trop importante dans le sol pourrait devenir défavorable aux populations de vers de terre qui trouveraient alors refuge dans les micro-habitats arboricoles. Réaliser des sessions d'échantillonnage à d'autres périodes de l'année permettrait de savoir, par exemple, si les micro-habitats arboricoles sont aussi abondants en vers de terre en saison sèche qu'en saison humide.

D'après Gates (1982) les vers de terre du monde entier sont continuellement importés vers des zones exotiques. La mondialisation actuelle permet l'introduction de plus en plus facile de nouvelles espèces invasives. L'introduction peut être passive, par dispersion de cocons lors de déplacements anthropiques (Stephenson, 1930), ou bien active par exemple pour une utilisation à visées commerciales. L'utilisation de *Perionyx excavatus* (Perrier, 1972) et d'*Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867), en lombricompostage tropical (Reinecke et al., 1992) peut expliquer la présence de ces espèces en Martinique dans la matrice agricole. Ce sont des

espèces pérégrines d'après la base de données Drilobase, c'est-à-dire qu'elles ont été capables de coloniser de nombreuses régions. En Martinique, leur présence et leur impact sur l'écosystème ne sont pas documentées et ne nous permettent donc pas de qualifier ces espèces d'invasives. La présence d'espèces invasives peut entrainer des conséquences importantes sur l'écosystème colonisé en modifiant l'activité du sol ou en délogeant des espèces natives. Pour limiter la colonisation d'espèces exotiques et leurs éventuelles conséquences sur l'écosystème, une première étape nécessite de connaître les caractéristiques permettant à une espèce de coloniser avec succès un nouveau territoire. D'après Lee (2002) les caractéristiques génétiques des espèces peuvent jouer un rôle important sur le succès de leur invasion. Les séquences de Martinique assignées à *Dichogaster andina,* (espèce supposée invasive d'après l'étude de Decaens et al., 2016) ne présentent aucune variation nucléotidique. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence de ces « clones ». (i) Premièrement, un faible nombre d'individus colonisateurs lors de son introduction sur l'île pourrait expliquer ce manque de diversité. La répartition globale de cette espèce sur toute la zone échantillonnée, au sein de tous les micro-habitats et à toutes hauteurs de la canopée, permet de penser que son introduction est assez ancienne pour avoir permis sa forte expansion au nord de la Martinique. Mais si la colonisation est ancienne, une diversité génétique intra-spécifique pourrait être observée. (ii) Un autre scénario de dispersion probable est une introduction récente avec un mode de dispersion très efficace. La corrélation observée entre la longueur des cours d'eau et la proportion d'espèces exotiques permet de penser que la dispersion de *D. andina* est favorisée par la présence de milieux aquatiques, avec par exemple, des cocons qui seraient transportés par hydrochorie, un mode de transport très efficace d'après plusieurs études (Schwert, 1980 ; Terhivuo et Saura, 2006). (iii) Le manque de diversité observée chez *Dichogaster andina* pourrait aussi être expliqué par un mode de reproduction asexuée, la parthénogénèse. Des conclusions ne peuvent pas être tirées avec la simple étude d'un seul marqueur mitochondrial, pour valider l'une des hypothèses, une mesure de diversité calculée à partir de marqueurs nucléaires est nécessaire.

La parthénogenèse est une méthode de reproduction assez répandue chez les vers de terre, elle permet l'établissement d'une population à partir d'un seul individu (Terhivuo et Saura 2006). L'effet Allee de densité dépendance de début de colonisation est réduit si les individus n'ont pas besoin de trouver un partenaire pour se reproduire (Tobin et al., 2011), cette caractéristique pourrait être à l'origine du succès de colonisation de certaines espèces invasives. Parmi les vers de terre identifiés en Martinique *Pontoscolex corethrurus* (Muller, 1857) est une espèce pérégrine qui est aujourd'hui largement répartie à travers le monde. Cette large

colonisation serait due à une adaptation rapide des populations clonales lors de leurs implantations (Hendrix et al., 2006 ; Buch et al., 2011). D'après les données récoltées à partir de l'ADN mitochondrial, *Dichogaster andina* pourrait elle aussi avoir colonisé la Martinique à partir de population clonale, ce qui pourrait expliquer son succès de colonisation.

---

4 | Perspectives

De nombreuses espèces exotiques au sein de la matrice agricole ont été mises en évidence au cours de cette analyse. Le lombricompostage semble jouer un rôle important dans l'introduction de ces espèces, afin d'éviter les conséquences de la colonisation d'espèces étrangères à l'écosystème et risquer de le perturber, identifier des espèces locales efficaces en lombricomposte semble être un enjeu majeur. De par la diversité des substrats utilisés et des habitats occupés par les espèces arboricoles, ils serait intéressant d'identifier les qualités de ces espèces en lombricomposte car elles semblent être de bons candidats pour remplacer les espèces exotiques.

Bibliographie

Adis, J. U., & Righi, G. (1989). Mass migration and life cycle adaptation-a survival strategy of terrestrial earth-worms in Central Amazonian inundation forests. Amazoniana: Limnologia et Oecologia Regionalis Systematis Fluminis Amazonas, 11(1), 23-30.

A.J. Reinecke, S.A. Viljoen, R.J. Saayman, The suitability of Eudrilus eugeniae, perionyx excavatus and Eisenia fetida (Oligochaeta) for vermicomposting in southern africa in terms of their temperature requirements, Soil Biology and Biochemistry, Volume 24, Issue 12, 1992, Pages 1295-1307, ISSN 0038-0717, https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90109-B.

Blanchart, E., Albrecht, A., Chevallier, T., & Hartmann, C. (2004). The respective roles of roots and earthworms in restoring physical properties of Vertisol under a Digitaria decumbens pasture (Martinique, WI). Agriculture, ecosystems & environment, 103(2), 343-355.

Buch, A. C., Brown, G. G., Niva, C. C., Sautter, K. D., & Lourençato, L. F. (2011). Life cycle of Pontoscolex corethrurus () in tropical artificial soil. Pedobiologia, 54, S19-S25.

Coulis, M., Joly, F.X., 2017. Allometric equations for estimating fresh biomass of five soil macroinvertebrate species from neotropical agroecosystems. European Journal of Soil Biology 83, 18–26.

Decaëns, T., Porco, D., James, S. W., Brown, G. G., Chassany, V., Dubs, F., ... & Roy, V. (2016). DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm communities in remote tropical forests of French Guiana. *Soil Biology and Biochemistry*, *92*, 171-183.

Deutsch, Curtis A., et al. « Impacts of Climate Warming on Terrestrial Ectotherms across Latitude ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, nº 18, mai 2008, p. 6668-72, doi:10.1073/pnas.0709472105.

Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M. B., & Vrijenhoek, R. C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5), 294-299

Fragoso, C., & Rojas-Fernandez, P. (1996). Earthworms inhabiting bromeliads in Mexican tropical rainforests: ecological and historical determinants. Journal of tropical ecology, 729-734.

Gates GE . 1982. Farewell to North American megadriles. Megadrilogica. 4: 12-77.

Hendrix P.F., Baker G.H., Callahan M.A.Jr., Damoff G.A., Fragoso C., Gonzalez G., James S. W., Lachnicht S.L., Winsome T. & Zou X., 2006. Invasion of exotic earthworms into ecosystems inhabited by native earthworms. Biological Invasions, 8: 1287–1300/

James, S. W., et al. « Comment on "Global Distribution of Earthworm Diversity" ». *Science*, vol. 371, nº 6525, janvier 2021, p. eabe4629, doi:10.1126/science.abe4629.

James, Samuel W., et al. « DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity in Lumbricus Terrestris L., 1758 (Clitellata): Resurrection of L. Herculeus (Savigny, 1826) ». *PLOS ONE*, vol. 5, nº 12, déc 2010, p. e15629, doi:10.1371/journal.pone.0015629.

James, Samuel W., et Franciane Gamiette. « New Species of Dichogaster Beddard, 1888 (Clitellata: Benhamiidae) with Additional Records of Earthworms from Guadeloupe (French West Indies) ». *Zootaxa*, vol. 4178, nº 3, octobre 2016, p. 391-408, doi:10.11646/zootaxa.4178.3.5.

Kekkonen, Mari, et al. « Delineating Species with DNA Barcodes: A Case of Taxon Dependent Method Performance in Moths ». *PLOS ONE*, vol. 10, nº 4, avr 2015, p. e0122481, doi:10.1371/journal.pone.0122481.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of molecular evolution, 16(2), 111-120.

King, R. Andrew, et al. « Opening a Can of Worms: Unprecedented Sympatric Cryptic Diversity within British Lumbricid Earthworms ». *Molecular Ecology*, vol. 17, nº 21, 2008, p. 4684-98, doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x.

Kumar, Sudhir, et al. « MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms ». *Molecular Biology and Evolution*, édité par Fabia Ursula Battistuzzi, vol. 35, nº 6, juin 2018, p. 1547-49, doi:10.1093/molbev/msy096.

Lavelle, P., Kohlmann, B., 1984. Etude quantitative de la macrofaune du sol dans une forêt tropicale humide du Mexique (Bonampak, Chiapas). Pedobiologia 27,377e393.

Lee, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. Trends in ecology & evolution, 17(8), 386-391.

Letunic, Ivica, et Peer Bork. « Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments ». *Nucleic Acids Research*, vol. 47, nº W1, juillet 2019, p. W256-59, doi:10.1093/nar/gkz239.

Loranger, G., et al. « Impact of Earthworms on the Diversity of Microarthropods in a Vertisol (Martinique) ». *Biology and Fertility of Soils*, vol. 27, nº 1, mai 1998, p. 21-26, doi:10.1007/s003740050394.

Maggia, Marie-Eugénie, et al. *At Each Site Its Diversity: DNA Barcoding Reveals Remarkable Earthworm Diversity in Neotropical Rainforests of French Guiana*. preprint, Ecology, 23 septembre 2020, doi:10.1101/2020.09.21.307348.

Mathieu, J., Barot, S., Blouin, M., Caro, G., Decaëns, T., Dubs, F., ... & Nai, P. (2010). Habitat quality, conspecific density, and habitat pre-use affect the dispersal behaviour of two earthworm species, Aporrectodea icterica and Dendrobaena veneta, in a mesocosm experiment. Soil Biology and Biochemistry, 42(2), 203-209.

Porco, David, et al. « Biological Invasions in Soil: DNA Barcoding as a Monitoring Tool in a Multiple Taxa Survey Targeting European Earthworms and Springtails in North America ». *Biological Invasions*, vol. 15, nº 4, avril 2013, p. 899-910, doi:10.1007/s10530-012-0338-2.

Puillandre, Nicolas, et al. « ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning ». *Molecular Ecology Resources*, vol. 21, nº 2, 2021, p. 609-20, doi:https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281.

« ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning ». *Molecular Ecology Resources*, vol. 21, nº 2, 2021, p. 609-20, doi:https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281.

Ratnasingham, Sujeevan, et Paul D. N. Hebert. « A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System ». *PLOS ONE*, vol. 8, nº 7, juil 2013, p. e66213, doi:10.1371/journal.pone.0066213.

Reinecke, A. J., Viljoen, S. A., & Saayman, R. J. (1992). The suitability of Eudrilus eugeniae, Perionyx excavatus and Eisenia fetida (Oligochaeta) for vermicomposting in southern Africa in terms of their temperature requirements. Soil Biology and Biochemistry, 24(12), 1295-1307.

Richard, B., et al. « Re-Integrating Earthworm Juveniles into Soil Biodiversity Studies: Species Identification through DNA Barcoding ». *Molecular Ecology Resources*, vol. 10, nº 4, 2010, p. 606-14, doi:https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02822.x.

Rodriguez, C., Borges, S., Martinez, M.A., Fragoso, C., James, S.W., Gonzalez, G., 2007. Biodiversidad y ecologia de las lombrices de tierra en las islas caribenas. In: Brown, G.G., Fragoso, C. (Eds.), Minhocas na America Latina: biodiversidade e ecologia Embrapa, Curitiba, pp. 79e108.

Rougerie, Rodolphe, et al. « DNA barcodes for soil animal taxonomy ». *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 44, nº 8, 2009, p. 789-802, doi:10.1590/S0100-204X2009000800002.

Saitou, N., et M. Nei. « The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. » *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, nº 4, juillet 1987, p. 406-25, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Schwert, D. P. (1980). Active and passive dispersal of lumbricid earthworms. In International Soil Zoology Colloquium (Vol. 7, No. 29, pp. 182-189).

Smith, M. Alex, et al. « DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 360, nº 1462, octobre 2005, p. 1825-34, doi:10.1098/rstb.2005.1714.

Stephenson J (1930) The Lumbricidae. Clarendon Press,Oxford

Taheri, S., Pelosi, C., & Dupont, L. (2018). Harmful or useful? A case study of the exotic peregrine earthworm morphospecies Pontoscolex corethrurus. Soil Biology and Biochemistry, 116, 277-289.

Tennekes, Martijn. « **Tmap** : Thematic Maps in *R* ». *Journal of Statistical Software*, vol. 84, nº 6, 2018, doi:10.18637/jss.v084.i06.

Terhivuo, J., & Saura, A. (2006). Dispersal and clonal diversity of North-European parthenogenetic earthworms. In Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species (pp. 5-18). Springer, Dordrecht.

Tobin, P. C., Berec, L., & Liebhold, A. M. (2011). Exploiting Allee effects for managing biological invasions. Ecology letters, 14(6), 615-624.

UICN France (2015). Synthèse des assises nationales « espèces exotiques envahissantes vers un renforcement des stratégies d'action » - Orléans, 23, 24 et 25 septembre 2014. Paris, France. 77 pages

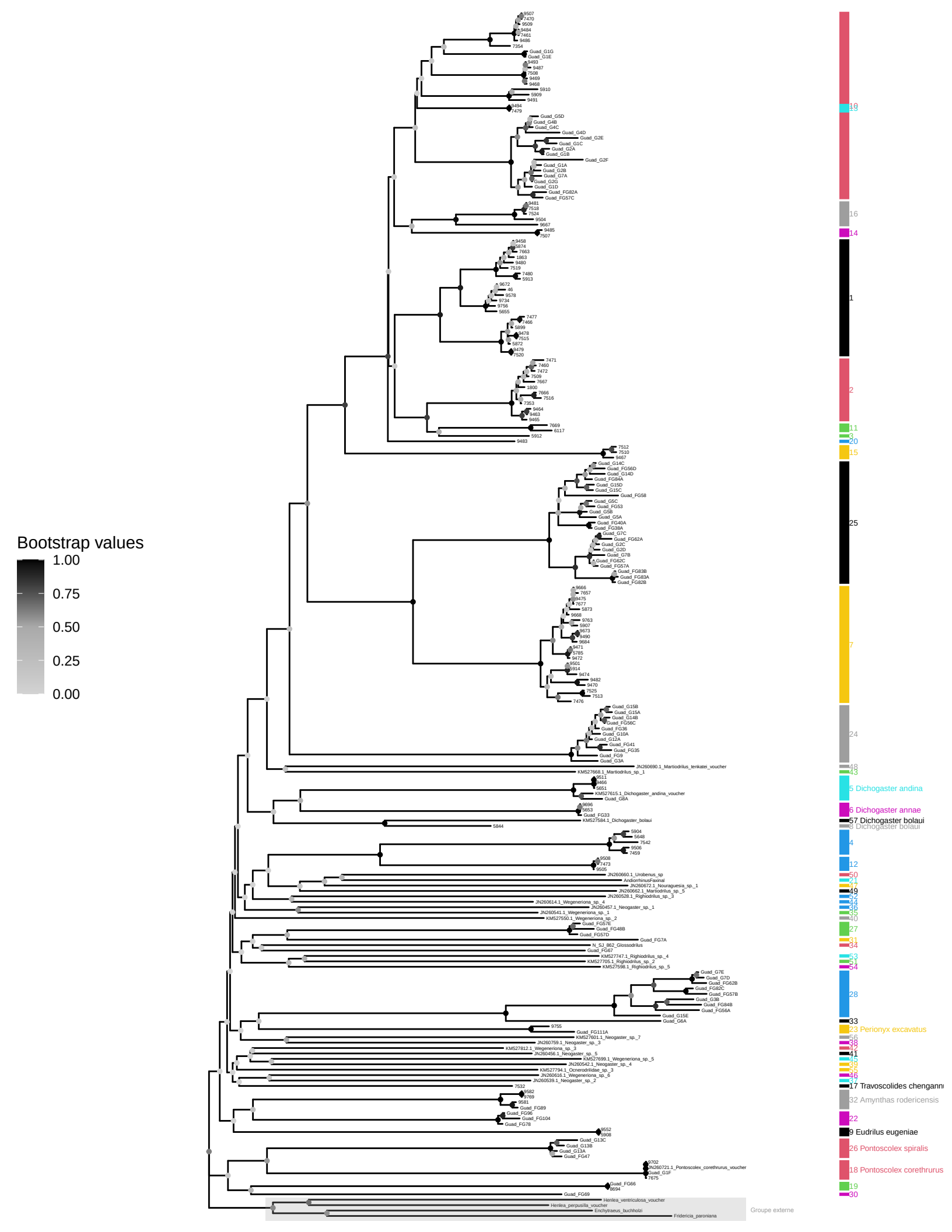
Yu, Guangchuang. « Using Ggtree to Visualize Data on Tree-Like Structures ». *Current Protocols in Bioinformatics*, vol. 69, nº 1, 2020, p. e96, doi:https://doi.org/10.1002/cpbi.96.

Zhang, A. B., et P. Savolainen. « BPSI2.0: A C/C++ Interface Program for Species Identification via DNA Barcoding with a BP-Neural Network by Calling the Matlab Engine ». *Molecular Ecology Resources*, vol. 9, nº 1, 2009, p. 104-06, doi:https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02372.x.

Zhang, Ai-bing, et al. « BarcodingR: An Integrated r Package for Species Identification Using DNA Barcodes ». *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 8, nº 5, 2017, p. 627-34, doi:https://doi.org/10.1111/2041-210X.12682.

ANNEXES

Figure 1 : Arbre phylogénétique en Neighbors Joining de la librairie de référence. Les MOTUs identifiés par la méthode de délimitation ASAP ont été regroupés par des barres de différentes couleurs associées à chacun des clades.


Bootstrap values
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Groupe externe
5 Dichogaster andina
6 Dichogaster annae
57 Dichogaster bolaui
8 Dichogaster bolaui
17 Travoscolides chengann
32 Amynthas rodericensis
9 Eudrilus eugeniae
26 Pontoscolex spiralis
18 Pontoscolex corethrurus