Etude pilote pour la détection des espèces de Mammifères semi-aquatiques par l'approche Metabarcoding ADNe

Julien Steinmetz
(Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, julien.steinmetz@oncfs.gouv.fr),
Thomas Ruys (Cistude nature), Pauline Jean (SPYGEN),
Sandrine Ruette (ONCFS), Tony Dejean (SPYGEN)

Objectifs

Objectif général : Evaluer la faisabilité d'un inventaire spatial et temporel de la communauté de Mammifères semi-aquatiques dans les milieux stagnants.

12 espèces cibles

Nom vernaculaire	Nom scientifique
Campagnol amphibie	*Arvicola sapidus*
Castor d'Eurasie	*Castor fiber*
Desman des Pyrénées	*Galemys pyrenaicus*
Loutre d'Europe	*Lutra lutra*
Vison d'Europe	*Mustela lutreola*
Putois	*Mustela putorius*
Ragondin	*Myocastor coypus*
Crossope aquatique	*Neomys fodiens*
Vison d'Amérique	*Neovison vison*
Rat musqué	*Ondatra zibethicus*
Raton laveur	*Procyon lotor*
Rat surmulot	*Rattus norvegicus*

Etude multi-partenariale

Les mammifères semi-aquatiques

Des espèces cibles aux profils variés

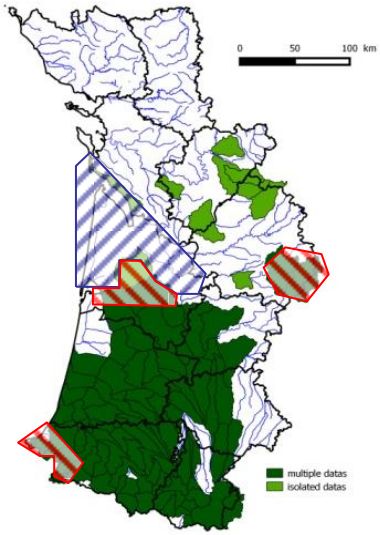
Statut :

• Espèces protégées (3 Plans Nationaux d'Actions)

Desman :
Objectif 1 : améliorer les connaissances biologiques et les outils d'étude sur le Desman des Pyrénées

Vison d'Europe :
Données fortuites < 10 voire 5 par an
Piégeage ciblé : 1000 à 3000 nuits pièges par capture

• Espèces exogènes
(Ragondin, Rat musqué, Raton laveur, Vison d'Amérique)



Les mammifères semi-aquatiques

Des espèces cibles aux profils variés

Biologie :

• Caractère aquatique plus ou moins marqué (Castor > Raton-laveur)

• Densité plus ou moins forte liée
(Tucker et al, 2014 : Evolutionary predictors of mammalian home range size)

o à la masse corporelle :
Loutre : densité de 0.1 à 0.5 individu par km de rivière
Desman : densité de 5 à 10 individus par km de rivière

o au niveau trophique :
Ragondin : une dizaine d'individus par hectare

o au comportement social

Etude pilote ADNe et mammifères semi-aquatiques

Le but de cette étude était de répondre aux questions suivantes :

- En présence avérée des différences espèces étudiées, est-il possible de les détecter à partir de l'ADN qu'elles libèrent dans l'eau ?

- La détectabilité par l'ADN est-elle la même en fonction des espèces ?

- La stratégie d'échantillonnage influence-t-elle la détectabilité des espèces ?

2013 : Développement de la base de référence génétique

2014 : Première série de tests afin de valider l'approche metabarcoding

2015-2016 : Quatre protocoles correspondant à des questionnements particuliers

Etude pilote ADNe et mammifères semi-aquatiques

Première série de tests en 2014

Liste des espèces de Mammifères semi-aquatiques détectées dans chaque échantillon et nombre de séquences ADN associées ; en rouge les espèces observées lors du prélèvement ou quelques jours avant ; en vert les espèces dont la présence est connue sur le site.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Cistude Nature	ONCFS 2014-33-1	ONCFS 2014-12-1	ONCFS 2014-40-1	ONCFS 2014-33-2	ONCFS 2014-33-3	ONCFS 2014-37-1	ONCFS 2014-17-1
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie	6650	51230		1548	22729			3637
Castor fiber	Castor d'Eurasie							12099	
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées								
Lutra lutra	Loutre d'Europe								
Mustela lutreola	Vison d'Europe								
Mustela putorius	Putois								
Myocastor coypus	Ragondin	134975	35916	17433	2172	12520	43147	4966	13638
Neomys fodiens	Crossope aquatique								
Neovison vison	Vison d'Amérique								
Ondatra zibethicus	Rat musqué	6279	15062			3900	46089		10021
Procyon lotor	Raton laveur								
Rattus norvegicus	Rat surmulot	1396	12073	5109		6116	49882		

=> Validation globale de la démarche

=> Adaptation (à la marge) du protocole de prélèvement

=> Nécessité de renouveler ces tests sur des secteurs de présence certaine des espèces notamment carnivores

2015-2016 : Test sur Vison Europe captifs

Objectif : valider la détection des Visons d'Europe

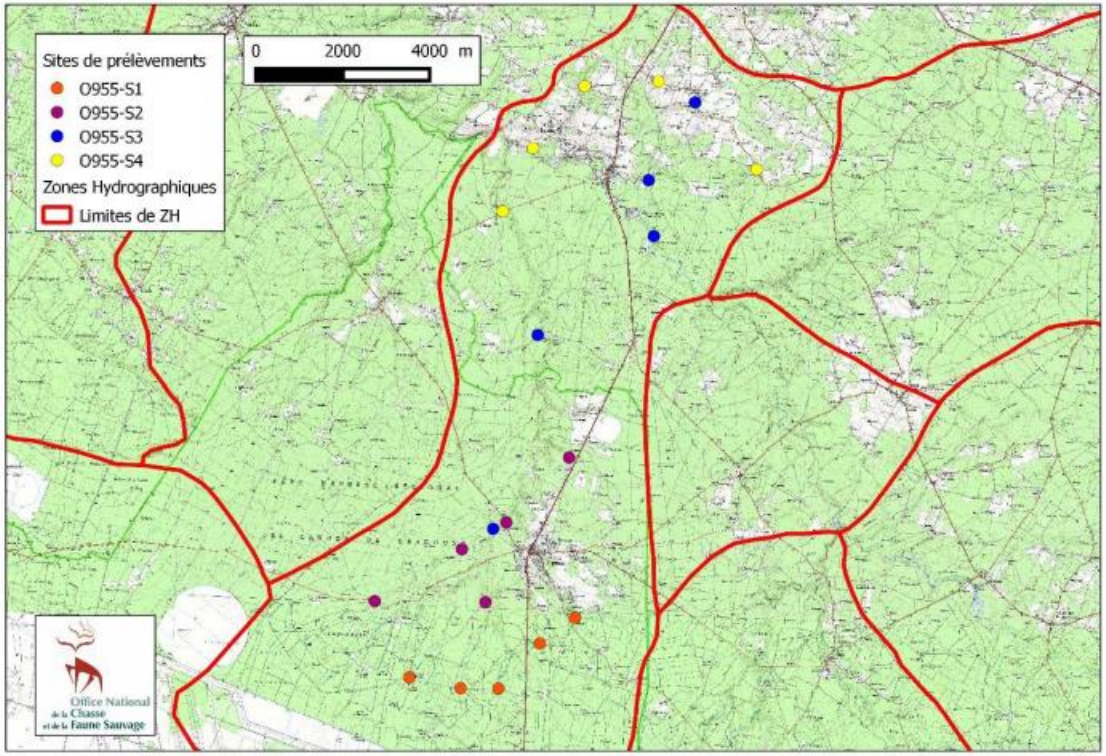
Détail d'un enclos de Vison d'Europe ; le bassin où ont été effectués les prélèvements est visible en haut à gauche.

	Porosité capsule de filtration	0,45µm	1µm
Nom scientifique	Nom vernaculaire	WF150591	WF150818
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie		
Castor fiber	Castor d'Eurasie		
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées		
Lutra lutra	Loutre d'Europe		
Mustela lutreola	Vison d'Europe	160916	93804
Mustela putorius	Putois		
Myocastor coypus	Ragondin		
Neomys fodiens	Crossope aquatique		
Neovison vison	Vison d'Amérique		
Ondatra zibethicus	Rat musqué		
Procyon lotor	Raton laveur		
Rattus norvegicus	Rat surmulot		

2015-2016 : Test à l'échelle d'un bassin versant (PNA VE)

Objectif : Utilisation de l'ADNe pour inventorier les petits mustélidés à l'échelle du bassin versant ?

5 bassins : 3 réplicas temporels avec à chaque passage
4 capsules filtrant chacune 12 L d'eau (= 5 sites de prélèvement par capsule)



2015-2016 : Test à l'échelle d'un bassin versant (PNA VE)

Résultats sur les espèces cibles :

N=60 capsules testées
(12 Putois, 24 Vison Europe et 24 Vison Amérique)
2 réponses positives à l'espèce cible
58 réponses négatives à l'espèce cible

: Liste des espèces de Mammifères semi-aquatiques détectées dans chaque échantillon du bassin Q216 et nombre de séquences ADN associées ; en vert les indices de présence de Loutre observés sur le terrain, en rouge les détections de l'espèce cible par ADNe.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Q216-S1			Q216-S2			Q216-S3			Q216-S4		
		Session 1	Session 2	Session 3	Session 1	Session 2	Session 3	Session 1	Session 2	Session 3	Session 1	Session 2	Session 3
		WF151157	WF151179	WF151171	WF151167	WF151174	WF151175	WF151162	WF151176	WF151169	WF151158	WF151180	WF151173
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie		394		4 620						720	8 174	7 316
Castor fiber	Castor d'Eurasie												
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées												
Lutra lutra	Loutre d'Europe				3 609							1 240	
Mustela lutreola	Vison d'Europe												
Mustela putorius	Putois												
Myocastor coypus	Ragondin	28 461	21 392	49 546	81 818	37 180	107 108	93 666	101 269	51 925	136 659	131 960	63 504
Neomys fodiens	Crossope aquatique										430		
Neovison vison	Vison d'Amérique	1 458							4 349				
Ondatra zibethicus	Rat musqué												
Procyon lotor	Raton laveur												
Rattus norvegicus	Rat surmulot				2 205	13 195	8 999				202		

2015-2016 : Test à l'échelle d'un bassin versant (PNA VE)

Résultats réplicas temporels :

Occurrence de chaque espèce de Mammifère semi-aquatique sur les vingt secteurs étudiés. Les pourcentages sont exprimés par rapport au nombre de secteurs ayant au minimum une occurrence de l'espèce. La colonne « Aucune occurrence » correspond soit à la non-détection de l'espèce alors qu'elle est présente, soit à son absence du territoire étudié.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Nombre d'occurrences sur les 3 réplicas temporels pour un secteur donné						
		Aucune occurrence	1 occurrence		2 occurrences		3 occurrences	
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie	4	4	25%	2	13%	10	63%
Castor fiber	Castor d'Eurasie	20						
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées	20						
Lutra lutra	Loutre d'Europe	10	8	80%	2	20%		0%
Mustela lutreola	Vison d'Europe	20						
Mustela putorius	Putois	20						
Myocastor coypus	Ragondin	0		0%	1	5%	19	95%
Neomys fodiens	Crossope aquatique	13	5	71%	1	14%	1	14%
Neovison vison	Vison d'Amérique	18	2	100%		0%		0%
Ondatra zibethicus	Rat musqué	7	2	15%	2	15%	9	69%
Procyon lotor	Raton laveur	20						
Rattus norvegicus	Rat surmulot	3	2	12%	2	12%	13	76%

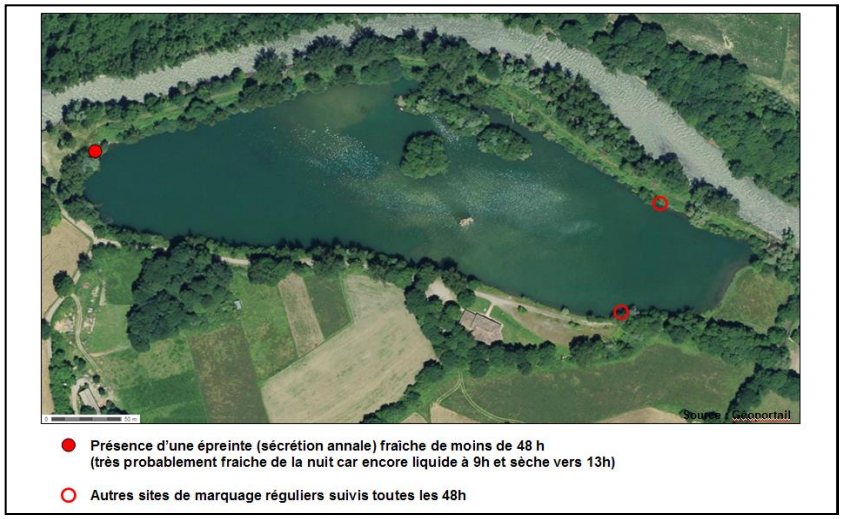
Répartition spatiale de l'ADNe dans un milieu stagnant

Espèce cible : Loutre

2 sites d'études

Lac 1
Site témoin

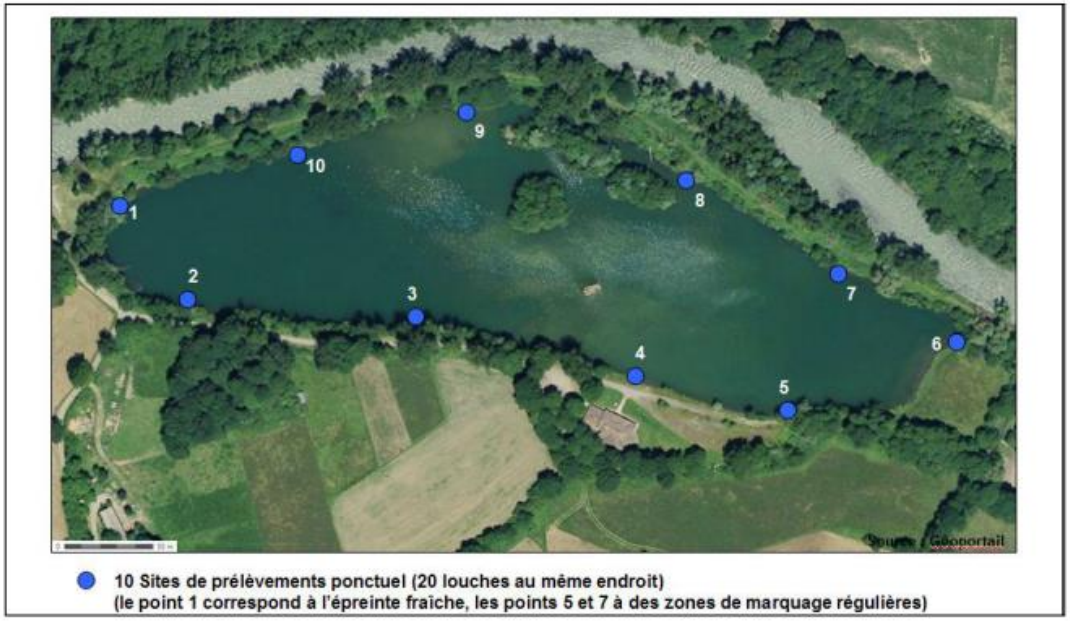
Lac 2



Répartition spatiale de l'ADNe dans un milieu stagnant

Site n°1 :
- 3 réplicas simultanément suivant le protocole standard (20 prélèvements de 120ml répartis autour du lac et filtration dans une seule capsule)

Site n°2 :
- 10 prélèvements ponctuels de 2,4L répartis autour du lac
- 3 réplicas simultanément suivant le protocole standard



Répartition spatiale de l'ADNe dans un milieu stagnant

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Site 2									
		Prélèvemt 1	Prélèvemt 2	Prélèvemt 3	Prélèvemt 4	Prélèvemt 5	Prélèvemt 6	Prélèvemt 7	Prélèvemt 8	Prélèvemt 9	Prélèvemt 10
		SPY1600039	SPY1600040	SPY1600041	SPY1600042	SPY1600043	SPY1600044	SPY1600045	SPY1600046	SPY1600047	SPY1600048
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie							11 047			
Castor fiber	Castor d'Eurasie										
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées										
Lutra lutra	Loutre d'Europe										
Mustela lutreola	Vison d'Europe										
Mustela putorius	Putois										
Myocastor coypus	Ragondin	53 060		5 921		102 836	54 090	95 495	92 778	65 723	50 119
Neomys fodiens	Crossope aquatique										
Neovison vison	Vison d'Amérique										
Ondatra zibethicus	Rat musqué					1 912					
Procyon lotor	Raton laveur										
Rattus norvegicus	Rat surmulot			17 933	1 145	429					

Détection de l'espèce cible :
Loutre jamais détectée sur aucun des deux sites

=> Effet des températures ?

Répartition spatiale de l'ADN des Mammifères semi-aquatiques
4 espèces avec les 10 prélèvements localisés
vs 2 espèces avec les prélèvements standard

=> Nécessité d'utiliser plusieurs kits sur de grands sites

2015-2016 : Tests sur différents sites

Objectif : tester la méthode sur des sites variés accueillant l'ensemble des espèces cibles

	Espèce cible	Vison d'Europe		Castor d'Eurasie		Raton laveur	
Nom scientifique	Nom vernaculaire	WF151181	WF151184	WF151182	WF151185	WF151187	WF151195
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie						
Castor fiber	Castor d'Eurasie	30 471		1 522	33 906		
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées						
Lutra lutra	Loutre d'Europe						
Mustela lutreola	Vison d'Europe						
Mustela putorius	Putois						
Myocastor coypus	Ragondin			3 966	28 624	40 542	5 161
Neomys fodiens	Crossope aquatique						
Neovison vison	Vison d'Amérique						
Ondatra zibethicus	Rat musqué					4 422	152
Procyon lotor	Raton laveur					111	3 702
Rattus norvegicus	Rat surmulot					2 701	

	Espèce cible	Campagnol amphibie		Desman des Pyrénées	Vison d'Amérique	Crossope aquatique	
Nom scientifique	Nom vernaculaire	WF151191	WF151192	WF151189	WF151186	SPY1602322	SPY1602328
Arvicola sapidus	Campagnol amphibie	4 794	28 029				
Castor fiber	Castor d'Eurasie						
Galemys pyrenaicus	Desman des Pyrénées						
Lutra lutra	Loutre d'Europe				196		
Mustela lutreola	Vison d'Europe						
Mustela putorius	Putois						
Myocastor coypus	Ragondin	23 918	40 264			6 428	
Neomys fodiens	Crossope aquatique						
Neovison vison	Vison d'Amérique						
Ondatra zibethicus	Rat musqué	31 064					
Procyon lotor	Raton laveur						
Rattus norvegicus	Rat surmulot	8 897	2 819				

Bonne détection des espèces de rongeurs
Mauvaise détection des espèces de carnivores et d'insectivores

Etude pilote ADNe et mammifères semi-aquatiques

Principaux éléments de conclusion

- Détectabilité des espèces

  Rongeurs versus Carnivores

- Localisation de l'ADNe dans un milieu stagnant

- Complémentarité de l'approche Metabarcoding ADNe avec les approches classiques

  - les espèces relativement faciles à identifier sur un site par un inventaire classique avec des indices de présence : c'est le cas du Castor d'Eurasie, de la Loutre d'Europe et du Ragondin.

  - les espèces pour lesquelles la détectabilité par des indices de présence est plus faible : c'est le cas du Campagnol amphibie, du Raton-laveur, du Rat musqué, du Rat surmulot et du Desman des Pyrénées

  - les espèces les plus élusives, très difficiles à identifier sur le terrain (indices de présence impossibles à attribuer avec certitude à une espèce) : c'est le cas du Vison d'Europe, du Putois, du Vison d'Amérique et de la Crossope aquatique

Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage

Merci pour votre attention