



# Vers une nouvelle méthode de détection des espèces de mammifères semi-aquatiques : étude pilote et approche « Metabarcoding ADN »



© SPYGEN

**JULIEN STEINMETZ<sup>1</sup>,  
SANDRINE RUETTE<sup>2</sup>,  
THOMAS RUYS<sup>3</sup>,  
PAULINE JEAN<sup>4</sup>,  
TONY DEJEAN<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ONCFS, Délégation régionale Occitanie, Cellule technique Sud-Ouest – Toulouse.

<sup>2</sup> ONCFS, Direction de la recherche et de l'expertise, Unité Prédateurs et animaux déprédateurs – Birieux.

<sup>3</sup> Cistude Nature – Chemin du Moulinat, 33185 Le Haillan.

<sup>4</sup> SPYGEN – 17, rue du Lac Saint-André, 73370 Le Bourget-du-Lac.

*Le développement de techniques permettant la détection de fragments d'ADN présents dans l'environnement ouvre des perspectives nouvelles pour l'étude et le suivi de la biodiversité. Ces méthodes d'investigation de pointe ont déjà donné des résultats très prometteurs pour de nombreux groupes d'espèces en milieu aquatique. Devant les attentes d'amélioration des connaissances sur la répartition de certaines espèces de mammifères, notamment le vison d'Europe, nous avons cherché à évaluer les possibilités d'application de ces techniques au groupe des mammifères semi-aquatiques.*

## « Metabarcoding ADN », une technique récente et prometteuse

L'identification d'espèces et la connaissance de leur répartition dans l'environnement sont à la base de toute mesure de gestion et de conservation des populations. Pour certaines espèces dites élusives de par leur faible taille, leur comportement discret ou leur rareté, la vérification même de leur présence par des méthodes traditionnelles d'inventaire (observations, indices de présence...) peut requérir des moyens impossibles à mettre en œuvre à grande échelle spatiale et temporelle. Récemment, l'étude de l'ADN environnemental (ADNe), couplée aux techniques de séquençage nouvelle génération (« Metabarcoding »), a émergé comme un complément pertinent aux méthodes traditionnelles d'inventaire de la biodiversité. Le principe général de cette approche repose sur la détection de courts fragments d'ADN libérés par les espèces dans leur environnement (*via* l'urine, les fèces, le mucus, les gamètes...). En prélevant des échantillons environnementaux (eau, sol...), il est alors possible de connaître les communautés présentes dans le milieu étudié à partir de cet ADN présent en quantités infimes.

Chez les vertébrés, les premiers travaux sont relativement récents et ont permis par exemple de dresser la carte de répartition d'une espèce exotique envahissante d'amphibien en Dordogne, la grenouille taureau *Lithobates catesbeianus* (Dejean *et al.*, 2012). Depuis lors, des études ont été menées sur les communautés de poissons, d'amphibiens et de mammifères marins (Civade *et al.*, 2016 ; Valentini *et al.*, 2016). Pour ces groupes d'espèces, les premiers travaux sont extrêmement prometteurs et la technique commence à être utilisée en routine et à large échelle dans certains cas (AFB, 2018).

### Quel intérêt pour les mammifères semi-aquatiques ?

La communauté des mammifères semi-aquatiques, c'est-à-dire plus ou moins inféodés aux zones humides dulçaquicoles, compte une quinzaine d'espèces en France. Parmi les espèces natives, trois sont menacées en France et ont fait l'objet d'un Plan national d'actions (PNA) : le vison d'Europe *Mustela lutreola*, la loutre d'Europe *Lutra lutra* et le desman des Pyrénées *Galemys pyrenaicus*. Le suivi de leur répartition représente un enjeu évident et déterminant pour l'évaluation de leur statut de conservation, mais également pour la priorisation des actions de

conservation. Pour cela, les outils simples, peu coûteux et applicables à large échelle spatiale et temporelle font le plus souvent défaut. Pour les espèces exogènes, comme le vison d'Amérique *Neovison vison* ou le raton laveur *Procyon lotor*, là encore le suivi de leur répartition est indispensable afin de définir des mesures de gestion. Disposer d'un outil d'inventaire performant, applicable à vaste échelle et permettant de détecter simultanément la présence de plusieurs espèces offrirait de nouvelles perspectives pour mieux comprendre les processus écologiques fondamentaux (syntopie, compétition, déplacement de niches écologiques...) régissant la coexistence ou l'exclusion de ces espèces.

Afin de tester la méthode « Metabarcoding ADN » dans le cadre du PNA vison d'Europe et pour la détection au sens large des mammifères semi-aquatiques, une collaboration a été mise en place entre l'ONCFS, la Direction régionale de l'environnement, de l'aménagement et du logement (DREAL) Nouvelle-Aquitaine, l'association Cistude Nature, le Laboratoire de Biométrie et Biologie évolutive (LBBE, Université Lyon 1) et un laboratoire spécialisé dans l'étude de l'ADNe, SPYGEN. Une étude pilote a été conduite dans l'objectif d'évaluer la faisabilité d'un inventaire spatial et temporel de la communauté de mammifères semi-aquatiques, par l'élaboration et l'utilisation d'un outil de diagnostic multi-spécifique permettant la détection de ces espèces dans les écosystèmes français.

### Première étape, la base de références génétiques

Douze espèces de mammifères semi-aquatiques ont été sélectionnées pour développer la base de références génétiques (**tableau 1**), à partir de tissus collectés par l'ONCFS. Ces espèces présentent en réalité un caractère aquatique plus ou moins prononcé, certaines d'entre elles passant le plus clair de leur temps dans l'eau ou à proximité immédiate (loutre d'Europe, castor d'Eurasie), tandis que d'autres fréquentent plutôt ses abords (vison, raton laveur, putois). La densité d'individus dans l'environnement est extrêmement variable également, en fonction notamment de la taille des domaines vitaux et du comportement social propre à chaque espèce (territorialité plus ou moins marquée, taille des groupes sociaux variable). En conséquence, la détectabilité était susceptible de ne pas être la même pour chacune de ces espèces.

**Tableau 1** Liste des 12 espèces de mammifères semi-aquatiques concernées par la base de références génétiques.

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

### Une étude pilote sur le terrain

Le but de l'étude pilote était de répondre à plusieurs questions.

- 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 libéré dans l'eau est-elle la même en fonction des espèces ?
- La stratégie d'échantillonnage (quantité d'eau prélevée, répartition spatiale des prélèvements) influence-t-elle la détectabilité des espèces ?

Les sites échantillonnés dans le cadre de ce projet étaient uniquement des milieux aquatiques stagnants, afin d'optimiser la détection de l'ADN des espèces recherchées. En effet, dans un milieu lotique (eau vive), l'ADN est directement emporté par le courant, alors que dans un milieu lentique (eau calme), il est retenu et peut être détecté plusieurs jours après la disparition de l'espèce (Dejean *et al.*, 2011).

### 96 échantillons analysés selon la même méthode

L'étude s'est déclinée en plusieurs projets.

#### Projet 1 : vérifier la détectabilité de 12 espèces de mammifères semi-aquatiques

Vingt échantillons ont été dédiés spécifiquement à l'étude de la détectabilité de chacune des 12 espèces cibles. Ces échantillons correspondent à des prélèvements effectués sur des sites où l'espèce cible était réputée présente (capture

## ► Encadré • La méthode de prélèvement et d'analyse des échantillons



▲ Filtration de l'eau par écoulement dans une capsule équipée d'une membrane de faible porosité.

Dans le protocole d'échantillonnage standard pour les milieux aquatiques stagnants, un échantillon est constitué de 20 prélèvements de 120 ml d'eau effectués à l'aide d'une louche et répartis tout autour du site étudié (dans les habitats favorables aux espèces recherchées). Ces 20 prélèvements sont ensuite mélangés dans un sachet stérile. Les 2,4 l d'eau ainsi prélevés sont ensuite passés à l'aide d'une seringue à travers une capsule de filtration de faible porosité (0,45 µm), qui retient l'ADN. Du tampon de conservation est ajouté dans la capsule, puis elle est fermée et agitée vigoureusement. Ce protocole d'échantillonnage standard, proposé habituellement pour le suivi d'un site dont la taille est inférieure à 1 ha, a été adapté aux différents projets de cette étude pilote qui visait à expérimenter son utilisation à de plus vastes échelles.

En parallèle des prélèvements d'ADN, et dans la mesure du possible, les indices de présence des espèces de mammifères semi-aquatiques ont été notés pour chaque site.

Les échantillons ont ensuite été envoyés sans donner d'indication sur les espèces ciblées, de façon à ce que les analyses soient réalisées en aveugle. Les analyses moléculaires ont été faites dans les laboratoires de SPYGEN. Ces laboratoires ont été créés spécifiquement pour traiter des échantillons environnementaux contenant de l'ADN rare ou dégradé. Ils offrent un environnement de type « salle blanche », permettant d'éviter les contaminations extérieures et entre échantillons (cloisonnement des salles en fonction de la rareté de l'ADN, pressions différentielles des salles, mise en place d'UV...). L'ADN a été extrait des capsules, puis amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) à l'aide du couple d'amorces universel pour les mammifères. Pour chaque échantillon, 12 répliquats PCR ont été effectués. Différents contrôles sont faits au cours des manipulations pour vérifier l'absence de contamination des échantillons.

Les séquences d'ADN obtenues sont analysées avec des outils bio-informatiques permettant d'éliminer les erreurs dues à l'amplification ou au séquençage (à l'aide de différents filtres informatiques) et de comparer chaque séquence avec celles présentes dans la base de références mammifères créée dans le cadre de cette étude. Finalement, une liste d'espèces est établie avec le nombre de séquences d'ADN associées par taxon. Les résultats peuvent être interprétés en termes de présence/absence pour chaque espèce, et non de manière quantitative (**tableau 2**).

**Tableau 2** Exemple de résultats fournis par le laboratoire.

La valeur correspond au nombre de séquences ADN identifiées par taxon. En rouge, les espèces observées lors du prélèvement ou quelques jours avant ; en vert, les espèces dont la présence est connue sur le site, mais sans indice de présence récent.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
<i>Arvicola sapidus</i>	Campagnol amphibie	6650	51230	
<i>Castor fiber</i>	Castor d'Eurasie			
<i>Galemys pyrenaicus</i>	Desman des Pyrénées			
<i>Lutra lutra</i>	Loutre d'Europe			
<i>Mustela lutreola</i>	Vison d'Europe			
<i>Mustela putorius</i>	Putois d'Europe			
<i>Myocastor coypus</i>	Ragondin	134975	35916	17433
<i>Neomys fodiens</i>	Crossope aquatique			
<i>Neovison vison</i>	Vison d'Amérique			
<i>Ondatra zibethicus</i>	Rat musqué	6279	15062	
<i>Procyon lotor</i>	Raton laveur			
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat surmulot	1396	12073	5109

récente, observation d'indices frais de moins de 48 heures, espèce très régulièrement contactée sur le site). Un échantillon est formé par la filtration de 20 prélèvements de 120 ml répartis sur le site étudié (**encadré**). L'analyse de ces échantillons a permis de détecter les rongeurs (castor d'Eurasie, ragondin, rat musqué, rat surmulot et campagnol amphibie) et le raton laveur sur l'ensemble des sites où ces espèces étaient présentes, mais pas les carnivores (vison d'Europe, vison d'Amérique, putois d'Europe, loutre) ni les insectivores (crossope aquatique et desman des Pyrénées – **tableau 3**).

### Projet 2 : focus sur la détectabilité du vison d'Europe, du vison d'Amérique et du putois

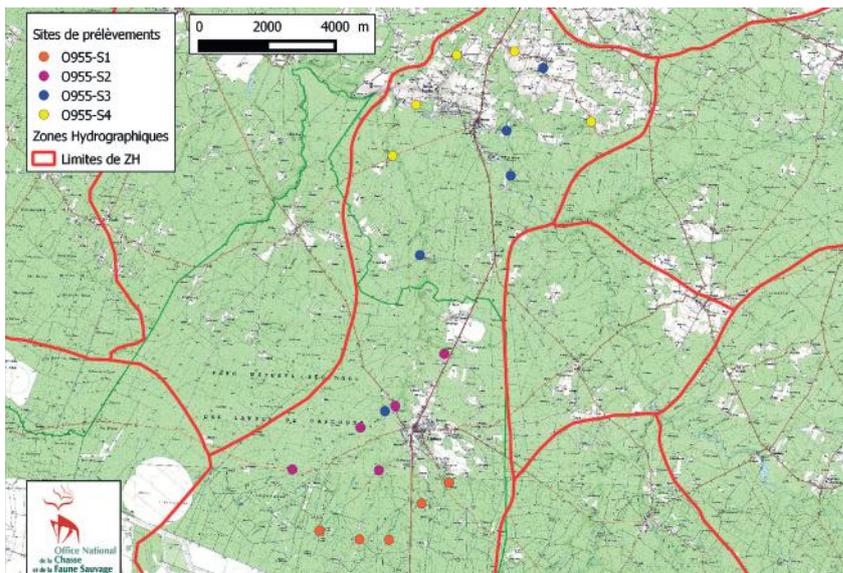
Soixante échantillons ont été dédiés à l'étude des potentialités d'utilisation à grande échelle de la méthode « Metabarcoding ADN » dans le cadre du PNA vison d'Europe, qui vise en premier lieu à améliorer la connaissance de l'aire de présence du vison d'Europe, mais également du vison d'Amérique et du putois. Pour ces petits mustélidés, nous avons travaillé à l'échelle du bassin versant (zone hydrographique de la base de données BD

Carthage ©). Un bassin versant présente en moyenne une surface de 60 km<sup>2</sup> sur la zone de présence potentielle de visons d'Europe. Cinq bassins versants ont été étudiés. Les espèces cibles étaient le vison d'Europe pour deux bassins, le vison d'Amérique pour deux bassins et le putois d'Europe pour un bassin. Sur chaque bassin versant, 20 sites de prélèvements ont été définis préalablement (incluant le site où la capture de l'animal avait eu lieu – **figure**). Ces sites ont été répartis de façon à couvrir l'ensemble des milieux stagnants présents sur le bassin versant. Ils présentaient des conditions favorables

**Tableau 3** Projet 1 : test de détectabilité selon les espèces.

Espèce cible	Nombre de prélèvements	Nombre de détections
Campagnol amphibie	4	4
Castor d'Eurasie	3	3
Desman des Pyrénées	1	0
Loutre d'Europe	1	0
Vison d'Europe	3	0
Putois d'Europe	1	0
Ragondin	1	1
Crossope aquatique	2	0
Vison d'Amérique	2	0
Rat musqué	-	-
Raton laveur	2	2
Rat surmulot	-	-

**Figure** Projet 2 : exemple de répartition des sites de prélèvements par bassin.



à leur utilisation régulière par les petits mustélidés semi-aquatiques (berges offrant des abris) et à la pérennité du matériel génétique (zones de courant faible voire absent). Sur chaque site, 2,4 l d'eau ont été prélevés selon le protocole standard. Afin de minimiser le nombre d'analyses génétiques, les prélèvements de plusieurs sites (5 sites constituent un secteur) ont été regroupés pour former un unique échantillon. Les prélèvements de ces cinq sites (12 l d'eau au total) ont été filtrés à travers une unique capsule à l'aide d'une pompe péristaltique pour faciliter le travail de l'opérateur. Quatre capsules ont donc été utilisées, soit quatre échantillons analysés, par bassin versant et par passage. Trois passages (réplicats temporels) ont été réalisés par bassin versant, avec un intervalle de temps n'excédant pas une à deux semaines entre

les passages. Sur les 60 échantillons, seuls deux ont permis de caractériser la présence de l'espèce cible, en l'occurrence celle du vison d'Amérique. Aucune analyse n'a mis en évidence la présence de vison d'Europe ou de putois.

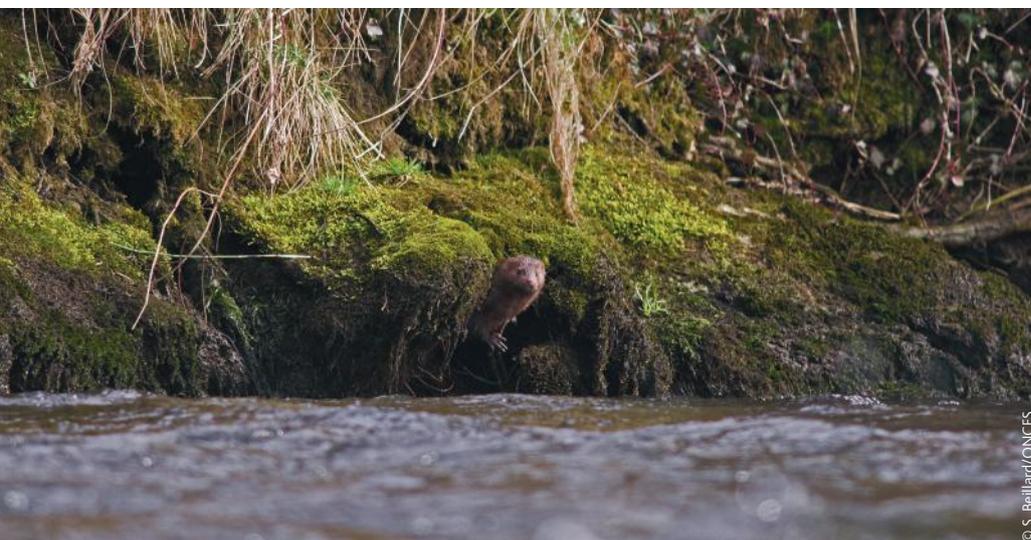
**Projet 3 : répartition spatiale de l'ADNe en milieux clos en prenant la loutre comme modèle**

Seize échantillons ont été analysés, afin d'évaluer la répartition spatiale de l'ADNe en milieu clos après le passage d'un carnivore. À cet effet, deux sites où la présence de la loutre d'Europe était avérée et récente ont été sélectionnés : un lac de 1,8 ha occupé en continu par une femelle et deux jeunes loutrons (site n° 1) et un lac de 4,8 ha sur lequel les prélèvements ont été effectués après découverte d'une

épreinte fraîche de moins de 48 heures (site n° 2). Sur les deux sites, trois échantillons ont été prélevés simultanément en suivant le protocole standard (**encadré**). En supplément, sur le site n° 2, 10 prélèvements ponctuels de 2,4 l ont été réalisés tout autour du site, correspondant donc à 10 échantillons (= 10 capsules). L'objectif était d'évaluer, en comparant les résultats pour ces dix échantillons, la répartition spatiale de l'ADN sur le site. Malgré une présence certaine de la loutre sur les deux sites étudiés, celle-ci n'a jamais été identifiée dans les échantillons, alors qu'elle a été détectée dans quatre des bassins versants étudiés pour le vison. Cependant, la détection de quatre espèces de rongeurs sur le site n° 2 a permis d'étudier la répartition de l'ADN autour de ce site.

**Une détectabilité très variable des différentes espèces**

Au travers des différents projets de cette étude pilote, les résultats semblent concordants : la détectabilité des rongeurs (campagnol amphibie, castor d'Eurasie, ragondin, rat musqué, rat surmulot) et du raton laveur est plus élevée que celle des carnivores (loutre d'Europe, vison d'Europe, putois, vison d'Amérique). Les résultats pour le desman et la crossope ne sont pas interprétables du fait d'un faible nombre de prélèvements. Les analyses d'échantillons ont permis de mettre en évidence à plusieurs reprises des espèces autres que l'espèce cible du site, notamment la loutre. Cependant, cette dernière n'a pas été détectée sur les plans d'eau où elle avait été observée (projet 3). Le nombre d'occurrences pour chaque espèce de mammifère semi-aquatique



▲ Dans le projet 2, la présence du vison d'Amérique a pu être détectée seulement à deux reprises parmi 60 échantillons analysés.

Tableau 4 Projet 2 : différence de détection selon les espèces.

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

dans le projet 2 est donné dans le **tableau 4**. Le campagnol amphibie, le ragondin, le rat musqué et le rat surmulot présentent un bon taux de détection ; ils sont détectés dans la majeure partie des échantillons lors des trois répliquats temporels (projet 2). Par contre, la loutre d'Europe, le vison d'Amérique et la crossope aquatique sont détectés de manière plus aléatoire sur ces répliquats.

Avec le protocole mis en œuvre, la méthode de « Metabarcoding ADN » permet donc à première vue de bien détecter les espèces de rongeurs, mais semble plus limitée pour la détection des carnivores. Cette différence de détectabilité pourrait s'expliquer par leurs densités respectives. Par essence, les proies sont plus nombreuses que les prédateurs, ce qui explique que leur ADN soit plus facilement détectable. De plus, certaines espèces comme la loutre d'Europe ou le vison d'Amérique possèdent des domaines vitaux de plusieurs kilomètres de réseau hydrographique (Larivière, 1999 ; Kuhn & Jacques, 2011), et sont donc parfois absentes d'un site donné pendant plusieurs jours. L'ADN étant amené à se dégrader au cours du temps, si l'espèce n'était pas présente sur le site lors de l'échantillonnage ou bien au cours des heures voire des jours précédents (à notre connaissance, aucune étude scientifique n'a encore été réalisée sur la persistance de l'ADN de mammifères dans l'eau), son ADN ne pourra pas être détecté dans le milieu.

Par exemple, sur l'un des bassins versants, la loutre est détectée sur le secteur 3 au premier passage, sur le secteur 1 au deuxième passage et sur le secteur 2 au troisième passage. Cette détection successive sur trois secteurs du même bassin

versant pourrait s'expliquer par un déplacement du ou des individus présents entre les trois passages. On observe le même phénomène sur un second bassin versant pour la loutre et le vison d'Amérique.

L'absence de détection de la loutre sur une zone où elle est bien établie et où elle a été observée pendant les prélèvements (projet 3) soulève cependant des questions. Cette espèce libère peut-être tout simplement trop peu d'ADN pour être détectée systématiquement. La détectabilité est peut-être variable aussi en fonction de la période d'échantillonnage, notamment l'hiver dans des eaux froides. Cette hypothèse est étayée par des résultats similaires (moins bonnes détections ou absence de détection) observés en hiver sur les poissons.



▲ **Projet 3** : les résultats obtenus sur le rat musqué (photo) et le surmulot confirment que l'ADN peut être très localisé sur un site et qu'il faut multiplier les prélèvements d'échantillons pour optimiser la détection des mammifères semi-aquatiques.

## Une méthode non applicable en l'état pour inventorier le vison d'Europe à large échelle

Dans le projet 2, la méthode de « Metabarcoding ADN » a permis de détecter l'espèce cible sur un seul des cinq bassins versants. Dans ce bassin, le vison d'Amérique a été détecté dans deux échantillons sur 12, correspondant à deux secteurs différents et à deux passages différents. Il s'agit d'une espèce qui peut atteindre des densités plus importantes dans la nature que le vison d'Europe et le putois, ce qui pourrait expliquer pourquoi il a été mieux détecté, les deux autres espèces n'ayant jamais été contactées au cours de l'étude. À ce sujet, des tests effectués en utilisant des animaux captifs ont validé la détection du vison d'Europe au travers des marqueurs génétiques et des bases de références utilisées lors de cette étude.

La détection de ces trois espèces par la méthode de « Metabarcoding ADN » reste cependant trop faible avec le protocole d'échantillonnage utilisé pour que cette méthode puisse être appliquée dans le cadre du PNA vison d'Europe.

## L'ADN de certaines espèces est très localisé

Sur le site n° 2 du projet 3, quatre espèces ont été détectées sur les 10 échantillons localisés autour du plan d'eau : le campagnol amphibie, le ragondin, le rat musqué et le rat surmulot ; alors que seules deux espèces ont été détectées dans les trois échantillons standards (mélange de prélèvements répartis autour du site) : le ragondin et le rat surmulot (**tableau 5**). La non-détection du

campagnol amphibie et du rat musqué dans les échantillons standards est attribuée à un effet de dilution, ces espèces passant sous le seuil de détectabilité avec cette méthode.

La répartition de l'ADN du rat musqué et du rat surmulot sur le site n'est pas étonnante (respectivement au niveau du point 5 et des points 3 à 5). En effet, des reliefs de repas de rat musqué ont été observés au niveau des points 5 et 6, et le rat surmulot est connu pour sa présence proche des habitations, ce qui est le cas entre les points 3 et 5.

Ces résultats confirment que l'ADN peut être très localisé en milieu clos et qu'il est important de faire des prélèvements réguliers tout autour du plan d'eau, afin de maximiser les chances de détection d'espèces de mammifères semi-aquatiques. Sur des étendues de plusieurs hectares, il est également essentiel d'utiliser plusieurs kits d'échantillonnage pour couvrir au mieux le périmètre du site étudié et éviter l'effet dilution de l'ADN. L'utilisation d'un bateau-drone préleveur pourrait être envisagée, afin de réaliser un échantillonnage en continu tout autour de la zone d'étude et d'augmenter le volume d'eau filtré.

## Bilan

La plupart des techniques d'inventaire dites « classiques », utilisées en routine pour les 12 espèces de mammifères semi-aquatiques ciblées, utilisent la recherche d'indices de présence (crottes, reliefs de repas, traces) dont la détectabilité est extrêmement variable selon les espèces.



© J. Steimetz/ONCFS

▲ Il est possible que la détectabilité des espèces par l'ADN soit plus faible en fonction de la période d'échantillonnage, notamment en hiver dans les eaux froides.

**Tableau 5** Projet 3 : liste des espèces de mammifères semi-aquatiques détectées dans chaque échantillon du site n° 2 et nombre de séquences ADN associées.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Site 2		
		Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
		SPY1600049	SPY1600050	SPY1600051
<i>Arvicola sapidus</i>	Campagnol amphibie			
<i>Castor fiber</i>	Castor d'Eurasie			
<i>Galemys pyrenaicus</i>	Desman des Pyrénées			
<i>Lutra lutra</i>	Loutre d'Europe			
<i>Mustela lutreola</i>	Vison d'Europe			
<i>Mustela putorius</i>	Putois d'Europe			
<i>Myocastor coypus</i>	Ragondin	46 867	30 138	
<i>Neomys fodiens</i>	Crossope aquatique			
<i>Neovison vison</i>	Vison d'Amérique			
<i>Ondatra zibethicus</i>	Rat musqué			
<i>Procyon lotor</i>	Raton laveur			
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat surmulot		25 738	

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

Ainsi, trois groupes d'espèces peuvent être distingués :

- 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. Pour ces espèces, l'utilisation de l'ADNe n'apportera que peu d'informations complémentaires dans le cadre de suivis spécifiques, dans l'état actuel des développements. En effet, pour le castor d'Eurasie et le ragondin, les indices sont très faciles à trouver. Pour la loutre d'Europe, l'approche « Metabarcoding ADNe » aurait pu apporter des informations sur des secteurs nouvellement colonisés, mais la détectabilité de l'espèce par cette approche reste aléatoire à l'heure actuelle et des tests complémentaires doivent être effectués ;
- 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. Au vu des résultats, l'utilisation de l'approche « Metabarcoding ADNe » permettrait d'apporter des éléments de connaissance sur la répartition de ces espèces (ce qui a déjà été le cas pour le suivi du campagnol amphibie en France), mais l'unique test effectué en milieu lentique sur le desman ne s'est pas révélé concluant ;
- les espèces les plus élusives, très difficiles à identifier sur le terrain (indices de présence impossibles à attribuer



▲ La détectabilité des espèces les plus discrètes à partir de l'ADN environnemental est encore très faible ; les protocoles d'échantillonnage demandent à être améliorés (photo : loutre).

avec certitude) : vison d'Europe, putois, vison d'Amérique et crossope aquatique (confusion avec la crossope de Miller). Pour les trois premiers, la détectabilité par la méthode « Metabarcoding ADNe » est très faible (seul le vison d'Amérique a été détecté dans le cadre de cette étude). Pour la crossope aquatique, cette étude pilote ne permet pas de conclure sur sa détectabilité car la présence de l'espèce n'était pas certifiée sur les deux sites sélectionnés. Lors de notre étude, elle a néanmoins été détectée par ADNe sur des sites où elle n'avait pas été observée. Pour ces espèces, les protocoles d'échantillonnage doivent donc encore être testés et améliorés.

## Conclusion

La méthode « Metabarcoding ADNe » est une approche adaptée pour le suivi spécifique de certaines espèces de mammifères semi-aquatiques (notamment les rongeurs). Bien que son efficacité soit plus faible, cette approche permet également d'acquérir des données sur la répartition d'autres espèces de mammifères semi-aquatiques lorsqu'elle est utilisée dans le cadre d'inventaires généralistes. En effet, à partir d'un même échantillon, des analyses peuvent être faites pour plusieurs groupes taxonomiques (amphibiens, poissons, mammifères semi-aquatiques), ce qui fait de l'approche ADNe un outil de veille écologique important. De plus, de par leur protocole d'échantillonnage facile à mettre en œuvre, les prélèvements peuvent être réalisés par des personnes aux profils variés (experts, généralistes, bénévoles...) pour la mise en place d'inventaires à grandes échelles. Il est néanmoins trop tôt pour envisager son déploiement pour les espèces les plus élusives, pour lesquelles le besoin est le plus important à l'heure actuelle.

## Remerciements

Merci à toutes les personnes ayant participé à la récolte des échantillons sur le terrain : les services départementaux, Pauline Filliol, Gus Lyon et Paul Hurel pour l'ONCFS ; Philippe Jourde (LPO) ; Tiit Maran (Tallinn Zoo) ; Frédéric Blanc (CEN Midi-Pyrénées) ; les personnels du Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà. ●

## Bibliographie

- ▮ AFB. 2018. L'ADN environnemental au service de la biodiversité : premier état des lieux. *Les rencontres* n° 52. 4 p. <http://www.onema.fr/seminaire-adn-environnemental-2017>.
- ▮ Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P. & Pont, D. 2016. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLoS ONE* 11(6): e0157366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157366>.
- ▮ Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6(8): e23398.
- ▮ Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49: 953-959.
- ▮ Kuhn, R. & Jacques, H. 2011. La loutre d'Europe. *Encyclopédie des carnivores de France, fascicule 8*. SFEPM. 72 p.
- ▮ Larivière, S. 1999. Mustela vison. *American Society of Mammalogist. Mammalian Species* 608: 1-9.
- ▮ Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25: 929-942.