



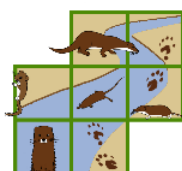
Suivis biologiques de la Réserve Naturelle régionale du Marais communal du Poiré-sur-Velluire - Année 2021 - 2020-259

Suivi du peuplement de mammifères remarquables

Novembre 2021

Réalisation :

SARL GREGE
Route de Préchac
33730 VILLANDRAUT
www.grege.net



GREGE
Groupe de Recherche et d'Etude
pour la Gestion de l'Environnement

Avec le concours financier :



CE PROJET EST COFINANCÉ PAR
LE FONDS EUROPÉEN DE DÉVELOPPEMENT RÉGIONAL



L'EUROPE S'ENGAGE EN PAYS DE LA LOIRE



RAPPORT TECHNIQUE

SOMMAIRE

1.	CONTEXTE ET OBJET	1
2.	MATERIEL ET METHODES.....	1
2.1.	PROTOCOLE ET ANALYSES PROPOSES	1
2.2.	METHODE D'ANALYSE GENETIQUE.....	3
3.	RESULTATS	4
3.1.	ECHANTILLONS TRANSMIS POUR ANALYSES.....	4
3.2.	ESPECES DETECTEES.....	8

1. CONTEXTE ET OBJET

Le Parc naturel régional du Marais Poitevin assure la gestion de la Réserve Naturelle régionale du Marais communal du Poiré-sur-Velluire et la maîtrise d'œuvre du nouveau plan de gestion 2020-2025. Dans le cadre ce nouveau plan, huit suivis biologiques ont été réalisés en 2021 sur la réserve, dont l'objectif est de mesurer l'état de conservation du marais, son évolution, et d'améliorer les connaissances.

Une consultation a été lancée dans le cadre d'un marché public d'études N° 20S259-1 comprenant 8 lots ciblant divers cortèges végétaux ou animaux.

Pour le Lot 5 - Suivi du peuplement de mammifères remarquables, l'objectif est d'identifier la présence de mammifères remarquables, notamment la **Musaraigne aquatique**, et l'objet de la mission vise à former un stagiaire à la pose de pièges type « Tube capteur de fèces » dans le but de détecter la présence de *Neomys fodiens*, fournir le matériel nécessaire à ce suivi, effectuer les analyses ADN des échantillons récoltés, interpréter les résultats et faire un rendu détaillé de ces résultats.

Le GREGE, bureau d'études et organisme de recherche en environnement, est spécialisé depuis près de 30 ans dans l'étude et la conservation des mammifères semi-aquatiques et terrestres et de leurs habitats. Ayant notamment développé pour la Musaraigne aquatique, la méthode d'inventaire par tubes capteurs de fèces avec analyse génétique des indices, le GREGE a été retenu pour la réalisation du Lot 5 : Suivi du peuplement de mammifères remarquables (CS 17).

Ce rapport constitue la restitution des résultats telle que prévue dans la proposition technique, avec toutefois un rappel méthodologique.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. PROTOCOLE ET ANALYSES PROPOSES

Le protocole d'inventaire repose sur la réalisation de 7 transects d'inventaires de 100 mètres le long de milieux favorables (cours d'eau, canaux, plans d'eau, marais...) répartis sur la Réserve, le long desquels sont distribués 10 tubes capteurs de fèces (un tube tous les 10 m).

Il s'agit de tubes de section rectangulaire de 40 x 60 mm, et de longueur 20 cm, dont l'intérieur est recouvert d'aspérités pour retenir les déjections (Planche-photo 1). Ces tubes sont spécifiquement appâtés avec des vers de mouches congelés, maintenus dans une

compresse de fibres. L'animal en essayant de dégager l'appât, passe du temps dans le tube et peut y déposer des fèces du fait de son transit rapide.

Planche-photos 1: Illustrations des tubes-capteurs et des indices



Tube capteur de fèces pour détecter la Musaraigne aquatique (P. Fournier - GREGE).



Tube capteur de fèces posé en nature (GREGE)



Crotte de Musaraigne dans un tube capteur (C. Bout – GREGE)

Le protocole initial du GREGE prévoyait un relevé au bout de 7 jours, car au-delà de 7 jours, le piétinement par les micromammifères induit une perte significative d'indices (Bout 2010). Toutefois, dans le cadre de ce suivi sur la RNR réalisé par le stagiaire (ayant fait l'objet d'une formation technique préalable), chaque sondage dure 10 nuits consécutives, avec un contrôle tous les 2 jours (soit 5 relevés), afin de collecter du matériel génétique le plus frais possible. Ces relevés intermédiaires sont utiles car ils permettent d'éviter la perte d'indices par piétinement. Nous proposons alors, du fait de ces contrôles réguliers, de réappâter les tubes au jour 6 (Relevé n° 3), pour réaugmenter leur attractivité.

Le CCTP demandait de prévoir environ 30 analyses génétiques, issues de 30 fèces sélectionnés par le stagiaire sur le principe d'une analyse visuelle et métrique.

Nous avons toutefois proposé une variante

L'objectif étant d'identifier la présence de l'espèce à l'échelle des différents milieux, donc des transects sélectionnés, un résultat au tube posé ou au contrôle par tube ne nous apparaît pas utile. Compte tenu de la méthode d'identification génétique que nous appliquons permettant de séquencer l'ADN de toutes les espèces contenues dans un échantillon, nous avons proposé :

1. Le maintien de la collecte des indices tous les 2 jours, avec un conditionnement par le stagiaire de tous les indices par tube et par contrôle, garantissant la bonne conservation de ce matériel génétique très frais.
2. L'envoi de l'ensemble des tubes au GREGE, sans sélection préalable de fèces, car notre expérience nous a montré que certaines crottes de Musaraigne aquatique pouvaient ne pas avoir les critères visuels ou métriques habituellement utilisés en France.
3. Après réception des tubes de collecte au GREGE, le **regroupement de toutes les crottes prélevées dans tous les tubes d'un même transect lors d'une même session de 10 nuits, dans un seul et même échantillon soumis à une analyse génétique**. Ainsi une seule analyse est à prévoir par transect.
4. La **répétition des prospections quatre fois** sur chacun des sept transects et ce à environ 1 mois d'intervalle, afin d'optimiser les chances de détecter de la Musaraigne aquatique. En effet, la détection de cette espèce peut varier en fonction de divers paramètres encore mal connus, dont la météorologie joue un rôle important. Ces répétitions permettent ainsi de maximiser les chances de captage de l'espèce en multipliant le nombre de tubes déployés et les conditions climatiques et saisonnières d'inventaire. La trentaine d'analyses génétiques prévues est ainsi respectée grâce au regroupement des indices par transect et par session (7 transects x 4 sessions = 28 échantillons), soit 28 analyses génétiques permettant d'identifier les espèces ayant fréquenté les transects à chacune des sessions.

Si d'autres indices sont découverts fortuitement lors de la phase de terrain (poils dans le tube, crotte dans le milieu naturel...) ils peuvent faire l'objet des deux analyses complémentaires.

Pour garantir la bonne conservation et un traitement rapide des échantillons, l'envoi des prélèvements au GREGE a été réalisé à la fin de chacune des quatre sessions.

2.2. METHODE D'ANALYSE GENETIQUE

Pour proposer une identification génétique efficace et fiable des prélèvements collectés dans le milieu naturel, le GREGE a développé de longue date, un partenariat fort avec le laboratoire GeCoLAB de l'Université de Liège, spécialisé depuis une dizaine d'années dans les différentes techniques d'extraction d'ADN rare au service de la biodiversité. L'ensemble

des procédures mises en place à partir de la réception des indices permet au GREGE de proposer en routine l'identification des espèces à l'origine des indices collectés, en utilisant des méthodes de séquençage nouvelle génération et des outils bio-informatiques.

La première étape consiste à regrouper, tel que précisé ci-dessus., dans un même échantillon, tous les prélèvements d'un transect par session. Un volume maximal pouvant cependant être soumis à analyse, en cas de dépassement, nous équilibrerons l'échantillon mis en analyse pour permettre une bonne représentation de tous les tubes collectés.

La seconde étape est la réalisation des techniques de « metabarcoding » qui reposent sur l'amplification et le séquençage à haut débit de courts fragments d'ADN mitochondrial (environ 200 paires de base) très variables du gène cytochrome oxydase 1 (CO1), préalablement sélectionné afin de pouvoir identifier la majorité des espèces de vertébrés et invertébrés connus. Cette amplification a été rendue possible grâce à la production d'amorces universelles permettant de s'accrocher sur la plupart des fragments de ce génome de vertébrés et d'invertébrés.

La dernière étape est la comparaison des séquences obtenues aux bases de données publiques disponibles (GENBANK et BOLD), mais également à la base de données privée « GeCoLAB/GREGE », qui ont constitué leur propre banque privée de séquences génétiques, notamment pour une dizaine d'espèces de micro et petits mammifères, à partir de prélèvements de spécimens certifiés, issus de leur réseau de collaborateurs. Cette comparaison permet alors de déterminer avec précision l'espèce ou les espèces « hôte » des indices, avec un taux de réussite supérieur à 95%.

Dans le cas où les crottes collectées et regroupées appartiendraient à différentes espèces, cette méthode permet d'identifier chacune des espèces, puisqu'il s'agit d'une méthode universelle pour l'ensemble des vertébrés et invertébrés.

Ainsi la méthode permet d'identifier toutes les espèces ayant fréquenté les tubes et déposé un indice, qu'il s'agisse de Musaraigne aquatique, d'une autre musaraigne ou de toute autre espèce.

3. RESULTATS

3.1. ECHANTILLONS TRANSMIS POUR ANALYSES

Deux-cent-quarante et un prélèvements ont été transmis au GREGE pour l'ensemble des quatre sessions (Tableau 1), permettant la constitution de 27 pools de fèces soumis à

analyse génétique (un pool de prélèvements par transect positif et par session, le site 7 lors de la première session ayant été totalement négatif).

Tableau 1 : Détail du nombre d'échantillons collectés et transmis au GREGE par site et par relevé pour chaque session, et codification des échantillons soumis à analyses génétique (Un échantillon = un pool des prélèvements par transect positif et par session).

Site	Date de la session	Numéro de relevé	Nombre de prélèvements collectés	ID CODE = Codification de l'échantillon soumis à analyse
Session 1				
Site 1	3 au 14 mai 2021	R1	0	1-5149-P
		R2	0	
		R3	0	
		R4	0	
		R5	1	
Site 2	3 au 14 mai 2021	R1	0	2-1733-P
		R2	0	
		R3	1	
		R4	0	
		R5	0	
Site 3	3 au 14 mai 2021	R1	0	3-1303-P
		R2	0	
		R3	2	
		R4	3	
		R5	4	
Site 4	3 au 14 mai 2021	R1	1	4-1742-P
		R2	1	
		R3	2	
		R4	2	
		R5	3	
Site 5	3 au 14 mai 2021	R1	0	5-1318-P
		R2	1	
		R3	1	
		R4	1	
		R5	0	
Site 6	3 au 14 mai 2021	R1	0	6-5167-P
		R2	1	
		R3	1	
		R4	0	
		R5	0	
Site 7	3 au 14 mai 2021	R1	0	Néant
		R2	0	
		R3	0	
		R4	0	
		R5	0	

Site	Date de la session	Numéro de relevé	Nombre de prélèvements collectés	ID CODE = Codification de l'échantillon soumis à analyse
Session 2				
Site 1	31 mai au 11 juin 2021	R1	0	1-1653-P
		R2	0	
		R3	2	
		R4	2	
		R5	0	
Site 2	31 mai au 11 juin 2021	R1	1	2-1792-P
		R2	3	
		R3	3	
		R4	3	
		R5	2	
Site 3	31 mai au 11 juin 2021	R1	0	3-1733-P
		R2	0	
		R3	3	
		R4	2	
		R5	4	
Site 4	31 mai au 11 juin 2021	R1	1	4-5167-P
		R2	0	
		R3	3	
		R4	3	
		R5	3	
Site 5	31 mai au 11 juin 2021	R1	1	5-5155-P
		R2	0	
		R3	4	
		R4	3	
		R5		
Site 6	31 mai au 11 juin 2021	R1	0	6-1861-P
		R2	1	
		R3	2	
		R4	0	
		R5	2	
Site 7	31 mai au 11 juin 2021	R1	1	7-1641-P
		R2	0	
		R3	1	
		R4	1	
		R5	0	
Session 3				
Site 1	21 juin au 2 juillet 2021	R1	3	1-1725-P
		R2	2	
		R3	0	
		R4	0	
		R5	3	
Site 2	21 juin au 2 juillet 2021	R1	6	2-1680-P
		R2	3	

Site	Date de la session	Numéro de relevé	Nombre de prélèvements collectés	ID CODE = Codification de l'échantillon soumis à analyse
		R3	3	
		R4	1	
		R5	3	
Site 3	21 juin au 2 juillet 2021	R1	0	3-1763-P
		R2	1	
		R3	4	
		R4	1	
		R5	2	
Site 4	21 juin au 2 juillet 2021	R1	5	4-5145-P
		R3	2	
		R2	3	
		R4	5	
		R5	2	
Site 5	21 juin au 2 juillet 2021	R1	2	5-5146-P
		R2	1	
		R3	2	
		R4	2	
		R5	4	
Site 6	21 juin au 2 juillet 2021	R1	5	6-1303-P
		R2	5	
		R3	4	
		R4	8	
		R5	4	
Site 7	21 juin au 2 juillet 2021	R1	3	7-1844-P
		R2	2	
		R3	4	
		R4	3	
		R5	4	
Session 4				
Site 1	19 au 31 juillet 2021	R1	1	1-1486-P
		R2	1	
		R3	2	
		R4	3	
		R5	3	
Site 2	19 au 31 juillet 2021	R1	0	2-1533-P
		R2	2	
		R3	2	
		R4	4	
		R5	4	
Site 3	19 au 31 juillet 2021	R1	0	3-1861-P
		R2	1	
		R3	0	
		R4	2	
		R5	1	

Site	Date de la session	Numéro de relevé	Nombre de prélèvements collectés	ID CODE = Codification de l'échantillon soumis à analyse
Site 4	19 au 31 juillet 2021	R1	0	4-5155-P
		R2	0	
		R3	4	
		R4	2	
		R5	3	
Site 5	19 au 31 juillet 2021	R1	4	5-5151-P
		R2	2	
		R3	2	
		R4	2	
		R5	6	
Site 6	19 au 31 juillet 2021	R1	0	6-1775-P
		R2	1	
		R3	2	
		R4	0	
		R5	3	
Site 7	19 au 31 juillet 2021	R1	1	7-1720-P
		R2	0	
		R3	2	
		R4	1	
		R5	2	

Trois échantillons complémentaires ont été constitués à partir de fèces trouvées fortuitement dans le milieu naturel :

1. **ARV-MP-130721** correspondant à une fèces suspectée de Campagnol amphibie.
2. **MUST-FORT-S2** correspondant à un regroupement de deux fèces de Mustélidés.
3. **MUST-FORT-S5** correspondant au regroupement de quatre fèces de Mustélidés.

Au total, 30 analyses génétiques ont été réalisées.

3.2. ESPECES DETECTEES

Pour trois échantillons, trop peu d'ADN a amplifié, ne permettant pas de conclure sur les éventuelles espèces détectées.

Huit espèces de micromammifères ont été détectées dans les tubes capteurs de crottes, ainsi que du Hérisson, mais malheureusement aucune Musaraigne aquatique :

1. Le Mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*).
2. Le Campagnol des champs (*Microtus arvalis*).
3. Le Campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*).
4. La Souris grise (*Mus musculus*).
5. Le Rat Surmulot (*Rattus norvegicus*).
6. La Crocidure musette (*Crocidura russula*).
7. La Musaraigne couronnée (*Sorex coronatus*).
8. Très probablement la Crocidure des jardins (*Crocidura suaveolens*).
9. Le Hérisson (*Erinaceus europaeus*).

Les fèces trouvées fortuitement ont quant à elles permis de confirmer la présence du **Campagnol amphibie** (*Arvicola sapidus*) et de détecter de la Fouine (*Martes foina*), de la Martre (*Martes martes*), ainsi que du Campagnol des champs et de la Crocidure musette, entant que proies.

**Tableau 1 : Détail des espèces détectées dans les échantillons analysés (un échantillon regroupant tous les indices par site et par session),
et dans les échantillons découverts fortuitement**

Site	ID CODE	Session	Nb de séquences	Espèce identifiée	% de similitude	Type	Remarque
Néant	ARV-MP-130721	Néant	237	<i>Arvicola sapidus</i>	98,5	Hôte	
Site 1	1-5149-P	1	22091	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	Crottes trouvées sur le tube
	1-1653-P	2	37898	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	
			152763	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			926	<i>Mus musculus</i>	100	Hôte	
	1-1725-P	3	8454	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	
			50768	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			1451	<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Hôte	
			1008	<i>Myodes glareolus</i>	99,2	Hôte	
	1-1486-P	4	2234	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	
			22481	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
613			<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Hôte		
Site 2	2-1733-P	1	44177	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	2-1792-P	2	114830	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	2-1680-P	3	107110	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			501	<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Hôte	
	2-1533-P	4	1730	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	
			23119	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			501	<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Hôte	
	MUST-FORT-S2	4	160	<i>Crocidura russula</i>	100	Proie	
			119815	<i>Martes martes</i>	100	Hôte	
409			<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Proie		

Site	ID CODE	Session	Nb de séquences	Espèce identifiée	% de similitude	Type	Remarque
Site 3	3-1303-P	1	70045	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			150	<i>Crocidura suaveolens</i>	93,3	Hôte	Le pourcentage de similitude est très faible, mais la séquence ne matche pas avec <i>C.russula</i> , ni <i>C. leucodon</i> . De plus, la réalisation d'un arbre phylogénique avec toutes les espèces de <i>Crocidura</i> la place du côté des branches de <i>C. suaveolens</i> . On conclut donc que c'est très probablement de la <i>C. suaveolens</i> .
	3-1733-P	2		Hôte non identifiable	100	Hôte	Trop peu d'ADN amplifié pour conclure
	3-1763-P	3	93486	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	3-1861-P	4	75701	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
Site 4	4-1742-P	1	172934	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			5606	<i>Erinaceus europaeus</i>	97	Présence	
			347	<i>Crocidura suaveolens</i>	93,3	Hôte	Le pourcentage de similitude est très faible, mais la séquence ne matche pas avec <i>C.russula</i> , ni <i>C. leucodon</i> . De plus, la réalisation d'un arbre phylogénique avec toutes les espèces de <i>Crocidura</i> la place du côté des branches de <i>C. suaveolens</i> . On conclut donc que c'est très probablement de la <i>C. suaveolens</i> .
	4-5167-P	2	78929	<i>Bos taurus</i>	100	Présence	Contamination externe du tube dans le milieu naturel
			129756	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	4-5145-P	3		Hôte non identifiable	100	Hôte	Trop peu d'ADN amplifié pour conclure
4-5155-P	4	38982	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte		

Site	ID CODE	Session	Nb de séquences	Espèce identifiée	% de similitude	Type	Remarque
Site 5	5-1318-P	1	85984	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			542	<i>Mus musculus</i>	100	Hôte	
	5-5155-P	2	93884	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	
			59837	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			970	<i>Sorex coronatus</i>	100	Hôte	
	5-5146-P	3	5570	<i>Apodemus sylvaticus</i>	100	Hôte	
			2310	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	5-5151-P	4		Hôte non identifiable	100	Hôte	Trop peu d'ADN amplifié pour conclure
MUST-FORT-S5	4	66064	<i>Martes foina</i>	100	Hôte		
		128	<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Proie		
Site 6	6-5167-P	1	104553	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	6-1861-P	2	131345	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	6-1303-P	3	77396	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	6-1775-P	4	11445	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
			491	<i>Microtus arvalis</i>	99,2	Hôte	
Site 7	7-1641-P	2	28611	<i>Rattus norvegicus</i>	100	Hôte	
	7-1844-P	3	46343	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	
	7-1720-P	4	98414	<i>Crocidura russula</i>	100	Hôte	

