

Collège Sciences & Technologies pour l'Énergie et l'Environnement de la Côte Basque
Université de Pau et des Pays de l'Adour
Licence Professionnelle Métiers de la Protection et de la Gestion de l'Environnement
Option Biologie Appliquée aux Écosystèmes Exploités

Etude de la dynamique de recolonisation du PNR des Pyrénées Catalanes par la Loutre d'Europe, *Lutra lutra*

HALOTEL Yon

**Stage effectué du 4 Mars au 25 Août 2019 au
Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes, lieu-dit La Bastide, 66360 OLETTE
sous la direction scientifique de Mr. Mollera**

« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil »

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à la Directrice du Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes, Mme. Casasayas, pour m'avoir accueilli. Je remercie mes maîtres de stage, Guilhem Mollera et Marion Laventure pour leur accueil et le partage de leurs connaissances. Je remercie aussi les autres chargés de mission du Pôle Espaces Naturels pour leurs conseils : Antoine Segalen, Marine Daire, Guilhem Laurents et Anaïs André. Je remercie enfin chaleureusement les autres stagiaires pour leur écoute, leur aide et leur bonne humeur.

Je remercie bien sur l'Agence de l'Eau Méditerranée Rhône Corse qui a financé ce projet et cette étude.

Je remercie également les acteurs de la protection de l'environnement qui m'ont permis de les accompagner sur leurs divers suivis naturalistes et pour les nombreuses discussions très intéressantes. Ces expériences furent très enrichissantes et m'ont permis d'acquérir de nouvelles compétences.

Je remercie vivement toute l'équipe d'enseignants chercheurs du laboratoire ... de l'Université de Perpignan – Via Domitia et notamment Olivier Rey pour ses conseils mais aussi Anaïs Bordes, la stagiaire en charge des analyses.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont conseillé et relu lors de la rédaction de ce rapport de stage : mes amis, professeurs et collègues.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
II.	Matériels et méthodes.....	5
A.	Zone d'étude	5
B.	Nettoyage des sites	7
C.	Echantillonnage.....	8
1.	Plan d'échantillonnage.....	8
2.	Choix des unités statistiques.....	8
D.	Campagne de collecte	9
1.	Méthode de prospection	9
2.	Méthode de recherche d'indices	10
3.	Variables complémentaires	11
4.	Protocole de récolte.....	12
E.	Tests statistiques.....	12
F.	Analyses génétiques.....	12
1.	Extraction de l'ADN.....	12
2.	Amplification et séquençage de l'ADN	13
III.	Résultats.....	14
A.	Occupation et diversité de la population.....	14
B.	Tracking génétique	15
C.	Distribution spatiale	17
D.	Tendances dans le comportement de marquage.....	18
IV.	Discussion.....	20
A.	Processus de recolonisation.....	20
B.	Perspectives de l'étude	21
C.	Intégration des connaissances	22
D.	Limite du protocole	22
V.	Bibliographie	23

I. Introduction

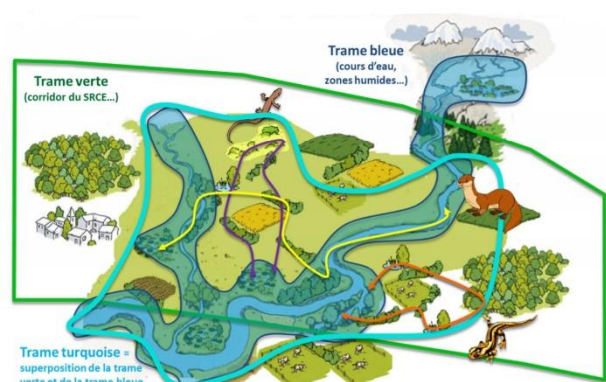
Chassée ou piégée pour sa fourrure et victime de la pollution des cours d'eau, la Loutre d'Europe disparaît des Pyrénées-Orientales dans les années 1970. Sa chasse fut ensuite interdite en France en 1972 et son statut de protection fut renforcé dès 1976. Ce n'est qu'en 2010, après l'arrêt de ces pratiques et la prise de conscience du mauvais état biologique des cours d'eau, qu'elle est à nouveau contactée. En quelques années, elle semble avoir recolonisé la quasi-totalité du Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes.

Le PNR des Pyrénées Catalanes, premier parc naturel régional sur le massif pyrénéen, fut créé le 5 mars 2004 par décret simple pris sur rapport du Ministre de l'environnement. Son classement fait suite à une initiative née de la volonté des acteurs locaux, soutenus par des élus. Ils souhaitent préserver et faire connaître la richesse patrimoniale des Pyrénées catalanes mais aussi permettre à ce territoire de se développer durablement dans le respect de la diversité et des particularités de son environnement. Leur objectif est donc d'œuvrer à la protection des espaces naturels mais aussi au développement économique de la région. Le territoire du parc couvre 138 000ha à cheval sur trois micro régions : le Capcir, la Cerdagne et le Conflent. Au total, 66 communes, comptabilisant seulement 21 000 habitants, sont concernés par l'emprise du PNR. Cette particularité, tant au niveau du nombre de communes que d'habitants s'explique notamment par le relief de ce territoire. Il s'étage des vallées de basses altitudes aux plus hauts sommets des Pyrénées Orientales passant ainsi par tous les petits villages accrochés à flanc de montagne. Le territoire est également riche de sept réserves naturelles, de sept sites Natura2000, de neuf stations de ski, deux citadelles Vauban classées au Patrimoine mondial de l'UNESCO et deux stations thermales. Autre particularité culturelle, le Train Jaune, emblème de la mobilité au sein du territoire, parcourt depuis 1910 les 62km entre Villefranche-de-Conflent et Latour-de-Carol. L'ensemble de ces éléments permet au parc de fédérer les acteurs locaux autour d'un projet de territoire au service de l'économie locale. La gestion du PNR est assurée par le syndicat mixte créé pour l'occasion.

L'Agence de l'eau Rhône-Méditerranée Corse a lancé en 2018 un appel à projet en faveur de la biodiversité qui devrait être renouvelé annuellement pendant 10 ans. Les projets doivent

être en lien avec les continuités écologiques et plus précisément avec la Trame turquoise (Source : <http://www.fncaue.com>

Figure 1). Notion très récente, elle représente la zone d'interface entre la Trame verte et la



Source : <http://www.fncaue.com>
Figure 1. Schéma illustrant la trame turquoise

Trame bleue déjà bien connues. Le parc a monté un dossier, approuvé pour une durée de 21 mois à partir de Mai 2018, date de signature de la convention par les deux parties. Le projet tend notamment à évaluer la qualité, l'efficacité et la cohérence des corridors et des continuités écologiques, éléments de la TVB, via une espèce parapluie reconnue comme indicateur au

niveau national, la Loutre d'Europe.

Compte tenu de la multiplicité du nombre d'espèces pouvant cohabiter dans un paysage, une approche espèce par espèce n'est pas envisageable pour des raisons logistiques et économiques. L'approche la plus adaptée ici consiste à viser des espèces « parapluies ». Cette notion largement utilisée fait référence à des espèces dont la protection permettra de protéger dans le même temps d'autres espèces (Caro, 2010). Le lien est alors physique, grâce à son grand rayon d'action et la taille importante de son territoire, la loutre est la sentinelle vigilante de l'état écologique des cours d'eau.

Le parc comprend une partie plus ou moins grandes de six bassins versants différents. On sait que la Loutre d'Europe est contactée dans le département de l'Aude depuis 2007 (Midi Libre, 2016) et en Ariège depuis les années 2000 (<https://www.ariège.com>). De plus, 42 loutres provenant de 4 populations ibériques différentes ont été réintroduites dans le nord-est de l'Espagne entre 1995 et 2002. En 2004, une étude génétique (Ferrando, 2007) a montré que les populations actuelles de cette zone ont une origine commune avec la population réintroduite. Cette étude a aussi permis la détection de quelques allèles non-identifiés dans le groupe fondateur. Suite à cette découverte, il apparaît que des échanges avec d'autres populations espagnoles, ainsi qu'avec des populations françaises ont eu lieu. Une autre étude plus récente (Pigneur et al. 2018), à l'échelle du grand sud-ouest de la France a montré l'existence de six groupes génétiques distincts avec une part non négligeable d'animaux qui

présentaient un patron génétique hybride, associant des caractéristiques de lignées génétiques différentes. Elle met ainsi en évidence la faculté d'échanges génétiques entre populations de loutres et une dynamique importante de cette espèce. Malgré des déplacements contraints par de forts dénivelés entre bassins versants ou par de larges zones d'habitats non favorables (Janssens et al. 2007 ; Cohen et al. 2013), un mixage progressif s'installe entre les populations.

Face à ce nouveau contexte et aux questions émergentes, une des problématiques consiste d'une part à déterminer l'origine des populations qui colonisent de nouveau le secteur du PNR des Pyrénées catalanes et d'autre part à étudier leur dispersion au niveau de ce carrefour écologique. Ainsi, il sera possible d'identifier les éventuelles barrières conditionnant l'évolution de ces populations mais également de mettre en avant de nouveaux corridors formant la Trame Turquoise sur le territoire du PNR.

Du fait de leur accessibilité et de leur disponibilité, la première source d'ADN a été fournie par les carcasses de loutres pour les études génétiques, rapidement suivie par l'analyse d'échantillons non invasifs (Dallas et al. 2003). En effet, les progrès techniques en matière de méthodes de biologie moléculaire ont permis d'utiliser différents matériels comme source d'ADN. Ainsi, en plus d'échantillons de tissus et d'épreintes, les gelées anales déposées lors du marquage des territoires peuvent aussi être utilisées pour mener des études génétiques. Sécrétées par des glandes et avec une composition propre à chaque individu, l'ADN qu'elles contiennent est très peu dégradé. La qualité de l'ADN utilisé a un fort impact sur la proportion d'échantillons génotypés avec succès et sur la fiabilité des génotypes obtenus. Mais malgré les difficultés techniques, la collecte de ces échantillons non-invasifs reste majoritairement utilisée dans les études sur la Loutre car elle ne requiert pas de capture ou de manipulation des individus et perturbe au minimum leur comportement. Utiliser ce type de matériel nécessite une grande rigueur, tant au niveau de la phase de collecte que dans la conservation des échantillons (Hajkova et al. 2006). Une telle rigueur est essentielle pour la bonne exploitation des données obtenues et la fiabilité des résultats.

Dans le cadre du projet de l'AEMRC, la mise en place d'une étude génétique sur la Loutre d'Europe a été conduite par le Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes, et ce, grâce à une subvention de la DREAL Occitanie et à un partenariat avec le laboratoire IHPE de l'Université de Perpignan – Via Domitia. Le PNR a été en charge de la récolte des prélèvements

entre mars et août 2019 tandis que les analyses génétiques ont été confiées au laboratoire universitaire et se poursuivront au-delà de la durée du stage. L'objectif de ce travail est d'étudier la dynamique de recolonisation récente à la croisée de plusieurs bassins versants. Pour cela, le génotype identifié à partir des épreintes et gelées anales sera comparé à celui d'autres populations. Afin de tirer profit au maximum de cette campagne de récolte, les échantillons sont aussi analysés via la méthode du meta bar-coding. Cette technique permet d'identifier le contenu stomacal des individus et ainsi de détecter la présence d'espèces patrimoniales, tel que le Desman des Pyrénées. Enfin, plusieurs paramètres abiotiques relevés à chaque laissée permettront d'en apprendre plus sur le comportement de marquage de la loutre en terrain montagnard.

Pour assurer une logique administrative, seuls les trois premiers bassins seront échantillonnés. La longueur de leurs cours d'eau de 1^{ère} et 2^{ème} catégorie ($\bar{X} \pm SD = 14 \pm 10$ km ; IGN 2016) et leurs pente ($\bar{X} \pm SD = 15,7 \pm 12,5^\circ$) sont résumées dans le Tableau 2 :

Bassin versant	Cours d'eau	Longueur (km)	Pente moyenne (°)
Aude	Vallserra	6,7	8,2
	Lladura	15,6	8,0
	Cabrils	18,9	23,0
	Galba	12,7	11,0
	Aude	19,2	9,5
Sègre	Mesclan d'Aigues	7	16,7
	Eyne	11,2	10,9
	Campcardos	9,5	15,8
	Angostrina	15,1	11,6
	Estahuja	9,6	10,5
	Rahur	3,5	8,2
	Tarteres	3	16,5
	Carlit	5,8	15,2
	Brangoli	11,3	13,6
	Jard	3,2	11,5
	Llavanera	13	12,5
	Err	14,7	18,2
	Angust	13,5	16,2
	Carol	25,5	16,1
	Segre	19,9	12,8
	Rialet	4,4	8,5
Têt	Riberola	10,3	16,9
	St Vincent	9,7	19,4
	Caranca	15,4	15,3
	Urbanya	10,8	20,1
	Pujols	5,9	18,1
	Cady	19,2	18,7
	Llitera	13,8	19,9
	Baillmarsane	7,6	13,1
	Tet	57,9	19,0
	Evol	13,4	23,9
	Caillan	20,9	19,1
	Rotja	23,3	22,2
	Mantet	24,6	21,6
	Castellane	27	21,7

Tableau 2. Caractéristiques des cours d'eau du PNRPC

Les pentes des cours d'eau sont plus importantes sur la vallée de la Têt notamment en raison du caractère enclavé des vallées affluentes contrairement au plateau Cerdan et au plateau du Capcir (Figure 3).

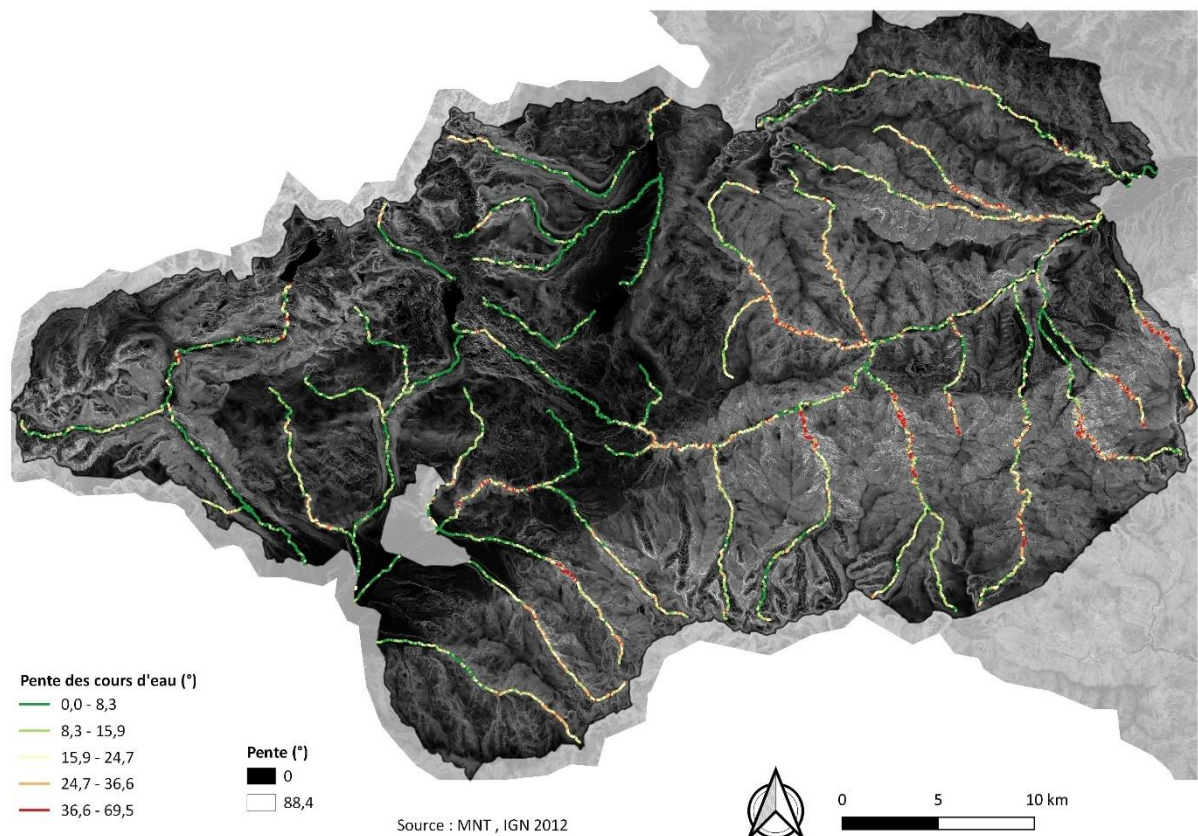


Figure 3. Topographie du PNRPC

B. Nettoyage des sites

Il n'est pas possible d'estimer précisément l'âge d'une épreinte sur le terrain et, par conséquent, il n'est pas possible de déterminer la chronologie, et donc la direction suivie par un individu lors de la dispersion et sa vitesse de déplacement. Le nettoyage quotidien des sites de marquage permet de dater la dépose des épreintes et permet de résoudre ce problème. Lampa et al. (2015) ne discutent pas d'effets négatifs associés au nettoyage des sites de marquage et suggèrent que les individus réagissent en augmentant la fréquence de marquage sur les sites nettoyés. Lors d'essais de cette méthode et après analyse des prélèvements réalisés, il a été constaté que deux individus différents, en l'occurrence de sexe différents, pouvaient aller jusqu'à marquer la même zone (9m²). L'ensemble des laissées fraîches a donc été prélevé séparément en veillant à distinguer un éventuel recouvrement ou une chronologie.

C. Echantillonnage

1. Plan d'échantillonnage

La principale contrainte du plan d'échantillonnage se situe au niveau financier. En effet, le budget prévisionnel ne prévoit l'analyse que de 100 échantillons. Malgré une certaine marge de manœuvre autour de ce nombre, le plan d'échantillonnage doit faire en sorte de s'en approcher. En raison de l'irrégularité des fréquences de marquage et de leur quantité, il a été décidé d'échantillonner 75 points de façon systématique : 25 sur les cours d'eau de 1^{ère} catégorie et 50 sur ceux de 2^{ème} catégorie. Le linéaire cumulé de ces derniers est plus grand et les régimes hydrologiques plus hétérogènes. Constituant des corridors écologiques, les chances d'y détecter des individus erratiques, provenant éventuellement d'autres bassins versants, sont aussi plus importantes. L'effort d'échantillonnage a ainsi été réparti de façon optimale, s'approchant d'une allocation de Neyman. Le tirage des sites a été effectué avec le logiciel de statistiques R implémenté des packages `sp`, `spsurvey`, `SDraw` et `rgdal`.

2. Choix des unités statistiques

Lors d'un premier tirage des sites, l'ensemble des cours d'eau de 1^{ère} et 2^{ème} catégorie a été utilisé. Au bout de quelques semaines, le constat a été fait que certains sites étaient très chronophages (piste longue et chaotique, autorisations et clés nécessaires). Il était évident que l'ensemble des sites ne pourrait être visité. En accord avec les chercheurs, la décision a été prise de tronquer les cours d'eau à proximité du dernier point d'accès en véhicule tout en évitant trop de trajet sur piste. Il s'agit de faire un compromis entre couverture du réseau hydrographique et faisabilité. Le tirage des sites a été refait avec la même méthode d'échantillonnage (Figure 4).

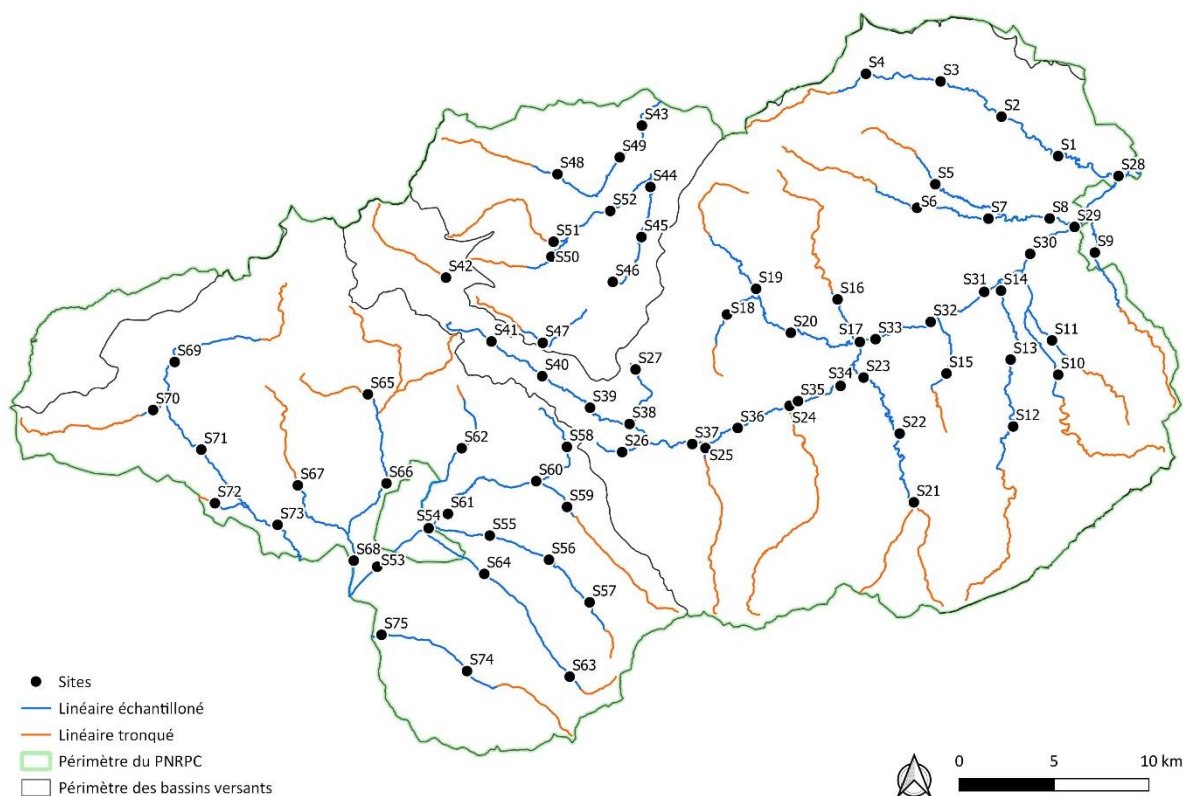


Figure 4. Localisation des sites échantillonnés

D. Campagne de collecte

1. Méthode de prospection

La méthode de prospection est inspirée de la méthodologie standard préconisée par le Groupe Loutre International de l'UICN (Reuther et al. 2000). L'objectif des prospections était de trouver au moins 2 sites de marquage puis de pousser les recherches plus en amont et en aval. Ceci a permis de maximiser les chances qu'une loutre marque à nouveau sur la zone prospectée et aux sites de marquage nettoyés. Parfois le site tiré se trouvait vraiment isolé, inaccessible, ou au moins 500 mètres de cours d'eau (rive droite et gauche) n'avait pas permis de détecter la présence de loutre. Dans ce cas-là, les points ont été décalés ou les recherches poursuivies au point d'intérêt le plus proche (ponts, barrages, confluences). La première visite, que l'on appellera « reset », consistait à rechercher des sites de marquage et à les nettoyer autour des sites tirés. Les laissées qui semblaient fraîches étaient prélevés a minima à défaut de mieux. Après quelques essais, il a été constaté que la fréquence de passage sur un même site n'était pas la même en fonction de la catégorie du cours d'eau. Ainsi, les prochaines visites démarraient 2 jours après le reset sur les cours d'eau de 1^{ère} catégorie contre 4 jours sur ceux

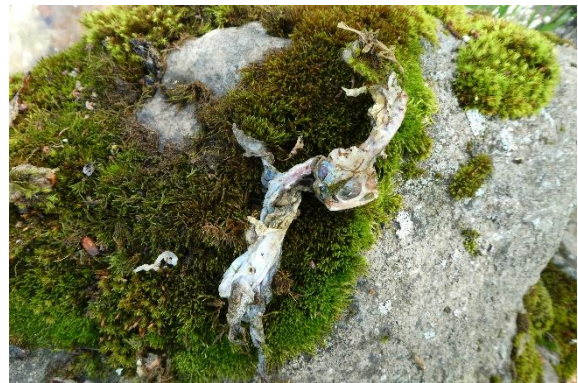
de 2^{ème} catégorie. Par la suite, chaque site était visité tous les 2 jours avec plus ou moins d'assiduité à cause des contraintes logistiques, météorologiques et économiques que le travail en montagne implique.

2. Méthode de recherche d'indices

Lors des prospections tous les indices (Figure 5) peuvent être utiles, pour attester la présence de la loutre par exemple, mais les épreintes et gelées anales sont nécessaires pour un prélèvement. Le seul risque de confusion concerne les épreintes qui peuvent être confondues avec des fèces de Vison d'Amérique. Ces derniers ont une odeur plus musquée mais surtout ils peuvent contenir des poils ou des os. En cas de présence de plumes, ces indices n'étaient même pas prélevés.



a.



b.



c.



d.

Figure 5. Indices de présence de la loutre : empreinte (a), restes d'amphibiens (b), épreinte (c) et gelée anale (d)

La même étude de Lampa et al. (2015) a montré que les sites les plus exposés présentaient les plus fortes densités d'indices de présence. Les gelées annales étaient le plus souvent

observées sur les sites exposés, les épreintes étant majoritairement retrouvées en plus faible nombre et dans les sites les moins exposés. Cependant cette étude a été conduite dans un type d'habitat en particulier à savoir des zones marécageuses et des étangs piscicoles. Tous les sites, plus ou moins exposés, ont donc été visités. Chaque laissée trouvée a fait l'objet d'une photo du contexte (Figure 6a) et d'un géoréférencement avec l'application mobile OruxMaps (exemple de nom pour le 2^{ème} marquage du site 5 : M5-2).

3. Variables complémentaires

C'est en géotypant les indices de présence collectés que Lampa *et al.* (2015) ont montré que les mâles déposaient plus fréquemment des gelées annales et moins fréquemment des épreintes que les femelles. Afin de tester les hypothèses énoncées et d'autres encore sur le comportement de marquage, le type d'indices (épreinte ou gelée), la date et l'heure ainsi que plusieurs paramètres abiotiques ont été relevés à chaque prélèvement : le lieu (berge ou lit), la protection contre la pluie (autrement dit l'exposition) et le substrat du dépôt (pierre, rocher, bâti, sable et graviers, végétation). Ces paramètres ont aussi été relevés sur les autres sites de marquage repérés et nettoyés afin de pouvoir identifier des différences de comportement entre mâle et femelle. En plus de cela, la date, l'heure et l'altitude ont aussi été consignés.



a.



b.

Figure 6. Exemple de photo du contexte (a) et prélèvement d'une laissée (b)

4. Protocole de récolte

Lors de la découverte d'un indice frais, une photo a été faite de près, avec une pièce pour l'échelle, et le point géoréférencé (exemple de nom pour le 1^{er} prélèvement du site`8 : P8-1). Le prélèvement a été réalisé muni de gants en plastique à usage unique et conditionné dans des micro tubes de 2ml (Figure 6b) Les tubes ont été remplis tant que possible à l'aide de cure-dents. La conservation dans l'éthanol est fréquemment utilisée (Dallas et al. 2003) mais implique plus de manipulation en laboratoire et dégrade encore plus un ADN qui l'est déjà. Une fois de retour à la voiture, le prélèvement était placé dans une glacière. A la fin de la journée, l'ensemble des prélèvements était mis au congélateur puis transporté au laboratoire quand un certain nombre était réunis. Ils y ont été stockés à -20°C jusqu'à analyse.

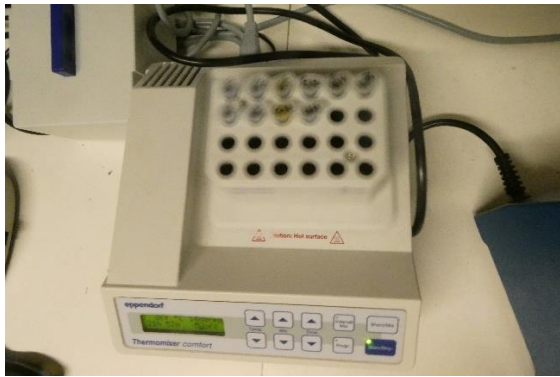
E. Tests statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel de statistiques R agrémenté du package Rcmdr. Pour comparer les distributions de variables qualitatives respectant la règle de Cochran, un test du chi² d'homogénéité a été utilisé. Le test non-paramétrique de Wilcoxon Mann et Whitney a été utilisé pour tester l'homogénéité de deux groupes selon une variable quantitative ne suivant pas une loi normale. Afin de rechercher une corrélation entre deux variables quantitatives ne suivant pas une loi normale, un test sur le coefficient de corrélation de Spearman a été réalisé. Le risque toléré a été porté à 10% en raison de la taille limitée du jeu de données.

F. Analyses génétiques

1. Extraction de l'ADN

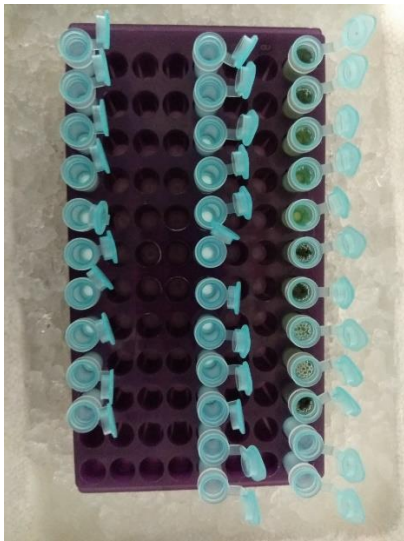
Pour les épreintes en quantité suffisante, un réplica a été effectué mais cela n'a pas été possible pour les gelées en raison de leur texture qui les rend difficile à séparer, d'autant plus une fois congelées. Cependant le succès de génotypage pour ce type d'indices (Pigneur et al. 2018) devrait permettre de limiter ce biais. L'ADN a été extrait en utilisant le E.Z.N.A.® Stool DNA Kit et en suivant les instructions du protocole « Pathogen detection » (Figure 7a-b-c).



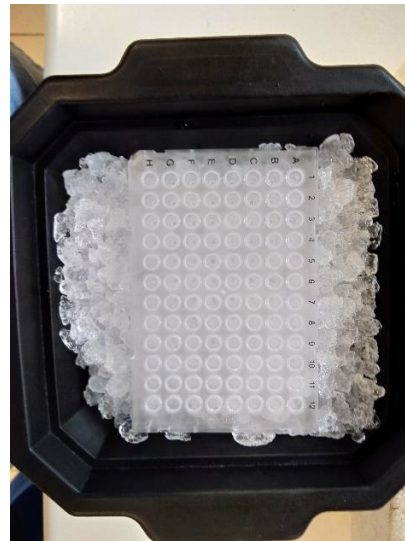
a.



b.



c.



d.

Figure 7. Illustrations de plusieurs étapes des analyses en laboratoire : vortex (a), chauffage (b), colonne de filtration (c), puits PCR (d)

2. Amplification et séquençage de l'ADN

En se basant sur d'autres études de ce type, 10 marqueurs microsatellites ont été sélectionnés : Lut453, 701, 604, 818, 717, 833, 733, 435, 453 et 782 (Dallas and Piernney 1998, Dallas et al. 1999). Chaque prélèvement a été sexé en utilisant un gène SRY spécifique aux loutres mâles (Dallas et al. 2000). Le SRY et le marqueur Lut604, comme témoin positif, ont été amplifiés pour le sexage par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Le kit QIAGEN Multiplex a été utilisé en suivant le protocole « Amplification of microsatellite loci using multiplex PCR » (Figure 7d). Les autres marqueurs microsatellites ont été amplifiés avec la même méthode. Le séquençage du génome a été réalisé en externe par le laboratoire Genoscreen à Lille. Le génotype de deux échantillons était considéré unique lorsque qu'au moins 8 des 10 marqueurs étaient de la même taille. Chaque individu est désigné par une lettre, M pour les mâles et F pour les femelles, puis par un nombre unique à chaque sexe.

III. Résultats

A. Occupation et diversité de la population

Un total de 107 laissées a été prélevé sur 59 sites entre le 15 avril et le 2 août 2019. Tous les cours d'eau échantillonnés ont fait état de la présence de loutre mais certains contacts ont été fait plus en aval de l'emplacement exact du site.

Bassin versant	Nbr d'indices récoltés		Nbr de génotypes détectés		Sex ratio
	Epreinte	Gelée	Mâle	Femelle	mâle:femelle
Têt	40	24	20	25	4 : 5
Sègre	24	8	23	3	8 : 1
Aude	10	1	3	7	1 : 2
Total	74	33	46	35	3 : 2

Tableau 3. Détails des prélèvements et résultats du sexage

Ces données sont venues enrichir les précédentes observations réalisées par les agents du parc ou des partenaires (Fédération de Pêche 66, ONCFS, PNA Loutre) et ont permis de construire la carte de présence de la Figure 8. Une grille de 1x1 km autour des cours d'eau a été utilisée pour construire le maillage. Avant de rechercher d'éventuelles barrières écologiques, l'ensemble des mailles doit être prospectées. Pour l'instant très peu ont donné lieu à une non-détection.

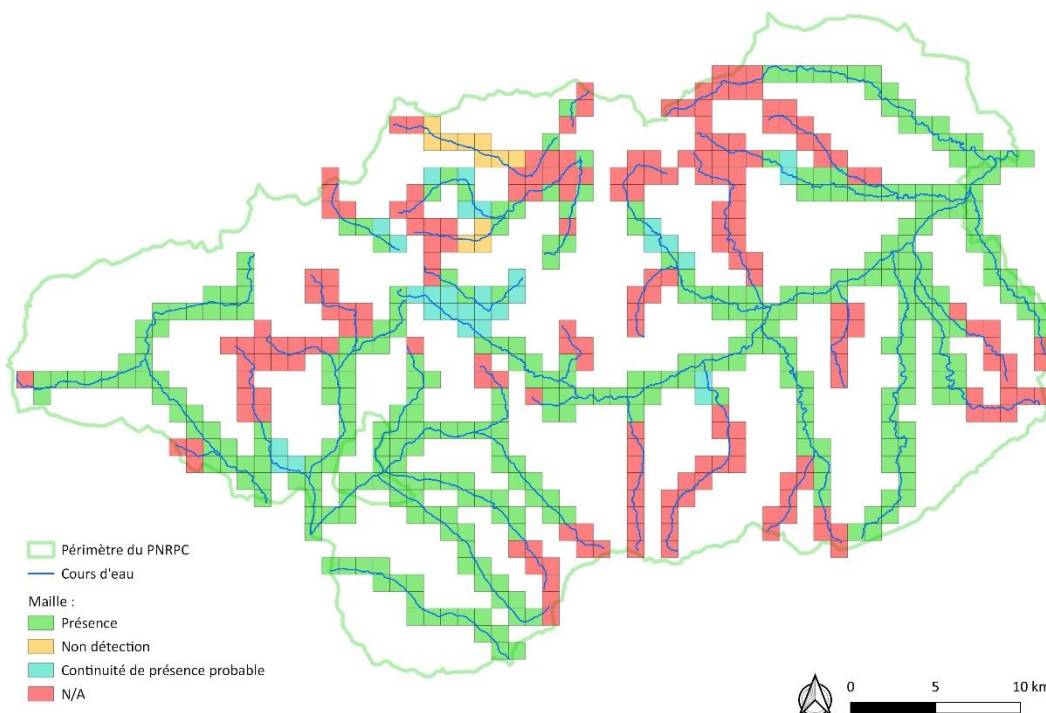


Figure 8. Carte de présence de la loutre sur le PNRPC

Au total, 103 échantillons ont été génotypés avec succès avec les 10 marqueurs, soit un succès de génotypage de 96 % pour les épreintes et 97 % pour les gelées (Tableau 3). L'ADN de 3 échantillons était trop dégradé et n'a pu être exploité tandis qu'un autre s'est avéré être des fèces de Vison d'Amérique. Entre 10 et 45 individus ont été détectés par bassin versant mais la densité (nombre d'individus par km²) est sensiblement la même ($\bar{X} \pm SD = 16,3 \pm 1,1$). En considérant la valeur médiane de la densité de loutres estimé en Europe à partir de précédents suivis démographique (à savoir 1 loutre pour 15 km de rivière ; Chanin 2003), et la longueur totale des cours d'eau permanent du PNRPC (966 km ; IGN 2015), la population peut être grossièrement estimée entre 64 et 81 individus. Le sex-ratio observé dans cette étude, avec 60% de mâles, est similaire à de précédentes observations qui varient entre 50 et 61% males (Hauer et al. 2002, Dallas et al. 2003, Hung et al. 2004)

B. Tracking génétique

Sept femelles ont été détectées à des sites différents éloignés de 0 à 23,2 km ($\bar{X} \pm SD = 13,9 \pm 8,3$ km) et plusieurs échantillons de six mâles étaient séparés par 0 à 33,0 km ($\bar{X} \pm SD = 18,9 \pm 12,0$ km). Ces données ont été obtenues en supposant que les loutres se déplaçaient principalement par les cours d'eau (Figure 9). Il est cependant possible qu'elles utilisaient des recs à flanc de montagne vu la densité du réseau hydrographique.

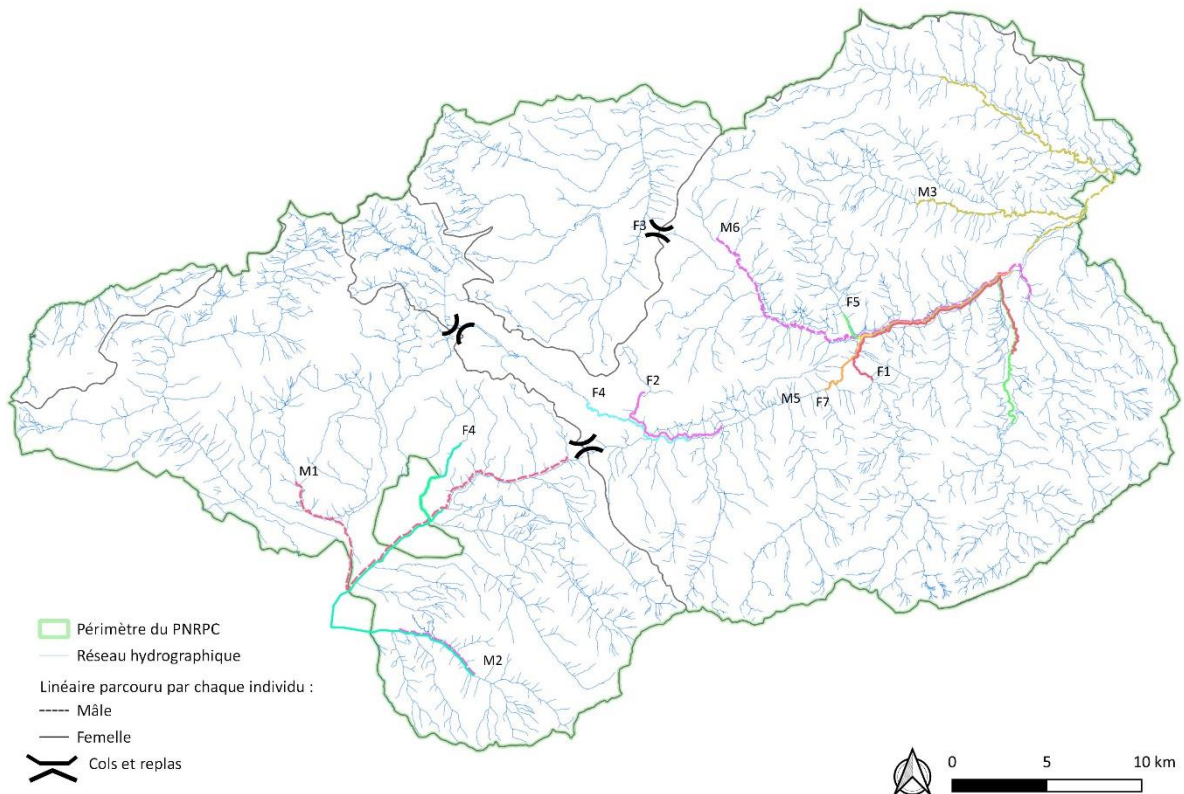


Figure 9. Matérialisation des déplacements de chaque individu contacté plusieurs fois

Les déplacements semblaient s'effectuer d'affluents en affluents, naviguant autour du cours d'eau principal. Ce phénomène est surtout marqué sur le bassin versant de la Têt. Pour les bassins versants du Sègre et de l'Aude, ce phénomène existe peut-être mais la plus petite portion de cours d'eau principal ou l'absence de rééchantillonnage très éloignés ne permet pas de l'avérer. Aucun déplacement interbassin n'a été constaté mais certains cols ou pas d'altitude semblaient propices (Figure 9).

C. Distribution spatiale

Les territoires des mâles ne se recouvraient jamais tandis que plusieurs femelles pouvaient se trouver sur une même portion de cours d'eau. Plusieurs femelles ont été échantillonnées sur le secteur d'un même mâle mais une même femelle a aussi été contactée sur le secteur de deux mâles ().

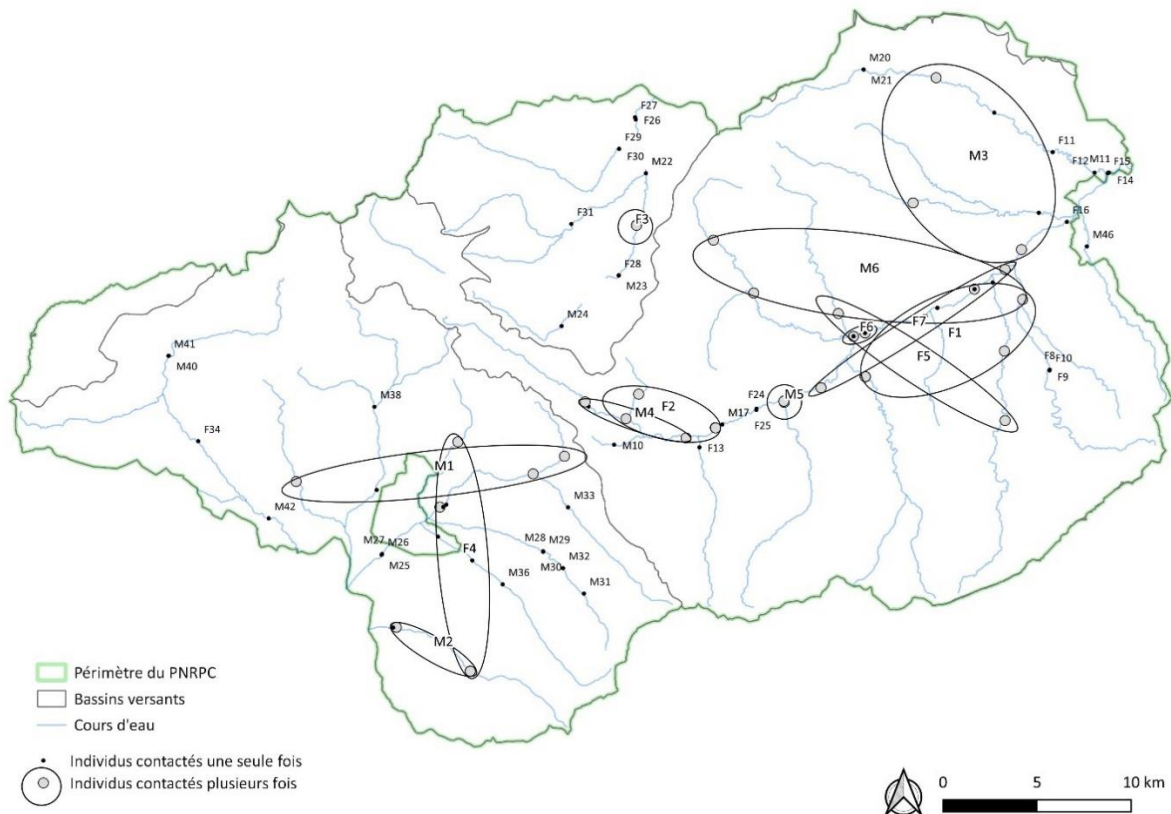


Figure 10. Localisation des échantillonnages de chaque individu

Les dates des prélèvements de chaque individu ont permis de déterminer qu'il s'agissait de cohabitation sur la même période dans la majorité des cas. Ces résultats corroborent les informations fournies par la littérature sur le sujet. La Figure 11 présente la chronologie des recouvrements de domaine avec une couleur pour chaque groupe d'individus isolé spatialement.

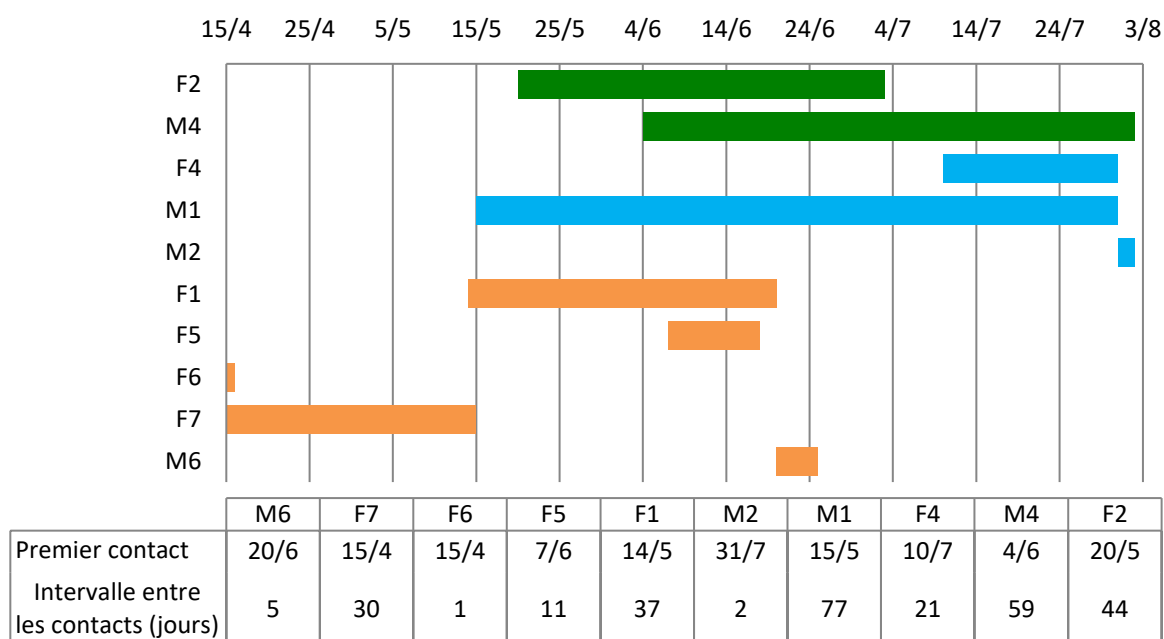


Figure 11. Superposition spatiale et temporelle des individus

D. Tendances dans le comportement de marquage

Quatre paramètres abiotiques ont été relevés sur 169 marquages dont 103 ont été sexés, les résultats de ces relevés sont représentés dans la Figure 12. Vu la quasi absence de fèces de Vison d'Amérique prélevé et analysé, l'ensemble des marquages trouvés a été intégré aux analyses statistiques n'impliquant pas le sexe.

Les plus fortes densités d'indices de présence étaient observées sur les sites protégés (p -value=0,104), sous les ponts ou passerelles, dans des anfractuosités de la berge ou sous des gros rochers. Les épreintes étaient le plus souvent observées sur les sites protégés (p -value=0,0314), les gelées étant retrouvées en plus faible nombre (p -value=7,90e-15) mais indifféremment sur les sites exposés ou non. En génotypant les indices de présence collectés il a été constaté que les mâles déposaient autant de gelées (p -value=1) et d'épreintes (p -value=0,346) que les femelles. Le nombre d'indices déposés ne différaient pas entre les sexes (p -value=0,434). Les indices étaient préférentiellement retrouvés sur les berges (p -value=5,06e-3) et dans l'ensemble, les rochers étaient le substrat privilégié par les loutres (p -value < 2,20e-16).

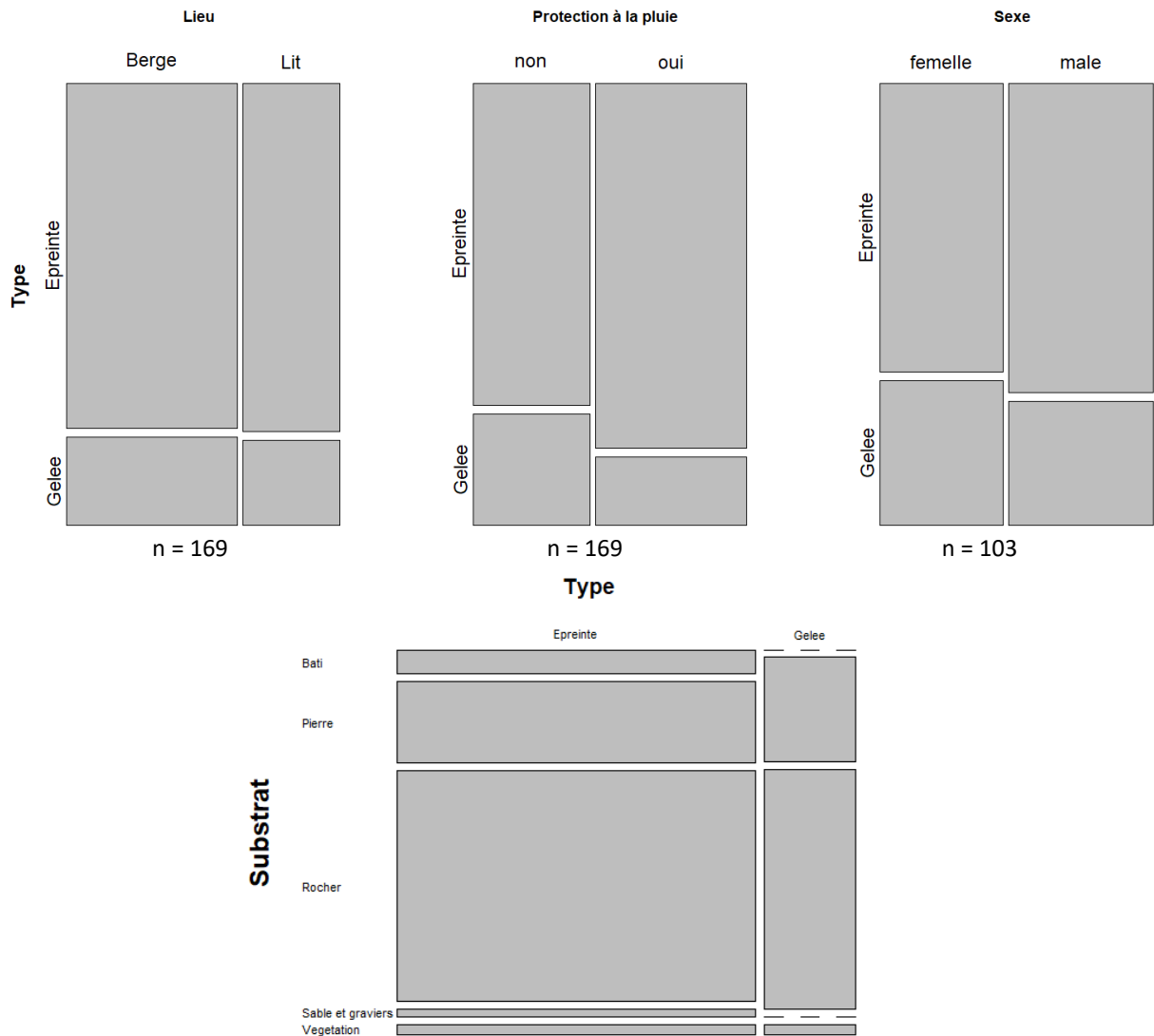


Figure 12. Illustration des proportions des différents types d'indices en fonction de chaque paramètre abiotique

Des tests statistiques ont aussi été utilisés en prenant l'altitude comme variable. Les mâles étaient contactés plus en altitude que les femelles ($p\text{-value}=0,00276$) mais ce phénomène est plus marqué pour le bassin versant de la Têt. Les indices plus en altitude étaient principalement des épreintes ($p\text{-value}=0,0239$) et étaient plus protégés ($p\text{-value}=0,0240$). Ils étaient également plus dans le lit que sur les berges ($p\text{-value}=0,0841$).

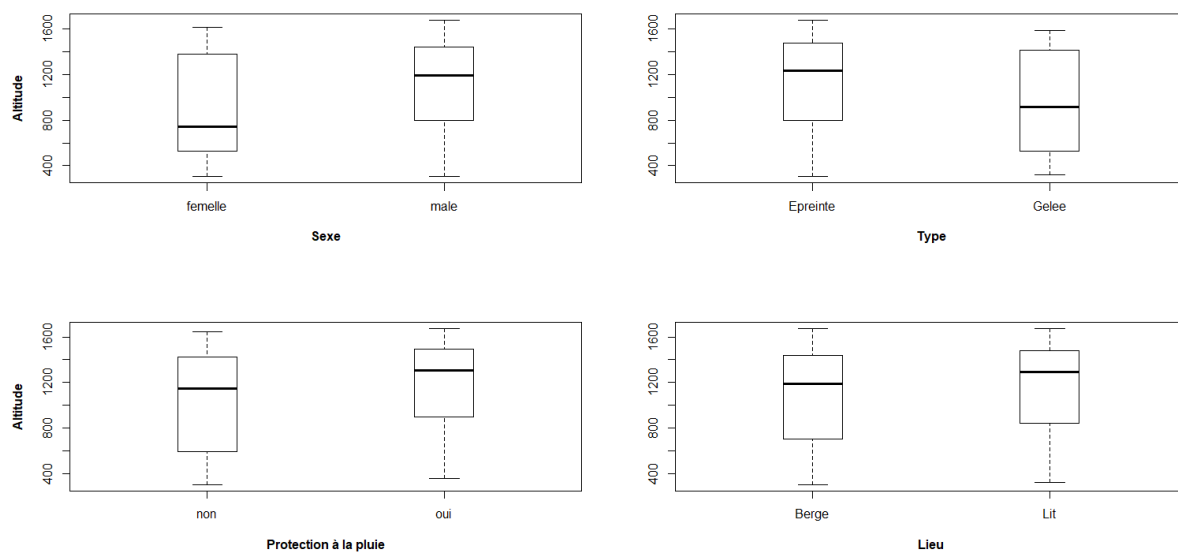


Figure 13. Représentation par boîte à moustaches de l'altitude en fonction des paramètres abiotiques

IV. Discussion

A. Processus de recolonisation

Les jeunes mâles sont rapidement chassés du territoire sur lequel ils sont nés et explorent des habitats parfois très éloignés, ce qui induit une plus forte mortalité, en particulier par collisions avec le trafic routier (Koelewijn *et al.* 2010). A titre d'information, 11 individus ont été victimes d'une collision routière au niveau du barrage de Villefranche-de-Conflent le long de la RN116 en moins d'un an. Un rapide renouvellement des individus est alors observé, comme mis en évidence lors du suivi génétique sur trois ans d'une population de Gironde (Pigneur, non publié). Ce phénomène a aussi été observé lors du suivi de l'espèce sur la rivière Ardèche (Jacob & Réseau Loutre LPO Rhône-Alpes, 2012). Bien qu'anecdotique, ces observations suggèrent un renouvellement rapide de la population et une expansion spatiale plus rapide chez les mâles que chez les femelles, ce qui se traduit par un sex-ratio fortement biaisé en faveur des mâles lors de la phase de colonisation. Si l'on considère que le sex-ratio se rééquilibre progressivement, la recolonisation du PNRPC par les loutres aurait eu lieu dans un premier temps pas l'Aude, puis par la Tête et ensuite par le Sègre. L'absence de déplacements interbassin induit plusieurs scénarios. Il peut s'agir de trois processus d'expansion indépendants depuis les bassins versants adjacents ou leur partie basse. Une autre option serait un processus unique avec une même provenance et qui a avancé progressivement de

bassin en bassin. Les conclusions de l'étude devraient permettre de trancher entre ces possibilités.

B. Perspectives de l'étude

L'étude n'est pas finie et les chercheurs vont maintenant s'atteler à répondre à la question de l'origine des populations recolonisatrices. Le travail consiste à récupérer des indices provenant des différentes populations françaises de loutre. Ils seront ensuite analysés pour pouvoir établir des apparentements entre ces populations et celles du PNRPC. Il y aura aussi toute la partie concernant le metabarcoding qui permettra d'étudier le régime alimentaire et de détecter la potentielle présence d'espèces patrimoniales. Cette opération n'a pu être menée avant notamment en raison des délais de traitements mais aussi pour des raisons plus pratiques liées à la taille et le prix des plaques à envoyer au laboratoire. Enfin, une fois toutes les données traitées, cette étude fera l'objet d'un article scientifique.

Lors de l'élaboration du plan d'échantillonnage, Jordi Ruiz-Olmo de l'Universitat Oberta de Catalunya a été consulté. Il a trouvé notre stratégie d'échantillonnage intéressante et pertinente soulignant notamment que les études semblables ont un niveau de génétique élevé mais une prise en compte du comportement, démographique ou écologique plus faible. Il a ensuite confirmé l'idée que cette étude était une très bonne occasion de comparer les résultats avec différentes méthodes d'échantillonnage (aléatoire, systématique, pour plus de commodité, différentes longueurs, nombre d'excréments par sites, etc.). Cependant il a aussi fait mention d'un possible manque de précision avec 100 échantillons. D'autre part il se questionne sur le software à utiliser ou si un petit modèle mathématique serait plus adéquat (capture-récupération, modèle accumulé, etc.). Il évoque enfin une possible collaboration ayant décidé de mener le même type d'étude génétique sur deux petits bassins versants espagnols similaires à ceux PNR. Malheureusement les délais étaient trop courts pour concrétiser ce partenariat

C. Intégration des connaissances

Certains résultats de cette étude viennent mettre à mal certaines des informations trouvées dans la bibliographie. Cela concerne notamment le comportement et les préférences de marquage des loutres qui avait été étudié sur un type de milieu en particulier. Il paraît évident que ce genre d'étude et les résultats qui en découlent sont à contextualiser par milieu voire par territoire. Sur le parc, on constate ainsi des différences entre les différents bassins versants.

Au niveau génétique, les méthodes utilisées diffèrent de celles habituellement trouvées dans les études du même type. Cette différence commence dès la conservation puisque le choix a été fait de ne pas conserver les prélèvements dans l'éthanol. C'était un choix osé vu l'état de dégradation de ce type de matériel génétique et des températures en cette période. L'excellent taux de succès de génotypage de cette étude par rapport à ce que l'on trouve dans les précédentes laisse penser que c'est un choix viable voire judicieux.

D. Limite du protocole

Plusieurs limites sont observées sur l'ensemble du protocole. En effet, 9 sites n'ont pu être échantillonnés car la loutre n'a pas remarqué ce site avant la fin de la campagne de collecte. Pour éviter des déplacements chronophages de vallée en vallée, les sites n'étaient plus visités au bout de 7 passages. Cela peut aussi être dû à une impossibilité d'accès comme les 3 sites le long de la route menant lac des Bouillouses car fermée à la circulation pendant la saison estivale.

Les prospections sont réalisées secteur après secteur, voire cours d'eau après cours d'eau, empêchant la détection d'individus sur des périodes continues. Les prélèvements réalisés lors du reset ne permettaient pas de trancher entre une occupation dans le temps ou juste un passage. De plus, sans visite quotidienne, il n'était pas possible de donner la direction de l'individu. Réaliser systématiquement plusieurs visites résoudrait ce problème mais l'objectif de cette étude était autre. Afin d'augmenter les chances de détecter un déplacement interbassin, il serait judicieux d'échantillonner des indices de loutre de part et d'autre des principaux cols durant la même période (La Perche, Creu, Sansa). Cette démarche permettrait de déterminer les corridors écologiques empruntés par les animaux et de faire le parallèle avec les flux génétiques.

Au niveau génétique, le fait de considérer unique deux génotypes avec minimum 8 marqueurs égaux, peut entraîner une surestimation de la densité de population. En effet, les individus ne présentant que 7 marqueurs de même taille pourraient en réalité provenir d'un individu déjà identifié mais en raison d'un ADN trop dégradé, les marqueurs étaient mal évalués.

V. Bibliographie

- Caro, T., et S. Girling. *Conservation by Proxy: Indicator, Umbrella, Keystone, Flagship, and Other Surrogate Species*. Island Press, 2010. <https://books.google.fr/books?id=i0W5yf4L12EC>.
- Cohen, Tali Magory, Tamar Narkiss, Amit Dolev, Yossi Ben-Ari, Noga Kronfeld-Schor, Amichai Guter, David Saltz, et Gila Kahila Bar-Gal. « Genetic Diversity of the Eurasian Otter (*Lutra Lutra*) Population in Israel ». *Journal of Heredity* 104, n° 2 (2013): 192-201. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess094>.
- Dallas, John F., David N. Carss, Freda Marshall, Klaus-Peter Koepfli, Hans Kruuk, Philip J. Bacon, et Stuart B. Piertney. « Sex Identification of the Eurasian Otter *Lutra Lutra* by PCR Typing of Spraints ». *Conservation Genetics* 1, n° 2 (1 juin 2000): 181-83. <https://doi.org/10.1023/A:1026551510861>.
- Dallas, John F., Karen E. Coxon, Tim Sykes, Paul R. F. Chanin, Freda Marshall, David N. Carss, Philip J. Bacon, Stuart B. Piertney, et Paul A. Racey. « Similar Estimates of Population Genetic Composition and Sex Ratio Derived from Carcasses and Faeces of Eurasian Otter *Lutra Lutra* ». *Molecular Ecology* 12, n° 1 (2003): 275-82. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01712.x>.
- F. DALLAS, JOHN, Philip Bacon, David Carss, JAMES W. H. CONROY, ROSIE GREEN, DON J. JEFFERIES, H Kruuk, FRED A MARSHALL, Stuart Piertney, et Paul Racey. « Genetic diversity in the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism ». *Biological Journal of the Linnean Society* 68 (14 janvier 2008): 73-86. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01159.x>.
- Ferrando, Aïnhua, Roberta Lecis, Xavier Domingo-Roura, et Montserrat Ponsà. « Genetic Diversity and Individual Identification of Reintroduced Otters (*Lutra Lutra*) in North-

- Eastern Spain by DNA Genotyping of Spraints ». *Conservation Genetics* 9, n° 1 (février 2008): 129-39. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9315-1>.
- Hájková, P., B. Zemanová, J. Bryja, B. Hájek, K. Roche, E. Tkadlec, et J. Zima. « Factors Affecting Success of PCR Amplification of Microsatellite Loci from Otter Faeces ». *Molecular Ecology Notes* 6, n° 2 (2006): 559-62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01269.x>.
- Hauer, Silke, Hermann Ansorge, et Olaf Zinke. « Mortality Patterns of Otters (*Lutra Lutra*) from Eastern Germany ». *Journal of Zoology* 256, n° 3 (2002): 361-68. <https://doi.org/10.1017/S0952836902000390>.
- Hung, Chih-Ming, Shou-Hsien Li, et Ling-Ling Lee. « Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen ». *Animal Conservation* 7 (1 août 2004): 301-11. <https://doi.org/10.1017/S1367943004001453>.
- Janssens, Xavier, Michaël C. Fontaine, Johan R. Michaux, Roland Libois, Jean de Kermabon, Pierre Defourny, et Philippe V. Baret. « Genetic Pattern of the Recent Recovery of European Otters in Southern France ». *Ecography* 31, n° 2 (avril 2008): 176-86. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.4936.x>.
- Koelewijn, H. P., M. Pérez-Haro, H. A. H. Jansman, M. C. Boerwinkel, J. Bovenschen, D. R. Lammertsma, F. J. J. Niewold, et A. T. Kuiters. « The Reintroduction of the Eurasian Otter (*Lutra Lutra*) into the Netherlands: Hidden Life Revealed by Noninvasive Genetic Monitoring ». *Conservation Genetics* 11, n° 2 (1 avril 2010): 601-14. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0051-6>.
- Lampa, Simone, Jean-Baptiste Mihoub, Bernd Gruber, Reinhard Klenke, et Klaus Henle. « Non-Invasive Genetic Mark-Recapture as a Means to Study Population Sizes and Marking Behaviour of the Elusive Eurasian Otter (*Lutra Lutra*) ». *PLOS ONE* 10, n° 5 (14 mai 2015): e0125684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125684>.
- Pigneur, Lise-Marie. « Apport de la génétique pour l'étude de la dynamique des populations de Loutre d'Europe *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) en France », s. d., 11.

« Longtemps disparue, la loutre a fait son retour dans les rivières de l'Aude - midilibre.fr ».

Publié le 23/03/2018. <https://www.midilibre.fr/2018/03/22/longtemps-disparue-la-loutre-a-fait-son-retour-dans-les-rivieres-de-l-aude,1644628.php>.

VI. Annexes

Tableau des tâches

Tâches principales	Acteurs
Bibliographie	Yon HALOTEL (PNRPC)
Elaboration du protocole	Yon HALOTEL , Guilhem MOLLERA (PNRPC) ; Olivier REY, Jérôme BOISSIER, Eve TOULZA (UPVD)
Collecte des données	Yon HALOTEL (PNRPC)
Analyses génétiques	Anaïs BORDES (UPVD)
Traitement statistiques	Yon HALOTEL , Marion LAVENTURE
Rédaction	Yon HALOTEL (PNRPC)

Tâches annexes :

- Tenu de Café Projet les lundis matins
- Participation au compte rendu annuel du ROB à Foix
- Comptage Perdrix grise à Nohèdes et Jujols
- Comptage Grand tétras au Col de Créu
- Participation à une capture chiroptères au pla de Mourens

Calendrier de stage

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S...	S21	S22	S23	S24
Bibliographie											
Elaboration du protocole											
Collecte des données											
Traitement statistiques											
Rédaction											

Résumé et mots clés

Nous avons voulu étudier et comprendre la dynamique de recolonisation de la Loutre d'Europe *Lutra lutra* dans le Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes dans un contexte contemporain et à l'échelle des bassins versants. Notre zone d'étude est composée de la tête de trois bassins versants (la Têt, l'Aude et le Sègre) dans le Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes. Des prélèvements d'épreintes et de gelées collectés entre Avril et Août 2019 dans cette zone ont été génotypés sur 10 marqueurs microsatellites spécifique à la loutre, donnant lieu à l'identification de 81 individus génétiquement distincts. Nous avons eu sept femelles et six mâles contactés plusieurs fois permettant de mettre en lumière leurs déplacements et les zones de contacts entre les individus. Certaines tendances dans le comportement de marquage ont pu être déterminées grâce au relevé de paramètres abiotiques. Les indices étaient retrouvés sur les sites les moins exposés et souvent sur un rocher. Les gelées ont été laissées aussi bien par les mâles que par les femelles. De plus amples analyses permettront de répondre aux questions telles que l'origine des populations recolonisatrices ou les liens de parentés entre les individus.

Mots-clés : Lutra, microsatellite, méthodes non-invasives, comportement de marquage, montagne, distribution spatiale