



THÈSE



En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Université de Liège

Présentée et soutenue par François Gillet

Titre :

Génétique et biologie de la conservation du desman des Pyrénées
(*Galemys pyrenaicus*) en France

Ecole doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Écologie, biodiversité et évolution

Unités de recherche :

C.E.F.S. (I.N.R.A. UR0035) et Unité de Génétique de la Conservation
(ULg)

Directeur(s) de Thèse :

Stéphane Aulagnier et Johan Michaux



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du



Université
de Liège

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :
Université de Liège

Présentée et soutenue par François Gillet

Titre :

Génétique et biologie de la conservation du desman des Pyrénées
(*Galemys pyrenaicus*) en France

Ecole doctorale et discipline ou spécialité :
ED SEVAB : Écologie, biodiversité et évolution

Unités de recherche :
C.E.F.S. (I.N.R.A. UR0035) et Unité de Génétique de la Conservation
(ULg)

Directeur(s) de Thèse :
Stéphane Aulagnier et Johan Michaux

Rapporteurs :
Alain Vanderpoorten
Géraldine Veron

Autre(s) membre(s) du jury :
Pierre-André Crochet
Frank D'Amico
Nicolas Gaidet-Drapier
Claude Miaud

Remerciements

Cette thèse est le résultat d'un travail de presque 5 ans au cours duquel de nombreuses personnes m'ont aidé et ont contribué directement à celui-ci. Je voudrais donc vivement les remercier à travers ces quelques mots (parfois humoristiques), en espérant n'oublier personne... Si c'est le cas je m'en excuse d'avance.

Cette aventure desmanique (et non pas démoniaque... quoique...) a commencée par une conversation avec Johan Michaux, mon co-directeur de thèse. Après un bref harcèlement moral de ma part pour savoir s'il avait un sujet de mémoire de master à éventuellement me proposer, il me répondit qu'il avait un sujet sur les mulots. Après quelques explications sur ce sujet, il me dit alors qu'il y aurait peut-être aussi un sujet sur le desman des Pyrénées... Intrigué, je lui répondis naturellement : « le quoi ?! » (deux mots que j'ai à mon tour entendu un nombre de fois incalculable par la suite). Finalement il ajouta « c'est un petit mammifère qui vit dans les Pyrénées et quand tu le prends dans la main, il meurt ». J'étais conquis.

Cette aventure aurait pu se terminer après ce mémoire mais, après plusieurs péripéties et autres rebondissements, elle a finalement (et heureusement!) continuée par une thèse de doctorat.

Donc merci Johan de m'avoir fait confiance; de t'être démené pour me trouver le financement pour réaliser cette thèse; de m'avoir toujours soutenu et encouragé que ce soit de près ou de loin, en début ou en fin de thèse; d'avoir toujours été aussi disponible; d'être resté toujours aussi positif et optimiste (mais ça c'est les gènes belges...); de m'avoir accueilli chez toi à plusieurs reprises (et de m'avoir laissé boire quelques-unes de tes bières lorsque j'étais loin de la Belgique, je sais que ça n'a pas été facile pour toi...); bref, merci pour tout!

Je voudrais également remercier Stéphane Aulagnier, qui a bien voulu accepter d'être mon autre co-directeur de thèse (sans harcèlement moral cette fois-ci). Merci de m'avoir aidé pour toutes les réinscriptions à l'université de Toulouse (pas toujours évidentes pour un belge) et d'avoir toujours été très disponible malgré la distance (en espérant ne pas avoir saturée votre boîte mails...). Merci également pour votre aide et votre hospitalité lors de quelques-uns de mes passages à Toulouse. Pour tout ça, un grand merci !

Merci à Mélanie et Fred (gamin !) du CEN Midi-Pyrénées pour tout le travail qu'ils ont réalisé notamment dans le cadre du Plan National d'Actions et du LIFE+ dans lesquels cette thèse était directement impliquée. Cette thèse a aussi été rendue possible grâce à vous. Merci pour votre aide et votre soutien constant depuis le début de cette thèse. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur caractéristiques, ça a été un plaisir de travailler avec vous et de vous côtoyer pendant ces quelques années.

Plus particulièrement, merci Mélanie pour ton hospitalité et ton accueil toujours chaleureux dans ta super famille.

Un merci particulier à toutes les personnes qui ont collecté des fèces (dans des conditions pas toujours évidentes) et qui ont servi lors de ce travail car, sans eux, celui-ci n'aurait pas été possible. Plus particulièrement merci aux structures suivantes : Association des Naturalistes de l'Ariège, Conservatoire d'Espaces Naturels d'Aquitaine, Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, Fédération Aude Claire, Fédération des Réserves Naturelles Catalanes, Groupe de Recherche et d'Etude pour la Gestion de l'Environnement, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Office National des Forêts, Parc National des Pyrénées.

Merci également à tous les financeurs ayant contribué directement ou indirectement à cette thèse : Fonds FEDER, Agence de l'eau Adour-Garonne, Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, DREAL Aquitaine, DREAL Midi-Pyrénées, DREAL Languedoc-Roussillon, Conseil Régional d'Aquitaine, de Midi-Pyrénées et du Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l'Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEM, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie).

Merci aux compagnons de capture avec qui j'ai passé de très bons moments et dont je ne garde que de bons souvenirs (dont l'histoire désormais célèbre du ragondin!). Je n'aurai jamais pensé que ce serait si amusant de soulever des pierres dans l'eau glacée à 3h du matin...Merci à l'équipe « Aude Claire » : Bruno, Aurélie et Patrick; aux vétérinaires Christine et Pascal (dit « Snickers »), à Vincent (qui confond des pommes de terre avec des pierres...) toujours là pour nous garder éveiller (même quand il dort...), à Alain, Anaïs, Cathie, Olivier, Gabrielle, Sarah, Frédérick et Nicolas (qui a fait du desman et de nous des stars! Enfin surtout le desman...).

Merci aux salariés du CEN Midi-Pyrénées que j'ai pu côtoyer et qui m'ont toujours bien accueilli, et au directeur, Daniel, qui m'a fait confiance pour faire partie de son équipe.

Merci aux collègues liégeois avec qui j'ai passé des très bons moments (au labo et en dehors) pendant ces 5 années et qui m'ont soutenu et aidé de nombreuses fois: Adrien, Alice L., Alice M., Laurent, Lise-Marie, Nathalie et Vincent. Je voudrais également remercier Maite Cabria pour m'avoir fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances qui m'ont servi tout au long de ce travail.

Merci aux amis et anciens diplômés (et futurs docteurs pour certains) de « Bio » pour toutes les super soirées passées avec vous et qui permettaient de relâcher la pression de temps en temps.

Merci à Antoine et Sophie (les futurs mariés) pour votre amitié si précieuse, votre présence et votre soutien.

Je voudrais remercier mes parents pour m'avoir permis de réaliser les études que je voulais (même s'il m'a fallu du temps pour trouver...) et de m'avoir toujours soutenu aussi bien financièrement que moralement. J'espère qu'en lisant la thèse vous aurez enfin compris sur quoi je travaillais... Merci aussi à tous les autres membres de ma famille (y compris la belle famille!) pour leur soutien tout au long de ce travail.

Enfin, merci à Julie pour sa présence et sa confiance, son indéfectible soutien et ses encouragements si précieux. Merci d'avoir toujours été à mes côtés (tu n'as pas le choix de toute manière) dans les bons moments comme dans les plus durs et de ne jamais avoir douté de moi. Merci pour tout.

Table des matières

CHAPITRE 1	13
INTRODUCTION GENERALE.....	13
1. La sixième extinction	15
1.1. Structure et diversité génétique des populations	16
1.2. Perte de diversité génétique.....	17
1.3. Dépression de consanguinité	18
2. Les études non invasives en génétique de la conservation.....	20
3. Objectifs et structure de la thèse.....	22
4. Présentation de l'espèce	25
4.1. Description	25
4.2. Systématique	26
4.3. Répartition.....	28
4.4. Habitat	30
4.6. Rythme d'activité, domaine vital et organisation sociale.....	32
4.7. Régime alimentaire.....	33
4.8. Causes de disparition.....	33
4.9. Statut de protection et de conservation.....	34
CHAPITRE 2	37
MATERIEL ET METHODES	37
1. Méthodologie d'échantillonnage.....	39
1.1 Echantillonnage à l'échelle des Pyrénées.....	39
1.2. Echantillonnage à l'échelle du tronçon de l'Aude soumis à régulation hydroélectrique	40
2. Marqueurs et analyses moléculaires.....	43
2.1. Marqueurs moléculaires	43
2.2. Séquençage de nouvelle génération.....	45
2.3. Structure des populations	45
2.3.1 Analyses de clustering.....	45
2.3.2. Histoire démographique	46

CHAPITRE 3	49
RESULTATS	49
Article 1	51
PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, <i>Galemys pyrenaicus</i> (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA.....	51
Résumé	51
Article 2.....	61
Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers in the endangered Pyrenean desman, <i>Galemys pyrenaicus</i>	61
Résumé	61
Abstract	65
Introduction	66
Material and methods	66
Results and discussion.....	67
Acknowledgments	69
References	69
Article 3.....	73
A new method to identify the endangered Pyrenean desman (<i>Galemys pyrenaicus</i>) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces	73
Résumé	73
Abstract	77
Introduction	78
Material and methods	79
Results	80
Discussion	81
Conclusion.....	84
Acknowledgments	85
References	85
Article 4.....	89
Evidence of a fine-scale genetic structure for the endangered Pyrenean desman (<i>Galemys pyrenaicus</i>) in the French Pyrenees.....	89

Résumé	89
Abstract	93
Introduction	94
Material and methods	95
Results	101
Discussion	107
Conclusion.....	111
Acknowledgments	111
References	112
Article 5.....	119
Using a complete molecular diet analysis and biotraits of prey community to refine a predator habitat selection. The case of the endangered Pyrenean desman (<i>Galemys pyrenaicus</i>)	119
Résumé	119
Abstract	125
Introduction	126
Material and Methods.....	128
Results	131
Discussion	136
Conclusion.....	139
Acknowledgments	140
References	140
Article 6.....	155
Genetic monitoring of the endangered Pyrenean desman (<i>Galemys pyrenaicus</i>) in the Aude river, France.....	155
Résumé	155
Abstract	159
Introduction	160
Material and methods	161
Results	163
Discussion	166

Conclusion.....	167
Acknowledgments	167
References	168
CHAPITRE 4	171
DISCUSSION GENERALE	171
1. Mise au point de nouvelles techniques d'études du desman des Pyrénées.....	173
1.1 L'identification génétique du desman des Pyrénées et ses applications.....	173
1.2. Identification génétique et problèmes liés à l'ADN	176
1.3. Intérêt des marqueurs microsatellites	177
2. Structure génétique à l'échelle des Pyrénées françaises.....	178
3. Nouvelles données sur le régime alimentaire du desman des Pyrénées	180
4. Suivi individuel de desmans des Pyrénées et déplacements associés.....	183
5. Implications pour la conservation du desman des Pyrénées.....	185
6. Perspectives.....	188
BIBLIOGRAPHIE	191
Illustrations.....	207
ANNEXE	209
Annexe 1	211
Summary	225
Résumé	228

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GENERALE



1. La sixième extinction

Voici comment certains scientifiques qualifient le déclin actuel de la biodiversité sur notre planète, tant la force de ce phénomène est comparable à celles des cinq précédentes extinctions (Myers & Knoll, 2001; Frankham et al., 2002; Wake & Vredenburg, 2008; Butchart et al., 2010; Dirzo et al., 2014). Depuis quelques années, les taux d'extinction n'ont cessé d'augmenter et, à l'heure actuelle, ils pourraient atteindre une valeur largement supérieure à celles rencontrées lors des précédentes crises. La vitesse à laquelle les organismes disparaissent est beaucoup plus grande que celle à laquelle ils apparaissent, si bien qu'un grand nombre d'entre eux ont déjà disparu, tandis que d'autres subissent des réductions de taille de population qui mettent en péril leur survie. Bien que l'extinction d'espèces fasse partie du processus évolutif sur notre planète, la crise actuelle, contrairement aux crises précédentes, est principalement causée par les activités humaines. Le paradoxe qui en résulte est, qu'aujourd'hui, de nombreuses espèces requièrent une intervention humaine pour les conserver et assurer leur pérennité.

C'est notamment pour cela que le concept de biologie de la conservation a été développé. En effet, cette science multidisciplinaire a essentiellement deux buts : évaluer l'impact de l'Homme sur la biodiversité et développer des approches pratiques pour prévenir l'extinction des espèces (Soulé, 1985). La discipline de la génétique de la conservation est ensuite apparue avec l'application des techniques moléculaires dans les études d'espèces menacées. La génétique de la conservation utilise la théorie et les techniques génétiques afin de réduire le risque d'extinction des espèces menacées (Frankham et al., 2002). Son but à long terme est de préserver les espèces en tant qu'entités dynamiques capables de s'adapter au changement de leur environnement. Cette discipline se focalise notamment sur les conséquences génétiques de la réduction de taille des populations d'une espèce.

L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) définit comme « menacée » une espèce présentant un haut risque d'extinction dans un court laps de temps. Ainsi, 23% des vertébrés, 51% des invertébrés et 70% des plantes seraient considérés comme menacés, ce qui concerne 22% des mammifères (IUCN, <http://www.iucnredlist.org/>). Les causes de cette érosion de la biodiversité sont multiples : la dégradation et/ou la destruction de l'habitat, les changements climatiques, l'introduction d'espèces exotiques, l'exploitation ou encore l'apparition de pathogènes. Ces phénomènes, qui résultent principalement des activités

anthropiques, peuvent entraîner des réductions de surface et une fragmentation des habitats favorables et donc une diminution des effectifs des populations naturelles et un isolement de celles-ci.

Ces populations réduites et isolées vont alors être soumises à des facteurs stochastiques dont la source est variable et qui peuvent potentiellement entraîner de nouvelles diminutions d'effectif et mener à l'extinction de ces populations. Cette source peut être d'origine démographique : tous les individus d'une population ne participent généralement pas de la même manière à la reproduction, et si l'effectif se réduit, le nombre d'individus reproducteurs se réduira aussi. Elle peut également être environnementale : certains facteurs environnementaux (température, nourriture, densité de prédateurs, etc.) peuvent être modifiés de manière imprévisible et mener à des changements aléatoires du taux de natalité et/ou de mortalité. Les catastrophes naturelles font également partie de cette stochasticité environnementale et auront d'autant plus d'impact que les populations sont petites et isolées. Enfin la source peut être génétique : des changements de la constitution génétique d'une population peuvent survenir par dérive en entraînant la modification de la fréquence d'un allèle au sein d'une population, indépendamment des mutations, de la sélection naturelle ou des migrations. Cette dérive est d'autant plus intense et néfaste que la population est petite puisque la probabilité qu'un allèle délétère s'y fixe y est plus grande (Caughley, 1994; Frankham et al., 2002).

1.1. Structure et diversité génétique des populations

Dans l'étude d'une espèce menacée il est donc primordial de pouvoir définir la structure de ses populations, leur effectif, mais également leur degré d'isolement afin de voir dans quelle mesure celles-ci vont être ou ont été affectées par ces facteurs stochastiques. Si l'habitat disponible d'une espèce est discontinu ou varie au sein de son aire de distribution, par exemple à cause de barrières naturelles, sa variabilité génétique peut souvent se retrouver structurée dans l'espace (Geffen et al., 2004; Pérez-Espona et al., 2008; Hartmann et al., 2013; Mager et al., 2014). Mais comme évoqué précédemment, les activités humaines jouent également un rôle dans la structuration des populations, particulièrement en entraînant la perte des habitats favorables ou en fragmentant ceux-ci (Gerlach & Musolf, 2000; Taylor et al., 2011; Coster & Kovach, 2012; Fietz et al., 2014; Mona et al., 2014). Le potentiel de dispersion, la structure sociale, mais également les flux de gènes entre populations vont être

affectés par cette fragmentation qui induit une diminution de la taille effective des populations.

Ces populations qui ont subi des réductions importantes d'effectifs peuvent alors encourir d'autres problèmes au niveau génétique comme une perte de diversité importante ou un risque augmenté de dépression de consanguinité. Bien qu'ils aient été controversés par le passé (Lande, 1988), de nombreuses études ont démontré que ces deux facteurs contribuaient au risque d'extinction des espèces (Lande, 1994; Crnokrak & Roff, 1999; Frankham, 2003, 2005a). Ceci est généralement dû au fait que les espèces menacées sont caractérisées par des petites populations et/ou qui sont en déclin et que, dans de telles populations, la consanguinité et la perte de diversité génétique sont inévitables (Frankham et al., 2002).

1.2. Perte de diversité génétique

Pour s'adapter à leur environnement et pouvoir évoluer, les espèces ont besoin d'un certain degré de diversité génétique. Alors que les espèces comptant des populations à large effectif possèdent généralement ce degré de diversité nécessaire pour conférer la résistance requise envers les changements globaux, les petites populations ont des niveaux de diversité génétique plus faibles. Ces populations réduites vont donc être confrontées à un risque d'extinction plus grand, du fait de leur potentiel évolutif plus faible, c'est-à-dire de leur capacité réduite à affronter les changements qui peuvent survenir (Frankham, 2005b; Bijlsma & Loeschke, 2012).

Le cas du guépard (*Acinonyx jubatus*) est un bon exemple pour mettre en évidence les dangers liés à la perte de diversité génétique d'une population ou d'une espèce. Il fit l'objet de plusieurs études moléculaires qui démontrèrent le manque de variabilité génétique de cette espèce, notamment par rapport à d'autres espèces de félidés ou de mammifères (O'Brien et al., 1985; O'Brien, 1994). Cette faible variabilité était notamment manifeste au niveau des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui joue un rôle prépondérant dans les réponses immunitaires et particulièrement dans la défense contre les virus. En effet, un taux de mortalité extrêmement élevé fut observé chez le guépard suite à l'attaque du virus de la Péritonite Infectieuse Féline (O'Brien et al., 1985).

1.3. Dépression de consanguinité

Par définition, un individu est consanguin s'il résulte d'un croisement entre individus apparentés. La dépression de consanguinité peut être définie comme la baisse du succès reproducteur chez des individus consanguins par rapport à des individus non consanguins. Ce phénomène survient généralement suite à une réduction de taille importante dans une population non consanguine où certains allèles délétères récessifs se sont accumulés et vont pouvoir être exprimés de manière plus importante chez les individus consanguins qui vont apparaître (Lande, 1994).

La consanguinité est depuis longtemps connue pour réduire le potentiel reproducteur et la survie des espèces naturellement non consanguines (Frankham, 2005a). Les impacts de la consanguinité ont été démontrés sur des espèces de mammifères maintenus en captivité où la mortalité des individus consanguins était significativement plus élevée que celle des individus non consanguins (Ralls & Ballou, 1983). Mais ces impacts négatifs ont également été démontrés sur des espèces sauvages dans leurs habitats naturels (Crnokrak & Roff, 1999; Dietz et al., 2000), bien qu'ils aient été controversés par le passé (Caro & Laurenson, 1994; Caughley, 1994).

Les relations entre la taille de la population, la perte de diversité génétique et la consanguinité peuvent être décrites par l'équation suivante :

$$H_t / H_0 = (1 - 1 / [2N_e])^t = 1 - F,$$

où H_t est l'hétérozygotie (attendue selon le modèle de Hardy-Weinberg) à la génération t et qui quantifie la diversité génétique, H_0 est l'hétérozygotie initiale, N_e est la taille efficace de la population et F le coefficient de consanguinité, aussi appelé déficit en hétérozygote. Etant donné que le terme central de l'équation est approximativement égal à $e^{-t/2N_e}$, cette équation peut être représentée par une exponentielle décroissante de la diversité génétique en fonction du nombre de générations, avec une pente plus importante pour les petites populations (Figure 1).

La taille efficace peut être définie comme une approximation du nombre d'individus qui contribuent réellement à la reproduction, nombre qui est généralement beaucoup plus petit que le nombre d'individus potentiellement reproducteurs (Frankham, 1995). Cette taille efficace est donc un paramètre important en biologie de la conservation puisqu'il va permettre

de déterminer, dans une certaine mesure, la perte de diversité génétique et la dépression de consanguinité pouvant affecter une espèce menacée.

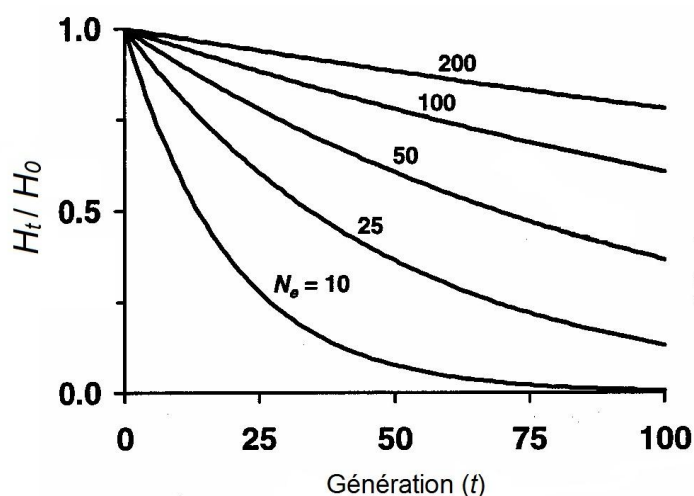


Figure 1. Déclin de l'hétérozygotie attendue, en fonction du temps, dans plusieurs populations de tailles efficaces différentes (Frankham et al., 2002).

Si ces facteurs génétiques, associés aux impacts anthropiques et aux événements stochastiques ne sont pas pris en compte, la vulnérabilité de l'espèce étudiée pourrait sensiblement augmenter et entrer dans ce qui est appelé le vortex d'extinction (Gilpin & Soulé, 1986) (Figure 2).

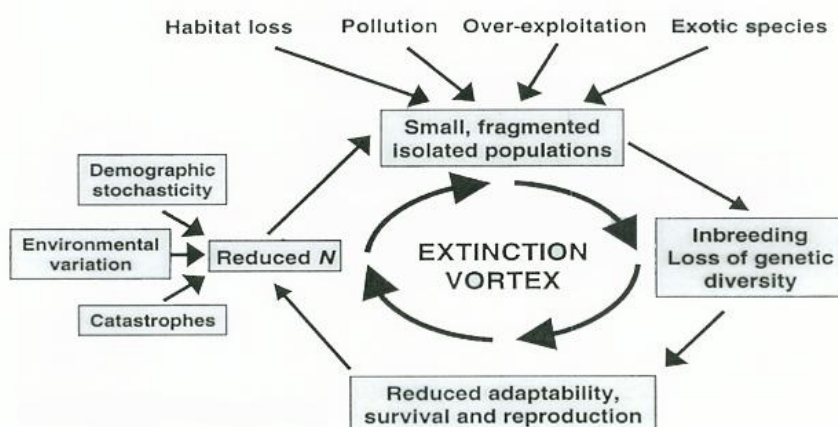


Figure 2. Vortex d'extinction montrant les interactions entre les effets démographiques et génétiques dus aux impacts d'origine anthropique associés aux facteurs environnementaux et qui diminuent la survie potentielle de l'espèce étudiée (Frankham et al. 2002).

2. Les études non invasives en génétique de la conservation

Pour obtenir des informations utiles sur la génétique d'une espèce particulièrement discrète ou menacée d'extinction, il n'est pas toujours évident ni approprié d'utiliser des méthodes qui vont porter atteinte à l'intégrité physique ou psychologique de l'espèce. Ces méthodes dites destructrices (l'animal est tué et des échantillons peuvent être prélevés sur celui-ci) ou non-destructrices (l'animal est capturé), peuvent être remplacées par des méthodes dites non invasives. Ces méthodes permettent, en effet, d'obtenir des informations sur l'espèce considérée sans devoir capturer, manipuler ou même observer les individus (Hoss et al., 1992; Taberlet et al., 1999).

Tableau 1. Quelques sources d'ADN non invasives avec espèces et études associées.

Source d'ADN	Espèce	Etude
Poils	Ours brun (<i>Ursus arctos</i>)	(Lorenzini et al., 2004)
	Martre (<i>Martes martes</i>)	(Mullins et al., 2010)
Fèces	Ours brun (<i>Ursus arctos</i>)	(Bellemain et al., 2005)
	Lynx pardelle (<i>Lynx pardinus</i>)	(Palomares et al., 2002)
	Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	(Mondol et al., 2009)
Urine	Plusieurs espèces de canidés	(Valière & Taberlet, 2000)
Salive	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	(Blejwas et al., 2006)
Plumes	Mésange bleue (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	(Taberlet & Bouvet, 1991)
Coquilles d'œufs	Goéland argenté (<i>Larus argentatus</i>) et Sterne caspienne (<i>Sterna caspia</i>)	(Schmaltz et al., 2006)
Pelotes de réjection	Chouette effraie (<i>Tyto alba</i>)	(Taberlet & Fumagalli, 1996)

Les sources d'ADN non invasives sont nombreuses (Tableau 1) et, parmi celles-ci, les excréments sont souvent utilisés car ils contiennent généralement plus d'ADN que les autres sources, ils sont facilement récoltables et fournissent plus d'informations (Kohn & Wayne, 1997). Néanmoins, étant donné que la quantité d'ADN contenue dans les excréments peut être

très faible et que l'ADN est généralement fragmenté, plusieurs erreurs liées à l'amplification lors de la PCR ou des problèmes de génotypage (dans le cas des microsatellites) sont fréquents. Les analyses génétiques utilisant du matériel non invasif sont aussi soumises à plus de règles et de contraintes méthodologiques, comme par exemple l'utilisation d'une approche multitube pour répéter le nombre de PCR (Taberlet & Fumagalli, 1996; Taberlet et al., 1999; Pompanon et al., 2005). Toutes ces sources d'ADN non invasives ont trouvé de nombreuses applications, et permettent de fournir de nombreuses informations sur la biologie et l'écologie des espèces étudiées (Tableau 2). Toutes ces informations peuvent notamment s'avérer particulièrement utiles pour les espèces menacées.

Tableau 2. Applications des sources d'ADN non invasives à l'étude de la biologie et de l'écologie de quelques espèces de mammifères.

Application	Espèce	Etude
Identification d'espèces rares	Lynx pardelle (<i>Lynx pardinus</i>)	(Palomares et al., 2002)
	Ours brun (<i>Ursus arctos</i>)	(Taberlet et al., 1997)
	Panthère des neiges (<i>Panthera uncia</i>)	(Janecka et al., 2008)
	Desman des Pyrénées (<i>Galemys pyrenaicus</i>)	(Gillet et al., 2015)
Estimation de taille de population	Ours brun (<i>Ursus arctos</i>)	(Solberg et al., 2006)
	Puma (<i>Puma concolor</i>)	(Miotto et al., 2007)
	Elephant de forêt (<i>Loxodonta cyclotis</i>)	(Eggert et al., 2003)
Diversité génétique	Ours brun (<i>Ursus arctos</i>)	(Kohn et al., 1995)
	Panthère des neiges (<i>Panthera uncia</i>)	(Zhang et al., 2008)
	Loutre (<i>Lutra lutra</i>)	(Ferrando et al., 2008)
Détermination du sexe	Phoque gris (<i>Halichoerus grypus</i>)	(Reed et al., 1997)
	Loutre (<i>Lutra lutra</i>)	(Mucci & Randi, 2007)
Régime alimentaire	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	(Fedriani & Kohn, 2001)
	<i>Leopoldamys neilli</i>	(Latinne et al., 2014)

3. Objectifs et structure de la thèse

Selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN), une espèce de mammifères sur six est menacée en Europe (IUCN, 2010). Parmi celles-ci, se trouvent, entre autres, le vison d'Europe (*Mustela lutreola*), le lynx pardelle (*Lynx pardinus*) ou le desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*). Le desman des Pyrénées est un petit mammifère insectivore semi-aquatique inféodé aux cours d'eau du massif pyrénéen et du nord-ouest de la péninsule ibérique. Cette espèce est caractérisée par un manque global d'informations concernant sa biologie et son écologie. Ceci peut s'expliquer par son comportement élusif et cryptique, mais aussi par l'absence de méthodes d'étude simples et fiables.

Le desman des Pyrénées présente un intérêt patrimonial à l'échelle de l'Union Européenne, il est inscrit sur les listes rouges espagnole et française, ainsi que dans les annexes prioritaires des conventions ou directives européennes. En France, ce petit mammifère est protégé au niveau national et a fait l'objet d'un Plan National d'Actions de 2010 à 2015, commandé par le Ministère de l'Energie, de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire (MEEDDAT), poursuivi actuellement par un projet LIFE+ Desman (LIFE13NAT/FR/000092).

Etant donné que son observation directe est extrêmement rare et laborieuse, la méthode d'étude et de recensement la plus appropriée est la récolte de fèces. Les fèces sont relativement faciles à collecter, à bas coût, et permettent de répondre à la plupart des questions posées sur la biologie de la conservation de l'espèce (distribution précise de l'espèce, structuration génétique ou non de celle-ci, flux géniques existant d'une région à l'autre favorisant à long terme sa survie, capacités de re-colonisation, etc.). La récolte de fèces n'est cependant pas toujours la technique la plus fiable puisque les fèces du desman des Pyrénées peuvent être confondues avec celles d'autres espèces semi-aquatiques vivant dans le même type d'habitat, comme la crossope aquatique (*Neomys fodiens*) ou le cincle plongeur (*Cinclus cinclus*) (Némoz & Bertrand, 2008). D'autres techniques comme le radiopistage ou la capture peuvent également être employées mais cette dernière doit se faire avec beaucoup de précautions car, en raison de la fragilité de l'espèce, la mort de l'animal est chose fréquente (González-Esteban et al., 2003a). Selon ces informations, la mise en point de méthodes d'identification fiables des fèces récoltées sur le terrain paraît particulièrement importante pour pouvoir améliorer nos connaissances sur le desman des Pyrénées.

Les données génétiques sur cette espèce se sont accumulées depuis le début du XXI^{ème} siècle (Douady et al., 2002; Shinohara et al., 2003; Cabria et al., 2006; Vidal et al., 2009) jusqu'à une étude récente qui mis en évidence la phylogéographie du desman des Pyrénées à partir de séquences d'ADN mitochondrial (cytochrome b et D-Loop) et de séquences nucléaires introniques (Igea et al., 2013), ainsi que la présence de niveaux très bas de diversité génétique comparativement à d'autres mammifères. Cependant, ces marqueurs moléculaires ne sont pas assez puissants afin de déceler une éventuelle structuration génétique plus récente ou mettre en évidence des flux de gènes entre populations. Ces informations seraient d'autant plus nécessaires qu'elles permettraient d'améliorer la stratégie de conservation du desman des Pyrénées.

Le but de cette thèse a donc été de renforcer les connaissances sur la biologie et la génétique de la conservation du desman des Pyrénées à travers plusieurs objectifs.

Le premier objectif (**articles 1, 2 et 3**) de ce travail a été de mettre au point plusieurs méthodes et outils génétiques afin de pouvoir : (1) identifier le desman des Pyrénées à partir d'échantillons non invasifs et ainsi estimer plus précisément sa distribution sur l'ensemble des Pyrénées françaises, (2) définir la structure génétique des populations à l'échelle de la même région et (3) analyser son régime alimentaire en utilisant une technique de séquençage de nouvelle génération associée au barcoding de l'ADN.

Le deuxième objectif (**article 4**) a été d'utiliser ces outils moléculaires afin d'étudier la structure génétique du desman dans les Pyrénées françaises, où il est considéré être le plus homogène génétiquement par Igea et al. (2013).

Le troisième objectif (**article 5**) a été d'établir son régime alimentaire dans tout le versant français de la chaîne des Pyrénées par la méthode de métabarcoding développée pendant cette thèse.

Enfin le quatrième objectif (**article 6**) a été de réaliser un suivi individuel de desmans des Pyrénées occupant un tronçon de rivière soumis à régulation hydroélectrique pendant trois années successives, afin de détecter un éventuel effet de telles activités sur les populations de desmans.

Cette thèse est donc organisée en quatre chapitres qui s'articulent autour des résultats des quatre objectifs recouvrant plusieurs approches et différentes échelles d'étude. Ces résultats sont présentés dans le **chapitre 3**, qui comprend six articles.

L'**article 1** présente les différentes méthodes d'identification génétique mises au point afin de pouvoir identifier aisément le desman des Pyrénées à partir d'échantillons de fèces et de le différencier d'autres espèces proches d'un point de vue écologique. L'**article 2** décrit les méthodes utilisées pour isoler et mettre au point les premiers marqueurs microsatellites développés pour le desman des Pyrénées et nécessaires aux études de sa structure génétique et de son suivi individuel. Enfin, l'**article 3** présente la première étude du régime alimentaire du desman des Pyrénées réalisée sur un petit nombre d'échantillons (24) et en utilisant une technique de séquençage haut-débit couplée à l'amplification d'un petit fragment de gène utilisé dans le barcoding, le cytochrome oxydase I (COI).

L'**article 4** présente l'étude de la structure génétique du desman dans les Pyrénées françaises. Cette étude se base sur un échantillonnage important recouvrant la totalité du massif pyrénéen français et utilise les marqueurs microsatellites mis au point dans l'**article 2**.

L'**article 5** décrit l'étude plus approfondie du régime alimentaire du desman des Pyrénées à partir d'un grand nombre d'échantillons (+ de 300), répartis sur l'ensemble du versant français de la chaîne des Pyrénées, couplée à l'utilisation des biotraits de sa communauté de proies afin d'identifier ses zones de chasse.

L'**article 6** développe le suivi d'une population occupant un tronçon de l'Aude soumis à régulation hydroélectrique où des travaux d'aménagements ont été effectués entre 2011 et 2013. Cette étude se base sur des échantillons de fèces collectés sur ce tronçon, des poils prélevés sur des animaux capturés ainsi que sur l'utilisation des microsatellites mis au point dans l'**article 2**. Le but était de mettre en évidence un impact potentiel de ces travaux sur les desmans occupant ce tronçon de rivière.

Enfin, le **chapitre 4** se présente sous la forme d'une discussion générale qui reprend les résultats majeurs obtenus au cours de cette thèse. Les perspectives pouvant permettre d'améliorer encore nos connaissances sur le desman des Pyrénées ainsi que les mesures de conservation prises à son égard y sont également discutées.

4. Présentation de l'espèce

Galemys pyrenaicus (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811)



Desman des Pyrénées © Éric Delgado

4.1. Description

Le desman des Pyrénées, *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811) est un petit mammifère insectivore endémique du nord-ouest de la péninsule ibérique (Espagne et Portugal) et du massif pyrénéen. Il mesure, en moyenne, entre 24 et 27 cm, dont plus de la moitié pour la queue. Cette espèce est considérée comme semi-aquatique et elle est inféodée aux cours d'eaux de montagnes de toute altitude, bien que la réactualisation récente des données mette en évidence une diminution de sa présence dans les zones de basse altitude (Charbonnel, 2015). Elle est également observée dans les canaux, les biefs de moulins ou les lacs d'altitude.

Sa morphologie particulière lui confère une aisance remarquable dans l'eau. Premièrement, les pattes postérieures, qui jouent un rôle important dans la nage, sont très développées, les pieds occupant plus du tiers de la longueur de la jambe. Les cinq doigts, munis de fortes griffes, sont reliés par une palmure complète. Deuxièmement, sa fourrure est formée de deux couches de poils. La couche interne est composée d'un duvet serré et étanche tandis que la couche externe est formée de longs poils, de longueurs inégales. Ces deux assises permettent la formation d'une couche d'air isolante, qui protège contre le froid et l'eau. Enfin, la queue, très longue, est comprimée verticalement et pourvue d'une rangée de poils à son extrémité favorisant son effet de gouvernail (Palmeirim & Hoffmann, 1983; Némoz & Bertrand, 2008).

Le desman des Pyrénées possède également une trompe mobile et préhensile, mesurant environ 15 mm, et formée par la fusion des narines et de la lèvre supérieure, comme chez l'éléphant. De nombreux organes tactiles constituent cette trompe : des organes d'Eimer sur toute la surface et des vibrisses à proximité de la tête (Bauchot et al., 1973). Dans la bouche se trouverait également un organe de Jacobson, développé et fonctionnel, mais dont on ignore encore le rôle chez cette espèce (Némoz & Bertrand, 2008). Enfin, la queue porte une glande à musc près de sa base, les yeux sont minuscules et enfouis sous la fourrure, tout comme les oreilles qui ne comportent pas de pavillon.



Figure 3. Patte antérieure (à gauche) et trompe (à droite) de desman des Pyrénées (Photos : Alain Bertrand)

4.2. Systématique

Cette espèce appartient à l'ordre des Soricomorpha, à la famille des Talpidae et à la sous-famille des Desmaninae (Douady et al., 2002; Motokawa, 2004; Hutterer, 2005). Cette sous-famille ne comporte à l'heure actuelle que deux espèces, la seconde étant le desman musqué (*Desmana moschata*), qui peuple les cours d'eau de Russie méridionale et qui diffère essentiellement du desman des Pyrénées par sa taille plus importante (corps + tête = 22cm). L'appartenance de ces deux espèces à la même sous-famille ainsi que leur lien phylogénétique a récemment été confirmé (Cabria et al., 2006).

Les plus vieux fossiles appartenant à la famille des Talpidae datent de la fin de l'Eocène (37-33Ma) en Europe et de la fin de l'Oligocène (28-23Ma) en Amérique du Nord (McKenna & Bell, 1997). En se basant sur ces spécimens et à partir de données géologiques, il a été proposé que cette famille était apparue en Europe et s'était ensuite répandue en Asie et en Amérique du Nord à la suite d'événements de dispersion (Hutchison, 1976; Moore, 1986; Whidden, 2000; Shinohara et al., 2003). C'est à la fin de l'ère Tertiaire que la famille des

Talpidae se serait considérablement diversifiée entraînant l'apparition, notamment, d'une variété importante de modes de locomotion : course, semi-aquatique, aquatique/fouisseur, semi-fouisseur et fouisseur au sens stricte (Hutchison, 1976; Yates & Moore, 1990). Le fait que des spécimens de talpidés vivant et fossilisés aient des distributions discontinues au sein et entre l'Europe, l'Asie et l'Amérique du Nord est une source majeure de controverse parmi les hypothèses phylogénétiques concernant l'évolution et la radiation de cette famille (Hutchison, 1976; Yates & Moore, 1990; Whidden, 2000; Shinohara et al., 2003). En ce qui concerne le desman des Pyrénées, sa présence a été mise en évidence au moins depuis le Miocène (de -24 à -5 millions d'années). La découverte de fossiles à Sansans dans le Gers, près d'Issoire dans le Puy-de-Dôme et dans le comté de Norfolk en Angleterre, montre que l'espèce avait une aire de répartition beaucoup plus vaste avant les glaciations quaternaires (Puisségur, 1935; Saint-Girons, 1973). Une donnée datée de -10000 à -12000 ans est connue en Dordogne (Vigne, dans Némoz & Bertrand 2008). De plus, les données fossiles indiquent que les Desmaninae étaient beaucoup plus diversifiés dans le passé et les plus vieux fossiles de desman dateraient d'il y a 4,2 Ma en Pologne et en Roumanie (Rümke, 1985; McKenna & Bell, 1997; Fortelius, 2012).

Deux sous-espèces de desman des Pyrénées sont distinguées sur la base de critères morphologiques (Palmeirim & Hoffmann, 1983) : *G. p. pyrenaicus* (E.Geoffroy, 1811) et *G. p. rufulus* (Graells, 1897). La première occuperait les Pyrénées, la seconde le reste de la péninsule ibérique. Selon certaines études, la variabilité morphologique de *Galemys pyrenaicus* ne permettrait cependant pas une différenciation claire entre les deux sous-espèces (Peyre, 1956; A Bertrand, 1993), tandis que d'autres auteurs confirment une variation significative de la taille du crâne des desmans en fonction de leur provenance (López-Fuster et al., 2006). Des données génétiques récentes semblent aller dans le sens de cette distinction (Castresana et al., 2013).

L'histoire évolutive du desman des Pyrénées semble avoir fortement été influencée par les glaciations du Pléistocène, révélant une structure phylogéographique comprenant quatre lignées mitochondriales, dont une inféodée aux Pyrénées, avec une distribution parapatrique (Igea et al., 2013). Plus spécifiquement la lignée pyrénéenne serait génétiquement très homogène et aurait trouvé origine à partir d'une zone refuge située dans les montagnes basques espagnoles, après un phénomène de goulot d'étranglement important. Cependant, malgré ces premiers résultats intéressants, aucune information concernant la génétique du

desman des Pyrénées, à une échelle spatiale et temporelle plus fine, n'est encore actuellement disponibles.

4.3. Répartition

Le desman des Pyrénées présente une distribution pouvant être répartie en quatre zones. Il est présent sur les deux versants des Pyrénées, sur l'arc Atlantique qui inclut la Cordillère Cantabrique, le massif galicien et le nord du Portugal, ainsi que sur le Système Central espagnol et le Système Ibérique septentrional (Figure 4). Ces quatre zones sont actuellement isolées. Les populations du Système Central espagnol présenteraient actuellement un risque d'extinction élevé (Gisbert & Garcíá-Perea, 2014). La zone géographique occupée par cette espèce concerne l'administration de quatre pays : l'Espagne, le Portugal, la France et Andorre (Queiroz, 1999).

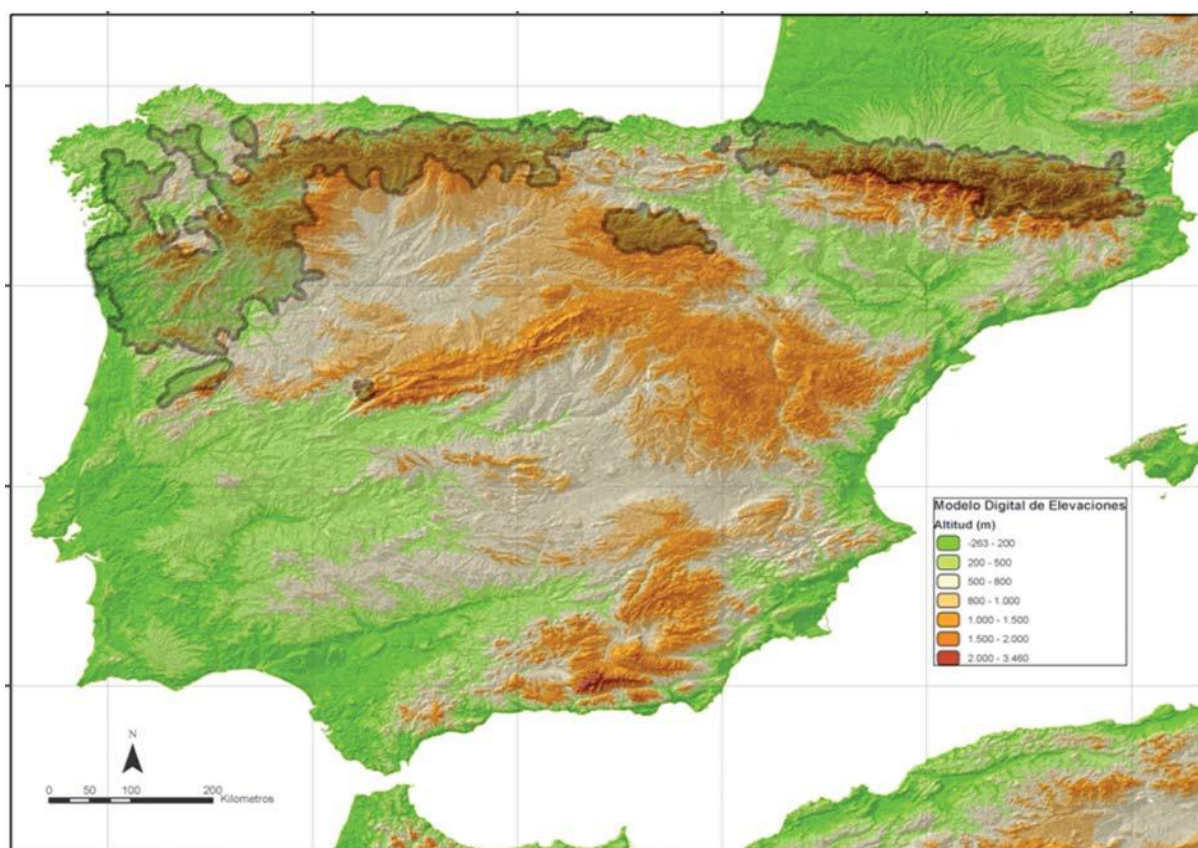


Figure 4. Carte de l'aire de répartition mondiale actuelle du desman des Pyrénées (extrait de Gisbert & Garcíá-Perea (2014)).

Jusqu'à très récemment, les données sur la répartition de l'espèce sont restées fragmentaires pour l'ensemble de son aire de répartition. L'étude de l'aire de répartition, tant en France qu'au Portugal et en Andorre, repose essentiellement sur la recherche de fèces. Ces données ont été complétées par les observations visuelles, les captures, et l'analyse du contenu des restes alimentaires et des fèces des prédateurs. En Espagne, les données pour délimiter l'aire de répartition actuelle sont basées principalement sur des observations et des captures.

En France, le desman des Pyrénées est présent dans l'ensemble du massif pyrénéen, mais avec un fort gradient de répartition ouest/est, caractérisé par moins de sites de présence à l'ouest (Pyrénées-Atlantiques, Hautes-Pyrénées, Haute-Garonne et ouest de l'Ariège) tandis que les populations sont beaucoup plus présentes et abondantes à l'est (est de l'Ariège, Aude et Pyrénées-Orientales) (Charbonnel, 2015). Il peuple les cours d'eau et les lacs jusqu'à très haute altitude (>2700m). La limite altitudinale inférieure de sa répartition est, par contre, plus difficile à préciser. Elle est proche de 80 mètres dans les Pyrénées-Atlantiques (commune de Uhart-Mixe, sur La Bidouze), mais s'élève rapidement, elle est rarement inférieure à 450 mètres sur le reste de la chaîne pyrénéenne française. La plus basse observation de Desman à l'est est de 360 mètres d'altitude (commune de Caudiès-de-Fenouillèdes, ruisseau de Saint Jaume) (Némoz et al., 2011).

Plusieurs facteurs influencent la répartition de cette espèce : altitude, pluviométrie, période de sécheresse, pente, débit des cours d'eau, nature des berges. Ainsi, les importantes modifications d'origine anthropique que peuvent subir certains cours d'eau, comme celles liées aux aménagements hydrauliques, influent probablement, de manière non négligeable, sur la répartition actuelle du desman des Pyrénées. Bien que les données concernant l'aire de répartition ne soient pas complètes et qu'il subsiste encore de nombreuses interrogations, tous les spécialistes de l'espèce s'accordent cependant à dire que l'aire de répartition de l'espèce ne cesse de se fragmenter et que le déclin de l'espèce se poursuit, notamment en France (Némoz & Bertrand, 2008). Ce constat est validé par les données collectées dans le cadre du Plan National d'Actions en faveur de l'espèce (2011 – 2013) qui permettent d'évaluer la régression à environ 60% (Charbonnel, 2015).

4.4. Habitat

Le desman des Pyrénées ne creuse pas de terriers mais établit son gîte dans les cavités naturelles des berges et dans les anfractuosités entre les pierres ou les racines. Il peut également occuper le terrier abandonné d'une autre espèce, comme le campagnol amphibie (*Arvicola sapidus*) (Peyre, 1956). Le desman des Pyrénées peut utiliser plusieurs gîtes, mais n'a en général qu'un seul gîte principal, les autres n'étant utilisés que durant de courtes périodes (10-15 minutes) (Stone, 1987a; Némoz & Bertrand, 2008). L'existence de plusieurs gîtes a été confirmée par une étude récente (Melero et al., 2012).

L'habitat caractéristique du desman des Pyrénées est constitué de cours d'eau oligotrophes de basses, moyennes et hautes altitudes. Cependant, de nombreuses observations ont aussi été rapportées dans des lacs de haute altitude, notamment dans les Pyrénées (Bertrand, 1992). Plusieurs facteurs conditionneraient la présence du desman des Pyrénées : la température, l'oxygénation de l'eau, la vitesse du courant, la faune aquatique et le faciès des cours d'eau (Peyre, 1956). D'autres facteurs comme la luminosité, la granulométrie ou la largeur et la profondeur du cours d'eau, ont également été étudiés.

Une étude récente a montré que la vitesse du courant avait une influence positive sur la présence du desman des Pyrénées (Charbonnel et al., 2015). Cette préférence pour les courants rapides avait déjà été suggérée par le passé (Nores et al. 1992; Queiroz et al. 1992; Queiroz et al. 1996; Ramalhinho & Boa Vida 1993) et une hypothèse d'explication émise par Charbonnel et al. (2015) serait que l'abondance et la richesse en invertébrés, constituant les principales proies du desman, sont positivement corrélées avec la vitesse du courant (Bertrand, 1994; Dewson et al., 2007). Il ressort également de cette étude que le nombre de petits cours d'eau affluents a également une influence positive sur la présence du desman. Ces cours d'eau pourraient en effet jouer le rôle de refuges en cas de crue importante et ainsi faciliter la recolonisation par l'espèce des sites perturbés (Lake, 2000; Charbonnel et al., 2015).



Figure 5. Exemples de rivières à desman des Pyrénées (Photos : François Gillet)

4.5. Reproduction

Les données concernant la reproduction de desman des Pyrénées sont peu nombreuses et proviennent principalement d'études réalisées au milieu du siècle dernier. En France, l'activité sexuelle du mâle s'étend de novembre à mai et celle de la femelle de janvier à juin. Le nombre d'embryons varie de 1 à 5 et les données concernant le nombre, la taille et le sex-ratio des portées sont encore à préciser (Peyre, 1956; Némoz & Bertrand, 2008). Aucune information ne permet de quantifier la dynamique des populations de cette espèce. L'absence de dimorphisme sexuel chez le desman des Pyrénées rend très difficile l'identification des sexes (González-Esteban et al., 2003b). Toutefois, une étude très récente a permis un sexage sur base génétique avec des échantillons de poils et de fèces (Vidal et al., 2009). Enfin, l'espérance de vie de l'espèce serait de 2-3 ans (González-Esteban et al., 2002).

4.6. Rythme d'activité, domaine vital et organisation sociale

Le desman des Pyrénées est un animal essentiellement nocturne bien que des périodes d'activité diurne soient observées (Peyre, 1956). Celles-ci peuvent se répartir en trois pics : l'aube, le crépuscule et la période entre 12h et 14h GMT (Stone, 1987b; Bertrand, 1994).

Les premières études de suivi de populations de desman des Pyrénées ont montré que ces populations étaient composées d'individus sédentaires et erratiques. Les individus sédentaires sont des adultes mâles et femelles vivant dans une même section de ruisseau tandis que les individus erratiques sont des juvéniles en dispersion ou des adultes solitaires occupant des territoires temporaires (Stone, 1987a). Des comportements de défense territoriale auraient été observés chez les individus sédentaires mais pas chez les individus erratiques (Stone, 1987a). De plus, les marquages odorants (sites de dépôt de fèces) (Figure 6) jouent peut-être un rôle dans ce comportement territorial. Des études plus récentes (Melero et al., 2012, 2014) ont pu mettre en évidence des interactions sociales entre individus mais aussi des comportements non territoriaux, contrastant les résultats de Stone (1987a). Les observations concernant la longueur du domaine vital sont assez disparates puisqu'elles vont d'un peu moins de 200m à plus d'1km (Némoz & Bertrand, 2008). Enfin, les densités de desman des Pyrénées observées seraient de l'ordre de 2,8 à 5,5 individus par km (Nores et al., 1998). Malgré ces quelques résultats, il est encore trop tôt pour étendre ces données d'utilisation de l'espace et de comportement social à un modèle généralisable à l'espèce.



Figure 6. Dépôts de fèces de desman des Pyrénées (Photos : Bruno Le Roux et François Gillet)

4.7. Régime alimentaire

Il ressort des premières études réalisées sur le régime alimentaire du desman des Pyrénées que celui-ci est essentiellement composé d'invertébrés benthiques : Trichoptères, Ephéméroptères, Plécoptères, Diptères et Gammarès (Trutat, 1891; Puisségur, 1935; Peyre, 1956; Richard & Vallette-Vialard, 1969; Saint-Girons, 1973; Santamarina & Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994; Castién & Gosálbez, 1995). Si les Trichoptères, les Ephéméroptères et les Plécoptères dominent qualitativement, ce sont deux familles de Trichoptères rhéophiles ne construisant pas de fourreaux (les *Rhyacophilidae* et les *Hydropsychidae*) qui semblent constituer la base du régime alimentaire d'un point de vue quantitatif (Bertrand, 1994; Castién & Gosálbez, 1995).

Dans son milieu naturel, le desman des Pyrénées apparaît donc comme une espèce au régime alimentaire spécialisé. Les modifications physico-chimiques de l'eau peuvent grandement influencer la présence et l'abondance de ses proies, le rendant extrêmement sensible à toute modification de son milieu (Santamarina, 1992; Amalinho & Boavida, 1993; Bertrand, 1994). Son régime alimentaire ne semble pas varier en fonction des saisons, contrairement à d'autres espèces ayant un régime alimentaire proche, comme le cincle plongeur (Bertrand, 1994, 1997). Il ne semble donc pas capable de modifier son régime alimentaire lorsque les conditions du milieu se modifient (Némoz & Bertrand, 2008). Toutefois, tous ces résultats doivent encore être confirmés et approfondis, notamment au niveau de la composition du régime et de sa potentielle variation spatiale et temporelle.

Le desman des Pyrénées détecterait ses proies de manière tactile et peut-être olfactive grâce à sa trompe qui possède de nombreux vibrisses et organes d'Eimer (Richard, 1973). Ceux-ci semblent jouer un rôle prépondérant dans la détection des objets, que ce soit en milieu aquatique ou aérien (Bauchot et al., 1973).

4.8. Causes de disparition

Comme il n'existe pas de données précises sur la répartition du desman des Pyrénées aux siècles précédents, il est difficile de connaître l'évolution des populations actuelles. De nombreux auteurs s'accordent cependant sur le fait qu'il y ait une régression généralisée dans les pays où l'espèce est présente (Némoz & Bertrand, 2008; Gisbert & Garcíá-Perea, 2014; Charbonnel, 2015).

La quantité et la répartition des précipitations tout au long de l'année influenceraient la répartition du desman des Pyrénées (Bertrand, 1992) bien qu'une étude récente ait démontré, qu'en France, la probabilité de détection est peu influencée par les précipitations (Charbonnel et al., 2015). Le réchauffement et les perturbations climatiques actuelles, joueront certainement un rôle, à plus ou moins long terme, sur la distribution de cette espèce et des habitats qui lui sont favorables mais ces modifications ne sont pas quantifiables à ce jour. Néanmoins, Charbonnel et al. (2015) montrent qu'à petite échelle la présence du desman des Pyrénées est moins influencée par les changements climatiques que par l'hydrologie.

Par contre, à court terme, certaines activités ou aménagements humains ont une influence néfaste sur la répartition des habitats favorables pour le desman des Pyrénées. Ces activités entraînent des modifications importantes du milieu naturel de cette espèce. Les centrales hydroélectriques, les aménagements hydrauliques et routiers, les canalisations, mais également les sports et loisirs aquatiques, sont autant d'activités influençant certains facteurs importants, comme le régime hydrologique ou la qualité de l'eau, qui touchent à la ressource alimentaire du desman des Pyrénées et donc à sa survie (Amalinho & Boavida 1993; Céréghino & Lavandier 1997; Queiroz et al. 1992). De même, la construction de certains aménagements, comme les barrages, peut entraîner une fragmentation du milieu naturel de cette espèce fragile (Queiroz et al., 1992).

Les causes de mortalité d'origine anthropique ne sont évidemment pas les seules. Bien que les prédateurs du desman des Pyrénées soient encore peu connus, quelques espèces consomment celui-ci, comme la loutre (*Lutra lutra*) (Callejo et al., 1979; Callejo, 1984; Adrián et al., 1988), le vison d'Amérique (*Mustela vison*) (Gisbert & Garcíá-Perea, 2003) ou le brochet (*Esox lucius*) (Peña et al., 1987). D'autres facteurs influencent également la mortalité de l'espèce : la compétition avec des espèces dont le régime alimentaire est proche, comme le cincle plongeur (Bertrand, 1994, 1997) ou la crossope aquatique (Santamarina, 1993), la destruction par les pisciculteurs ou les pêcheurs, ou des parasites et pathogènes (Némoz & Bertrand, 2008).

4.9. Statut de protection et de conservation

Le desman des Pyrénées bénéficie d'un statut de protection international. Il figure dans l'annexe II de la Convention de Berne, relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe, et fait donc partie des espèces strictement protégées. Il est

également inscrit aux annexes II et IV de la Directive européenne « Habitats-Faune-Flore », concernant la conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvages. Au niveau mondial, il est classé « vulnérable » dans la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (Fernandes et al., 2008), ce qui signifie que ses populations sont soumises à un risque élevé d'extinction en milieu naturel. Au niveau français, il est classé « Quasi menacé », mais la ré-évaluation de son statut est prévue pour la fin de l'année 2015. La mise en place d'actions de protection et de conservation n'est toutefois pas simple pour le desman des Pyrénées. Etant un animal essentiellement nocturne et particulièrement discret, son observation directe est, par conséquent, extrêmement rare et les informations disponibles sont très faibles.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES



1. Méthodologie d'échantillonnage

Les différentes études présentées dans ce travail sont basées en majeure partie sur des échantillons de fèces mais également sur quelques échantillons de tissus provenant de cadavres et de poils prélevés sur des animaux capturés.

1.1 Echantillonnage à l'échelle des Pyrénées

Le protocole de collecte des fèces a été établi dans le cadre du Plan National d'Actions pour le desman des Pyrénées (2009-2014), piloté par la DREAL Midi-Pyrénées et coordonné par le Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, dans le but d'améliorer les connaissances sur cette espèce et de répondre à plusieurs objectifs : analyser sa structure génétique, actualiser la carte de sa répartition ou encore caractériser son l'habitat et étudier sa sélection à l'échelle de son aire de répartition. L'échantillonnage prévoyait environ 2000 tronçons de rivières répartis sur l'ensemble de la chaîne des Pyrénées partagé en un lot historique et un lot aléatoire mais spatialement équilibré (Generalized Random Tessellation Stratified, GRTS) (Stevens & Olsen, 2004) (Figure 7).

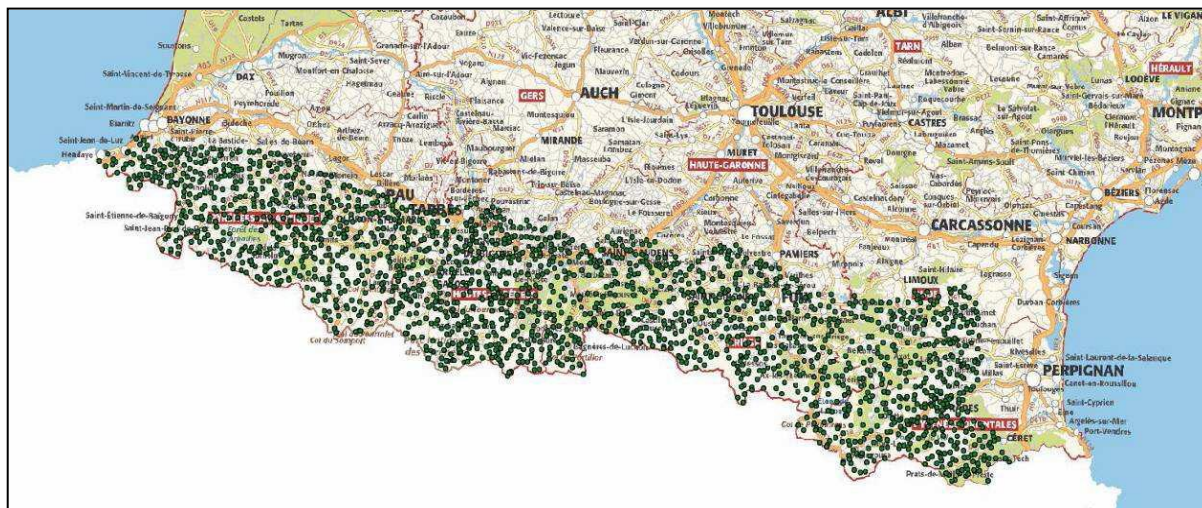


Figure 7. Carte des tronçons à prospecter pour le desman des Pyrénées sur le versant français de la chaîne pyrénéenne.

La majorité des prospections a été effectuée entre juillet 2011 et juillet 2013 dans des conditions susceptibles d'optimiser les chances de collecte : (1) la prospection des tronçons a été programmée dans la mesure du possible aux périodes les plus favorables c'est-à-dire aux périodes d'étiage et de niveaux d'eau constants, (2) après au moins une semaine sans

pluviométrie ou avec un épisode pluvieux inférieur à 5 mm et (3) d'aval en amont. Chaque tronçon échantillonné faisait une longueur totale de 500 mètres divisé en sous-sections de 100 mètres et n'était visité qu'une seule fois.

Cet échantillonnage exhaustif a finalement permis de collecter 1270 fèces présumées de desman des Pyrénées. En plus de ces fèces, 38 spécimens de desman des Pyrénées ont été trouvés morts de manière fortuite sur le terrain et ont été ajoutés à cet échantillonnage. Ces cadavres ont été collectés dans les six départements compris dans le territoire géographique de cette espèce avec les autorisations suivantes émises par le Gouvernement Français : n° 2011221-0004 pour le département de l'Aude, n° 24/2011 pour le département des Pyrénées-Atlantiques, n° 2011215-0002 pour le département des Pyrénées-Orientales et n° 2011-INT/01 pour les départements de l'Ariège, de la Haute-Garonne et des Hautes-Pyrénées. Enfin, quelques échantillons de tissus de crossope aquatique et de cincle plongeur ont également été utilisés dans ce travail et provenaient d'une collection appartenant à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

1.2. Echantillonnage à l'échelle du tronçon de l'Aude soumis à régulation hydroélectrique

Le tronçon de ~20km d'étude était divisé en 10 stations (DES1 à DES10) de 300 mètres (Figure 8). Chaque station a été prospectée deux fois lors des étés 2011, 2012 et 2013 ainsi qu'une fois après la session de capture annuelle (septembre 2011, 2012, 2013). Chaque session de capture était organisée sur trois stations (DES3, DES7 et DES9), qui étaient rallongées de 600 mètres pour l'occasion, et durait six nuits (deux nuits par station). Chaque station de capture faisait donc 900 mètres de longueur et était découpée en sous-sections de 300 mètres.

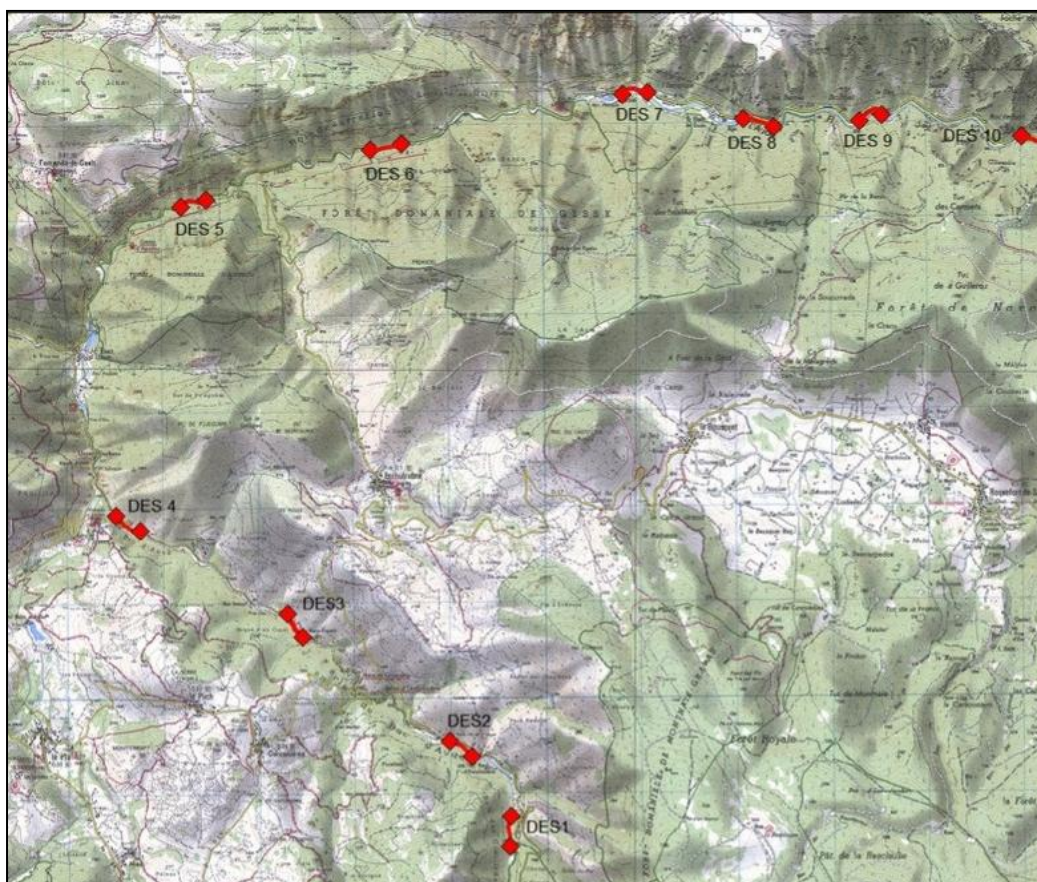


Figure 8. Carte du tronçon de l'Aude de ~20km étudié, avec les 10 stations (DES1 à DES10) en rouge.

Les pièges, qui étaient constitués par deux nasses à poisson modifiées et accrochées l'une à l'autre, étaient disposés environ tous les 50 mètres, ce qui faisait 6 pièges par sous-section de 300 mètres, soit 18 pièges sur l'ensemble du tronçon de 900 mètres. Les pièges étaient posés avec l'entrée du piège face au courant en fin de journée (18h) et enlevés en début de matinée suivante (4h). Le relevé des pièges s'effectuait toutes les heures. En cas de capture de desman des Pyrénées, l'animal était pesé, sexé, éventuellement marqué par du vernis sur les griffes d'une patte arrière ou par la pose d'un transpondeur et un prélèvement de poils était effectué. L'animal était ensuite relâché sur le lieu de capture.



Figure 9. Pièges à desman des Pyrénées (A et B), capture (C), manipulation (D) et relâcher (E) d'un desman des Pyrénées.

2. Marqueurs et analyses moléculaires

2.1. Marqueurs moléculaires

Durant le dernier quart de siècle, les avancées scientifiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont été de plus en plus nombreuses et ont permis le développement d'études de plus en plus complexes et abouties. Celles-ci se basent essentiellement sur des marqueurs moléculaires dont la gamme s'est largement étendue au cours de ces dernières années. Ces marqueurs permettent notamment d'estimer de nombreux paramètres de la génétique des populations, importants pour la conservation des espèces, comme la variabilité génétique intra-populationnelle, les flux géniques entre populations ou la différence génétique qui existe entre unités taxonomiques (Avice, 1995). Ils permettent également d'accéder à de nombreuses autres informations, comme la distribution ou la capacité de dispersion des espèces, par exemple.

L'ADN mitochondrial (ou ADNmt) a été utilisé pendant les trois dernières décennies comme outil d'estimation du passé démographique et évolutif d'espèces et de populations (Ballard & Whitlock, 2004). Largement utilisé dans les études phylogéniques ou phylogéographiques, l'ADN mitochondrial est caractérisé, entre autres, par une présence en plusieurs copies au sein d'une même cellule ce qui facilite son extraction et son utilisation, un héritage uniquement maternel, un taux de recombinaison extrêmement faible et un taux de mutation 5 à 10 fois supérieur à celui des gènes nucléaires (Brown et al., 1979; Moritz et al., 1987; Avice, 2000; Zink & Barrowclough, 2008). Néanmoins, ce marqueur présente également certaines limites (Zhang & Hewitt, 2003; Ballard & Whitlock, 2004; Galtier et al., 2006; Nabholz et al., 2008; Dubey et al., 2009; Edwards & Bensch, 2009). Le fait que la transmission de l'ADNmt soit maternelle fait que ce marqueur ne rapporte qu'une partie de la structure génétique et de l'histoire évolutive des populations ; la présence de pseudogènes dans le génome nucléaire ou des cas d'homoplasie sont également limitants.

Pour étudier la structure génétique des populations d'une espèce, il convient de pouvoir utiliser d'autres marqueurs. Les gènes nucléaires peuvent s'avérer être une alternative et/ou un complément à l'ADNmt mais ils présentent également des inconvénients importants dus notamment à leur taux de mutation assez faible et leur temps de coalescence quatre fois plus grand que l'ADNmt (Brown et al., 1979; Zhang & Hewitt, 2003).

Parmi les marqueurs nucléaires, les microsatellites présentent de nombreux avantages pour réaliser des études en génétique de la conservation. Il s'agit de courtes séquences d'ADN nucléaire, formées de répétitions en tandem d'un motif de 1 à 6 nucléotides, dispersées dans l'ensemble du génome (Selkoe & Toonen, 2006). Ces marqueurs sont dotés d'une variabilité plus élevée, due à leur taux de mutation extrêmement rapide (entre 10^{-2} et 10^{-6} par locus par génération, et 5×10^{-4} en moyenne), par modification du nombre de répétitions en tandem, générant un haut niveau de diversité génétique (C Schlötterer, 2000). Ce taux élevé de mutation entraîne donc généralement une diversité allélique importante, ce pourquoi les microsatellites s'avèrent particulièrement utiles pour estimer la diversité génétique entre populations d'une espèce ou d'évaluer l'existence de flux géniques entre celles-ci, notamment chez des espèces comptant des populations de petite taille, ou ayant subi une réduction importante, comme c'est généralement le cas chez les espèces menacées. Ces mutations entraînent une différence du nombre de répétitions au niveau d'un locus et donc une différence de longueur des allèles. Les différences de longueur des allèles vont permettre de potentiellement pouvoir identifier des individus au sein d'une population et d'ainsi réaliser des études de suivi, importantes pour la conservation des espèces.

Un autre avantage des microsatellites est qu'ils sont, pour la plupart, spécifiques à l'espèce étudiée, et aux espèces proches, ce qui réduit les problèmes de contamination par des espèces non ciblées, contrairement aux marqueurs où l'emploi d'amorces universelles est plus courant, comme l'ADNmt (Selkoe & Toonen, 2006). Toutefois, cette spécificité des marqueurs microsatellites peut également être un désavantage puisque de nouvelles amorces devront presque systématiquement être créées lorsqu'une nouvelle espèce est étudiée. Ces marqueurs sont souvent utilisés pour définir des structures de populations mais ils le sont beaucoup moins pour établir des phylogénies étant donné que les différences d'allèles observées peuvent être dues à de l'homoplasie (Estoup et al., 2002; Zhang & Hewitt, 2003).

Ces marqueurs présentent donc des avantages et des inconvénients. Ils ont ainsi été utilisés dans ce travail, en combinaison avec d'autres marqueurs, afin de pouvoir atteindre les différents objectifs fixés. En l'occurrence, deux marqueurs mitochondriaux, un fragment du gène du cytochrome b (cytb) et un fragment du gène de la sous-unité I du cytochrome oxydase (COI), ont été utilisés dans cette étude ainsi que 24 marqueurs microsatellites développés spécifiquement pour le desman des Pyrénées (**article 2**).

2.2. Séquençage de nouvelle génération

L'identification d'une espèce ou l'étude de son régime alimentaire, à partir d'un très grand nombre d'échantillons de fèces, et en utilisant la méthode classique de séquençage Sanger, est très difficile. En effet, elle nécessite au préalable une étape de clonage complexe, longue et coûteuse, permettant de séparer les différents fragments d'ADN du marqueur génétique choisi pour l'étude, obtenus lors de l'étape d'amplification par PCR. Sans cette étape de clonage, le séquençage direct des produits de PCR, issus de l'amplification de l'ADN extrait des fèces, résulte en la superposition de différentes séquences provenant des différentes espèces de proies, et de l'espèce hôte de la crotte, ce qui rend la lecture des électrophérogrammes impossible.

Pour contourner ce problème, les technologies de séquençage de nouvelle génération à haut débit, récemment développées et en plein essor, comme la méthode Ion Torrent (Life Technologies), constituent une solution. En effet, cette méthode comprend une phase de PCR en émulsion (emPCR) (Margulies et al., 2005), avant le séquençage Ion Torrent proprement dit, permettant d'isoler chaque brin d'ADN comme lors d'un clonage. Cette étape va permettre le séquençage des différents fragments d'ADN présents dans un échantillon de fèces. Cette méthode de séquençage produit notamment un très grand nombre de séquences (plusieurs millions) à partir d'un très grand nombre d'échantillons (~500). De plus, chaque séquence produite peut être assignée de manière fiable à l'échantillon original grâce à des méthodes de « tagging » et de « multiplexing » où les amorces utilisées vont être associées à de courtes séquences de 7 paires de bases (i.e. tags), et d'adaptateurs nécessaires à l'emPCR. Cette méthode va permettre à tous les échantillons d'être analysés dans un seul run de séquençage et d'être reconnus après celle-ci en utilisant différentes combinaisons de tags « forward » et « reverse » (Galan et al., 2012).

2.3. Structure des populations

2.3.1 Analyses de clustering

Pour pouvoir étudier la structure génétique d'une espèce, la première étape consiste à identifier le nombre de populations génétiquement distinctes vivant dans la zone d'étude. Pour cela, les caractéristiques génétiques des individus (e.g. leur génotype et fréquences alléliques) vont être utilisées afin d'estimer ce nombre de « populations génétiques » et d'assigner chaque individu analysé à une de ces populations. Ces méthodes dites de « clustering » (Pritchard et al., 2000) émettent l'hypothèse qu'il existe K populations dans la zone d'étude

(K étant inconnu). Chaque individu va ensuite être assigné aux différentes populations avec une certaine probabilité, en se basant sur leur génotype multilocus (e.g. microsatellites) tout en estimant, au sein de chaque population, les fréquences alléliques. De cette manière, chaque individu reçoit une probabilité d'appartenir aux différentes populations.

Grâce à cette méthode, réalisable avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) par exemple, les caractéristiques génétiques des individus étudiés permettent de définir des populations et leur distribution dans l'espace. Ceci va donc potentiellement permettre de comprendre comment les facteurs environnementaux, notamment, structurent la diversité génétique des populations et empêchent ou favorisent la dispersion des individus. Des estimations de flux de gènes entre populations vont alors pouvoir être établies. Ces données sont extrêmement importantes en génétique de la conservation.

2.3.2. Histoire démographique

S'il est important de définir la structure génétique d'une espèce, il l'est également d'en établir son histoire démographique. Cette structure génétique peut en effet être le résultat de changements de tailles efficaces des populations, et de leur distribution, qui ont pu mener à des événements de divergence ou de regroupement. Lors des dernières décennies, l'accroissement de la disponibilité des marqueurs moléculaires et des capacités de calcul informatique, ont permis le développement de méthodes d'inférence, et de programmes informatiques associés, capables de mettre en évidence les processus démographiques ayant modelé les populations (Beaumont & Rannala, 2004; Excoffier & Heckel, 2006; Cornuet et al., 2010).

Parmi ces méthodes, le calcul bayésien approché ou « approximate Bayesian computation » (ABC) est un algorithme permettant de calculer une inférence historique basée sur des modèles (Beaumont et al., 2002). Cette méthode permet de contourner les calculs de vraisemblance, pouvant être compliqués dans le cas de scénarios évolutifs complexes, en remplaçant ce critère par un critère de similarité entre jeux de données simulés et observés, où la similarité est mesurée comme la distance entre statistiques sommaires calculées sur les deux jeux de données. Le programme DIYABC permet notamment de réaliser des inférences historiques en utilisant une méthode ABC (Cornuet et al., 2008). Ce programme permet la prise en compte d'événements évolutifs complexes comprenant toute sorte de combinaisons d'événements de divergences ou de convergences de populations, ou de changements

d'effectifs. Il permet également de comparer plusieurs scénarios évolutifs, de quantifier leur pertinence et d'estimer des paramètres pour chacun de ceux-ci. Le taux de confiance accordé à ces estimations peut également être évalué.

Ces deux approches sont donc particulièrement intéressantes pour à la fois définir la structure génétique des populations d'une espèce mais également l'histoire évolutive de celles-ci. Ces méthodes ont notamment été utilisées dans l'**article 4** de cette thèse afin d'étudier la structure génétique du desman des Pyrénées en France.

CHAPITRE 3

RESULTATS



Article 1

PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA

François Gillet, Maria Teresa Cabria, Mélanie Némoz, Frédéric Blanc, Christine Fournier-Chambrillon, Eric Sourp, Corinne Vial-Novella, Stéphane Aulagnier, Johan R. Michaux

Résumé

Du fait de la perte et/ou de la fragmentation continue de son habitat depuis plusieurs décennies (Nores et al. 1992; Némoz & Bertrand 2008; Gisbert & Garcíá-Perea 2014), le desman des Pyrénées est actuellement considéré comme vulnérable dans la liste rouge de l'UICN (Fernandes et al., 2008). En raison de son comportement éluif et de son activité essentiellement nocturne (Stone 1987, Bertrand 1994), la détection de la présence du desman des Pyrénées peut s'avérer problématique bien qu'elle puisse être réalisée par deux méthodes: la récolte de fèces et la capture. Alors que la capture d'animaux vivants est difficile à mettre en œuvre et potentiellement à risque pour les animaux, l'échantillonnage des fèces est non-invasive, mais peut conduire à d'autres problèmes. Plus précisément, certaines erreurs peuvent facilement se produire lors de l'identification de l'auteur des échantillons prélevés. En effet, le desman des Pyrénées partage son habitat et son régime alimentaire avec d'autres espèces de vertébrés semi-aquatiques comme le cincle plongeur *Cinclus cinclus* ou la crossope aquatique *Neomys fodiens* (Peyre 1950, Bertrand 1994). Une certaine confusion peut facilement se produire en particulier lorsque les fèces ne sont pas fraîches ou ont été en contact avec de l'eau. Par conséquent, une identification fiable de l'espèce productrice des échantillons récoltés est extrêmement importante pour détecter la présence du desman des Pyrénées.

Le but de ce travail était donc de mettre au point des méthodes d'identification génétique fiables et non invasives permettant de distinguer facilement les fèces du desman des Pyrénées par rapport aux deux autres espèces écologiquement proches

A partir d'échantillons de tissus de desman des Pyrénées (15), de cincle plongeur (4) et de crossope aquatique (7) mais également de 22 fèces présumées de desman des Pyrénées, deux méthodes d'identification ont été développées dans cette étude: 1) la première, pour laquelle des amorces spécifiques ont été développées, se base sur l'amplification par PCR et le séquençage d'un fragment du gène codant pour le cytochrome b de l'ADN mitochondrial ; 2)

la seconde est basée sur une approche de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette dernière méthode permet aux variations présentes dans les séquences nucléotidiques des différentes espèces d'être facilement reconnues par des enzymes de restriction, en l'occurrence *AluI* et *Sau3AI*, qui peuvent fournir des fragments d'ADN de différentes longueurs après un processus de digestion.

Lors de l'amplification par PCR, seulement deux échantillons de fèces n'ont pas donné de résultat. Ceci était certainement dû à la dégradation trop importante de l'ADN contenu dans ces échantillons ou leur appartenance à une autre espèce que les trois ciblées par cette étude. Le séquençage du fragment du cytochrome b a révélé que quatre des vingt échantillons de fèces amplifiés ne provenaient pas du desman des Pyrénées, trois appartenaient à la crossope aquatique et un au cincle plongeur.

L'analyse RFLP des fragments du cytochrome b a permis d'identifier clairement les trois espèces étudiées grâce à la découverte de différentes longueurs de fragments de restriction. Par ailleurs, les échantillons de tissus et de fèces du desman des Pyrénées ont donné les mêmes longueurs de fragments.

La méthode PCR-RFLP semble être une méthode performante pour distinguer les échantillons de fèces de desman des Pyrénées d'autres espèces écologiquement proches. Moins onéreuse que le séquençage, elle permet également une identification sans ambiguïté des échantillons.

Une seule combinaison de motifs de restriction a été trouvée pour le desman des Pyrénées ainsi qu'un seul haplotype après séquençage. Ce résultat suggère que la diversité génétique du desman des Pyrénées dans les Pyrénées est faible confirmant les résultats d'Igea et al. (2013). Cette hypothèse doit cependant être confirmée par des marqueurs génétiques complémentaires (cf. **article 4**).

En conclusion, ce travail a pu fournir deux méthodes fiables pour identifier précisément le desman des Pyrénées à partir d'échantillons de fèces. Cela aidera à améliorer la connaissance globale de cette espèce rare et vulnérable et facilitera l'étude de sa distribution, l'utilisation et la conservation de ses habitats.

Article 1

PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA

François Gillet^{1, 2, 3}, Maria Teresa Cabria¹, Mélanie Némoz³, Frédéric Blanc³, Christine Fournier-Chambrillon⁴, Eric Sourp⁵, Corinne Vial-Novella⁶, Stéphane Aulagnier², Johan R. Michaux¹

¹ Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

² Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

³ Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

⁴ Groupe de Recherche et d'Etudes pour la Gestion de l'Environnement (GREGE), Route de Préchac, 33730 Villandraut, France

⁵ Parc national des Pyrénées, 2 rue du IV Septembre, 65 007 Tarbes, France

⁶ Département Biologie Vétérinaire, Laboratoires des Pyrénées et des Landes, rue des Ecoles - 64150 Lagor, France

Publié dans *Mammalia*

François Gillet*, Maria Teresa Cabria, Mélanie Némoz, Frédéric Blanc, Christine Fournier-Chambrillon, Eric Sourp, Corinne Vial-Novella, Stéphane Aulagnier and Johan R. Michaux

PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA

Abstract: The Pyrenean desman is a vulnerable mammal species endemic to Pyrenees and the northern Iberian Peninsula. The presence of this elusive species can be most easily detected by sampling its faeces. However, these faecal samples can be confused with those of other vertebrate species living in the same habitats. This study provides two easy and reliable methods for the identification of the Pyrenean desman faeces based on genetic analyses. The first one consists of a nested PCR and sequencing of a mitochondrial cytochrome *b* fragment, and the second one is an enzymatic digestion with endonucleases *AhaI* and *Sau3AI*. The restriction patterns given by the two enzymes were found suitable for the successful discrimination of the Pyrenean desman from the other species based on species-specific sequence variations.

*Corresponding author: François Gillet, Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Boulevard du Rectorat 27, 4000 Liège, Belgium; Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France; and Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France, e-mail: f.gillet@doct.ulg.ac.be

Maria Teresa Cabria and Johan R. Michaux: Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Boulevard du Rectorat 27, 4000 Liège, Belgium

Mélanie Némoz and Frédéric Blanc: Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

Christine Fournier-Chambrillon: Groupe de Recherche et d'Etudes pour la Gestion de l'Environnement (GREGE), Route de Préchac, 33730 Villandraut, France

Eric Sourp: Parc national des Pyrénées, 2 rue du IV Septembre, 65 007 Tarbes, France

Corinne Vial-Novella: Département Biologie Vétérinaire, Laboratoires des Pyrénées et des Landes, rue des Ecoles-64150 Lagor, France

Stéphane Aulagnier: Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

Only one restriction pattern was found in the Pyrenean desmans collected in the French Pyrenees, suggesting a low genetic diversity in this area.

Keywords: desman; faeces; *Galemys pyrenaicus*; identification; RFLP

DOI 10.1515/mammalia-2014-0093

Received June 20, 2014; accepted September 7, 2014

Introduction

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus* E.Geoffroy, 1811) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and the northern half of the Iberian Peninsula where it lives in mountain streams of cold and well-oxygenated flowing waters (Nores et al. 2007). This species is currently considered as vulnerable in the IUCN Red List (Fernandes et al. 2008) and has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades, inevitably impacting its distribution. The ecology and biology of this species are poorly known, notably because of its elusive behaviour and its primarily nocturnal activity (Stone 1987, Bertrand 1994). Its distribution area is not even definitively established. However, this information is essential in order to develop the best management strategies for the species (Némoz and Bertrand 2009).

The presence of the Pyrenean desman can be detected by two methods: faecal sampling and live-trapping. These were tested and compared in previous studies (Nores et al. 1998, González-Esteban et al. 2003). Whereas the live-trapping method is difficult to implement and potentially risky for the species, faecal sampling is non-invasive but its use can raise different issues. Specifically, some mistakes can easily be committed when trying to identify the species of the collected samples. Indeed, the Pyrenean desman shares its habitat and diet with other semi-aquatic vertebrate species, namely, the white-throated dipper *Cinclus*

cinclus (Linnaeus, 1758) and the water shrew *Neomys fodiens* (Pennant, 1771) (Peyre 1950, Bertrand 1994). Some confusion can easily occur especially when faeces are not fresh or have been in contact with water. Reliable identification is therefore of great importance to detect the presence of this species, so this genetic analysis aims to provide a cheap, reliable and non-invasive method to easily distinguish the faeces of the Pyrenean desman from those of other ecologically related species.

Materials and methods

Sampling and DNA extraction

Tissue samples of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) (15) and the white-throated dipper (*Cinclus cinclus*) (4) were collected from several areas of the French Pyrenean Mountains, whereas those of the water shrew (*Neomys fodiens*) (7) were sampled in the French Alps. In addition, 22 supposedly desman faecal samples were collected from different French Pyrenean localities. Genomic DNA from tissue and faecal samples preserved in ethanol were extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and the Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), respectively, following the manufacturer's instructions. DNA extractions from the faecal samples were conducted in a separate room with a UV-sterilised platform where no Pyrenean desman tissue samples were previously treated.

The tissue samples of *Galemys pyrenaicus* were collected in the field with the following authorizations licensed by the French Government: n° 2011221-0004 for Aude department, n° 24/2011 for Pyrénées-Atlantiques department, n° 2011215-0002 for Pyrénées-Orientales department and n° 2011-INT/01 for Ariège, Haute-Garonne and Hautes-Pyrénées departments. The *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus* tissue samples were issued from a collection of the Institut National de la Recherche Agronomique.

Species identification

Two identification methods were developed in this study: i) the first one based on the amplification by nested PCR, and the sequencing of a fragment of the mitochondrial DNA cytochrome *b*; and ii) the second one based on a restriction fragment length polymorphism (RFLP) approach. The variation presented in the DNA nucleotide

sequence of each species can be easily recognized by restriction enzymes that can provide different restriction patterns of different fragment length after a digestion process. This method can quickly provide effective results as it has been previously demonstrated in similar studies on mustelids species (Hansen and Jacobsen 1999, Gomez-Moliner et al. 2004).

Sequencing of a partial fragment of the mtDNA cytochrome *b*

Specific primers were designed for this study (Table 1) on the basis of the published cytochrome *b* sequences of *Galemys pyrenaicus*, *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus* (Cabria et al. 2006, Castiglia et al. 2007, Hourlay et al. 2008, Igea et al. 2013) (Table 2). These primers amplify a fragment of approximately 400 bp that allow the detection of the variability in the nucleotide sequences of the three species. A nested PCR was performed for the faecal samples, whereas a single PCR was performed for the tissue samples, which were used as a control of the methodology described in this paper. Nested PCR is suitable for the amplification of DNA extracted from faeces because of the fact that this DNA is often degraded and in low quality.

The single PCR included 0.1 µM of each primer (forward primer GPYRF1 and reverse primer GPYRR1), 0.34 µM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1X GoTaq® buffer reaction (Promega Inc., Madison, USA), 1U GoTaq® DNA polymerase (Promega Inc., Madison, USA) and approximately 20–30 ng of DNA, in a final volume of 17 µL. Amplifications were performed in a thermal cycler VWR Uncycler using one activation step at 94°C for 5 min followed by 40 cycles (denaturation at 94°C for 50 s, annealing at 52°C for 45 s, extension at 72°C for 45 s) and final extension step at 72°C for 10 min. For amplification of the faecal samples, a nested PCR was performed. The nested PCR included the PCR mixture described above, with forward primer GPYRF2 instead of GPYRF1 and 0.3 µL of the previous PCR product that was used as a DNA template, in a final volume of 17 µL. PCR products were sequenced on an

Table 1 Characteristics of the specifically created primers used for the amplification of the cytochrome *b* fragment in *Galemys pyrenaicus*, *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus*.

Primers	Sequence	Length (bp)
GPYRF1	5'-TTGTAGAATGGAKCTGAGG-3'	19
GPYRF2	5'-TTCCTTCACGAAACAGGATC-3'	20
GPYRR1	5'-GTCGGCTGCTAAAAGTCAGAATA-3'	23

Table 2 GenBank accession numbers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) of the sequences used for the design of the three specific primers (GPYRF1, GPYRF2 and GPYRR1) developed for this study.

Species	GenBank accession numbers
<i>Galemys pyrenaicus</i>	AY833419, JX290701, JX290702, JX290703, JX290704, JX290705, JX290706, JX290707, JX290708, JX290709, JX290710
<i>Neomys fodiens</i>	DQ991056, DQ991057, DQ991058, DQ991059, DQ991060, DQ991061, DQ991062, DQ991063
<i>Cinclus cinclus</i>	AM502101, AM502102, AM502103, AM502104, AM502100, AM502099, AM502098, AM502097, AM502095, AM502094, AM502093, AM502092, AM502091

Applied Biosystems® 3730 DNA analyzer and were verified using CHROMASPRO v 1.5 (<http://technelysium.com.au>). Sequences were then submitted to the BLAST® functionality available on the NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

RFLP analysis

The CLUSTALX 2.0 program (Thompson et al. 1997, Larkin et al. 2007) was used to check and align the sequences of the three species. The RESTRICTIONMAPPER 3.0 software (<http://www.restrictionmapper.org/>) was used to determine the more suitable restriction enzymes. The restriction enzymes *AhaI* and *Sau3AI* were identified as those generating the best RFLP patterns for species identification. These enzymes were consequently used to digest PCR products from the tissue and faecal samples. Enzymatic digestions were carried out in a 10 µl volume consisting of 1 µM of the corresponding 10X buffer for *AhaI* or *Sau3AI*, 0.1 µM of BSA, 0.25 µM of *AhaI* or *Sau3AI*, and 15–20 ng of the PCR product. Digestions were performed for 4 h at 37°C in a thermal cycler VWR Unocycler, followed by 3.5% agarose gel electrophoresis of 10 µl of the digestion products for 1 h at 70 mV.

Results and discussion

Sequencing of a fragment of the mtDNA cytochrome *b* gene

After PCR amplification with primers GPYRF2 and GPYRR1, numerous substitutions were detected in the sequences between *Galemys pyrenaicus* and *Neomys fodiens* (n=77)

and *Cinclus cinclus* (n=99) (Figure 1). Amplicons were also obtained in the faecal samples after the nested PCR, except only for two. This result could mean that these two samples were not from the Pyrenean desman, the water shrew or the white-throated dipper, or that PCR amplification was not successful for technical reasons, for example, because of an over-degraded DNA. However, this high success rate of 90% positive amplification indicates that this method is reliable for amplifying mtDNA from faecal samples. The sequencing of the PCR products obtained from supposedly desman faecal samples revealed that 4 of the 20 amplified samples were not belonging to the Pyrenean desman, as 3 were belonging to *Neomys fodiens* and 1 to *Cinclus cinclus*. Therefore, sequencing those samples allowed avoiding a misidentification of almost 20% of the collected faecal samples.

RFLP analysis

Besides DNA sequencing, the obtained amplicons can also be used for RFLP analysis. RFLP patterns obtained with RESTRICTIONMAPPER 3.0 with the sequences found in databases are shown in Table 3.

The digestion with the two restriction enzymes can lead to the identification of the three species based on their different restriction patterns (Table 4). These combinations can also be visualized in the amplified sequences of *Galemys pyrenaicus*, *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus*, as shown in Figure 1. The restriction patterns obtained with faecal samples were the same as those obtained with tissue samples.

These RFLP patterns totally agree with the results obtained using the sequencing method. The RFLP identification method is therefore validated for identifying *Galemys pyrenaicus* from *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus*.

Compared with the sequencing method, the PCR-RFLP appears to be a powerful method for distinguishing faecal samples of the Pyrenean desman from other ecologically related species. Aside from being cheaper than the sequencing method, the PCR-RFLP method also allows for an unambiguous visual interpretation of the results without the need of computer analyses.

Moreover, when combined with the sequencing of the amplified fragments, this method can result in better estimates of the genetic diversity or structure of the studied species. A recent genetic study based on mitochondrial and intronic sequences (Igea et al. 2013) showed that the genetic variability of the Pyrenean desman is very low in the Pyrenees. Our results support this previous finding.

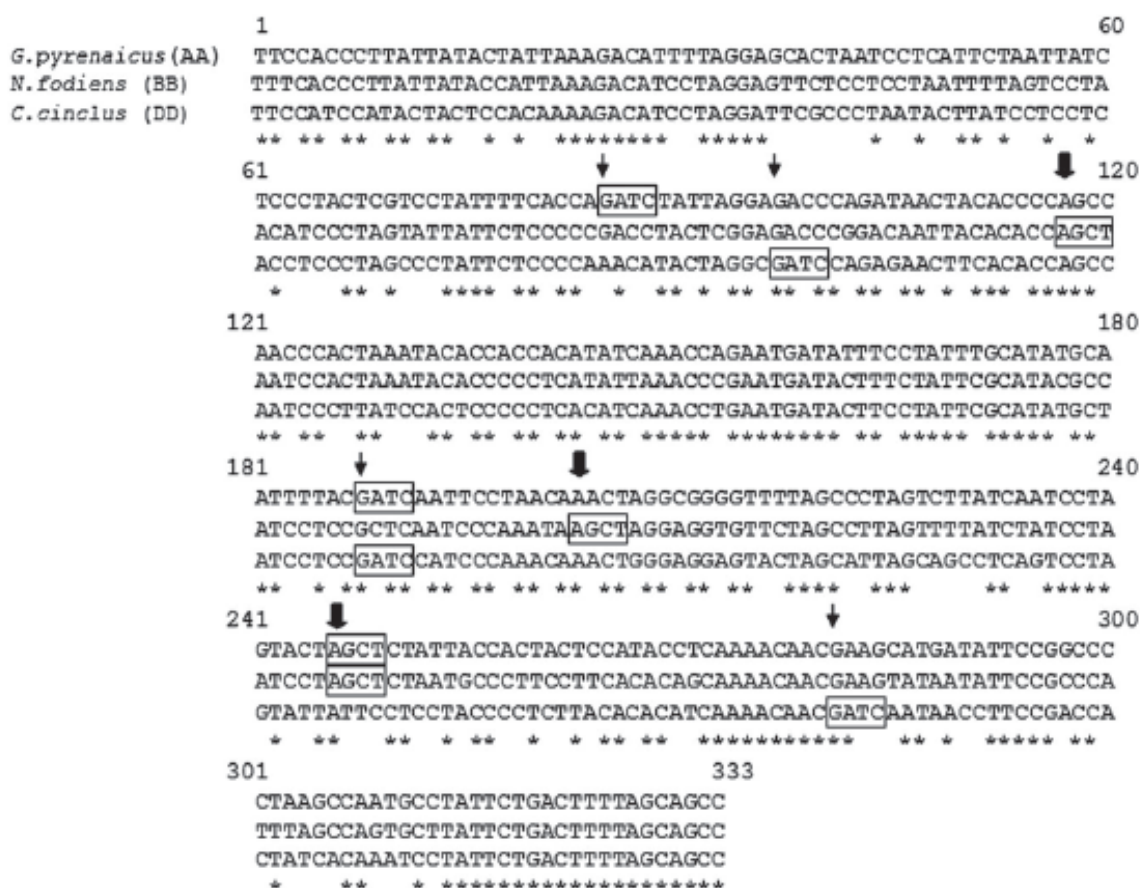


Figure 1 Aligned sequences of the cytochrome *b* fragment from *Galemys pyrenaeus*, *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus*. Small arrows show the restriction sites for *AluI* with recognition sequence being GATC; large arrows show the restriction sites for *Sau3AI* with recognition sequence being AGCT. Combinations of restriction patterns obtained for each species are shown between brackets. Asterisks mark the invariability in nucleotides for the three sequences.

Table 3 Length in base pairs of the different DNA fragments obtained in *Galemys pyrenaeus*, *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus* after digestion with restriction enzymes *AluI* (restriction patterns: A, B, C, D) and *Sau3AI* (restriction patterns: A, B, C, D, E).

Species	Restriction patterns of <i>AluI</i> / Fragments size (bp)	Restriction patterns of <i>Sau3AI</i> / Fragments size (bp)
<i>Galemys pyrenaeus</i>	A/310, 89	A/149, 131, 103
<i>Neomys fodiens</i>	B/181, 89, 86, 43 C/181, 129, 89	B/383 C/252, 131
<i>Cinclus cinclus</i>	D/399	D/143, 91, 93, 56 E/124, 111, 93, 56

Table 4 Combinations of restriction patterns obtained after digestion of the amplified cytochrome *b* fragments with *AluI* and *Sau3AI* for *Galemys pyrenaeus*, *Neomys fodiens* and *Cinclus cinclus*.

Species	Combination of restriction patterns
<i>Galemys pyrenaeus</i>	AA
<i>Neomys fodiens</i>	BB
<i>Cinclus cinclus</i>	DD

size of our sample, although widely distributed along the Pyrenees, require that additional analyses should be performed on more polymorphic markers and a larger faecal sample.

In conclusion, this work provides two reliable methods for the accurate identification of the Pyrenean desman based on faecal samples. These methods will facilitate the study of the species' distribution, habitat use and

Indeed, only one combination of restriction patterns was found for the Pyrenean desman, and only one haplotype was evidenced after sequencing the amplicons. However, the short length of the amplified fragment and the small

conservation, and more importantly, help in expanding the global knowledge of this rare and vulnerable species.

Acknowledgments: We thank the following people who collected tissue samples: EDF agents, Pyrenees National Park agents, M. Bayon, A. Bertrand, J-P. Besson, J-P. Quéré, A. Charbonnel, F. Elzear, L. Fabre, P. Fantin, B. Le Roux, V. Lacaze, M. Lagardère, F. Lassèrre, B. Le Corre, M. Mas, P. Maunas, G. Nogué, F. Prud'Homme, T. Quintilla, B. Salmeron, T. Tico, S. Torreilles and S. Verret. We also thank the following organisations who collected faecal samples: Association des Naturalistes de l'Ariège, Conservatoire d'Espaces Naturels d'Aquitaine, Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, Fédération Audeclaire, Fédération des Réserves Naturelles Catalanes, Groupe de Recherche et d'Etude pour la Gestion de l'Environnement, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Office National des Forêts, Parc National des Pyrénées. This study is part of the "Plan National d'Actions pour le Desman des Pyrénées", which is financially supported by the following institutions: Agence de l'eau Adour-Garonne, DREAL Aquitaine, Midi-Pyrénées, and Languedoc-Roussillon, Conseil Régional Aquitaine, Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l'Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEMA, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), ERDF (axis III and IV). F. Gillet is supported by a French research fellowship provided by the ANRT ("bourse CIFRE").

References

- Bertrand, A. 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire du Desman des Pyrénées *G. pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse, France. pp. 217.
- Cabria, M.T., J. Rubines, B. Gómez-Moliner and R. Zardoya. 2006. On the phylogenetic position of a rare Iberian endemic mammal, the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Gene* 375: 1–13.
- Castiglia, R., F. Annesi, G. Aloise and G. Amori. 2007. Mitochondrial DNA reveals different phylogeographic structures in the water shrews *Neomys anomalus* and *N. fodiens* (Insectivora: Soricidae) in Europe. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 45: 255–262.
- Fernandes, G., J. Herrero, S. Aulagnier and G. Amori. 2008. *Galemys pyrenaicus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Accessed on 28 December 2013.
- Gomez-Moliner, B.J., M.T. Cabria, J. Rubines, I. Garin, M.J. Madeira, A. Elejalde, J. Aihartza, P. Fournier and S. Palazón. 2004. PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*) by analysis of excremental DNA. *J. Zool.-London* 262: 311–316.
- González-Esteban, J., I. Villate and E. Castián. 2003. A comparison of methodologies used in the detection of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). *Mamm. Biol.* 68: 387–390.
- Hansen, M.M. and L. Jacobsen. 1999. Identification of mustelid species: otter (*Lutra lutra*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*), by analysis of DNA from faecal samples. *J. Zool.-London* 247: 177–181.
- Hourlay, F., R. Libois, F. D'Amico, M. Sarà, J. O'Halloran and J.R. Michaux. 2008. Evidence of a highly complex phylogeographic structure on a specialist river bird species, the dipper (*Cinclus cinclus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 435–444.
- Igea, J., P. Aymerich, A. Fernández-González, J. González-Esteban, A. Gómez, R. Alonso, J. Gosálbez and J. Castresana. 2013. Phylogeography and postglacial expansion of the endangered semi-aquatic mammal *Galemys pyrenaicus*. *BMC Evol. Biol.* 13: 115.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Némoz, M. and A. Bertrand. 2009. Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*), 2010–2015. So ciété Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères/ Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, Toulouse. pp. 159.
- Nores, C., A.I. Queiroz and J. Gisbert. 2007. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811). In: (L. Palomo, J. Gisbert and J. Blanco, eds.) Atlas y libro rojo de los Mamíferos terrestres de España. Dirección General para la Biodiversidad – SECEM – SECEMU, Madrid, Spain. pp. 92–95.
- Nores, C., F. Ojeda, A. Ruano, I. Villate, J. Gonzalez and J.M. Cano. 1998. Estimating the population density of *Galemys pyrenaicus* in four Spanish rivers. *J. Zool.-London* 246: 454–457.
- Peyre, A. 1950. Ecologie et biogéographie du Desman (*Galemys pyrenaicus* G.) dans les Pyrénées françaises. *Mammalia* 20: 405–418.
- Stone, R.D. 1987. The activity pattern of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) (Insectivora: Talpidae), as determined under natural condition. *J. Zool.-London* 213: 95–106.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.

Article 2

Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers in the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus*

François Gillet, Maria Teresa Cabria, Frédéric Blanc, Christine Fournier-Chambrillon, Mélanie Némoz, Eric Sourp, Corinne Vial-Novella, Rafael Zardoya, Stéphane Aulagnier, Johan R. Michaux

Résumé

Dernièrement, la phylogéographie du desman des Pyrénées a été proposée à partir de séquences d'ADN mitochondrial (cytochrome b et D-Loop) et de séquences nucléaires introniques (Igea et al. 2013). Celle-ci a suggéré un niveau très bas de diversité génétique comparativement à d'autres mammifères. Cependant, ces marqueurs moléculaires n'étaient pas assez variables pour déceler une éventuelle structure génétique liée à des événements d'isolement plus récents ou mettre en évidence des flux de gènes entre populations génétiquement différenciées. Le but de cette étude a ainsi été de mettre au point une série de marqueurs microsatellites polymorphes pour le desman des Pyrénées permettant d'étudier de manière plus fine cette espèce.

Pour cette étude, une banque de microsatellites a été créée par la société Génoscreen (Lille) d'où 94 loci ont été sélectionnés pour être amplifiés en PCR simple. De ces 94 loci, 24 ont montré un certain taux de polymorphisme et ont été retenus pour la suite des analyses. Ces 24 microsatellites ont alors été répartis en 5 multiplex et ceux-ci ont été testés sur 38 échantillons de tissus de desman des Pyrénées, préalablement collectés dans toute l'aire française de l'espèce.

Tous les loci testés étaient polymorphes parmi ces 38 échantillons. Le nombre d'allèles variait de 2 à 5, l'hétérozygotie moyenne observée était de 0,15 et l'hétérozygotie moyenne attendue était de 0,23. Un écart significatif à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été découvert pour 8 loci qui montraient un déficit en hétérozygotes, suggérant la présence d'allèles nuls. Cependant, les valeurs d'allèles nuls étaient toujours inférieures à 0,2 indiquant que celles-ci ne poseraient pas de problèmes significatifs dans nos analyses.

Ces premiers microsatellites mis au point pour le desman des Pyrénées, constituent ainsi des outils de choix pour apporter des informations sur la structure génétique de cette espèce à une échelle plus fine (cf. **article 4**).

Article 2

Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers in the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus*

François Gillet^{1, 2, 3}, Maria Teresa Cabria¹, Frédéric Blanc³, Christine Fournier-Chambrillon⁴, Mélanie Némoz³, Eric Sourp⁵, Corinne Vial-Novella⁶, Rafael Zardoya⁷, Stéphane Aulagnier², Johan R. Michaux¹

¹ Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

² Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

³ Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

⁴ Groupe de Recherche et d'Etudes pour la Gestion de l'Environnement (GREGE), Route de Préchac, 33730 Villandraut, France

⁵ Parc national des Pyrénées, 2 rue du IV Septembre, 65 007 Tarbes, France

⁶ Département Biologie Vétérinaire, Laboratoires des Pyrénées et des Landes, rue des Ecoles - 64150 Lagor, France

⁷ Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC; José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain

Article à soumettre dans Conservation Genetics Resources

Abstract

The Pyrenean desman is a vulnerable mammal species endemic to Pyrenean mountains and the northern half of the Iberian Peninsula. The genotyping of 24 microsatellites from tissue samples revealed a low level of alleles per locus (2 to 5) as well as very low levels of polymorphism (mean observed and expected heterozygosity values per locus were 0.15 and 0.23 respectively). 8 loci exhibited evidence of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium but no evidence for linkage disequilibrium was found. Presence of null alleles was not detected in all 24 loci either. These first microsatellite primers developed for the Pyrenean desman will provide information on its fine-scale genetic structure and will help improving its conservation policies.

Keywords *Galemys pyrenaicus*, microsatellite, conservation, Pyrenean desman, multiplex

Introduction

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean mountains and the northern half of the Iberian Peninsula. This species is currently considered as vulnerable in the IUCN Red List (Fernandes et al. 2008) and has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades, inevitably impacting its distribution (Némoz and Bertrand, 2008). The ecology and biology of this species are weakly known and, until recently, no genetic data was available for it. A recent genetic study (Igea et al., 2013) based on mitochondrial and nuclear data has shown that the Pyrenean desman was characterized by very low levels of genetic diversity compared to other mammals and possessed a phylogeographic structure encompassing four mitochondrial lineages with parapatric distributions. The present study aims to provide polymorphic microsatellites for *G.pyrenaicus*. This will allow studying the genetic structure of this species at smaller scales as well as assessing potential gene flows between its populations.

Material and methods

38 *G.pyrenaicus* specimens, found dead fortuitously in the field, were collected in all of the 6 French departments encompassed in the geographical range of this species, with the following authorizations licensed by the French Government: n° 2011221-0004 for Aude department, n° 24/2011 for Pyrénées–Atlantiques department, n° 2011215-0002 for Pyrénées–Orientales department and n° 2011-INT/01 for Ariège, Haute – Garonne and Hautes–Pyrénées departments.

DNA of one individual was sent to the Genoscreen society (Lille, France) to build a microsatellite-enriched library. Monolocus PCRs were first performed to test the polymorphism of 94 selected loci. From these 94 loci, 24 displayed good quality and polymorphic amplification and therefore were selected for further analysis. The 5'-end of the forward primer of each locus was labeled with a fluorescent dye (PET, NED, VIC, 6-FAM) and the 24 microsatellites were distributed in five Multiplex kits (A, B, C, D, E) based on size limitations (Appendix 1). The five kits were tested on the 38 tissue samples.

Genomic DNA was extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. PCRs were carried out in 9µl volume containing 0.1 of each 20µM primers, 5µl of Multiplex PCR kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and 2µl of DNA. Amplifications were performed in a thermal cycler VWR Unocycler using one activation step at 95°C for 15min followed by 35 cycles (denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 57°C for 90 s, extension at 72°C for 60s) and final extension step at 72°C for 30

min. PCR products were detected on an ABI 3700 sequencer using 2 μ l of amplified DNA, 12 μ l of formamide and 0.3 μ l of GeneScan 500LIZ[®] size standard.

Observed and expected heterozygosities were estimated with the GENETIX software (Belkhir et al., 2004). Hardy–Weinberg (HW) equilibrium and linkage disequilibrium were tested using the exact test implemented in GENEPOP 4.1.0 (Rousset, 2008).

Results and discussion

All tested loci were polymorphic among our samples. The number of alleles varied from 2 to 5 with an average of 2.95 (Table 1). The mean observed heterozygosity (H_O) was 0.15 (ranging from 0.02 to 0.41) and the mean expected heterozygosity (H_E) was 0.23 (ranging from 0.05 to 0.59) (Table 2). Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were found for loci GpyrGS13, GpyrGS22, GpyrGS30, GpyrGS32, GpyrGS33, GpyrGS55, GpyrGS74 and GpyrGS82 (Table 2). These loci exhibited a deficit of heterozygotes indicating the possibility of null alleles. However, the values of Null Allele Frequency (NAF) estimated in FreeNA (Chapuis and Estoup, 2007) were always ≤ 0.2 indicating that null alleles are not expected to cause significant problems in the analysis (Table 2). After Bonferroni correction, no significant linkage disequilibrium was detected using GENEPOP 4.1.0 (Rousset, 2008).

Table 2 Observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities and null allele frequency (NAF). Loci with significant deviation from Hardy-Weinberg proportions (P value < 0.05) are indicated with *.

Locus	H_O	H_E	NAF
GpyrGS06	0.08	0.08	0.13
GpyrGS07	0.06	0.06	0.00
GpyrGS10	0.25	0.34	0.00
GpyrGS11	0.16	0.20	0.02
GpyrGS12	0.05	0.10	0.00
GpyrGS13*	0.00	0.19	0.10
GpyrGS18	0.13	0.12	0.00
GpyrGS20	0.42	0.54	0.00
GpyrGS22*	0.41	0.56	0.07

GpyrGS23	0.37	0.50	0.00
GpyrGS30 *	0.09	0.18	0.00
GpyrGS32 *	0.22	0.60	0.00
GpyrGS33 *	0.28	0.45	0.20
GpyrGS34	0.33	0.43	0.00
GpyrGS41	0.09	0.08	0.00
GpyrGS46	0.05	0.05	0.12
GpyrGS47	0.11	0.10	0.08
GpyrGS53	0.09	0.08	0.16
GpyrGS55 *	0.03	0.08	0.00
GpyrGS74 *	0.05	0.15	0.09
GpyrGS75	0.08	0.08	0.07
GpyrGS80	0.11	0.10	0.00
GpyrGS82 *	0.22	0.50	0.15
GpyrGS94	0.08	0.08	0.00

In conclusion, these first polymorphic microsatellites primers developed for the Pyrenean desman will provide information on the fine-scale genetic structure and dynamics among populations of this vulnerable species. This will help to improve the conservation strategies for this species.

Acknowledgments

We thank the following people who collected tissue samples: EDF agents, Pyrenees National Park agents, M. Bayon, A. Bertrand, J-P. Besson, J-P. Quéré, A. Charbonnel, F. Elzear, L. Fabre, P. Fantin, B. Le Roux, V. Lacaze, M. Lagardère, F. Lassère, B. Le Corre, M. Mas, P. Maunas, G. Nogué, F. Prud'Homme, T. Quintilla, B. Salmeron, T. Tico, S. Torreilles and S. Vernet.

This study is part of the “Plan National d’Actions en faveur du Desman des Pyrénées” and the LIFE+ Desman (LIFE13NAT/FR/000092) which are coordinated by the Conservatoire d’Espaces Naturels de Midi-Pyrénées (CEN-MP) and are financially supported by the following structures: European Union Funding Network (ERDF and LIFE+), Agence de l’eau Adour-Garonne, Agence de l’eau Rhône-Méditerranée-Corse, DREAL Aquitaine, Midi-Pyrénées, and Languedoc-Roussillon, Conseil Régional Aquitaine, Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l’Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEM, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). F. Gillet is supported by a French research fellowship provided by the ANRT (“bourse CIFRE”).

References

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.
- Chapuis, M.-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621–31. doi:10.1093/molbev/msl191
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. IUCN Red List Threat. Species. Version 2013.2.
- Igea, J., Aymerich, P., Fernández-González, A., González-Esteban, J., Gómez, A., Alonso, R., Gosálbez, J., Castresana, J., 2013. Phylogeography and postglacial expansion of the endangered semi-aquatic mammal *Galemys pyrenaicus*. *BMC Evol. Biol.* 13, 115. doi:10.1186/1471-2148-13-115
- Némoz, M., Bertrand, A., 2008. Plan National d’Actions en faveur du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*), 2009-2014. Société Française pour l’Etude et la Protection des Mammifères / Ministère de l’Ecologie, de l’Energie, du Développement Durable et de l’Aménagement du Territoire, 151p.
- Rousset, F., 2008. genepop’007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–6. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Appendix 1. Description of the 24 polymorphic microsatellite loci isolated from the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) with primer sequences, repeat motif of nucleotides, number of alleles and allele size range (bp).

Locus	Primer sequence 5' - 3'	Multiplex Kit	Repeat motif	No. alleles	Allele size range (bp)
GpyrGS06	F : GGGAAAGACCACTATCTGGG R : TCATCATTCCAGAGCTGCCT	C	(ATAG) ₉	3	191- 199
GpyrGS07	F : GAACCACAAACTGAGGGTTCA R : CCAGCTCATACTGTGTGGC	E	(CATC) ₇	2	194- 198
GpyrGS10	F : CACAGCAAGGTCTTAATGAAATAGA R : GTATCATTTTCTCTGTAAATCCAATC	B	(CATC) ₁₄	4	234- 246
GpyrGS11	F : CCTGAGGCTCATTCTACTTGC R : AACCTAAAGTAGAGTAACTG	B	(CATC) ₁₆	3	198- 206
GpyrGS12	F : GTAGCCCACTAGTTGTTGAATG R : GAAATCCCTGAGGTCAGTAACC	B	(CATC) ₇	2	217- 221
GpyrGS13	F : TCTCACACTAACATCCCACTTGA R : TTCATAAAGTCAATTTAATGC	A	(CATC) ₁₀	2	174- 178
GpyrGS18	F : TTGGGACTGTTATTATTGC R : TACGGCGGGTGAAATAAGTC	D	(CATC) ₁₅	3	243- 251
GpyrGS20	F : CCTGATGCTGACTTTTGTGC R : AAGGATCAGACCAAACCTCCA	E	(TCTA) ₁₅	4	219- 231
GpyrGS22	F : TGCTTCCTTGTTTTCCCTTC R : TCAAGGATGGTGCATTTCTGAC	B	(TCTA) ₁₄	5	208- 224
GpyrGS23	F : TTAAGTATATGTACACCCTC R : TGGCATCTGGTACATAGTAGTTGTT	A	(TCTA) ₁₄	5	195 - 211
GpyrGS30	F : GTGTATTAATGTGAATTTGG R : ACACCCATTCATCTGTTC	C	(TGGA) ₁₆	3	186- 194

GpyrGS32	F : GGTAATAATAGCTCTAAATGCAG R : TTATTTGCCTCAAGGTCAC	E	(TGGA) ₁₄	5	189- 207
GpyrGS33	F : GGTAGTCAAGGAATTCTCTGCTGT R : TGCATGTTCCCCCAACTCTA	A	(GGAT) ₁₆	3	230- 238
GpyrGS34	F : CATCATATTTTCTGTGCCTGGA R : CCTTCTACTCTAGTGATTCAC	D	(TGGA) ₁₆	4	193- 205
GpyrGS41	F : GCAAACCAAGAAGTTATGCCA R : CAACTTATTTGTTAATGATTTTATCCC	D	(AG) ₁₃	3	106- 112
GpyrGS46	F : GCTCTACACTCTACACGCAG R : CCTTGACATGAGTATGGGTTC	A	(AC) ₁₁	2	186-188
GpyrGS47	F : AGAGTTCTCTAGCATCACCAGG R : GATCTGGAGGGTTGGGGC	B	(AC) ₁₁	3	137-143
GpyrGS53	F : TTAGAGAAACTGCATGGGCC R : TCTTCACATTGTCTGCATCAAC	E	(CA) ₁₀	2	146- 148
GpyrGS55	F : CAAGAACCAAGTGTCTTGCC R : GTCTGGAGATTCACCCATGC	C	(AC) ₁₀	2	164- 166
GpyrGS74	F : CATAAAGTAGAACTCGTCCT R : AGGTATGAGTTCTAAGGACC	C	(CA) ₁₅	2	138- 140
GpyrGS75	F : GGTAGAGACTCATCTGAAGGGC R : TTGTGCCTCCAAATGTTAGC	D	(CA) ₁₀	2	152- 154
GpyrGS80	F : TGATAAGTCAGAATGTGGGG R : TTTACCTTGACGATCCCTGC	C	(CA) ₁₂	2	127- 129
GpyrGS82	F : CACTATTAGACCAGAAAGCG R : CAGAGTGTGGCTTACCATTCC	E	(AC) ₁₈	2	172-174
GpyrGS94	F : AGTTTTGCATAATTAAGCTG	A	(AC) ₁₀	3	128- 132

R : GGAGGATGAGCAGTGTATGG

Article 3

A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces

François Gillet, Marie-Laure Tiouchichine, Maxime Galan, Frédéric Blanc, Mélanie Némoz, Stéphane Aulagnier and Johan R. Michaux

Résumé

La nature des interactions trophiques est un sujet fondamental dans l'écologie et elle a suscité l'attention des biologistes depuis des décennies. Plus particulièrement, les études de régime alimentaire apportent des données importantes pour la connaissance de l'écologie et la mise en œuvre de la conservation des espèces étudiées (Shehzad et al. 2012). Cette connaissance est particulièrement essentielle quand une espèce est menacée et discrète par nature comme le desman des Pyrénées. Cette espèce est bien adaptée à la vie aquatique et ses caractéristiques physiques en font une spécialiste de la recherche et de la consommation de larves de macro-invertébrés benthiques (Palmeirim & Hoffmann 1983; Richard 1986).

Le régime alimentaire de *G. pyrenaicus* a déjà été étudié par l'analyse des fragments de proies contenus soit dans le tube digestif d'animaux capturés et morts (Puisségur 1935; Castién & Gosálbez 1995; Santamarina & Guitian 1988; Santamarina 1993) soit dans les fèces (Bertrand 1993; 1994). Bien que cette méthode ait fourni des informations utiles, elle présente cependant certaines limites. Tout d'abord, la résolution taxonomique ne peut guère dépasser le rang de la famille (Bertrand, 1994). Deuxièmement, le desman des Pyrénées étant une espèce vulnérable, le piégeage et la mise à mort des animaux ne sont pas appropriés tandis que l'analyse des fèces prend beaucoup de temps et nécessite une grande expérience de l'examineur. Enfin, comme expliqué dans l'**article 1**, certaines erreurs peuvent facilement se produire lorsqu'il s'agit d'identifier morphologiquement l'espèce productrice des échantillons.

Les méthodes d'identification génétique mises au point dans l'**article 1** ont démontré qu'elles permettaient de distinguer facilement les fèces de desman des Pyrénées. Cependant, le nombre d'espèces ciblées était limité aux autres espèces semi-aquatiques écologiquement proches du desman des Pyrénées, à savoir le cincle plongeur et la crossope aquatique. Par conséquent, il était important de proposer une méthode plus précise et universelle, diminuant tout risque de confusion possible avec des fèces provenant d'autres espèces et permettant

également d'identifier clairement le desman des Pyrénées et ses proies, avec une résolution taxonomique dépassant le rang de la famille.

Récemment, les techniques moléculaires utilisant le barcoding de l'ADN ont permis d'étudier le régime alimentaire d'un large panel d'espèces de mammifères comprenant, entre autres, herbivores, chauves-souris, carnivores et rongeurs (Soininen et al. 2009; Zeale et al. 2011; Galan et al. 2012; Shehzad et al. 2012; Latinne et al. 2014). Parmi les différentes régions de l'ADN utilisées dans ce type d'étude, le gène codant pour la cytochrome oxydase 1 (COI) de l'ADN mitochondrial a été largement utilisé, notamment dans des études sur les invertébrés (Hajibabaei et al. 2011; Meusnier et al. 2008; Lees et al. 2010; Virgilio et al. 2010).

Etant donné que les invertébrés constituent la majeure partie du régime alimentaire du desman des Pyrénées, le but de cette étude était d'amplifier un fragment du gène COI long de 133pb à l'aide d'une technique de séquençage de nouvelle génération (méthode Ion Torrent) afin d'identifier les fèces appartenant au desman des Pyrénées et de pouvoir analyser son régime alimentaire avec une résolution taxonomique supérieure au rang de la famille.

Dans cette étude, 24 fèces présumées de desman des Pyrénées ont été récoltées dans plusieurs localités des Pyrénées françaises et ont été multiplexées avec des échantillons venant d'autres projets lors du séquençage Ion Torrent. Des duplicats de PCR ont été réalisés pour chaque échantillon en suivant la procédure de Galan et al. (2012). Après le séquençage à haut-débit, les séquences ont été triées en utilisant le programme SESAME (Piry et al. 2012). Elles ont ensuite été comparées avec des séquences publiées disponibles dans la base de données BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007). Les séquences ayant un score de similarité plus grand ou égal à 98% étaient considérées comme certifiées.

Tous les échantillons de fèces ont été amplifiés avec succès. Parmi ceux-ci seize appartenaient au desman des Pyrénées tandis que les huit autres étaient attribués à d'autres espèces comme la crossope aquatique, le murin de Daubenton (*Myotis daubentonii*) ou le merle (*Turdus merula*).

L'analyse du régime alimentaire contenu dans les 16 fèces de desman des Pyrénées a permis d'identifier 19 espèces certifiées avec un score $\geq 98\%$ et 11 espèces potentielles avec un score compris entre 90 et 96%. Les 19 espèces valides étaient distribuées en quatre ordres et onze familles. L'ordre Trichoptera et la famille Hydropsychidae étaient les plus fréquents. L'espèce la plus fréquente était *Hydropsyche dinarica*. Les 11 espèces potentielles étaient distribuées

en cinq ordres et neuf familles. L'ordre, la famille et l'espèce les plus fréquents étaient Plecoptera, Perlodidae et *Perlodes microcephalus* respectivement.

Les résultats d'identification du desman des Pyrénées et de ses proies parmi les fèces analysées confirment l'utilité d'utiliser ce marqueur génétique dans les études de régime alimentaire utilisant les techniques de séquençage de nouvelle génération. L'identification de nombreuses autres espèces hôtes appartenant à différentes classes démontre également l'universalité des amorces utilisées ainsi que leur potentiel pour amplifier un panel d'espèces plus large à partir d'échantillons de fèces récoltées sur le terrain.

Les ordres et familles des 19 espèces certifiées sont en accord avec les résultats des précédentes études (Castién & Gosálbez 1995; Santamarina & Guitian 1988; Santamarina 1993; Bertrand 1993; 1994), tout comme la prééminence de la famille Hydropsychidae dans le régime alimentaire du desman des Pyrénées (Santamarina & Guitian 1988; Santamarina 1993; Bertrand 1993; 1994). Une meilleure identification des espèces potentielles pourrait être obtenue en réalisant au point une banque de référence à partir d'organismes collectés dans les Pyrénées françaises. Enfin, étant donné que la moitié des espèces découvertes dans notre étude n'ont été retrouvées qu'une fois dans nos échantillons une étude incluant un plus grand nombre d'échantillons permettra de compléter la liste des proies du desman des Pyrénées (**cf. article 5**).

Article 3

A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces

François Gillet^{a, b, c}, Marie-Laure Tiouchichine^d, Maxime Galan^d, Frédéric Blanc^c, Mélanie Némoz^c, Stéphane Aulagnier^b and Johan R. Michaux^a

^a Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

^b Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

^c Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

^d CBGP (Centre de Biologie et de Gestion des Populations), UMR INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro, Campus international de Baillarguet CS 30016, Montferrier-sur-Lez cedex, France

Soumis le 18 avril 2015 à Mammalian Biology

Abstract

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small endangered semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and to the northern half of the Iberian Peninsula whose ecology and biology are still poorly known. The aim of this study was to identify Pyrenean desman faeces and to analyze its diet from this material using next-generation sequencing methods. We amplified and sequenced a small DNA minibarcode (133bp) of the COI gene in twenty-four putative faeces samples of Pyrenean desman and successfully identified the species in 16 samples. Other identified species were mammals, birds and amphibians, evidencing the potential application of our methods to a larger panel of taxa.

In the Pyrenean desman faeces, we were able to identify nineteen prey species with a positive match (more than 98% of identity with a reference sequence) and eleven putative prey species with lower identity scores (90-96%). The nineteen species belonged to four orders and eleven families among which Trichoptera and Hydropsychidae were the most frequent, respectively. Future improvements could be obtained by extending the reference DNA sequence collection to reach precise identifications over the Desman's range and by increasing the sampling to gain a better knowledge of the local diet of this endangered species. Such information is of great importance to propose the best management measures for its conservation.

Keywords diet; faeces; *Galemys pyrenaicus*; identification; next-generation sequencing

Introduction

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and to the northern half of the Iberian Peninsula. It is endangered and is currently considered as vulnerable in the IUCN Red List (Fernandes et al. 2008) and is legally protected in the four countries encompassing its distribution area (Andorra, France, Portugal and Spain). It has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades, inevitably impacting its distribution (Nores et al., 2007; Némoz and Bertrand, 2008; Gisbert and García-Perea, 2014; Charbonnel, 2015). The biology and ecology of this species are still poorly known, notably because of its elusive behaviour and its primarily nocturnal activity (Stone, 1987; Bertrand, 1994). Its distribution area is not even definitively established. However, this information is essential in order to develop the best management strategies for the species (Némoz and Bertrand, 2008).

The nature of trophic interactions is a fundamental topic in ecology and has aroused the attention of biologists for decades. Diet analyses provide key data for understanding animal ecology, evolution and conservation (Shehzad et al. 2012). This knowledge is particularly important when a species is endangered and elusive in nature as the Pyrenean desman. This species lives in cold and well-oxygenated flowing waters of mountain rivers and is well adapted to the aquatic life. *G. pyrenaicus* is characterized by large webbed hindfeet, a double layered fur, a long tail and a mobile prehensile snout, which make it a specialist in finding and feeding on larvae of benthonic macroinvertebrates (Palmeirim and Hoffmann, 1983; Richard, 1986). The diet of *G. pyrenaicus* has been previously studied either by examining digestive tracts of trapped animals or by analyzing faeces samples (Trutat, 1891; Puisségur, 1935; Richard and Vallette Vialard, 1969; Santamarina and Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994; Castián and Gosálbez, 1995; Fernández-salvador et al., 1998). While these methods have provided some useful information, they are not without flaws. Firstly, the taxonomic resolution based on these approaches cannot exceed the family rank (Bertrand, 1994). Secondly, as the Pyrenean desman is a vulnerable species, trapping and killing animals is not appropriate and analyzing faeces is time-consuming and greatly relies on the experience of the identifier. Indeed, some mistakes can easily occur when identifying the host species especially when faeces are not fresh or have been in contact with water. A recent reliable and non-invasive molecular method was developed to easily distinguish faeces of the Pyrenean desman (Gillet et al., 2015) but the scope of targeted species was limited to other semi aquatic ecologically related vertebrate species namely the white-throated dipper *Cinclus cinclus* and

the water shrew *Neomys fodiens*. Therefore, it seems appropriate to propose a more precise and universal method that could clearly identify the Pyrenean desman and its prey, at a finer taxonomic resolution than the family rank.

More recently, several diets based on faeces of a broad panel of mammal species encompassing herbivores, bats, carnivores, and rodents among others, have been successfully analyzed with molecular techniques using DNA barcoding (Soininen et al., 2009; Zeale et al., 2011; Galan et al., 2012; Shehzad et al., 2012; Latinne et al., 2014). The different preys and plant taxa contained in the faeces are identified by amplifying small and highly variable DNA fragments with universal primers and by using them as barcodes. Among the different DNA regions that have been used for this purpose, the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (COI) has been widely used, notably in invertebrates studies (Meusnier et al. 2008; Lees et al. 2010; Virgilio et al. 2010). In addition, the international project Barcoding of Life (www.barcoding.si.edu) aims to generate a complete species identification catalogue for all animal kingdom organisms based on the COI gene.

As invertebrates, and particularly macroinvertebrates benthonic larvae, represent the majority of the diet of the Pyrenean desman, the aim of our study was to use a small COI minibarcode of 133bp in order to assess the performance of a DNA barcoding technique, using next-generation sequencing, to (1) identify *G.pyrenaicus* faeces, as this will greatly help future studies on this species, especially on its distribution and (2) to analyse its diet at a taxonomic resolution finer than the family rank.

Material and methods

24 putative faecal samples of *G. pyrenaicus* were collected in different French Pyrenean localities and preserved in ethanol. DNA from faeces was extracted using the Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.

In this study, we performed an Ion Torrent PGM sequencing (Life Technologies) following the tagging and multiplexing method developed by (Galan et al., 2012). A 133bp minibarcode was amplified for each sample using a modified forward primer LepF1 (Hebert et al., 2004) : 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNNNNATTCHACDAAYCAYAA RGAYATYGG-3', and a modified reverse primer EPT-long-univR (Hajibabaei et al., 2011) : 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATNNNNNNNACTATAAAARAAAATYTDAYAAA DGCRGTG-3'. The 5' parts of the primers were modified by the addition of individual-specific

MIDs (Multiplex IDentifiers NNNNNNN), consisting in a short 7bp sequence and adaptors required for the emPCR and the Ion Torrent sequencing. By using combination of different forward and reverse MIDs sequences, several hundred of samples can be multiplexed on the same sequencing run, and the sequences can be recognized after sequencing where all the PCR products from the different samples are mixed together. In this study, the 24 faecal samples were multiplexed with samples from other projects. PCR amplification was performed twice for each faecal sample and following the procedure detailed in Galan et al (2012). Briefly, PCRs were carried out in a 10 µl reaction volume using 5 µl of 2x QIAGEN Multiplex Kit (Qiagen, Hilden, Germany), 0.5 µM of each primer, and 1 µl of DNA extract. The PCR conditions consisted in an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 45 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 30 s, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. After PCR pooling (4 µl per strong PCR amplification products and 7 µl per lighter ones) and size selection by gel excision, the amplicon libraries were sequenced by the company Genes Diffusion (Douai, France) on a Ion Torrent PGM system using a Ion 316 Chip version 2 (LifeTechnologies).

The sequences were sorted by using the SESAME barcode software (SEquence Sorter & AMplicon Explorer) (Piry et al., 2012). These sequences were compared with published sequences available in the BOLD database (Ratnasingham and Hebert, 2007). Sequences that had a unique best-hit with an identity score greater or equal to 98% were considered to be positive matches. Identification results are expressed as number of positive samples for each taxon (order, family and species ranks) and matching score of species with the database.

Results

All 24 faecal samples were successfully amplified and a total of 301,369 reads were obtained among which 229,557 were correctly assigned to the 24 samples. Sixteen samples (165,660 reads (70%)) belonged to the Pyrenean desman with 96,314 reads (58%) assigned to the desman itself and 69,346 reads (42%) assigned to its prey. The remaining 8 samples were assigned to other host species: three samples belonged to the water shrew *Neomys fodiens* (22,268 reads) and the other were respectively assigned to a species of *Rattus* (17,257 reads), the edible dormouse *Glis glis* (9,170 reads), the Daubenton's bat *Myotis daubentonii* (7,499 reads), the common blackbird *Turdus merula* (3,531 reads) and the fire salamander *Salamandra salamandra* (4,172 reads).

The proportion of items obtained twice in the PCR duplicates for a same DNA extract was computed as the percentage of repeatability. Repeatability of the results reached 100% when

only host species were considered, 86% when only prey species were considered and 89% when all species were considered.

The diet analysis of the 16 Pyrenean desman faeces led to the identification of 19 species (17,684 reads with a score $\geq 98\%$) and 11 additional putative species (51,662 reads with a score of 90 to 96%). The 19 validated species belonged to four orders (Diptera, Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera) and 11 families (two for Diptera and Ephemeroptera each, three for Plecoptera and four for Trichoptera). The number of positive samples for orders, families and species are displayed in Table 1. The most frequent order was Trichoptera (16 positive samples), which included the most frequent family and species, Hydropsychidae (13 positive samples) and *Hydropsyche dinarica* (7 positive samples) respectively. The 11 putative species belonged to five orders (Amphipoda, Coleoptera, Diptera, Ephemeroptera and Plecoptera) and 9 families (one for Amphipoda, Coleoptera and Diptera, three for Ephemeroptera and three for Plecoptera) (Table 2). The most frequent orders were Plecoptera (14 positive samples) and Ephemeroptera (12 positive samples), the most frequent family was Perlodidae (Plecoptera) (10 positive samples) and the most frequent species was *Perloides microcephalus* (Perlodidae) (10 positive samples).

Discussion

The amplification of a COI minibarcode successfully provided the identification of both the Pyrenean desman and its prey species in 16 faecal samples. As no predator-specific blocking probe was used in this study, these results confirm the relevance of using this genetic marker with NGS sequencing method in diet assessments (Piñol et al., 2014). Interestingly, in addition to the Pyrenean desman and its prey, the COI fragment used in this study also led to the identification of other host species including one bird and one amphibian. This demonstrates the potential of the primers used in this study to amplify a larger panel of host species from faecal samples. These results also show the difficulty of identifying Pyrenean desman faeces in the field by morphological criteria and the risk of confusion with faeces from other species living in the same habitat, as it was previously reported (Gillet et al., 2015).

Table 1. Prey order, family and species identified with positive matches (>98%) in the 16 faeces of *Galemys pyrenaicus* collected in the French Pyrenees with their respective number of positive samples.

Order	Family	Species	Number of positive samples
Diptera (2)	Simuliidae (1)	<i>Simulium argyreatum</i>	1
	Tipulidae (1)	<i>Tipula maxima</i>	1
Ephemeroptera (9)	Baetidae (6)	<i>Baetis muticus</i>	1
		<i>Baetis rhodani</i>	6
	Heptageniidae (6)	<i>Rhithrogena sp</i>	6
Plecoptera (11)	Leuctridae (3)	<i>Leuctra aurita</i>	1
		<i>Leuctra pseudocylindrica</i>	2
	Nemouridae (3)	<i>Protonemura intricata</i>	1
		<i>Protonemura meyeri</i>	2
	Perlidae (6)	<i>Dinocras cephalotes</i>	2
		<i>Perla marginata</i>	5
Trichoptera (16)	Hydropsychidae (13)	<i>Annitella thuringica</i>	1
		<i>Hydropsyche dinarica</i>	7
		<i>Hydropsyche instabilis</i>	2
		<i>Hydropsyche siltalai</i>	2
		<i>Hydropsyche tenuis</i>	2
	Limnephilidae (1)	<i>Potamophylax cingulatus</i>	1
	Odontoceridae (2)	<i>Odontocerum albicorne</i>	2
	Philopotamidae (1)	<i>Philopotamus montanus</i>	1

Table 2. Additional putative prey order, family and species identified with non positive matches (< 98%) in the 16 faeces of *Galemys pyrenaicus* collected in the French Pyrenees with their respective number of positive samples and matching score of species with the database

Order	Family	Species	Number of positive samples	Percentage of identity
Amphipoda (8)	Gammaridae (8)	<i>Gammarus fossarum</i>	8	90%
Coleoptera (1)	Carabidae (1)	<i>Bembidion articulatum</i>	1	92%
Diptera (1)	Thaumaleidae (1)	<i>Androprosopa gillespieae</i>	1	92%
Ephemeroptera (12)	Baetidae (5)	<i>Baetis alpinus</i>	5	94-95%
	Ephemerellidae (5)	<i>Ephemerella mucronata</i>	5	90%
		Heptageniidae (7)	<i>Ecdyonurus venosus</i>	3
			<i>Epeorus sylvicola</i>	4
Plecoptera (14)	Nemouridae (5)	<i>Nemoura uncinata</i>	2	96%
		<i>Protonemura auberti</i>	3	91-92%
	Notonemouridae (2)	<i>Halticoperla tara</i>	2	91%
	Perlodidae (10)	<i>Perlodes microcephalus</i>	10	90-91%

This study also allowed to unambiguously identify 19 prey species of the Pyrenean desman, with an additional 11 putative species displaying identity scores varying from 90 to 96%. This is the first study to give information on the diet of *G. pyrenaicus* at the species level. The 19 validated species belonged to four orders and eleven families of invertebrates which are consistent with the results of previous studies (Santamarina and Guitian, 1988; Santamarina,

1993; Bertrand, 1994; Casti n and Gos lbez, 1995). The most frequent family and species were Hydropsychidae and *Hydropsyche dinarica* respectively. Even though our sampling is smaller, this result confirms previous findings concerning the pre-eminence of Hydropsychidae in the diet of *G. pyrenaicus* (Santamarina and Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994). The other most frequent species, *Baetis rhodani*, *Rhithrogena sp.* and *Perla marginata*, as well as the majority of the macroinvertebrate larvae species identified in this study are also rheophile, therefore confirming the specialized diet of the Pyrenean desman as previously suggested (Santamarina and Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994). Even though a positive match could not be reached for the additional putative species, there is a fair chance that a majority of them could be part of the diet of the Pyrenean desman, especially *Baetis alpinus*, *Ecdyonurus venosus*, *Nemoura uncinata* and *Perlodes microcephalus* which are common species in the French Pyrenees (<http://www.opie-benthos.fr/>). The presence of Coleoptera and Amphipoda Gammaridae is not surprising as they were previously reported in the diet of the Pyrenean desman (Santamarina, 1993; Bertrand, 1994).

Conclusion

In this study, a diet analysis from putative faecal samples of the Pyrenean desman using DNA barcoding with the Ion Torrent PGM sequencing method, provided high-resolution identification of both the Pyrenean desman and its prey as well as other host species belonging to different classes. These results therefore potentially extend the methods used in this study to a broader panel of taxa.

Out of 16 Pyrenean desman faecal samples we were able to identify 19 species with a positive match ($\geq 98\%$ match with database), and 11 additional putative species with lower matching scores (90-96%). More precise identifications should be obtained for these species in the future after building a reference collection of invertebrate species collected in the French Pyrenees. The sequencing of these species could really improve the study of the diet of the Pyrenean desman at the scale of the whole Pyrenees chain.

As half of the identified species were found only once in our samples, the study of a larger number of faeces could provide a much broader list of prey of the Pyrenean desman. This would also allow studying potential changes of the diet in time and space which could greatly improve the future conservation of this endangered species.

Acknowledgments

We thank the following organisations who collected faeces samples: Association des Naturalistes de l'Ariège, Conservatoire d'Espaces Naturels d'Aquitaine, Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, Fédération Aude Claire, Fédération des Réserves Naturelles Catalanes, Groupe de Recherche et d'Etude pour la Gestion de l'Environnement, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Office National des Forêts, Parc National des Pyrénées. We thank also Sylvain Piry for his help with the bioinformatic analysis using SESAME barcode.

This study is part of the “Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées” and the LIFE+ Desman (LIFE13NAT/FR/000092) which are coordinated by the Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées (CEN-MP) and are financially supported by the following structures: European Union Funding Network (ERDF and LIFE+), Agence de l'eau Adour-Garonne, Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, DREAL Aquitaine, Midi-Pyrénées, and Languedoc-Roussillon, Conseil Régional Aquitaine, Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l'Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEM, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). F. Gillet is supported by a French research fellowship provided by the ANRT (CIFRE N° 2011/1571).

References

- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire de desman des pyrénées *G. pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse, 217p.
- Castién, E., Gosálbez, J., 1995. Diet of *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) in the North of the Iberian peninsula. *Netherlands J. Zool.* 45, 422–430.
- Charbonnel, A., 2015. Influence multi-échelle des facteurs environnementaux dans la répartition du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) en France. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse, 245 p.
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. IUCN Red List Threat. Species. Version 2013.2.
- Fernández-salvador, R., del Real, M., Garcíá-Perea, R., Gisbert, J., 1998. Feeding habits of the Iberian desman, *Galemys pyrenaicus*. Euro-American Mammal Congress, Santiago de Compostela (Spain).

- Galan, M., Pagès, M., Cosson, J.-F., 2012. Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding : Species Identification from Fresh , Degraded and Environmental Samples. PLoS One 7. doi:10.5061/dryad.1j6v6
- Gillet, F., Cabria, M.T., Némoz, M., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015. In press. PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA. Mammalia. doi:10.1515/mammalia-2014-0093
- Gisbert, J., Garcíá-Perea, R., 2014. Historia de la regresión del desmán ibérico *Galemys pyrenaicus* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811) en el Sistema Central (Península Ibérica). Munibe Monogr. Nat. Ser.
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. a C., Baird, D.J., 2011. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. PLoS One 6, e17497. doi:10.1371/journal.pone.0017497
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one : DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. PNAS 101, 14812–14817.
- Latinne, A., Galan, M., Waengsothorn, S., Rojanadilok, P., Eiamampai, K., Sribuarod, K., Michaux, J., 2014. Diet Analysis of *Leopoldamys Neilli*, a Cave-dwelling Rodent in Southeast Asia, Using Next-Generation Sequencing from Feces. J. Cave Karst Stud. 76, 139–145. doi:10.4311/2013LSC0100
- Lees, D.C., Rougerie, R., Zeller-Lukashort, C., Kristensen, N.P., 2010. DNA mini-barcodes in taxonomic assignment: a morphologically unique new homoneurous moth clade from the Indian Himalayas described in *Micropterix* (Lepidoptera, Micropterigidae). Zool. Scr. 39, 642–661. doi:10.1111/j.1463-6409.2010.00447.x
- Meusnier, I., Singer, G. a C., Landry, J.-F., Hickey, D. a, Hebert, P.D.N., Hajibabaei, M., 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. BMC Genomics 9, 214. doi:10.1186/1471-2164-9-214
- Némoz, M., Bertrand, A., 2008. Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*), 2009-2014. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères / Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, 151p.
- Nores, C., Queiroz, A.I., Gisbert, J., 2007. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811)., in: Palomo, L., Gisbert, J., Blanco, J. (Eds.), Atlas Y Libro Rojo de Los Mamíferos Terrestres de España. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad - SECEM - SECEMU, pp. 92–98.
- Palmeirim, J.M., Hoffmann, S.H., 1983. *Galemys pyrenaicus*. Mamm. Species 207, 1–5.
- Piñol, J., San Andrés, V., Clare, E.L., Mir, G., Symondson, W.O.C., 2014. A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation

- sequencing with no blocking probes. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 18–26. doi:10.1111/1755-0998.12156
- Piry, S., Guivier, E., Realini, a, Martin, J.-F., 2012. |SE|S|AM|E| Barcode: NGS-oriented software for amplicon characterization--application to species and environmental barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 1151–7. doi:10.1111/j.1755-0998.2012.03171.x
- Puisségur, C., 1935. Recherches sur le Desman des Pyrénées. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 67, 163–227.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355–364. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Richard, P.B., 1986. Les Desman des Pyrénées , un mammifère inconnu à découvrir. *Science et Découvertes*, Ed. Le Rocher, Monaco : 118 p.
- Richard, P.B., Vallette Vialard, A., 1969. Le Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) : premières notes sur sa biologie. *La Terre la Vie* 116, 225–245.
- Santamarina, J., 1993. Feeding ecology of a vertebrate assemblage inhabiting a stream of NW Spain (Riobo; Ulla basin). *Hydrobiologia* 252, 175–191. doi:10.1007/BF00008154
- Santamarina, J., Guitian, J., 1988. Quelques données sur le régime alimentaire du desman (*Galemys pyrenaicus*) dans le nord-ouest de l'Espagne. *Mammalia* 52.
- Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M. a, Miquel, C., Poillot, C., Shah, S. a, Pompanon, F., Coissac, E., Taberlet, P., 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Mol. Ecol.* 21, 1951–65. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x
- Soininen, E.M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., Brysting, A.K., Sønstebo, J.H., Ims, R. a, Yoccoz, N.G., Taberlet, P., 2009. Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Front. Zool.* 6, 16. doi:10.1186/1742-9994-6-16
- Stone, R.D., 1987. The activity pattern of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) (Insectivora : Talpidae), as determined under natural condition. *J. Zool. London* 213, 95–106.
- Trutat, E., 1891. Essai sur l'histoire naturelle du Desman des Pyrénées . Douladoure-Privat, Toulouse, 107 p.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., De Meyer, M., 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* 11, 206. doi:10.1186/1471-2105-11-206

Zeale, M.R.K., Butlin, R.K., Barker, G.L. a, Lees, D.C., Jones, G., 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 236–44.
doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02920.x

Article 4

Evidence of a fine-scale genetic structure for the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the French Pyrenees

François Gillet, Maria Teresa Cabria, Frédéric Blanc, Christine Fournier-Chambrillon, Mélanie Némoz, Eric Sourp, Corinne Vial-Novella, Rafael Zardoya, Stéphane Aulagnier, Johan R. Michaux

Résumé

La conservation des espèces menacées dépend de la connaissance de la structure génétique et de la diversité de leurs populations (Frankham 2003). Cette diversité est souvent spatialement structuré car l'habitat naturel n'est pas toujours continu ou peut varier sur l'aire de distribution des espèces. Les activités anthropiques, source de fragmentation et de perte d'habitat, jouent également un rôle dans la structuration des populations, avec comme conséquence de modifier les habitudes de déplacement et de dispersion ou de perturber la structure sociale et augmenter la consanguinité (Gerlach & Musolf 2000; Coster & Kovach 2012; Mona et al 2014). La fragmentation peut diminuer l'accès aux habitats appropriés et restreindre le flux de gènes. La taille efficace des populations diminue alors et le risque de dérive génétique et de dépression de consanguinité augmentent (Frankham 2005). Les distributions d'espèces actuelles étant le résultat d'événements évolutifs et de processus anthropiques, la connaissance de la dynamique des populations des espèces ainsi que l'étude de leur caractéristiques génétiques et écologiques sont utiles pour mettre en œuvre des plans de conservation et des mesures de gestion appropriées, en particulier pour les espèces possédant des petits domaines vitaux et une spécialisation de l'habitat.

Une étude récente a mis en évidence la phylogéographie du desman des Pyrénées à partir de séquences d'ADN mitochondrial (cytochrome b et D-Loop) et de séquences nucléaires introniques. Les résultats de cette étude ont également suggéré l'existence de niveaux très bas de diversité génétique comparativement à d'autres mammifères (Igea et al. 2013). Plus spécifiquement la lignée pyrénéenne serait génétiquement très homogène et aurait trouvé origine à partir d'une zone refuge située dans les montagnes basques espagnoles, après un phénomène de goulot d'étranglement important. Toutefois, ces hypothèses sont fondées sur un nombre restreint de spécimens ainsi que sur l'utilisation de marqueurs génétiques caractérisées par des taux d'évolution relativement bas, ne permettant pas d'avoir des informations précises concernant la structure génétique fine des populations. Afin de mieux

comprendre l'histoire évolutive du desman des Pyrénées, nous avons donc mené une étude génétique approfondie basée sur des marqueurs microsatellites développés précédemment dans notre laboratoire (Gillet et al. 2015). Ces marqueurs ont été utilisés pour analyser un ensemble d'échantillons de fèces distribués dans toutes les Pyrénées françaises

L'utilisation d'un échantillonnage important analysé selon un grand nombre de marqueurs hypervariables, a permis de répondre aux questions suivantes : existe-t'il une structure génétique au sein des populations de desman des Pyrénées des Pyrénées françaises? Si oui, quels sont leurs niveaux de diversité génétique et souffrent-elles de dépression de consanguinité ? Quels sont les niveaux de flux de gènes entre elles ?

Un total de 38 échantillons de tissus et 355 échantillons de fèces, provenant de l'ensemble de l'aire de distribution française du desman des Pyrénées, ont été utilisés dans cette étude. Ces 393 échantillons ont été génotypés avec 24 loci microsatellites polymorphes en utilisant les différents multiplex et conditions PCR rapportés dans Gillet et al. (2015). Un total de 108 individus ont pu être identifié à partir de ces échantillons.

Les résultats de l'analyse de clustering réalisée sur ces 108 échantillons, avec le programme STRUCTURE, a mis en évidence la présence de trois populations ($K = 3$) de desman des Pyrénées génétiquement et géographiquement distinctes, situées dans l'est, le centre et l'ouest des Pyrénées françaises. L'hétérozygotie observée était faible (0,19 à 0,23) dans les trois populations et le coefficient de consanguinité était élevé (0,17 à 0,43). Les indices F_{st} étaient significatifs entre les trois populations (0,2 à 0,34) indiquant une certaine limitation des flux de gènes. De plus, une sous-structuration a également été découverte pour la population de l'ouest, puisque trois sous-populations ont été mise en évidence, ce qui pourrait expliquer partiellement son fort coefficient de consanguinité (0,43).

Après avoir utilisé le programme DIYABC sur 10 scénarios, deux de ceux-ci se sont avérés être les plus probables pour expliquer la structure découverte. Ces scénarios décrivent deux histoires démographiques légèrement différentes. Le premier propose la séparation du cluster occidental du cluster oriental suivie par la séparation du cluster central à partir de ce dernier. Le deuxième suggère l'apparition du cluster central suite à un événement de convergence entre les clusters est et ouest.

Quel que soit le scénario choisi, l'origine de cette structure génétique pourrait remonter au Petit Age Glaciaire (PAG) (entre 1550 et 1850, bien que les limites ne soient pas totalement établies) pendant lequel des températures plus basses auraient pu entraîner la descente des

populations de desman des Pyrénées vers de plus basses altitudes où les bassins versant sont plus séparés, ce qui aurait limité la dispersion des individus. Cette espèce préfère en effet des rivières avec des débits d'eau élevés situés en haute altitude (Nores et al. 1992; Ramalhinho & Boa Vida 1993; Queiroz et al. 1996; Charbonnel et al. 2015). La perte d'habitat et la fragmentation des populations dus aux facteurs anthropiques ont également pu jouer un rôle dans l'apparition de cette structure génétique.

Malgré cette apparente réduction du flux génique entre les clusters, des échanges d'allèles ont également pu être mis en évidence. Ceux-ci pourraient confirmer que la génétique du desman des Pyrénées semble être peu influencée par les réseaux fluviaux (Igea et al. 2013) et que sa dispersion pourrait être plus complexe que précédemment accepté (Melero et al. 2012; 2014). Ces résultats suggèrent que, même si sa dispersion pourrait être relativement indépendante des cours d'eau, une meilleure connectivité entre bassins versants le long des Pyrénées devrait être encouragée afin de faciliter la dispersion des populations de desman des Pyrénées. Ces échanges entre bassins versants voisins devraient être facilités par l'amélioration de la qualité de l'eau et des habitats, principalement aux altitudes les plus basses où les rivières se rejoignent. Il pourrait également être intéressant d'améliorer les zones de connectivité entre les cours d'eaux principaux et leurs affluents. En effet, les affluents peuvent être utilisés comme zones refuges face à des événements hydrologiques soudains et de courte durée (e.g. crues, lâchers de centrale hydro-électrique) (Lake 2000; Charbonnel 2015). Ces échanges entre bassins versants et entre cours d'eaux principaux et affluents pourraient favoriser une augmentation des flux des gènes entre populations et ainsi conduire à une diminution des risques de dépression de consanguinité et une meilleure réponse aux changements climatiques futurs. La population de desmans des Pyrénées la plus occidentale pourrait particulièrement bénéficier de cette amélioration de la connectivité entre cours d'eaux car elle semble être la plus isolée.

Bien que cette étude ait apporté de nouvelles informations concernant la structure génétique du desman des Pyrénées en France, une étude utilisant ces mêmes marqueurs, réalisée sur l'aire de distribution totale de l'espèce paraît nécessaire pour renforcer encore la connaissance générale du desman des Pyrénées ainsi que sa conservation. Plus particulièrement, l'échantillonnage du versant espagnol des Pyrénées paraît prioritaire afin de mieux comprendre la structure génétique du desman des Pyrénées dans ces montagnes.

Article 4

Evidence of a fine-scale genetic structure for the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the French Pyrenees

François Gillet ^{1,2,3}, Maria Teresa Cabria ¹, Frédéric Blanc ³, Christine Fournier-Chambrillon ⁴, Mélanie Némoz ³, Eric Sourp ⁵, Corinne Vial-Novella ⁶, Rafael Zardoya ⁷, Stéphane Aulagnier ², Johan R. Michaux ¹

¹ Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

² Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

³ Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

⁴ Groupe de Recherche et d'Etudes pour la Gestion de l'Environnement (GREGE), Route de Préchac, 33730 Villandraut, France

⁵ Parc national des Pyrénées, 2 rue du IV Septembre, 65 007 Tarbes, France

⁶ Département Biologie Vétérinaire, Laboratoires des Pyrénées et des Landes, rue des Ecoles - 64150 Lagor, France

⁷ Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC; José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain

Article à soumettre dans *Molecular Ecology*

Abstract

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and the northern half of the Iberian Peninsula where it lives in mountain streams of cold and well-oxygenated flowing waters. This species is currently considered as vulnerable in the IUCN Red List and has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades, inevitably impacting on its distribution. The ecology and biology of this species are poorly known, notably because of its primarily nocturnal activity. Furthermore, a recent genetic study, based on mitochondrial and intronic sequences, showed that the genetic variability of the Pyrenean desman is very low in the Pyrenees. In this study we investigated the potential existence of a genetic structure and gene flow at a smaller scale using 24 polymorphic microsatellites loci. As the Pyrenean desman is a very elusive species, we completed our sample collection of tissues with faeces samples coming from the French distribution area of this species. Doing so, we successfully identify 70 individuals out of 355 faeces samples. Bayesian analyses revealed a genetic structure in our data set. Three genetic and geographic clusters were evidenced (one eastern, one central and one western, which includes three genetic sub-clusters) and their origins trace back to only 200 years ago. These clusters were characterized by low levels of genetic diversity and high inbreeding coefficients. Although gene flow among clusters appears to be limited, populations seem to have exchanged alleles recently. Therefore, connectivity between watersheds should be strengthened in order to ensure a certain level of genetic diversity and to potentially improve the long term survival of the Pyrenean desman in France.

Keywords *Galemys pyrenaicus*; microsatellites; conservation genetic; structure

Introduction

Conservation of endangered species is dependent on the knowledge of their populations' genetic structure and diversity (Frankham, 2003). This diversity is often spatially structured because the natural habitat is not always continuous or can vary across the range of the species. Anthropogenic activities, resulting in fragmentation and habitat loss, play a role in shaping the structure of wildlife populations too. At the individual level, they can alter spatial and dispersal movement patterns or disrupt social structure and increase inbreeding (Gerlach and Musolf, 2000; Coster and Kovach, 2012; Mona et al., 2014). At the species level, fragmentation can decrease the access to suitable habitats and can restrict gene flow. Then the effective population size decreases whereas the risk of genetic drift and inbreeding depression increases (Frankham, 2005). Current species distributions are the result of long-term effects of both evolutionary events and anthropogenic processes. The knowledge of species population dynamics along with their genetics and basic ecology is therefore useful to implement conservation plans and appropriate managements measures, especially for species displaying small ranges and habitat specialization.

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and to the northern half of the Iberian Peninsula (Queiroz, 1999). This species lives in mountain rivers of cold and well-oxygenated flowing waters and is therefore well adapted to the aquatic life. The Pyrenean desman is characterized by large webbed hindfeet, a double layered fur, a long tail and a mobile prehensile snout, which make it a specialist in finding and feeding on larvae of benthonic macroinvertebrates (Palmeirim and Hoffmann, 1983; Richard, 1986). The Pyrenean desman is an endangered species. It is currently considered as vulnerable in the IUCN Red List (Fernandes et al., 2008) and is legally protected in the four countries encompassing its distribution area (Andorra, France, Portugal and Spain). It has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades, inevitably impacting on its distribution (Nores et al., 2007; Némoz and Bertrand, 2008).

The elusive behaviour and nocturnal activity of this species makes it hard to study. Its ecology and biology are therefore poorly known (Stone, 1987; Bertrand, 1994; Melero et al., 2012, 2014). Moreover, no data on the genetic structure was available for the Pyrenean desman until a recent study based on mitochondrial and nuclear markers (Igea et al., 2013). This study evidenced that the Pyrenean desman was characterized by very low levels of genetic diversity as compared to other mammals. Its evolutionary history seems to be strongly influenced by

the Pleistocene glaciations, leading to a phylogeographic structure encompassing four mitochondrial lineages with parapatric distributions. More specifically, Igea et al. (2013) tended to evidence that the desman's Pyrenean populations are genetically homogeneous and that they probably originated from a distant refuge, probably situated in the Basque Mountains, after a severe bottleneck.

However, these hypotheses were based on a restricted number of specimens as well as on the use of genetic markers characterized by relatively low evolutionary rates, which do not allow fine-scale information concerning populations. In order to better understand the evolutionary history of the Pyrenean desman, we conducted a thorough genetic study based on a comprehensive sampling and microsatellite markers developed in our laboratory (Gillet et al., 2015a). These hypervariable markers were used to analyse an exhaustive set of faeces samples distributed throughout the French Pyrenees region. Indeed, faeces represent the easiest way to detect the presence of the Pyrenean desman and to obtain DNA for genetic analyses as it was previously demonstrated (Gillet et al., 2015b).

We aimed to determine whether there is a genetic structure among the Pyrenean desman populations of this region, the levels of gene flow, the levels of genetic diversity and potential instances of inbreeding depression.

The ultimate goal of this study is to help improving our general knowledge of this endangered and elusive species and better target its conservation.

Material and methods

Sampling and DNA extraction

A total of 38 tissue and 355 faeces samples coming from the whole French range of this species were used in this study. Tissue samples came from specimens found dead and collected with licenses: n° 2011221-0004 for Aude department, n° 24/2011 for Pyrénées–Atlantiques, n° 2011215-0002 for Pyrénées–Orientales and n° 2011-INT/01 for Ariège, Haute – Garonne and Hautes–Pyrénées. Identification of Pyrenean desman faeces was ascertained by the amplification of a small mitochondrial cytochrome b fragment (Gillet et al., 2015b). Genomic DNA from tissue and faeces samples preserved in ethanol was extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and the Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), respectively, following the manufacturer's instructions. To avoid any cross contamination, DNA extractions were conducted in a separated room with an UV-sterilised

platform where no Pyrenean Desman tissue samples were previously treated.

DNA amplification

The 393 samples used in this study were genotyped at 24 variable microsatellite loci using the multiplex sets and PCR conditions reported in Gillet et al. (2015), with slightly modified conditions for faeces samples, where PCRs were carried out in 10 μ l volume containing 0.15 of each 20 μ M primers, 7.5 μ l of Multiplex PCR kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and 5 μ l of DNA. Amplified DNA was analyzed for length variations on an ABI 3700 sequencer using GeneScan 500LIZ[®] size standard and alleles were scored with GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). In order to prevent genotyping errors in our dataset, consensus genotypes had to be constructed for faeces samples. For this, we used a modified multitube PCR approach (Taberlet et al., 1996) and we repeated four times each PCR. Scoring alleles were accepted if they appear at least three times out of the four PCRs.

Statistical analysis

The comparison of each replicate genotype with the consensus genotype was made to quantify the error rates and both the construction of the consensus genotype and the quantification of error rates such as false alleles (FA) and allelic dropouts (ADO) were performed using GIMLET v1.3.3 (Valiere, 2002). The probability of identity among siblings PIDsibs, i.e. the probability that two related individuals have the same genotype (Waits et al., 2001), was estimated using GIMLET v1.3.3. The program MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to estimate the proportion of null alleles (NA). Genetic diversity was assessed by estimating observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities with GENETIX (Belkhir et al., 2004) and the Hardy–Weinberg (HW) equilibrium was tested using the exact test implemented in GENEPOP 4.1.0 (Rousset, 2008) for each loci separately and over all loci for each cluster (see below). Tests for linkage disequilibrium between loci for each cluster were performed using GENEPOP 4.1.0. The allelic richness (AR) was calculated using the rarefaction procedure implemented in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Multi-locus F_{IS} was calculated for each cluster and adjusted for multiple tests using the Bonferroni's correction with FSTAT 2.9.3.2.

Population structure

STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard et al., 2000) was used to detect the presence of a potential genetic structure in our dataset. We used the model-based Bayesian clustering method, with no prior identification of populations, to infer the number of genetic clusters (K) and assign individuals to these clusters dependent on allele frequencies at each locus. For each value of K from 1 to 10, the program was run 10 times using an admixture model with a burn-in of 10^5 and MCMC values of 10^6 . The ΔK method (Evanno et al., 2005) was implemented with STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt, 2011) to find the most likely value of K present in the dataset and a visual output of the STRUCTURE results was generated using DISTRUCT (Rosenberg, 2003) and CLUMPAK (Kopelman et al., 2015).

ARLEQUIN (Excoffier et al., 2005) was used to estimate pairwise genetic differentiations among populations using F_{ST} statistics and the online SMOGD application (<http://www.ngcrawford.com/django/jost/>) was used to estimate Dest statistics (Jost, 2008) using 1,000 bootstrap replicates.

Isolation by distance (IBD) analyses among and within clusters defined with STRUCTURE 2.3.1 was performed with GENEPOP 4.1.2. The signal strength was estimated by calculating $D\sigma^2$ estimates (i.e. product of population density and axial mean square parent-offspring distance as defined by (Rousset, 1997)), according to $b = 1/(4\pi D\sigma^2)$. The value obtained ($D\sigma^2$) was inversely correlated with the IBD strength. The logarithm of the Euclidean distance on GPS coordinates was used to calculate the geographic distance and $\hat{a}r$ statistics were used to represent the genetic distance between pairs of individuals (Rousset, 2000). A Mantel's test with 10,000 permutations was used to test the significance of the correlation.

Finally, we used BOTTLENECK 1.2 (Cornuet and Luikart, 1996) to investigate recent demographic bottlenecks with estimations based on 1000 replications.

Demographic history

The evolutionary history of *G. pyrenaicus* in France was inferred using approximate Bayesian computation implemented the DIYABC 1.0.4.45beta software (Cornuet et al., 2010). This coalescent-based approach allows estimating the effective size population as well as the splitting time in generation of each tested genetic cluster. A number of biogeographic scenarios were tested and compared in order to find out whether the observed clusters originated from the fragmentation of an ancestral common population or if one resulted from an admixture of the others. We used the STRUCTURE results in order to choose appropriate

scenarios for our data. In addition, we tested our microsatellite data with the software POPULATIONS v1.2.3.1 (Langella, 2002) and took into account the two obtained genetic trees. Finally, based on these analyses, three populations were used and ten plausible scenarios were tested. Scenarios 1 to 6 displayed the same model: two consecutive divergences with a first divergence between two out of the three populations followed by the divergence of the third population from one of the two others, scenarios 7 to 9 displayed an admixture event between two populations leading to the formation of the third, and scenario 10 displayed a radiation process where the three populations would have split at the same time from a common ancestor (Figure 1). Two runs were performed; in the first one we considered all scenarios, whereas only scenarios having the highest posterior probabilities (PP) were considered in the second one. The distribution and range of priors for parameters used to describe these scenarios (effective population size, time of splitting or merging events, and admixture rates) are given in Table 1. A total of 10^7 and 2×10^6 data sets were simulated for each scenario in the first and second runs respectively in order to build a reference table from a set of prior parameters distributions. To check if the combination of these distributions of prior parameters and scenarios were able to generate datasets similar to the observed ones, a principal component analysis (PCA) was performed on the first 10^5 simulated data sets in the first run and on the first 2×10^5 data sets in the second run. To determine the most likely scenario, the normalized Euclidean distances between each simulated data set of the reference table and the observed data set was then computed and 1% of the closest simulated data sets were used to estimate the relative posterior probability (with 95% confidence intervals) of each scenario with a logistic regression (Cornuet et al., 2008). The most likely scenario was the one with the highest posterior probability with a non-overlapping 95% confidence interval.

In order to evaluate the level of confidence of these analyses, new data sets were simulated with each scenario and the same procedure for estimating their respective posterior probabilities was applied, and the proportion of times the right scenario has the highest posterior probability was measured. Following Cornuet et al. (2010), Type-I error was estimated for 10000 simulated data sets generated under the best-supported scenario. Type-II error was estimated by simulating 10000 data sets generated for each alternative scenario and counting decisions in favor of the selected scenario.

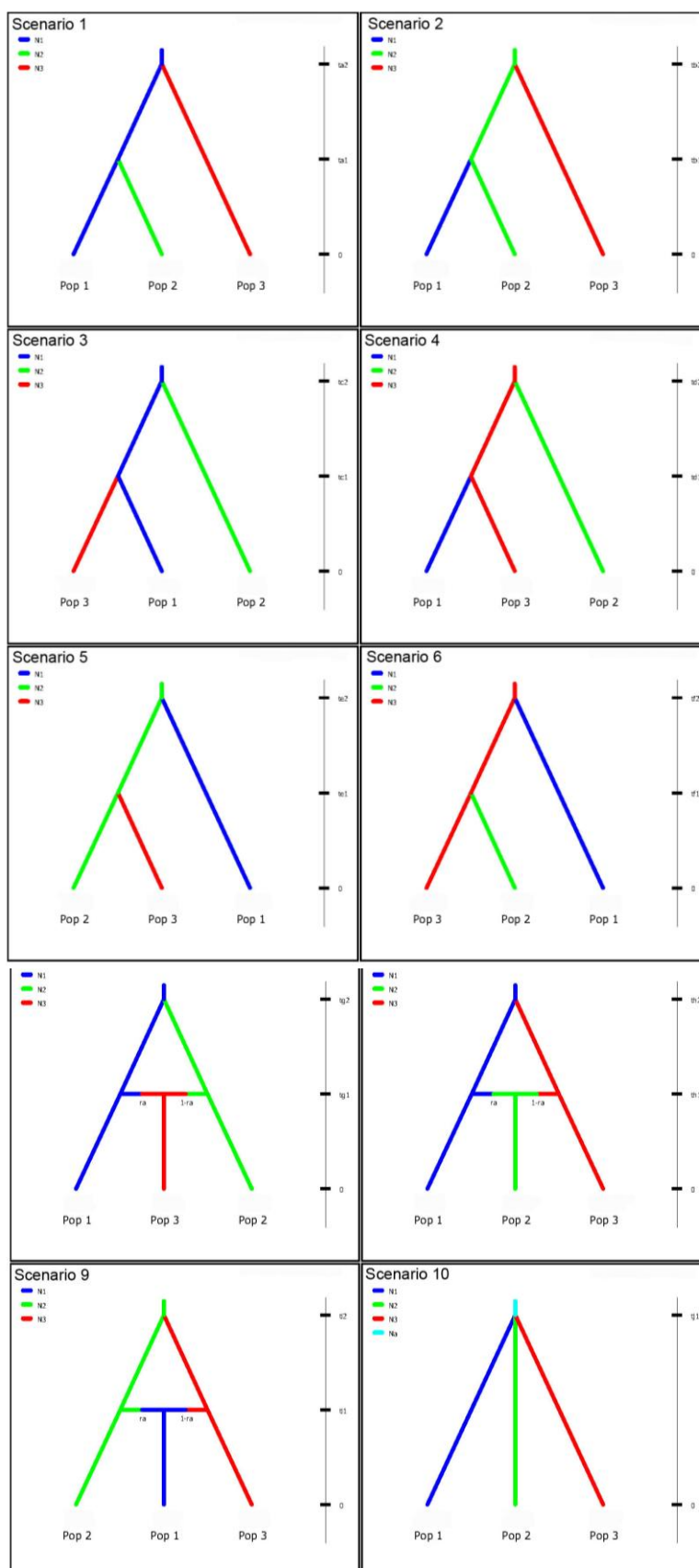


Figure 1. Schematic representations of the ten tested scenarios designed to test the origin of the three populations found in our study by Approximate Bayesian Computation (ABC) analysis. Definition of prior parameters are displayed in Table 1.

Table 1. Prior distribution of parameters used in our DIYABC analysis.

Parameter	Distribution	Min	Max
Effective population size			
N1, N2, N3, Na	Uniform	10	500
Time of events (in generation backward in time)			
Time conditions: ta2>ta1, tb2>tb1, tc2>tc1, td2>td1, te2>te1, tf2>tf1, tg2>tg1, th2>th1, ti2>ti1	Uniform	10	500
Admixture rate (ra)	Uniform	0.001	0.999
Microsatellites Mutation model parameters			
Mean mutation rate	Uniform	10^{-5}	10^{-3}
Mean coefficient p	Uniform	0.1	0.3
Mean SNI rate	Log-uniform	10^{-8}	10^{-4}

Different historical demographic events and genetic parameters were estimated with MIGRATE 3.4.4 (Beerli and Felsenstein, 1999, 2001; Beerli, 2004, 2006; Beerli and Palczewski, 2010), as well as interactions between clusters (i.e. migration rate (M)), and confidence intervals. This software is able to search through genealogies and to obtain estimates of theta (Θ) and M by employing a Metropolis-Hastings Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm and a likelihood ratio test respectively. It assumes a constant Θ for each population but a variable Θ between them (pairwise migration rate estimates).

MIGRATE 3.4.4 was used with default parameters firstly, with F_{ST} - based statistics of Θ and M , 10 short chains of 10,000 sampled genealogies and three long chains of 100,000 sampled genealogies. The parameter estimates of Θ and M from the previous run were used as starting values to perform a second analysis. The formula $xN_e m = M * \Theta$ was used to calculate the headcount of immigrants per generation, with x being the inheritance scalar, set at 4 for diploid species, N_e the effective population size, and m the mutation rate per generation and per locus.

Results

Microsatellite genotyping

A total of 70 individuals were identified out of the 355 analysed faeces samples with a PID (sibs) of $2.24e^{-03}$. The mean proportion of positive PCRs was 67%, ranging from 53% to 76% among loci (Appendix 1). No significant allelic dropout or false allele errors could be found in our data (all loci <0.001). MICRO-CHECKER did not detect any significant bias in our dataset that could be attributed to null alleles (Appendix 1). Therefore, the total number of individuals used in our analyses was 108.

Population structure and genetic diversity

After using the ΔK method on our STRUCTURE results, the highest ΔK value was found at $K=3$ (Figure 2). The first cluster (C) which appeared to have the largest geographic distribution (Figure 3) mainly includes samples from the Garonne watershed in the Central Pyrenees. The second cluster (E) mainly includes samples from the Tet – Tech – Aude watershed in the Eastern Pyrenees. Finally, the third cluster (W) mainly includes samples from the Adour – Nive watershed in the Western Pyrenees.

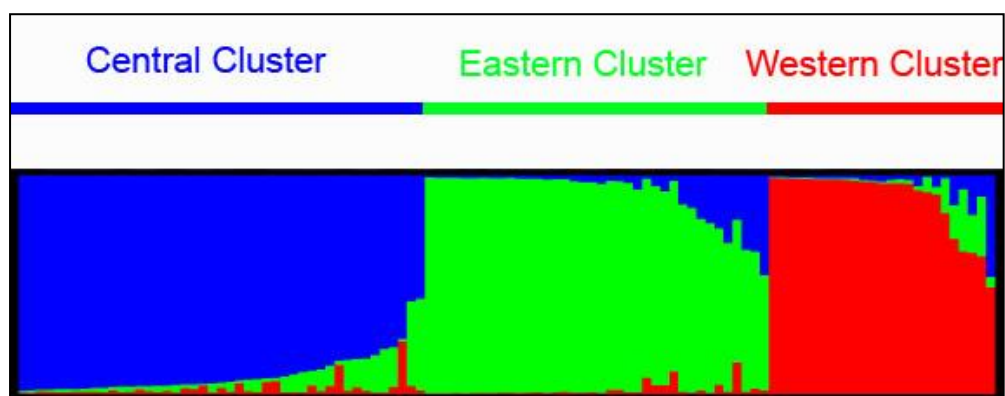


Figure 2. Population structure of Pyrenean desman in the French Pyrenees estimated using STRUCTURE ($K = 3$). Each individual is represented by a vertical line partitioned into K colours segments, the length of each colour being proportional to the estimated membership coefficient.

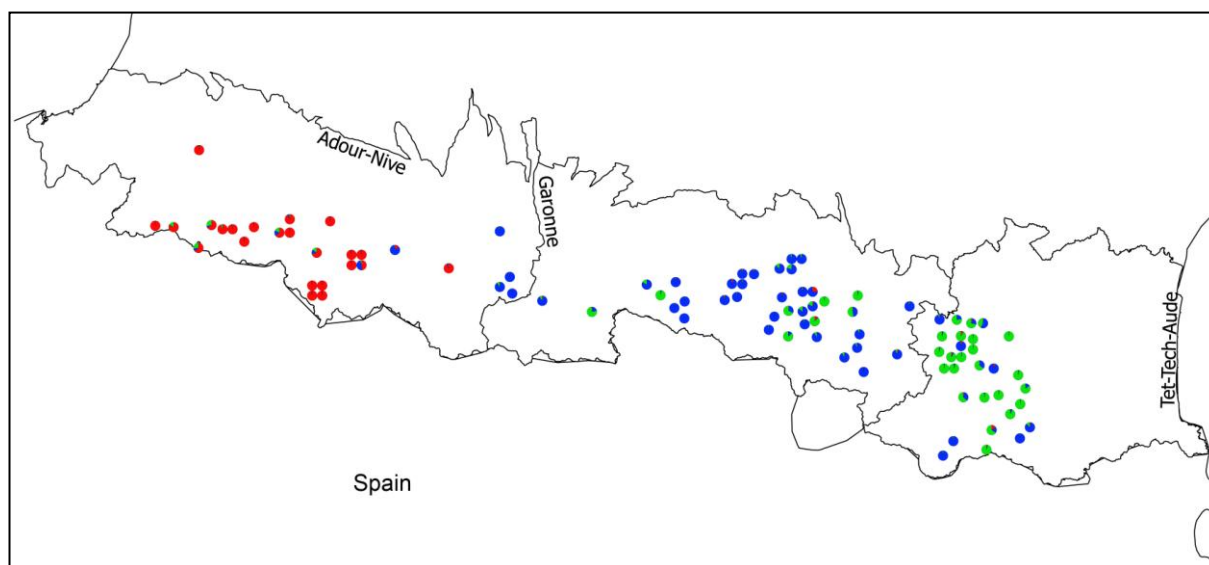


Figure 3. Geographic distribution of the three genetic clusters that were discovered among our data for the Pyrenean desman in the French Pyrenees. Each diagram represents one individual with its respective clusters assignments from STRUCTURE. The three main watersheds of the Pyrenees are represented on the map, from left to right: Adour – Nive, Garonne and Tet – Tech – Aude.

The mean H_O ranged from 0.19 in the Eastern cluster to 0.23 in the Central cluster and the mean H_E ranged from 0.26 in the Eastern cluster to 0.37 in the Western cluster. Mean allelic richness ranged from 1.4 to 1.8 (Table 2). Tests for HWE showed significant deviations for the Eastern and Western clusters. Four pairs of loci (GpyrGS22 vs GpyrGS33, GpyrGS30 vs GpyrGS74, GpyrGS33 vs GpyrGS18 and GpyrGS11 vs GpyrGS20) showed significant linkage disequilibrium for the Central cluster and one pair (GpyrGS33 vs GpyrGS82) for the Eastern cluster after Bonferroni's correction. The inbreeding coefficient (F_{IS}) was significant for all of the three clusters (Table 2) and the pairwise F_{ST} were significant between all of them (Table 3). Moreover, the results of the Wilcoxon test under a two-phase model (TPM) performed using the BOTTLENECK 1.2 software package indicated that both the central and eastern clusters undergone a recent bottleneck ($p < 0.001$).

Table 2. Overview of the genetic parameters at each main cluster of Pyrenean desman in the French Pyrenees. N: Number of samples, H_O : Mean observed heterozygosity, H_E : Mean expected heterozygosity, HWE: Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (significance level = 0.002), AR: Mean allelic richness, F_{IS} : Mean Inbreeding coefficient.

Clusters	N	H_O	H_E	HWE	AR	F_{IS}
Central	45	0.226	0.274	0.04	1.405	0.179
Eastern	38	0.189	0.258	<0.002	1.803	0.271
Western	25	0.216	0.368	<0.002	1.703	0.434

Table 3. F_{ST} (Above diagonal- ARLEQUIN software) and D_{EST} (Below diagonal- SMOGD software) for the 3 main clusters ($p < 0.05$).

Clusters	Central	Eastern	Western
Central	-	0.288	0.203
Eastern	0.037	-	0.345
Western	0.013	0.084	-

As no significant null alleles proportions were found among our data, the high values of F_{IS} , especially in the Western cluster (Table 2), could also indicate a Wahlund effect occurring in the genetic clusters. In order to investigate this possibility, we conducted an additional clustering analysis within each cluster, with the same conditions as previously described. Analyses for clusters C and E did not give any conclusive results while the analysis for cluster W supported the existence of three sub-clusters (Figure 4). This sub-structuring could explain the higher value of the inbreeding coefficient (0.434) in the Western cluster even if these sub-clusters did not seem to exhibit any clear geographical distribution (Figure 5).

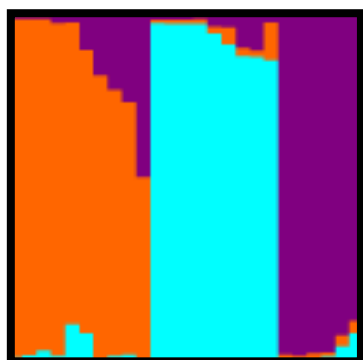


Figure 4. Population structure estimated in the Western cluster of Pyrenean desman in the French Pyrenees using STRUCTURE (K=3). Each individual is represented by a vertical line partitioned into K colour segments, the length of each colour being proportional to the estimated membership coefficient.

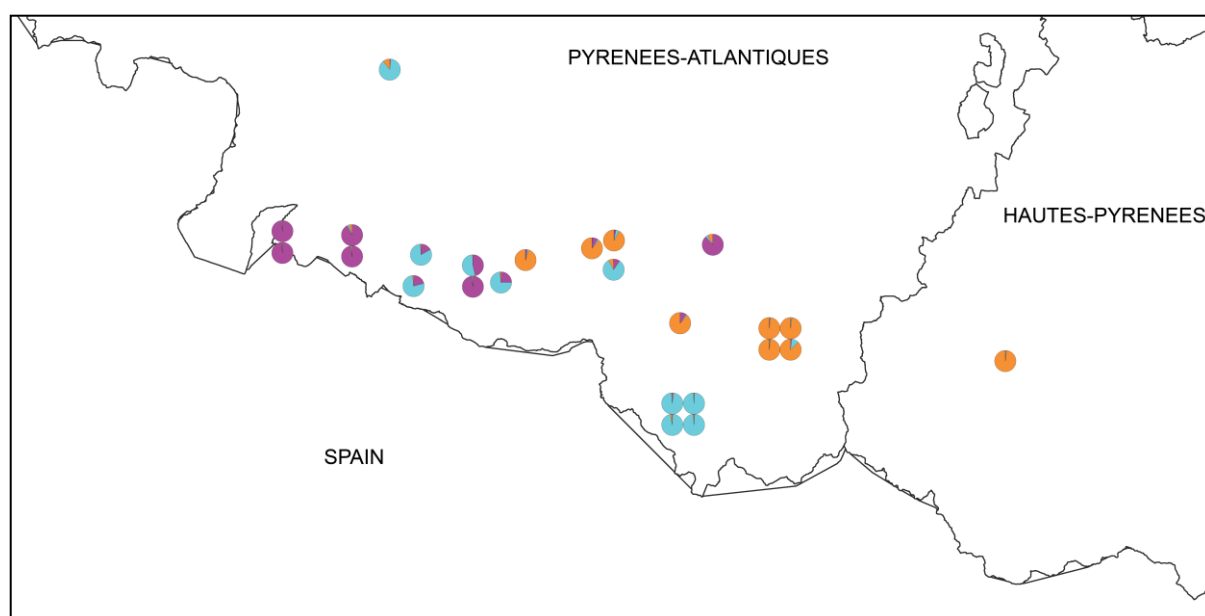


Figure 5. Geographic distribution of the three Pyrenean desman clusters identified in the Western French Pyrenees. Each diagram represents one individual with its respective clusters assignments from STRUCTURE.

IBD analyses indicated an absence of isolation by distance among clusters and within the clusters E and W. In contrast, a significant signal was observed within the cluster C (Mantel test $p < 0.05$) as indicated by the relatively low $D\sigma^2$ value (0.44). However, the slight regression slope indicated that the genetic distance between pairs of individuals was weakly correlated with the geographic distance between them ($r^2 = 0.05$). The absence of significant signal among the three clusters showed that their existence was not driven by the geographic distance.

Demographic history

After using DIYABC software on 10 distinct demographic scenarios (Figure 1) a second analysis was performed on the most two probable scenarios (presenting the highest posterior probabilities) obtained in the first run. These two scenarios (scenario 2 and 9, Figure 6) exhibited two different evolutionary demographic patterns. Scenario 2 described the separation of cluster W from more Eastern Pyrenean desmans followed by the separation of cluster C from cluster E. In contrast, scenario 9 described the origination of the central cluster following a merging event of the other two clusters. The logistic regressions performed on 1% of the closest simulated datasets revealed that the most likely of all tested scenarios was scenario 2, with a PP of 0.582 and a confidence interval (95 CI) of 0.475–0.689. However, the confidence interval of scenarios 2 and 9 were overlapping (PP of 0.418 and 95CI of 0.310–0.525). Analysis of confidence in scenario 2 resulted in type I and type II errors of 0.266 and 0.238 respectively and inversely for scenario 9. Therefore, the two scenarios have a similar probability of being rightly chosen, with scenario 2 having a slight better probability (76.2%) than scenario 9 (73.4%). However, the divergence times (t_{2a} , t_{2b} , t_{9a} and t_{9b}) and effective population size estimates (N_C , N_E and N_W) were all within the same order of magnitude when comparing the posterior distribution of parameters of the two scenarios (Figure 6). Assuming a minimum generation time of 1 year, median divergence times t_{2a} and t_{2b} of scenario 2 were estimated at 80 (95% CI: [25 – 190]) and 230 years ago (95% CI : [80 – 440]), respectively. For scenario 9, median admixture and divergence times t_{9a} and t_{9b} were estimated at 60 (95% CI: [18 – 160]) and 240 years ago (95% CI: [80 – 450]), respectively (Figure 6). The effective population size estimates for cluster C, E and W reached a mean of 370 (95% CI:[90 – 490]), 100 (95% CI:[30 – 220]) and 330 (95% CI:[140 – 480]) individuals respectively for scenario 2 and 290 (95% CI:[100 – 470]), 100 (95% CI:[30 – 220]) and 320 (95% CI:[130 – 480]) respectively for scenario 9 (Figure 6).

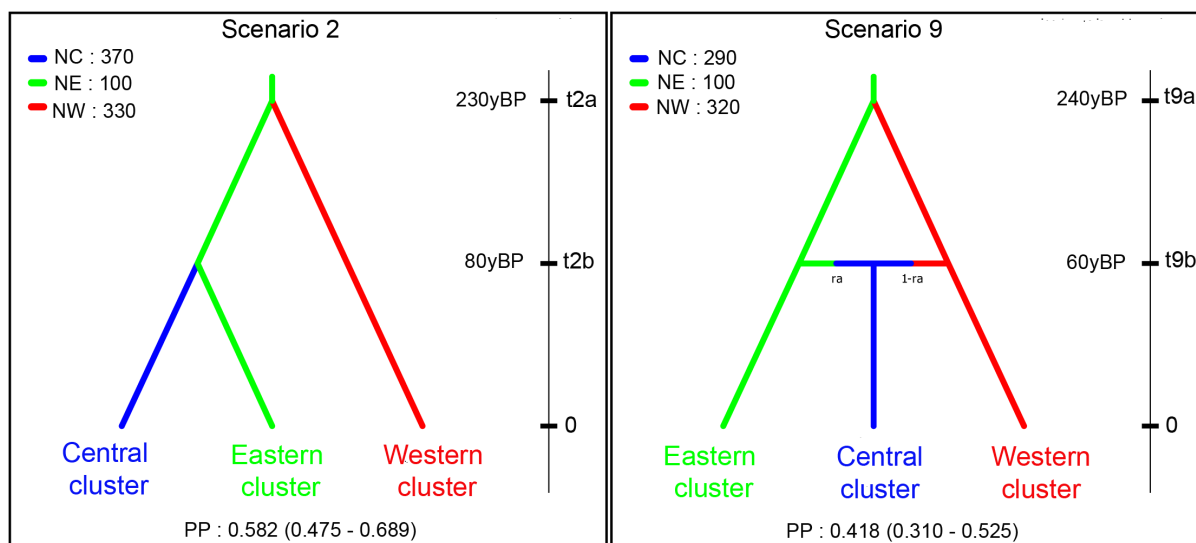


Figure 6. Schematic representations of the two most likely scenarios of population structuring of the Pyrenean desman in the French Pyrenees using DIYABC.

We also conducted another DIYABC analysis on the three Western smaller clusters with the same scenarios that for the three main clusters and slightly modified conditions (effective population sizes and time of events set at max. 300). After the first run with ten scenarios, two were standing out and thus a second run with these two scenarios was launched. Finally, the software unambiguously chose one scenario from the two with a PP of 0.585 (95CI of 0.565 – 0.605). This scenario displayed the same evolutionary demographic pattern as scenarios 1 to 6 from Figure 1. The median times of divergence among these clusters were quite similar to those found for the three main groups (100 and 200 years ago). Mean effective population sizes were estimated at 185, 160 and 120 individuals.

MIGRATE 3.4.4 was used on the three main clusters to calculate the migration rate per generation according to $N_e m = (M_{ij} * \Theta_j) / 4$, with $\Theta_C = 2.86$, $\Theta_E = 1.14$, $\Theta_W = 1.14$ and $M_{EC} = 0.83$, $M_{WC} = 0.46$, $M_{CE} = 1.38$, $M_{WE} = 0.39$, $M_{CW} = 0.84$, $M_{EW} = 0.87$. The effective number of migrants per generation among clusters was low, with less than one migrant per generation (1 year) with $Nm_{EC} = 0.59$, $Nm_{WC} = 0.32$, $Nm_{CE} = 0.39$, $Nm_{WE} = 0.11$, $Nm_{CW} = 0.24$ and $Nm_{EW} = 0.25$.

Discussion

The present study provides new insights concerning the genetic structure of the Pyrenean desman populations in the French Pyrenees. The exhaustive sampling, covering the entire current distribution area of the Pyrenean desman in the French slope of the Pyrenees, and the use of 24 highly sensitive microsatellite markers ensured robust analytical findings. However, the results of the genotyping of faeces samples were highly dependent on the faeces freshness and size at the time of collecting as Pyrenean desman faeces are generally small (10 to 15 mm long and 4 to 8 mm wide (Bertrand, 1993)) and the DNA in them is rapidly degrading due to the contact with water and the UV radiation (Lindahl, 1993). Indeed, in our study only 20% of the collected faeces could be attributed to distinct individuals. The percentage of detected individuals is also tributary of the threshold rule of the conservative multitube approach that we used as scoring alleles were accepted if they appear at least three times out of the four PCRs. Nonetheless this step is necessary to ensure reliable results.

Population structure and evolutionary history of the French Pyrenean desman

The results evidenced three genetically and geographically distinct clusters (Figure 3), situated in Eastern, (E), Central (C) and Western (W) French Pyrenees, respectively. In addition, a sub-structuring seemed to appear for cluster W where three sub-clusters were evidenced. These sub-clusters did not seem to exhibit any clear geographical distribution but this would probably be the result of the low sampling within each sub-cluster (from six to ten individuals). A more extensive sampling in this area is needed to better define this substructure.

This complex genetic structure was not suspected by the study of Igea et al. (2013), which suggested the existence of a single Pyrenean population that would have colonized recently the Pyrenean region from a putative refuge situated in the Basque Mountains after a severe bottleneck event. This hypothesis was deduced from very low levels of genetic diversity found in both sequences of mitochondrial and nuclear (intron) markers in this region. Our microsatellites markers, characterized by higher mutation rates than mitochondrial or nuclear intronic sequences (Schlötterer, 2000), allowed to highlight a finer genetic structure for the Pyrenean desman.

The only other vertebrate species having a similar reported genetic structure across the French Pyrenees is a bird species, the rock ptarmigan (*Lagopus muta*) (Bech et al., 2009). The genetic structure of this species was associated with a significant isolation-by-distance effect,

that is likely the result of short dispersal distances, and high natal and breeding philopatry coupled with severe habitat fragmentation.

As no isolation by distance (IBD) was evidenced, the structure supported by our study is probably the result of concomitant anthropogenic and environmental factors. The DIYABC analysis proposed that clusters C and E diverged about 80 years ago, from an ancestral population, itself having diverged from the W cluster approximately 230 years ago, or that cluster C is a result of an admixture event between clusters E and W that occurred about 60-80 years ago, after clusters E and W diverged about 230-240 years ago. However these estimations might be underestimated given that the software algorithm does not assume migration within scenario events. Moreover, these estimations were performed considering one year as a minimum generation time even though this information is not known for the Pyrenean desman and could be higher. Indeed, as *G. pyrenaicus* belongs to the Talpidae family, if we extrapolate the generation time of the Pyrenean desman from the generation time of the European mole (*Talpa europea*) (1.72, (Niethammer, 1990)), the estimations of divergence times become 400 years ago for the separation of the E and W clusters and 100 – 140 years ago for the divergence of C and E (or the admixture of E and W in the second scenario).

The human population growth during the last century and therefore, the increase of human impact on nature, have inevitably led to the riverine habitat loss and fragmentation for species occupying mountain streams. An example of the human impact on rivers is the construction and the functioning of hydroelectric power plants. These can lead to physical and biotic modifications and they can alter both hydrologic and thermal regimes, impacting macro invertebrates benthonic larvae resources (Queiroz et al., 1992; Céréghino and Lavandier, 1997). Although weak information is available for the Pyrenean desman, these detrimental effects have been studied and highlighted by various authors on mammals and birds (Nilsson and Dynesius, 1994; D'Amico et al., 2000). Furthermore, the development of such infrastructures dates back to the beginning of the 20th century in the French Pyrenees, and most of them were built between 1930 and 1960. These dates could therefore coincide with the apparition of the third population found in this study (60-80 years ago). However, more focused studies on the influence of these infrastructures on the distribution of the Pyrenean desman, should be developed in order to confirm or infirm this hypothesis.

Local climatic changes could also have played a role in the structuring of the populations of Pyrenean desmans during the last centuries, notably during the last 100 years of the Little Ice Age (LIA) (1750-1850). The lower temperatures in high altitude could have induced a shifting of Pyrenean desmans towards lower altitudes. This shifting could have favoured the use of habitats at these lower altitudes where the watersheds are more separated which could therefore have restricted dispersal. Indeed, this species favours rivers with high water flows, which are now found in high altitudes (Nores et al., 1992; Ramalhinho and Boa Vida, 1993; Queiroz et al., 1996; Charbonnel et al., 2015).

Genetic diversity of the Pyrenean desman populations

All three main clusters seem characterized by a signal of inbreeding depression, as evidenced by similar and relatively low values of heterozygosity (around 0.2) and significant high values of the F_{IS} index (Table 2). These data would be associated to recent bottleneck events, at least for clusters C and E, as confirmed by the results of the BOTTLENECK 1.2 analysis.

The very high value of the inbreeding coefficient in the Western cluster could also be explained by a Wahlund effect as three sub-clusters were found in this population. As for the three main populations, both the impact of anthropogenic and climatic factors (notably during the Little Ice Age) could explain the structure observed for the three sub-clusters. This isolation of populations could have also been faster in the Western part of the Pyrenees as it is characterized by a smaller proportion of favorable habitat compared to the more Eastern part (Charbonnel, 2015). However, the effective population sizes given by the DIYABC software are opposed to this gradient of favorable habitat, with a higher value in the Western than in the Eastern population. The sub-structure in the Western population could bias the estimation of the effective population size.

Gene flows seem limited among the three main clusters, as evidenced by pairwise F_{ST} values significantly higher than zero and situated between 0.345 (between the W and E cluster) and 0.203 (between the C and W clusters). This tendency is also evidenced using the Dest index (Table 3).

Despite this apparent reduced gene flow between clusters, they are not geographically separated and they overlap in some areas (Figure 3). Moreover, results of the cluster assignments with STRUCTURE clearly show that some individuals share alleles from different clusters. This result is particularly observed between the E and C clusters (Figure 3)

where migrations seem to occur every two or three generations. Although this result could be seen as a recent expansion process in other species, such as the otter (Janssens et al. 2008, Pigneur et al., 2014), the general regression of the distribution area of the Pyrenean desman in the last decades do not allow us to retain this hypothesis. However, this overlapping of clusters could confirm that the genetic of Pyrenean desman seems to be poorly influenced by the river networks (Igea et al., 2013) and that its dispersal could be complex, as it has been pointed out by Stone (1987a; 1987b), Melero et al. (2012; 2014) and Gillet et al. (2015c). Our migration rate estimations tend also to confirm a certain level of movement and recent gene flow among clusters.

Finally, some individuals could also be coming from the Spanish side, particularly the two individuals colored in green in the central cluster (Figure 3) which could have come by passage through the Val d'Aran. The sampling of the Spanish slope of the Pyrenees could provide useful information for a better understanding of this genetic structure. It could reveal whether there is some gene flow across the mountains, as it is the case for the lizard *Zootoca vivipara* (Milá et al., 2013).

Implications for conservation of the Pyrenean desman in the French Pyrenees

Classified as “Vulnerable” in the IUCN Red List (Fernandes et al., 2008), the Pyrenean desman is legally protected in France and is the focus of a LIFE + project (LIFE13NAT/FR/000092) following a National Action Plan (Némoz and Bertrand, 2008). This species has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades, particularly in France where its range still needs some further investigations (Némoz and Bertrand, 2008). The low level of genetic diversity observed in the different French Pyrenean desman clusters as well as the high values of the inbreeding coefficient (F_{is}) and relatively low effective population sizes within them, strongly suggest a signal of inbreeding depression. This pattern would probably increase the risk of extinction for this species (Frankham, 2005).

As the Pyrenean desman seems to suffer an apparent lack of genetic diversity among all three main populations, a better connectivity along the Pyrenees should be encouraged in order to facilitate the dispersion of populations. This would favor genetic mixing leading to a decrease of inbreeding depression risks and a better response to unforeseen future climatic changes. These exchanges between neighbouring watersheds should be favoured by improving water quality, mainly at lower altitudes where rivers merge. A better management of hydroelectric

infrastructures, and of winter tourism at high altitudes, should be promoted in the whole chain.

Another improvement could be done by increasing water flow in rivers impoverished in trophic resources or by restoring suitable habitats for the Pyrenean desman notably by placing artificial blocks in the river to recreate adequate water flows and shelters. Connectivity between main and tributary rivers should also be favoured as tributary rivers can be used as refugium in case of short and sudden hydrological events (Lake, 2000; Charbonnel, 2015).

Conclusion

The present study highlighted a fine scale genetic structure for the Pyrenean desman in the French Pyrenees, including three distinct clusters geographically spread across the whole range of the species. This structure seemed to have appeared during the last 200 years, probably under the effect of concomitant human and environmental factors. Low levels of genetic diversity were found for all three clusters as well as high inbreeding coefficient (F_{IS}) and high F_{ST} values among clusters. This would probably be the result of recent bottleneck events, which could increase the risk of inbreeding depression for these populations, especially in the western one. However, populations seem to have exchanged alleles recently, which could lead to an improvement of the genetic diversity of the species. This result also suggests a greater dispersal potential than previously accepted for this species. Therefore, connectivity between watersheds should be promoted in order to ensure a certain level of genetic diversity and to potentially improve the long-term survival of the Pyrenean desman in France. Although this study gave a new insight at the fine scale genetic structure of the Pyrenean desman in France, a larger study, based on sensitive genetic markers like microsatellites or SNP's, and comprising the whole range of the species, particularly the Spanish side of the Pyrenees, is necessary to improve the global knowledge of this threatened species and its worldwide conservation.

Acknowledgments

We thank the following people who collected tissue samples: EDF agents, Pyrenees National Park agents, M. Bayon, A. Bertrand, J-P. Besson, J-P. Quéré, A. Charbonnel, F. Elzear, L. Fabre, P. Fantin, B. Le Roux, V. Lacaze, M. Lagardère, F. Lassère, B. Le Corre, M. Mas, P. Maunas, G. Nogué, F. Prud'Homme, T. Quintilla, B. Salmeron, T. Tico, S. Torreilles and S. Vernet

We thank the following organisations who collected faeces samples: Association des Naturalistes de l'Ariège, Conservatoire d'Espaces Naturels d'Aquitaine, Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, Fédération Aude Claire, Fédération des Réserves Naturelles Catalanes, Groupe de Recherche et d'Etude pour la Gestion de l'Environnement, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Office National des Forêts, Parc National des Pyrénées.

This study is part of the “Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées” and the LIFE+ Desman (LIFE13NAT/FR/000092) which are coordinated by the Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées (CEN-MP) and are financially supported by the following structures: European Union Funding Network (ERDF and LIFE+), Agence de l'eau Adour-Garonne, Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, DREAL Aquitaine, Midi-Pyrénées, and Languedoc-Roussillon, Conseil Régional Aquitaine, Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l'Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEM, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). F. Gillet is supported by a French research fellowship provided by the ANRT (CIFRE N° 2011/1571).

References

- Bech, N., Boissier, J., Drovetski, S., Novoa, C., 2009. Population genetic structure of rock ptarmigan in the “sky islands” of French Pyrenees: Implications for conservation. *Anim. Conserv.* 12, 138–146. doi:10.1111/j.1469-1795.2008.00233.x
- Beerli, P., 2006. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22, 341–5. doi:10.1093/bioinformatics/bti803
- Beerli, P., 2004. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Mol. Ecol.* 13, 827–836. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02101.x
- Beerli, P., Felsenstein, J., 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4563–4568.
- Beerli, P., Felsenstein, J., 1999. Maximum-Likelihood Estimation of Migration Rates and Effective Population Numbers in Two Populations Using a Coalescent Approach. *Genetics* 152, 763–73.
- Beerli, P., Palczewski, M., 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics* 185, 313–26. doi:10.1534/genetics.109.112532

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.
- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire de desman des pyrénées *G. pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse, 217p.
- Bertrand, A., 1993. Découvrir le Desman des Pyrénées, Ed. A.N.A., 32 p.
- Céréghino, R., Lavandier, P., 1997. Influence des éclusées hydroélectriques sur la distribution et le développement larvaire des Diptères Simuliidae d'une rivière de moyenne montagne. Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie. doi:10.1016/S0764-4469(97)82775-8
- Charbonnel, A., 2015. Multi-scale influence of environmental factors in the distribution of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in France. PhD thesis, University of Toulouse, 245p.
- Charbonnel, A., Buisson, L., Biffi, M., D'Amico, F., Besnard, A., Aulagnier, S., Blanc, F., Gillet, F., Lacaze, V., Michaux, J.R., Némoz, M., Pagé, C., Sanchez-Perez, J.M., Sauvage, S., Laffaille, P., 2015. Integrating hydrological features and genetically validated occurrence data in occupancy modelling of an endemic and endangered semi-aquatic mammal, *Galemys pyrenaicus*, in a Pyrenean catchment. *Biol. Conserv.* 184, 182–192. doi:10.1016/j.biocon.2015.01.019
- Cornuet, J., Ravigné, V., Estoup, A., 2010. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1 . 0). *BMC Bioinformatics* 11, 401.
- Cornuet, J.-M., Luikart, G., 1996. Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics* 144, 2001–14.
- Cornuet, J.-M., Santos, F., Beaumont, M. a, Robert, C.P., Marin, J.-M., Balding, D.J., Guillemaud, T., Estoup, A., 2008. Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24, 2713–9. doi:10.1093/bioinformatics/btn514
- Coster, S.S., Kovach, A.I., 2012. Anthropogenic influences on the spatial genetic structure of black bears. *Conserv. Genet.* 13, 1247–1257. doi:10.1007/s10592-012-0368-4
- D'Amico, F., Manel, S., Mouches, C., Ormerod, S.J., 2000. River birds in regulated rivers : cost or benefit ? *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27, 167–170.
- Earl, D. a., vonHoldt, B.M., 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–20. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3 . 0): An integrated software package for population genetics data analysis 47–50.
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. IUCN Red List Threat. Species. Version 2013.2.
- Fournier, M., Mesquita, J., Mangin, A., 2010. Evaluation scientifique de l'impact de l'hydroélectricité dans le Parc naturel régional des Pyrénées ariégeoises. 163p.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126, 131–140.
doi:10.1016/j.biocon.2005.05.002
- Frankham, R., 2003. Genetics and conservation biology. *C. R. Biol.* 326, S22–S29.
doi:10.1016/s1631-0691(03)00023-4
- Gerlach, G., Musolf, K., 2000. Fragmentation of Landscape as a Cause for Genetic Subdivision in Bank Voles 14, 1066–1074.
- Gillet, F., Cabria, M.T., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Némoz, M., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015a. In prep. Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers in the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus*.
- Gillet, F., Cabria, M.T., Némoz, M., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015b. In press. PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA. *Mammalia*. doi:10.1515/mammalia-2014-0093
- Gillet, F., Le Roux, B., Blanc, F., Bodo, A., Fournier-Chambrillon, C., Fournier, P., Jacob, F., Lacaze, V., Némoz, M., Aulagnier, Stéphane Michaux, J.R., 2015c. In Prep. Genetic monitoring of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the Aude river, France.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Igea, J., Aymerich, P., Fernández-González, A., González-Esteban, J., Gómez, A., Alonso, R., Gosálbez, J., Castresana, J., 2013. Phylogeography and postglacial expansion of the endangered semi-aquatic mammal *Galemys pyrenaicus*. *BMC Evol. Biol.* 13, 115.
doi:10.1186/1471-2148-13-115
- Janssens, X., Fontaine, M.C., Michaux, J.R., Libois, R., de Kermabon, J., Defourny, P., Baret, P. V., 2008. Genetic pattern of the recent recovery of European otters in southern France. *Ecography (Cop.)*. 31, 176–186. doi:10.1111/j.0906-7590.2008.4936.x
- Jost, L., 2008. G ST and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17, 4015–4026. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x

- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. a, Mayrose, I., 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* doi:10.1111/1755-0998.12387
- Lake, P.S., 2000. Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J.North Am. Benthol.Soc.* 19, 573–592.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–15. doi:10.1038/362709a0
- Melero, Y., Aymerich, P., Luque-Larena, J.J., Gosàlbez, J., 2012. New insights into social and space use behaviour of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 58, 185–193. doi:10.1007/s10344-011-0561-7
- Melero, Y., Aymerich, P., Santulli, G., Gosàlbez, J., 2014. Activity and space patterns of Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) suggest non-aggressive and non-territorial behaviour. *Eur. J. Wildl. Res.* 60, 707–715. doi:10.1007/s10344-014-0838-8
- Milá, B., Surget-Groba, Y., Heulin, B., Gosá, A., Fitze, P.S., 2013. Multilocus phylogeography of the common lizard *Zootoca vivipara* at the Ibero-Pyrenean suture zone reveals lowland barriers and high-elevation introgression. *BMC Evol. Biol.* 13, 192. doi:10.1186/1471-2148-13-192
- Mona, S., Ray, N., Arenas, M., Excoffier, L., 2014. Genetic consequences of habitat fragmentation during a range expansion. *Heredity (Edinb.)* 112, 291–9. doi:10.1038/hdy.2013.105
- Némoz, M., Bertrand, A., 2008. Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*), 2009-2014. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères / Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, 1.
- Niethammer, J., 1990. *Talpa europaea* Linnaeus, 1758 - Maulwurf. in: *Handbuch der Säugetiere Europas. Band 3/I: Insektenfresser - Insectivora, Herrentier - Primates.* AULA-Verlag, Wiesbaden, p. 99-133.
- Nilsson, C., Dynesius, M., 1994. Ecological effects of river regulation on mammals and birds: A review. *Regul. Rivers Res. Manag.* 9, 45–53. doi:10.1002/rrr.3450090105
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., Gonzalez, J., 1992. Aproximación a la metodología y estudio del área de distribución, estatus de población y selección de hábitat del desmán (*Galemys pyrenaicus*) en la Península Ibérica. Ministerio de Medio Ambiente, Oviedo.
- Nores, C., Queiroz, A.I., Gisbert, J., 2007. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811)., in: Palomo, L., Gisbert, J., Blanco, J. (Eds.), *Atlas Y Libro Rojo de Los Mamíferos Terrestres de España.* Madrid: Dirección General para la Biodiversidad - SECEM - SECEMU, pp. 92–98.
- Palmeirim, J.M., Hoffmann, S.H., 1983. *Galemys pyrenaicus*. *Mamm. Species* 207, 1–5.

- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.
- Queiroz, A.I., 1999. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). in: A.J. Mitchell-Jones et al. (eds) : The atlas of European Mammals. Poyser Nat. Hist., Academic Press, London, 78-79.
- Queiroz, A.I., Alves, M.H., Almada, V., 1992. The small hydroplants : predicted impacts on the Pyrenean desman populations (*Galemys pyrenaicus*. Geoffroy)., in: Proceeding Meeting on the Pyrenean Desman. Lisboa, pp. 69–77.
- Queiroz, A.I., Bertrand, A., Khakhin, G., 1996. Status and conservation of Desmaninae in Europe. Council of Europe, Strasbourg.
- Ramalhinho, M.G., Boa Vida, M.J., 1993. Habitat of the Pyrenean Desman: assessment of running water quality. Monitoring pollution. In: Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman, Lisbon, pp. 63–67.
- Richard, P.B., 1986. Les Desman des Pyrénées , un mammifère inconnu à découvrir. Science et Découvertes, Ed. Le Rocher, Monaco : 118 p.
- Rosenberg, N. a., 2003. Distruct: a Program for the Graphical Display of Population Structure. Mol. Ecol. Notes 4, 137–138. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Rousset, F., 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resour. 8, 103–6. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Rousset, F., 2000. Genetic differentiation between individuals 13, 58–62.
- Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics 145, 1219–1228.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma 109, 365–371. doi:10.1007/s004120000089
- Stone, R.D., 1987a. The social ecology of the Pyrenean desman as revealed by radiotracking. J. Zool. 212, 117–129.
- Stone, R.D., 1987b. The activity pattern of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) (Insectivora : Talpidae), as determined under natural condition. J. Zool. London 213, 95–106.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Res. 24, 3189–94.
- Valiere, N., 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. Mol. Ecol. Notes 2, 377–379. doi:10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Waits, L.P., Luikart, G., Taberlet, P., 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.* 10, 249–56.

Appendix 1. Null allele frequency (NAF) and rates of positive PCR (PCR+).

Locus	NAF	PCR+
GpyrGS06	0.19	0.63
GpyrGS07	0.19	0.65
GpyrGS10	0.10	0.69
GpyrGS11	0.08	0.53
GpyrGS12	0.00	0.67
GpyrGS13	0.13	0.74
GpyrGS18	0.16	0.62
GpyrGS20	0.00	0.67
GpyrGS22	0.14	0.66
GpyrGS23	0.04	0.68
GpyrGS30	0.17	0.73
GpyrGS32	0.20	0.69
GpyrGS33	0.06	0.69
GpyrGS34	0.00	0.6
GpyrGS41	0.01	0.73
GpyrGS46	0.00	0.74
GpyrGS47	0.00	0.76
GpyrGS53	0.15	0.54
GpyrGS55	0.15	0.63
GpyrGS74	0.14	0.7
GpyrGS75	0.14	0.73
GpyrGS80	0.20	0.67
GpyrGS82	0.18	0.65
GpyrGS94	0.19	0.6

Article 5

Using a complete molecular diet analysis and biotraits of prey community to refine a predator habitat selection. The case of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*)

François Gillet, Marjorie Biffi, Marie-Laure Tiouchichine, Fanny Colas, Frank D'Amico, Maxime Galan, Frédéric Blanc, Mélanie Némoz, Stéphane Aulagnier, Laëtitia Buisson, Pascal Laffaille, Johan R. Michaux

Résumé

La compréhension de la distribution des espèces et de leurs exigences écologiques, est d'un intérêt particulier en biologie de la conservation. Les signes indirects, tels que les fèces ou les poils, sont couramment utilisés comme indicateurs de la présence d'espèces pour lesquelles les observations sont difficiles (espèces rares ou discrètes, effort d'échantillonnage limité etc., (Rushton et al. 2004)), surtout lorsqu'ils peuvent être récoltés rapidement, facilement et à bas coût. Cependant, la détection de signes indirects de présence à un site n'est pas nécessairement liée à l'utilisation d'une ressource (nourriture ou abri), car celui-ci peut être une zone de passage ou un site de marquage territorial. Par conséquent, les inférences sur la sélection de l'habitat à une échelle plus fine peuvent être biaisées si la localisation de signes indirects de présence est considérée comme un site régulièrement utilisé ou approprié pour l'espèce. Les mesures de conservation qui reposeraient sur ces hypothèses pourraient alors ne plus être optimales.

Néanmoins, les signes indirects de présence restent une mine d'informations sur l'écologie des espèces et les interactions trophiques. Les développements récents des techniques moléculaires ont permis d'étudier le régime alimentaire d'espèces à partir de fragments d'ADN contenus dans leurs fèces (Valentini et al. 2009). Ces méthodes ont été utilisées pour une grande variété de types de régime alimentaire (carnivore, Shehzad et al. 2012; herbivore, Soinen et al. 2009; insectivore, Zeale et al. 2011).

Les approches basées sur les traits fonctionnels des proies peuvent contribuer de manière significative à une meilleure évaluation du type d'environnement dans lequel elles vivent (Feio et al. 2010). Elles sont maintenant largement utilisées dans des études allant du niveau de l'animal au niveau de l'écosystème, dans des environnements terrestres (Violle et al. 2007)

ou aquatiques. Etant donné que les caractéristiques des espèces sont supposées être sélectionnées par les conditions environnementales, elles peuvent expliquer la distribution locale des organismes et peuvent être considérés comme des indicateurs environnementaux (Usseglio-Polatera et al. 2000). À notre connaissance, les approches fondées sur les traits fonctionnels n'ont jamais été utilisées pour étudier la distribution des prédateurs, ou pour affiner leur sélection de l'habitat par la connaissance de leurs zones de chasse.

Pour illustrer cette nouvelle approche, cette étude a été concentrée sur le desman des Pyrénées. Bénéficiant du développement récent de méthodes génétiques permettant d'identifier de manière fiable les fèces de cette espèce (**articles 1 et 3**), plusieurs études ont cherché à définir la sélection de l'habitat de son habitat avec la description des variables environnementales sur les sites où les fèces ont été prélevées (Biffi et al., 2015; Charbonnel et al., 2015). Dernièrement, une méthode moléculaire, basée sur le métabarcoding de l'ADN et en utilisant le séquençage de nouvelle génération, a été développé pour identifier les proies au niveau du genre et de l'espèce dans les fèces de desman des Pyrénées (**article 3**). Cette méthode identifia plusieurs espèces de macroinvertébrés comme étant les principales proies du desman des Pyrénées, coïncidant avec les résultats antérieurs obtenus à partir des méthodes traditionnelles (identification morphologique du contenu des voies digestives des animaux piégés ou de fragments de proies digérées dans les fèces) (Trutat, 1891; Puisségur, 1935; Richard & Vallette Vialard, 1969; Santamarina & Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994; Castién & Gosálbez, 1995; Fernández-salvador et al., 1998).

Un effort croissant a été consacré à définir les biotraits des invertébrés aquatiques décrivant les caractéristiques biologiques (cycle de vie, reproduction, nutrition, etc.) et écologiques des taxons (par exemple, les caractéristiques spatiales et physiques de l'habitat utilisé) (Usseglio-Polatera et al. 2000). Ces biotraits ont notamment été utilisés pour évaluer de multiples perturbations, qu'elles soient chimiques (Colas et al. 2012, 2013), hydrauliques (Griswold et al. 2008) ou organiques (Charvet et al. 2001), sur les systèmes aquatiques. Par conséquent, les profils des biotraits des macroinvertébrés aquatiques peuvent être des indicateurs intéressants pour comprendre la distribution du desman des Pyrénées.

Les objectifs de l'étude étaient donc (1) d'analyser le régime alimentaire du desman des Pyrénées à partir d'un échantillonnage couvrant son aire de distribution française et (2) d'étudier le profil des biotraits de ses communautés de proies pour identifier ses zones de chasse et d'affiner l'analyse de sa distribution et de son utilisation de l'habitat.

Au total, 989 échantillons de fèces présumées de desman des Pyrénées ont été recueillis dans différentes localités des Pyrénées françaises et conservés dans l'éthanol absolu. Un séquençage Ion Torrent PGM (Life Technologies) a été effectué en suivant les méthodes de « tagging » et de « multiplexing » développées par Galan et al. (2012). Un minibarcode du gène COI de 133bp a été amplifié pour chaque échantillon. Après le séquençage à haut-débit, les séquences ont été triées en utilisant le programme SESAME (Piry et al., 2012) et ont ensuite été comparées avec des séquences publiées disponibles dans la base de données BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007). Les séquences ayant un score de similarité plus grand ou égal à 98% étaient considérées comme certifiées.

Les taxons de macroinvertébrés pour lesquels des données étaient disponibles dans des bases de données ont été considérés pour l'étude des biotraits. Vingt caractéristiques biologiques et écologiques, définies par Usseglio-Polatera et al. (2000) selon les informations sur les taxons disponibles dans la littérature, ont été utilisées. Chaque trait est décrit par une série de catégories, appelées modalités. Comme un nombre différent de fèces a été récolté pour chaque site et, afin d'éviter de donner plus de poids aux sites où plus de fèces ont été collectées, une fèce par site a été sélectionnée au hasard 1000 fois afin d'obtenir 1000 jeux de données de fèces. Pour chaque jeu de données et pour chaque taxon de proie, la fréquence d'occurrence du taxon a été calculée comme étant le nombre de sites où sa présence a été confirmée génétiquement divisé par le nombre total de sites (171).

Après le séquençage, 381 fèces ont été identifiées comme appartenant au desman des Pyrénées et 157 autres appartenant à d'autres espèces hôtes. Cette étude du régime alimentaire du desman des Pyrénées a permis l'identification de 26 ordres, 77 familles, 130 genres et 120 espèces d'invertébrés. Six ordres (28%), treize familles (17%) et treize genres (10 %) avaient une fréquence d'occurrence supérieure ou égale à 10 % du nombre de fèces. L'ordre le plus fréquent était Ephemeroptera (86 %) qui comprenait la famille la plus fréquente, Heptageniidae (59 %), et le genre le plus fréquent était Baetis (Ephemeroptera, Baetidae) (56 %). Parmi les 120 espèces identifiées, sept d'entre elles avaient une fréquence d'occurrence \geq 10 %, les plus fréquentes étaient *Rhithrogena sp.*, *Baetis rhodani* et *Hydropsyche dinarica*, toutes les trois avec 37% d'occurrence.

La présence dans les montagnes pyrénéennes a pu être confirmée pour 77 des 120 espèces identifiées, et pour les sept espèces les plus fréquentes, grâce aux bases de données de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN) et de l'Office pour les Insectes et leur Environnement (<http://www.opie-benthos.fr>) et l'aide d'experts locaux. Bien que la présence

de 43 espèces identifiées n'ait pu être confirmée, essentiellement en raison d'un manque de connaissances concernant leur distribution complète, ces résultats mettent en évidence la précision de l'identification et de la fiabilité de cette étude.

Les ordres et les familles d'invertébrés les plus fréquents sont cohérents avec les résultats d'études antérieures (Puisségur, 1935; Peyre, 1956; Richard, 1986; Santamarina & Guitian, 1988; Santamarina, 1993; A Bertrand, 1994; Castién & Gosálbez, 1995). Ephemeroptera, Plecoptera et Trichoptera sont les ordres les plus fréquents avec des occurrences légèrement plus élevées pour les deux premiers. La domination des Ephemeroptera coïncide avec les résultats de Santamarina & Guitian (1998) et Castién & Gosálbez (1995) alors qu'elle contraste avec Bertrand (1994) (dominance des Trichoptera). La fréquence d'occurrence des Plecoptera est, par contre, plus élevée dans notre étude. La famille et l'espèce les plus fréquentes étaient Baetidae et *Baetis rhodani* respectivement, ce qui contraste avec les résultats d'études précédentes concernant la prééminence de Hydropsychidae dans le régime alimentaire de *G. pyrenaicus* (Bertrand, 1994). La présence non négligeable de Gammaridae (17%) dans nos résultats coïncide avec les observations de Puisségur (1935), Peyre (1956), Saint-Girons (1973) et Richard (1986) dans le bassin versant français, alors qu'elle contraste avec les résultats de Santamarina (1988) en Galice et Castien & Gosálbez (1995) en Navarre.

Les biotraits étaient disponibles pour 54 des 81 taxons de proies connus, dont les treize taxons avec les plus hautes fréquences d'occurrence (présence dans > 10% des sites). Le profil moyen des biotraits de la communauté de proies du desman des Pyrénées était caractérisé par une plus grande abondance des insectes de taille moyenne (0,5 à 4 cm) qui sont principalement présents dans l'eau douce à l'état d'œufs ou de stade larvaire. Ces organismes présentaient également, entre autres, un cycle de vie court (< 1 ans), et préférant des eaux oligotrophes à mésotrophes (quantité tolérée, faible à moyenne, de phosphore et d'azote).

L'approche des biotraits a permis d'identifier les habitats des communautés de proie et donc les caractéristiques des sites de chasses du desman des Pyrénées. Les proies se trouvent principalement dans les régions apicales des cours d'eau où il y a un débit moyen à fort. Cette approche biotraits confirme l'hypothèse proposée par (Charbonnel et al., 2015) qui a montré qu'il y avait un lien entre la préférence du desman des Pyrénées pour les eaux à écoulement rapide et la disponibilité de ses proies. Cette approche a également identifié les communautés de proies comme étant principalement polluo-sensibles pouvant être indicatrices de la qualité de l'eau.

Cette étude est la première application de l'approche biotraits pour l'étude des interactions biotiques prédateur-proie et l'étude des sites de chasse d'un prédateur à des fins de conservation. Cette méthode est transposable à toutes les espèces pour lesquelles les proies pourraient être analysées avec des biotraits, et pourrait fournir d'autres applications que seule l'identification des sites de chasse.

En conclusion, cette étude est la plus complète jamais réalisée sur le régime alimentaire du desman des Pyrénées avec l'identification sans ambiguïté de 130 genres. De plus, elle a mis en évidence la pertinence d'utiliser simultanément une identification moléculaire des proies dans contenue dans les fèces de cette espèce et une approche biotraits pour étudier l'habitat et les caractéristiques de ces proies. Cette approche a mené à l'acquisition d'informations intéressantes sur les zones de chasse du desman des Pyrénées. Comme ces approches n'impliquent aucune incidence sur les espèces étudiées, elles semblent prometteuses pour fournir de plus amples connaissances sur les liens prédateur-proies, qui contribuent à façonner la distribution des prédateurs. Etant donné que les approches biotraits ont été utilisées pour évaluer la qualité de l'environnement, il permet de prédire le type et la qualité des habitats utilisés par le prédateur à partir de l'identification de ses proies. Ainsi, cette approche mériterait d'être davantage explorée pour la mise en œuvre de mesures de conservation.

Article 5

Using a complete molecular diet analysis and biotraits of prey community to refine a predator habitat selection. The case of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*)

François Gillet^{1, 2, 3}, Marjorie Biffi⁴, Marie-Laure Tiouchichine⁵, Fanny Colas⁴, Frank D'Amico⁶, Maxime Galan⁵, Frédéric Blanc³, Mélanie Némoz³, Stéphane Aulagnier², Laëtitia Buisson⁴, Pascal Laffaille⁷, Johan R. Michaux¹

¹ Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

² Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

³ Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

⁴ Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

⁵ CBGP (Centre de Biologie et de Gestion des Populations), UMR INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro, Campus international de Baillarguet CS 30016, Montferrier-sur-Lez cedex, France

⁶ FED 4155 Milieux & Ressources Aquatiques & UMR CNRS 5142 Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications, Univ Pau & Pays Adour, F-64600 Anglet (FRANCE)

⁷ Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France

Article en préparation

Abstract

Indirect presence signs are a wealth of information about species ecology and trophic interactions. Recent advances in molecular techniques have made it possible to identify prey species from DNA fragments contained in faeces. In addition, trait-based approaches are widely used in studies from the organism to the ecosystem level and, as species traits are assumed to be selected by environmental conditions, they may explain the local distribution of organisms and can be considered as environmental indicators. Therefore, the aims of this study were to analyse the diet of the Pyrenean desman, from a wide sampling covering the entire species range in the French Pyrenees, and to investigate the biotraits profile of desman prey communities, in order to identify its foraging habitat and to refine the analysis of its habitat use.

By amplifying a small COI fragment and using an Ion Torrent sequencing method in 381 Pyrenean desman faeces samples, this study is the most complete ever done on the diet of this species, as 130 vertebrate and invertebrate genera were unambiguously identified. Among these genera, 120 species were identified but their presence in the Pyrenees was not confirmed for 43 of them.

The biotraits approach enabled to identify the characteristics of the Pyrenean desman foraging sites. Among others, prey are mainly found in the apical regions of streams, where there is medium to fast flowing water, and are essentially composed of polluo-sensitive taxa, which can be considered as indicators of the stream water quality. This is the first application of biotraits approaches for the study of predator-prey biotic interactions and the investigation of predator foraging sites for conservation purposes.

Keywords *Galemys pyrenaicus*; biotraits; diet; next-generation sequencing; prey

Introduction

The understanding of species distribution within a landscape and their ecological requirements at finer scales is of particular interest in the fields of conservation biology, applied ecology and species management. Indirect signs such as faeces, hairs or tracks are commonly used as indicators of species presence when true encounters are difficult to achieve (i.e. rare or elusive species, limited sampling efforts etc.; e.g. (Rushton et al., 2004) because they can be rapidly, easily and inexpensively collected. Coupled with environmental variables in Species Distributions Models (SDM), species records enable to understand how species select habitat (Kearney and Porter, 2009). However, further insights into the activity patterns of individuals and their dynamic of habitat use at a finer scale than their entire home range cannot be provided with these approaches. Methods exist that allow tracking animals in real time such as hiding for direct observations or radiotracking but the acquisition of data is more costly in time and equipment and may be invasive for the studied species (e.g. unintentional kill or disturbance). Yet, such information is important for conservation purposes as species are known to require habitat mosaics to meet their different needs as resting, breeding or foraging (Law and Dickman, 1998). For example, semi-aquatic species such as otters, *Lutra lutra*, use aquatic environments to find food resources (i.e. fish) and riparian terrestrial environments to shelter (Prenda and Granado-Lorencio, 1996) which implies different management measures for these habitats. However, the detection of indirect signs of presence at a site do not necessarily linked this site to the use of a resource (i.e. food or shelter) as it may be a passing area or a territorial marking site with a potentially lower suitability. Therefore, inferences about habitat selection at a finer scale may be biased if the localization of indirect presence signs is considered as the most often used or more suitable sites. Conservation measures which rely on such assumptions may then be misleading or non-optimal and would deserve a deeper understanding of the specific contribution of each habitat patch where the species is detected.

Nonetheless, indirect presence signs remain a wealth of information on species ecology and trophic interactions. Recent advances in molecular techniques have made it possible to identify prey species from DNA fragments contained in faeces (Valentini et al., 2009). These methods have been used to document on diet composition and richness for a large variety of diet type (i.e. carnivore:(Shehzad et al., 2012); herbivore: (Soininen et al., 2009); insectivore: (Zeale et al., 2011), to inventory biodiversity in remote or inaccessible areas where the predators forage (Boyer et al., 2015) or to analyse dietary overlap for species that share the same spatial niches (Brown et al., 2014). Clare et al., (2011, 2014) demonstrated that the

identification of prey species from molecular analysis coupled with prey ecology enable the identification of the location and type of foraging habitats for bats and an estimation of bats water quality tolerance using prey species as environmental indicators. This species-identity approach is yet limited because it is solely based on the description of prey assemblages. By contrast, functional traits-based approaches can significantly contribute to a better assessment of the type of environment in which prey community reside because they (i) respond to many abiotic and biotic parameters, (ii) integrate environmental conditions over time and space, (iii) simultaneously cover several habitats within systems and (iv) are comparable at large spatial scales, even across ecoregions that differ in their taxonomic composition (Feio et al., 2010). Trait-based approaches are now widely used in studies from the organism to the ecosystem level in terrestrial (Violle et al., 2007) or aquatic environments (Colas et al., 2013). As species traits are assumed to be selected by environmental conditions, including chemical and physical quality, they may explain the local distribution of organisms and can be considered as environmental indicators (Usseglio-Polatera et al., 2000), thereby enabling causal diagnosis (Culp et al., 2011). To our knowledge, traits-based approaches have never been used to investigate predator distribution and to refine their habitat selection through insights into their choices of foraging sites.

To exemplify this new approach, we focused our study on the Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811, Talpidae), a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenees Mountains (France, Spain and Andorra) and the Iberian Peninsula (northern and central Spain, northern Portugal). The species is listed as vulnerable by the IUCN (Fernandes et al., 2008) and is legally protected in the four countries encompassing its distribution area. Benefiting from the recent development of a genetic method that can easily and reliably identify desman faeces (Gillet et al., 2015a), several studies have sought to define the species habitat selection with the description of environmental variables at sites where faeces were collected (Charbonnel, 2015; Charbonnel et al., 2015). Lately, a molecular method, based on DNA barcoding and using next-generation sequencing, was developed to identify prey at a fine taxonomic level from desman faeces (Gillet et al., 2015b). This method recognized aquatic macroinvertebrates as being the main preys of the desman, coinciding with previous findings obtained from traditional methods (morphological identification of digestive tracts from trapped animals and of post-digested prey fragments in faeces; (Trutat, 1891; Puisségur, 1935; Richard and Vallette Vialard, 1969; Santamarina and Guitian, 1988; Santamarina, 1993; A Bertrand, 1994; Castián and Gosálbez, 1995; Fernández-salvador et al., 1998). An increasing effort has been devoted to define aquatic invertebrates' biotraits

describing biological (e.g. life cycle, reproduction or nutrition) and ecological characteristics of taxa (e.g. spatial and physical characteristics of used habitat; (Usseglio-Polatera et al., 2000). These biotraits have been used as surrogates to assess multiple stressors on running waters systems such as chemical (Colas et al., 2012, 2013), hydraulic (Griswold et al., 2008) or organic (Charvet et al., 2000) perturbations. Consequently, biotrait profiles of aquatic macroinvertebrates may provide interesting indicators in biotraits approaches to understand desman distribution.

Thus, the objectives of the study were (1) to analyse the diet of the Pyrenean desman from a wide sampling covering the entire species range in the French Pyrenees, (2) to investigate the biotraits profile of desman prey communities to identify its foraging habitat and refine the analysis of its distribution and of its habitat use.

Material and Methods

Study area

The Pyrenees Mountains are located in south Western Europe and are a natural barrier between France and Spain. This study focuses on the French part of the Pyrenees (W1°400–E3°100, N43°080–N42°230; Fig. 1) which covers approximately 18 000 km² and extends for about 400 km from the Bay of Biscay to the Mediterranean Sea with a maximum elevation of 3 298 m.

Faeces collection

A national survey and two local studies were conducted between 2011 and 2013 in the context of the Conservation Action Plan for the Pyrenean desman (Némoz and Bertrand, 2008), in order to update the distribution of this species in France. Given the cryptic behaviour of the Pyrenean desman, searches for indirect signs (i.e. faeces) were conducted on 1330 sites covering the entire French Pyrenees region; Figure 1). The majority of these searches was performed during the summer season. Skilled observers meticulously inspected each emergent item (i.e. rock, tree root or branch) along a 500 m riverbed transect (Castién and Gosálbez, 1992; A. Bertrand, 1994; Aymerich and Gosálbez, 2002; Charbonnel et al., 2014). 989 faeces suspected of being left by a Pyrenean desman, based on their colour, size, smell and position, were collected and preserved in ethanol for further molecular analysis

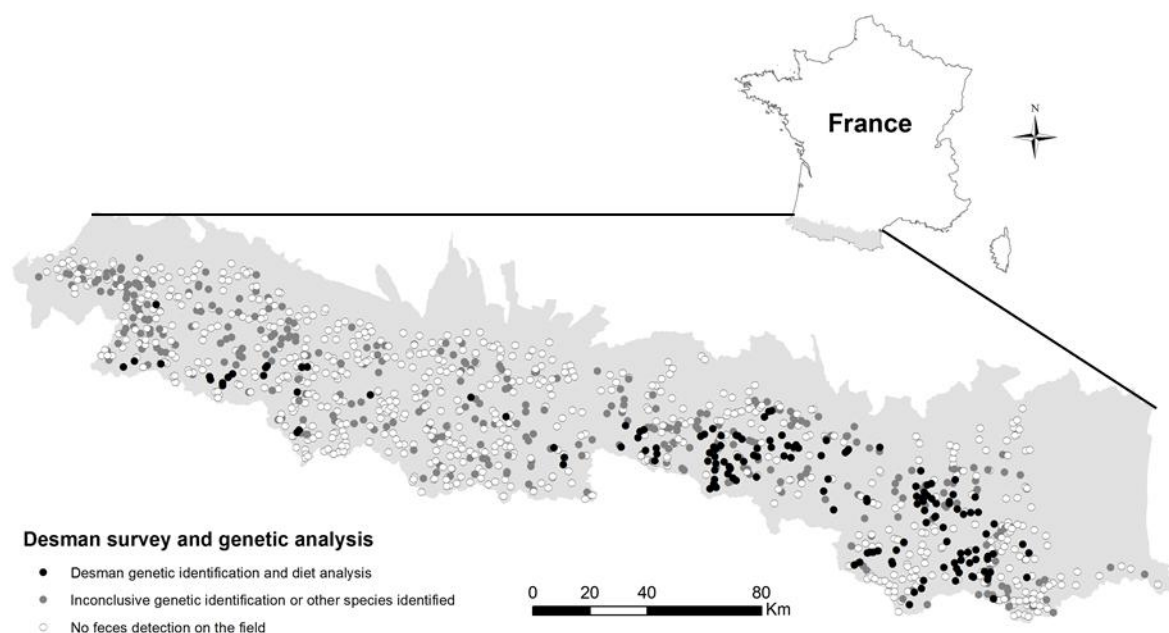


Figure 1. Location of the study area within the French Pyrenees. Sampling sites location of the Pyrenean desman are shown (dark dots: genetic confirmation of presence and data on diet; grey dots: faeces detected on the field but genetically assigned to another species or without assignment; white dots: no faeces detected on the field and no genetic analysis; N = 1330).

DNA analysis

DNA from faeces was extracted using the Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.

In this study, we performed an Ion Torrent PGM sequencing (Life Technologies) following the tagging and multiplexing method developed by (Galan et al., 2012). A 133bp minibarcode of the cytochrome c oxidase I gene (COI) was amplified for each sample using a modified forward primer LepF1 (Hebert et al., 2004) : 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNNNNATTCHACDAAYCAYAA RGAYATYGG-3', and a modified reverse primer EPT-long-univR (Hajibabaei et al., 2011) : 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATNNNNNNNACTATAAAARAAAATYTDAYAAA DGCRTG-3'. The 5' parts of the primers were modified by the addition of individual-specific MIDs (Multiplex IDentifiers NNNNNNN), consisting in a short 7bp sequence and adaptors required for the emPCR and the Ion Torrent sequencing. By using combination of different forward and reverse MIDs sequences, several hundred of samples can be multiplexed on the same sequencing run, and the sequences can be recognized after sequencing where all the PCR products from the different samples are mixed together.

PCR amplification was performed twice for each faecal sample and following the procedure

detailed in Galan et al (2012). Briefly, PCRs were carried out in a 10 µl reaction volume using 5 µl of 2x QIAGEN Multiplex Kit (Qiagen, Hilden, Germany), 0.5 µM of each primer, and 1 µl of DNA extract. The PCR conditions consisted in an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 45 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 30 s, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. After PCR pooling (4 µl per strong PCR amplification products and 7 µl per lighter ones) and size selection by gel excision, the amplicon libraries were sequenced by the company Genes Diffusion (Douai, France) on a Ion Torrent PGM system using a Ion 316 Chip version 2 (LifeTechnologies).

The sequences were sorted by using the SESAME barcode software (SEquence Sorter & AMplicon Explorer) (Piry et al., 2012). These sequences were compared with published sequences available in the BOLD database (Ratnasingham and Hebert, 2007). Sequences that had a unique best-hit with an identity score greater or equal to 98% were considered to be positive matches. Identification results are expressed as frequency of occurrence for each taxon (order, family, genera and species ranks)

In addition, a customised database was build from 84 invertebrate taxa collected in some Pyrenean rivers (Appendix 3). A 710bp fragment of COI was amplified in these samples with universal primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer et al., 1994), following the PCR conditions reported in Folmer et al. (1994).

Genera and species were validated as possibly occurring in France and in the Pyrenees regions with the French National Inventory of Natural Heritage (INPN) and the French Office for Insects and their Environment (OPIE) online databases, previous studies (Neveu and Lapchin, 1979; Vinçon, 1987a) and local experts. Unknown genera were removed from the analysis.

Biotraits profile of preys

As previous studies on desman diet has identified aquatic taxa as its main prey, we considered for the biotraits approach the macroinvertebrates taxa for which biotraits databases were available. We used 20 fuzzy-coded biological and ecological traits (Chevene et al., 1994) defined by (Usseglio-Polatera et al., 2000) according to information on taxa synthesized from the literature.

The biological traits reflect the life history of taxa (aquatic stages, life cycle duration, potential number of reproductive cycles per year), their resistance and resilience abilities (resistance forms, dispersal, locomotion and substrate relation), general morphological

(maximum body size), physiological (respiration) or behavioural (reproduction, food, feeding habits) features of organisms. Ecological traits mainly describe habitat preferences of taxa at fine scale (e.g. bottom substrate, current velocity, temperature, pH, saprobity, trophic level of freshwater) and at larger scale (longitudinal, transversal and altitudinal distributions). Each trait is described by a set of categories, named modalities hereafter.

Mean biotraits profile of desman prey community

For this biotraits approach, as a different number of faeces was collected depending on the site and to avoid giving more weight to sites where more faeces were collected, we randomly selected 1 faeces per site one thousand times and obtained 1000 faeces datasets.

For each dataset and for each prey taxon, the frequency of taxon occurrence was calculated as the number of sites where its presence has been genetically confirmed divided by the total number of sites (i.e. 171). Taxa frequencies calculated for each of the 1000 faeces datasets and biological traits scores for each taxon were then combined using a weighting procedure. To do this, for the 1000 datasets and for each known taxon in the biotraits database, the theoretical frequency of each biotrait modality was multiplied by the frequency of occurrence of the taxon. We insured that for each taxon, the sum of modalities for each biotrait remained equal to 1 and thus obtained 1000 weighted biotraits datasets.

Considering all of the known taxa in all of the 1000 weighted biotraits databases, the mean and standard deviation of each biotraits modality were calculated. The mean biotraits profile of desman prey community could thus be defined by the highest frequencies of modalities for each trait.

Results

Molecular diet analysis

After the two PCR amplifications, a total of 9,489,679 reads were obtained among which 2,962,289 were correctly assigned to 538 samples. 381 samples (2,695,260 reads (90%)) belonged to the Pyrenean desman with 1,707,102 reads (63%) assigned to the desman itself and 988,158 reads (37%) assigned to its prey. The remaining 157 samples (267,029 reads) were assigned to fourteen other host species among which 3 birds and 8 mammals (Appendix 1).

The proportion of items obtained twice in the PCR duplicates for a same DNA extract was computed as the percentage of repeatability. Repeatability of the results reached 99% when

only host species were considered, 83% when only prey species were considered and 87% when all species were considered.

The diet analysis of the 381 Pyrenean desman faeces led to the identification of 26 orders, 77 families and 130 genera of organisms that are known to be present in the Pyrenees. From these genera, 120 species were identified with a score $\geq 98\%$, among which 77 are present in the Pyrenees. The presence in the Pyrenees of the 43 remaining species could not be confirmed. 94 additional putative species (identity score of 82 to 97%) were found but were grouped together according to their genera, for purposes of understanding and clarity.

Despite the use of genetic databases, 26 additional genera were removed from the analysis as no information on their distribution was available or their presences were not possible in France (endemic species of other continents).

Six orders (28%), thirteen families (17%) and thirteen genera (10%) had a frequency of occurrence above or equal to 10%, meaning that the maximum of diversity among these ranks was found below this percentage. The most frequent orders were Ephemeroptera (86%), Plecoptera (84%) and Trichoptera (64%). The most frequent families were Heptageniidae (Ephemeroptera) (59%), Baetidae (Ephemeroptera) (57%), and Nemouridae (Plecoptera) (49%). The most frequent genera were Baetis (Ephemeroptera Baetidae) (56%), Protonemura (Plecoptera Nemouridae) (47%) and Hydropsyche (Trichoptera Hydropsychidae) (46%). Among the 120 identified species, seven of these had a frequency of occurrence $\geq 10\%$ and the most frequent were *Rhithrogena sp.*, *Baetis rhodani* and *Hydropsyche dinarica*, all three having a frequency of occurrence of 37%. Frequencies of occurrence of the most frequent orders, families, genera and species are displayed in Table 1. Lists of orders, families, genera and species having a frequency of occurrence below 10% are available in Appendix 2.

127 of the 130 genera corresponded to invertebrate taxa and the three remaining genera were amphibians (*Calotriton*, an endemic genus of the Pyrenees Mountains and *Salamandra*) and fish (*Salmo*). These taxa are probably consumed at their larvae stage and accounted for very small proportions in desman diet (respectively occurring in 0.8%, 1.3% and 0.5% of the faeces). 63 % of desman prey genus corresponded to taxa with at least one aquatic stage during their life cycle.

Biotrait profile of desman prey community

Biotraits were available for 54 of the 81 aquatic, or partially aquatic, prey genera of the Pyrenean desman, including the thirteen genera with the highest frequencies of occurrence in

desman diet (presence in >10% of the faeces). Mean biotrait profile of desman prey community (Figure 2) is characterized by higher abundance of medium-sized insects from 0.5 to 4 cm which are mainly present in freshwater at the eggs or larvae stages. These organisms exhibit a short life cycle (< 1 year) with only one generation per year. They reproduced mainly by cemented eggs and clutches and exhibit no form of resistance. Desman preys are mainly tegument or gill breathers and preferred oligotrophic to mesotrophic waters (low to medium amount of phosphorus and nitrogen tolerated). The saprobic values classified desman preys mainly as xenosaprobic to b-mesosaprobic taxa. Desman preys community is preferentially subordinated to the apical regions of streams (from the epirithron to the hyporithron) and to river channel habitats with medium to fast water velocity. They can tolerate variations of temperature (eurythermic taxa) but are more often linked to cold temperature (<15°C in summer and winter). Preys are mostly crawler taxa that preferred habitat with coarse mineral substrate (e.g. cobbles, pebbles), macrophytes and twigs and roots. Desman preys mainly feed on living microphytes, dead plants, detritus or other macroinvertebrates and are thus classified as shredders, scrapers and predators.

Table 1. Prey order, family, genera and species (with an identity score $\geq 98\%$) having a frequency of occurrence $\geq 10\%$ in the 381 faeces of *Galemys pyrenaicus* collected in the French Pyrenees, with their respective frequencies of occurrence.

Order	Family	Genus	Species
Amphipoda (17%)	Gammaridae (17%)	Gammarus (15%)	
Coleoptera (14%)			
Diptera (45%)	Chironomidae (15%)		
	Simuliidae (15%)	Simulium (15%)	<i>Simulium argyreatum</i> (12%)
	Stratiomyidae (11%)	Sargus (11%)	
Ephemeroptera (86%)	Baetidae (57%)	Baetis (56%)	<i>Baetis rhodani</i> (37%)
	Ephemerellidae (37%)	Ephemerella (37%)	
	Heptageniidae (59%)	Ecdyonurus (35%)	
		Rhithrogena (37%)	<i>Rhithrogena sp.</i> (37%)
Plecoptera (84%)	Leuctridae (30%)	Leuctra (30%)	<i>Leuctra aurita</i> (14%)
	Nemouridae (49%)	Protonemura (47%)	
	Perlidae (26%)	Dinocras (15%)	<i>Dinocras cephalotes</i> (15%)
		Perla (16%)	<i>Perla marginata</i> (10%)
	Perlodidae (33%)	Perlodes (31%)	
Trichoptera (64%)	Hydropsychidae (47%)	Hydropsyche (46%)	<i>Hydropsyche dinarica</i> (37%)
	Limnephilidae (19%)		

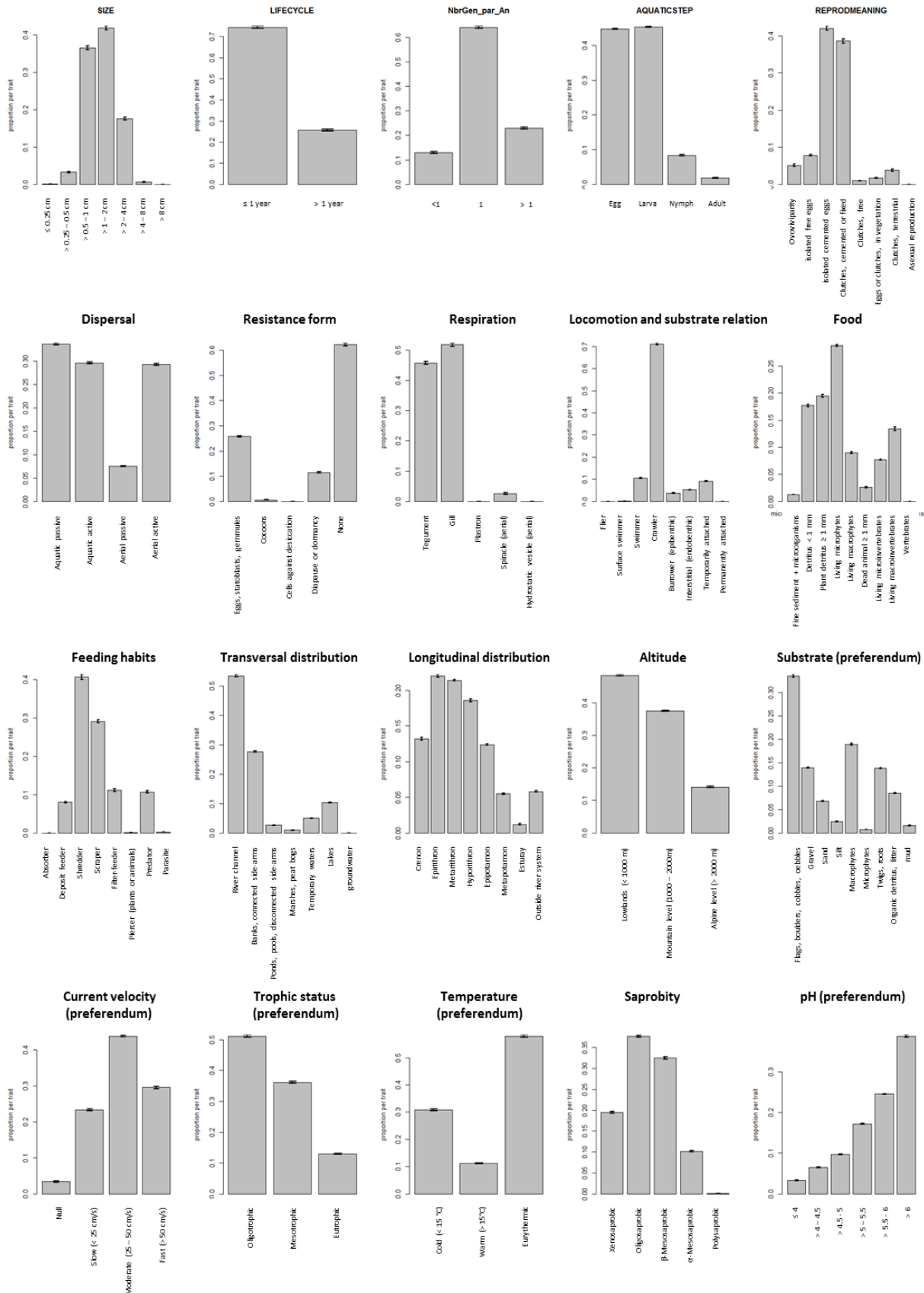


Figure 2. Biological and Ecological traits and modalities used in this study to calculate the mean biotraits profile of desman prey community. Mean and standard deviation were calculated for each modality from the 1000 datasets of taxa occurrence frequency in the desman diet.

Discussion

Molecular diet analysis

The amplification of a COI minibarcode successfully provided the identification of the Pyrenean desman (and its prey species) as well as other host species in 538 faecal samples (55%). The fact that the remaining 45% of the samples could not be correctly assigned is probably due to the over degradation or the small amount of DNA contained in them. Indeed, these results are highly dependent on the faeces freshness and their size at the time of collecting, as Pyrenean desman faeces are generally small (10 to 15 mm long and 4 to 8 mm wide (Bertrand, 1993)) and the DNA is rapidly degrading due to the contact with water and the UV radiation (Lindahl, 1993). The size of the faeces does not only limit the amount of DNA, it also affects the reproducibility of the extraction step since the totality of the faeces has to be used, except in very few cases.

However, the results of this study confirm the relevance of using this genetic marker with NGS sequencing method in diet assessments without using predator-a specific blocking probe, as it was previously reported (Piñol et al., 2014; Gillet et al., 2015b). The identification of other various host species (Appendix 1) also confirms the usefulness of the primers used in this study to amplify a larger panel of host species from faecal samples as well as the difficulty of identifying Pyrenean desman faeces in the field by morphological criteria and the risk of confusion with faeces from other species living in the same habitat (Gillet et al., 2015a).

Through an exhaustive sampling, this study allowed to certify the presence of the Pyrenean desman in 381 faecal samples among which 120 prey species were unambiguously identified. This study is therefore the most complete ever done on the diet of this species in terms of number of samples and taxonomic resolution combined. Bertrand 1994 had analysed 521 faeces but only with morphological methods, which comprise their limitation and risk of confusion as previously explained in this study. However, as the majority of the faeces were collected during summer, our sampling may not be completely representative of the diet of the Pyrenean desman.

The presence in the Pyrenean mountains could be confirmed for 77 of the 120 species (Appendix 2) and for the seven most frequent species (Table 1). Even though the presence of 45 identified species could not be confirmed, essentially due to a lack of knowledge regarding their complete distribution, these results highlight the precision of identification and the reliability of this study.

The most frequent orders (six) and families (thirteen) of invertebrates are consistent with the results of previous studies (Puisségur, 1935; Peyre, 1956; Richard, 1986; Santamarina and Guitian, 1988; Santamarina, 1993; A Bertrand, 1994; Castián and Gosálbez, 1995; Gillet et al., 2015b). Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera were the most frequent orders with slightly higher occurrences for the two first. The dominance of Ephemeroptera coincides with results of Santamarina and Guitian (1998) and Castián and Gosálbez (1995) while it contrasts with Bertrand (1994) (dominance of Trichoptera). The occurrence frequency of Plecoptera was also higher in our study. The most frequent family and species were Baetidae and *Baetis rhodani* respectively, contrasting with previous results regarding the pre-eminence of Hydropsychidae in the diet of *G. pyrenaicus* (A Bertrand, 1994), even though Hydropsychidae are still dominant among Trichoptera. Gillet et al. (2015) also found a dominance of Trichoptera. However, the study was based on a restricted number of samples (16). The presence of *Baetis rhodani*, *Rhithrogena sp.* and *Simulium argyreatum* among the most frequent identified species is not surprising as they are widespread in the Pyrenees (Vinçon, 1987b; Vinçon & Clergue-Gazeau, 1988).

The non negligible presence of Gammaridae (17%) in our results coincides with the findings of Puisségur (1935), Peyre (1956), Saint-Girons (1973) and Richard (1986) in the French watershed while it conflicts with the results of Santamarina (1988) in Galicia and Castián and Gosálbez (1995) in Navarra. Finally, the presence of the family Stratiomyidae and the associated genus *Sargus* were never recorded before. However, the detection of this family could be due to the fact that the larvae of this genus generally live in faeces (Martinez, 1986).

Biotraits profile of desman prey community

The high number of sites (171) which covered the entire known species distribution in the French Pyrenees (Charbonnel, 2015) enabled to state that the identified prey are representative of the Pyrenean desman diet in its French range. Besides, the majority of aquatic taxa justified the use of aquatic macroinvertebrates biotraits in the definition of the mean biological and ecological profile of desman prey community.

The biotraits approach enabled to globally identify prey community habitats and thus, the characteristics of desman foraging sites. However putative seasonal variations could not be taken into account due to the period of sampling. Prey are mainly found in the apical regions of streams where there is medium to fast flowing water. These findings corroborate previous studies on desman habitat use at the scale of its home range (Nores et al., 1992; Queiroz et al.,

1993; Ramalhinho & Boa Vida, 1993; Charbonnel, 2015; Charbonnel et al., 2015). This biotraits approach confirms the hypothesis proposed by (Charbonnel et al., 2015) which stated that there were a link between the fast flowing waters preference of the desman and the availability of its prey. At a finer scale, prey habitats corresponded to heterogeneous conditions of the riverbed in terms of substrate (coarse mineral substrate, macrophytes, twigs, roots) and are consistent with findings of (Charbonnel, 2015) on desman preferences. This suggests that the previous models of desman habitat use developed from indirect presence signs (i.e. faeces) targeted its foraging sites. Further researches will be needed for conservation purposes to investigate if foraging sites overlap resting sites, but also to investigate if faeces deposit sites overlap foraging sites.

The biotraits approach also identified desman prey community mainly as polluo-sensitive taxa (cemented reproduction, respiration from gills or tegument, relatively low organic pollution tolerance) which can be considered as indicators of the stream water quality. Thus, the distribution of the Pyrenean desman is likely to be driven by the water quality of streams. As numerous genera were identified in a restricted number of sites, especially taxa which are exclusively terrestrial, the desman mode of feeding appears also opportunistic. However, this could also be due to the spatiotemporal heterogeneity of our sampling.

Nonetheless, the presence of terrestrial taxa may indicate that the Pyrenean desman uses riverbanks as foraging sites. Moreover, riverbanks characteristics have been recognized as important drivers of desman habitat selection (Charbonnel, 2015). However, from these results, it is not possible to state whether terrestrial prey are captured in terrestrial environments or from the fluvial drift where they may have fallen. All this should be further explore with the use of terrestrial taxa biotraits.

Benefits and applications of the biotraits approach coupled with genetic analysis

Recently, the use of prey characteristics has enabled to identify prey environment and the areas where the predator may find them (Clare et al., 2011, 2014). However, such methods are based on a species-level identification of prey and are limited with respect to traits-based approach (Feio et al., 2010) which uses several metrics to describe the ecology of prey taxa (Usseglio-Polatera et al., 2000) and enable to estimate a mean biotraits profile of prey community across time, space and taxa. Such approach has been used for the identification of the functional community in connection with particular environmental conditions (McGill et al., 2006) with a wide application to ecosystem degradation studies (e.g. (Charvet et al., 2000; Griswold et al., 2008; Colas et al., 2012, 2013). To our knowledge, we provide the first

application of biotraits approaches for the study of predator-prey biotic interactions and the investigation of predator foraging sites for conservation purposes. This method is transposable at any species from which prey community could be analysed with biotraits and could provide others applications than only identifying foraging sites. For example, in context of species reintroduction, finding the right places is one of the major challenges (Macdonald et al., 2000). The prey communities could be studied at different locations in order to select those with the mean biotraits profile that best suited the predator expectations.

Conclusion

By using an Ion Torrent sequencing method to amplify a COI minibarcode in a comprehensive sampling of faeces, this study is the most complete ever done on the Pyrenean desman diet, as 130 genera could be unambiguously identified. Furthermore, it has highlighted the relevance of simultaneously using a molecular identification of prey taxa from faeces and a trait-based approach, to study prey community habitats and characteristics. This approach led to the acquisition of interesting information on the Pyrenean desman foraging habitat choices. As such investigation imply no impact on the studied species, this approach seems promising and is able to provide further knowledge on the links between a predator and its prey, which contribute to shape the predator distribution. As biotraits approaches have been used to assess environmental quality, it makes it possible to predict the type and quality of the habitats being used by predators from the identification of their prey. Thus, such approach deserves to be further explore for conservation planning and will benefit from the increasing number of prey species that is likely to be found in genetic databases and from the development of species biotraits databases. Finally, it seems particularly interesting to implement future faeces sampling that could take seasonal and spatial variables (i.e. altitude, geology, etc.) into account. With such a sampling, the biotraits approach coupled with the molecular identification of prey could be even more precise to study the foraging sites of the Pyrenean desman.

Acknowledgments

We thank the following organisations who collected faeces samples: Association des Naturalistes de l'Ariège, Conservatoire d'Espaces Naturels d'Aquitaine, Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, Fédération Aude Claire, Fédération des Réserves Naturelles Catalanes, Groupe de Recherche et d'Etude pour la Gestion de l'Environnement, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Office National des Forêts, Parc National des Pyrénées. We thank Sylvain Piry for his help with the bioinformatic analysis using SESAME barcode. We also thank ECOGEA who collected and determined invertebrate taxa.

This study is part of the “Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées” and the LIFE+ Desman (LIFE13NAT/FR/000092) which are coordinated by the Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées (CEN-MP) and are financially supported by the following structures: European Union Funding Network (ERDF and LIFE+), Agence de l'eau Adour-Garonne, Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, DREAL Aquitaine, Midi-Pyrénées, and Languedoc-Roussillon, Conseil Régional Aquitaine, Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l'Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEM, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). F. Gillet is supported by a French research fellowship provided by the ANRT (CIFRE N° 2011/1571).

References

- Almeida, D., Barrientos, R., Merino-Aguirre, R., Angeler, D.G., 2012. The role of prey abundance and flow regulation in the marking behaviour of Eurasian otters in a Mediterranean catchment. *Anim. Behav.* 84, 1475–1482.
doi:10.1016/j.anbehav.2012.09.020
- Aymerich, P., Gosàlbez, J., 2002. Factors de distribucio de *Galemys pyrenaicus* (Insectivora, Talpidae) a Catalunya. *Orsis* 17, 21–35.
- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire de desman des pyrénées *G. pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse, 217p.
- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire du desman des Pyrénées, *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) dans les Pyrénées françaises. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier de Toulouse, 50pp.
- Bertrand, A., 1993. Découvrir le Desman des Pyrénées, Ed. A.N.A., 32 p.

- Boyer, S., Cruickshank, R.H., Wratten, S.D., 2015. Faeces of generalist predators as “biodiversity capsules”: A new tool for biodiversity assessment in remote and inaccessible habitats. *Food Webs* 3, 1–6. doi:10.1016/j.fooweb.2015.02.001
- Brown, D.S., Burger, R., Cole, N., Vencatasamy, D., Clare, E.L., Montazam, A., Symondson, W.O.C., 2014. Dietary competition between the alien Asian Musk Shrew (*Suncus murinus*) and a re-introduced population of Telfair’s Skink (*Leiolopisma telfairii*). *Mol. Ecol.* 23, 3695–3705. doi:10.1111/mec.12445
- Castián, E., Gosálbez, J., 1992. Distribucion geographica y habitats ocupados por *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) (Insectivora: Talpidae) en los Pireneos occidentales. Doñana. *Acta Vertebr.* 19, 37–44.
- Castián, E., Gosálbez, J., 1995. Diet of *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) in the North of the Iberian peninsula. *Netherlands J. Zool.* 45, 422–430.
- Charbonnel, A., 2015. Influence multi-échelle des facteurs environnementaux dans la répartition du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) en France. Thèse de doctorat de l’Université de Toulouse, 245 p.
- Charbonnel, A., Buisson, L., Biffi, M., D’Amico, F., Besnard, A., Aulagnier, S., Blanc, F., Gillet, F., Lacaze, V., Michaux, J.R., Némoz, M., Pagé, C., Sanchez-Perez, J.M., Sauvage, S., Laffaille, P., 2015. Integrating hydrological features and genetically validated occurrence data in occupancy modelling of an endemic and endangered semi-aquatic mammal, *Galemys pyrenaicus*, in a Pyrenean catchment. *Biol. Conserv.* 184, 182–192. doi:10.1016/j.biocon.2015.01.019
- Charbonnel, A., D’Amico, F., Besnard, A., Blanc, F., Buisson, L., Némoz, M., Laffaille, P., 2014. Spatial replicates as an alternative to temporal replicates for occupancy modelling when surveys are based on linear features of the landscape. *J. Appl. Ecol.* 51, 1425–1433. doi:10.1111/1365-2664.12301
- Charvet, S., Statzner, B., Usseglio-Polatera, P., Dumont, B., 2000. Traits of benthic macroinvertebrates in semi-natural French streams: an initial application to biomonitoring in Europe. *Freshw. Biol.* 43, 277–296. doi:10.1046/j.1365-2427.2000.00545.x
- Chevène, F., Dolédec, S., Chessel, D., 1994. A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data. *Freshw. Biol.* 31, 295–309. doi:10.1111/j.1365-2427.1994.tb01742.x
- Clare, E.L., Barber, B.R., Sweeney, B.W., Hebert, P.D.N., Fenton, M.B., 2011. Eating local: influences of habitat on the diet of little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Mol. Ecol.* 20, 1772–1780. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05040.x
- Clare, E.L., Symondson, W.O.C., Broders, H., Fabianek, F., Fraser, E.E., MacKenzie, A., Boughen, A., Hamilton, R., Willis, C.K.R., Martinez-Nuñez, F., Menzies, A.K., Norquay, K.J.O., Brigham, M., Poissant, J., Rintoul, J., Barclay, R.M.R., Reimer, J.P., 2014. The diet of *Myotis lucifugus* across Canada: assessing foraging quality and diet variability. *Mol. Ecol.* 23, 3618–3632. doi:10.1111/mec.12542

- Colas, F., Archaimbault, V., Férard, J.-F., Bouquerel, J., Roger, M.-C., Devin, S., 2012. Benthic indicators of sediment quality associated with run-of-river reservoirs. *Hydrobiologia* 703, 149–164. doi:10.1007/s10750-012-1355-y
- Colas, F., Baudoin, J.-M., Danger, M., Usseglio-Polatera, P., Wagner, P., Devin, S., 2013. Synergistic impacts of sediment contamination and dam presence on river functioning. *Freshw. Biol.* 58, 320–336. doi:10.1111/fwb.12060
- Culp, J.M., Armanini, D.G., Dunbar, M.J., Orlofske, J.M., Poff, N.L., Pollard, A.I., Yates, A.G., Hose, G.C., 2011. Incorporating traits in aquatic biomonitoring to enhance causal diagnosis and prediction. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 187–197. doi:10.1002/ieam.128
- Feio, M.J., Alves, T., Boavida, M., Medeiros, A., Graça, M. a. S., 2010. Functional indicators of stream health: a river-basin approach. *Freshw. Biol.* 55, 1050–1065. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02332.x
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 1 June 2014.
- Fernández-salvador, R., del Real, M., Garcíá-Perea, R., Gisbert, J., 1998. Feeding habits of the Iberian desman, *Galemys pyrenaicus*. Euro-American Mammal Congress, Santiago de Compostela (Spain).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299. doi:10.1371/journal.pone.0013102
- Galan, M., Pagès, M., Cosson, J.-F., 2012. Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding : Species Identification from Fresh , Degraded and Environmental Samples. *PLoS One* 7. doi:10.5061/dryad.1j6v6
- García-Díaz, P., Lizana, M., 2013. Reproductive aspects of American minks (*Neovison vison*) in central Spain: Testing the effects of prey availability. *Mamm. Biol. - Zeitschrift für Säugetierkd.* 78, 111–117. doi:10.1016/j.mambio.2012.11.002
- Gillet, F., Cabria, M.T., Némoz, M., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015a. In press. PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA. *Mammalia*. doi:10.1515/mammalia-2014-0093
- Gillet, F., Tiouchichine, M.-L., Galan, M., Blanc, F., Némoz, M., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015b. A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. Submitted. *Mamm. Biol.*

- Greenwood, A., Churchfield, S., Hickey, C., 2002. Geographical distribution and habitat occurrence of the Water Shrew (*Neomys fodiens*) in the Weald of South-East England. *Mamm. Rev.* 32, 40–50. doi:10.1046/j.1365-2907.2002.00099.x
- Griswold, M.W., Berzinis, R.W., Crisman, T.L., Golladay, S.W., 2008. Impacts of climatic stability on the structural and functional aspects of macroinvertebrate communities after severe drought. *Freshw. Biol.* 53, 2465–2483. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02067.x
- Guixé, D., Arroyo, B., 2011. Appropriateness of Special Protection Areas for wide-ranging species: the importance of scale and protecting foraging, not just nesting habitats. *Anim. Conserv.* 14, 391–399. doi:10.1111/j.1469-1795.2011.00441.x
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. a C., Baird, D.J., 2011. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One* 6, e17497. doi:10.1371/journal.pone.0017497
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one : DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101, 14812–14817.
- Ismar, S.M.H., Trnski, T., Beauchamp, T., Bury, S.J., Wilson, D., Kannemeyer, R., Bellingham, M., Baird, K., 2014. Foraging ecology and choice of feeding habitat in the New Zealand Fairy Tern *Sternula nereis davisae*. *Bird Conserv. Int.* 24, 72–87. doi:10.1017/S0959270913000312
- Kearney, M., Porter, W., 2009. Mechanistic niche modelling: combining physiological and spatial data to predict species: ranges. *Ecol. Lett.* 12, 334–350.
- Law, B.S., Dickman, C.R., 1998. The use of habitat mosaics by terrestrial vertebrate fauna: implications for conservation and management. *Biodivers. Conserv.* 7, 323–333. doi:10.1023/A:1008877611726
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–15. doi:10.1038/362709a0
- Macdonald, D.W., Tattersall, F.H., Rushton, S., South, A.B., Rao, S., Maitland, P., Strachan, R., 2000. Reintroducing the beaver (*Castor fiber*) to Scotland: a protocol for identifying and assessing suitable release sites. *Anim. Conserv.* 3, 125–133. doi:10.1111/j.1469-1795.2000.tb00237.x
- Mantyka-pringle, C.S., Martin, T.G., Rhodes, J.R., 2012. Interactions between climate and habitat loss effects on biodiversity: a systematic review and meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 18, 1239–1252. doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02593.x
- Martinez, M., 1986. Les diptères Stratiomyidae (2ème partie et fin). *Cah. Liaison O.P.I.E.* 20, 3–10.
- McGill, B.J., Enquist, B.J., Weiher, E., Westoby, M., 2006. Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol. Evol.* 21, 178–185. doi:10.1016/j.tree.2006.02.002

- Nawaz, M.A., Martin, J., Swenson, J.E., 2014. Identifying key habitats to conserve the threatened brown bear in the Himalaya. *Biol. Conserv.* 170, 198–206. doi:10.1016/j.biocon.2013.12.031
- Némoz, M., Bertrand, A., 2008. Plan national d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*), 2010–2015. Société Française pour l'Etude la Prot. des Mammifères/Ministère l'Ecologie, l'Energie, du Dev. Durable l'Aménagement du Territ. pp. 159.
- Neveu, A., Lapchin, L., 1979. Ecologie des principaux invertébrés filtreurs de la basse Niveau (Pyrénées-Atlantiques). I. Simuliidae (Diptera, Nematocera). *Ann. Limnol.* 14, 225–244.
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., Gonzalez, J., 1992. Aproximación a la metodología y estudio del área de distribución, estatus de población y selección de hábitat del desmán (*Galemys pyrenaicus*) en la Península Ibérica. Ministerio de Medio Ambiente, Oviedo.
- Pajuelo, M., Bjorndal, K.A., Reich, K.J., Arendt, M.D., Bolten, A.B., 2012. Distribution of foraging habitats of male loggerhead turtles (*Caretta caretta*) as revealed by stable isotopes and satellite telemetry. *Mar. Biol.* 159, 1255–1267. doi:10.1007/s00227-012-1906-9
- Peyre, A., 1956. Ecologie et biogéographie du Desman (*Galemys pyrenaicus*) dans les Pyrénées françaises. *Mammalia* 20, 405–418.
- Piñol, J., San Andrés, V., Clare, E.L., Mir, G., Symondson, W.O.C., 2014. A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 18–26. doi:10.1111/1755-0998.12156
- Piry, S., Guivier, E., Realini, a, Martin, J.-F., 2012. |SE|S|AM|E| Barcode: NGS-oriented software for amplicon characterization--application to species and environmental barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 1151–7. doi:10.1111/j.1755-0998.2012.03171.x
- Prenda, J., Granado-Lorencio, C., 1996. The relative influence of riparian habitat structure and fish availability on otter *Lutra lutra* L. sprainting activity in a small Mediterranean catchment. *Biol. Conserv.* 76, 9–15. doi:10.1016/0006-3207(95)00080-1
- Puisségur, C., 1935. Recherches sur le Desman des Pyrénées. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 67, 163–227.
- Queiroz, A.I., Alves, H., Almada, V., 1993. The small hydro plants: predicted impacts on the Pyrenean desman populations (*Galemys pyrenaicus*, Geoffroy). In: Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman, Lisbon, pp. 69–77.
- Rainho, A., Palmeirim, J.M., 2011. The Importance of Distance to Resources in the Spatial Modelling of Bat Foraging Habitat. *PLoS One* 6, e19227. doi:10.1371/journal.pone.0019227

- Ramalhinho, M.G., Boa Vida, M.J., 1993. Habitat of the Pyrenean Desman: assessment of running water quality. Monitoring pollution. In: Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman, Lisbon, pp. 63–67.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355–364. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Real, R., Barbosa, A.M., Rodríguez, A., García, F.J., Vargas, J.M., Palomo, L.J., Delibes, M., 2009. Conservation biogeography of ecologically interacting species: the case of the Iberian lynx and the European rabbit. *Divers. Distrib.* 15, 390–400. doi:10.1111/j.1472-4642.2008.00546.x
- Richard, P.B., 1986. Les Desman des Pyrénées , un mammifère inconnu à découvrir. *Science et Découvertes*, Ed. Le Rocher, Monaco : 118 p.
- Richard, P.B., Vallette Vialard, A., 1969. Le Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) : premières notes sur sa biologie. *La Terre la Vie* 116, 225–245.
- Rushton, S.P., Ormerod, S.J., Kerby, G., 2004. New paradigms for modelling species distributions? *J. Appl. Ecol.* 41, 193–200. doi:10.1111/j.0021-8901.2004.00903.x
- Saint-Girons, M.-C., 1973. Les mammifères de France et du Bénélux. Ed. Doin, Paris : 418pp.
- Santamarina, J., 1993. Feeding ecology of a vertebrate assemblage inhabiting a stream of NW Spain (Riobo; Ulla basin). *Hydrobiologia* 252, 175–191. doi:10.1007/BF00008154
- Santamarina, J., Guitian, J., 1988. Quelques données sur le régime alimentaire du desman (*Galemys pyrenaicus*) dans le nord-ouest de l’Espagne. *Mammalia* 52.
- Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M. a, Miquel, C., Poillot, C., Shah, S. a, Pompanon, F., Coissac, E., Taberlet, P., 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Mol. Ecol.* 21, 1951–65. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x
- Soininen, E.M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., Brysting, A.K., Sønstebo, J.H., Ims, R. a, Yoccoz, N.G., Taberlet, P., 2009. Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Front. Zool.* 6, 16. doi:10.1186/1742-9994-6-16
- Trutat, E., 1891. Essai sur l’histoire naturelle du Desman des Pyrénées . Douladoure-Privat, Toulouse, 107 p.
- Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P., Tachet, H., 2000. Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: how to use species trait databases? *Hydrobiologia* 422-423, 153–162. doi:10.1023/A:1017042921298
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E., Taberlet, P., 2009. New

-
- perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: The trnL approach. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 51–60. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x
- Vinçon, G., 1987a. Etude hydrobiologique de la vallée d'Ossau (Pyrénées-Atlantiques). II. Le milieu et la structure du peuplement benthique. *Ann. Limnol.* 23, 225–243. doi:10.1051/limn/1987021
- Vinçon, G., 1987b. Etude hydrobiologique de la Vallée d'Ossau (Pyrénées-Atlantiques). I. Répartition des Ephéméroptères. *Ann. Limnol.* 23, 95–113.
- Vinçon, G., Clergue-Gazeau, M., 1988. Etude hydrobiologique de la Vallée d'Ossau (Pyrénées-Atlantiques, France). III. Simuliidae (Diptera, Nematocera) : leur originalité biogéographique et écologique. *Ann. Limnol.* 24, 67–81.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882–892. doi:10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x
- Zeale, M.R.K., Butlin, R.K., Barker, G.L. a, Lees, D.C., Jones, G., 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 236–44. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02920.x

Appendix 1. Number of positive samples, and number of reads, for the eleven other aquatic and terrestrial species, for which fecal samples were found during the field survey (along with the Pyrenean desman).

Class	Species	Number of positive samples	Number of reads
Birds	<i>Cinclus cinclus</i>	2	3,125
	<i>Garrulus glandarius</i>	1	1,494
	<i>Turdus merula</i>	23	14,291
Mammals	<i>Barbastella barbastellus</i>	1	1155
	<i>Glis glis</i>	12	67,439
	<i>Lutra lutra</i>	1	4,207
	<i>Myotis daubentonii</i>	8	28,629
	<i>Neomys fodiens</i>	97	94,342
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	3	8,251
	<i>Rattus sp.</i>	7	43,765
<i>Sorex araneus</i>	2	331	

Appendix 2. Lists (in alphabetical order) of orders, families, genera and species having a frequency of occurrence < 10%. “*” indicates species for which the presence in the Pyrenees is known.

Order	Family	Genus	Species
Araneae	Agromyzidae	<i>Abax</i>	<i>Abax parallelepipedus</i> *
Bdelloida	Anisopodidae	<i>Acentrella</i>	<i>Annitella thuringica</i>
Chordeumatida	Anthomyiidae	<i>Allajulus</i>	<i>Aporrectodea caliginosa</i> *
Entomobryomorpha	Aphididae	<i>Allogamus</i>	<i>Arcynopteryx compacta</i>
Glomerida	Armadillidiidae	<i>Allotrichoma</i>	<i>Armadillidium pictum</i> *
Haplotaxida	Athericidae	<i>Amphinemura</i>	<i>Atherix sp.</i> *
Hemiptera	Blephariceridae	<i>Annitella</i>	<i>Baetis alpinus</i> *
Hymenoptera	Calliphoridae	<i>Anopheles</i>	<i>Baetis melanonyx</i> *
Isopoda	Calopterygidae	<i>Aporrectodea</i>	<i>Baetis muticus</i> *
Julida	Carabidae	<i>Arcynopteryx</i>	<i>Baetis scambus</i> *
Lepidoptera	Ceratozetidae	<i>Armadillidium</i>	<i>Brachyptera seticornis</i> *
Littorinimorpha	Cercopidae	<i>Atherix</i>	<i>Brachyptera sp.</i> *
Neuroptera	Chloropidae	<i>Bembidion</i>	<i>Brillia bifida</i>
Odonata	Chrysopidae	<i>Blera</i>	<i>Calopteryx virgo</i> *
Opiliones	Craspedosomatidae	<i>Brachyptera</i>	<i>Cardiocladius capucinus</i> *
Salmoniformes	Culicidae	<i>Brillia</i>	<i>Chaetopteryx gessneri</i>
Polydesmida	Drosophilidae	<i>Calopteryx</i>	<i>Chaetopteryx villosa</i> *
Sarcoptiformes	Dryopidae	<i>Cardiocladius</i>	<i>Corynoneura sp.</i> *
Trombidiformes	Dytiscidae	<i>Ceratitis</i>	<i>Diamesa hyperborea</i>
	Ephydriidae	<i>Chaetopteryx</i>	<i>Dicranota sp.</i> *
	Formicidae	<i>Chrysopidgc</i>	<i>Dicranota subflammatra</i>
	Geometridae	<i>Conchapelopia</i>	<i>Diplectrona felix</i> *
	Glomeridae	<i>Corynoneura</i>	<i>Drusus rectus rectus</i> *
	Glomeridellidae	<i>Cricotopus</i>	<i>Drusus sp.</i> *
	Habrotrichidae	<i>Diamesa</i>	<i>Dryops luridus</i>
	Hybotidae	<i>Dicranota</i>	<i>Electrogena lateralis</i> *
	Julidae	<i>Dicrotendipes</i>	<i>Elodes marginata</i>
	Leptophlebiidae	<i>Dikerogammarus</i>	<i>Eloeophila mundata</i>
	Limoniidae	<i>Diplectrona</i>	<i>Ephemerella mucronata</i>
	Lumbricidae	<i>Drusus</i>	<i>Episyrphus balteatus</i> *
	Megascolecidae	<i>Dryops</i>	<i>Gammarus fossarum</i>
	Muscidae	<i>Electrogena</i>	<i>Glomeris intermedia</i> *
	Odontoceridae	<i>Elodes</i>	<i>Glomeris marginata</i> *
	Oniscidae	<i>Eloeophila</i>	<i>Habrophlebia lauta</i> *
	Oribatulidae	<i>Epeorus</i>	<i>Haematopota pluvialis</i> *
	Pediciidae	<i>Ephydra</i>	<i>Halesus digitatus</i> *
	Pentatomidae	<i>Epichlorops</i>	<i>Halesus radiatus</i> *
	Phalangiidae	<i>Episyrphus</i>	<i>Hydropsyche incognita</i> *
	Philodromidae	<i>Fuscozetes</i>	<i>Hydropsyche instabilis</i> *
	Philopotamidae	<i>Glomeridella</i>	<i>Hydropsyche siltalai</i> *
	Philosciidae	<i>Glomeris</i>	<i>Hydropsyche tenuis</i>

Pipunculidae	<i>Habroleptoides</i>	<i>Isoperla grammatica*</i>
Polydesmidae	<i>Habrophlebia</i>	<i>Lasius umbratus*</i>
Porcellionidae	<i>Habrotrocha</i>	<i>Lesteva pubescens</i>
Psychodidae	<i>Haematopota</i>	<i>Leuctra albida</i>
Rhyacophilidae	<i>Halesus</i>	<i>Leuctra fusca*</i>
Salmonidae	<i>Helina</i>	<i>Leuctra hippopus*</i>
Sarcophagidae	<i>Isoperla</i>	<i>Leuctra inermis*</i>
Sciomyzidae	<i>Laccophilus</i>	<i>Leuctra pseudocylindrica*</i>
Scirtidae	<i>Lasiomma</i>	<i>Limnophyes pentaplastus*</i>
Sericostomatidae	<i>Lasius</i>	<i>Lycia hirtaria</i>
Staphylinidae	<i>Lesteva</i>	<i>Macropelopia notata</i>
Syrphidae	<i>Limnophyes</i>	<i>Micropsectra pallidula*</i>
Tabanidae	<i>Limonia</i>	<i>Microspectra sp</i>
Tachinidae	<i>Liponeura</i>	<i>Odontocerum albicorne*</i>
Taeniopterygidae	<i>Lucilia</i>	<i>Orthocladius frigidus*</i>
Tateidae	<i>Lycia</i>	<i>Orthocladius fuscimanus*</i>
Tephritidae	<i>Macropelopia</i>	<i>Orthocladius schnelli</i>
Tetragnathidae	<i>Metaphire</i>	<i>Parametriocnemus stylatus</i> <i>adzharicus</i>
Tipulidae	<i>Metellina</i>	<i>Pedicia straminea</i>
Tomoceridae	<i>Microspectra</i>	<i>Pentatoma rufipes</i>
Torrenticolidae	<i>Microtendipes</i>	<i>Perla grandis*</i>
Uenoidae	<i>Nemoura</i>	<i>Perlodes intricatus*</i>
	<i>Ochogona</i>	<i>Perlodes microcephalus*</i>
	<i>Odontocerum</i>	<i>Perlodes mortoni*</i>
	<i>Oniscus</i>	<i>Philaenus spumarius*</i>
	<i>Opilio</i>	<i>Philodromus collinus*</i>
	<i>Orthocladius</i>	<i>Philodromus praedatus*</i>
	<i>Parametriocnemus</i>	<i>Philopotamus montanus*</i>
	<i>Paranchus</i>	<i>Philoscia muscorum*</i>
	<i>Paratanytarsus</i>	<i>Phytomyza vitalbae</i>
	<i>Paratrichocladius</i>	<i>Polypedilum pedestre</i>
	<i>Pedicia</i>	<i>Porcellio scaber*</i>
	<i>Pentatoma</i>	<i>Potamophylax cingulatus*</i>
	<i>Philaenus</i>	<i>Potamophylax latipennis*</i>
	<i>Philodromus</i>	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>
	<i>Philopotamus</i>	<i>Protonemura auberti</i>
	<i>Philoscia</i>	<i>Protonemura meyeri*</i>
	<i>Phytomyza</i>	<i>Pseudodiamesa branickii</i>
	<i>Platypalpus</i>	<i>Psychoda ermina</i>
	<i>Polydesmus</i>	<i>Psychoda sp.</i>
	<i>Polypedilum</i>	<i>Rheotanytarsus ringei</i>
	<i>Porcellio</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
	<i>Potamophylax</i>	<i>Rhyacophila dorsalis*</i>
	<i>Potamopyrgus</i>	<i>Rhyacophila evoluta*</i>
	<i>Pseudodiamesa</i>	<i>Rhyacophila fasciata*</i>

<i>Psychoda</i>	<i>Rhyacophila fasciata denticula*</i>
<i>Pteromicra</i>	<i>Rhyacophila meridionalis*</i>
<i>Rheotanytarsus</i>	<i>Rhyacophila relictata*</i>
<i>Rhopalosiphum</i>	<i>Rhyacophila sp.*</i>
<i>Rhyacophila</i>	<i>Salmo trutta*</i>
<i>Salmo</i>	<i>Sargus thoracicus</i>
<i>Sarcophaga</i>	<i>Scaptomyza flava</i>
<i>Scaptomyza</i>	<i>Sericostoma baeticum</i>
<i>Scatophila</i>	<i>Sericostoma personatum*</i>
<i>Sericostoma</i>	<i>Sericostoma pyrenaicum*</i>
<i>Siphona</i>	<i>Serratella ignita*</i>
<i>Smittia</i>	<i>Simulium intermedium</i>
<i>Spilomyia</i>	<i>Simulium monticola*</i>
<i>Sylvicola</i>	<i>Simulium murmanum</i>
<i>Synorthocladius</i>	<i>Simulium vernalis</i>
<i>Tachinid</i>	<i>Sylvicola fenestralis*</i>
<i>Taeniopteryx</i>	<i>Synorthocladius semivirens</i>
<i>Thienemannia</i>	<i>Taeniopteryx auberti</i>
<i>Thremma</i>	<i>Thienemannia gracei</i>
<i>Thricops</i>	<i>Thremma gallicum</i>
<i>Tipula</i>	<i>Thricops simplex</i>
<i>Tomocerus</i>	<i>Tipula fulvipennis</i>
<i>Tomosvaryella</i>	<i>Tipula maxima*</i>
<i>Torrenticola</i>	<i>Tipula sp.*</i>
<i>Tvetenia</i>	<i>Tvetenia calvescens</i>
<i>Wormaldia</i>	<i>Wormaldia triangulifera*</i>
<i>Zaphne</i>	<i>Zavreliomyia sp.</i>
<i>Zavreliomyia</i>	
<i>Zygoribatula</i>	

Appendix 3. List of the 84 invertebrate taxa, and their respective order, collected in Pyrenean rivers and which were used to build the customised COI database.

Taxon	Order (class)
<i>Adicella reducta</i>	Trichoptera
<i>Agapetus fuscipes</i>	Trichoptera
<i>Alainites muticus</i>	Ephemeroptera
<i>Amphinemura sp</i>	Plecoptera
<i>Ancylus fluviatilis</i>	Gastropoda
<i>Antocha sp</i>	Diptera
<i>Atherix sp</i>	Diptera
<i>Baetis alpinus</i>	Ephemeroptera
<i>Baetis lutheri</i>	Ephemeroptera
<i>Baetis melanonyx</i>	Ephemeroptera
<i>Baetis rhodani</i>	Ephemeroptera
ceratopogoninae	Diptera
Chironomii	Diptera
Clinocerinae	Diptera
<i>Dicranota sp</i>	Diptera
<i>Dinocras cephalotes</i>	Plecoptera
<i>Dixa sp</i>	Diptera
<i>Dryops sp</i>	Coleoptera
<i>Ecdyonorus sp</i>	Ephemeroptera
<i>Elmis aenea</i>	Coleoptera
<i>Elmis sp</i>	Coleoptera
<i>Elodes sp</i>	Coleoptera
Empididae Hemerodrominae	Diptera
<i>Epeorus sp</i>	Ephemeroptera
<i>Ephemera danica</i>	Ephemeroptera

<i>Erpobdella sp</i>	Arhynchobdellida (Annelida)
<i>Esolus sp</i>	Coleoptera
<i>Gammarus pulex</i>	Amphipoda
<i>Glossiphonia sp</i>	Rhynchobdellida (Annelida)
<i>Glossossoma boltoni</i>	Trichoptera
<i>Habroleptoides sp</i>	Ephemeroptera
Hexatomini	Diptera
<i>Hydra sp</i>	Anthomedusae (Hydrozoa)
<i>Hydraena sp</i>	Coleoptera
Hydrophilidae	Coleoptera
<i>Hydropsyche augustipennis</i>	Trichoptera
<i>Hydropsyche dinarica</i>	Trichoptera
<i>Hydropsyche siltalai</i>	Trichoptera
<i>Isoperla sp</i>	Plecoptera
<i>Leuctra sp</i>	Plecoptera
<i>Limnebius sp</i>	Coleoptera
Limnephilidae	Trichoptera
<i>Limnius sp</i>	Trichoptera
<i>Liponeura sp</i>	Diptera
Lumbricidae	Oligochaeta
<i>Micrasema longulum</i>	Trichoptera
<i>Micrasema minimum</i>	Trichoptera
Nematoda	
<i>Nemoura sp</i>	Plecoptera
<i>Odontocerum albicorne</i>	Trichoptera
<i>Orectochilus villosus</i>	Coleoptera
Othocladiinae	Diptera
<i>Oulimnius sp</i>	Diptera

Pachyleuctra	Plecoptera
<i>Perla marginata</i>	Plecoptera
<i>Perlodes microcephala</i>	Plecoptera
<i>Philopotamus montagnus</i>	Trichoptera
<i>Pisidium sp</i>	Veneroida (Bivalvia)
<i>Platembalus maculatus</i>	Coleoptera
<i>Polycelis felina</i>	Tricladida (Turbellaria)
<i>Potamophilax sp</i>	Trichoptera
<i>Prodiamesa sp</i>	Diptera
Prosimuliini	Diptera
<i>Protonemura beatensis</i>	Plecoptera
<i>Psychomyia pusilla</i>	Trichoptera
<i>Rhithrogena gratianopolitana</i>	Ephemeroptera
<i>Rhithrogena sp</i>	Ephemeroptera
<i>Rhyacophila dorsalis</i>	Trichoptera
<i>Rhyacophila fasciata</i>	Trichoptera
<i>Rhyacophila meridionalis</i>	Trichoptera
<i>Rhyacophila moscaryi tredosensis</i>	Trichoptera
<i>Rhyacophila occidentalis</i>	Trichoptera
<i>Rhyacophila tristis</i>	Trichoptera
<i>Sericostoma personatum</i>	Trichoptera
<i>Silo graellsii</i>	Trichoptera
<i>Silo nigricornis</i>	Trichoptera
<i>Silo piceus</i>	Trichoptera
<i>Siphonoperla torrentium</i>	Plecoptera
Tanypodinae	Diptera
Tanytarsinii	Diptera
Thaumaleidae	Diptera

<i>Tinodes dives</i>	Trichoptera
Tipulidae	Diptera
<i>Wormaldia sp</i>	Trichoptera

Article 6

Genetic monitoring of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the Aude river, France

François Gillet, Bruno Le Roux, Frédéric Blanc, Aurélie Bodo, Mélanie Némoz, Christine Fournier-Chambrillon, Pascal Fournier, Frédérick Jacob, Vincent Lacaze, Stéphane Aulagnier & Johan R. Michaux

Résumé

Bien que la biologie et l'écologie du desman des Pyrénées soient encore peu connues, les spécialistes conviennent que cette espèce a souffert de la fragmentation et de la perte de son habitat, en raison de l'augmentation de l'impact humain sur les cours d'eau de montagne. Un exemple de l'impact humain sur les rivières est la construction et le fonctionnement des centrales hydroélectriques. Ceux-ci peuvent conduire à des modifications des régimes hydrologique et thermique, avec un impact direct sur les ressources en larves de macro-invertébrés benthiques (Cereghino & Lavandier 1997; Queiroz et al. 1992). Bien que peu d'informations soient disponibles pour le desman des Pyrénées, ces effets négatifs ont été étudiés et mis en évidence par divers auteurs sur les mammifères et les oiseaux (D'Amico et al. 2000; Nilsson & Dynesius 1994). En France, l'Aude a été profondément touchée par la centrale hydroélectrique de Nentilla, en particulier par sa récente réparation et les modifications des débits associés. Le suivi des desmans des Pyrénées vivant dans la section impactée de la rivière était donc l'occasion d'évaluer les impacts potentiels de ces modifications sur cette espèce.

La présence du desman des Pyrénées peut être essentiellement détectée par deux méthodes: récolte de fèces et capture. La capture d'animaux vivants est lourde à mettre en œuvre et potentiellement à risque, tandis que l'échantillonnage des fèces est non-invasif, mais comporte des risques de confusion avec les fèces d'autres espèces de vertébrés semi-aquatiques. Cependant, une méthode fiable et non invasive récente a été développée pour remédier à ce problème (Gillet et al. 2014). Le génotypage de l'ADN contenu dans les fèces avec des marqueurs microsatellites peut être utilisé pour étudier les populations ou pour suivre les individus d'espèces rares de mammifères (Taberlet et al 1997; Eggert et al 2003; Mondol et al. 2009a; Mondol et al. 2009b). Par conséquent, le but de cette étude a été de réaliser un suivi individuel des desmans des Pyrénées, vivant dans la section de l'Aude en aval de la

centrale hydroélectrique de Nentilla, en combinant le génotypage des échantillons de fèces et les poils d'animaux piégés vivants.

Le long d'un tronçon de 20 km de l'Aude, dix segments de 300 m ont été prospectés deux fois par an (janvier et avril 2011, mars et juillet 2012 et juillet et août 2013). De plus, des sessions de piégeage ont eu lieu dans trois segments et pendant six nuits (deux nuits par segment) en septembre 2011, 2012 et 2013. L'identification du desman des Pyrénées dans les fèces a été vérifiée par amplification d'un petit fragment du cytochrome b, comme décrit dans Gillet et al. (2015). Les échantillons de poils et de fèces ont été génotypés avec 24 loci microsatellites en utilisant les multiplex et conditions PCR rapportés dans l'**article 2**.

Un total de 131, 160 et 150 fèces présumées de desman des Pyrénées ont été récoltées. 7, 2 (un nouvel individu et une recapture) et 3 individus ont été piégés, respectivement en 2011, 2012 et 2013. Sur les 441 fèces collectées, 267 ont été attribuées au desman des Pyrénées, et 204 (64, 80 et 60 en 2011, 2012 et 2013 respectivement) de celles-ci ont été génotypées. Ceci a permis d'identifier 28 individus supplémentaires (PID (sibs) de $4,46e^{-03}$). Dix-neuf individus ont été identifiés en 2011, sept piégés et douze identifiés à partir des fèces. En 2012, neuf nouveaux individus ont été identifiés, un piégé et huit identifiés à partir des fèces. Enfin, onze nouveaux individus ont été identifiés en 2013, trois piégés et huit identifiés à partir de fèces.

Etant donné que plusieurs animaux ont été ré-identifiés grâce aux fèces un ou deux ans après leur première découverte, le génotypage des 24 microsatellites s'avère être une technique fiable pour identifier et mettre en œuvre le suivi d'une population locale de desman des Pyrénées. Les trois sessions annuelles de récolte de fèces et de piégeage ont conduit à l'identification de 39 individus le long des 20 km du tronçon de l'Aude étudié. Les plus grands nombres de desman des Pyrénées par segment de 300 m ont été trouvés en 2011 dans trois segments avec 7, 6, et 5 individus, respectivement. Cependant, ces résultats pourraient être affectés par les débits d'eau au moment de la récolte. De plus, toutes les fèces collectées n'ont pas pu être génotypées et donc le nombre d'animaux pourrait être sous-estimé dans d'autres segments et/ou années. Comme la longueur des segments est du même ordre de grandeur que les domaines vitaux (Stone 1987b; Silva 2001; Gisbert & Garcia-Perea 2004; Melero et al 2012), ces chiffres élevés de desman des Pyrénées par segment pourraient coïncider avec les résultats de Melero et al. (2012) et (2014) concernant le comportement social de cette espèce et le partage des domaines vitaux.

Les mouvements de quatre individus ont pu être mis en évidence au cours de cette étude, ils ont été retrouvés à des distances de 1,6 km, 4,8 km, 16,2 km et 17,8 km, huit jours, un mois, dix mois et un an plus tard, respectivement. Cette capacité de mouvements à longue distance n'avait jamais été découverte pour le desman des Pyrénées. Ces individus ayant été identifiés par les fèces, aucune information sur leur sexe ou leur âge n'était disponible afin d'éventuellement corréler ces mouvements à une quelconque composante comportementale. Ces mouvements pourraient cependant être liés aux modifications de la rivière pendant les travaux sur la centrale hydroélectrique. En effet, à partir de Novembre 2011 des débits d'eau très élevés ont été observés et ceux-ci ont profondément modifié le lit de la rivière. Par conséquent, certains individus pourraient avoir voyagé vers l'amont pour trouver un habitat plus adapté. Ceci pourrait signifier que le desman des Pyrénées possède une certaine capacité de dispersion lorsque son habitat est appauvri et que sa réponse à ces modifications peut être rapide. De plus, les individus qui se sont déplacés sur de longues distances ont dû rencontrer plusieurs barrages, ce qui pourrait confirmer que le desman des Pyrénées est capable de traverser ou de contourner ces obstacles, comme il a été suggéré par Chora & Quaresma (2001).

Cette étude confirme que le génotypage de fèces est une méthode fiable pour identifier des desmans des Pyrénées, en addition ou substitution au piégeage, afin d'effectuer un suivi individuel. Toutefois, plusieurs améliorations semblent nécessaires comme le sexage des animaux à partir des fèces ou l'étude à plus long terme sur la capacité de mouvement à longue distance, et les raisons de celle-ci. Enfin, les chiffres observés sur de courts segments démontrent que la rivière Aude et son bassin constituent un habitat approprié pour le desman des Pyrénées et devraient être d'une attention particulière pour la conservation de cette espèce

Article 6

Genetic monitoring of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in the Aude river, France

François Gillet^{1,2,3}, Bruno Le Roux⁴, Frédéric Blanc³, Aurélie Bodo⁴, Christine Fournier-Chambrillon⁵, Pascal Fournier⁵, Frédéric Jacob⁶, Vincent Lacaze⁷, Mélanie Némoz³, Stéphane Aulagnier² & Johan R. Michaux¹

¹ Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

² Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), Institut National de la Recherche Agronomique, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

³ Conservatoire d'Espaces Naturels de Midi-Pyrénées, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse Cedex 3, France

⁴ Fédération Aude Claire, 32 Rue des Augustins, 11300 Limoux, France

⁵ Groupe de Recherche et d'Etudes pour la Gestion de l'Environnement (GREGE), Route de Préchac, 33730 Villandraut, France

⁶ EDF, Centre d'Ingénierie Hydraulique, Savoie Technolac, 73373Le Bourget du Lac, France

⁷ Association des Naturalistes d'Ariège, Vidallac, 09240 Alzen, France

Article à soumettre dans Belgian Journal of Zoology

Abstract

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and the northern half of the Iberian Peninsula. This species is currently considered as vulnerable in the IUCN Red List and has been suffering from habitat loss and fragmentation for decades but little information is known about the impact of water flow modifications induced by hydroelectric power plants. In order to address this issue an individual monitoring of Pyrenean desmans, living in an harnessed section of the Aude river, was performed by genotyping both faeces samples and hair of live-trapped animals. During a three year study (2011-2013), a total of 39 individuals were identified using 24 microsatellite loci, 28 from faeces and 11 from trapped animals. Several long distance movements were evidenced up to at least 15km, a distance which has never been reported before. These movements might be related to the modifications of river bed caused by the very high water flows that occurred during the repairing of the Nentilla hydroelectric plant. The local population density suggests that the Aude river is a suitable habitat for the Pyrenean desman and its preservation should be a priority for the conservation of this species.

Keywords conservation; *Galemys pyrenaicus*; genetic; microsatellites; monitoring

Introduction

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a small semi-aquatic mammal endemic to the Pyrenean Mountains and the northern half of the Iberian Peninsula where it lives in mountain streams of cold and well-oxygenated flowing waters (Nores et al., 2007). This species is considered as vulnerable in the IUCN Red List (Fernandes et al., 2008). The ecology and biology of this species are poorly known, notably because of its elusive behaviour and its primarily nocturnal activity (Stone, 1987a; Bertrand, 1994). However, scientists agree that this species, like other species living in mountain streams, has been suffering from fragmentation and habitat loss, due to the increase of human impact on nature. An example of the human impact on rivers is the construction and the functioning of hydroelectric power plants. These can lead to physical and biotic modifications and they can alter both hydrologic and thermal regimes, impacting macro-invertebrates benthonic larvae resources (Queiroz et al., 1992; Céréghino and Lavandier, 1997). Although weak information is available for the Pyrenean desman, these detrimental effects have been studied and highlighted by various authors on mammals and birds (Nilsson and Dynesius, 1994; D'Amico et al., 2000). In France, the Aude river has been deeply impacted by the hydroelectric plant of Nentilla, and particularly by its recent repairing that induced modifications of water flows. The monitoring of Pyrenean desmans living in the section of the river, downstream from the hydroelectric plant, was therefore an opportunity to evaluate the potential impacts of these modifications on this species.

The presence of the Pyrenean desman can be essentially detected by two methods: faeces sampling and live-trapping. These were tested and compared in previous studies (Nores et al., 1998; González-Esteban et al., 2003). While live-trapping is heavy to implement and potentially at risk for the species, faeces sampling is non-invasive but should be foresighted. Specifically, some mistakes can easily occur when collecting samples. Indeed, the Pyrenean desman shares its habitat and diet with other semi-aquatic vertebrate species and therefore faeces can be confounded when they are not fresh or have been in contact with water. However, a recent reliable and non-invasive method was developed to easily distinguish faeces of the Pyrenean desman from these other species (Gillet et al., 2015b). Moreover, genotyping of faeces with microsatellite markers can be used to survey populations or to monitor individuals of rare mammal species (Taberlet et al., 1997; Eggert et al., 2003; Mondol et al., 2009a, 2009b). Therefore, we performed an individual monitoring of Pyrenean

desmans living in the section of the Aude river impacted by the Nentilla hydroelectric plant by combining the genotyping of faeces samples and hairs of live-trapped animals.

Material and methods

Sampling protocol

Three sampling campaigns of faeces were conducted: between January and April 2011, between March and July 2012 and between July and August 2013 respectively. The dates were not fixed since faeces sampling was dependent on the weather and the river flows. Along 20 km of the Aude river, ten 300 m-long segments were surveyed twice a year (Figure 1).

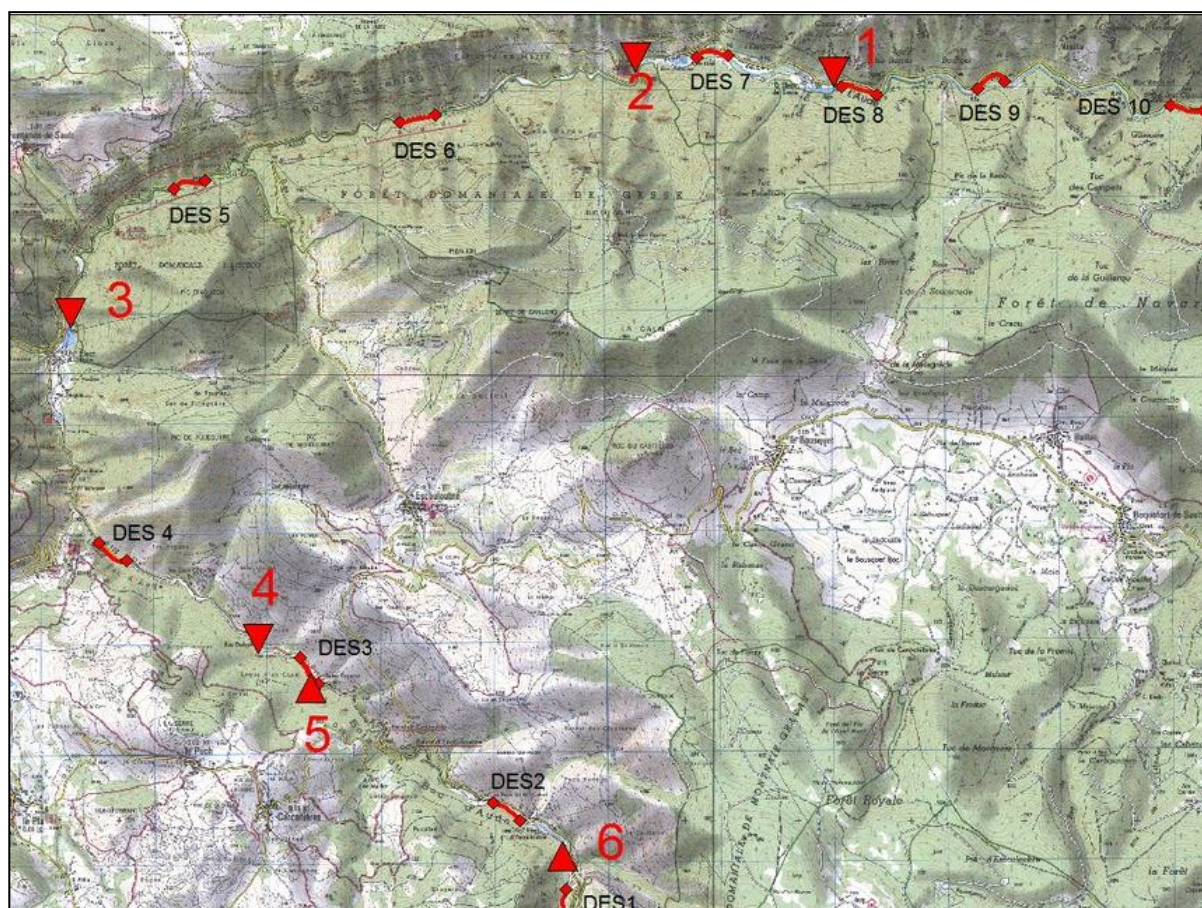


Figure 1. Map of the study area showing the ten river segments (DES1 to DES10) and different obstacles (red arrows) along the Aude river. All obstacles are water intakes of different heights: 3 m, 1 m, 9 m, 1 m, 75 cm and 2 m for obstacles 1 to 6, respectively.

During the first campaign, each faeces sample was collected in a small tube (1.5 ml) fitted in a larger one containing silica-gel. During the second and third campaigns, faeces were collected in tubes (1.5 ml) containing absolute ethanol. The geographic position of each faeces was recorded on a GPS device.

Additionally, trapping sessions were conducted in three segments (DES3, DES7 and DES9, Figure 1) during six nights (two nights per segment) in September 2011, 2012 and 2013. Each trapping segment was extended to 900 m long or lower (depending on the accessibility to the river) and was divided in sub-segments of 300 m long or lower. The traps, formed by two modified fish-traps hooked to each other, were set up in the most homogeneous way, without fixing arbitrary distances between them. Traps were laid where the strongest water flow occurred, in the river or near the banks, with the entrance facing the water flow and the rear portion out of the water to form a repository for the trapped Pyrenean desman. They were laid late in the day (18:00) and removed early in the next morning (4:00). Traps were checked every hour. Captured Pyrenean desmans were weighed, sexed, eventually marked with varnish on claws of a hind leg or with a transponder, and a hair sample was taken, which was immediately placed in a 1.5 ml tube containing absolute ethanol. Hair samples were collected under licenses delivered by the French Government: n° 2011221-0004 for Aude department and n° 2011-INT/01 for Ariège department. Animals were then released at the site of capture. A post-trapping sampling of faeces was achieved each time in the three segments.

Sampling and DNA extraction

Genomic DNA from hair and faeces samples preserved in ethanol were extracted using the QIAmp DNA Micro Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and the Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), respectively, all following the manufacturer's instructions. To avoid any cross contamination, DNA extractions from faeces samples were conducted in a separated room with an UV-sterilised platform where no Pyrenean desman tissue samples were previously treated.

DNA amplification

Identification of Pyrenean desman from faeces was ascertained by amplification of a small cytochrome b fragment, as described in Gillet et al. (2015b). Then hair samples and faeces were genotyped at 24 variable microsatellite loci (Table 1) using the multiplex sets and PCR conditions reported in (Gillet et al., 2015a), with slightly modified conditions for faeces

samples, PCRs being carried out in 10µl volume containing 0.15 of each 20µM primers, 7.5µl of Multiplex PCR kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and 5µl of DNA. Amplified DNA was analyzed for length variations on an ABI 3700 sequencer using GeneScan 500LIZ[®] size standard and alleles were scored on GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

In order to prevent genotyping errors in our dataset, consensus genotypes had to be constructed for faeces samples. For this, we used a modified multitube PCR approach (Taberlet et al., 1996) and we repeated four times each PCR. Scoring alleles were accepted if they appear at least three times out of the four PCRs.

Statistical analysis

Each replicate genotype was compared with the consensus genotype to quantify the error rates; both the construction of the consensus genotype and the quantification of error rates such as false alleles (FA) and allelic dropouts (ADO) were performed using GIMLET v1.3.3 (Valiere, 2002). The probability of identity among siblings PIDsibs, i.e. the probability that two related individuals have the same genotype (Waits et al., 2001), was estimated using GIMLET v1.3.3. MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to estimate the proportion of null alleles (NA).

Results

A total of 131, 160 and 150 putative faeces of Pyrenean desman were collected in 2011, 2012 and 2013 respectively. In addition, 7, 2 (one new individual and one recapture) and 3 individuals were trapped for the same years, respectively (Table 2). Out of the 441 collected faeces, 267 were assigned to the Pyrenean desman after sequencing a small cytochrome b fragment, and 204 (64, 80 and 60 in 2011, 2012 and 2013 respectively) were genotyped for microsatellite loci (Table 2). The mean proportion of positive PCRs was 81%, ranging from 47% to 93% among loci and from 39% to 100% among samples. The mean Allelic Dropout (ADO) rate was 0.06, ranging from 0 to 0.26, and the mean false allele (FA) rate was 0.01, ranging from 0 to 0,014 (Table 2). Other error types than ADO or FA were also detected but as they exhibited very low rates (<0.001), we considered them as negligible. MICRO-CHECKER did not detect any significant bias in our dataset that could be attributed to null alleles (Table 1). A total of 28 additional individuals were identified from faeces with a PID (sibs) of $4.46e^{-03}$.

Table 1. Genotyping 24 microsatellite loci in Pyrenean desman of the Aude river (France). Null allele frequency (NAF), rates of positive PCR (PCR+), allelic dropout (ADO) and false allele (FA) for each locus.

Locus	NAF	PCR+	ADO	FA
GpyrGS06	0.13	0.77	0.00	0.09
GpyrGS07	0.00	0.74	0.00	0.000
GpyrGS10	0.00	0.77	0.06	0.013
GpyrGS11	0.02	0.78	0.07	0.000
GpyrGS12	0.00	0.82	0.00	0.000
GpyrGS13	0.10	0.89	0.00	0.000
GpyrGS18	0.00	0.80	0.00	0.000
GpyrGS20	0.00	0.74	0.00	0.014
GpyrGS22	0.07	0.82	0.21	0.000
GpyrGS23	0.00	0.79	0.05	0.000
GpyrGS30	0.00	0.77	0.00	0.000
GpyrGS32	0.00	0.81	0.17	0.000
GpyrGS33	0.20	0.74	0.10	0.000
GpyrGS34	0.00	0.79	0.26	0.000
GpyrGS41	0.00	0.92	0.21	0.000
GpyrGS46	0.12	0.87	0.00	0.000
GpyrGS47	0.08	0.87	0.00	0.000
GpyrGS53	0.16	0.87	0.00	0.000
GpyrGS55	0.00	0.83	0.00	0.000
GpyrGS74	0.09	0.84	0.00	0.000
GpyrGS75	0.07	0.87	0.00	0.000
GpyrGS80	0.00	0.88	0.00	0.000
GpyrGS82	0.15	0.47	0.25	0.000
GpyrGS94	0.00	0.93	0.00	0.000

Nineteen individuals were identified in 2011, seven were trapped (four males and three females) and twelve were identified from faeces. Furthermore, two trapped animals were identified again from faeces in the same segments (DES3 and DES9), two and three days after their capture respectively. One individual, identified from faeces, was found 4.8 km upstream from DES9 (on May 3), in DES6 (on June 9).

Nine new individuals were identified in 2012, one (female) was trapped and eight were identified from faeces. In addition, one individual (female) trapped in 2011 was recaptured in 2012 (Table 2). Two animals identified in 2011 were identified again from faeces collected in 2012. The first one was found 16.2 km upstream from DES7 (on September 20, 2011), in

DES1 (on July 13, 2012). The second was found 17.8 km upstream from DES9 (on September 20, 2011), in DES2 (on September 7, 2012).

Eleven new individuals were identified in 2013, three (females) were trapped and eight were identified from faeces. One animal identified in 2011 was identified again in 2013 in the same river segment (DES3). One of the three trapped individuals was identified from faeces collected two months before its capture. Finally, the short-term movement of one individual was evidenced, as it was found 1.6 km downstream from DES8 (on August 20), in DES9 (on August 28).

The number of individuals identified per river segment and per year is given in Table 1. The river segments DES3, DES7 and DES9 hosted 8, 9 and 11 individuals, respectively. No desman was found in three segments: DES5, DES10 and DES13.

Table 2. Number of collected faeces / number of faeces belonging to the Pyrenean desman / number of genotyped faeces / number of identified individuals of Pyrenean desman (**in bold**), per river segment and per year in the Aude river (France). Trapping sessions occurred in segments DES3, DES7 and DES9. Numbers in brackets are trapped individuals that are included in the total number of identified individuals. “*” indicates one individual trapped in 2011 that was recaptured in 2012.

	DES1	DES2	DES3	DES4	DES5	DES6	DES7	DES8	DES9	DES10	Total
2011	3/3/3/1	0	14/13/13/ 5 (1)	0	9/0	6/0	42/16/14 /7 (3)	8/5/5/0	42/29/29/ 6 (3)	7/0	19
2012	53/37/37 /2	38/27/ 27/2	5/3/3/0	1/1/1/ 0	14/0	11/4/4/ 2	7/4/4/ 1	11/1/1/ 0	6/2/2/ 3 (1) (1*)	14/1/1/0	9
2013	35/31/8/ 0	35/30/ 7/0	34/16/9/ 3 (1)	6/6/6/ 1	6/6/6/0	9/9/6/ 2	8/8/6/ 1 (1)	6/6/6/ 1	8/8/5/ 3 (1)	3/1/1/0	11
Total	3	2	8 (2)	1		4	9 (4)	1	11 (5)	0	39

Discussion

According to our results, the genotyping of the 24 microsatellites proved to be a reliable technique to identify Pyrenean desmans and to implement individual monitoring as several animals were found one or two years after being first identified. However, the results of this technique are highly dependent on the freshness, and the size of faeces, at the time of collecting. Indeed, Pyrenean desman faeces are generally small (10 to 15 mm long and 4 to 8 mm wide, Bertrand 1993) and the contained DNA is quickly degrading in nature due to water and UV radiations. Genotyping faeces can also be seen as complementary to the trapping of individuals as it is without risk to harm the animals and requires less field workforce. On the other hand, the trapping of Pyrenean desmans can provide more information on the individuals like their sex, size, body mass, etc.

The three yearly sessions of faeces sampling and trapping successfully lead to the identification of 39 individuals along the 20 km of the Aude river. Eleven individuals were trapped among which 4 males and 7 females were identified. The other 28 individuals identified from faeces could not be sexed and therefore the sex-ratio could hardly be representative of the population. The highest number in a 300 m segment of river was found in 2011 in DES7 ($n = 7$), followed by DES9 ($n = 6$) and DES3 ($n = 5$). However these results could be impacted by the time of sampling and the water flows. Moreover, all collected faeces could not be genotyped and therefore the number of animals could be underestimated in other segments and/or years. As the length of the sampled river segments is within the order of magnitude of reported home ranges (Stone, 1987b; Silva, 2001; Gisbert and Garcíá-Perea, 2004; Melero et al., 2012), these high numbers of Pyrenean desman per segment could support the results of Melero et al. (2012, 2014) concerning the social behaviour of this species and the overlapping of home ranges.

Movements of four individuals were evidenced during this study as they were found at distances of 1.6 km, 4.8 km, 16.2 km and 17.8 km, eight days, one month, ten months and one year later, respectively. Although several distances between rest sites have been reported (Melero et al., 2012), long-distance movements have never been recorded before for the Pyrenean desman. Stone (1987a) showed that populations of Pyrenean desman were composed of sedentary and erratic individuals, the latter being mainly juveniles and solitary adults. As the four individuals mentioned above were identified from faeces, we have no information on their sex or age. These movements could be related to modifications of the

river during the repairing works. Indeed, from November 2011, very high water flows have been observed downstream from the segment DES2 and they have profoundly impacted the river bed. Therefore some individuals may have moved upstream to find some more suitable habitat, notably in the less impacted segments DES1 and DES2. This also means that the Pyrenean desman can afford dispersal when its habitat is impoverished and that its response can be quick. In addition, individuals which moved over long distances should have encountered hydraulic plants or dams on their way. This could confirm that the Pyrenean desman is able to cross over such obstacles, as it was previously suggested (Chora and Quaresma, 2001).

Conclusion

This study supports the genotyping of faeces as a reliable method to identify Pyrenean desmans in addition or substitution to trapping in order to perform individual monitoring. However, sexing the animals should be investigated while ageing will remain impossible, making difficult direct studies of population dynamics. Several movements of individuals evidenced that Pyrenean desmans can travel long distances. This new and unexpected finding is particularly interesting in terms of conservation. However, a longer term study is required to investigate the reason of this dispersal. Finally, the observed numbers on short segments demonstrate that the Aude river, and its basin, are a suitable habitat for the Pyrenean desman and that it should be of particular attention concerning the conservation of this species.

Acknowledgments

We deeply thank the Fédération Aude Claire who collected faeces samples. We are grateful to the following people who helped us during the trapping sessions and particularly: Alain, Bertrand, Olivier Billard, Patrick Bodo, Cathie Boléat, Anaïs Charbonnel, Sarah Perré, Gabrielle Rosenau. This study is part of the “Plan National d’Actions en faveur du Desman des Pyrénées” and the LIFE+ Desman (LIFE13NAT/FR/000092) which are coordinated by the Conservatoire d’Espaces Naturels de Midi-Pyrénées (CEN-MP) and are financially supported by the following structures: European Union Funding Network (ERDF and LIFE+), Agence de l’eau Adour-Garonne, Agence de l’eau Rhône-Méditerranée-Corse, DREAL Aquitaine, Midi-Pyrénées, and Languedoc-Roussillon, Conseil Régional Aquitaine, Midi-Pyrénées and Languedoc-Roussillon, Conseil Général des Pyrénées-Atlantiques, de l’Aude et des Pyrénées-Orientales, EDF, SHEM, Patagonia, Parc National des Pyrénées, ANRT

(Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). F. Gillet is supported by a French research fellowship provided by the ANRT (CIFRE N° 2011/1571).

References

- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire de desman des pyrénées *G. pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse, 217p.
- Bertrand, A., 1993. Découvrir le Desman des Pyrénées, Ed. A.N.A., 32 p.
- Céréghino, R., Lavandier, P., 1997. Influence des éclusées hydroélectriques sur la distribution et le développement larvaire des Diptères Simuliidae d'une rivière de moyenne montagne. Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie. doi:10.1016/S0764-4469(97)82775-8
- Chora, S.C., Quaresma, C.M., 2001. Desman, *Galemys pyrenaicus*, Geoffroy 1811 : spatial use patterns and ability to transpose the Fráguas small hydro (Paiva river, Douro Basin). 4èmes rencontres sur le Desman des Pyrénées, 18-20 octobre 2001, Moulis : 6 p.
- D'Amico, F., Manel, S., Mouches, C., Ormerod, S.J., 2000. River birds in regulated rivers : cost or benefit ? Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 167–170.
- Eggert, L.S., Eggert, J. a., Woodruff, D.S., 2003. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. Mol. Ecol. 12, 1389–1402. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01822.x
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. IUCN Red List Threat. Species. Version 2013.2.
- Gillet, F., Cabria, M.T., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Némoz, M., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015a. In prep. Isolation, characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite markers in the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus*.
- Gillet, F., Cabria, M.T., Némoz, M., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015b. In press. PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA. Mammalia. doi:10.1515/mammalia-2014-0093
- Gisbert, J., Garcíá-Perea, R., 2004. Estudio cuantitativo sobre la población de Desmán Ibérico en el valle del Ambroz y Topillo de Cabrera en el norte de Extremadura. Junta de Extremadura, 400 pp.
- González-Esteban, J., Villate, I., Castien, E., 2003. A comparison of methodologies used in the detection of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). Mamm. Biol. 68, 387–390.
- Melero, Y., Aymerich, P., Luque-Larena, J.J., Gosálbez, J., 2012. New insights into social and space use behaviour of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). Eur. J. Wildl. Res. 58, 185–193. doi:10.1007/s10344-011-0561-7

- Mondol, S., Karanth, K.U., Kumar, N.S., Gopaldaswamy, A.M., Andheria, A., Ramakrishnan, U., 2009a. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biol. Conserv.* 142, 2350–2360. doi:10.1016/j.biocon.2009.05.014
- Mondol, S., Navya, R., Athreya, V., Sunagar, K., Selvaraj, V.M., Ramakrishnan, U., 2009b. A panel of microsatellites to individually identify leopards and its application to leopard monitoring in human dominated landscapes. *Bmc Genet.* 10. doi:79 10.1186/1471-2156-10-79
- Nilsson, C., Dynesius, M., 1994. Ecological effects of river regulation on mammals and birds: A review. *Regul. Rivers Res. Manag.* 9, 45–53. doi:10.1002/rrr.3450090105
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., Gonzalez, J., Cano, J.M., Garcia, E., 1998. Estimating the population density of *Galemys pyrenaicus* in four Spanish rivers. *J. Zool.* 246, 454–457.
- Nores, C., Queiroz, A.I., Gisbert, J., 2007. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811)., in: Palomo, L., Gisbert, J., Blanco, J. (Eds.), *Atlas Y Libro Rojo de Los Mamíferos Terrestres de España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad - SECEM - SECEMU, pp. 92–98.
- Queiroz, A.I., Alves, M.H., Almada, V., 1992. The small hydroplants : predicted impacts on the Pyrenean desman populations (*Galemys pyrenaicus*. Geoffroy)., in: *Proceeding Meeting on the Pyrenean Desman*. Lisboa, pp. 69–77.
- Silva, E., 2001. Estudo da capacidade de transposição de obstáculo do rio Ardena pela toupeira de água (*Galemys pyrenaicus*). Relatório de Estágio para obtenção da licenciatura em Biologia, pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Stone, R.D., 1987a. The activity pattern of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) (Insectivora : Talpidae), as determined under natural condition. *J. Zool. London* 213, 95–106.
- Stone, R.D., 1987b. The social ecology of the Pyrenean desman as revealed by radiotracking. *J. Zool.* 212, 117–129.
- Taberlet, P., Camarra, J.J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L.P., DuboisPaganon, C., Burke, T., Bouvet, J., 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.* 6, 869–876.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 3189–94.
- Valiere, N., 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Mol. Ecol. Notes* 2, 377–379. doi:10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Waits, L.P., Luikart, G., Taberlet, P., 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.* 10, 249–56.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE



1. Mise au point de nouvelles techniques d'études du desman des Pyrénées

L'objectif cette thèse était de renforcer les connaissances sur la biologie et la génétique de la conservation du desman des Pyrénées et notamment mieux connaître la structure de ses populations le long de la chaîne pyrénéenne française. Pour améliorer ces connaissances, notre premier objectif a été de mettre au point plusieurs outils génétiques permettant d'apporter une série d'informations inédites concernant la distribution du desman, sa structure génétique et même son régime alimentaire. La méthode d'identification par PCR-RFLP, la mise au point de 24 marqueurs microsatellites polymorphes et la méthode de barcoding associée au séquençage Ion Torrent, développés dans le **chapitre 3**, ont ainsi permis de répondre à ces objectifs, voire de les dépasser à l'exception de la mise au point d'un marqueur du sexe.

1.1 L'identification génétique du desman des Pyrénées et ses applications

De par sa discrétion et son activité essentiellement nocturne (Stone, 1987a; Bertrand, 1994; Melero et al., 2012, 2014), l'observation directe du desman des Pyrénées est difficile. Cependant, la détection est primordiale pour réaliser des études sur une espèce, qu'elles soient biologiques, génétiques, démographiques, écologiques ou autres, mais également pour avoir une meilleure connaissance de sa répartition et pouvoir évaluer son statut de conservation. Le desman des Pyrénées étant une espèce protégée, sa capture est réglementée et n'est pas toujours appropriée du fait du risque potentiel qu'elle peut engendrer et de la lourdeur du dispositif, y compris humain, qui doit être mis en place. La récolte des fèces s'avère alors être une bonne méthode alternative ou complémentaire mais qui peut être source de confusion avec d'autres espèces lors de l'identification des fèces.

Les méthodes d'identification génétique développées au cours de cette thèse ont permis l'identification certaine du desman des Pyrénées, à partir de fèces récoltées sur le terrain, et de ce fait d'éviter les possibles confusions avec d'autres espèces.

L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction de la méthode PCR-RFLP se révèle être une technique peu coûteuse, relativement simple et fournissant des résultats très rapidement. Ceci la rend donc très utile pour une simple identification comme il avait déjà été montré lors d'études précédentes (Wolf et al., 1999; Gomez-Moliner et al., 2004). Cependant,

cette méthode ne donne que très peu d'informations sur la diversité génétique du desman des Pyrénées et encore moins sur la signature génétique individuelle. Les méthodes basées sur le séquençage permettent, par contre, d'apporter ce type d'informations en plus de l'identification de l'espèce.

Les méthodes développées dans l'**article 1** ont notamment été utilisées pour valider génétiquement un lot de fèces de desman des Pyrénées collectées entre 2011 et 2013 dans 131 sites du bassin versant du Haut-Salat et qui ont servi à l'étude de l'influence de variables environnementales sur les probabilités de détection et d'occupation de l'espèce à cette échelle (Charbonnel et al., 2015) (**Annexe 1**). Cette étude, réalisée dans le cadre de la thèse d'Anaïs Charbonnel portant sur l'influence multi-échelle des facteurs environnementaux dans la répartition du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) en France, a notamment permis de mettre en évidence une influence positive de l'hétérogénéité en substrats et abris du lit mineur, sur la probabilité de détection des fèces de desman des Pyrénées. De plus, la probabilité d'occupation de l'espèce était plus élevée dans des cours d'eau présentant de nombreux affluents et où les débits étaient plus forts. Par contre, l'influence des conditions climatiques s'est avérée négligeable à cette échelle. Enfin, la distribution spatiale du desman des Pyrénées dans le bassin versant du Haut-Salat s'est également révélée structurée par sous-secteur hydrographique (Charbonnel et al., 2015).

Ces méthodes sont donc d'application directe pour réaliser des études écologiques sur le desman des Pyrénées. Cependant, elles ne sont pas toujours appropriées dans le cas où le nombre d'échantillons à traiter est important. En effet, la méthode RFLP ou le séquençage Sanger classique peuvent alors vite devenir contraignant, surtout à une époque où les méthodes de séquençage de nouvelle génération sont en plein essor et où la capacité d'analyse augmente régulièrement tandis que leur coût diminue.

Au cours de cette thèse, le nombre d'échantillons a augmenté au fur et à mesure des prospections et une méthode d'identification plus performante, utilisant un petit fragment du gène mitochondrial COI et un séquençage à haut débit Ion Torrent (Life Technologies), a donc été mise au point (**article 3**). Cette méthode a permis d'identifier facilement et rapidement le desman des Pyrénées à partir d'un grand nombre d'échantillons (~1000). De plus, contrairement aux méthodes décrites dans l'**article 1** qui ne ciblaient que les espèces écologiquement proches du desman des Pyrénées, l'amplification du fragment de COI a permis d'identifier un panel beaucoup plus large d'espèces hôtes, dont des oiseaux et des

amphibiens. Ceci a été possible notamment grâce à l'universalité des amorces utilisées et le nombre de séquences de référence disponibles dans la base données BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007). L'identification d'autres espèces hôtes confirme par ailleurs la difficulté d'identifier correctement les fèces de desman des Pyrénées mais également l'utilité de cette méthode d'identification pour étudier cette espèce dans les meilleures conditions.

Cette méthode a été utilisée pour valider génétiquement la présence du desman des Pyrénées, dans près de 250 tronçons de rivière, sur plus de 1300 prospectés, répartis sur l'ensemble des Pyrénées françaises (Charbonnel, 2015). Les résultats de cette étude permettent d'actualiser la carte de répartition de l'espèce (la dernière datant des années 1990 (Bertrand 1994)) et mettent en évidence un gradient est-ouest de probabilité d'occupation du desman des Pyrénées avec des probabilités élevées plus nombreuses à l'est (notamment à l'est de l'Ariège, dans le sud de l'Aude et l'ouest des Pyrénées-Orientales) qu'à l'ouest. L'extrême est, tout comme l'extrême ouest et les parties les plus en aval du massif, se montrent fortement défavorables à la présence du desman des Pyrénées. De plus, les facteurs climatiques et hydrographiques semblent influencer fortement la probabilité d'occupation de l'espèce à cette échelle, contrairement aux facteurs terrestres à proximité du cours d'eau qui présentent un effet négligeable (i.e. occupation du sol).

Ces validations génétiques de la présence du desman des Pyrénées ont également pu être utilisées dans une autre étude, dont l'objectif était d'étudier de façon rigoureuse l'utilisation de l'habitat local du desman des Pyrénées, en se focalisant sur des descripteurs fins des cours d'eau et de son environnement terrestre immédiat (i.e. lit majeur) (Biffi et al., 2015). Pour cette étude, d'éventuelles différences d'utilisation de l'habitat dans trois grandes régions hydro-géographiques des Pyrénées françaises (i.e. Atlantique, Garonne, Méditerranée) ont été explorées par une approche comparative. Les résultats ont mis en évidence que la sélection de l'habitat par le desman des Pyrénées est significative pour les trois régions, ce qui suggère que cette espèce montre une préférence pour certains habitats et que sa répartition spatiale est liée aux conditions environnementales locales (i.e. sa répartition ne se fait pas de manière aléatoire dans la zone). De plus, la marginalité de sa niche écologique diminue d'ouest en est, signifiant que les conditions moyennes utilisées par l'espèce se rapprochent de celles de l'ensemble de la région située à l'est de la chaîne pyrénéenne. Cependant, les valeurs d'hétérozygotie et de richesse allélique des trois clusters identifiés dans cette thèse sont trop similaires pour déduire un lien avec cette sélection de l'habitat pour le moment. Enfin, il ressort de cette étude que le desman des Pyrénées présente une niche écologique étroite (i.e.

3.9 à 7.4 fois plus étroite que l'habitat disponible selon la région). Il peut donc être considéré comme une espèce spécialisée selon les variables d'habitat local considérées dans cette étude (Biffi et al., 2015).

1.2. Identification génétique et problèmes liés à l'ADN

Les méthodes d'identification génétique décrites dans les **articles 1 et 3** ont donc démontré leur utilité pour le desman des Pyrénées, notamment dans le cadre d'études portant sur sa distribution, sa probabilité d'occupation ou sa sélection de l'habitat, s'intégrant directement dans la stratégie de conservation de cette espèce menacée.

Cependant, ces méthodes d'identification sont extrêmement dépendantes de la qualité et de la quantité de l'ADN contenu dans les fèces récoltées. En effet, sur les 1792 fèces analysées lors de cette thèse, 43% (769) n'ont permis aucune identification tandis que respectivement 48% (853) et 9% (170) de celles-ci ont permis l'identification du desman des Pyrénées et d'autres espèces hôtes. Par conséquent presque la moitié des échantillons récoltés n'ont pas pu être exploitables lors cette thèse étant donné une quantité trop faible ou une dégradation trop importante de l'ADN. De plus, la concentration de l'ADN dans l'extraction et la réussite de l'amplification concordait rarement, l'ADN étant très probablement trop fragmenté. Cette dégradation de l'ADN peut s'accélérer dans la nature du fait de la chaleur, des rayonnements UV ou encore de l'humidité (Dizdaroglu, 1992; Lindahl, 1993). Le desman des Pyrénées déposant, en majorité, ses fèces sur des rochers ou morceaux de bois émergeant du cours d'eau, celles-ci sont généralement exposées à ces trois facteurs. Le temps passé entre le dépôt des fèces et leur collecte est donc un facteur déterminant. Mais ce n'est pas le seul puisque la taille joue également un rôle, particulièrement pour cette espèce dont les fèces sont assez petites, la longueur variant de 10 à 15 mm et la largeur de 4 à 8 mm (Bertrand, 1993). La portion d'ADN contenue dans ces fèces peut être très faible et, par conséquent, il faut être extrêmement prudent lors des manipulations. Les échantillons doivent notamment être préservés de manière adéquate (dans de l'éthanol absolu et à -20°C), et ne pas être contaminés par de l'ADN étranger (Frantzen et al., 1998; Taberlet et al., 1999). De plus, la quantité d'ADN contenue dans ces fèces peut être encore plus faible lorsqu'il n'a pas été possible de récolter un excrément complet, ce qui est courant. Mais la taille des fèces n'est pas que limitante au niveau de la quantité d'ADN, elle l'est également au niveau de la reproductibilité de la phase d'extraction puisque l'intégralité de l'excrément doit être utilisé,

sauf dans de très rares cas. Chaque échantillon est donc à usage unique et ne peut donc être réutilisé en cas d'extraction médiocre ou d'absence d'amplification lors de la PCR.

Enfin, le taux d'amplification obtenu avec les méthodes décrites dans l'**article 1** (RFLP et séquençage) (57%) était plus faible par rapport à d'autres études similaires (Wolf et al., 1999; Gomez-Moliner et al., 2004; Bidlack et al., 2007; Ishihara et al., 2010; Jiang et al., 2011; Wadley et al., 2013). Cependant, celles-ci ont été réalisées sur des espèces de plus grande taille et donc avec des échantillons de fèces plus importants également. De plus, étant donné que ces validations génétiques ont été utilisées pour d'autres études portant sur l'écologie de l'espèce (Biffi et al., 2015; Charbonnel, 2015; Charbonnel et al., 2015), les fèces de chaque tronçon prospecté ont dû être analysées, même si leur nombre était faible et leur taille petite.

1.3. Intérêt des marqueurs microsatellites

La mise au point de 24 marqueurs microsatellites polymorphes, décrite dans l'**article 2**, a permis de répondre à deux objectifs de cette thèse. Ces marqueurs ont en effet permis d'étudier la structure génétique du desman des Pyrénées à l'échelle des Pyrénées françaises et d'identifier de manière individuelle les desmans des Pyrénées vivant sur un tronçon de rivière particulier (**article 6**). Ces marqueurs ont démontré une nouvelle fois leur utilité pour mener à bien ce type d'études chez une espèce menacée, comme précédemment illustré chez l'ours brun, la loutre ou le vison d'Europe (Taberlet et al., 1997; Lorenzini et al., 2004; Michaux et al., 2005; Ferrando et al., 2008; Janecka et al., 2008; Janssens et al., 2008; Pérez et al., 2008; Pigneur et al., 2014).

Bien qu'elle ait porté ses fruits, cette création d'amorces spécifiques pour des marqueurs microsatellites n'est pas chose aisée puisque plusieurs critères doivent être respectés. Il faut notamment, dans la mesure du possible, sélectionner un microsatellite dont la séquence est ininterrompue (ex : 5'-CACACACACACACA-3') et qui est encadré par des segments d'ADN relativement conservés et stables afin de pouvoir créer les amorces, celles-ci devant fonctionner chez une majorité d'individus de l'espèce étudiée. De plus, la partie du microsatellite ciblé ne doit pas être trop proche de la zone pour laquelle on veut créer une amorce (Selkoe and Toonen, 2006). Enfin, vu la faible diversité génétique du desman des Pyrénées (Igea et al., 2013), et les résultats non concluants d'une étude précédente faites sur un plus petit nombre d'amorces (Taberlet et al., 2011a), un grand nombre de celles-ci ont du être testées (94) afin d'atteindre un nombre de microsatellites polymorphes (24) pouvant répondre à nos objectifs. Cependant, le polymorphisme (entre 2 et 5 allèles par locus) et l'hétérozygotie

attendue (moyenne de $0,24 \pm 0,19$) de ces marqueurs sont toujours restés inférieurs comparés à d'autres espèces relativement proches (Ortega et al., 2005; Maldonado et al., 2006; McDevitt et al., 2009; Moska et al., 2012) ou semi-aquatiques (Moller et al., 2004; Michaux et al., 2005; Pertoldi et al., 2006; Cabria et al., 2007; Ferrando et al., 2008; Janssens et al., 2008; Centeno-Cuadros et al., 2011). Ceci est probablement le résultat d'une diversité génétique très faible chez ces populations de desmans des Pyrénées.

2. Structure génétique à l'échelle des Pyrénées françaises

Les résultats de cette étude ont mis en évidence trois populations de desman des Pyrénées génétiquement et géographiquement distinctes, situées dans l'est, le centre et l'ouest des Pyrénées avec un échantillonnage et des effectifs relativement équilibrés. De plus, une sous-structuration a également été découverte pour la population de l'ouest puisque trois sous-populations ont été mise en évidence.

Cette structure génétique complexe est une nouvelle donnée importante pour la conservation du desman des Pyrénées et n'avait pas pu être découverte par l'étude phylogéographique d'Igea et al. (2013). Celui-ci avait en effet proposé l'existence d'une population pyrénéenne unique qui aurait colonisé les Pyrénées après la dernière glaciation (~10.000 ans), à partir d'un refuge présumé situé dans les montagnes du Pays Basque espagnol, après un événement de goulot d'étranglement sévère. Toutefois, cette hypothèse a été déduite de très faibles niveaux de diversité génétique dans les séquences de marqueurs mitochondriaux (cinq haplotypes) et nucléaires (huit introns avec une diversité génétique moyenne (π) de 0,00034 et un maximum de trois allèles par intron). Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude, caractérisés par des taux plus élevés de mutation (Christian Schlötterer, 2000), ont permis de mettre en évidence une structure génétique plus récente pour cette espèce.

Selon nos analyses statistiques, l'origine de cette structure génétique pourrait remonter au Petit Age Glaciaire (PAG) (entre 1550 et 1850, bien que les limites ne soient pas totalement établies). Cette période a en effet été marquée par des températures nettement plus faibles ayant pu entraîner un glissement des populations de desman des Pyrénées vers de plus basses altitudes. Ce glissement aurait pu favoriser l'utilisation des habitats présents à ces plus basses altitudes, où les bassins versant sont plus séparés, ce qui aurait limité la dispersion des individus. En effet, cette espèce préfère des rivières avec des débits d'eau élevés, aujourd'hui

situées en haute altitude (Nores et al., 1992; Ramalhinho & Boa Vida, 1993; Queiroz et al., 1996; Charbonnel et al., 2015).

Enfin, la croissance de la population humaine du siècle dernier et, par conséquent, l'augmentation de l'impact humain sur la nature, ont également pu jouer un rôle dans la structuration génétique du desman des Pyrénées, en entraînant la perte d'habitat et la fragmentation des populations. Entre autres, la construction et le fonctionnement des centrales hydroélectriques peuvent conduire à une diminution de la continuité des cours d'eau, à des modifications physiques et biotiques, et peuvent modifier les régimes hydrologiques et thermiques, réduisant les ressources en larve de macro-invertébrés benthiques (Queiroz et al., 1992; Céréghino & Lavandier, 1997). Bien que l'information ne soit pas disponible pour le desman des Pyrénées, des effets négatifs ont été mis en évidence sur des mammifères et des oiseaux (Nilsson & Dynesius, 1994; D'Amico et al., 2000). De plus, le développement de l'hydroélectricité dans les Pyrénées françaises remonte au début du XXème siècle et la majorité des ouvrages a été construit entre 1930 et 1960. Ces dates pourraient donc coïncider avec l'apparition (il y a 60 à 80 ans) de la troisième population de desman des Pyrénées découverte dans cette étude. La construction et le fonctionnement de ces ouvrages auraient pu jouer un rôle dans la séparation des populations. L'influence des centrales hydroélectriques sur la répartition du desman des Pyrénées nécessite de faire l'objet d'études plus ciblées afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Cette structure génétique peut être rapprochée des résultats de Charbonnel (2015). Celle-ci a en effet mis en évidence un gradient est-ouest de probabilité d'occupation du desman des Pyrénées et des conditions moyennes d'habitat utilisé par le desman des Pyrénées se rapprochant de celles de la région située à l'est de la chaîne pyrénéenne. La présence d'habitats moins propices pour le desman dans l'ouest des Pyrénées pourrait expliquer la sous structuration populationnelle plus marquée dans cette région. Cependant, cette hypothèse devra être confirmée par une étude basée sur un échantillonnage plus conséquent de la région.

D'une manière générale cette structure génétique peut aussi être mise en relation avec la régression de la distribution de l'espèce en France, récemment mise en évidence par Charbonnel (2015). Cette régression pourrait être due aux changements environnementaux (climat, hydrologie et occupation du sol), cependant ceux-ci ne sont pas suffisants pour expliquer cette importante baisse de la probabilité de présence de l'espèce. D'autres facteurs ont donc très probablement dû agir pour induire une telle diminution de l'aire de distribution

de l'espèce, comme par exemple la fragmentation de ses habitats (Nores et al., 1992; Némoz and Bertrand, 2008; Gisbert and Garcíá-Perea, 2014), la pollution de l'eau, les interactions avec d'autres espèces (e.g. prédation par le vison d'Amérique, modification des communautés d'invertébrés benthiques) (Amalhinho and Boavida, 1993; Céréghino and Lavandier, 1997; Gisbert and Garcíá-Perea, 2003) ou encore les facteurs génétiques comme la perte de diversité ou la consanguinité). L'identification précise des facteurs à l'origine de cette contraction de l'aire de distribution du desman des Pyrénées paraît donc urgente et nécessaire pour la conservation de cette espèce.

3. Nouvelles données sur le régime alimentaire du desman des Pyrénées

Bien que des informations sur le régime alimentaire du desman des Pyrénées aient déjà été publiées par le passé (Trutat, 1891; Puisségur, 1935; Richard & Vallette-Vialard, 1969; Santamarina & Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994; Castién & Gosálbez, 1995; Fernández-Salvador et al., 1998), celles-ci demeuraient relativement peu précises. En effet, les études précédentes n'ont généralement été basées que sur un petit nombre de cadavres ou de fèces (sauf pour Bertrand 1994 qui avait analysé 521 fèces). Par ailleurs, ces études ont utilisé des approches morphologiques, ne permettant généralement pas d'identifier les proies à des niveaux taxonomiques au-delà de la famille.

L'analyse du régime alimentaire du desman des Pyrénées, basée sur un échantillonnage conséquent de 381 fèces et en utilisant une méthode de métabarcoding de l'ADN (selon la méthode de séquençage à haut débit Ion Torrent), a permis d'apporter de nombreuses nouvelles informations. Plus particulièrement, la composition des genres et espèces de proies a pu être étudiée de manière plus précise.

L'amplification d'un fragment du gène COI a fourni avec succès l'identification du desman des Pyrénées (et de ses proies), ainsi que d'autres espèces hôtes, dans 542 échantillons de fèces. Comme aucune amorce bloquante spécifique au desman des Pyrénées n'a été utilisée dans cette étude, ces résultats confirment la pertinence de l'utilisation de ce marqueur génétique, avec les méthodes de séquençage de nouvelle génération, pour les études de régime alimentaire (Piñol et al., 2014). De plus, l'identification d'autres espèces hôtes (amphibiens, mammifères, oiseaux) met en évidence l'utilité des amorces utilisées pour amplifier un panel

plus large d'espèces et donc leur application potentielle à celles-ci. Ces résultats confirment aussi la difficulté d'identifier morphologiquement les fèces de desman des Pyrénées et le risque de confusion avec celles provenant d'autres espèces vivant dans le même habitat, comme il a été montré dans l'**article 1**.

Grâce à un échantillonnage exhaustif, cette étude a permis de certifier la présence du desman des Pyrénées dans 381 échantillons fécaux parmi lesquels 120 espèces de proies ont été identifiées sans ambiguïté. La présence dans les montagnes pyrénéennes a pu être confirmée pour 77 des 120 espèces, et pour les sept espèces les plus fréquentes, grâce aux bases de données de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN) et de l'Office pour les Insectes et leur Environnement (<http://www.opie-benthos.fr>) et l'aide d'experts locaux. Bien que la présence de 43 espèces identifiées n'ait pu être confirmée, essentiellement en raison d'un manque de connaissances concernant leur distribution complète, ces résultats mettent en évidence la précision de l'identification et de la fiabilité de cette étude.

Les ordres et les familles d'invertébrés les plus fréquents (fréquence d'occurrence > 10 %) sont cohérents avec les résultats d'études antérieures (Puisségur, 1935; Peyre, 1956; Richard, 1986; Santamarina & Guitian, 1988; Santamarina, 1993; Bertrand, 1994; Castién & Gosálbez, 1995). Ephemeroptera, Plecoptera et Trichoptera sont les ordres les plus fréquents avec des occurrences légèrement plus élevées pour les deux premiers. La domination de l'ordre Ephemeroptera concorde avec les résultats de Santamarina & Guitian (1998) et Castién & Gosálbez (1995) mais pas avec ceux de Bertrand (1994) (dominance des Trichoptera). La fréquence d'occurrence de l'ordre Plecoptera est, par contre, plus élevée dans notre étude. La famille et l'espèce les plus fréquentes étaient Baetidae et *Baetis rhodani* respectivement, ce qui contraste avec les résultats d'études précédentes rapportant la prééminence de Hydropsychidae dans le régime alimentaire de *G. pyrenaicus* (Bertrand, 1994). La présence non négligeable de Gammaridae (17%) dans nos résultats concorde avec les observations de Puisségur (1935), Peyre (1956), Saint-Girons (1973) et Richard (1986) dans le bassin versant français, alors qu'elle contraste avec les résultats de Santamarina (1988) en Galice et Castién & Gosálbez (1995) en Navarre. Les six ordres, treize familles et treize genres les plus fréquents ne correspondent respectivement qu'à 28%, 17% et 10% du nombre total de taxons trouvés pour ces rangs taxonomiques. Le desman des Pyrénées semble donc être assez opportuniste dans sa quête de nourriture. La présence d'organismes exclusivement terrestres pourrait signifier qu'il utilise également les berges comme sites de chasse. Les berges ont été

identifiées comme une composante importante de la sélection de l'habitat par le desman des Pyrénées (Charbonnel, 2015). Cependant, il n'est pas possible de savoir si ces proies terrestres sont capturées directement dans leur environnement terrestre ou à la suite de leur chute dans la rivière. Il ressort également de cette étude que la consommation de poissons est très faible (0,5%). Cet élément, bien qu'il puisse paraître anecdotique, est important en termes de conservation et de communication auprès des pêcheurs et pisciculteurs.

L'analyse des biotraits des proies a permis d'identifier leurs habitats et donc les caractéristiques des zones de chasse du desman des Pyrénées. Les proies vivent principalement dans les zones amont des cours d'eau où le débit est moyen à fort. Ces résultats coïncident avec ceux d'autres études réalisées sur l'utilisation de l'habitat du desman des Pyrénées à l'échelle de son domaine vital (Nores et al., 1992; Queiroz et al., 1993; Ramalhinho & Boa Vida, 1993; Charbonnel, 2015; Charbonnel et al., 2015). Cette approche pourrait également confirmer l'hypothèse qu'il y aurait un lien entre la préférence de cette espèce pour les courants rapides et la disponibilité de ses proies (Charbonnel et al., 2015) (**Annexe 1**).

Cette approche par les biotraits a également identifié les proies du desman des Pyrénées comme principalement composées de taxons polluo-sensibles. Ces résultats sont en accord avec ceux de Santamarina (1988) et Bertrand (1994) et confirment le caractère fragile du desman des Pyrénées par rapport aux modifications de la qualité de l'eau. Même si nos résultats ont montré que le desman pouvait être assez opportuniste dans sa quête de proies, ils ont confirmé que son régime alimentaire était avant tout spécialisé. La qualité de l'eau qui influe sur l'abondance de ses proies préférentielles paraît être un élément important dans la distribution de cette espèce.

Enfin, bien que cette approche des biotraits, couplée à l'identification moléculaire des proies du desman des Pyrénées, aient apporté de nouvelles informations intéressantes, il semble particulièrement important de poursuivre les études à ce niveau. La mise en place d'un échantillonnage prenant en compte les saisons et des variables spatiales (altitude, géologie, etc.) pourrait rendre ces approches encore plus précises pour étudier les zones de chasse de cette espèce.

4. Suivi individuel de desmans des Pyrénées et déplacements associés

Le génotypage des 24 microsattellites, mis au point lors de cette thèse (**article 2**), a permis d'identifier des individus à la fois pour l'étude sur la structure génétique à l'échelle des Pyrénées mais également pour celle du suivi individuel de desmans des Pyrénées sur un tronçon de 20 km de l'Aude touché par des travaux entrepris par EDF sur la centrale hydroélectrique de Nentilla. Au total, 39 individus différents ont pu être identifiés sur ce tronçon. Ce type d'étude n'avait jamais été réalisé pour le desman des Pyrénées et a démontré qu'il était possible de réaliser un suivi de cette espèce avec ce type d'approche. En effet, plusieurs individus ont pu être ré-identifiés sur plusieurs années. Cependant, comme pour les méthodes d'identification, les résultats du génotypage sont dépendants de la qualité et de la quantité de l'ADN contenu dans les fèces récoltées. Sur 612 fèces analysées, seuls 100 individus ont pu être identifiés (16%). Ce faible rapport doit aussi être attribué au seuil de confiance utilisé dans la méthode multitube puisqu'un allèle était seulement validé lorsqu'il apparaissait au moins trois fois sur quatre répétitions de PCR. Cette étape diminue fortement le taux d'individus identifiés mais elle est néanmoins nécessaire car elle assure la fiabilité et la robustesse des résultats. Cette problématique liée au génotypage des fèces de desman des Pyrénées devra donc être prise en compte lorsque de prochaines études de suivi seront réalisées puisque un échantillonnage conséquent devra être réalisé afin de pouvoir détecter un maximum d'individus.

L'étude de la structure génétique du desman des Pyrénées a montré que malgré une limitation apparente du flux génique entre populations (F_{st} entre 0,2 et 0,35), certains individus possèdent des allèles de différents clusters et ceux-ci se chevauchent géographiquement à certains endroits. Si chez certaines espèces comme la loutre (Janssens et al., 2008; Pigneur et al., 2014) un tel résultat peut être interprété comme lié à une expansion récente des populations, les constats de régression du desman des Pyrénées au cours de ces dernières décennies ne nous invitent pas à retenir une telle hypothèse.

Cependant ce résultat pourrait confirmer que la génétique du desman des Pyrénées semble être peu influencée par le réseau hydrographique (Igea et al., 2013) et que sa dispersion pourrait être complexe (Melero et al., 2012, 2014). Celle-ci pourrait être plus lointaine que ne le laisse supposer la longueur des domaines vitaux (entre ~200 et ~600m, variable selon les

études) (Stone, 1987b; Silva, 2001; Gisbert & Garcíá-Perea, 2004; Melero et al., 2012, 2014) et être relativement indépendante des cours d'eau. Cependant, d'autres études devront être réalisées pour vérifier cette hypothèse.

Les mouvements de quatre individus ont pu être découverts lors de l'étude de suivi sur le tronçon de l'Aude. Ces individus ont parcouru des distances assez longues, allant jusqu'à 18km pour un individu retrouvé un an après sa première identification. Cette capacité de déplacement est une nouvelle information concernant cette espèce. En effet, même si plusieurs données étaient connues sur la taille des domaines vitaux (Stone, 1987b; Silva, 2001; Gisbert and Garcíá-Perea, 2004; Melero et al., 2012, 2014) ou les distances parcourues entre les sites de repos (entre ~100 et ~400m) (Melero et al., 2012, 2014), cette capacité de déplacement n'avait jamais été découverte auparavant.

Il est pour l'instant difficile de trouver les raisons de ces déplacements, cependant, plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Une première hypothèse serait que les individus ayant effectué ces déplacements étaient des juvéniles en dispersion ou des adultes solitaires. Ces individus ayant été identifiés par génotypage, aucune information sur leur âge ou leur sexe n'est disponible et il est donc difficile, à l'heure actuelle, de corréler ces déplacements avec une quelconque composante comportementale. Une seconde hypothèse serait que ces déplacements étaient liés aux modifications du lit de la rivière engendrées par les débits très élevés, dus notamment aux travaux d'aménagement. Certains individus auraient alors pu voyager vers l'amont afin de trouver un habitat moins perturbé. De toute évidence, ceci signifie que le desman des Pyrénées possède un certain potentiel de fuite puis de recolonisation si son habitat est affecté et que sa réponse à la modification de son environnement peut être rapide. D'autres études plus ciblées devront être entreprises pour confirmer ou infirmer ces hypothèses. Enfin, la longueur des déplacements effectués sur un tronçon pourrait confirmer le fait que le desman est capable, dans une certaine mesure, de traverser des obstacles comme des stations hydroélectriques ou des barrages en les contournant par la terre ou en utilisant des passes à poisson comme précédemment suggéré (Chora and Quaresma, 2001). Six prises d'eau, avec des seuils variant de 75cm à 9m de hauteur, étaient réparties sur les 20km du tronçon de l'Aude étudié. Les desmans ayant effectué les plus longs déplacements ont dû franchir cinq de celles-ci.

En conclusion, de nouvelles études plus complètes sur la capacité de déplacement du desman des Pyrénées et sur les causes à l'origine de ceux-ci sont nécessaires afin de mieux

comprendre la dynamique et la génétique des populations de cette espèce. Ces données sont essentielles pour sa conservation et pour engager les mesures de gestion les plus appropriées.

5. Implications pour la conservation du desman des Pyrénées

Les études menées lors de cette thèse ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments importants concernant la conservation future du desman des Pyrénées. Ce travail faisait partie intégrante du Plan National d'Action pour le desman des Pyrénées (PNAD) et a permis de répondre à plusieurs actions de celui-ci, dont la mise au point de méthodes génétiques pour identifier l'espèce et l'actualisation de sa répartition grâce aux points de présence validés génétiquement.

Les faibles niveaux de diversité génétique observés dans les différentes populations françaises de desman des Pyrénées, les tailles efficaces relativement petites ainsi que les valeurs élevées du coefficient de consanguinité, suggèrent fortement l'existence d'un signal de dépression de consanguinité qui pourrait augmenter le risque d'extinction de cette espèce (Frankham, 2005a). En effet, comme expliqué dans le **chapitre 1**, les facteurs génétiques comme la perte de diversité ou la dépression de consanguinité sont à prendre en compte pour mettre en place ou améliorer les mesures de conservation d'une espèce. Le fait d'ignorer ceux-ci pourrait grandement mettre en péril le bon déroulement de la sauvegarde de l'espèce (Frankham, 2005a). Une étude a notamment démontré que, de manière générale, la plupart des espèces ne sont pas en danger d'extinction avant que certains facteurs génétiques ne les affectent (Spielman et al., 2004). Il ressort de cette étude que, dans 77% des cas, la diversité génétique était plus faible chez des taxons considérés comme menacés par rapport à des taxons apparentés n'étant pas menacés. Pour les mammifères, ce pourcentage s'élevait à 84% et l'hétérozygotie était en moyenne 35% plus faible chez les espèces menacées.

Le desman des Pyrénées semble souffrir d'un manque apparent de diversité génétique au sein des trois populations principales. Dès lors, même si sa dispersion pourrait être relativement indépendante des cours d'eau, une meilleure connectivité entre bassins versants le long des Pyrénées devrait être encouragée afin de faciliter la dispersion des populations. Ces échanges entre bassins versants voisins devraient être facilités par l'amélioration de la qualité de l'eau et

des habitats, principalement aux altitudes les plus basses où les rivières se rejoignent. Cette amélioration pourrait notamment se faire en augmentant la valeur du débit réservé, ou en privilégiant des débits réservés non constants, de certains tronçons court-circuités pour concorder avec les préférences hydrologiques du desman des Pyrénées. Elle pourrait également se faire en recréant des habitats favorables à l'espèce, par exemple en plaçant des blocs, ou des déflecteurs en bloc, dans le lit mineur des tronçons court-circuités les plus pauvres en diversité de substrats, et en veillant à la préservation et la diversité des berges qui accueillent ses gîtes (Charbonnel, 2015).

Mais il pourrait également être intéressant d'améliorer les zones de connectivité entre les cours d'eaux principaux et leurs affluents. En effet, les affluents peuvent être utilisés comme zones refuges face à des événements hydrologiques soudains et de courte durée (e.g. crues, lâchers de centrale hydro-électrique) (Lake, 2000; Charbonnel, 2015). Plusieurs zones refuges étaient présentes dans des cours d'eaux affluent de l'Aude dans l'étude du suivi du desman des Pyrénées (**article 6**). Ceux-ci auraient donc pu jouer un rôle dans la recolonisation potentielle du tronçon étudié, suggérée par les déplacements importants mis en évidence lors de cette thèse. L'utilisation de zones refuges a notamment été étudiée et proposée comme mesure de conservation pour le Desman des Pyrénées par la Fédération Aude Claire (Joubier, 2014), qui était chargée de réaliser les collectes sur le tronçon de l'Aude étudié et qui a mis en place le protocole de suivi.

Ces échanges entre bassins versants et entre cours d'eaux principaux et affluents pourraient favoriser une augmentation des flux des gènes entre populations et ainsi conduire à une diminution des risques de dépression de consanguinité et une meilleure réponse aux changements climatiques futurs imprévus. La population de desmans des Pyrénées la plus occidentale pourrait particulièrement bénéficier de cette amélioration de la connectivité entre cours d'eaux car elle semble être la plus isolée. En outre, la préservation de la population audoise semble prioritaire au vu du nombre d'individus identifiés sur le tronçon de 20 km étudié.

Bien qu'aucune étude n'ait encore été réalisée sur la relation potentielle entre la présence du desman des Pyrénées et la disponibilité de ses proies, l'abondance de celles-ci conditionne très probablement la présence de l'espèce dans les cours d'eaux. Charbonnel et al. (2015) (**Annexe 1**) émettent d'ailleurs l'hypothèse qu'il y aurait un lien entre la préférence de cette espèce pour les courants rapides et la disponibilité de ses proies, qui semble confirmée par l'analyse des biotraits des proies réalisée dans ce travail. Les proies du desman des Pyrénées

étant en majorité rhéophiles et polluo-sensibles, une meilleure qualité de l'eau pourrait favoriser cette abondance de ressources trophiques. Cette amélioration implique notamment une meilleure gestion des ouvrages hydroélectriques. Les vidanges décennales de barrage, qui sont l'occasion de contrôles et de travaux d'entretien visant à assurer la pérennité et la sécurité de l'ouvrage, pourraient notamment être limitées au strict minimum, en substituant certaines (1 sur 2 par exemple) par l'utilisation de robots aquatiques capables d'inspecter l'ouvrage, comme c'est déjà le cas sur certains aménagements. Il serait également envisageable de proposer, en partenariat avec les producteurs d'électricité, des mesures de réduction adaptées à chaque contexte et une meilleure gestion du risque de pollution en aval des barrages. L'amélioration de la qualité de l'eau passe aussi par le contrôle du développement touristique en haute altitude (épuration des rejets et limitation de l'installation de canons à neige notamment) ou de l'abreuvement direct du bétail dans la rivière. Enfin, la pratique du canyoning devrait également être contrôlée ou limitée, car celui-ci entraîne un appauvrissement qualitatif et quantitatif de la faune benthique, dans la zone de pratique ou en aval de celle-ci (Bertrand, 1996; IRIS consultants, 2005).

Le desman des Pyrénées est classé « vulnérable » dans la liste rouge de l'IUCN (Fernandes et al., 2008). Cependant, les nouvelles données apportées par cette thèse concernant la diversité génétique du desman des Pyrénées, associées à la mise en évidence récente d'une régression de l'espèce sur son aire de distribution française (Charbonnel 2015), pourraient justifier la révision de son statut IUCN, de « vulnérable » à « en danger » au minimum. Particulièrement, dans un contexte où les prochaines décennies pourraient voir les changements globaux actuels se poursuivre et s'intensifier (Lehner et al., 2006).

Ce travail a permis d'élaborer des outils génétiques pour l'étude de l'espèce et de proposer des protocoles innovants, standardisés et non ou peu invasifs pour l'espèce. Ceux-ci seront prochainement proposés pour intégrer un cahier des charges de prise en compte de l'espèce à destination des administrations, des maîtres d'ouvrage et maîtres d'œuvre de la gestion des cours d'eau pyrénéens. Ces outils génétiques pourraient également être utiles dans le cadre d'élevage éventuel pour renforcement local ou réintroduction de l'espèce. Une telle démarche est notamment prévue en Espagne, compte-tenu des extinctions locales constatées (Gisbert & Garcíá-Perea, 2014).

6. Perspectives

Cette thèse a permis d'apporter de nouvelles informations concernant la génétique du desman des Pyrénées, notamment par la mise au point de marqueurs microsatellites polymorphes qui ont permis l'étude de la structuration de ses populations dans les Pyrénées françaises. Cependant, une étude utilisant ces mêmes marqueurs, réalisée sur l'aire de distribution totale de l'espèce paraît nécessaire pour renforcer encore la connaissance générale de cette espèce ainsi que sa conservation. Plus particulièrement, l'échantillonnage du versant espagnol des Pyrénées paraît prioritaire afin de mieux comprendre la structure génétique du desman des Pyrénées dans ces montagnes. Ces études, par l'intermédiaire de collaborations avec l'Espagne et le Portugal, pourraient notamment mettre en évidence de nouvelles populations présentes dans ces pays ou plusieurs lignées mitochondriales ont été découvertes (Igea et al., 2013).

La sous-structure découverte pour la population occidentale de desmans des Pyrénées pourrait faire également l'objet d'étude plus approfondies afin d'avoir plus d'informations concernant les trois sous-clusters découverts, par exemple celles concernant leur distribution géographique ou l'état des flux de gènes entre ceux-ci. Un échantillonnage de fèces exhaustif dans cette région (Pyrénées-Atlantiques et Hautes-Pyrénées), associée aux marqueurs microsatellites, pourrait apporter ces informations.

Parmi les analyses génétiques à effectuer, la mise au point de marqueurs permettant d'identifier le sexe des individus à partir des fèces paraît très importante. Durant cette thèse, nous avons à plusieurs reprises testés les marqueurs, mis au point par Vidal et al. (2009), sur des échantillons de fèces mais malheureusement aucune amplification n'a pu être obtenue, bien que les amorces utilisées aient donné des résultats pour les échantillons de tissus. Cette différence était probablement due à la dégradation de l'ADN et/ou à un problème de spécificité des amorces. Mettre au point de nouveaux marqueurs plus performants serait donc extrêmement intéressant notamment afin d'acquérir certaines informations importantes sur le sex-ratio ou sur le comportement de dépôt des fèces.

Afin d'approfondir encore les connaissances sur la dynamique des populations de desman des Pyrénées, un suivi individuel avec plus de sessions de collectes de fèces serait intéressant à réaliser dans le futur. Ceci permettrait d'acquérir plus d'informations sur les déplacements de l'espèce, sur sa densité ou sur son potentiel de recolonisation. Les déplacements effectués par

plusieurs desmans des Pyrénées suggèrent que cette espèce peut franchir ou contourner des obstacles importants comme des stations hydroélectriques ou des barrages. Cependant, il serait intéressant d'effectuer des études de flux de gènes entre populations séparées par de tels ouvrages afin de voir s'il existe néanmoins une fragmentation engendrée par ceux-ci. Le bassin versant du Haut-Salat pourrait notamment être une zone d'étude intéressante afin de comparer les résultats obtenus avec ceux de l'étude de Charbonnel et al. (2015) sur les probabilités de détection et d'occupation du desman des Pyrénées.

L'utilisation de marqueurs SNPs (single nucleotide polymorphism) pourrait également avoir un intérêt pour le desman des Pyrénées notamment pour génotyper des individus dans le contexte d'études de suivi ou de structure des populations. En effet, l'obtention d'un grand nombre de marqueurs SNPs est de plus en plus simple notamment grâce aux techniques de séquençage de nouvelle génération (Garvin et al., 2010; Davey et al., 2011). De plus, l'utilisation de ces nombreux SNPs permet de génotyper des individus sans devoir réaliser de répétitions de PCR, tout en diminuant les erreurs de génotypage (Glover et al., 2010; Kraus et al., 2014). L'absence de répétitions des analyses permet également de diminuer le coût de celles-ci (Kraus et al., 2014). Le développement de ces marqueurs dans le futur pourrait donc s'appliquer aux études de suivi pour le desman des Pyrénées alors qu'actuellement le coût pour arriver à l'identification formelle d'un individu est de l'ordre de plusieurs centaines d'euros, en raison du nombre élevé de microsatellites à amplifier, du nombre de répétitions à effectuer et du faible taux d'identification.

Une étude plus approfondie reposant sur l'analyse de l'ADN environnemental à partir de prélèvements d'eau douce (Ficetola et al., 2008; Thomsen et al., 2012; Rees et al., 2014) pourrait également être intéressante pour détecter le desman des Pyrénées. Cette méthode pourrait être utilisée notamment dans des cours d'eau où des fèces n'ont pas été trouvées. Le seuil de détectabilité de l'ADN environnemental dans l'eau douce est de l'ordre de quelques jours à quelques semaines (Dejean et al., 2011; Thomsen et al., 2012; Pilliod et al., 2014). Dès lors, cette dégradation rapide peut être particulièrement utile en conservation puisqu'une détection positive de l'espèce pourra être corrélée avec une présence récente de l'espèce (Thomsen & Willerslev, 2015). Cependant, cette détectabilité dépend de plusieurs facteurs dont l'abondance et le temps de présence de l'espèce et les conditions environnementales (Dejean et al., 2011; Thomsen et al., 2012; Pilliod et al., 2014). De plus, pour les eaux courantes, il faut également prendre en compte le transport potentiel à longue distance de

l'ADN environnemental (quelques centaines de mètres à plusieurs kilomètres) (Deiner & Altermatt, 2014; Jane et al., 2014).

Une méthode d'analyse d'ADN environnemental efficace pour le desman des Pyrénées pourrait la rendre plus prometteuse que l'analyse des fèces, au vu de l'effort de prospection et du coût de traitement au laboratoire (min. 50 €/fèce pour atteindre l'identification spécifique). Elle permettrait également de réaliser un screening rapide des rivières où sa présence n'a pas été détectée, pour cibler celles où des études plus approfondies pourraient être effectuées. Enfin, cette méthode pourrait également être intéressante en aval immédiat des secteurs inaccessibles de haute montagne ou de canyons non prospectables (Charbonnel, 2015).

Cependant, l'analyse de l'ADN environnemental ne s'est pour l'instant pas révélée très efficace pour la détection de mammifères. En effet, la première étude réalisée sur le desman des Pyrénées n'a pas permis de le détecter (Taberlet et al., 2011b), tandis que dans une autre étude, la loutre a pu être détectée mais avec un faible taux (27 %), par rapport aux autres espèces aquatique étudiées (jusqu'à 100% pour des amphibiens, invertébrés, poissons) (Thomsen et al., 2012). Ceci est probablement dû à une très faible quantité d'ADN libérée par les mammifères semi-aquatiques. L'amélioration de cette méthode pour détecter ces espèces paraît donc nécessaire dans un premier temps, si on veut pouvoir l'appliquer de manière efficace pour étudier le desman des Pyrénées.

Enfin, il pourrait également être intéressant d'étudier la structure génétique des certaines espèces de proies du desman des Pyrénées afin de la comparer avec celle du desman des Pyrénées. Des études de ce type ont notamment été réalisées dans les Alpes sur plusieurs espèces d'insectes de rivières, dont une espèce de Baetidae (*Baetis alpinus*), pour laquelle une différenciation génétique a été mise en évidence au sein et entre les rivières (Monaghan et al., 2002).

BIBLIOGRAPHIE



- Adrián, M.I., Aguado, R., Costa, R., Delibes, A., Dominguez, J.F., 1988. Distribución y alimentación de la nutria (*Lutra lutra*) en la provincia de León. *Tierras León* 70, 121–131.
- Amalinho, M.G., Boavida, M.J., 1993. Habitat of the Pyrenean desman : assessment of running water quality. Monitoring pollution. Proceeding Meet. Pyrenean Desman, 28 Sept.-1 Oct., Lisbonne, Port. 63–67.
- Antoine, J.M., 2011. Vulnérabilité et adaptation des sociétés montagnardes à la torrencialité au cours du Petit Age Glaciaire dans les Pyrénées., in: *Sud-Ouest Européen*, Presses Universitaires Du Mirail - CNRS. pp. 53–66.
- Antoine, J.M., 2009. L ' histoire du climat par ses extrêmes . Sources géohistoriques et inondations dans les Pyrénées depuis le Petit Age Glaciaire. *Archéologie du Midi Médiéval* 27, 143–155.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Avise, J.C., 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conserv. Biol.* 9, 686–690.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13, 729–744. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x
- Bauchot, R., Buisseret, C., Leroy, Y., Richard, P.B., 1973. L'équipement sensoriel de la trompe du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*, Insectivora, Talpidae). *Mammalia* 37, 17–34.
- Beaumont, M. a., Zhang, W., Balding, D.J., 2002. Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162, 2025–2035.
- Beaumont, M.A., Rannala, B., 2004. The Bayesian revolution in genetics. *Nat. Rev. Genet.* 5, 251–61. doi:10.1038/nrg1318
- Bellemain, E., Swenson, J.E., Tallmon, O., Brunberg, S., Taberlet, P., 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: Four methods for brown bears. *Conserv. Biol.* 19, 150–161.
- Bertrand, A., 1997. Le Desman des Pyrénées , le cincle plongeur et la bergeronnette des ruisseaux sur du gave d'Aspe (Pyrénées-Atlantiques) en relation avec l'aménagement de la RN 134 - Synthèses des études et perspectives de recherches appliquées. Ministère de l'Equipement,.
- Bertrand, A., 1996. Essai d'évaluation de l'impact des activités de loisirs aquatiques sur les vertébrés sur le Llech et les autres cours d'eau du versant nord du Canigou (Pyrénées-Orientales). Rapport d'étude Laboratoire Souterrain du CNRS, Moulis, 31 p.
- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire de desman des pyrénées *G. pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse, 217p.

- Bertrand, A., 1993. Répartition géographique du desman des Pyrénées. *Arvicola* 5, 11–12.
- Bertrand, A., 1993. Découvrir le Desman des Pyrénées, Ed. A.N.A., 32 p.
- Bertrand, A., 1992. Répartition géographique du Desman des Pyrénées *Galemys pyrenaicus* dans les Pyrénées françaises. in : Proceeding of the meeting on the Pyrenean desman, Lisboa, 1992 : 41-52.
- Bidlack, A.L., Reed, S.E., Palsbøll, P.J., Getz, W.M., 2007. Characterization of a western North American carnivore community using PCR–RFLP of cytochrome b obtained from fecal samples. *Conserv. Genet.* 8, 1511–1513. doi:10.1007/s10592-007-9285-3
- Biffi, M., Charbonnel, A., Buisson, L., Blanc, F., Némoz, M., Laffaille, P., 2015. Evidence for a spatially contrasted use of local habitat by the endangered Pyrenean Desman. *Soumis à Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.*
- Bijlsma, R., Loeschcke, V., 2012. Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evol. Appl.* 5, 117–129. doi:10.1111/j.1752-4571.2011.00214.x
- Blejwas, K.M., Williams, C.L., Shin, G.T., McCullough, D.R., Jaeger, M.M., 2006. Salivary DNA evidence convicts breeding male coyotes of killing sheep. *J. Wildl. Manage.* 70, 1087–1093.
- Brown, W.M., George, M.J., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1967–1971.
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baillie, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, G.M., Chanson, J., Chenery, A.M., Csirke, J., Davidson, N.C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J.N., Genovesi, P., Gregory, R.D., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J.-F., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M.A., McRae, L., Minasyan, A., Hernández Morcillo, M., Oldfield, T.E.E., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T.D., Vié, J.-C., Watson, R., 2010. Global Biodiversity : Indicators of Recent Declines. *Science* (80-.). 328, 1164–1168.
- Cabria, M.T., Gonzalez, E.G., Gomez-Moliner, B.J., Zardoya, R., 2007. Microsatellite markers for the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and closely related mustelids. *Mol. Ecol. Notes* 7, 1185–1188.
- Cabria, M.T., Rubines, J., Gómez-Moliner, B., Zardoya, R., 2006. On the phylogenetic position of a rare Iberian endemic mammal, the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Gene* 375, 1–13. doi:10.1016/j.gene.2006.01.038
- Callejo, A., 1984. Ecología trófica y distribución de la nutria en aguas continentales de Galicia. *Memoria de Licenciatura, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela.*
- Callejo, A., Rivera, J.G., Lopez, J.L., Castro Lorenza, A., 1979. Primeros datos sobre la dieta de la nutria, *Lutra lutra* L., en aguas continentales de Galicia. *Acta Vertebr.* 6, 191–209.

- Caro, T.M., Laurenson, M.K., 1994. Ecological and genetic factors in conservation: A cautionary tale. *Science* (80-.). 263, 485–486.
- Casti n, E., Gos lbez, J., 1995. Diet of *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) in the North of the Iberian peninsula. *Netherlands J. Zool.* 45, 422–430.
- Castresana, J., Igea, J., Aymerich, P., Fernández-González, A., Gos lbez, J., 2013. Filogeografía del desmán ibérico (*Galemys pyrenaicus*) y su distribución en la Red de Parques Nacionales. In: *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2009-2012*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales (Madrid). Pp 143-154.
- Caughley, G., 1994. Directions in conservation biology. *J. Anim. Ecol.* 63, 215–244.
- Centeno-Cuadros, A., Román, J., Delibes, M., Godoy, J.A., 2011. Prisoners in their habitat? generalist dispersal by habitat specialists: A case study in Southern water vole (*Arvicola sapidus*). *PLoS One* 6, e24613. doi:10.1371/journal.pone.0024613
- Céréghino, R., Lavandier, P., 1997. Influence des éclusées hydroélectriques sur la distribution et le développement larvaire des Diptères Simuliidae d’une rivière de moyenne montagne. *Comptes Rendus l’Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie*. doi:10.1016/S0764-4469(97)82775-8
- Charbonnel, A., 2015. Influence multi-échelle des facteurs environnementaux dans la répartition du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) en France. Thèse de doctorat de l’Université de Toulouse, 245 p.
- Charbonnel, A., Buisson, L., Biffi, M., D’Amico, F., Besnard, A., Aulagnier, S., Blanc, F., Gillet, F., Lacaze, V., Michaux, J.R., N moz, M., Pagé, C., Sanchez-Perez, J.M., Sauvage, S., Laffaille, P., 2015. Integrating hydrological features and genetically validated occurrence data in occupancy modelling of an endemic and endangered semi-aquatic mammal, *Galemys pyrenaicus*, in a Pyrenean catchment. *Biol. Conserv.* 184, 182–192. doi:10.1016/j.biocon.2015.01.019
- Chora, S.C., Quaresma, C.M., 2001. Desman, *Galemys pyrenaicus*, Geoffroy 1811 : spatial use patterns and ability to transpose the Fr guas small hydro (Paiva river, Douro Basin). 4 mes rencontres sur le Desman des Pyrénées, 18-20 octobre 2001, Moulis : 6 p.
- Cornuet, J., Ravign , V., Estoup, A., 2010. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1 . 0). *BMC Bioinformatics* 11, 401.
- Cornuet, J.M., Santos, F., Beaumont, M.A., Robert, C.P., Marin, J.M., Balding, D.J., Guillemaud, T., Estoup, A., 2008. Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24, 2713–2719. doi:10.1093/bioinformatics/btn514
- Coster, S.S., Kovach, A.I., 2012. Anthropogenic influences on the spatial genetic structure of black bears. *Conserv. Genet.* 13, 1247–1257. doi:10.1007/s10592-012-0368-4
- Crnokrak, P., Roff, D.A., 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity (Edinb.)* 83, 260–270.

- D'Amico, F., Manel, S., Mouches, C., Ormerod, S.J., 2000. River birds in regulated rivers : cost or benefit ? *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27, 167–170.
- Davey, J.W., Hohenlohe, P. a, Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M., Blaxter, M.L., 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12, 499–510. doi:10.1038/nrg3012
- Deiner, K., Altermatt, F., 2014. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One* 9, e88786. doi:10.1371/journal.pone.0088786
- 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, 8–11. doi:10.1371/journal.pone.0023398
- Dewson, Z.S., James, A.B.W., Death, R.G., 2007. A review of the consequences of decreased flow for instream habitat and macroinvertebrates. *J. North Am. Benthol. Soc.* 26, 401–415. doi:10.1899/06-110.1
- Dietz, J.M., Baker, A.J., Ballou, J.D., 2000. Demographic evidence of inbreeding depression in wild golden lion tamarins, in: *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge Univ Press, New York, pp. 203–211.
- Dirzo, R., Young, H.S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N.J.B., Collen, B., 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* (80-.). 345, 401–406.
- Dizdaroglu, M., 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275, 331–342. doi:10.1016/0921-8734(92)90036-O
- Douady, C.J., Chatelier, P.I., Madsen, O., de Jong, W.W., Catzeflis, F., Springer, M.S., Stanhope, M.J., 2002. Molecular phylogenetic evidence confirming the Eulipotyphla concept and in support of hedgehogs as the sister group to shrews. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 200–209.
- Dubey, S., Michaux, J., Brünner, H., Hutterer, R., Vogel, P., 2009. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-b pseudogene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50, 633–41. doi:10.1016/j.ympev.2008.12.008
- Edwards, S., Bensch, S., 2009. Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography ? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Mol. Ecol.* 18, 2930–2933.
- Eggert, L.S., Eggert, J. a., Woodruff, D.S., 2003. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Mol. Ecol.* 12, 1389–1402. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01822.x
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and. *Mol. Ecol.* 11, 1591–1604.
- Excoffier, L., Heckel, G., 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat. Rev. Genet.* 7, 745–58. doi:10.1038/nrg1904

- Fedriani, J.M., Kohn, M.H., 2001. Genotyping faeces links individuals to their diet. *Ecol. Lett.* 4, 477–483.
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. IUCN Red List Threat. Species. Version 2013.2.
- Fernández-salvador, R., del Real, M., Garcíá-Perea, R., Gisbert, J., 1998. Feeding habits of the Iberian desman, *Galemys pyrenaicus*. Euro-American Mammal Congress, Santiago de Compostela (Spain).
- Ferrando, A., Lecis, R., Domingo-Roura, X., Ponsa, M., 2008. Genetic diversity and individual identification of reintroduced otters (*Lutra lutra*) in north-eastern Spain by DNA genotyping of spraints. *Conserv. Genet.* 9, 129–139. doi:10.1007/s10592-007-9315-1
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Fietz, J., Tomiuk, J., Loeschcke, V., Weis-Dootz, T., Segelbacher, G., 2014. Genetic consequences of forest fragmentation for a highly specialized arboreal mammal--the edible dormouse. *PLoS One* 9, e88092. doi:10.1371/journal.pone.0088092
- Fortelius, M., 2012. New and Old Worlds Database of Fossil Mammals (NOW). University of Helsinki; <http://www.helsinki.fi/science/now/>.
- Frankham, R., 2005a. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126, 131–140. doi:10.1016/j.biocon.2005.05.002
- Frankham, R., 2005b. Stress and adaptation in conservation genetics. *J. Evol. Biol.* 18, 750–755. doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00885.x
- Frankham, R., 2003. Genetics and conservation biology. *C. R. Biol.* 326, S22–S29. doi:10.1016/s1631-0691(03)00023-4
- Frankham, R., 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genet. Res.* 66, 95–107.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Frantzen, M.A.J., Silk, J.B., Ferguson, J.W.H., Wayne, R.K., Kohn, M.H., 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* 7, 1423–1428.
- Galan, M., Pagès, M., Cosson, J.-F., 2012. Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding : Species Identification from Fresh , Degraded and Environmental Samples. *PLoS One* 7. doi:10.5061/dryad.1j6v6
- Galtier, N., Enard, D., Radondy, Y., Bazin, E., Belkhir, K., 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA 215–222. doi:10.1101/gr.4305906.due

- Garvin, M.R., Saitoh, K., Gharrett, a. J., 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: A technical review. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 915–934. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02891.x
- Geffen, E., Anderson, M.J., Wayne, R.K., 2004. Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. *Mol. Ecol.* 13, 2481–90. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02244.x
- Gerlach, G., Musolf, K., 2000. Fragmentation of Landscape as a Cause for Genetic Subdivision in Bank Voles 14, 1066–1074.
- Gillet, F., Cabria, M.T., Némoz, M., Blanc, F., Fournier-Chambrillon, C., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015. In press. PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA. *Mammalia*. doi:10.1515/mammalia-2014-0093
- Gilpin, M.E., Soulé, M.E., 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. Pages 19-34 in M.E. Soule, editor. *Conservation Biology: The science of scarcity and diversity*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Gisbert, J., Garcíá-Perea, R., 2014. Historia de la regresión del desmán ibérico *Galemys pyrenaicus* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811) en el Sistema Central (Península Ibérica). *Munibe Monogr. Nat. Ser.*
- Gisbert, J., Garcíá-Perea, R., 2004. Estudio cuantitativo sobre la población de Desmán Ibérico en el valle del Ambroz y Topillo de Cabrera en el norte de Extremadura. Junta de Extremadura, 400 pp.
- Gisbert, J., Garcíá-Perea, R., 2003. Estudio sobre la distribución de la Almizclera (*Galemys pyrenaicus*) en Extremadura. Junta de Extremadura, 285 pp. Inédit.
- Glover, K. a, Hansen, M.M., Lien, S., Als, T.D., Høyheim, B., Skaala, O., 2010. A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment. *BMC Genet.* 11, 2. doi:10.1186/1471-2156-11-2
- Gomez-Moliner, B.J., Cabria, M.T., Rubines, J., Garin, I., Madeira, M.J., Elejalde, A., Aihartza, J., Fournier, P., Palazon, S., 2004. PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*) by analysis of excremental DNA. *J. Zool.* 262, 311–316. doi:10.1017/s0952836903004667
- González-Esteban, J., Villate, I., Castien, E., 2003a. A comparison of methodologies used in the detection of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). *Mamm. Biol.* 68, 387–390.
- González-Esteban, J., Villate, I., Castien, E., 2003b. Sexual identification of *Galemys pyrenaicus*. *Acta Theriol. (Warsz)*. 48, 571–573.
- González-Esteban, J., Villate, I., Castien, E., Rey, I., Gosalbez, J., 2002. Age determination of *Galemys pyrenaicus*. *Acta Theriol. (Warsz)*. 47, 107–112.

- Hartmann, S.A., Steyer, K., Kraus, R.H.S., Segelbacher, G., Nowak, C., 2013. Potential barriers to gene flow in the endangered European wildcat (*Felis silvestris*). *Conserv. Genet.* 14, 413–426. doi:10.1007/s10592-013-0468-9
- Hoss, M., Kohn, M., Paabo, S., Knauer, F., Schroder, W., 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* 359, 199.
- Hutchison, J.H., 1976. The Talpidae (Insectivora, Mammalia): Evolution, Phylogeny, and Classification, Ph.D. dissertation, University of California, Berkeley.
- Hutterer, R., 2005. Order Soricomorpha. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammals Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, third ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 220–311.
- Igea, J., Aymerich, P., Fernández-González, A., González-Esteban, J., Gómez, A., Alonso, R., Gosálbez, J., Castresana, J., 2013. Phylogeography and postglacial expansion of the endangered semi-aquatic mammal *Galemys pyrenaicus*. *BMC Evol. Biol.* 13, 115. doi:10.1186/1471-2148-13-115
- IRIS consultants, 2005. Mesure de l'impact des pratiques de canyonisme et d'aquarandonnée sur les invertébrés aquatiques des rivières dourbie et Bramabiau dans le département du Gard. Rapport technique, DREAL Languedoc-Roussillon, 59 p.
- Ishihara, S., Herrela, R.J., Ijiri, D., Matsubayashi, H., Hirabayashi, M., Del Barrio, A.N., Boyles, R.M., Eduarte, M.M., Salac, R.L., Cruz, L.C., Kanai, Y., 2010. Identification of tamaraw (*Bubalus mindorensis*) from natural habitat-derived fecal samples by PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Anim. Sci. J.* 81, 635–41. doi:10.1111/j.1740-0929.2010.00794.x
- IUCN, 2010. Red List of Threatened Species. www.redlist.org.
- Jane, S.F., Wilcox, T.M., Mckelvey, K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K., Lowe, W.H., Letcher, B.H., Whiteley, A.R., 2014. Distance, flow and PCR inhibition: EDNA dynamics in two headwater streams. *Mol. Ecol. Resour.* 216–227. doi:10.1111/1755-0998.12285
- Janecka, J.E., Jackson, R., Yuquang, Z., Diqiang, L., Munkhtsog, B., Buckley-Beason, V., Murphy, W.J., 2008. Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. *Anim. Conserv.* 11, 401–411. doi:10.1111/j.1469-1795.2008.00195.x
- Janssens, X., Fontaine, M.C., Michaux, J.R., Libois, R., de Kermabon, J., Defourny, P., Baret, P. V., 2008. Genetic pattern of the recent recovery of European otters in southern France. *Ecography (Cop.)* 31, 176–186. doi:10.1111/j.0906-7590.2008.4936.x
- Jiang, W., Wang, X., Li, M., Wang, Z., 2011. Identification of the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*) and the red fox (*Vulpes vulpes*) by copro-DNA diagnosis. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 206–10. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02906.x
- Joubier, F., 2014. Les zones refuges sur l'Aude : des mesures de protection pour le Desman, *Galemys pyrenaicus*. Stage de master, Fédération Aude Claire.

- Kohn, M., Knauer, F., Stoffella, A., Schroder, W., Paabo, S., 1995. Conservation genetics of the European brown bear - A study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Mol. Ecol.* 4, 95–103.
- Kohn, M.H., Wayne, R.K., 1997. Facts from feces revisited. *Trends Ecol. Evol.* 12, 223–227.
- Kraus, R.H.S., vonHoldt, B., Cocchiararo, B., Harms, V., Bayerl, H., Kühn, R., Förster, D.W., Fickel, J., Roos, C., Nowak, C., 2014. A SNP-based approach for rapid and cost-effective genetic wolf monitoring in Europe based on non-invasively collected samples. *Mol. Ecol. Resour.* 295–305. doi:10.1111/1755-0998.12307
- Lake, P.S., 2000. Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J. North Am. Benthol. Soc.* 19, 573–592.
- Lande, R., 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution (N. Y.)* 48, 1460–1469.
- Lande, R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science (80-)*. 241, 1455–1460.
- Latinne, A., Galan, M., Waengsothorn, S., Rojanadilok, P., Eiamampai, K., Sribuarod, K., Michaux, J., 2014. Diet Analysis of *Leopoldamys Neilli*, a Cave-dwelling Rodent in Southeast Asia, Using Next-Generation Sequencing from Feces. *J. Cave Karst Stud.* 76, 139–145. doi:10.4311/2013LSC0100
- Lehner, B., Döll, P., Alcamo, J., Henrichs, T., Kaspar, F., 2006. Estimating the Impact of Global Change on Flood and Drought Risks in Europe: A Continental, Integrated Analysis. *Clim. Change* 75, 273–299.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–15. doi:10.1038/362709a0
- López-Fuster, M.J., García-perea, R., Fernández-salvador, R., 2006. Craniometric variability of the Iberian desman, *Galemys pyrenaicus* (Mammalia : Erinaceomorpha : Talpidae). *Folia Zool.* 55, 29–42.
- Lorenzini, R., Posillico, M., Lovari, S., Petrella, A., 2004. Non-invasive genotyping of the endangered Apennine brown bear: a case study not to let one's hair down. *Anim. Conserv.* 7, 199–209. doi:10.1017/s1367943004001301
- Mager, K.H., Colson, K.E., Groves, P., Hundertmark, K.J., 2014. Population structure over a broad spatial scale driven by nonanthropogenic factors in a wide-ranging migratory mammal, Alaskan caribou. *Mol. Ecol.* 23, 6045–57. doi:10.1111/mec.12999
- Maldonado, J.E., Leonard, J., Miranda, G.A., Ortega, J., Wayne, R.K., Aguilera, R.J., 2006. Ten polymorphic microsatellite loci for the endangered Buena Vista Lake shrew (*Sorex ornatus relictus*). *Mol. Ecol. Notes* 6, 349–352. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01228.x
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L. a, Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X. V, Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer,

- M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K. a, Volkmer, G. a, Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380. doi:10.1038/nature04726
- McDevitt, A.D., Rambau, R. V., O'Brien, J., McDevitt, C.D., Hayden, T.J., Searle, J.B., 2009. Genetic variation in Irish pygmy shrews *Sorex minutus* (Soricomorpha: Soricidae): Implications for colonization history. *Biol. J. Linn. Soc.* 97, 918–927. doi:10.1111/j.1095-8312.2009.01218.x
- McKenna, M.C., Bell, S.K., 1997. *Classification of Mammals above the Species Level*. Columbia University Press, New York.
- Melero, Y., Aymerich, P., Luque-Larena, J.J., Gosàlbez, J., 2012. New insights into social and space use behaviour of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 58, 185–193. doi:10.1007/s10344-011-0561-7
- Melero, Y., Aymerich, P., Santulli, G., Gosàlbez, J., 2014. Activity and space patterns of Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) suggest non-aggressive and non-territorial behaviour. *Eur. J. Wildl. Res.* 60, 707–715. doi:10.1007/s10344-014-0838-8
- Michaux, J.R., Hardy, O.J., Justy, F., Fournier, P., Kranz, A., Cabria, M., Davison, A., Rosoux, R., Libois, R., 2005. Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. *Mol. Ecol.* 14, 2373–2388. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02597.x
- Miotto, R.A., Rodrigues, F.P., Ciocheti, G., Galetti, P.M., 2007. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected cerrado areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica* 39, 647–654. doi:10.1111/j.1744-7429.2007.00315.x
- Moller, T.B., Pertoldi, C., Madsen, A.B., Asferg, T., Frydenberg, J., Hammershoj, M., Loeschcke, V., 2004. Genetic variability in Danish polecats *Mustela putorius* as assessed by microsatellites. *Wildlife Biol.* 10, 25–33.
- Mona, S., Ray, N., Arenas, M., Excoffier, L., 2014. Genetic consequences of habitat fragmentation during a range expansion. *Heredity (Edinb.)* 112, 291–9. doi:10.1038/hdy.2013.105
- Monaghan, M.T., Spaak, P., Robinson, C.T., Ward, J. V., 2002. Population Genetic Structure of 3 Alpine Stream Insects: Influences of Gene Flow, Demographics, and Habitat Fragmentation. *J. North Am. Benthol. Soc.* 21, 114–131. doi:10.2307/1468304
- Mondol, S., Karanth, K.U., Kumar, N.S., Gopalswamy, A.M., Andheria, A., Ramakrishnan, U., 2009. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biol. Conserv.* 142, 2350–2360. doi:10.1016/j.biocon.2009.05.014

- Moore, D.W., 1986. Systematic and Biogeographic Relationships among the Talpinae (Insectivora: Talpidae), Ph.D. dissertation, University of New Mexico, Albuquerque.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 269–292.
- Moska, M., Wierzbicki, H., Strzała, T., Mucha, A., Dobosz, T., 2012. Genetic structuring of the common shrew, *Sorex araneus* (Soricomorpha: Soricidae) in the Polish Sudetes may suggest ways of northwards colonization. *Hereditas* 149, 197–206. doi:10.1111/j.1601-5223.2012.02266.x
- Motokawa, M., 2004. Phylogenetic relationships within the family Talpidae (Mammalia : Insectivora). *J. Zool.* 263, 147–157. doi:10.1017/s0952836904004972
- Mucci, N., Randi, E., 2007. Sex identification of Eurasian otter (*Lutra lutra*) non-invasive DNA samples using ZFX/ZFY sequences. *Conserv. Genet.* 8, 1479–1482. doi:10.1007/s10592-007-9303-5
- Mullins, J., Statham, M.J., Roche, T., Turner, P.D., O'Reilly, C., 2010. Remotely plucked hair genotyping: a reliable and non-invasive method for censusing pine marten (*Martes martes*, L. 1758) populations. *Eur. J. Wildl. Res.* 56, 443–453. doi:10.1007/s10344-009-0332-x
- Myers, N., Knoll, A.H., 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *PNAS* 98, 5389–5392.
- Nabholz, B., Glémin, S., Galtier, N., 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals--the longevity hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* 25, 120–30. doi:10.1093/molbev/msm248
- Némoz, M., Bertrand, A., 2008. Plan National d'Actions en faveur du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*), 2009-2014. Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères / Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, 1.
- Némoz, M., Bertrand, A., Sourie, M., Arlot, P., 2011. A French Conservation Action Plan for the Pyrenean Desman *Galemys pyrenaicus*. *Galemys Boletín Inf. la Soc. Española para la Conserv. y Estud. los mamíferos* 23, 47–50.
- Nilsson, C., Dynesius, M., 1994. Ecological effects of river regulation on mammals and birds: A review. *Regul. Rivers Res. Manag.* 9, 45–53. doi:10.1002/rrr.3450090105
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., Gonzalez, J., 1992. Aproximación a la metodología y estudio del área de distribución, estatus de población y selección de hábitat del desmán (*Galemys pyrenaicus*) en la Península Ibérica. Ministerio de Medio Ambiente, Oviedo.
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., Gonzalez, J., Cano, J.M., 1998. Estimating the population density of *Galemys pyrenaicus* in four Spanish rivers 454–457.

- O'Brien, S.J., 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5748–5755.
- O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J.F., Bush, M., Wildt, D.E., 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* (80-.). 227, 1428–1434.
- Ortega, J., Young, S., Simons, L.H., Maldonado, J.E., 2005. Characterization of six microsatellite DNA loci for *Sorex arizonae*. *Mol. Ecol. Notes* 5, 851–853. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01086.x
- Palmeirim, J.M., Hoffmann, S.H., 1983. *Galemys pyrenaicus*. *Mamm. Species* 207, 1–5.
- Palomares, F., Godoy, J.A., Piriz, A., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11, 2171–2182.
- Peña, J.C., Purroy, F.J., Dominguez, J., 1987. Primeros datos sobre la alimentacion del Lucio (*Esox lucius*) en la cuenca del Eslla (España). *Actas IV Cong. Esp. Limnol.* 271–280.
- Pérez, T., Vázquez, F., Naves, J., Fernández, A., Corao, A., Albornoz, J., Domínguez, A., 2008. Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*). *Conserv. Genet.* 10, 291–301. doi:10.1007/s10592-008-9578-1
- Pérez-Espona, S., Pérez-Barbería, F.J., McLeod, J.E., Jiggins, C.D., Gordon, I.J., Pemberton, J.M., 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). *Mol. Ecol.* 17, 981–96. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03629.x
- Pertoldi, C., Breyne, P., Cabria, M.T., Halfmaerten, D., Jansman, H.A.H., Van Den Berge, K., Madsen, A.B., Loeschcke, V., 2006. Genetic structure of the European polecat (*Mustela putorius*) and its implication for conservation strategies. *J. Zool.* 270, 102–115. doi:10.1111/j.1469-7998.2006.00095.x
- Peyre, A., 1956. Ecologie et biogéographie du Desman (*Galemys pyrenaicus*) dans les Pyrénées françaises. *Mammalia* 20, 405–418.
- Pigneur, L.-M., Marc, D., Fournier, P., Fournier-Chambrillon, C., Steinmetz, J., Rieu, L., Giralda-Carrera, G., Urra, F., Van Doninck, K., Michaux, J., 2014. La Loutre en France et Navarre. Actes du 36 ème colloque francophone de mammalogie. 18-20 octobre 2013, Toulouse.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 109–116. doi:10.1111/1755-0998.12159
- Piñol, J., San Andrés, V., Clare, E.L., Mir, G., Symondson, W.O.C., 2014. A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 18–26. doi:10.1111/1755-0998.12156

- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P., 2005. Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nat. Rev. Genet.* 6, 847–859. doi:10.1038/nrg1707
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.
- Puisségur, C., 1935. Recherches sur le Desman des Pyrénées. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 67, 163–227.
- Queiroz, A.I., 1999. *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). in: A.J. Mitchell-Jones et al. (eds) : *The atlas of European Mammals*. Poyser Nat. Hist., Academic Press, London, 78-79.
- Queiroz, A.I., Alves, H., Almada, V., 1993. The small hydro plants: predicted impacts on the Pyrenean desman populations (*Galemys pyrenaicus*, Geoffroy). In: *Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman*, Lisbon, pp. 69–77.
- Queiroz, A.I., Alves, M.H., Almada, V., 1992. The small hydroplants : predicted impacts on the Pyrenean desman populations (*Galemys pyrenaicus*. Geoffroy)., in: *Proceeding Meeting on the Pyrenean Desman*. Lisboa, pp. 69–77.
- Queiroz, A.I., Bertrand, A., Khakhin, G., 1996. Status and conservation of Desmaninae in Europe. Council of Europe, Strasbourg.
- Ralls, K., Ballou, J., 1983. Extinction: lessons from zoos. Dans: Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B., Thomas, L. (Eds.), *Genetics and Conservation: a Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA. 164–184.
- Ramalhinho, M.G., Boa Vida, M.J., 1993. Habitat of the Pyrenean Desman: assessment of running water quality. Monitoring pollution. In: *Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman*, Lisbon, pp. 63–67.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355–364. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Reed, J.Z., Tollit, D.J., Thompson, P.M., Amos, W., 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol. Ecol.* 6, 225–34.
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R.M., Gough, K.C., 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *J. Appl. Ecol.* 1450–1459. doi:10.1111/1365-2664.12306
- Richard, P.B., 1986. Les Desman des Pyrénées , un mammifère inconnu à découvrir. *Science et Découvertes*, Ed. Le Rocher, Monaco : 118 p.
- Richard, P.B., 1973. Le Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*). Mode de vie, univers sensoriel. *Mammalia* 37, 1–16.

- Richard, P.B., Vallette Vialard, A., 1969. Le Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) : premières notes sur sa biologie. *La Terre la Vie* 116, 225–245.
- Rümke, C.G., 1985. A review of fossil and recent desmaninae (Talpidae, Insectivora). *Utr. Micropaleontol. Bull. Spec. Publ.* 4, 1–241.
- Saint-Girons, M.-C., 1973. Les mammifères de France et du Bénélux. Ed. Doin, Paris : 418pp.
- Santamarina, J., 1993. Feeding ecology of a vertebrate assemblage inhabiting a stream of NW Spain (Riobo; Ulla basin). *Hydrobiologia* 252, 175–191. doi:10.1007/BF00008154
- Santamarina, J., 1992. Trophic resources of *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) in relation to water quality. in : Proceeding meeting on the Pyrenean desman, Lisboa, 1992 : 27-32.
- Santamarina, J., Guitian, J., 1988. Quelques données sur le régime alimentaire du desman (*Galemys pyrenaicus*) dans le nord-ouest de l'Espagne. *Mammalia* 52.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371. doi:10.1007/s004120000089
- Schmaltz, G., Somers, C.M., Sharma, P., Quinn, J.S., 2006. Non-destructive sampling of maternal DNA from the external shell of bird eggs. *Conserv. Genet.* 7, 543–549. doi:10.1007/s10592-005-9065-x
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615–629.
- Shinohara, A., Campbell, K.L., Suzuki, H., 2003. Molecular phylogenetic relationships of moles, shrew moles, and desmans from the new and old worlds. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 247–258. doi:10.1016/s1055-7903(02)00416-5
- Silva, E., 2001. Estudo da capacidade de transposição de obstáculo do rio Ardena pela toupeira de água (*Galemys pyrenaicus*). Relatório de Estágio para obtenção da licenciatura em Biologia, pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Solberg, K.H., Bellemain, E., Drageset, O.M., Taberlet, P., Swenson, J.E., 2006. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biol. Conserv.* 128, 158–168. doi:10.1016/j.biocon.2005.09.025
- Soulé, M.E., 1985. What Is Conservation Biology? *Bioscience* 35, 727–734.
- Spielman, D., Brook, B.W., Frankham, R., 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15261–15264. doi:10.1073/pnas.0403809101
- Stevens, D.L., Olsen, A.R., 2004. Spatially Balanced Sampling of Natural Resources. *J. Am. Stat. Assoc.* 99, 262–278. doi:10.1198/016214504000000250

- Stone, R.D., 1987a. The activity pattern of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) (Insectivora : Talpidae), as determined under natural condition. *J. Zool. London* 213, 95–106.
- Stone, R.D., 1987b. The social ecology of the Pyrenean desman as revealed by radiotracking. *J. Zool.* 212, 117–129.
- Taberlet, P., Bouvet, J., 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk* 108, 959–960.
- Taberlet, P., Camarra, J.J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L.P., DuboisPaganon, C., Burke, T., Bouvet, J., 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.* 6, 869–876.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Mol. Ecol.* 5, 301–305.
- Taberlet, P., Miquel, C., Poillot, C., Coissac, E., 2011a. Mise au point de méthodes d'identification génétique du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) à partir de fèces, à l'échelle de l'espèce et de l'individu (ADN mitochondrial et microsatellites). Rapport final. PNAD, 8p.
- Taberlet, P., Miquel, C., Poillot, C., Coissac, E., 2011b. Mise au point de méthodes d'identification génétique du Desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) à partir de fèces, à l'échelle de l'espèce et de l'individu (ADN mitochondrial et microsatellites). Rapport intermédiaire n°1. PNAD, 8p.
- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. & Evol.* 14, 323–327.
- Taylor, A.C., Walker, F.M., Goldingay, R.L., Ball, T., van der Ree, R., 2011. Degree of landscape fragmentation influences genetic isolation among populations of a gliding mammal. *PLoS One* 6, e26651. doi:10.1371/journal.pone.0026651
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2565–2573. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Thomsen, P.F., Willerslev, E., 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* 183, 4–18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019
- Trutat, E., 1891. Essai sur l'histoire naturelle du Desman des Pyrénées . Douladoure-Privat, Toulouse, 107 p.
- Valière, N., Taberlet, P., 2000. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Mol. Ecol.* 9, 2150–2152.
- Vidal, O., Pérez-Serra, A., Pla, C., 2009. A sex determination protocol for the Iberian desman (*Galemys pyrenaicus*) based on a three primer amplification of DBX and DBY fragments with non-invasive samples. *Conserv. Genet.*

- Wadley, J.J., Austin, J.J., Fordham, D.A., 2013. Rapid species identification of eight sympatric northern Australian macropods from faecal-pellet DNA. *Wildl. Res.* 40, 241–249. doi:10.1071/WR13005
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T., 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction ? A view from the world of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11466–11473.
- Whidden, H.P., 2000. Comparative myology of moles and the phylogeny of the Talpidae (Mammalia, Lipotyphla). *Am. Museum Novitates* 3294, 1–53.
- Wolf, C., Rentsch, J., Hubner, P., 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1350–1355.
- Yates, T.L., Moore, D.W., 1990. Speciation and evolution in the family Talpidae (Mammalia: Insectivora). In: Nevo, E., Reig, O.A. (Eds.), *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*. Alan R Liss, New York, pp. 1–22.
- Zhang, D.-X., Hewitt, M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations : practice , problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12, 563–584.
- Zhang, Y., Janecka, J.E., Li, D., Duo, H., Jackson, R., Murphy, W.J., 2008. Population survey and genetic diversity of snow leopards *Panthera uncia* as revealed by fecal DNA. *Acta Zool. Sin.* 54, 762–766.
- Zink, R.M., Barrowclough, G.F., 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol.* 17, 2107–21. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03737.x

Illustrations

Pages 13, 37, 49, 171, 191, 209: Marie-Claude Guérineau

ANNEXE



Annexe 1

Integrating hydrological features and genetically validated occurrence data in occupancy modeling of an endemic and endangered semi-aquatic mammal, *Galemys pyrenaicus*, in a Pyrenean catchment

Anaïs Charbonnel^{a,b,c}, Laetitia Buisson^{b,c}, Marjorie Biffi^{b,c}, Frank D'Amico^{d,e}, Aurélien Besnard^f, Stéphane Aulagnier^g, Frédéric Blanc^a, François Gillet^{a,h}, Vincent Lacazeⁱ, Johan R. Michaux^h, Mélanie Némoz^a, Christian Page^j, José Miguel Sanchez-Perez^{b,k}, Sabine Sauvage^{b,k}, Pascal Laffaille^{b,k}

^a Conservatoire d'Espaces Naturels Midi-Pyrénées, 75 voie du TOEC - BP 57611 - 31076 Toulouse, France

^b CNRS; UMR 5245; CNRS; EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 31326 Castanet-Tolosan, France

^c Université de Toulouse; INP, UPS; EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement); 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

^d Université de Pau et des Pays de l'Adour, UFR Sciences & Techniques Côte Basque, Campus Montaury, 64600 Anglet, France

^e Université de Pau, Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications, LMAP CNRS-UMR 5142, Av. de l'Université, 64000 Pau, France

^f Laboratoire de Biogéographie et d'Ecologie des Vertébrés, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Centre d'Ecologie Evolutive et Fonctionnelle, CNRS UMR 5175, 1919 Route de Mende, 34293, Montpellier Cedex 5, France

^g INRA, UR 0035 CEFS Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage. Centre de recherche de Toulouse, 31320, Auzeville, France

^h Génétique des Microorganismes, Dépt des Sciences de la Vie, Univ. de Liège, Inst. De Botanique B22, BE-4000 Liège, Belgium

ⁱ Association des Naturalistes d'Ariège - Vidallac 09240 ALZEN

^j Sciences de l'Univers au CERFACS, URA 1875, CERFACS/CNRS, 42 Avenue Gaspard Coriolis, 31057 Toulouse Cedex 01, France

^k Université de Toulouse; INP, UPS; EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement); ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France

Publié dans *Biological Conservation*



Contents lists available at ScienceDirect

Biological Conservation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocon

Integrating hydrological features and genetically validated occurrence data in occupancy modelling of an endemic and endangered semi-aquatic mammal, *Galemys pyrenaicus*, in a Pyrenean catchment



Anaïs Charbonnel^{a,b,c,*}, Laëtitia Buisson^{b,c}, Marjorie Biffi^{b,c}, Frank D'Amico^{d,e}, Aurélien Besnard^f, Stéphane Aulagnier^g, Frédéric Blanc^a, François Gillet^{a,h}, Vincent Lacazeⁱ, Johan R. Michaux^h, Mélanie Némou^a, Christian Pagé^j, José Miguel Sanchez-Perez^{b,k}, Sabine Sauvage^{b,k}, Pascal Laffaille^{b,k}

^a Conservatoire d'Espaces Naturels Midi-Pyrénées, 75 voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse, France

^b CNRS, UMR 5245, CNRS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 31326 Castanet-Tolosan, France

^c Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

^d Université de Pau et des Pays de l'Adour, UFR Sciences & Techniques Côte Basque, Campus Montaury, 64600 Anglet, France

^e Université de Pau, Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications, UMAP CNRS-UMR 5142, Av. de l'Université, 64000 Pau, France

^f Laboratoire de Biogéographie et d'Ecologie des Vertébrés, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Centre d'Ecologie Evolutive et Fonctionnelle, CNRS UMR 5175, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^g INRA UR 0035 CEFS Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage, Centre de recherche de Toulouse, 31320 Auzeville, France

^h Génétique des Microorganismes, Dépt des Sciences de la Vie, Univ. de Liège, Inst. De Botanique B22, BE-4000 Liège, Belgium

ⁱ Association des Naturalistes d'Arrière Vidallac, 09240 Alzen, France

^j Sciences de l'Univers au CERFACS, URA 1875, CERFACS/CNRS, 42 Avenue Gaspard Coriolis, 31057 Toulouse Cedex 01, France

^k Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2014

Received in revised form 10 January 2015

Accepted 15 January 2015

Keywords:

Pyrenean desman

Detection

Markovian site occupancy model

Habitat use

Soil and water assessment tool

ABSTRACT

As freshwater habitats are among the most endangered, there is an urgent need to identify critical areas for conservation, especially those that are home to endangered species. The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a semi-aquatic mammal whose basic ecological requirements are largely unknown, hindering adequate conservation planning even though it is considered as a threatened species. Species distribution modelling is challenging for freshwater species. Indeed, the complexity of aquatic ecosystems (e.g. linear and hierarchical ordering) must be taken into account as well as imperfect sampling. High-quality and relevant hydrological descriptors should also be used. To understand the influence of environmental covariates on the occupancy and detection of the Pyrenean desman, we combine both a robust sign-survey data set (i.e. with genetic validation ensuring true presence information) and a hydrological model to simulate the flow regime across a whole catchment. Markovian site-occupancy analysis, taking into account sign detection and based on spatially adjacent replicates, indicated a positive influence of heterogeneity of substrate and shelters, and a negative influence of flow variability on Pyrenean desman detection. This valuable information should help to improve monitoring programs for this endangered species. Our results also highlighted a spatially clustered distribution and a positive influence of stream flow and number of tributaries on occupancy. Hence, modifications of flow regime (e.g. hydropower production, irrigation, climate change) and habitat fragmentation appear to be major threats for this species, altering the connectivity between tributaries and the mainstream river as well as between adjacent sub-catchments.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Université Paul Sabatier, Bât. 4R1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France. Tel.: +33 (0)5 61 55 89 12.

E-mail addresses: anaïs.charbonnel@espaces-naturels.fr (A. Charbonnel), laetitia.buisson@univ-tlse3.fr (L. Buisson), mbiffi@live.fr (M. Biffi), Frank.Damico@univ-pau.fr (F. D'Amico), aurelien.besnard@cefe.cnrs.fr (A. Besnard), stephane.aulagnier@toulouse.inra.fr (S. Aulagnier), frederic.blanc@espaces-naturels.fr (F. Blanc), francois.gillet@espaces-naturels.fr (F. Gillet), vincent.lacaze@ariegenature.fr (V. Lacaze), michaux@supagro.inra.fr (J.R. Michaux), melanie.nemou@espaces-naturels.fr (M. Némou), christian.page@cerfacs.fr (C. Pagé), jose-miguel.sanchez-perez@univ-tlse3.fr (J.M. Sanchez-Perez), sabine.sauvage@univ-tlse3.fr (S. Sauvage), pascal.laffaille@ensat.fr (P. Laffaille).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.019>

0006-3207/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Freshwater habitats hold a notable biodiversity with for example, one third of vertebrate species being restricted to this ecosystem (Dudgeon et al., 2006). However, freshwater habitats are one of the most endangered ecosystems in the world (Vörösmarty et al., 2010) and human-induced alterations of the natural river conditions strongly affect aquatic biodiversity

(Dudgeon et al., 2006; Vörösmarty et al., 2010). Extinction rates of freshwater fauna are currently extremely high (Allan et al., 2005) with around 15,000 freshwater species worldwide already extinct or imperiled as a result of human activity (Strayer and Dudgeon, 2010). As a consequence, there is an urgent need to identify critical areas for conservation of freshwater biodiversity especially for rare, endemic and endangered species.

Among rare freshwater species, the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is one of the less well-known European mammals. The distribution of this small semi-aquatic species is restricted to the Pyrenees (Andorra, France and Spain), as well as parts of northern and central Spain and northern Portugal. In the French Pyrenees, the species lives in mountain brooks, cold and well oxygenated water courses from sea level to 2700 m (Némoz et al., 2011). The Pyrenean desman is becoming increasingly threatened, triggering several conservation regulations (Femandes et al., 2008). Yet, even basic knowledge such as distribution range and habitat preferences that are essential for conservation planning are not complete for this species (Aymerich, 2004; Barbosa et al., 2009, 2010; Nores et al., 1992, 1999; Palmeirim et al., 1983; Queiroz et al., 1996).

The environmental factors influencing the spatial distribution of species can be identified by the use of Species Distribution Models (SDMs). They model the statistical relationships between species presence records and environmental variables, and may be used to predict habitat suitability for species in unsampled areas (Guisan and Zimmermann, 2000). A few studies have used SDMs for understanding the ecological requirements of the Pyrenean desman and have reported a positive influence of topographic variability, and a strong but contrasting influence of climatic variables, depending on the study area (Barbosa et al., 2009; Morueta-Holme et al., 2010; Williams-Tripp et al., 2012). A negative effect of the density of urban areas was also identified (Barbosa et al., 2009). As these studies were applied at large scales (e.g., the whole Iberian Peninsula) and with coarse resolution (e.g., 10 km), they did not take into account the particular features of freshwater environments.

Indeed, SDMs for aquatic species often fail to account fully for links between organism occurrence and environmental constraints imposed by river networks (Jähnig et al., 2012) as they do not take into account the linear configuration of the river network (SDMs built on grid cells with both aquatic and terrestrial ecosystems considered together, e.g. Blank and Blaustein, 2012; Domisch et al., 2013). Not accounting for these particular features seems to be appropriate for broad-scale studies as the use of climatic or topographic variables might be more meaningful (Bucklin et al., 2015). As aquatic species' movements are constrained by the spatial orientation of the watercourses and by the connectivity between streams and sub-catchments, such hydrological parameters should however be considered (Ottaviani et al., 2009), especially for small-scale predictions (e.g. across a river catchment). The importance of hydrological variables on freshwater species ecology and distribution is well known (e.g. Kuemmerlen et al., 2014) even for river birds (Royan et al., 2014) or semi-aquatic mammals (Pedroso et al., 2014; Toner et al., 2010). Despite this, hydrological variables (e.g. stream flow) are often ignored in SDMs due to the lack of fine scale spatial data available for studies conducted in large areas. A solution to counterbalance this lack of data may be to simulate flow variables using a hydrological model. One of the most commonly applied, the Soil and Water Assessment Tool (SWAT), is a catchment-scale, physically based model (Arnold et al., 1998), running on a daily time step and capable of continuous simulation over a long time period at different spatial scales (Gassman et al., 2007). By using spatial information (i.e. topography, climate, soil and land-use), SWAT simulates the hydrological cycle both in space and time (see Neitsch et al., 2005 for more details). To our knowledge, very few studies have coupled this tool

with SDMs to understand the influence of hydrological parameters on the presence of aquatic species, and to predict habitat suitability (but see Jähnig et al., 2012; Kuemmerlen et al., 2014).

Another important challenge in SDMs is the quality of species presence-absence data. When surveys are based on the recording of indirect signs, such as faeces, ambiguous signs could lead to the risk of species misidentification, leading to false presences (i.e. wrongly attributed to the species of interest; Miller et al., 2011) or false absences (i.e. wrongly attributed to species other than the species of interest). To overcome this issue, techniques that identify species using faecal DNA analysis are increasingly used (Waits and Paetkau, 2005). Species detection is another major issue. It is well known that the absence of records in the field is a combination of undetected presences (i.e. false absences) and true absences (Gu and Swihart, 2004). Semi-aquatic mammals, such as the Pyrenean desman, are particularly sensitive to this detection issue as monitoring is usually based on faeces searches in heterogeneous environments (González-Esteban et al., 2003). Site occupancy models have been developed to deal with species detection issues at a large scale. They model the probability that a species occupies some sites even though the species has not been detected with any certainty when the sites were visited (MacKenzie et al., 2002). This class of models requires replication of detection-non detection data at sampling sites. Usually based on temporal replication, recent developments of site occupancy models now allow the use of spatial instead of temporal replicates. Among them, the Markovian occupancy model can be applied when spatially adjacent replicates are available at sites, to test for spatial correlation of occupancy probabilities between replicates (Charbonnel et al., 2014; Hines et al., 2010). To date, this recent model has rarely been applied to investigate the influence of covariates on species distribution (see however Barber-Meyer et al., 2013; Karanth et al., 2011; Thorn et al., 2011).

In this study, we applied the Markovian occupancy model to a genetically validated dataset for the Pyrenean desman, and used a hydrological model to simulate flow in the river network of a single catchment in the French Pyrenees. Our aim was to highlight the environmental factors, including hydrological variables, influencing detection and occupancy of this threatened semi-aquatic species for better implementation of conservation plans.

2. Methods

2.1. Study area

The upper river Salat (42–43°N, 0–1°W; drainage area = 1156 km²) is a tributary of the river Garonne, located in the French Pyrenean Mountains (Fig. 1). This catchment has a stream length of 1388 km (CARTHAGE © DB, French database on thematic mapping of the Water Agencies, 2011 version <http://www.sandre.eaufrance.fr>). Elevation varies between 350 and 2870 m (mean elevation = 1200 m). Mean (±sd) annual rainfall, air temperature and stream flow are 1360.83 mm ± 216.72 (range = 1013.72–1998.49), 9.51 °C ± 1.76 (range = 4.21–12.11; Pagé and Terray, 2010) and 0.78 m³/s ± 2.76 (range = 0.00–31.96; SWAT simulations, see 2.4), respectively. Land cover (Corine Land Cover © DB, map of the European environmental landscape, version 2006) is dominated by forests (50%) and herbaceous and shrubby vegetation (25%). We focused our study on this catchment because of (i) its representativeness of other French Pyrenean catchments, (ii) its conservation status (this catchment is part of a Natura 2000 site) and (iii) the known presence of Pyrenean desman (Bertrand, 1994). The stream network (CARTHAGE © DB) was

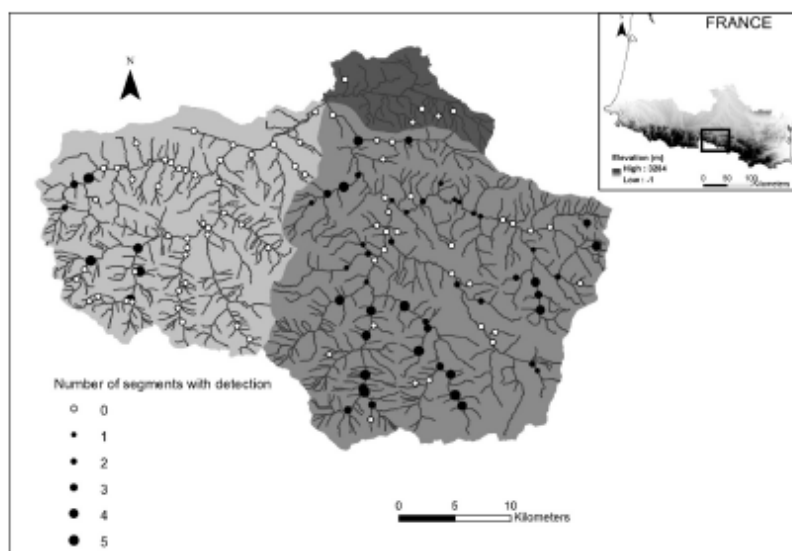


Fig. 1. Map of the upper Salat river catchment (study area) with hydrographic sub-sectors (light grey: Lez, medium grey: Salat and dark grey: Baup) and sampling site locations (dots, $n = 131$). The size of dots indicates the number of segments with detection for each site.

divided into 1388 1-km-long sections (hereafter simply called sections) for the computation of environmental covariates.

2.2. Field sampling

One hundred thirty-one sites (i.e. river transects) were surveyed for this study (Fig. 1). Sites were selected using a spatially balanced, Generalized Random Tessellation Stratified sampling which is known to produce survey designs suitable for aquatic systems (Stevens and Olsen, 2004). Searches for Pyrenean desman faeces were conducted along these river transects which were waded by pairs of skilled observers, meticulously inspecting each emergent rock, tree root or branch in the riverbed (i.e. river banks were not inspected). The number of observers was limited as much as possible across transects to minimize observer bias for sign detection. All faeces detected and suspected of being left by a Pyrenean desman based on colour, size, and position were harvested for genetic analysis. Surveys were conducted between 2011 and 2013 during the summer, when faeces appeared to persist longest, to maximize detection (Bertrand, 1994). We tried not to conduct surveys during or after a period of fluctuating water levels or heavy rainfall to minimize variations in sign detection probabilities (e.g., removal of faeces by rising water levels). Each site was a riverbed transect 500 m-long, which approximately matches the mean home range of the species (Melero et al., 2012). Each site was divided into five sub-units (i.e. segments) of equal length (i.e. 100 m) that constituted adjacent spatial replicates, as this segment length appears appropriate for the Pyrenean desman when analyzed with the Markovian occupancy model (Charbonnel et al., 2014). For each segment, information of detection or non-detection of faeces was thus available.

2.3. Genetic validation of faeces identification

Genomic DNA from faeces samples was extracted using the Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). DNA extraction was conducted in a separate room with a UV-sterilised platform where no Pyrenean desman tissue samples had previously been

treated. In order to identify the owner species of the faeces sample, we amplified a small cytochrome b fragment of approximately 400 bp using specific primers designed for this study (GPYRF1: 5'-TTGTAGAAATGGAKCTGAGG-3', GPYRF2: 5'-TTCCTTACGAAACAGGATC-3' and GPYRR1: 5'-GTCGGCTGCTAAAAGTCAGAATA-3'). PCRs were carried out in a volume of 9 μ l containing 0.17 μ l of forward primer GPYRF1 and 0.17 μ l of reverse primer GPYRR1 (10 μ M), 2.89 μ l of sterile water, 0.58 μ l of dNTPs (10 μ M), 1.70 μ l of $MgCl_2$ (25 mM), 3.40 μ l of 5X GoTaq[®] buffer reaction (Promega Inc., Madison, USA), 0.09 μ l of GoTaq[®] DNA polymerase (Promega Inc., Madison, USA) and 8 μ l of DNA. Amplifications were performed in a thermal cycler VWR Unocycler using one activation step at 94 $^{\circ}C$ for 5 min followed by 40 cycles (denaturation at 94 $^{\circ}C$ for 50 s, annealing at 52 $^{\circ}C$ for 45 s, extension at 72 $^{\circ}C$ for 45 s) and final extension step at 72 $^{\circ}C$ for 10 min. Three microlitres of the PCR product were amplified in a nested PCR with 14 μ l of the PCR mixture described above with additions of 5 μ l of sterile water and 0.17 μ l of forward primer GPYRF2 (10 μ M) in place of GPYRF1. PCR products were sequenced on an Applied Biosystems[®] 3730 DNA analyzer and verified using CHROMASPRO v 1.5 (<http://technelysium.com.au>). Sequences were then submitted to the BLAST[®] functionality available on the NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). For a detailed description of the protocol, see Gillet et al. (in press).

2.4. Simulation of stream flow using SWAT model

The combined use of hydraulic and distribution models involves hydrological information available at the same spatial resolution (here, 1-km river sections). SWAT requires several input datasets using the ArcSWAT interface in ArcGIS 10.0 (Winchell et al., 2007). SWAT uses a topography map to delineate the watershed that was divided into 1165 sub-basins (mean surface area = 100 ha \pm 82; mean reach length = 873 m \pm 704) with a discretization scale of 50 ha (Fig. 2). In this study, we used (i) a 25 m resolution Digital Elevation Model (ALTI \odot DB - IGN), (ii) a 1 km resolution Digital Soil Map of the World (FAO, 2007), and (iii) a 250 m resolution land cover map (BDOS \odot , Regional Natural

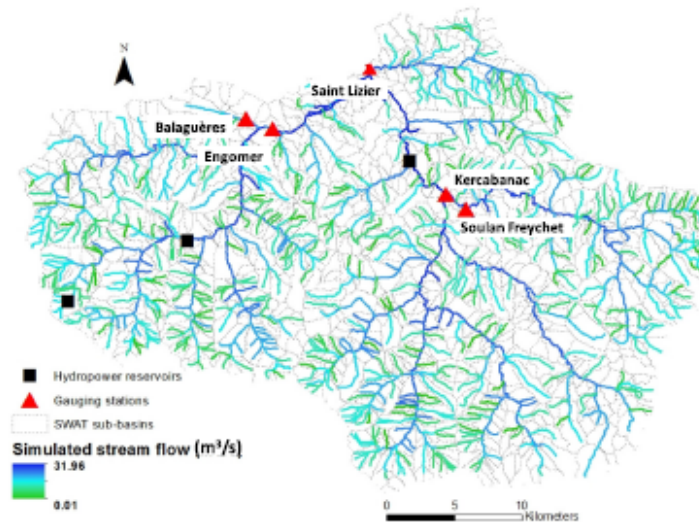


Fig. 2. Map of SWAT sub-basin distributions, hydropower reservoirs (black squares) and gauging stations (red triangles) used to calibrate and validate SWAT modelling. The average simulated stream flow (1992–2011) is also shown. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Parks of Midi-Pyrénées). The climatic variables used to calibrate the SWAT models included daily rainfall, maximum and minimum air temperature, solar radiation, wind speed and relative humidity. Climatic variables were derived from the SAFRAN © DB (1992–2011) which has a spatial resolution of 8 km and accounts for the influence of the topography on the atmospheric variables (Habets et al., 2008). As our study area was located in a mountainous region, we modified snow parameters to calibrate SWAT and improved flow simulations (Appendix A, Supplementary Materials). Observed monthly output flows of three hydropower reservoirs (Fig. 2; Electricity of France) were also included in simulations to increase their accuracy. After running SWAT, simulated stream flows were available in the 1165 sub-basins with a monthly time step, between 1992 and 2011. For each of the 1388 1-km sections, the flow value assigned was that of the sub-basin it was included in. A simulation period of 20 years was chosen to reduce the influence of years with extreme hydrological events (e.g. flood, low water). Average monthly stream flow data recorded from 1992 to 2011 were available at five gauging stations (Fig. 2) and used to calibrate and evaluate the performance of the SWAT simulations using three different metrics: the Spearman correlation coefficient (ρ), the coefficient of determination (R^2) and the Nash–Sutcliffe Efficiency (NSE) calculated between measured and simulated stream flow (e.g. Kiesel et al., 2010; Moriasi et al., 2007). As is typically done (Qi and Grunwald, 2005), the model was calibrated using the gauging station located at the outlet (“Saint-Lizier”) and validated at the four other gauging stations (Fig. 2).

2.5. Covariates influencing detection and occupancy

2.5.1. Covariates related to detection probability

Bias in sign detection may arise due to a variety of factors including weather, habitat structure and observer. First, species detection is known to be influenced by the experience of the observer (MacKenzie et al., 2006). Hence, we used the pairs of observers who inspected each transect as a first covariate (OBS; 3 categories). For the Pyrenean desman, we then hypothesized that substrate

heterogeneity influences faeces detection as emergent items are supports for faeces deposits. We could expect that the greater the heterogeneity, the higher the detection. Hence, during sampling, observers visually assessed the percentage of heterogeneity of substrate and shelters (e.g. rocks, tree roots or branches) in the riverbed (SUBSTRATE) that was classified in four categories: 0–25%, 26–50%, 51–75% and 76–100%. The 0–25% category indicated a riverbed with homogeneous substrate and few or no shelters whereas the 76–100% category indicated a riverbed with a very high diversity of substrate and shelters (e.g. rocks, tree roots or branches). In addition, rainfall may negatively influence the faeces detection by washing out emergent items, as already shown for the European otter (*Lutra lutra*; Reid et al., 2013). It could thus be more difficult to find faeces in areas with high annual rainfall as items are regularly washed out. Flow variability might also influence detection with higher variation in stream flow resulting in faeces regularly removed by the fluctuating water level, and thus a lowered detection. Consequently, we used the mean annual rainfall (RAIN, mean of the annual rainfall from 1992 to 2011, mean across the 131 river transects = 1252.80 mm \pm 154.75) and the inter-monthly flow variability (FLOW VAR, variance of the twelve monthly flows simulated from SWAT, averaged from 1992 to 2011, mean = 1.81 \pm 7.40). All these covariates were calculated for each 1-km section.

2.5.2. Covariates related to occupancy probability

We used four covariates that were not highly correlated ($|r| \leq 0.60$) in the Markovian occupancy model. First, we used the mean monthly flow (FLOW, mean of the twelve monthly flows, averaged from 1992 to 2011, simulation of SWAT models, mean = 1.48 m³/s \pm 2.76). Second, we calculated eight climatic covariates over the period 1992–2011 (Pagé and Terray, 2010): the mean (\pm sd) annual temperature (10.4 °C \pm 1.34), the mean temperature of the coldest month (2.38 °C \pm 1.23), the mean temperature of the warmest month (18.74 °C \pm 1.32), the inter-annual temperature variability (32.39 \pm 6.17), the mean annual rainfall (1253 mm \pm 1.55), the mean rainfall of the driest month (32.33 mm \pm 4.57), the mean rainfall of the wettest month

(214.4 mm \pm 2.41) and the inter-annual rainfall variability (359.50 \pm 9.76). As they were quite strongly correlated ($|r| \geq 0.72$), we used the first axis of a principal component analysis (PCA) which explained 93.80% of the variation of the climatic covariates as a synthetic covariate (CLIMATE). Its values increased as mean annual rainfall increased while mean annual temperature decreased. For both FLOW and CLIMATE, linear and quadratic terms were included in occupancy models. Third, we calculated the number of tributaries (TRIBUTARIES, derived from CARTHAGE \odot DB, mean = 3.11 \pm 1.99) for each 1-km section and its proximal upstream and downstream sections. Finally, the influence of the three main hydrographic sub-sectors was also tested (SUB-SECTOR; 3 categories; CARTHAGE \odot DB; Fig. 1). To improve the convergence of occupancy models, all non-categorical covariates were log-transformed and normalized.

2.6. Data analysis

We applied to our dataset the Markovian occupancy model recently developed by Hines et al. (2010) which estimated four parameters: p , the probability of detecting the species conditional on the presence of the species on the site (i.e. probability of detection); ψ , the probability that a site is occupied or used by a species (i.e. probability of site occupancy); θ_0 , the probability that a species is present on a segment given that the site is occupied but the species was absent on the previous adjacent segment; and θ_1 , the probability that a species is present on the segment given that the site is occupied and that the species was present on the previous adjacent segment (see Charbonnel et al., 2014, and Hines et al., 2010 for more details about the parameters estimated).

To evaluate the predictive accuracy of our final model predictions, we used a jackknife iterative procedure, best suited for small data sets ($n = 131$) than the traditional partitioning in 70% for calibration and 30% for validation. Thus, the model selection process described below was repeated 131 times. This model selection process initially focused on determining a suitable covariates model structure for detection (p) and subsequently used this model structure to test combinations of covariates for occupancy (ψ). We first defined a full occupancy model (i.e. including all four occupancy covariates) based on the recommendations of Burnham and Anderson (2002) and MacKenzie et al. (2006). Then, we formulated covariates for detection, either without any covariates, or individually or in additive combination, restricting models to a maximum of two covariates to reduce convergence problems (Burnham and Anderson, 2002). This resulted in eleven different models. All model comparisons were based on Akaike Information Criterion (AIC) values (Burnham and Anderson, 2002). The Akaike weights (ω_i) were also calculated. To assess the relative importance of each detection covariate, the sum of ω_i of models ($\Sigma\omega_i$) that included each covariate was calculated. As this process was repeated 131 times (see above), we then summed the Akaike weights obtained for the 131 iterations. Based on this global Akaike weight, the detection covariates were ranked and the ones with the highest rank were selected to fix the model structure for p . Thereafter, we kept this model structure component unchanged and ran further occupancy analyses to compare models involving either no covariates or all combinations of covariates for ψ , resulting in sixteen models. No covariates were included for local occupancy parameters θ_0 and θ_1 to reduce the number of parameters to estimate. Like for detection covariates, the global Akaike weight of each occupancy covariate was calculated. For each iteration, model averaging was used to determine the effect size (β regression coefficient) of each covariate across the top set of models ($\Delta AIC \leq 2$; Burnham and Anderson, 2002). Finally, a global average coefficient was computed for each covariate across the 131 iterations, and used to build covariate response curves for occupancy and detec-

tion. Ninety-five percent confidence intervals were calculated through the jackknife procedure. Estimates obtained through model averaging for each iteration were then used to predict occupancy probabilities over the whole Salat catchment. A final prediction map was thus produced through the computation of average probabilities across the 131 iterations. The predictive accuracy was evaluated using the area under the ROC curve (AUC) which is an index of classification accuracy independent of species prevalence and arbitrary threshold effects (Manel et al., 2001). We fitted all the models using the freeware PRESENCE v. 6.2 (Hines, 2006) and R.2.14.1.

3. Results

3.1. Desman detection

A total of 579 faeces were collected from 94 out of the 131 sampled sites. Sixty-nine percent of these faeces were genetically confirmed to be Pyrenean desman, sampled in 54 sites (i.e. 41% of sampling sites with at least one detection event during the survey). DNA included in 27% of the collected faeces was too degraded to accurately identify the author of the faeces. Four percent of the 579 collected faeces were allocated to another species (e.g. 2% to *Neomys* spp.). Among the 54 sites where the presence of desman was genetically confirmed, 13 had only one 100-m segment with detection, 11 had two segments with detection, 9 had three segments with detection, 12 had four segments with detection and 9 had all the five segments with detection. Eighty-seven percent of sites with detection were located in the Salat sub-sector, 13% in the Lez while no presence was recorded in the Baup sub-sector (Fig. 1).

3.2. SWAT flow simulation

SWAT simulations of stream flow were accurate, as indicated by the model evaluation statistics computed between measured and simulated monthly stream flow at the gauging station used for calibration ($\rho = 0.89$; $R^2 = 0.78$; $NSE = 0.73$; "Saint Lizier"; Figs. 2 and 3a). According to Monási et al. (2007), the evaluation statistics were also considered to be high at the gauging stations used for the validation step ($0.85 \leq \rho \leq 0.91$; $0.62 \leq R^2 \leq 0.85$; $0.60 \leq NSE \leq 0.8$; Fig. 3c–e), except the Balaguères station ($\rho = 0.81$; $R^2 = 0.50$; $NSE = 0.33$; Fig. 3b). Simulated mean monthly flow over the 1992–2011 period ranges spatially from 0.01 to 31.96 m³/s, with a mean of 0.78 m³/s (Fig. 2).

3.3. Influence of covariates on detection and occupancy

The covariate that influenced desman detection most was FLOW VAR (global Akaike weight = 130.56) followed by SUBSTRATE (global Akaike weight = 70.26). OBS had a moderate influence (global Akaike weight = 44.83) while RAIN (global Akaike weight = 0.60) did not explain desman detection at all. To avoid statistical convergence issues when building occupancy models, only the first two covariates, FLOW VAR and SUBSTRATE, were retained. The probability of detecting Pyrenean desman faeces decreased sharply with increasing flow variability (Fig. 4a) and was higher in streams dominated by heterogeneous substrates and shelters in spite of a large variability in detection probabilities for stream reaches with low heterogeneity (Fig. 4b).

For desman occupancy, the covariate SUB-SECTOR exerted the strongest influence (global Akaike weight = 131.00). FLOW was also important (global Akaike weight = 88.99) followed by TRIBUTARIES (global Akaike weight = 76.20) and then CLIMATE (global Akaike weight = 57.07). The Pyrenean desman occupancy was very

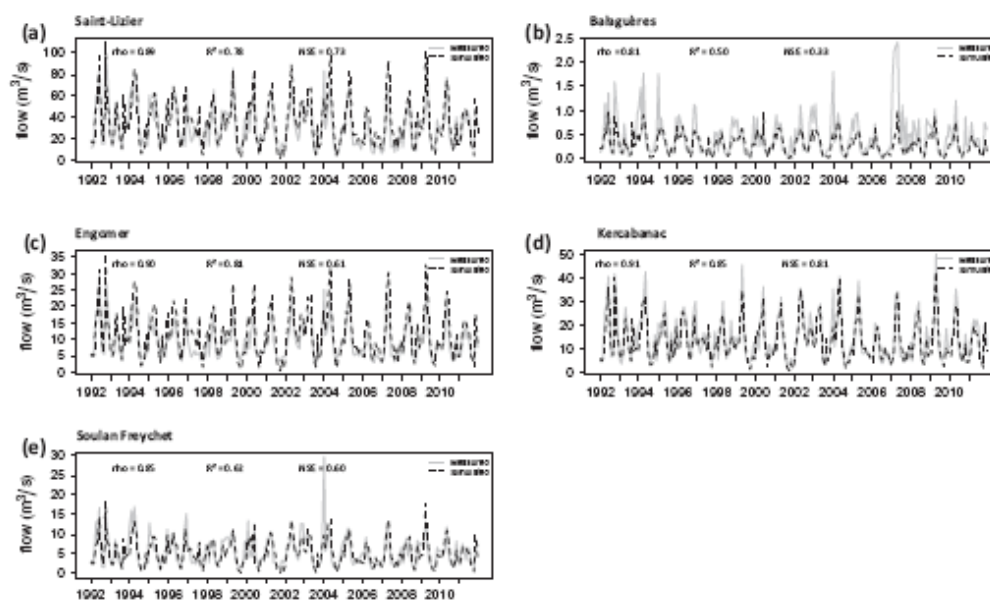


Fig. 3. Measured (grey) and simulated (black) Soil and Water Assessment Tool (SWAT) stream flow at the downstream gauging station used for the calibration step (a) and at gauging stations used for the validation step (b–e; see Fig. 1 for the location). Model simulations were evaluated with the Spearman coefficient correlations (ρ), coefficient of determination (R^2) and Nash–Sutcliffe efficiency (NSE) between measured and simulated stream flow.

different between sub-sectors with the highest occupancy probabilities for stream sections located in the Salat sub-sector (Figs. 1 and 4c). As no detection event has been reported in the Baup sub-sector (Fig. 1), occupancy probability in this area was estimated to be null by the model. Both covariates FLOW and TRIBUTARIES had a positive influence on occupancy probability (Fig. 4d and e) suggesting that the Pyrenean desman has a higher occupancy probability in stream sections with high mean monthly flow and several tributaries. For example, in the Salat sub-sector, occupancy probability raises rapidly over 0.9 from $5 \text{ m}^3/\text{s}$ flow values. Finally, it appears that the Pyrenean desman occupancy was higher in areas with more abundant annual rainfall and colder annual temperature (i.e. high values of CLIMATE; Fig. 4f), although this covariate was the least influencing.

Expected local spatial dependence was highlighted by the average model estimates that showed that the probability of Pyrenean desman sign presence on a segment, given absence on the previous segment ($\theta_0 = 0.48$, 95% CI = 0.46–0.49) was lower than the probability of Pyrenean desman sign presence on a segment given presence on the previous segment ($\theta_1 = 0.72$, 95% CI = 0.71–0.73).

3.4. Predictive occupancy map

The average predicted occupancy probability for the Pyrenean desman across the study area had a moderate accuracy compared to observations given that AUC value was 0.74. Occupancy probability estimates ranged from 0 to 0.97 suggesting that some streams are very suitable for the Pyrenean desman while others are not suitable at all in the upper Salat catchment. There was a strong contrast among occupancy probabilities predicted on sections of the three sub-sectors, with a mean occupancy of 0.63 ± 0.18 in the Salat, 0.15 ± 0.12 in the Lez and 0.00 ± 0.00 in the Baup (Figs. 1, 4c and 5a). Higher occupancy probabilities were predicted for major rivers of the Lez and Salat sub-sectors while lower occupancy probabilities were predicted for small tributaries (Fig. 5a), underlining the positive relationship with stream flow.

These predictions indicate a potential linear distribution of 176 km (12.5%) with predicted occupancy probability ≥ 0.80 , and 462 km (32.7%) with predicted probabilities ≥ 0.60 in the whole upper Salat river catchment. Last, the area with the highest variability in predicted occupancy across the 131 iterations was located on the Lez river, upstream of the Lez and the Salat confluence, and also in the headwaters of the Lez sub-sector (Fig. 5b).

4. Discussion

4.1. Detection probability of the Pyrenean desman – implications for monitoring

We have emphasized that the probability of detecting desman faeces decreases in areas with high flow variability, which may regularly submerge emergent items where the desman usually leaves its faeces and thus limit the accumulation of signs. In agreement with Aymerich and Gosálbez (2004), we thus suggest that periods of heavy rain or high water flow as well as the period shortly following flood events should be avoided when survey involves faeces detection. We also showed that the detection probability rises in streams with a larger diversity of substrate and shelters. This result is consistent with Nores et al. (1992) who suggested that the availability of emergent items may influence the faeces detectability of the Pyrenean desman. When streams with a homogeneous substrate and shelters or high flow variability (natural or artificial) have to be monitored, more efforts in sampling should therefore be directed towards compensating the lowest detection, or other survey methods with higher detection efficiency (e.g. live trapping) should be applied (González-Esteban et al., 2003).

4.2. Variables influencing occupancy of the Pyrenean desman

We found that stream flow has a strong and positive influence on the occupancy of the Pyrenean desman. Some authors also

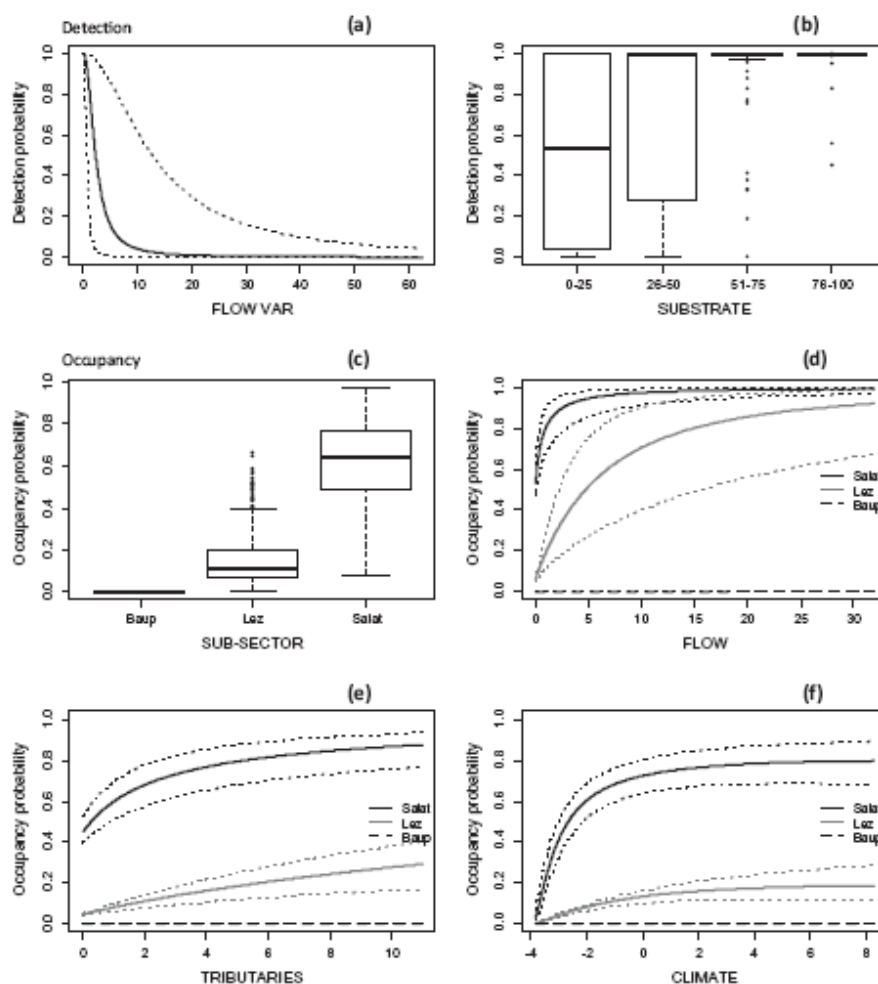


Fig. 4. Relationship between detection (a and b) and occupancy (c–f) probability, and covariates for the Pyrenean desman in the upper Salat river catchment. All the figures show the average probabilities predicted along the range of each covariate (solid black lines) and their 95% confidence intervals (dotted lines), except Fig. 4b which plots the estimated detection probabilities in the 131 sites according to substrate heterogeneity categories, and Fig. 4c which plots the predicted occupancy probability for the whole study area (1388 1-km long sections) according to the sub-sector. Predictions were computed with the other covariates at their mean values.

suggested a preference of this species for fast flowing waters (Nores et al., 1992; Queiroz et al., 1993, 1996; Ramalhinho and Boa Vida, 1993). One hypothesis to explain this preference for high water flow in mountainous regions would be that abundance and richness of invertebrates, which are the main prey of the Pyrenean desman (Bertrand, 1994), are known to be positively related to flow (Aymerich, 2004; Dewson et al., 2007). This finding is also in accordance with Nores et al. (1992) who suggested that the factors that influence the Pyrenean desman the most are those related to hydrology characteristics. They proposed a rather mechanical explanation for this preference arguing that high water velocity may help the desman float in the water for optimal use of its resources. Nores et al. (1992) found that the presence of the Pyrenean desman was favoured for a water velocity greater than 0.2 m/s. In our study, highest occupancy was obtained for river transects with flow above 5 m³/s and 15 m³/s in the Salat and Lez sub-sectors, respectively. But, we can observe that for these two sub-sectors, the most rapid increase of occupancy is obtained up to

5 m³/s, and grows beyond this value much more slowly, meaning that this species can tolerate quite high flow. On a larger scale (e.g. Iberian Peninsula), Barbosa et al. (2003) and Morueta-Holme et al. (2010) highlighted the importance of water abundance, owing to the amphibious lifestyle of the Pyrenean desman, as more water offers better habitat conditions and greater food availability. As suggested by Aymerich (2004), artificial reduction of flow regime (e.g. due to hydropower production or irrigation) likely has a negative impact on Pyrenean desman occurrence, especially in mountain rivers which are more sensitive to flow reduction. Our results also revealed the positive influence of the number of tributaries on the presence of the Pyrenean desman. A high number of tributaries may act as refuge areas in case of natural or artificial flooding (Lake, 2000), which can facilitate the recolonization of disturbed sites by the species. The strong influence of the geographic area that we found may indicate that Pyrenean desman occurrences show spatial clustering, with an influence of terrestrial barriers, and that dispersal is mainly constrained by aquatic

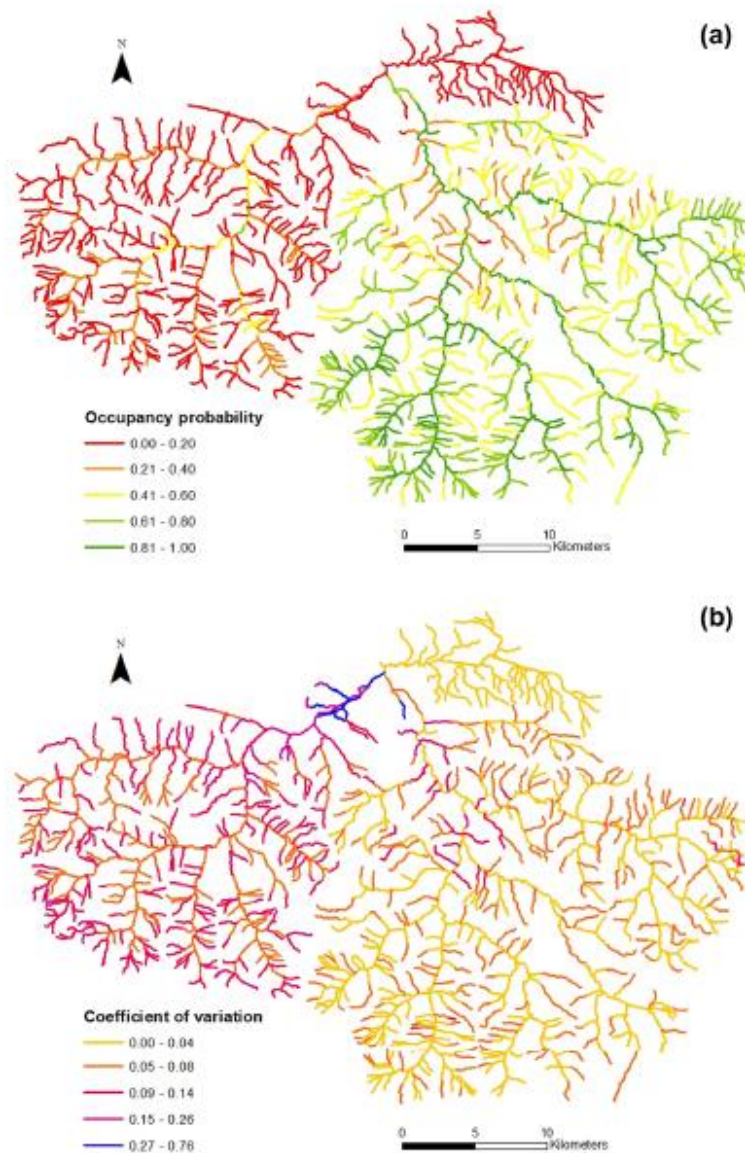


Fig. 5. Maps of (a) the average predicted occupancy probability of the Pyrenean desman in the upper Salat river catchment across the 131 iterations and (b) the prediction variability (i.e. coefficient of variation) across the iterative jackknife procedure. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

environments (Filipe et al., 2009). Spatial structuring of distribution for other semi-aquatic species less restricted to aquatic habitats, such as the European otter (*Lutra lutra*), has already been emphasized and is thought to result from population dynamics (Barbosa et al., 2003). We never found Pyrenean desman faeces in the Baup catchment, which we assume to be caused by extremely low sign detection or possible extirpation of desman from this area due to unsuitable environmental conditions within this catchment (i.e. agricultural land, drier and warmer climate). The spatial clustering of Pyrenean desman occurrences and the high probability of suitable habitats in the Salat sub-sector both suggest

that this area may represent one large population connected by movement and gene flow. Stream connectivity should thus be favoured as habitat fragmentation could potentially decrease demographic support for tributaries and lead to isolation of populations, as mentioned by Nores et al. (1999) and Queiroz et al. (1996). Until more data on movement and dispersal of the Pyrenean desman are available, the most cautious conservation strategy is thus to protect habitat quality and connectivity throughout the entire sub-sector. The predicted occupancy map would therefore be useful as a decision-making instrument for future developments within this catchment.

Lastly, studies previously conducted on a larger scale revealed the importance of climate to explain the Pyrenean desman distribution. Indeed, it has been shown that mean annual precipitation has a positive influence and annual air temperature a negative influence in Spain and Portugal (Barbosa et al., 2009, 2010; Morueta-Holme et al., 2010). By contrast, a negative relationship between precipitation and the presence of Pyrenean desman as well as a positive relationship with air temperature were found in France (Williams-Tripp et al., 2012). At a finer scale (i.e. catchment scale), we found a pattern similar to that reported in Spain and Portugal, but our results suggest that climatic variables appear to be much less influential than the three other covariates considered. This contrasted result is consistent with the fact that hydrology is known to be more important in structuring the distribution of aquatic species within the species range than climate which drives spatial distribution at larger scales (Bucklin et al., 2015; Morueta-Holme et al., 2010).

4.3. Better accounting for the hydrology when modelling the distribution of aquatic species

In aquatic ecosystems, abiotic factors that structure freshwater species distribution are different from those that influence species in terrestrial environments (Jähnig et al., 2012). However, hydrological variables are rarely taken into account into SDMs due to a lack of detailed data for the whole study area. Applying SDMs at fine scales (e.g. catchment scale) may result in an incomplete description of species ecological niche (Ottaviani et al., 2009) as these factors are known to strongly influence the distribution of freshwater species. Hence, as mentioned by Jähnig et al. (2012), integrated modelling approaches are needed to provide habitat suitability predictions of aquatic organisms using adequate predictors. Some hydrological models such as the SWAT model make it possible to simulate stream flow across an entire stream network and then to use flow as an input variable in SDMs. For example, by using hydrological and hydraulic models, Jähnig et al. (2012) simulated water levels, flow velocities and sediment processes in a river section, to serve as inputs into an SDM applied to a freshwater mollusc. All these hydrological and hydraulic parameters appeared to explain significantly its occurrence. Moreover, Kuemmerlen et al. (2014) used SWAT to simulate hydrological factors (e.g. flow seasonality, flow range) and applied SDMs to invertebrate species at the catchment scale. They showed more accurate predictions of habitat suitability when hydrological factors were included among the predictors. Coupling between a hydrological model and SDMs thus appears promising to get more accurate predictions of species distribution from SDMs in freshwater ecosystems at fine resolution (Kuemmerlen et al., 2014). This should be applied to a wider range of aquatic and semi-aquatic species (e.g. mammals, birds, reptiles, amphibians, fish, stream invertebrates), especially for studies at local scales to improve ecological knowledge about these species.

4.4. Accounting for the imperfect detection of species

A major issue in monitoring wild animal populations is the difficulty to detect species. This problem can be taken into account using occupancy models to avoid false absence data (MacKenzie et al., 2006). The value of these statistical methods has been largely acknowledged during the last few years with many applications for a wide diversity of species such as insects (Kéry et al., 2010), fish (Comte and Grenouillet, 2013), reptiles (Durso et al., 2011) and birds (Kéry et al., 2013). In our study, in spite of quite high detection probabilities found for the Pyrenean desman, the use of a site-occupancy model has limited the risk of underestimating the Pyrenean desman occupancy. More generally, occupancy

models may avoid introducing errors into distribution patterns (Comte and Grenouillet, 2013) or introducing bias into wildlife-habitat relationships (Gu and Swihart, 2004; Kéry et al., 2010), two issues that are crucial for species with low detectability. Indeed, for rare, secretive or nocturnal species, it may be difficult to detect individuals visually and logistics constraints may appear for surveys in rough terrain (Aing et al., 2011). Consequently, survey methods based on recording indirect signs have become standard practice for many species (Heinemeyer et al., 2008). Depending on the species ecology, if the data are based on sign surveys and sampled following a design with spatially adjacent replicates, they could be analyzed with the Markovian occupancy model. This may concern species that use trails to move as do many large mammals (Barber-Meyer et al., 2013; Karanth et al., 2011; Thorn et al., 2011), using a linear home range (e.g. species living along rivers or ecotones) or species for which surveys follow a linear configuration (e.g. roads, trails) such as those carried out in remote systems (e.g. mountains, forests). Moreover, spatially adjacent replicates have the advantage of being more effective and straightforward to implement than temporal replication (see Charbonnel et al., 2014 for more details).

Whereas the importance of accounting for false negative errors is frequently recognized, much less attention has however been given to false positives (Miller et al., 2011). A specific occupancy model developed by Royle and Link (2006) can account for false positives when genetic analyses are too expensive and not appropriate for some survey techniques (e.g. listening points). In our case, DNA analyses were appropriate to avoid false positives that would have occurred by misidentifying the faeces of other species (e.g. *Neomys* spp., *Glis* spp., *Myotis* spp., *Turdus* spp., *Pardalis* spp.) as being Pyrenean desman. For species with shrinking ranges, false-positive observations may thus result in an underestimation of the population decline. However, the use of modern DNA techniques makes sure that a faeces sample belongs to the species of interest, thus resulting in a reduced risk of overestimating occupancy probabilities. Given the serious consequences of inaccurate estimates of the status of rare species for conservation and management decisions, accounting for false-positive errors should be an important component when designing and analyzing monitoring programs for rare species (Miller et al., 2011) or species for which surveys are based on the recording of indirect cues (e.g. scats) like many carnivore species (Heinemeyer et al., 2008).

Acknowledgements

We thank all the field investigators who helped for the field work: R. Lassus, F. Julien, F. Gilbert, S. Perré and A. Denis. We are also grateful to SWAT modellers for their precious help: Y. Grusson, A. Uhart, X. Sun, J. Payoux, as well as the R modeller A. Maire, and J. Brown and M. Williams-Tripp for the implementation of the GRTS sampling. Thank to S. Danflous who corrected the English text, and the Parc Naturel Régional des Pyrénées ariégeoises for the availability of the land use database (BDOS © 2013). This study was funded by ANRT (Cifre n° 2011/1018), EDF (Electricité de France) and European Union (FEDER) and is part of the French conservation Action Plan for the Pyrenean desman (2010–2015) supervised by DREAL MP (Direction Régionale pour l'Environnement, l'Aménagement et le Logement de Midi-Pyrénées) and coordinated by the CEN MP (Conservatoire d'Espaces Naturels Midi-Pyrénées).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.019>.

References

- Aing, C., Hall, S., Oken, K., Dobrow, R., Heberg, J., 2011. A Bayesian hierarchical occupancy model for track surveys conducted in a series of linear, spatially correlated sites. *J. Appl. Ecol.* 48, 1508–1517.
- Allan, J.D., Palmer, M., Poff, N.L., 2005. Climate change and freshwater ecosystems. In: Lovejoy, T.E., Hannah, L. (Eds.), *Climate Change and Biodiversity*. Yale University Press, pp. 274–290.
- Arnold, J.G., Srinivasan, R., Mutiah, R.S., Williams, J.R., 1998. Large area hydrologic modeling and assessment Part I: model development. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 34, 73–89.
- Aymerich, P., 2004. Els micromamífers semiaquàtics d'Andorra: distribució i estat de conservació. *Habitats* 9, 26–34.
- Aymerich, P., Gosálbez, J., 2004. La prospección de excrementos como metodología para el estudio de la distribución de los musgafios. *Galemys: Boletín informativo de la Sociedad Española para la conservación y estudio de los mamíferos*, vol. 16, pp. 83–90.
- Barber-Meyer, S.M., Jnawali, S.R., Karki, J.B., Khanal, P., Lohani, S., Long, B., MacKenzie, D.I., Pandav, B., Pradhan, N.M.B., Shrestha, R., Subedi, N., Thapa, G., Thapa, K., Wikramanayake, E., 2013. Influence of prey depletion and human disturbance on tiger occupancy in Nepal. *J. Zool.* 289, 10–18.
- Barbosa, A.M., Real, R., Oliveira, J., Vargas, J.M., 2003. Otter (*Lutra lutra*) distribution modeling at two resolution scales suited to conservation planning in the Iberian Peninsula. *Biol. Conserv.* 114 (377), 387.
- Barbosa, A.M., Real, R., Vargas, J.M., 2009. Transferability of environmental favourability models in geographic space: The case of the Iberian desman (*Galemys pyrenaicus*) in Portugal and Spain. *Ecol. Model.* 220, 747–754.
- Barbosa, A.M., Real, R., Vargas, J.M., 2010. Use of coarse-resolution models of species distributions to guide local conservation inferences. *Conserv. Biol.* 24, 1378–1387.
- Bertrand, A., 1994. Répartition géographique et écologie alimentaire du desman des Pyrénées *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) dans les Pyrénées françaises. Diplôme Universitaire de Recherche, Toulouse.
- Blank, L., Blaustein, L., 2012. Using ecological niche modeling to predict the distributions of two endangered amphibian species in aquatic breeding sites. *Hydrobiologia* 693, 157–167.
- Bucklin, D.N., Basille, M., Benscoer, A.M., Brandt, L.A., Mazzotti, F.J., Romafach, S.S., Sperotera, C., Wafling, J.L., 2015. Comparing species distribution models constructed with different subsets of environmental predictors. *Divers. Distrib.* 21, 23–35.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2002. Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach. Springer, New York, NY.
- Charbonnel, A., D'Amico, F., Besnard, A., Blanc, F., Buisson, L., Némot, M., Laffaille, P., 2014. Spatial replicates as an alternative to temporal replicates for occupancy modelling when surveys are based on linear features of the landscape. *J. Appl. Ecol.* 51, 1425–1433.
- Comte, L., Grenouillet, G., 2013. Species distribution modelling and imperfect detection: comparing occupancy versus consensus methods. *Divers. Distrib.* 19, 996–1007.
- Dewson, Z.S., James, A.B.W., Death, R.G., 2007. A review of the consequences of decreased flow for instream habitat and macroinvertebrates. *J. North Am. Benthol. Soc.* 26, 401–415.
- Domisch, S., Araújo, M.B., Bonada, N., Pauls, S.U., Jähnig, S.C., Haase, P., 2013. Modelling distribution in European stream macroinvertebrates under future climates. *Glob. Change Biol.* 19, 752–762.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Cessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81, 163–182.
- Durso, A.M., Willson, J.D., Winne, C.T., 2011. Needles in haystacks: estimating detection probability and occupancy of rare and cryptic snakes. *Biol. Conserv.* 144, 1508–1515.
- Fernandes, M., Herrero, J., Aulagnier, S., Amori, G., 2008. *Galemys pyrenaicus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 20 March 2013.
- Filipe, A.F., Araújo, M.B., Doadrio, I., Angermeier, P.L., Collares-Pereira, M.J., 2009. Biogeography of Iberian freshwater fishes revisited: the roles of historical versus contemporary constraints. *J. Biogeogr.* 36, 2096–2110.
- Gastman, P.W., Reyes, M.R., Green, C.H., Arnold, J.G., 2007. The soil and water assessment tool: historical development, applications, and future research directions. *Trans. Am. Soc. Agric. Biol. Eng.* 50, 1211–1250.
- Gillet, F., Cabria Garrido, M. T., Némot, M., Blanc, F., Fournier-Chambillon, C., Sourp, E., Vial-Novella, C., Aulagnier, S., Michaux, J., in press. PCR-RFLP identification of the endangered Pyrenean desman, *Galemys pyrenaicus* (Soricomorpha, Talpidae), based on faecal DNA. *Mammalia*.
- González-Esteban, J., Villate, I., Castián, E., 2003. A comparison of methodologies used in the detection of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). *Mammalian Biol.* 68, 387–390.
- Gu, W., Swihart, R.K., 2004. Absent or undetected? Effects of non-detection of species occurrence on wildlife-habitat models. *Biol. Conserv.* 116, 195–203.
- Guisan, A., Zimmermann, N.E., 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol. Model.* 135, 147–186.
- Habets, P., Boone, A., Champoux, J.L., Etchevers, P., Franchistéguy, L., Leblois, E., Ledoux, E., Le Moigne, P., Martin, E., Morel, S., Nollan, J., Quintana Seguí, P., Rousset-Regimbeau, Viennot, P., . . . The SAFRAN-ISBA-MODCOU hydrometeorological model applied over France. *J. Geophys. Res.* 113, 1–18.
- Henemeyer, K.S., Ulizio, T.J., Harrison, R.J., 2008. Natural sign: tracks and scat. In: Long, R.A., MacKay, P., Zielinski, W.J., Ray, J.C. (Eds.), *Non-Invasive Survey Methods for Carnivores*. Island Press, Washington, DC, pp. 45–74.
- Hines, J.E., 2006. PRESENCE 2: software to estimate patch occupancy and related parameters. U.S. Geological Survey, Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, Maryland, USA. <<http://www.mbr-pwrc.usgs.gov/software/presence.html>>.
- Hines, J.E., Nichols, J.D., Royle, J.A., MacKenzie, D.I., Gopalaswamy, A.M., Kumar, N.S., Karanth, K.U., 2010. Tigers on trails: occupancy modeling for cluster sampling. *Ecol. Appl.* 20, 1456–1466.
- Jähnig, S.C., Kuemmerlen, M., Kiesel, J., Domisch, S., Cai, Q., Schmalz, B., Fohrer, N., 2012. Modelling of riverine ecosystems by integrating models: conceptual approach, a case study and research agenda. *J. Biogeogr.* 39, 2253–2263.
- Karanth, K.U., Gopalaswamy, A.M., Kumar, N.S., Vaidyanathan, S., Nichols, J.D., MacKenzie, D.I., 2011. Monitoring carnivore populations at the landscape scale: occupancy modelling of tigers from sign surveys. *J. Appl. Ecol.* 48, 1048–1056.
- Kéry, M., Gardner, B., Monnerat, C., 2010. Predicting species distributions from checklist data using site-occupancy models. *J. Biogeogr.* 37, 1851–1862.
- Kéry, M., Guillaere-Aroita, C., Lahoz-Monfort, J.J., 2013. Analysing and mapping species range dynamics using occupancy models. *J. Biogeogr.* 40, 1463–1474.
- Kiesel, J., Fohrer, N., Schmalz, B., White, M.J., 2010. Incorporating landscape depressions and tile drainages of a northern German lowland catchment into a semi-distributed model. *Hydrolog. Process.* 24, 1472–1486.
- Kuemmerlen, M., Schmalz, B., Cate, B., Cai, Q., Fohrer, N., Jähnig, S.C., 2014. Integrating catchment properties in small scale species distribution models of stream macroinvertebrates. *Ecol. Model.* 277, 77–86.
- Lake, P.S., 2000. Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J. North Am. Benthol. Soc.* 19, 573–592.
- MacKenzie, D.I., Nichols, J.D., Lachman, G.B., Droege, S., Royle, J.A., Langtimm, C.A., 2002. Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology* 83, 2248–2255.
- MacKenzie, D.I., Nichols, J.D., Royle, J.A., Pollock, K.H., Bailey, L.L., Hines, J.E., 2006. *Occupancy Estimation and Modeling: Inferring Patterns and Dynamics of Species Occurrence*. Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
- Manel, S., Williams, H.C., Ormerod, S.J., 2001. Evaluating presence absence models in ecology: the need to account for prevalence. *J. Appl. Ecol.* 38, 921–931.
- Melero, Y., Aymerich, P., Luque-Larena, J.J., Gosálbez, J., 2012. New insights into social and space use behaviour of the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 58, 185–193.
- Miller, D.A., Nichols, J.D., McClintock, B.T., Grant, E.H.C., Bailey, L.L., Weir, L.A., 2011. Improving occupancy estimation when two types of observational error occur: non-detection and species misidentification. *Ecology* 92, 1422–1428.
- Moriari, D.N., Arnold, J.G., Van Iew, M.W., Binger, R.L., Harmel, R.D., Veith, T., 2007. Model evaluation guidelines for systematic quantification of accuracy in watershed simulations. *Trans. ASABE* 50 (3), 885–900.
- Morúa-Holme, N., Floggaard, C., Svenning, J.-C., 2010. Climate change risks and conservation implications for a threatened small-range mammal species. *PLoS ONE* 5, e10360.
- Némot, M., Bertrand, A., Sourie, M., Arlot, P., 2011. A French Conservation Action Plan for the Pyrenean Desman *Galemys pyrenaicus*. *Galemys: Boletín informativo de la Sociedad Española para la conservación y estudio de los mamíferos*, vol. 23, pp. 47–50.
- Neitsch, S.L., Arnold, J.G., Kiniry, J.R., Williams, J.R., 2005. *Soil and Water Assessment Tool Theoretical Documentation, Version 2013*. Temple, Tex.: USDA-ARS Grassland, Soil and Water Research Laboratory. <<http://www.brc.tamus.edu/swat/doc.html>> (accessed 01.05.13).
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., González, J., 1992. Aproximación a la metodología y estudio del área de distribución, estatus de población y selección de hábitat del desmán (*Galemys pyrenaicus*) en la Península Ibérica. Ministerio de Medio Ambiente, Oviedo.
- Nores, C., Palacios, B., Ventura, J.A.M., Vázquez, V.M., González, J., et al., 1999. Informe sobre la situación del Desmán Ibérico (*Galemys pyrenaicus*) en España. Seminario de conservación de argaritifera margaritifera y *Galemys pyrenaicus* en la Península Ibérica, Pola de Somiedo (Asturias, Spain).
- Ottaviani, D., Panzacchi, M., Jona Lasinio, G., Genovesi, P., Bottoni, L., 2009. Modelling semi-aquatic vertebrates' distribution at the drainage basin scale: the case of the otter *Lutra lutra* in Italy. *Ecol. Model.* 220, 111–121.
- Pagé, C., Terray, L., 2010. Nouvelles projections climatiques à échelle fine sur la France pour le 21ème siècle : les scénarii SCRATCH2010. Technical Report TR/CMCC/1058, SUC au CERHACS, URA CERHACS/CNRS No1875CS, Toulouse, France.
- Palmeirim, J.M., Hoffmann, R.S., 1983. *Galemys pyrenaicus*. *Mammalian Species* 207, 1–5.
- Pedroso, N.M., Marques, T.A., Santos-Reis, M., 2014. The response of otters to environmental changes imposed by the construction of large dams. *Aquatic Conserv.: Marine Freshwater Ecosyst.* 24, 66–80.
- Queiroz, A.I., Alves, H., Almada, V., 1993. The small hydro plants: predicted impacts on the Pyrenean desman populations (*Galemys pyrenaicus*, Geoffroy). In: *Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman*, Lisbon, pp. 69–77.
- Qi, C., Grunwald, S., 2005. GIS-based hydrologic modeling in the Sandusky watershed using SWAT. *Trans. ASABE* 48, 169–180.
- Queiroz, A.I., Bertrand, A., Khakhria, G., 1996. Status and conservation of Desmaninae in Europe. Council of Europe, Strasbourg.

- Ramalhinho, M.G., Boa Vida, M.J., 1993. Habitat of the Pyrenean Desman: assessment of running water quality. Monitoring pollution. In: *Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman*, Lisbon, pp. 63–67.
- Reid, N., Lundy, M.G., Hayden, B., Lynn, D., Marnell, F., McDonald, R.A., Montgomery, W.I., 2013. Detecting detectability: identifying and correcting bias in binary wildlife surveys demonstrates their potential impact on conservation assessments. *Eur. J. Wildl. Res.* 59, 869–879.
- Royan, A., Hannah, M.D., Reynolds, J.S., Noble, G.D., Sadler, P.J., 2014. River birds' response to hydrological extremes: new vulnerability index and conservation implications. *Biol. Conserv.* 177, 64–73.
- Royle, J.A., Link, W.A., 2006. Generalized site occupancy models allowing for false positive and false negative errors. *Ecology* 87, 835–841.
- Stevens, D.L., Olsen, A.R., 2004. Spatially balanced sampling of natural resources. *J. Am. Stat. Assoc.* 99, 262–278.
- Strayer, D.L., Dudgeon, D.D., 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29, 344–358.
- Thorn, M., Green, M., Bateman, P.W., Waite, S., Scott, D.M., 2011. Brown hyaenas on roads: Estimating carnivore occupancy and abundance using spatially auto-correlated sign survey replicates. *Biol. Conserv.* 144, 1799–1807.
- Toner, J., Farrell, J., Mead, J., 2010. Muskrat abundance responses to water level regulation within freshwater coastal wetlands. *Wetlands* 30, 211–219.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555–561.
- Williams-Tripp, M., D'Amico, F.J.N., Pagé, C., Bertrand, A., Némox, M., Brown, J.A., 2012. Modeling rare species distribution at the edge: the case for the vulnerable endemic Pyrenean desman in France. *Scientific World J.* 2012, 1–6.
- Waits, L.P., Paetkau, D., 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *J. Wildl. Manag.* 69, 1419–1433.
- Winchell, M., Srinivasan, R., Di Luzio, M., Arnold, J.C., 2007. *ArcSWAT interface for SWAT user's guide*. Blackland Research Center, Texas Agricultural Experiment Station and USDA Agricultural Research Service.

Author : François Gillet

Title : Conservation genetics and biology of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in France

Thesis supervisors : Stéphane Aulagnier and Johan Michaux

Place and date of defense : Toulouse, 7th July 2015

Summary

The Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) is a semi-aquatic mammal endemic to the Iberian Peninsula and the Pyrenees and classified as “vulnerable” by the IUCN. The aims of this PhD thesis, part of a National Action Plan, were to improve the knowledge on this species by the development of molecular tools (species identification by sequencing of a fragment of the cytochrome b gene and by RFLP, creation and amplification of polymorphic microsatellites). A genetic structure of three populations associated with low levels of genetic diversity has been evidenced in the French Pyrenees. In addition, the molecular analysis of its diet (COI gene) has allowed to identify its foraging areas and an individual survey on a stretch of river has revealed long distance movements unsuspected before. These results may direct conservation measures for this species.

Keywords :biotraits; COI; conservation biology; conservation genetics; French Pyrenees; *Galemys pyrenaicus* ; genetic structure; faeces; metabarcoding; microsatellites; molecular diet; monitoring; next-generation sequencing; population dynamics; RFLP; species identification;

Discipline : Ecology, biodiversity and evolution

Laboratories : Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), (I.N.R.A. UR0035), 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France and Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgique

Auteur : François Gillet

Titre : Génétique et biologie de la conservation du desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) en France

Directeurs de thèse : Stéphane Aulagnier et Johan Michaux

Lieu et date de soutenance : Toulouse, le 7 juillet 2015

Résumé

Le desman des Pyrénées (*Galemys pyrenaicus*) est un mammifère semi-aquatique, endémique de la péninsule ibérique et des Pyrénées et vulnérable selon l'UICN. Les objectifs de cette thèse, dans le cadre d'un Plan National d'Actions, ont été d'améliorer les connaissances sur cette espèce par la mise au point d'outils moléculaires (identification de l'espèce par séquençage d'un fragment du gène du cytochrome b et par RFLP, création et amplification de microsatellites polymorphes). Une structure génétique à trois populations associée à des bas niveaux de diversité génétique a été mise en évidence dans les Pyrénées françaises. L'analyse moléculaire de son régime alimentaire (gène COI) a permis d'identifier ses zones de chasse et un suivi individuel sur un tronçon de rivière a permis de découvrir une capacité de mouvement à longue distance insoupçonnée. Ces résultats ont permis de proposer des mesures de conservation mieux adaptées pour cette espèce.

Mots clés : Biologie de la conservation ; biotraits ; COI ; dynamique des populations ; *Galemys pyrenaicus* ; fèces ; génétique de la conservation ; identification d'espèces ; métabarcoding ; microsatellites ; Pyrénées françaises, régime alimentaire ; RFLP ; séquençage nouvelle génération ; suivi individuel ; structure génétique

Discipline : Écologie, biodiversité et évolution

Laboratoires : Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS), (I.N.R.A. UR0035), 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France et Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgique