

Suivi d'une population de lièvre variable (*Lepus timidus*) en hiver dans le massif des Ecrins par une méthode non invasive basée sur la génétique .

Bouche Michel *

Besnard Aurélien **

Queney Guillaume ***

Résumé:

Le développement des techniques associées à des marqueurs génétiques permet aujourd'hui l'identification des espèces et des individus à partir de fèces récoltées sur le terrain.

Depuis 2013, le Parc national des Ecrins met en œuvre un protocole de collecte de fèces de Lièvre en hiver (*Lepus timidus* et *Lepus europaeus*). Après extraction et amplification de l'ADN, assignation d'espèce et d'individus, les logiciels de Capture-Marquage-Recapture sont utilisés pour obtenir des effectifs et des densités de Lièvre variable sur plusieurs sites d'étude.

Depuis 2013, ces densités sont relativement stables, oscillant entre 0,8 et 1,4 individu par kilomètre carré.

Les taux de survie obtenus sont de l'ordre de 0,55, ce qui correspond à une espérance de vie de 5 à 6 ans.

En 2017, un hybride de première génération (*Lepus timidus* X *Lepus europaeus*) a été découvert parmi les 213 lièvres variables identifiés.

Cette méthode, avec des données géolocalisées apporte également des informations sur l'utilisation de l'espace par les lièvres en hiver : les lièvres variables ne sont pas territoriaux et fidèles à leur site d'hivernage d'une année sur l'autre. Elle donne aussi des informations sur les interactions entre Lièvre variable et Lièvre d'Europe : les 2 espèces sont en sympatrie sur un gradient d'altitude dont l'importance semble liée aux conditions climatiques.

*Bouche Michel, Parc national des Ecrins, Domaine de Charance, 05000 Gap
michel.bouche@ecrins-parcnational.fr

**Besnard Aurélien, CNRS / Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR 5175
1919 Route de Mende -F34293 Montpellier cedex 5
Aurelien.BESNARD@cefe.cnrs.fr

*** Queney Guillaume, Laboratoire Antagène, 6 allée du Levant, CS 60001, 69890 La Tour de Salvagny
gqueney@antagene.com

Introduction

Le lièvre variable est un arctico-alpin. Il s'est spécifié en marge des glaciers lors des grandes glaciations du quaternaire (Wilson et al. 2005), puis il a suivi leur retrait vers le nord du paléarctique et en altitude dans les Alpes. L'espèce s'est également retrouvée piégée sur des îles par la montée du niveau des océans en Irlande, en Écosse et à Hokkaido au Japon.



Fig 1 : Répartition du lièvre variable (*Lepus timidus*) dans le Paléarctique

Dans les Alpes les densités observées semblent beaucoup plus faibles qu'en Écosse ou que en Scandinavie, mais cette espèce est emblématique de ce massif.

Dans un contexte de réchauffement climatique, la question de la réduction de son biotope est posée. De plus la compétition avec le lièvre d'Europe (*Lepus europaeus*) pourrait s'accroître, tant sur le plan spatial, avec une augmentation de la zone de sympatrie que sur le plan génétique avec un risque d'introgression (Thulin 2003, Thulin et al. 2006)

La littérature scientifique sur cette espèce est abondante en Écosse et en Scandinavie, dans les Alpes elle est beaucoup plus rare et porte essentiellement sur l'écologie et le comportement de l'espèce (Bouche 1988, Corti com. Pers., gamboni 1997, Slotta 1998, Nodari 2006, Bisi et al. 2013, Rehnus 2013). Nombre d'entre elles sont basées sur des méthodes indiciaires qui ne permettent pas de discriminer Lièvre variable et Lièvre d'Europe sur le large gradient d'altitude où les deux espèces sont présentes. De plus il n'existe pas de méthode standardisée permettant d'estimer les tendances démographiques et la dynamique de population du lièvre variable dans les Alpes est à ce jour inconnue.

Depuis 2013, Le Parc national des Ecrins, dans le cadre de ses objectifs de conservation et de gestion, a entrepris de tester une méthode non invasive de suivi des effectifs de lièvre variable basée sur l'analyse génétique des fèces.

1/ Méthode :

1-1/ Zones d'étude

Le site de Mikéou sur la commune de Réotier (Hautes Alpes) est prospecté depuis 2013. La zone d'étude s'étend sur environ 1600 ha, de 1500 à 2700 m d'altitude. Elle est majoritairement boisée jusqu'à 2200 m d'altitude.

2 autres zones ont été suivies en 2016 et 2017 : l'une en Isère sur le massif du Taillefer, l'autre en limite Isère Hautes Alpes sur le plateau d'Emparis.



Fig 2 : Localisation des sites d'étude Lièvre variable du massif des Ecrins

1-2/ Collecte des prélèvements :

Le développement des marqueurs génétiques permet l'identification des espèces et des individus à partir de prélèvement de fèces sur le terrain (Marucco et al. 2011, Mollet et al. 2015, Pérez et al. 2014, Rösner et al. 2014, Schwartz et al. 2007, Valière et al. 2007).

Dans le parc national des Ecrins, la collecte des échantillons se fait de façon aléatoire le long de différents itinéraires parcourus en hiver et à ski sur la zone d'étude.

Chaque itinéraire est séparé du précédent par une chute de neige. Il peut être légèrement différent d'une fois à l'autre pour éviter la trap-dépendance, tout en conservant la même détectabilité des animaux.

Chaque échantillon est géolocalisé, stocké individuellement et daté (postérieur à la précédente chute de neige).

Outre les chutes de neige qui assurent l'indépendance entre les itinéraires, l'hiver présente de nombreux autres avantages pour la collecte :

- le froid conserve l'ADN (de ce fait le succès des géotypages dépasse les 98%)
- les fèces sont plus visibles sur le sol
- en hiver pas de reproduction ni de grands déplacements ce qui permet de travailler sur des populations closes.

Le nombre de parcours réalisés (3 à 4) et le nombre de prélèvements (90 à 110 pour une zone d'environ 1500 ha) a été choisi pour optimiser la précision des résultats et le coût des analyses. Un échantillonnage des fèces est parfois nécessaire, soit sur le terrain (la probabilité que 2 fèces appartiennent à 2 lièvres différents augmente au-delà de 100m : on espace donc les prélèvements) ou a posteriori avec une grille de 100X100 m (on élimine des prélèvements dans les mailles où il y en a le plus).

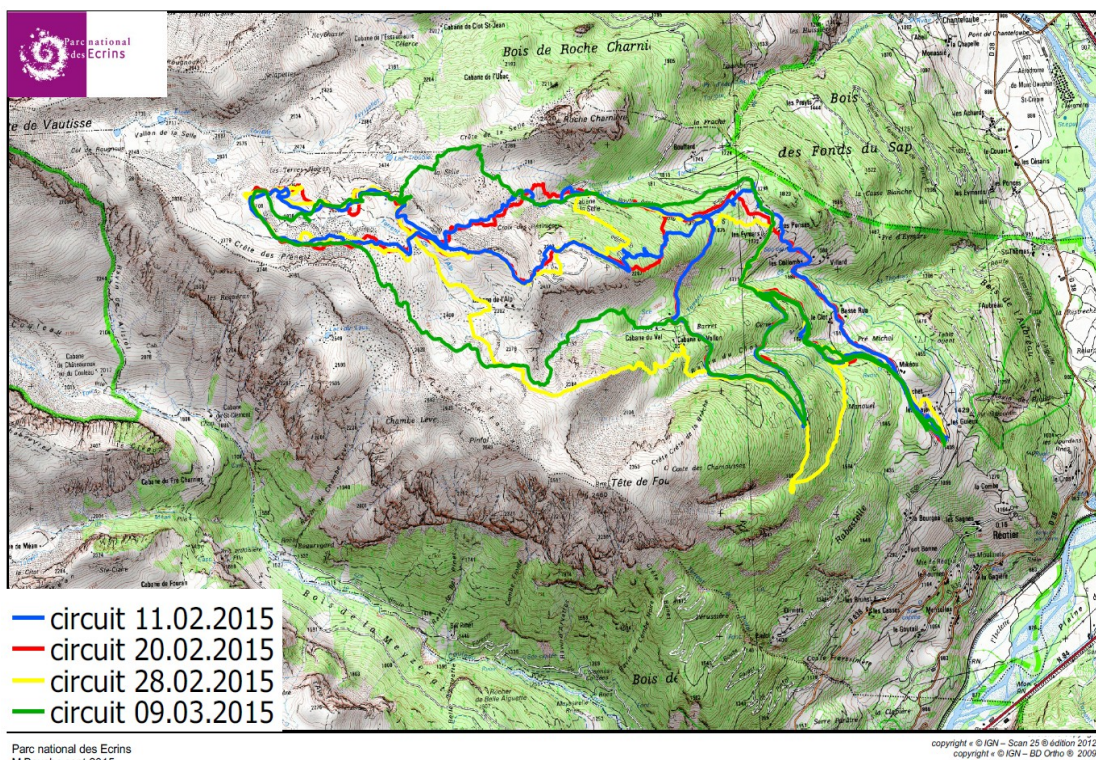


Fig 3 : Itinéraires parcourus à ski en 2015 sur le site d'étude de Mikéou (Réotier)

1-3/ Analyse génétiques

Ces analyses sont assurées par le laboratoire ANTAGENE à La Tour de Salvagny, près de Lyon. L'ADN est extrait des cellules épithéliales présentes à la périphérie des fèces, Puis l'ADN est amplifié jusqu'à 3 reprises. Le laboratoire utilise 12 marqueurs microsatellites, plus 2 marqueurs de sexe spécifiques.

Chaque échantillon est ensuite assigné à une espèce (*L. timidus* ou *L. europaeus*) et à un individu.

1-4/ Analyses statistiques

Pour estimer la taille de la population suivie nous utilisons un logiciel de capture-marquage-recapture. Mais ici on parlera plutôt d'identification-recapture puisque les animaux ne sont pas capturés ni marqués.

Nous utilisons essentiellement les logiciels MARK, CAPTURE et Clostest pour s'assurer que l'on travaille bien sur une population fermée. L'analyse peut se faire année après année ou plus globalement avec Robustdesign.

Plusieurs modèles sont testés, notamment avec des taux de capture et de recapture différents et variables.

Le modèle retenu est celui qui présente l'AIC la plus faible

2/ Résultats

2-1/ Effectifs : Sur le site de Mikéou, les effectifs varient de 11 à 19 lièvres variables différents, tout en sachant que les surfaces prospectées varient d'une année à l'autre.

Les intervalles de confiance à 95 % sont très resserrés grâce à 4 répétitions et des taux de recapture très importants d'un itinéraire à l'autre, sauf en 2016 où seuls 3 itinéraires ont pu être parcourus. L'intervalle bas est limité par le nombre d'animaux identifiés.

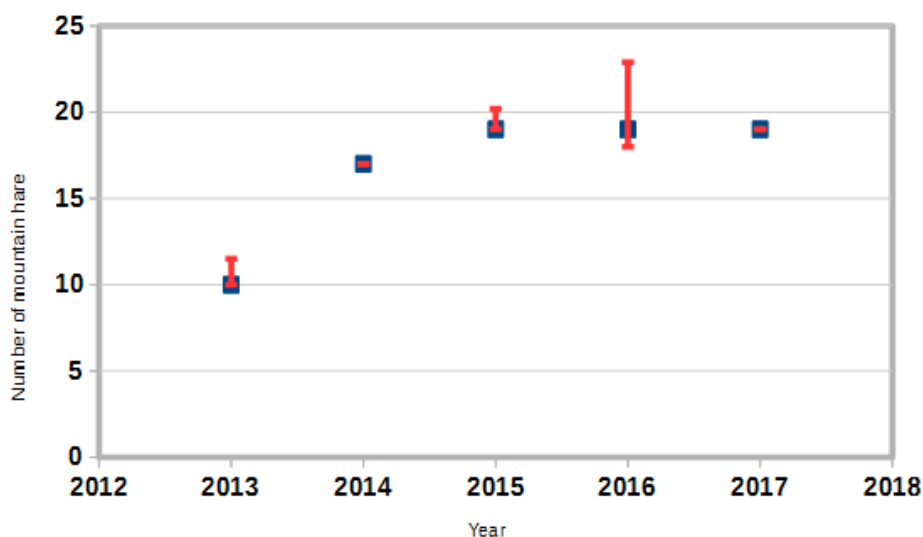


Fig 4 : Evolution des effectifs de Lièvre variable sur le site de Mikéou (Réotier)

Le meilleur modèle est celui pour lequel taux de capture et de recapture sont égaux et constants, ce qui n'est pas surprenant pour une méthode non invasive et des répétitions proches les unes des autres (dans l'intervalle de 2 mois au maximum).

Il n'y a pas d'effet « temps » ni de trap-dépendance.

2-2 Densités/

Ce calcul permet de comparer les années entre elles et les zones d'étude entre elles.

Une première méthode (Johnson et al. 2005) estime la surface prospectée en traçant autour des itinéraires un tampon dont la largeur est soit la moyenne des amplitudes maximum de déplacement de chaque lièvre, soit la moitié de cette valeur : on obtient donc une fourchette de densités en divisant l'effectif par les surfaces estimées.

Ces densités varient de 0,6 à 1,7 lièvres variables pour 100 hectares.

Ces résultats sont comparables à ce qu'on obtient avec la même méthode sur d'autres sites des Alpes. Les densités observées semblent supérieures dans les Alpes du nord. Les résultats obtenus avec d'autres méthodes sont moins précis et plus aléatoires.

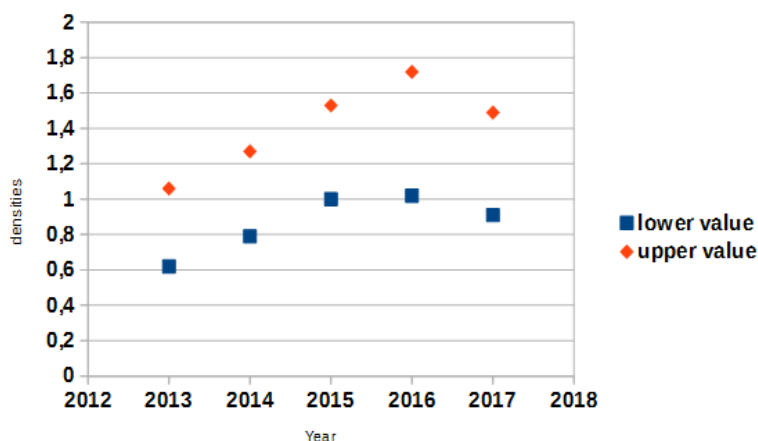


Fig 5 : Evolution des densités sur le site de Mikéou par la méthode des tampons (Johnson 2005)

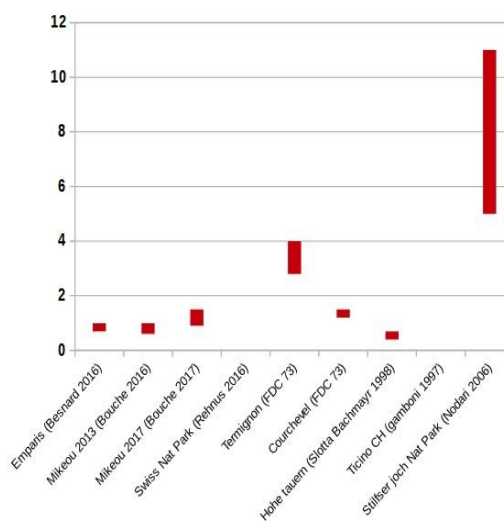


Fig 6 : Densités obtenues sur d'autres sites d'étude

Une seconde méthode permet d'estimer des densités à partir de données géolocalisées et de l'effort de prospection : il s'agit de la CMR spatialisée (Efford 2011).

On obtient des résultats avec un intervalle de confiance tout à fait comparables aux densité obtenues avec la méthode de Johnson, mais aussi avec des données obtenues récemment en Suisse (Rehnus et Bollemann 2016). les densités observées varient de 1 à un peu plus de 3 animaux pour 100 hectares, avec là encore des densités plus élevées pour les Alpes du nord.

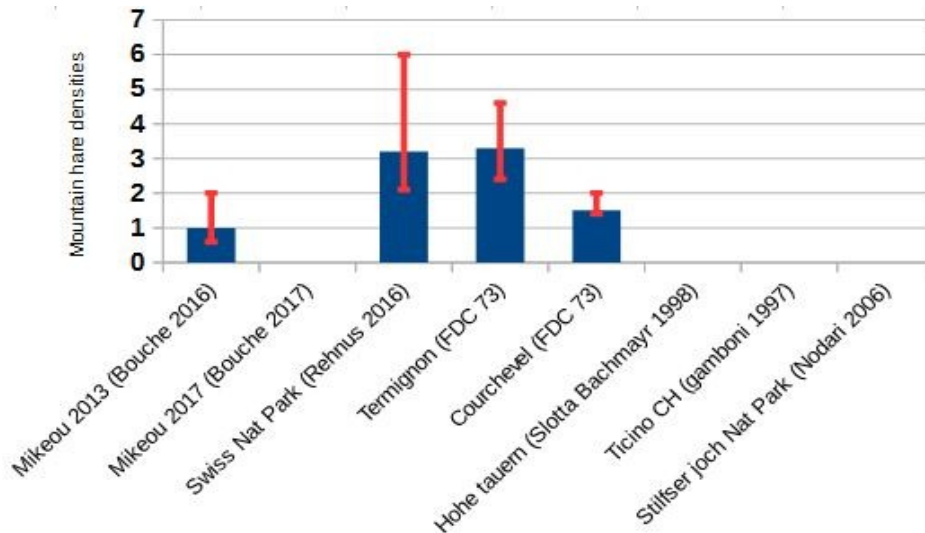


Fig 7: résultats de densités de lièvres variables obtenues par CMR spatialisée (Efford 2011)

2-3 Taux de survie

l'analyse des données avec Robust Design nous permet d'obtenir après quelques années des taux de survie. Nous avons obtenu un taux de survie annuel moyen de 0,55 avec un intervalle de confiance de 0,43-0,67, Il s'agit d'un taux de survie annuel adulte (pas de jeunes en hiver) et hors chasse (pas de prélèvement sur la commune. Ces taux de survie sont très comparables à ce qu'on observe ne Scandinavie et en Écosse (Flux 1970, Hewson 1976, Lindlof 1981, Angerbjorn 1986, Marcstrom 1989, Dahl 2005).

Par ailleurs, 1 seul lièvre est présent au cours des 5 années d'étude. 5 sont présents 4 années consécutives, 6 3 années et 9 2 années consécutives.

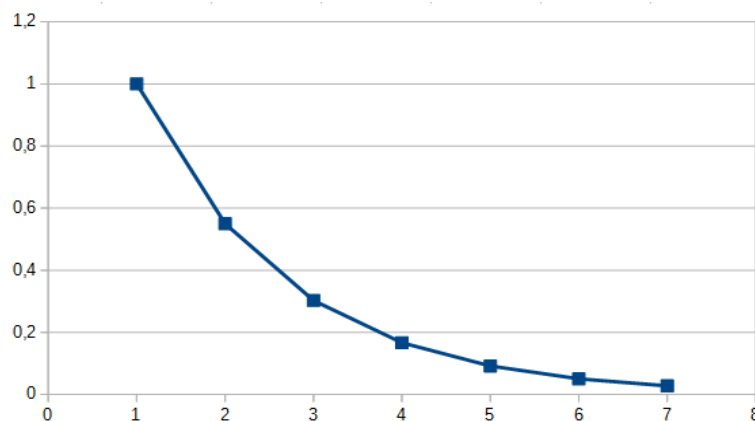


Fig 8 : Evolution de la survie avec l'âge chez le lièvre variable sur le site de Mikéou (Réotier)

2-4/ Interactions interspécifiques

Ce suivi nous donne également une image précise des interactions entre Lièvre variable et Lièvre d'Europe. Les 2 espèces partagent un gradient d'altitude variable d'une année à l'autre, mais qui peut atteindre 1000 m, Il semble que les années les plus enneigées les lièvres d'Europe se cantonnent en

deçà de 1800 m d'altitude, mais que à la faveurs d'hivers moins rigoureux et moins enneigés certains individus arrivent à passer l'hiver au dessus de 200 m jusqu'à plus de 2400 m d'altitude.

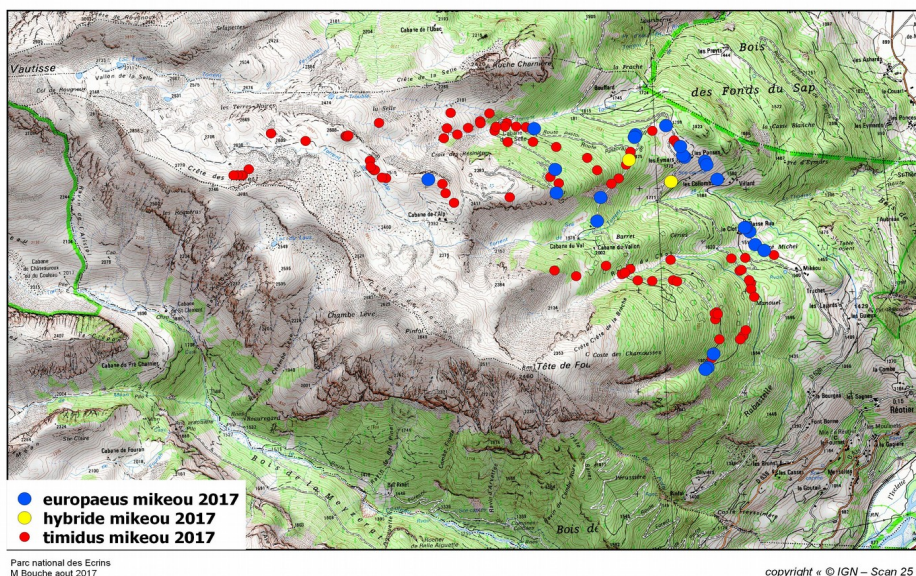


Fig 9 : Répartition du Lièvre variable et du Lièvre d'Europe sur le site de Mikéou (Réotier) en 2017 et d'un hybride des 2 espèces

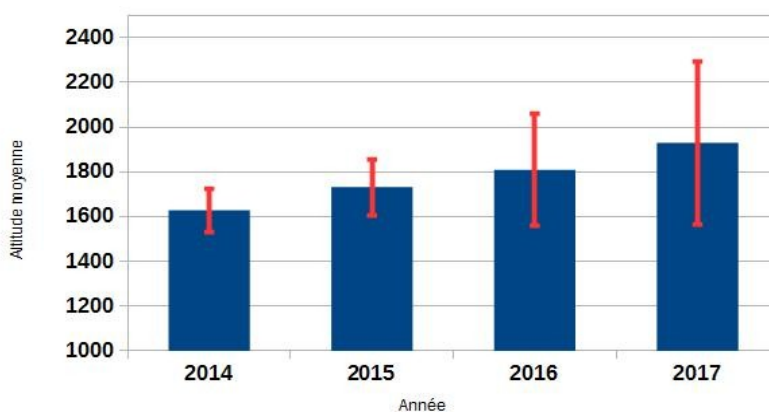


Fig 10 : Evolution de l'altitude moyenne des observations de Lièvre d'Europe sur le site de Mikéou (Réotier)

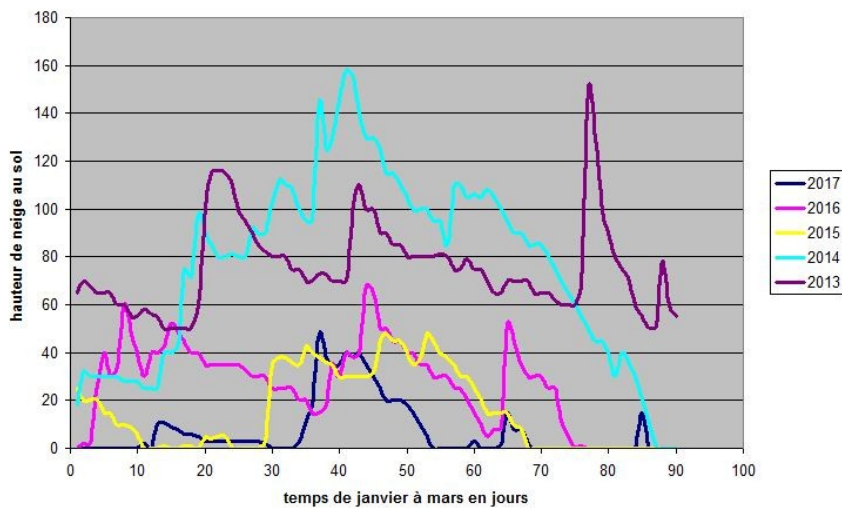


Fig 11 : Epaisseurs de neige cumulées à Pelvoux (hautes Alpes) de 2013 à 2017

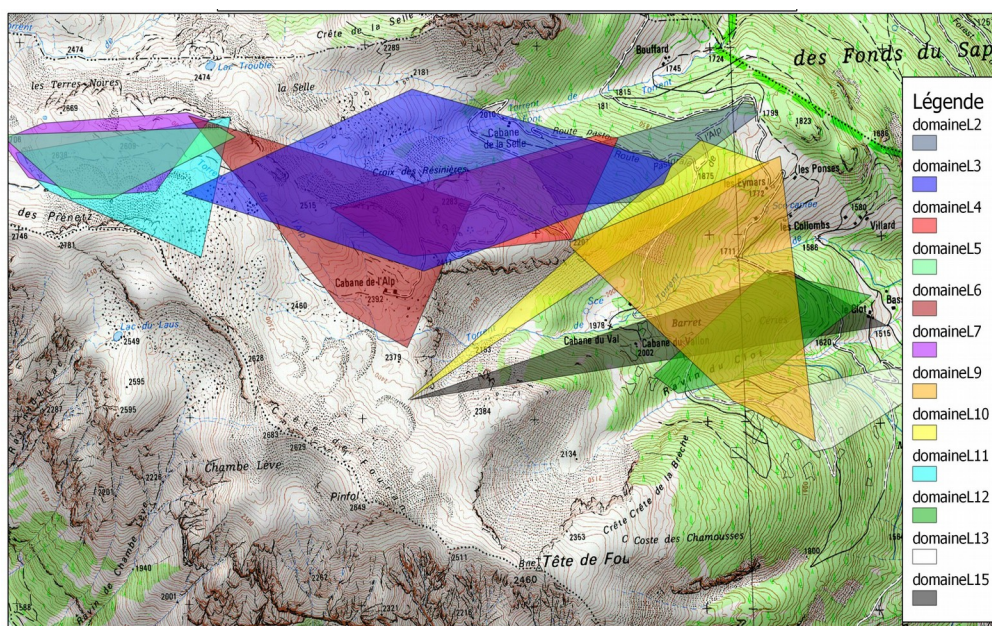
On note une bonne corrélation entre l'enneigement beaucoup plus faible de 2015 à 2017 et l'augmentation de l'altitude moyenne des observations de Lièvre d'Europe sur le site de Mikéou (Réotier).

Ce suivi génétique nous a permis d'identifier en 2017 un hybride de première génération entre *Lepus timidus* et *Lepus europaeus*. Les hybrides de deuxième ou de troisième génération qui présentent moins de différences avec l'une ou l'autre des 2 espèces ne sont pas identifiés. Toutefois cet hybride reste exceptionnel au regard des 213 lièvres variables identifiés sur le massif des Ecrins.

2-5 Utilisation de l'espace sur le site d'étude de Mikéou

Grâce aux données géolocalisées, il est possible de tracer des polygones convexes pour chaque lièvre dont on dispose de au moins 4 localisations par hiver. On peut alors constater que :

- les lièvres variables ne sont pas territoriaux : ils partagent le domaine vital utilisé en hiver.
 - les lièvres variables sont ubiquistes : certains restent en forêt, d'autres restent en altitude. Par contre ils ne fréquentent pas les zones très ouvertes sans blocs ou sans bosquet où ils peuvent trouver refuge.
 - la taille moyenne des polygones hivernaux est de 50 hectares avec un maximum à plus de 200 hectares.
 - l'amplitude maximale de déplacement des lièvres variables est en moyenne de 1600 m avec un maximum à 3500 m.
 - l'amplitude altitudinale des déplacements est en moyenne de 350 m avec un maximum à 900 m.
- Année après année on constate également que les lièvres variables sont fidèles à leur domaine hivernal.



Copyright IGN - Licence BRGM / sphère écologie 2011

Fig 12 : Polygones convexes des localisations de différents Lièvres variables sur le site de Mikéou (Réotier)

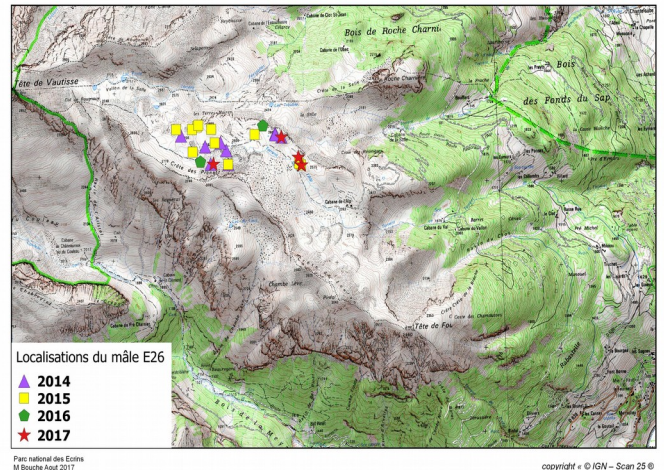
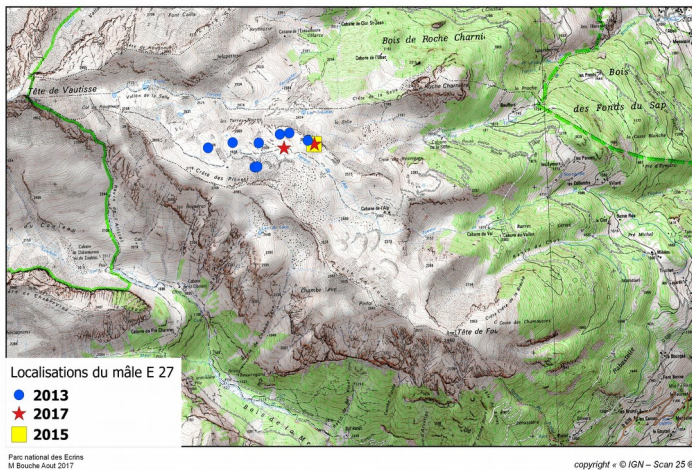


Fig 13 : Localisations de différents Lièvres variables hiver après hiver sur le site de Mikéou

2-6/ Sex ratio

Les marqueurs de sexe n'ont été disponibles qu'en 2017. Ils ont été recherchés sur l'année 2015. Mais les échantillons sont encore faibles, En cumulant l'ensemble des résultats sur l'ensemble des sites des Ecrins, on obtient un sex-ratio quasiment équilibré.

L'analyse des résultats par sexe sera riche d'enseignements comme le montre la ségrégation des sexes sur Mikéou au cours de l'hiver 2017 : au dessus de 2200 m d'altitude, on ne trouve que des mâles.

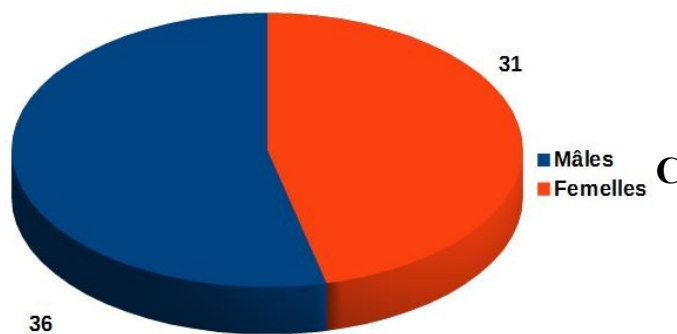


Fig 14 : Sex ratio observé sur les lièvres variables des Ecrins

Conclusion

Cette méthode non invasive basée sur l'analyse génétique des fèces semble fiable pour le suivi des effectifs et des densités des population de lièvre variable en hiver, même si les effectifs réduits limitent la puissance statistique.

Les résultats obtenus sur la population de Réotier montrent des densités assez stables sur les 5 années d'étude, mais il est trop tôt pour faire ressortir un modèle de dynamique de population.

L'hybridation semble faible et par conséquent les risques d'introgession négligeables sur le massif des Ecrins.

Le Lièvre d'Europe semble réagir aux variations climatiques et environnementales.

Les avantages de cette méthode sont nombreux :

-avant tout c'est la seule méthode fiable à ce jour permettant d'estimer les densités de Lièvre variable sur un site d'étude dans les Alpes.

- cette méthode n'est pas intrusive et n'a pas d'impact sur les populations
- cette méthode est standardisable et peut s'appliquer sur tout site accessible en hiver.
- l'investissement sur le terrain est faible (quelques journées-agent par hiver) et les premiers traitements sont aisés.
- cette méthode apporte de nombreuses informations sur l'utilisation de l'espace, et les interactions intra et inter spécifiques.

En 2016 et 2017 cette méthode a été appliquée sur plusieurs sites en Savoie par la Fédération Départementale des chasseurs et par le Parc national de la Vanoise, ainsi que dans la Drôme par la Fédération départementale des chasseurs. D'autres sites devraient voir le jour dans l'Isère, la Haute-Savoie et les Alpes-maritimes en 2018.

Bibliographie

Besnard A. Astruc G 2014. Analyses des données d'identifications individuelles de Lièvres variables à partir de prélèvements de fèces dans le Parc National des Ecrins . Rapport au Parc national des Ecrins. 15p.

Besnard A. Astruc G 2016. Analyses des données d'identifications individuelles de Lièvres variables à partir de prélèvements de fèces en Savoie. Rapport à la Fédération départementale des Chasseurs de Savoie.

Besnard, Astruc et Bouche – 2017 -Le lièvre variable dans le parc national des Ecrins: la génétique au service des gestionnaires de l'espace. Rapport au Conseil Général de l'Isère.

Beugin M-P, Letty J, Kaerle C, et al. A single multiplex of twelve microsatellite markers for the simultaneous study of the brown hare (*Lepus europaeus*) and the mountain hare (*Lepus timidus*). *Ecol Evol.* 2017;7:3931–3939.

<https://doi.org/10.1002/ece3.2943>

Bisi F, Nodari M, Dos Santos Oliviera NM, Masseroni E, Preatoni DG, Wauters LA, Martinoli A (2013) Habitat selection and activity patterns in Alpinemountain hare (*Lepus timidus varronis*). *Mamm Biol* 78:28–33

Bouche M., 1988a. *Contribution à l'étude éco-éthologique du lièvre variable dans le massif des Ecrins*. Document scientifique du Parc National des Ecrins.

Bouche M., 1988b. *Lièvre variable. Suivi de la dynamique des populations dans le massif des Ecrins*. Rapport de DEA, université Paul Valéry, Montpellier.

Burnham, K.P. & Anderson, D.R. (1998) - Model selection and inference: a practical information-theoretic approach. Springer-Verlag.

Dahl F., 2005 : *Life and death of the mountain hare in the boreal forest of Sweden*. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.

Ebert C, Sandrini J, Spielberger B, Thiele B, Hohmann U (2012) Noninvasive genetic approaches for estimation of ungulate population size: a study on roe deer (*Capreolus capreolus*) based on faeces. *Anim Biodivers Conserv* 35:267–275 *Eur J Wildl Res*

Efford, M.G. (2011) - Estimation of population density by spatially explicit capture–recapture

analysis of data from area searches. *Ecology* 92, 2202–2207.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

Flux JEC (1970) Life history of the Mountain hare (*Lepus timidus scoticus*) in north-east Scotland. *J Zool (Lond)* 161:75–123

Gamboni A-S (1997) Comportement spatio-temporel d'une population de lièvre variable (*Lepus timidus varronis*) au sud des alpes. Master thesis, University of Neuchâtel

Hewson, R. (1976). A Population Study of Mountain Hares (*Lepus timidus*) in North-East Scotland from 1956-1969. *Journal of Animal Ecology*, 45(2), 395-414. doi:10.2307/3881

Hewson R., 1990. *Behaviour, population changes and dispersal of mountain hares (Lepus timidus) in Scotland*. *J. Zool. London* 220: 287-309.

Johnson, N.C., Vernes K. & Payne A., 2005 - *Demography in relation to population density in two herbivorous marsupials: testing for source – sink dynamics versus independent regulation of population size*. *Oecologia* 143, p. 70–76.

Letty J., 2011. Analyse de la structuration génétique des populations de lièvre d'Europe et de lièvre variable dans la zone alpine. ONCFS rapport interne

Lindlof, B. 1987. *Lar kanna skogsharen*. Svenska Jagareförbundet, Stockholm, Sweden. 49pp. (In Swedish).

Marucco F, Boitani L, Pletscher DH, Schwartz MK (2011) Bridging the gaps between non-invasive genetic sampling and population parameter estimation. *Eur J Wildl Res* 57:1–13

Mollet P, Kery M, Gardner B, Pasinelli G, Royle JA (2015) Estimating population size for Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) with spatial capture-recapture models based on genotypes from one field sample. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0129020

Nodari M (2006) Ecological role of mountain hare (*Lepus timidus*) in the alpine ecosystem. Habitat use, population consistency and dynamics of a species of conservation and management interest. Dissertation, University Insubria

Otis, D.L., Burnham, K.P., White, G.C. & Anderson, D.R. (1978) - Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildlife Monographs* 62.

Pérez T, Naves J, Vázquez JF, Fernández-Gil A, Seijas J, Albornoz J, Revilla E, Delibes M, Domínguez A (2014) Estimating the population size of the endangered Cantabrian brown bear through genetic sampling. *Wild Biol* 20:300–309

R Core Team (2015) - R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Rehnus M (2013) Der Schneehase in den Alpen: Ein Überlebenskünstler mit ungewisser Zukunft. Bristol-Stiftung, Zurich. Haupt, Bern

Rehnus M, Bollemann K (2016) Non-invasive genetic population density estimation of mountain

hares (*Lepus timidus*) in the Alps: systematic or opportunistic sampling? *Eur J Wildl Res* DOI10.1007/s10344-016-1053-6

Rösner S, Brandl R, Segelbacher G, Lorenc T, Muller J (2014) Noninvasive genetic sampling allows estimation of capercaillie numbers and population structure in the Bohemian Forest. *Eur J Wildl Res* 60:789–801

Schwartz MK, Pilgrim KL, McKelvey KS, Rivera PT, Ruggiero LF (2007b) DNA markers for identifying individual snowshoe hares using field-collected pellets. *Northwest Sci* 81:316–322

Slotta-Bachmayr L (1998) Biologie und Ökologie des Alpenschneehasen (*Lepus timidus varronis* Miller 1901). Verbreitung, Raumnutzung, Aktivität und Habitatwahl in den Hohen Tauern. Dissertation, Paris Lodron University Salzburg

Stanley, T.R. & Burnham, K.P. (1999) - A closure test for time-specific capture-recapture data. *Environmental and Ecological Statistics* 6, 197–209.

Thulin C.G., 2003. *The distribution of mountain hare Lepus timidus in Europe: a challenge from brown hare Lepus europaeus* ? *Mamm. Rev.* 33, 1: 29-42.

Thulin C.G., Stone J., Tegelstrom H., Walker C.W. 2006. *Species assignment and hybrid identification among scandinavian hares Lepus europaeus and Lepus timidus*. *Wildlife Biology* 12

Valière N, Bonenfant C, Toïgo C, Luikart G, Gaillard J-M, Klein F (2007) Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conserv Genet* 8:69–78

Wilson, D. E., and D. M. Reeder (eds). 2005. *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins University Press

White, G.C. & Burnham, K.P. (1999) - Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46 (Suppl.), 120–139.

White, G.C., Anderson, D.R., Burnham, K.P. & Otis, D.L. (1982) - Capture-recapture and removal methods for sampling closed populations. Los Alamos National Laboratory Rep. LA-8787-NERP, Los Alamos, New Mexico, USA., 235pp.