



Pôle départemental de Recherche sur la Biodiversité en Isère

Rapport du projet SPIBEX – Août 2015

Conception d'un indicateur spectroscopique pour l'étude et le suivi de la population de Bouquetins en Chartreuse



Table des matières

Liste des personnes et partenaires impliqués dans ce projet.....	4
Résumé.....	5
I. Objectifs et enjeux du projet SPIBEX.....	6
II. Matériel et méthodes.....	8
Site d'étude	8
Occupation du site par les animaux	8
Protocole de récolte des échantillons sur le terrain	9
Protocole laboratoire	10
Analyses Infrarouge.....	11
Analyses élémentaires.....	12
III. Résultats.....	14
Analyse des échantillons mixtes de végétation	14
Analyses des fèces.....	15
Discrimination des sexes	16
Discrimination des classes d'âges.....	18
Calibration pour la discrimination des échantillons par genre	19
Calibration pour l'azote fécal (indice Nf).....	19
Evolution de Nf au cours de la période de végétation.....	21
IV. Discussion	22
V. Conclusion	24
Bibliographie.....	25

Liste des personnes et partenaires impliqués dans ce projet

- Sébastien De Danieli, Nathan Daumergue, Lauric Cécillon et Jean-Jacques Brun
Unité de Recherche Ecosystèmes montagnards - IRSTEA Grenoble

sebastien.de-danieli@irstea.fr

nathan.daumergue@irstea.fr

lauric.cecillon@irstea.fr

jean-jacques.brun@irstea.fr

- Suzanne Barnave et Paul Boudin
Réserve Naturelle des Hauts de Chartreuse
Maison du Parc
38380 Saint Pierre de Chartreuse

reserve.naturelle@parc-chartreuse.net

- Carole Toïgo
ONCFS – CNERA Faune de Montagne
5, allée de Bethléem ZI Mayencin
38610 Gières

carole.toigo@oncfs.fr

Résumé

Notre étude s'est concentrée sur la mise en œuvre et l'intérêt de la spectroscopie infrarouge pour le suivi d'une population de Bouquetin réintroduite ces dernières années sur le massif de Chartreuse. Les analyses spectroscopiques ont été réalisées sur les fèces d'animaux et collectées individuellement auprès d'individus marqués et suivis par télémétrie. Les empreintes spectrales obtenues ont permis de discriminer les individus de même sexe. En revanche, les tests de discrimination des individus en fonction de leur âge n'ont pas donné de résultats significatifs. Enfin, cette étude a permis de concevoir une calibration pour évaluer l'indice Nf (azote fécal) avec des coûts nettement moindre par rapport aux méthodes de laboratoire classiques. Cet indice apporte des éléments de réponse sur la diversité et l'évolution de la qualité du régime alimentaire du Bouquetin. L'utilisation de cet indice au cours du temps permettra aux gestionnaires de prendre en compte les évolutions des relations de la population avec son environnement.

I. Objectifs et enjeux du projet SPIBEX

Le projet SPIBEX (Suivi par Spectroscopie Infra-rouge de la population de Bouquetin (*Capra ibex*) en Chartreuse) s'est intéressé au suivi de la population de Bouquetins réintroduits en 2010 sur la Réserve Naturelle des Hauts de Chartreuse. Les animaux constituant ce noyau de population sont issus de deux populations distinctes puisqu'un premier lâcher a été effectué en 2010 avec des animaux issus du massif de Belledonne, et un second lâcher a été réalisé en 2011 avec cette fois-ci des animaux issus du Parc National de la Vanoise.

Dans ce contexte de réintroduction, un suivi continu et rigoureux a été mis en place par les gestionnaires concernés. La compétition interspécifique, l'occupation des milieux ou encore l'appropriation et l'acceptation de ces nouveaux occupants par les acteurs locaux dans les paysages chartusiens, sont autant de facteurs déterminants à prendre en compte par les gestionnaires, pour faire de cette réintroduction, une véritable réussite, mais également un atout majeur pour la biodiversité. Parmi ces facteurs, le suivi sanitaire, la performance des individus ou encore la dynamique de la population font partie des éléments les plus essentiels à prendre en compte dans le suivi individuel (Morellet et al. 2007).

En effet, le suivi de populations animales en continu s'avère parfois difficile et coûteux compte-tenu des difficultés inhérentes aux méthodes mises en œuvre : les indicateurs biométriques par exemple, implique de capturer l'animal, nécessitant ainsi des moyens humains et logistiques conséquents. Pour pallier à ces méthodes, le développement de différents indicateurs comme les Indicateurs de Changement Ecologique (Morellet et al. 2007) ou d'autres outils faisant appel à des techniques non-invasives comme le barcoding ADN (Kohn et Wayne 1997) existent. Parmi ceux-ci, le développement et l'utilisation de la spectroscopie Infrarouge (IR) dans la conception d'indicateur de qualité, à partir de mesures réalisées sur les fèces (Foley et al. 1998; Dixon et Coates 2009) semblent prometteur.

Les fèces laissées par les animaux sur les sites qu'ils occupent sont facilement récoltables et l'étude de leur composition est une approche permettant d'améliorer les connaissances sur les habitudes alimentaires, la physiologie ou encore l'écologie des animaux concernés (Putman 1984; Landau, Glasser, et Dvash 2006).

Pour cette approche, différentes analyses sont mobilisables en laboratoires en fonction des objectifs fixés : dosage des glucocorticoïdes pour évaluer le dérangement et le stress (Sheriff et al. 2011), ou plus généralement l'évaluation des teneurs en matières azotées essentielles à la nutrition (Leslie, Bowyer, et Jenks 2008). Cependant il s'avère que la plupart des méthodes conventionnelles utilisées en laboratoire restent très coûteuses, que ce soit en temps ou en argent. Mais depuis quelques années, le développement de capteurs IR (proche et moyen infrarouge) a permis de concevoir de nouvelles approches pour l'analyse de constituants organiques dans différents domaines (agro-industriel, biogéochimie...). Ces techniques sont utilisées pour réaliser des analyses en routines de différents éléments chimiques (azote, carbone...) et sont non-destructives. Toutefois, pour chaque nature d'échantillon analysé, une étape de calibration doit être effectuée en fonction

de l'élément que l'on souhaite doser. Outre cette approche quantitative, cette technique présente également l'intérêt de caractériser un échantillon par rapport à un autre, ou à un ensemble d'échantillons, puisque le spectre obtenu lors de l'analyse reflète sa composition chimique et sera alors utilisé comme une empreinte unique propre à l'échantillon. De cette façon il est alors possible d'effectuer des classifications d'échantillons basées sur leurs propriétés physico-chimiques.

Compte-tenu des différents éléments cités précédemment le projet SPIBEX vise à mettre en œuvre cette approche originale pour le suivi des Bouquetins réintroduits en établissant des **mesures de références** pour le suivi à court ou long terme des individus présents, et en **développant un indicateur spectroscopique** pertinent pour évaluer les relations de la population avec son environnement. Au cours de ces travaux, les principaux objectifs ont été de (i) tester la possibilité d'échantillonner individuellement les animaux sur le terrain, (ii) d'évaluer la mise en œuvre de l'analyse IR pour discriminer des individus à partir de leur fèces et (iii) d'établir une calibration pour prédire un indice global mobilisable pour le monitoring de la population.

II. Matériel et méthodes

Site d'étude

Le travail de terrain (récolte des échantillons après observation directe des animaux) s'est déroulé sur la Réserve naturelle des Hauts de Chartreuse.

Ce territoire montagnard d'une superficie de 4432 ha (alt. moyenne 1608 m) situé au cœur du PNR de Chartreuse présente une grande diversité de milieux. La végétation dominante recouvrant les sites d'études occupés par les animaux étant principalement composée de Landes mixtes à ligneux bas sur éboulis partiellement végétalisés, pelouses alpines sur dalles et prairies moyennes.



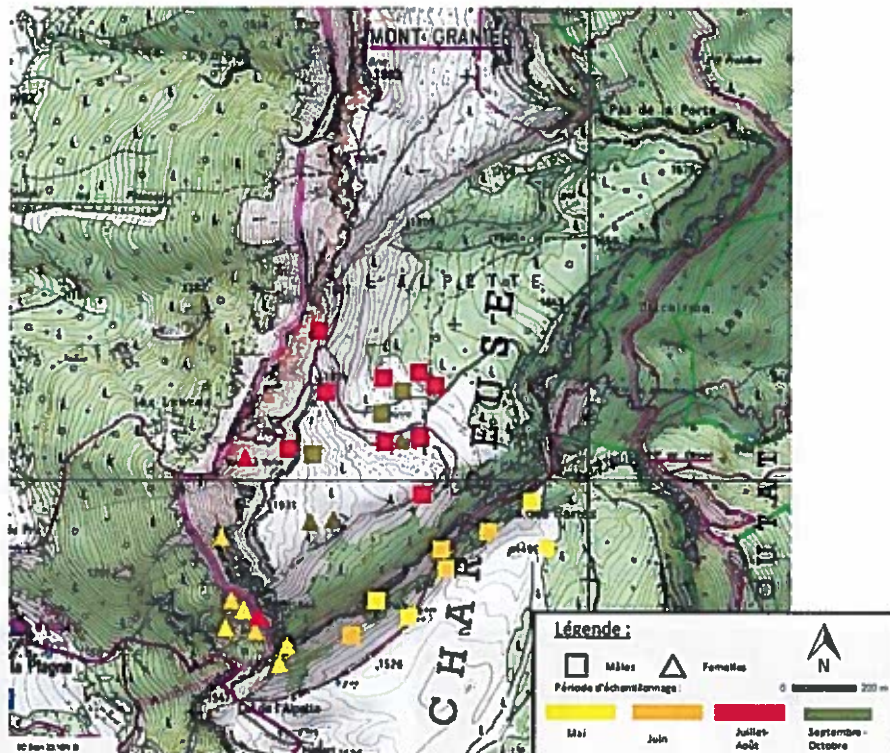
Bouquetin mâle sur la Réserve des Hauts de Chartreuse – S.De Danieli

Occupation du site par les animaux

Nos travaux se sont concentrés sur les individus présents essentiellement sur le plateau du Granier. En effet, on peut distinguer deux groupes d'animaux, l'un sur le plateau et l'autre sur le secteur du Pinet. D'après les gestionnaires, il s'avère que les animaux présents sur le Pinet ont peu d'interactions avec le groupe du Granier. Malgré nos efforts et compte-tenu des sangles particulièrement exposées, il ne nous a pas été possible d'échantillonner convenablement les individus présents sur le secteur du Pinet.

Sur le secteur Granier, qui comprend les sangles périphériques ainsi que le plateau de l'alpage de l'Alpette, les animaux occupent des secteurs bien définis d'une année sur l'autre et en fonction des saisons. Le point le plus bas pour nos observations et collecte d'échantillons se situe sous le col de l'Alpette (alt. 1434 m) et a été réalisé en début de

saison de végétation (courant Mai). Le point le plus haut se trouvant sur le plateau du Granier, au-dessus du secteur de Fontaine Neuve (alt. 1875m).



Carte 1 : Représentation cartographique des principales positions enregistrées lors de l'échantillonnage des animaux en 2014

Protocole de récolte des échantillons sur le terrain

De Septembre 2013 à Juin 2015, 117 échantillons de fèces ont été récoltés sur un ensemble de 20 journées de terrain. Les campagnes d'échantillonnages sur le terrain se sont déroulées sur des périodes allant des mois de Mai à début Novembre. Pour cette étude, nous avons été contraints de ne pas échantillonner en hiver afin de préserver la quiétude des animaux en période de rut ainsi que pour des raisons de sécurité.

Pour chaque journée de terrain, l'ensemble des sites connus et occupés par les animaux étaient contrôlés. Dans certains cas, le recours à la télémétrie a permis de repérer des animaux occupant des zones boisées et que nous n'aurions pas localisés sans cet appui technique.

L'approche des groupes d'individus repérés étaient ensuite réalisés pour atteindre une distance moyenne d'observation inférieure à 50 mètres. Les animaux étaient alors identifiés à partir des marquages auriculaires et leur observation en continu par un ou plusieurs observateurs équipés de jumelles permettaient de collecter les échantillons de fèces récentes et directement associées à un individu. Bien que le Bouquetin reste une espèce peu farouche à la vue de l'homme (surtout concernant les individus mâles), la principale contrainte concerne essentiellement la récolte des échantillons dans la végétation ; cette opération s'avère relativement délicate et demande une certaine

expérience afin d'éviter au maximum de collecter la litière ou la végétation environnante, mais également pour ce qui concerne les objectifs de cette étude, il nous fallait être parfaitement sûr de l'individu concerné par l'échantillon récolté. Chaque échantillon de fèces était alors conditionné immédiatement et individuellement en sac plastique stérile. Enfin, la position GPS de chaque individu (ou groupe d'individus) concerné par la collecte était ensuite relevé.

Parallèlement à ces collectes, des échantillons de végétations ont été prélevés durant la campagne de 2014 dans le but de déterminer la teneur en Azote et la digestibilité des couverts exploités par les animaux. Ces prélèvements étaient réalisés manuellement sur les zones où l'alimentation des animaux était constatée directement. Un échantillon mixte de végétation était alors prélevé sur une surface de 0.5 m² et conditionné en sac plastique stérile.

A l'issue de chaque journée de terrain, les échantillons (fèces et végétation) étaient transportés au laboratoire dans un délai relativement court (6 heures maximum entre la collecte et le retour labo) pour une conservation à -18°C jusqu'à leur préparation pour analyses.



Observation des animaux à distance et récolte de fèces – S. De Danieli

Protocole laboratoire

A l'issue de ce stockage, les échantillons ont été triés manuellement. Cette étape s'avère essentielle car lors de la collecte sur le terrain et malgré les précautions de manipulations, certains échantillons présentaient encore un trop grand nombre d'éléments comme des débris végétaux ou minéraux, pouvant par la suite fausser les spectres. Dans certains cas (peu de matière ou trop contaminés), des échantillons ont été écartés du lot final pour analyses. Par la suite les échantillons conservés ont été directement mis en étuve durant 48h à 40 °C. Suite à cette étape de séchage, un broyage fin a été réalisé à partir d'un broyeur à rotor (Retsch ZM200) équipé d'un tamis d'une maille de diamètre 0.25 mm, permettant d'obtenir un échantillon sous forme d'une poudre homogène et d'une granulométrie fine.

Analyses Infrarouge

Cette technique d'analyse est utilisée dans un grand nombre d'applications industrielles notamment pour le contrôle en ligne des matières premières. Son principe est basé sur l'analyse des réactions vibrationnelles des liaisons atomiques constituant le matériau étudié.

Pour cela, un faisceau dans le domaine du Proche IR (10 000 à 4000 cm^{-1}) ou moyen IR (4000 à 400 cm^{-1}) balaye l'échantillon sur l'ensemble de la gamme de longueur d'onde. Au cours de l'analyse, le rayonnement IR est alors absorbé par les liaisons atomiques des groupes fonctionnels (amides, composés phénoliques, aromatiques ...) dans une gamme spécifique de longueur d'onde. Suite à cette phase d'analyse de quelques minutes seulement, un spectre (ou empreinte spectrale) propre à la nature de l'échantillon est obtenu. Ce dernier est constitué de bandes d'absorbance dont l'intensité et leur position renseigne sur la nature des groupes fonctionnels présents au sein de l'échantillon.

Pour cette étude, un certain nombre de considérations techniques nous ont amenés à réaliser l'acquisition des spectres IR sur deux appareillages distincts. L'intérêt de cette double acquisition était d'obtenir un spectre à la fois dans le domaine du proche IR mais également dans le moyen IR. Le principal atout du travail dans le moyen IR étant de pouvoir interpréter directement les pics d'absorbance présents sur le spectre ; chose difficilement réalisable dans le proche IR. Cependant, l'appareillage utilisé en proche IR permet quant à lui de réaliser des analyses en routine et son module d'acquisition présente une sensibilité à la granulométrie moindre ainsi qu'une surface d'analyse dix fois supérieure à celle présente sur le module moyen IR.

Une première acquisition a donc été effectuée sur un spectromètre Nicollet IS10 (ThermoFischer Scientific™) en mode Réflexion totale atténuée (ATR). Pour cette analyse, chaque échantillon est balayé par un faisceau lumineux IR dont l'intensité varie de 4000 à 500 cm^{-1} . Un spectre moyen constitué de 32 balayages et d'une résolution de 8 cm^{-1} est alors obtenu pour chaque échantillon en quelques minutes.

Une seconde acquisition en proche IR a ensuite été réalisée sur un spectromètre Antaris II (ThermoFischer Scientific™). Ici, l'échantillon est balayé par un faisceau dont l'intensité varie de 10 000 à 4000 cm^{-1} . Le spectre moyen obtenu est constitué de 64 scans et d'une résolution de 8 cm^{-1} .

Les spectres bruts subissent par la suite différents traitements chimiométriques, regroupant un ensemble de méthodes mathématiques et statistiques spécialement développées pour l'analyse IR. Par la suite, deux types d'approches peuvent être envisagés :

- Qualitatives : les empreintes spectrales sont utilisées pour caractériser les échantillons et des classifications/discriminations basées sur les différents niveaux d'absorbance enregistrées sont réalisées.

- Quantitatives : un étalonnage (ou calibration) est réalisé et vise à relier les spectres à des valeurs de références mesurées au préalable sur les échantillons par d'autres méthodes analytiques conventionnelles. Cette option permet de réaliser alors un grand nombre de prédiction en routine d'une ou plusieurs variables à partir de l'étalonnage réalisé au préalable et pour un coût moindre.

Dans le cadre du projet SPIBEX, le jeu de données spectrales récolté a subi dans un premier temps des traitements préparatoires (correction de la ligne de base, normalisation et dérivées premières) dans le but de corriger d'éventuelles dérives liées aux conditions lors de l'acquisition (température et hygrométrie du laboratoire, température de l'analyseur ...). Passé ce stade, une approche exploratoire qualitative est menée dans un premier temps à partir d'Analyses en Composantes Principales (ACP). Cette étape a pour objectif d'établir les premières interprétations sur la nature et l'information mobilisable à partir des données physico-chimiques contenues dans les spectres.

Dans un second temps une approche qualitative est effectuée afin de mobiliser l'information disponible dans les spectres à l'élaboration d'un indice global, basé sur la qualité du régime alimentaire, et qui permet un monitoring à long terme de la population échantillonnée (Blanchard et al. 2003; Leslie, Bowyer, et Jenks 2008; Gil-Jiménez et al. 2015). Cette phase de calibration est réalisée à partir de régressions PLS (Partial Least Squares - Geladi et Kowalski (1986)).

Pour la suite de l'étude, l'approche exploratoire et les tests de discrimination des échantillons ont été réalisés à partir des spectres moyens IR. Les calibrations quant à elles, ont été réalisées en proche IR.

Analyses élémentaires

Parallèlement à ces mesures spectrales, des analyses élémentaires ont été réalisées sur les mêmes échantillons de fèces. Les concentrations en azote total des échantillons ont été mesurés à partir de méthodes de référence (norme iso 16634 – Méthode Dumas) sur un analyseur élémentaire CHNS/O Elementar Vario Micro Cube.

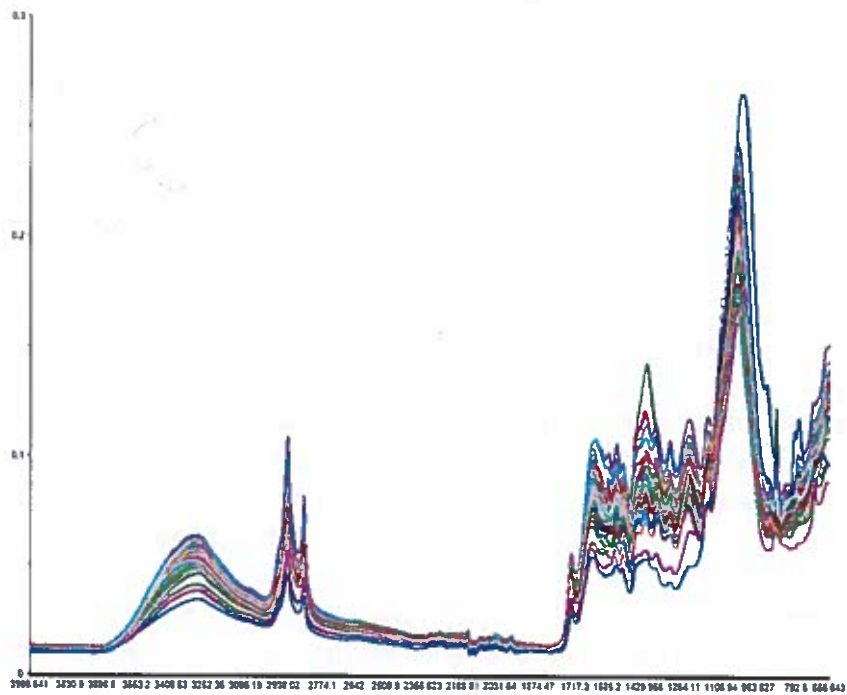
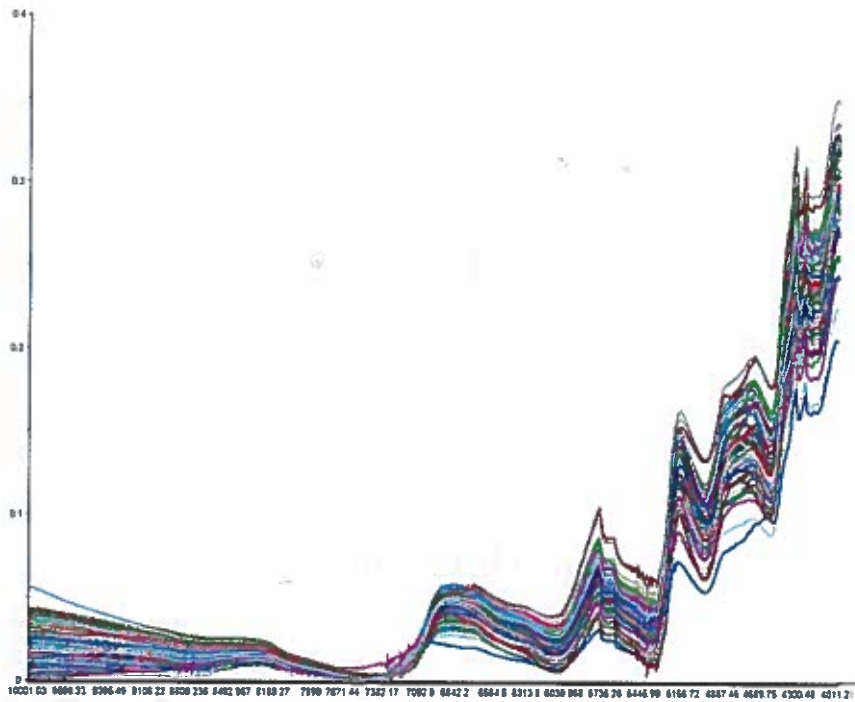


Fig. 2 & 3 - Spectres bruts proche IR (haut) et moyen IR (bas) des échantillons de fèces

III. Résultats

Analyse des échantillons mixtes de végétation

D'après la littérature, la distribution spatiale chez le Bouquetin est caractérisée, au cours de l'année, par une occupation des zones d'alimentation présentant un couvert végétal avec une forte teneur en azote (Neuhaus et Ruckstuhl 2002).

Dans un premier temps, nous avons donc analysé les teneurs en azote total des échantillons mixtes de végétations collectés durant la période 2014 sur les zones d'alimentations des animaux. Les résultats obtenus en fonction de la date et du lieu de récolte sont donnés dans la figure ci-dessous :

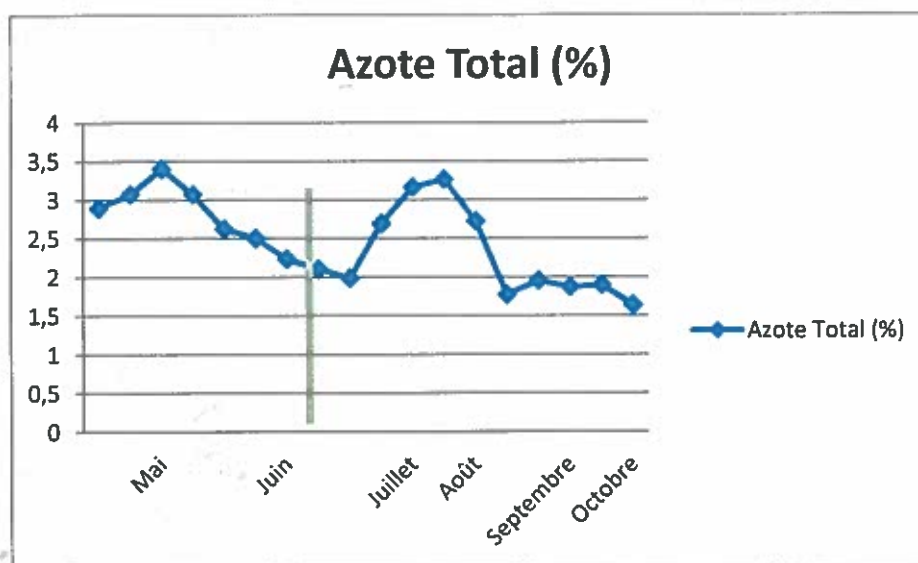


Fig.4 : Evolution de la teneur en azote des échantillons de végétation en 2014

On constate des teneurs élevées en début de saison, pendant les semaines qui ont suivies le retrait du manteau neigeux puis une diminution constante sur les zones encore occupées jusque début Juin. Pour cette période (Avril/Mai) les animaux étaient essentiellement concentrés sur deux zones distinctes :

- la partie Sud sous le col de l'alpette pour les femelles, en pied de falaise du plateau du Granier et le long des sangles jusqu'à la Balme à Colon.
- Le plateau et l'alpage de l'alpette pour les mâles.

Début Juin 2014 (première semaine – en vert sur la figure 4), les animaux (mâles et femelles confondus) ont gagnés, dans un intervalle de quelques jours, des secteurs plus haut en altitude mais toujours bien distincts :

- Sangles hautes de la partie Ouest du Granier pour les femelles.

- Partie haute du plateau du Granier et secteur boisé pour les mâles (lieu-dit Fontaine neuve).

On s'aperçoit que ces déplacements vers de nouvelles zones ont été effectués au moment où les teneurs en azote des végétations consommées étaient parmi les plus faibles. A l'issue de cette période, les zones « d'été » occupées par les animaux présentent à nouveau des teneurs élevées en azote et où le pic semble être atteint autour de la première semaine de Juillet. Il est important de préciser que nous avons analysé un nombre plus faible d'échantillons de végétaux sur la période Août/Septembre (n=5) contrairement à la période Mai/Juin (n=11) ce qui explique sans doute cette diminution plus marquée dans nos résultats.

Analyses des fèces

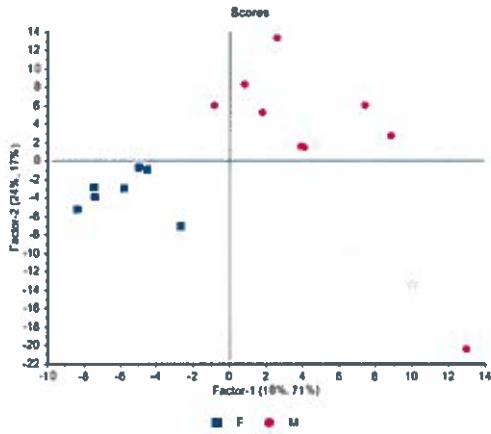
Nous avons vu précédemment que les rayonnements infrarouges émis vers la surface de l'échantillon analysé, sont principalement absorbés par les liaisons atomiques des macromolécules (ou groupes fonctionnels) de type C-H, N-H, O-H, C=O... qui représentent les constituants majoritaires des matériaux organiques comme les débris de végétaux contenus dans les fèces. D'autre part, nos recherches bibliographiques nous ont amenées à concentrer nos travaux non pas sur la lignine et la cellulose mais plutôt sur la teneur en azote total des fèces (Barboza, Parker, et Hume 2009). C'est pourquoi, et compte-tenu des variations élevées de teneur en azote du couvert végétal exploité par les animaux et constatées précédemment, il nous est apparu plus opportun de réaliser dans un premier temps nos analyses par période (Printemps ou Automne).

Discrimination des sexes

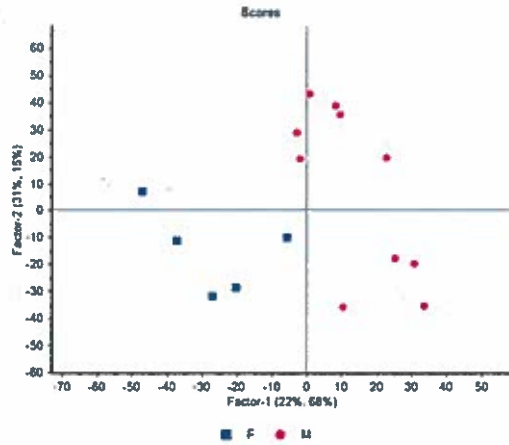
L'approche réalisée ici, a pour objectif de tester la capacité de la spectroscopie sur les échantillons de fèces pour discriminer les individus en fonction de leur sexe.

Période		Triés	Conservés
Automne 2013			
	Mâles	12	10
	Femelles	10	7
Printemps 2014			
	Mâles	30	28
	Femelles	17	12
Automne 2014			
	Mâles	15	10
	Femelles	10	5
Printemps 2015			
	Mâles	14	9
	Femelles	10	6
	TOTAL	104	76

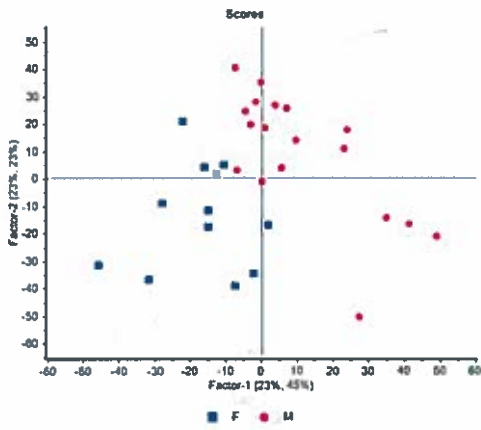
Tab.1 : Nombre d'échantillons collectés par genre et par période



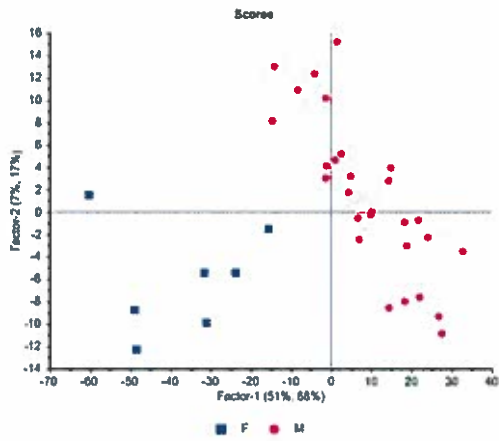
Automne 2013



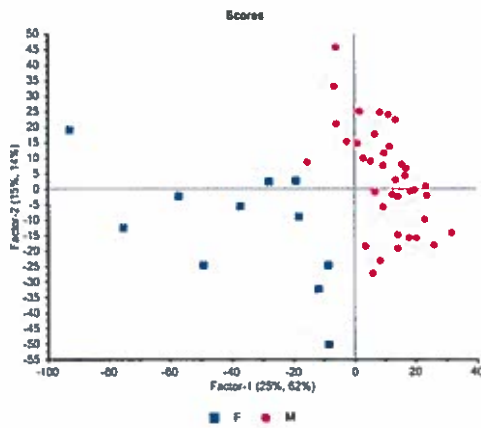
Automne 2014



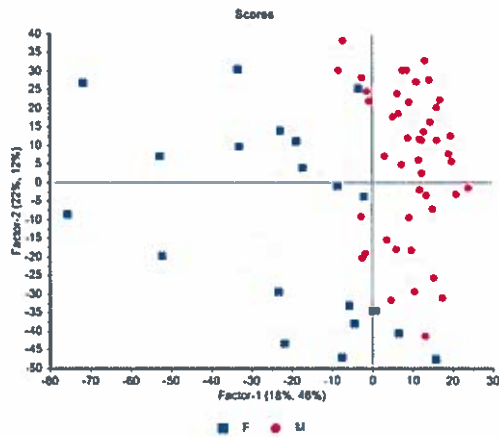
Automne 2013 et automne 2014



Printemps 2014



Année 2014



Années 2013-2014

Fig.5 : Représentation des scores de l'ACP en fonction de différentes périodes.

Quelle que soit la période concernée, les résultats obtenus montrent dans leur ensemble une bonne discrimination des individus en fonction de leur sexe. Il est intéressant de noter toutefois que les échantillons représentant les individus femelles présentent une distribution plus hétérogène traduisant ainsi une plus grande diversité physico-chimique au sein même des échantillons.

Ces premiers résultats vont dans le sens de la littérature et montrent qu'il existe des caractéristiques physico-chimiques assimilables aux genres (Tolleson et al. 2005) et permettant d'obtenir de telles classifications à partir des spectres.

Discrimination des classes d'âges

Dans la continuité des résultats précédents, il paraissait intéressant de pouvoir tester la capacité à discriminer les individus en fonction de leur âge (Jeunes/Adultes). Malgré nos efforts de prospection et compte-tenu de l'effectif relativement faible de cette population au cours de notre étude, nous n'avons obtenu que très peu d'échantillons d'individus considérés comme « Jeune » (individu de moins de 2 ans). Avec ce nombre restreint d'échantillons collectés sur les différentes périodes ($n=7$), l'ACP réalisée sur les échantillons collectés sur l'ensemble de l'année 2014 ne donne pas de résultats significatifs pour classer les échantillons en fonction de l'âge des individus.

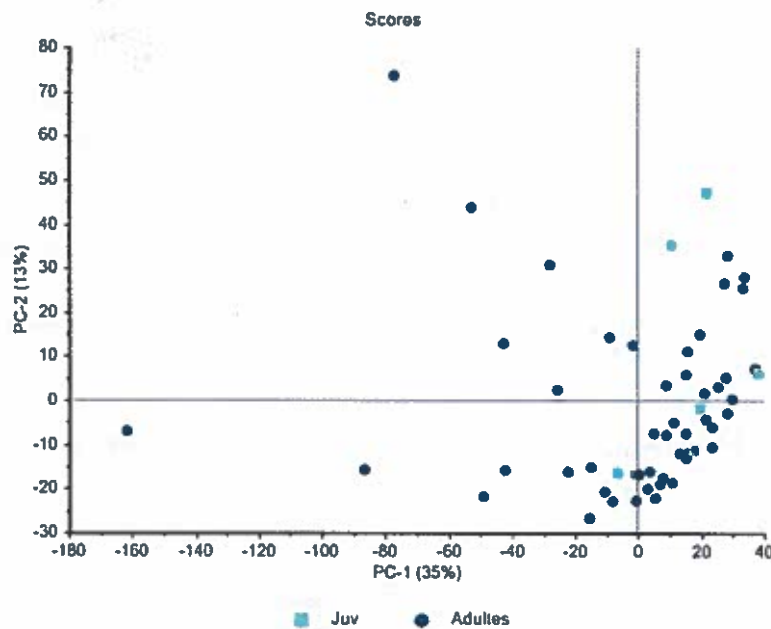


Fig.6 : Représentation des scores de l'ACP pour le test de discrimination des classes d'âges.

Calibration pour la discrimination des échantillons par genre

A l'issue de cette phase exploratoire, nous avons également réalisé une calibration pour classer un échantillon inconnu en fonction du genre (mâle ou femelle). Différentes modalités ont été testées en fonction des échantillons disponibles, de leur date de récolte... Les différentes calibrations obtenues ont été réalisées à partir de régression PLS (Partial Least Squares (Geladi et Kowalski 1986; Barker et Rayens 2003)). Cette méthode de régression très utilisée en chimiométrie permet de construire une calibration prédictive à partir d'un grand nombre de variables explicatives, comme ici avec nos valeurs d'absorbance enregistrées pour chaque spectre. Différentes calibrations ont été réalisées en fonction des périodes d'échantillonnages. Pour chaque modèle, une erreur standard est calculée (RMSEC – Root Mean Square Error of Calibration) et permet d'évaluer la précision de chaque modèle. Compte-tenu du nombre restreint d'échantillons sur les différentes périodes retenues, il a été préférable de ne pas soustraire d'échantillons à nos jeux de calibrations pour les utiliser comme échantillons de validations mais d'utiliser plutôt une validation croisée (Martens et Martens 2001). Toutefois des comparaisons interannuelles ont été réalisées avec des groupes d'échantillons de validations à partir d'échantillons tirés cette fois-ci aléatoirement et non utilisés pour l'équation de calibration.

L'ensemble des résultats obtenus en fonction des différentes calibrations est repris dans le tableau suivant :

Résultats calibrations PLS	n=	R ²	RMSEC
Automne 2013	17	0,89	0,34
Printemps 2014	40	0,69	0,31
Printemps 2014 (tirage aléatoire)	17	0,64	0,39
Automne 2014	15	0,88	0,22
Automne 2013+Automne 2014	32	0,75	0,3
Année 2014	55	0,79	0,2
Printemps 2015	10	0,79	0,32
Période totale (2013+2014)	72	0,77	0,41

Tab.2 : Résultats des calibrations établies pour la prédiction et la classification des échantillons par genre

Calibration pour l'azote fécal (indice Nf)

Pour les ongulés de montagne comme le Bouquetin, la qualité des ressources alimentaire et la disponibilité de celles-ci présentent une grande hétérogénéité spatiale et temporelle (Körner 2003). C'est un facteur clé dans les relations animal-environnement intervenant entre autres dans le métabolisme individuel et les mécanismes de la reproduction (Pekins, Smith, et Mautz 1998; Parker, Barboza, et Gillingham 2009).

Compte-tenu de ces éléments, la teneur en azote fécal (Nf) est fréquemment utilisé comme indicateur de la qualité du régime alimentaire des animaux et devient un outil pour le suivi des populations ((FN – Fecal Nitrogen index) Foley et al. 1998; Leslie, Bowyer, et Jenks 2008; Gil-Jiménez et al. 2015).

Nous avons cherché ici à établir une calibration permettant de prédire cet indice Nf à partir d'un échantillon de fèces de Bouquetin. D'un point de vue pratique, les concentrations en azote total des échantillons ont été d'abord mesurées à partir de méthodes de référence (norme iso 16634 – Méthode Dumas) sur un analyseur élémentaire CHNS/O Elementar Vario Micro Cube. Les résultats obtenus ont été utilisés pour réaliser une calibration à partir des spectres IR et sur un certain nombre d'échantillons issus des campagnes de collecte de 2013 et de 2014. En effet, nos résultats précédents (cf. discrimination en fonction du genre) ont montré des performances sensiblement différentes selon la période au cours de laquelle les échantillons ont été prélevés. Un jeu d'échantillons (n=35) avec un tirage aléatoire réparti sur l'ensemble des campagnes a été créé pour servir de base à la calibration pour cet indice. En parallèle, un jeu d'échantillons de validation (échantillons non utilisés dans la conception du modèle) a été retenu (n= 10) pour évaluer la performance du modèle.

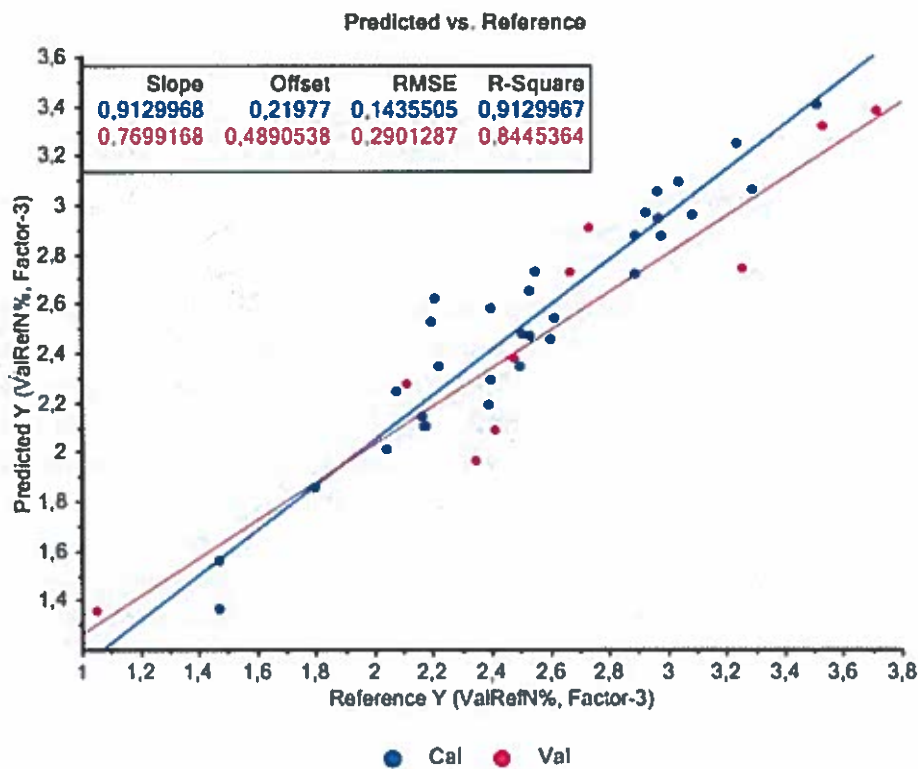


Fig 7. : Calibration pour la prédiction de Nf à partir d'échantillons de fèces de Bouquetins.

Les résultats que nous obtenons sont particulièrement encourageants puisque l'erreur standard de prédiction sur le jeu de validation est de ± 0.29 % sur la teneur en azote total ($r^2=0.84$).

Evolution de Nf au cours de la période de végétation

A partir de notre calibration établie précédemment, nous avons calculé les valeurs moyennes pour l'indice Nf sur la période Mai-Septembre 2014 pour évaluer les variations dans le temps chez les mâles (n=8) et femelles (n=8). Nous avons comparé ces résultats avec les teneurs en azote total des échantillons mixtes de végétation dont le détail est donné dans la figure suivante :

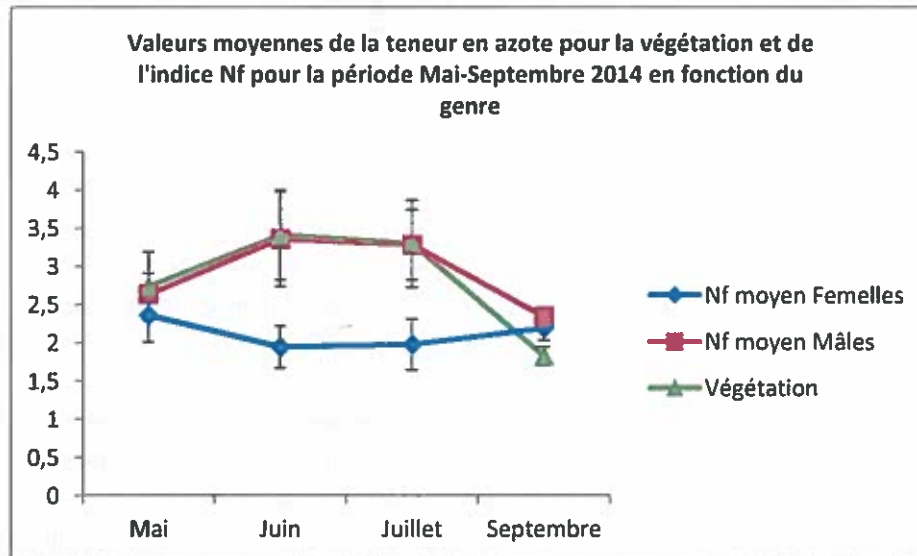


Fig.8 : Valeurs moyennes de la teneur en azote pour la végétation et de l'indice Nf pour la période Mai-Septembre 2014 en fonction du genre

Si l'on constate une différence significative de valeur pour Nf durant la période estivale, en revanche, des valeurs semblables sont obtenues dès l'automne. On peut attribuer ces écarts aux variations qualitatives de la ressource exploitée d'une part (Neuhaus et Ruckstuhl 2002; Grignolio et al. 2007) mais aussi aux différences d'optimisation liées à l'état physiologique des individus, notamment pour ce qui concerne les femelles (Gross, Alkon, et Demment 1996; Grignolio et al. 2007). Compte-tenu de ces résultats, la période automnale semble être la période à privilégier pour un suivi inter-annuel et/ou un monitoring à long terme, dans la mesure où elle permettrait de s'affranchir de variations préjudiciables qui pourrait survenir au cours de l'été et de la période de développement végétatif (K. B. Monteith et al. 2014a).

IV. Discussion

Les différents résultats de cette étude démontrent que la technologie Infrarouge apporte de bons résultats pour évaluer et quantifier certains paramètres physico-chimiques contenus dans les fèces de Bouquetins. Ainsi, le premier test de cette étude, nous a permis d'apprécier la capacité de l'analyse infrarouge pour discriminer relativement bien des échantillons en fonction du genre et dans le même temps, de relever une hétérogénéité plus marquée au sein de la population des femelles.

Au cours de cette étude, notre travail bibliographique nous a amené à concentrer nos travaux sur la teneur en azote contenu dans les fèces comme un paramètre majeur et représentatif de la qualité alimentaire (Gil-Jiménez et al. 2015). La calibration obtenue pour prédire l'indice Nf nous a donné quant à elle de très bons résultats avec une erreur standard faible. Cette calibration constitue la base d'un indicateur mobilisable pour le suivi à moyen ou long terme des individus présents sur le massif.

Toutefois, nous avons constaté des variations inter et intra-annuelles dans la qualité de nos prédictions, notamment quand il s'agissait de discriminer les individus, résultant de variations physico-chimiques au sein des fèces. D'après la littérature, ces écarts traduisent des fluctuations spatio-temporelle de qualité des ressources alimentaires disponibles (Verheyden et al. 2011) mais aussi et surtout des variations de métabolismes en fonction des individus (K. B. Monteith et al. 2014b). En effet, les fonctions digestives chez les ruminants de la même espèce varient d'un individu à l'autre et dépendent de l'état physiologique de celui-ci ; dans leurs travaux menés sur le Bouquetin de Nubie (*Capra Nubiana*), Gross, Alkon, et Demment (1996) ont montré que les femelles gestantes optimisaient la digestion des ressources azotées disponibles dans la végétation, favorisant ainsi l'assimilation de protéines. Ce rendement métabolique plus performant chez les femelles gestantes se traduit par des excréments présentant des teneurs en azote moindre, par rapport aux individus mâles et aux femelles non gestantes (Gross, Alkon, et Demment 1996; K. B. Monteith et al. 2014b). De plus, ce phénomène d'optimisation digestif est d'autant plus marqué pendant la période de lactation (K. L. Monteith et al. 2013; K. B. Monteith et al. 2014b). En effet, même si cette période coïncide avec le pic de végétation en altitude et une abondance de la ressource alimentaire, il s'avère que chez le Bouquetin, les choix des sites pour la mise bas et l'élevage des jeunes ne privilégient pas la qualité et la quantité de la ressource alimentaire disponible, mais plutôt les zones où le risque de prédation est moindre (Toïgo 1999; Grignolio et al. 2007). Il en résulte un accroissement de la capacité à optimiser la ressource alimentaire disponible consécutif à ces stratégies de survie (Gross, Alkon, et Demment 1996).

Ces variations de métabolismes propres à chaque individu expliquent en grande partie les variations observées dans nos résultats et ce, notamment au printemps, et quel que soit le nombre d'échantillons considéré dans nos calibrations (pour rappel, l'année 2014 est celle qui a représenté l'effort d'échantillonnage le plus marqué, associé à des conditions optimales pour le suivi des animaux contrairement aux autres périodes). En revanche la

stabilité et la qualité des résultats que nous avons obtenus pour la période automnale rejoignent les conclusions de K. B. Monteith et al. (2014) et nous laissent penser qu'il s'agirait de la période à considérer comme étant la plus favorable si l'on souhaite utiliser la spectroscopie comme outil de suivi sur le long terme.

Concernant les variations intrinsèques à la végétation et notamment mises en avant par les travaux de Verheyden et al. (2011), il semble important de prendre en compte dans nos calibrations, les différences qualitatives de la végétation et notamment celles induites par les variations de teneur en tanin. En effet, les tanins sont des métabolites secondaires présents dans la végétation et interviennent dans la protection des plantes (Paolini 2004). Dans l'alimentation du Bouquetin, les formes condensées de tanins présentes en quantité importante dans les légumineuses et autres fourragères (Paolini 2004), vont avoir un effet négatif sur la digestibilité et l'assimilation des protéines, favorisant ainsi un accroissement de la teneur en composés azotés dans les fèces (Kariuki et Norton 2008).

Bien que l'utilisation de cet indice pour un suivi à court terme soit controversé d'après quelques études (K. B. Monteith et al. 2014b; Verheyden et al. 2011), notamment en raison de l'hétérogénéité ponctuelle des ressources alimentaires, nous pensons en revanche que son intérêt réside plutôt dans un suivi à long terme comme le suggèrent les travaux de Blanchard et al. (2003) sur le Mouflon du Canada (*Ovis canadensis*).

Associée aux indicateurs démographiques de la population, l'évaluation des fluctuations de la qualité alimentaire par l'indice Nf, apporterait des éléments de réponse sur la relation de la population avec son environnement et présente en ce sens, un certain potentiel dans son utilisation future comme indicateur de changement écologique (Morellet et al. 2007).

Enfin, compte-tenu des coûts d'utilisation modérés de l'Infrarouge, nos travaux sont d'autant plus pertinents pour travailler sur un grand nombre d'échantillons et à l'échelle du massif en suivant ainsi la dynamique de colonisation de la population.

V. Conclusion

Les différents résultats de cette étude nous ont permis de constater que la technologie Infrarouge offre la possibilité d'obtenir de bons résultats pour évaluer et quantifier certaines variables physico-chimiques contenues dans les fèces de Bouquetins. Nous avons vu que des paramètres environnementaux (e.g. tannins) ont une incidence directe sur les indicateurs spectroscopiques et leur développement et l'interprétation nécessite un certain niveau d'expertise en amont. Mais passé cette étape préparatoire, les calibrations obtenues, notamment pour prédire l'indice Nf, démontrent la capacité et l'utilité de la technologie Infrarouge comme outil de monitoring à long terme. En revanche, faute de données mobilisables pour cette population encore jeune qui a présenté une dynamique de reproduction élevée lors de cette étude (toutes les femelles échantillonnées étaient gestantes), nous n'avons pas pu tester le potentiel de la spectroscopie pour évaluer le succès reproducteur dont les résultats à travers de récents travaux, semblent pourtant très encourageants (Wiedower et al. 2012). Enfin, l'évaluation des teneurs en hormone de stress (glucocorticoïdes) à partir de la spectroscopie IR pour la faune de montagne (Rehnus, Wehrle, et Palme 2014; Santos et al. 2014) présente à nos yeux un autre grand intérêt pour les gestionnaires confrontés aux problématiques liées au dérangement.

Bibliographie

- Barboza, Perry S., Katherine L. Parker, et Ian D. Hume, éd. 2009. *Integrative Wildlife Nutrition*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-87885-8>.
- Barker, Matthew, et William Rayens. 2003. « Partial Least Squares for Discrimination. » *Journal of Chemometrics* 17 (3): 166-73. doi:10.1002/cem.785.
- Blanchard, P., M. Festa-Bianchet, J.-M. Gaillard, et J.T. Jorgenson. 2003. « A Test of Long-Term Fecal Nitrogen Monitoring to Evaluate Nutritional Status in Bighorn Sheep. » *Journal of Wildlife Management* 67 (3): 477-84.
- Dixon, R., et D. Coates. 2009. « Review: Near Infrared Spectroscopy of Faeces to Evaluate the Nutrition and Physiology of Herbivores. » *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 17 (1): 1-31. doi:10.1255/jnirs.822.
- Foley, William J., Allen McIlwee, Ivan Lawler, Lem Aragones, Andrew P. Woolnough, et Nils Berding. 1998. « Ecological Applications of near Infrared Reflectance Spectroscopy – a Tool for Rapid, Cost-Effective Prediction of the Composition of Plant and Animal Tissues and Aspects of Animal Performance. » *Oecologia* 116 (3): 293-305.
doi:10.1007/s004420050591.
- Geladi, Paul, et Bruce R. Kowalski. 1986. « Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. » *Analytica Chimica Acta* 185 (janvier): 1-17. doi:10.1016/0003-2670(86)80028-9.
- Gil-Jiménez, E., M. Villamuelas, E. Serrano, M. Delibes, et N. Fernández. 2015. « Fecal Nitrogen Concentration as a Nutritional Quality Indicator for European Rabbit Ecological Studies. » *PLoS ONE* 10 (4). doi:10.1371/journal.pone.0125190.
- Grignolio, Stefano, Iva Rossi, Elisa Bertolotto, Bruno Bassano, et Marco Apollonio. 2007. « Influence of the Kid on Space Use and Habitat Selection of Female Alpine Ibex. » *Journal of Wildlife Management* 71 (3): 713-19. doi:10.2193/2005-675.
- Gross, John E., Philip U. Alkon, et Montague W. Demment. 1996. « Nutritional Ecology of Dimorphic Herbivores: Digestion and Passage Rates in Nubian Ibex. » *Oecologia* 107 (2): 170-78. doi:10.1007/BF00327900.
- Kariuki, I.W., et B.W. Norton. 2008. « The Digestion of Dietary Protein Bound by Condensed Tannins in the Gastro-Intestinal Tract of Sheep. » *Animal Feed Science and Technology* 142 (3-4): 197-209. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.08.006.
- Kohn, Michel H., et Robert K. Wayne. 1997. « Facts from feces revisited. » *Trends in Ecology & Evolution* 12 (6): 223-27. doi:10.1016/S0169-5347(97)01050-1.
- Körner, Christian. 2003. *Alpine Plant Life*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18970-8>.
- Leslie, David M., R. Terry Bowyer, et Jonathan A. Jenks. 2008. « Facts From Feces: Nitrogen Still Measures Up as a Nutritional Index for Mammalian Herbivores. » *Journal of Wildlife Management* 72 (6): 1420-33. doi:10.2193/2007-404.
- Martens, Harald, et M. Martens. 2001. *Multivariate Analysis of Quality: An Introduction*. John Wiley & Sons.

- Monteith, Kevin L., Thomas R. Stephenson, Vernon C. Bleich, Mary M. Conner, Becky M. Pierce, et R. Terry Bowyer. 2013. « Risk-Sensitive Allocation in Seasonal Dynamics of Fat and Protein Reserves in a Long-Lived Mammal. » Édité par Ian Montgomery. *Journal of Animal Ecology* 82 (2): 377-88. doi:10.1111/1365-2656.12016.
- Monteith, Kyle B., Kevin L. Monteith, R. Terry Bowyer, David M. Leslie, et Jonathan A. Jenks. 2014a. « Reproductive Effects on Fecal Nitrogen as an Index of Diet Quality: An Experimental Assessment. » *Journal of Mammalogy* 95 (2): 301-10. doi:10.1644/12-MAMM-A-306.1.
- Morellet, Nicolas, Jean-Michel Gaillard, A. J. Mark Hewison, Philippe Ballon, Yves Boscardin, Patrick Duncan, François Klein, et Daniel Maillard. 2007. « Indicators of Ecological Change: New Tools for Managing Populations of Large Herbivores. » *Journal of Applied Ecology* 44 (3): 634-43. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01307.x.
- Neuhaus, P., et K.E. Ruckstuhl. 2002. « Foraging Behaviour in Alpine Ibex (*Capra ibex*): Consequences of Reproductive Status, Body Size, Age and Sex. » *Ethology Ecology and Evolution* 14 (4): 373-81.
- Paolini, Virginie. 2004. *Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre*. Perpignan. <http://www.theses.fr/2004PERP0524>.
- Parker, Katherine L., Perry S. Barboza, et Michael P. Gillingham. 2009. « Nutrition Integrates Environmental Responses of Ungulates. » *Functional Ecology* 23 (1): 57-69. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01528.x.
- Pekins, P J, K S Smith, et W W Mautz. 1998. « The Energy Cost of Gestation in White-Tailed Deer. » *Canadian Journal of Zoology* 76 (6): 1091-97. doi:10.1139/z98-032.
- Rehnus, M., M. Wehrle, et R. Palme. 2014. « Mountain Hares *Lepus timidus* and Tourism: Stress Events and Reactions. » *Journal of Applied Ecology* 51 (1): 6-12. doi:10.1111/1365-2664.12174.
- Santos, J.P.V., J. Vicente, M. Villamuelas, E. Albanell, E. Serrano, J. Carvalho, C. Fonseca, C. Gortázar, et J.R. López-Olvera. 2014. « Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for Predicting Glucocorticoid Metabolites in Lyophilised and Oven-Dried Faeces of Red Deer. » *Ecological Indicators* 45: 522-28. doi:10.1016/j.ecolind.2014.05.021.
- Sheriff, Michael J., Ben Dantzer, Brendan Delehanty, Rupert Palme, et Rudy Boonstra. 2011. « Measuring Stress in Wildlife: Techniques for Quantifying Glucocorticoids. » *Oecologia* 166 (4): 869-87. doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
- Toïgo, Carole. 1999. « Vigilance Behavior in Lactating Female Alpine Ibex. » *Canadian Journal of Zoology* 77 (7): 1060-63. doi:10.1139/z99-081.
- Tolleson, D.R., R.D. Randel, J.W. Stuth, et D.A. Neuendorff. 2005. « Determination of Sex and Species in Red and Fallow Deer by near Infrared Reflectance Spectroscopy of the Faeces. » *Small Ruminant Research* 57 (2-3): 141-50. doi:10.1016/j.smallrumres.2004.06.020.
- Verheyden, Hélène, Lise Aubry, Joël Merlet, Patrick Petibon, Béatrice Chauveau-Duriot, Nadine Guillon, et Patrick Duncan. 2011. « Faecal Nitrogen, an Index of Diet Quality in Roe Deer *Capreolus capreolus*? » *Wildlife Biology* 17 (2): 166-75. doi:10.2981/10-111.
- Wiedower, E.E., A.J. Kouba, C.K. Vance, R.L. Hansen, J.W. Stuth, et D.R. Tolleson. 2012. « Fecal near Infrared Spectroscopy to Discriminate Physiological Status in Giant Pandas. » *PLoS ONE* 7 (6). doi:10.1371/journal.pone.0038908.