

Rapport de stage de Master 2

Master Gestion Intégrée des Zoonoses et Maladies Animales Tropicales

UTILISATION DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL POUR LES INVENTAIRES DE BIODIVERSITE EN ZONE D'INTERFACE HOMME-ANIMAL AU CAMBODGE

Du 30 Janvier 2025 au 11 Juillet 2025

Présenté par Lucas DENIZOT
Soutenu le mardi 24 Juin 2025

Sous la direction du Docteur Julien CAPPELLE

Co-encadré par le Docteur Pauline VAN LEEUWEN

Stage financé par le projet BCOMING

Établissements d'accueil : Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh
Laboratoire GeCoLab - Université de Liège, Belgique

Remerciements

A Pauline,

Merci pour ton professionnalisme et ta gentillesse. Merci d'avoir pu être présente dans chaque moment de doute, et de m'avoir fait découvrir le Cambodge, la Belgique et toutes les équipes qui y étaient rattachées. Ce fut un réel plaisir de pouvoir travailler à tes côtés.

A Julien,

Merci de m'avoir proposé cette opportunité exceptionnelle de stage, j'ai pu grâce à toi découvrir de nouvelles cultures, de nouveaux pays, et travailler sur un sujet qui me correspondait parfaitement.

Merci infiniment à vous deux, j'espère sincèrement avoir l'occasion de recroiser votre chemin à l'avenir.

A Julia,

Merci d'avoir été présente tout au long de mon séjour au Cambodge, pour ton organisation sans faille au cours des missions et pour m'avoir laissé la chance de découvrir autant de belles espèces en forêt. Je vous souhaite plein de bonheur à Mada !

A tous mes amis du Cambodge,

Merci à vous Bastien, Thomas, Andréa, Léa, Lucas, Zainab, Candice, Jérémy, Frida, Kimhoung, Leangyi, Kimsear, Linavin, Malen et bien entendu à mes colocataires Julie, Elise et Alexandre. Merci de m'avoir permis de m'intégrer si facilement, d'avoir été présents autant à l'Institut que dans le reste du pays au cours de ces quatre fabuleux mois. A nos beuveries du vendredi soir, et à tous ces bons plats mangés à vos côtés. Je sais que je reverrai certains d'entre vous, et je souhaite à vous autres la plus belle des réussites.

Au laboratoire GeCoLab,

Merci de m'avoir permis de visiter vos labos et de comprendre les différentes techniques que vous mettez en place. Merci pour cette petite marche caritative noyée dans le peket, la bière, et toute cette festivité propre à la Belgique.

Enfin, un grand grand merci à ma famille, mes amis...

Merci d'avoir toujours été là, de jour comme de nuit, dans mes moments de joie, de doute et parfois de tristesse. Merci à tous mes proches d'avoir été si bons publics lorsque je partageais tous mes périples en Asie. Merci à ma chérie, pour avoir été toujours présente, pour m'avoir toujours poussé à aller plus loin et pour ne jamais regretter ce que je fais. Merci d'avoir été cette épaule sur laquelle je peux m'appuyer.

Merci à vous tous d'avoir cru en moi et de m'avoir permis d'avoir le courage de réaliser tout cela, sans vous je ne serai pas là à écrire ces remerciements. Je vous aime !

Sommaire

1.Résumé	4
2.Liste des abréviations	5
3.Liste des tableaux	6
4.Liste des figures.....	7
5.Introduction	8
6. Matériels et méthode	17
6.1 Zone d'échantillonnage 2024	17
6.2 Collecte de données	17
6.2.1 ADN environnemental.....	17
6.2.2 Ecouvillonnage accessoire.....	20
6.2.3 Pièges à poils	20
6.2.4 Échantillons complémentaires	21
6.3 Préparation des échantillons en laboratoire	22
Préparation de la librairie, séquençage et traitement bioinformatique	22
6.4 Retranscription et tri des données numériques	22
6.4.1 Tri des données	22
6.4.2 Vérification et validation des identifications.....	22
6.4.3 Ajustement du niveau taxonomique	23
6.4.4 Vérification de la présence des espèces au Cambodge.....	23
6.5 Analyse statistique.....	23
6.6 Echantillonnage 2025	24
7.Résultats.....	26
7.1 Analyse descriptive des données de 2024	26
7.1.1 Échantillonnage	26
7.1.2 Espèces	26
6.1.3 Détection à partir de matrice d'eau et de sol pour le marqueur 12S	28
7.1.4 Ecouvillonnages supplémentaires.....	29
7.2 Comparaison des autres types d'échantillonnages	29
7.2.1 Comparaison entre marqueurs	29
7.2.2 Comparaison entre types d'échantillons.....	32

7.2.3 Comparaison entre type d'échantillons et par marqueur	34
7.3 Effort d'échantillonnage	35
7.4 Comparaison d'identification ADNe/Méthodes conventionnelles.....	36
7.5 Echantillonnage sur le terrain (mission 2025)	37
7.5.1 Mission à Phnom Penh	37
7.5.2 Mission à Stung Treng.....	37
7.5.3 Mission à Battambang	37
7.5.4 Bilan global d'échantillonnage.....	37
8. Discussion.....	38
8.1 Détection des espèces	38
8.2 Application de ces méthodes à la conservation des espèces	38
8.3 Application de ces méthodes à la prévention des zoonoses	38
8.4 Choix des marqueurs	39
8.5 Importance des types d'échantillonnages utilisés.....	39
8.6 Comparaison avec les techniques conventionnelles	41
9. Bibliographie	43
10. Annexe.....	48
Annexe 1. Echantillonnage dans la province de Stung Treng en 2024	48
Annexe 2. Prélèvement d'ADNe sur des feuilles et dans le sol	50
Annexe 3. Protocole de l'« aquatic kit » / Prélèvement d'eau	50
Annexe 4. Préparation et mise en place des pièges à poils.....	51
Annexe 5. Liste des emplacements échantillonnés durant les missions de terrain en 2025	52
Annexe 6. Répartition des espèces détectées de façon précise selon leur classe taxonomique	53

1. Résumé

Les vertébrés subissent un déclin mondial, en grande partie lié aux pressions anthropiques. Dans le cadre du projet BCOMING, cette étude vise à évaluer l'efficacité de l'ADN environnemental (ADNe) pour inventorier la faune vertébrée au Cambodge, zone critique pour la conservation des espèces et pertinente pour la compréhension des dynamiques épidémiologiques.

Une mission menée à Stung Treng (avril-mai 2024), en appui aux équipes de capture de chauves-souris, a permis de collecter huit types d'échantillons d'ADNe (écouvillonnage de feuilles, toiles d'araignées, pièges à poils, etc.). L'analyse des résultats obtenus par metabarcoding, à partir des échantillons prélevés sur le terrain, a révélé 146 taxons différents de vertébrés, dont 91 espèces identifiées de façon précise. La détection concernait principalement des oiseaux et de mammifères, mais cela incluait aussi d'autres classes. La diversité détectée variait selon le type d'échantillon et le marqueur utilisé. La combinaison de l'écouvillonnage de feuilles avec les marqueurs 12S et CO1-Galan s'est avérée particulièrement efficace pour obtenir un recensement qui serait peu coûteux, potentiellement exhaustif, et facilement reproductible. De plus, l'utilisation de toiles d'araignées comme support d'échantillonnage apparaît également prometteuse. Les courbes de raréfaction obtenues n'ayant pas atteint d'asymptote, l'effort d'échantillonnage reste à intensifier. Trois campagnes ont ensuite été réalisées à Phnom Penh, Stung Treng et Battambang, le long d'un gradient d'urbanisation, aboutissant à la collecte de 200 échantillons via quatre types de méthodes, en vue d'analyses futures par metabarcoding.

Ces résultats montrent ainsi que l'ADNe constitue un outil complémentaire pertinent aux approches traditionnelles, bien que perfectible, avec un fort potentiel pour renforcer les dispositifs de suivi de la biodiversité.

Mots clés : Inventaire d'espèces, metabarcoding, maladies émergentes, surveillance, environnement, One Health.

Abstract

Vertebrate species are experiencing a global decline, largely due to human-induced pressures on natural environments. As part of the BCOMING project, this study aims to assess the effectiveness of environmental DNA (eDNA) in order to survey vertebrate wildlife in Cambodia, a key area for species conservation and for understanding disease dynamics.

A field mission supporting bat capture teams was carried out in Stung Treng (April–May 2024) and allowed the collection of eight types of eDNA samples (leaf swabs, spider webs, hair traps, etc.). The results obtained through metabarcoding from these field samples revealed 146 different vertebrate taxa, including 91 precisely identified species. Most detections concerned birds and mammals, but other vertebrate groups were also found. The amount of diversity detected varied depending on the type of sample and the genetic marker used. The combination of leaf swabbing with 12S and CO1-Galan markers proved particularly effective for obtaining a survey that is low-cost, potentially exhaustive, and easy to reproduce. In addition, the use of spider webs as sampling material also appeared to be encouraging. Since the rarefaction curves did not reach an asymptote, more sampling effort is still needed. Three further sampling campaigns were carried out in Phnom Penh, Stung Treng, and Battambang, along an urbanization gradient. A total of 200 samples were collected using four different methods, and they will be analyzed by metabarcoding in future work.

These results show that eDNA is a useful complementary tool to traditional methods, with room for improvement, and with strong potential to support biodiversity monitoring.

Keywords : Species inventory, metabarcoding, emerging diseases, monitoring, environment, One Health.

2. Liste des abréviations

ASEAN : Association of Southeast Asian Nations

ADNe : ADN environnemental

ADNi : ADN dérivé d'invertébrés

COI : Cytochrome Oxydase I

DDF : Dry Dipterocarp Forest

EtOH : Ethanol

INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel

IUCN : International Union for Conservation of Nature

GBIF : Global Biodiversity Information Facility

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NGS : Next-generation sequencing

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLIA : Prek Leap National Institute of Agriculture

RUA : Royal University of Agriculture

RUPP : Royal University of Phnom Penh

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

3. Liste des tableaux

Tableau 1. Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles utilisées pour le recensement d'espèces animales.	12
Tableau 2. Répartition des différents ordres détectés, à partir de l'analyse des données collectées durant la mission de Stung Treng en 2024 et selon un gradient de précision taxonomique	27
Tableau 3. Performances des trois marqueurs, en termes de détection taxonomique sur les échantillons d'ADNe collectés.	30
Tableau 4. Performances des différents types d'échantillonnages en termes de détection taxonomique sur les échantillons d'ADNe collectés.....	34
Tableau Annexe 1. (A) Liste des espèces de Chiroptères capturées en parallèle au cours de la mission réalisée dans la province de Stung Treng (Avril-Mai 2024). (B) Nombre d'échantillons collectés sur le terrain au cours de la même mission et d'échantillons qui ont pu être amplifiés en laboratoire.	49
Tableau Annexe 5. Liste des emplacements échantillonnés au cours des trois missions réalisées entre février et mai 2025 au Cambodge.	52
Tableau Annexe 6. Liste des espèces identifiées par classe taxonomique à partir des échantillonnages réalisés au cours de la mission à Strung Treng en 2024.....	53

4. Liste des figures

Figure 1. Protocole standard de metabarcoding basé sur l'ADN environnemental	13
Figure 2. Mise en place des "pièges à air" durant la mission de 2024 à Stung Treng.....	18
Figure 3. Répartition géographique des zones échantillonnées durant les missions de 2025 pour l'étude de l'ADNe au Cambodge	25
Figure 4. (A) Upset représentant l'analyse des co-détections de taxons vertébrés entre différents types d'échantillons à partir du marqueur génétique 12S. (B) Performances des échantillons d'eau et de sol en termes de détection taxonomique.....	28
Figure 5. Diversité des taxons détectés selon le marqueur génétique utilisé.....	31
Figure 6. Diversité des taxons détectés à partir de différentes techniques d'échantillonnages.....	33
Figure 7. Facet grid représentant le nombre de taxons détectés par type d'échantillonnage et par marqueur.....	35
Figure 8. Courbes de raréfaction montrant la richesse taxonomique cumulée (Taxa NB) en fonction du nombre d'échantillons pour les différents types de substrats étudiés : (A) Air, (B) Feuilles, (C) Poils, (D) Toile d'araignée.	36
Figure Annexe 1. Zones échantillonnées dans la province de Stung Treng en 2024.....	48
Figure Annexe 2. Collecte d'ADNe à partir de l'écouvillonnage de feuilles (A) et du prélèvement de terre (B).....	50
Figure Annexe 3. Utilisation d'un kit aquatique fourni par Nature Metrics (UK) pour collecter l'ADN présent dans l'eau.....	50
Figure Annexe 4. Utilisation de pièges à poils comme méthode de collecte d'ADNe.	51

5. Introduction

I. Biodiversité tropicale et risques sanitaires : l'impact des pressions anthropiques

Les régions tropicales, reconnues pour leur richesse en biodiversité, sont aujourd'hui identifiées comme des foyers majeurs de risques liés à l'émergence de pathogènes zoonotiques (Keesing et al., 2010; Williams et al., 2021). En effet, la forte diversité biologique de ces zones favorise la cohabitation de multiples espèces animales, certaines pouvant héberger des agents pathogènes potentiellement transmissibles à l'être humain. Pourtant, cette biodiversité que l'on pourrait définir comme l'ensemble des espèces vivantes présentes dans un milieu défini, est aujourd'hui de plus en plus menacée par des pressions anthropiques croissantes, altérant non seulement les habitats naturels, mais aussi les dynamiques entre espèces. Comprendre les liens entre biodiversité, activités humaines et risques sanitaires devient alors un enjeu crucial, tant pour la conservation des espèces que pour la santé publique.

a. Impact des activités humaines sur la biodiversité

En effet, l'activité humaine entraîne la perte et la dégradation de la biodiversité dans de nombreuses régions, notamment à travers une déforestation intensive destinée notamment à permettre l'implantation de monocultures, comme celles de palmiers à huile. Cette dynamique est particulièrement marquée dans les pays tropicaux, spécialement en Asie du Sud-Est, où l'Indonésie et la Malaisie représentaient à elles seules environ 85 % de la production mondiale d'huile de palme en 2020. Selon le *Global Forest Resources Assessment* de la FAO (2020), entre 1990 et 2020, environ 180 millions d'hectares de forêts ont été perdus à l'échelle mondiale. Plus de 90 % de cette déforestation a eu lieu dans les zones tropicales, où le rythme annuel de perte forestière est passé de 13,8 millions d'hectares par an entre 1990 et 2000 à 9,28 millions d'hectares par an entre 2015 et 2020, révélant une lente diminution, mais toujours à un rythme préoccupant. Or, toujours selon la FAO, les forêts tropicales couvrent environ 13 % de la surface terrestre, soit environ deux milliards d'hectares, représentant près de 45 % de la superficie forestière mondiale. En détruisant ces habitats naturels, en augmentant la pollution et en favorisant la surexploitation des ressources naturelles, ces pressions anthropiques compromettent alors directement l'équilibre des écosystèmes (Sponsel, 2013).

b. Conséquences sur la survie des espèces

La dégradation de ces régions tropicales a des conséquences dramatiques sur la survie de nombreuses espèces. Différentes études parlent notamment depuis des années d'une sixième extinction de masse (Kluser et Peduzzi, 2007; Naggs, 2017). Cette problématique a régulièrement été approfondie et souligne que le taux actuel d'extinction des espèces dépasse largement les niveaux attendus à l'origine. L'Asie du Sud-Est illustre parfaitement cette observation : de nombreuses espèces emblématiques, comme le tristement célèbre pangolin de Sunda (*Manis javanica*), qui était autrefois largement répandu dans la région, est aujourd'hui considéré selon comme une espèce en danger critique d'extinction.

c. Impact sur le comportement et interactions homme/animaux

Ces actions peuvent également provoquer un changement dans le comportement des animaux sauvages. En effet, la réduction de leur espace vital et la fragmentation de leur habitat naturel expliquent que les animaux sauvages se nourrissent plus fréquemment dans les plantations ou en s'attaquant au bétail (Abrahms, 2021). Certaines espèces de chauves-souris auront également tendance à se rapprocher

des habitations lorsque leur habitat naturel est modifié par l'Homme (Meyer et al., 2016). Ainsi, l'expansion des activités dans ces zones provoque un impact sur la perte de biodiversité, mais elle va aussi augmenter les interactions entre la faune sauvage, les populations humaines et les animaux domestiques.

d. Rôle sur la transmission de zoonoses

Malheureusement, cette augmentation des interactions représente un risque de transmission de maladies (Miller et al., 2013). À titre d'exemple, une étude menée au Cambodge par Cappelle et ses collaborateurs (2020) a mis en évidence la présence du virus Nipah à très faible niveau chez les chauves-souris frugivores de l'espèce *Pteropus lylei*, considérées comme un réservoir naturel du virus. Cette étude n'a détecté aucune infection humaine, mais elle souligne que certaines pratiques humaines, comme la récolte de mangues ou la collecte de jus de palme dans des zones fréquentées par ces chauves-souris, pourraient théoriquement exposer les populations locales à un risque de transmission, avec la mise en place de conditions propices à l'émergence d'une zoonose. A cela s'ajoute la chasse et le commerce, le plus souvent illégal, d'espèces animales sauvages, qui peut lui aussi favoriser le contact entre l'Homme et la vie sauvage, et donc la transmission de maladies zoonotiques (Rush et al., 2021). En Asie, près de 77% des consommateurs ont déclaré préférer acheter de la viande dans des marchés humides plutôt qu'en supermarché (Magouras et al., 2020). Or, ces marchés présentent généralement une mauvaise hygiène (Lo et al., 2019), et sont parfois associés à l'émergence de maladies infectieuses. L'exemple du SARS-CoV-1, responsable de l'épidémie de SRAS ayant causé plus de 700 décès entre 2003 et 2004, illustre bien ce risque. L'hypothèse serait que ce virus avait probablement pour réservoir naturel des chauves-souris, et qu'il aurait été transmis à l'être humain via un hôte intermédiaire, possiblement la civette palmiste masquée (*Paguma larvata*), vendu sur les marchés (Wang et al., 2006). Le commerce d'animaux sauvages vivants crée ainsi un contexte propice à l'émergence de nouveaux agents pathogènes.

II. Conservation de la biodiversité : un enjeu pour la santé globale (OneHealth)

a. Lien entre biodiversité et santé globale

Les maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes sont devenues une menace majeure pour la santé humaine. Or 75 % d'entre elles sont en réalité d'origine zoonotique (Dong and Soong, 2021). Ces maladies sont causées par des agents pathogènes partagés entre l'homme et l'animal et entraînent des dizaines de milliers de décès chaque année. Cela souligne que la santé humaine n'est pas isolée, mais est en réalité liée à la santé des animaux, des plantes et de l'environnement. Cette conséquence a ainsi permis d'établir le terme « One Health » (Kelly et al., 2017). L'approche « One Health » peut être définie comme une approche intégrée et unificatrice qui mobilise de multiples secteurs, disciplines et communautés, et qui vise à équilibrer et optimiser durablement la santé des personnes, des animaux et des écosystèmes. Elle reconnaît que la santé des humains, des animaux domestiques et sauvages, des plantes et de l'environnement au sens large sont étroitement liées et interdépendantes (Panel (OHHLEP) et al., 2022). Cette approche fut mise au point pour éviter qu'une zoonose, comme par exemple l'Influenza Aviaire Hautement Pathogène de type H5N1, puisse provoquer une pandémie humaine responsable d'un grand nombre de décès. Face à ces menaces, la préservation de la biodiversité pourrait être un levier intéressant pour limiter le risque d'émergence de maladies zoonotiques.

b. Rôle biodiversité sur l'émergence de zoonoses : dualité effet dilution / amplification

Toutefois, son lien avec de nouvelles émergences reste encore incertain, et deux hypothèses opposées sont régulièrement évoquées dans la littérature scientifique. D'un côté, l'« effet de dilution » suggère que la biodiversité pourrait jouer un rôle protecteur en limitant la propagation des pathogènes dans un écosystème diversifié, où des hôtes moins compétents peuvent ralentir la transmission du pathogène à travers un mécanisme appelé « réduction des rencontres » (Keesing et al., 2010). Une étude a notamment mis en évidence une corrélation négative entre la richesse en espèces de petits mammifères terrestres et le nombre de cas de maladie de Lyme signalés dans l'Est des États-Unis (Ostfeld and Keesing, 2001). Cet effet semble s'opposer à l'« effet d'amplification », qui indique que l'augmentation de la diversité des hôtes pourrait au contraire favoriser la transmission des maladies (Wood et al., 2014). Cette dualité est aujourd'hui lourdement remise en question, car les deux effets peuvent en réalité être observés simultanément à différentes échelles, et de nombreuses études s'attardent à dire que l'explication ne peut être uniquement basée sur des corrélations entre la richesse des espèces hôtes et la prévalence des agents pathogènes dans les populations réservoirs d'hôtes mais plus sur le type d'interactions écologiques qui peuvent se produire entre deux espèces (Chen and McFarlane, 2025; Glidden et al., 2021; Gómez-Hernández et al., 2023; Ratti et al., 2021). Il est donc nécessaire de mieux comprendre ces interactions afin de pouvoir orienter au mieux les stratégies de conservation et de gestion des risques sanitaires.

c. Mise en place de projet dans les zones à risque : BCOMING

L'augmentation des émergences de maladies infectieuses zoonotiques ces dernières décennies nécessite une compréhension du rôle de la biodiversité sur celle-ci. Pour y parvenir, des projets internationaux tels que BCOMING ont vu le jour. Démarré en 2022, ce projet européen a pour but d'étudier et de prévenir des risques d'émergences de maladies infectieuses, en mettant en place des plans d'actions de protection de la biodiversité et de surveillance des maladies. Pour y parvenir, le projet a établi ses activités sur trois zones tropicales en situation critique de biodiversité, telles que les Caraïbes, l'Asie du Sud-Est, ou encore l'Afrique de l'Ouest.

d. Focus sur l'Asie du Sud-Est et le Cambodge

L'Asie du Sud-Est est aujourd'hui confrontée à une crise importante de sa biodiversité. Celle-ci est provoquée par des taux de croissance sans précédent des populations, des économies et de la consommation par habitant, entraînant une hausse de l'activité humaine, qu'elle soit légale ou non, sur des zones naturelles (Feng et al., 2021; Yang et al., 2023). Le Cambodge est l'un des pays d'Asie du Sud-Est les plus impactés. En plein développement, il présente l'un des taux de déforestation les plus élevés au monde. Au cours des deux dernières décennies, c'est environ 30 % de forêts qui ont été rasées, cela représente 2,64 millions d'hectares (Banerjee et al., 2025). Avec près de 34 % de sa superficie terrestre bénéficiant d'un statut protégé, le Cambodge connaît malgré tout une forte prévalence de la chasse et une forte dépendance à la viande de brousse. En effet, environ 83 % des ménages ruraux se livrent à une forme ou une autre de récolte d'animaux sauvages au moins une fois par an (Ibbett et al., 2021). Étudier ce système est donc pertinent pour comprendre les effets de la biodiversité sur la santé humaine.

e. Les techniques de recensement conventionnelles, avantages et inconvénients

Pour comprendre le rôle de la biodiversité dans l'émergence de maladies zoonotiques, le recensement des espèces qui la compose est une étape nécessaire. Connaître la diversité des espèces permet d'identifier les réservoirs potentiels connus de pathogènes, les hôtes intermédiaires possibles, ainsi que les interactions écologiques entre ces espèces et l'être humain. Cela aide également à déterminer quels changements environnementaux (comme la perte d'habitat ou la fragmentation) peuvent favoriser les contacts intra- et inter-espèces et ainsi augmenter le risque de transmission de maladies. Les techniques utilisées jusqu'à présent pour surveiller la faune sauvage sont assez nombreuses et ont pu être expérimentées dans certaines études (Lahoz-Monfort and Magrath, 2021). Certaines de ces méthodes sont non-invasives et ne nécessitent pas la capture d'animaux. C'est le cas des enquêtes de terrain basées sur l'observation directe, comme les transects visuels ou les comptages d'individus le long de parcours prédéfinis (Diggle, 2006; Waetjen et Shilling, 2017). Cependant, la majorité des inventaires reposent sur la capture d'individus pour l'identification de l'espèce. La capture peut être réalisée à l'aide de cages, en particulier pour les rongeurs et les petits mammifères, de pièges "pitfall" pour les reptiles et amphibiens, ou de filets pour les chauves-souris et les oiseaux. Enfin, l'utilisation de technologies comme des pièges photographiques, qui se déclenchent lors d'un mouvement à proximité (Shrestha et Lapeyre, 2018) et des moniteurs acoustiques, pour surveiller les espèces qui émettent des sons, sont également utilisables si les sons enregistrés sont préalablement connus (Frommolt et Tauchert, 2014; Teixeira et al., 2019). Ces derniers présentent un intérêt car ils ne sont pas invasifs pour l'animal. Cependant, ces méthodes dites conventionnelles pour effectuer l'inventaire de la faune présentent des limites. L'analyse de terrain nécessite le plus souvent de mobiliser beaucoup de personnes, qui doivent être également formées. De plus, les données obtenues avec ces observations sont difficiles à standardiser car la déclaration des espèces dépend entièrement de l'observateur (Zwerts et al., 2019). Le piégeage possède également certains défauts, en induisant notamment un stress intense chez les animaux capturés, en raison de la manipulation nécessaire pour leur identification. Ce stress peut entraîner des comportements d'automutilation lorsque l'animal tente de se libérer, d'autant plus que cela représente également un danger pour la personne qui le manipule. Cela souligne l'importance de limiter au maximum les interactions avec lui afin de réduire ces risques (Santos et al., 2017). De plus, le piégeage est généralement ciblé sur des taxons spécifiques, ce qui nécessite une connaissance approfondie des espèces étudiées. Ce niveau d'expertise demande du temps et une formation adéquate, rendant la mise en place de cette méthode plus exigeante par rapport à d'autres approches d'inventaire. Enfin, la capture photo et acoustique est logistiquement intense à mettre en place car elle nécessite d'être utilisée sur une longue période, en plus d'être particulièrement onéreuse (Zwerts et al., 2019). La visualisation et le tri d'une grande quantité d'images et de sons peut également devenir compliqué, même si de nouvelles solutions commencent à être mises en place pour analyser de façon automatique l'origine des indices détectés (Lahoz-Monfort and Magrath, 2021). Chacune de ces techniques présente ainsi des avantages et des inconvénients (**Tableau 1**). L'émergence de nouvelles techniques en tant que support supplémentaire d'informations représente donc un réel intérêt.

Tableau 1. Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles utilisées pour le recensement d'espèces animales.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Enquêtes de terrain	<ul style="list-style-type: none"> • Efficace pour les espèces communes et abondantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Beaucoup de personnes mobilisées • Données obtenues parfois difficilement reproductibles • Peu efficace pour les espèces rares et discrètes
Pièges photographiques	<ul style="list-style-type: none"> • Technique non-invasive • Efficace pour les espèces rares et discrètes • Données fiables • Mise en place facile sur le terrain 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût du matériel • Biais de détection envers les espèces de grande taille • Temps nécessaire pour identifier les espèces et parfois limiter au genre ou la famille • Limité par les conditions météorologiques
Appareils acoustiques	<ul style="list-style-type: none"> • Technique non-invasive • Quantité de données obtenues importante • Analyse des sons automatisée et rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût du matériel • Pas d'estimation de la densité des populations • Limité aux espèces qui émettent des sons présentes dans la base de données de référence • Limité par les conditions météorologiques et perturbations anthropiques
Pièges à cages, filets	<ul style="list-style-type: none"> • Efficace pour les taxons ciblés • Fiabilité de l'information • Information sur des données relatives aux individus (sexe, âge, statut reproducteur) 	<ul style="list-style-type: none"> • Beaucoup de personnes mobilisées • Stress engendré à l'animal • Risque de blessures chez l'homme et/ou l'animal • La capture se limite à un nombre limité d'espèces

f. L'ADN environnemental, aspect historique

Avec les avancées technologiques et le coût du séquençage haut débit devenant moins onéreux, une approche innovante s'est alors développée : l'ADN environnemental (ADNe). Cette technique permet de détecter la présence d'espèces à partir de traces d'ADN laissées dans leur environnement, sans nécessiter de capture ou d'observation directe. De plus, il s'est avéré que l'ADN peut persister dans

l'environnement sur des périodes allant de quelques heures dans les eaux tempérées à des centaines ou des milliers d'années dans le pergélisol froid et sec (Beng and Corlett, 2020). L'ADNe a été introduit pour la première au début des années 2000 par Eske Willerslev et son équipe, qui ont réussi à extraire et séquencer l'ADN de plantes et d'animaux éteints à partir de sédiments (Willerslev et al., 2003). Aujourd'hui, cette méthode représente une technique efficace pour la surveillance et le recensement de la biodiversité (Leempoel et al., 2020; Van Leeuwen and Michaux, 2023).

Différentes matrices ont été testées pour établir des inventaires d'espèces de vertébrés et peuvent être regroupés en trois classes. Il est possible d'utiliser celles provenant de l'environnement comme l'eau (Ficetola et al., 2008), le sol et les sédiments (Andersen et al., 2012), ou encore l'air à travers la mise en place de filtres (Garrett et al., 2023). Les surfaces qui peuvent piéger l'ADNe sont également des matrices adaptées car elles concentrent l'ADN. Il s'agit notamment des végétaux (Lynggaard et al., 2023), écorces, trous dans la roche ou encore des toiles d'araignées (Gregorič et al., 2022). Enfin, il est possible de récupérer le matériel génétique des vertébrés ingéré par des espèces parasites et des espèces d'invertébrés hématophages comme les moustiques, mouches, tiques ou encore les sangsues (Calvignac-Spencer et al., 2013; Kocher et al., 2017). Il est alors possible d'évaluer la biodiversité des vertébrés par l'analyse de « l'ADN dérivé d'invertébrés » (ADNi).

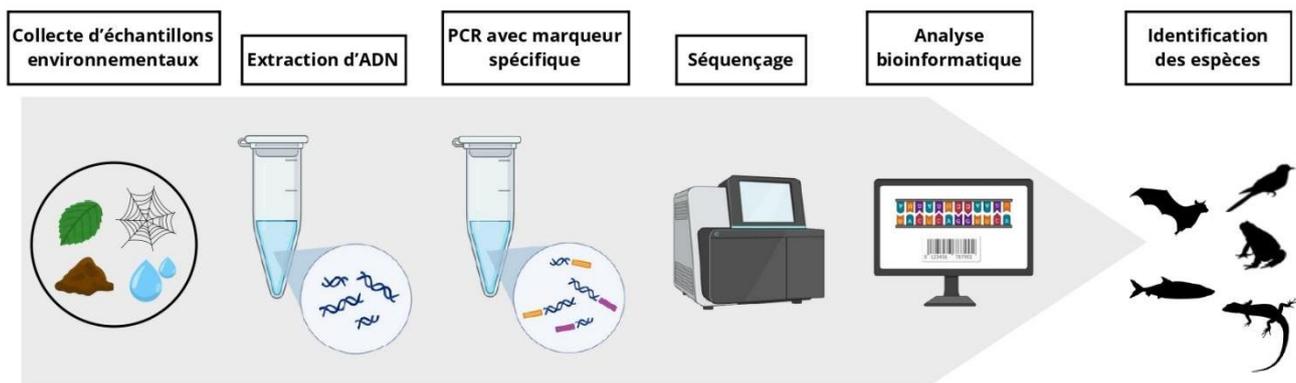


Figure 1. Protocole standard de metabarcoding basé sur l'ADN environnemental (Basé sur le schéma d'article d'Emilie EGEA, INRAE, 2024)

En partant du principe que tous les organismes libèrent de l'ADN dans leur environnement, celui-ci peut être collecté, amplifié et séquencé afin de fournir une estimation indirecte de la biodiversité locale. Le metabarcoding, développé par Taberlet et al., (2012) est actuellement la technique la plus courante pour l'ADNe, en plus de la détection monospécifique par qPCR. Les différentes étapes de cette technique sont représentées dans la **Figure 1**. Initialement utilisé pour recenser la faune aquatique, il est désormais appliqué à l'étude des mammifères et autres espèces terrestres. Cette méthode repose sur l'amplification par PCR et la technique de NGS. Pour réaliser cela, il a été nécessaire de définir des marqueurs adaptés pour chaque taxon. Ces marqueurs sont des courts fragments d'ADN car dégradés dans l'environnement, et qui sont communs aux espèces ciblées. Par exemple, les marqueurs utilisés pour les métazoaires sont généralement un fragment du gène de la cytochrome oxydase I (COI), alors que pour les mammifères d'autres marqueurs comme des fragments du 12S ou 16S rRNA peuvent être plus pertinent (Coissac et al., 2012). Contrairement au barcoding, qui cible une seule séquence à la fois, le metabarcoding permet d'identifier simultanément plusieurs séquences et donc espèces à partir d'un même échantillon grâce à une profondeur de séquençage élevé (nombre de séquences par échantillon) qu'il est possible ensuite de classer en agglomérat de séquences similaires, qui représentent alors un taxon. Ces agglomérats (ou

clusters) sont ensuite comparés à des bases de données de référence pour permettre d'identifier l'espèce en fonction du pourcentage de correspondance et d'alignement de chaque nucléotide.

g. Avantages de cette technique

La collecte d'ADNe présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes classiques de suivi de la biodiversité (Zwerts et al., 2019). Tout d'abord, la collecte des échantillons est plus simple et rapide à mettre en place, nécessitant moins de main-d'œuvre et de matériels que les techniques traditionnelles précédemment décrites. Contrairement aux méthodes conventionnelles, elle ne requiert pas une expertise taxonomique avancée, rendant ainsi son utilisation plus accessible. Ensuite, cette approche est absolument non-invasive pour les espèces ciblées. Étant donné qu'il n'est pas nécessaire de capturer ou de manipuler les individus, elle évite le stress et les perturbations liées au piégeage. De plus, elle réduit les contraintes logistiques sur le terrain et facilite la standardisation des données, permettant ainsi une meilleure comparaison entre les différents habitats étudiés. Enfin, cette méthode est moins dépendante des conditions météorologiques, ce qui constitue un autre atout par rapport aux autres méthodes qui dépendent fortement de ce critère pour la mise en place du matériel. Là où les observations visuelles et les captures peuvent être limitées par la pluie ou d'autres facteurs environnementaux, l'utilisation de l'ADNe s'avère plus flexible, car la collecte d'ADN dans le sol, l'eau ou l'air peut être réalisée avec une plus grande facilité, assurant ainsi une surveillance efficace de la biodiversité.

h. Inconvénients de cette technique

Grâce à ces nombreux atouts, la collecte d'ADNe semble être une technique idéale en complément aux approches traditionnelles. Toutefois, cette technique présente également certaines limites qu'il est essentiel de considérer (Beng and Corlett, 2020). Tout d'abord, l'ADN est une structure fragile, ce qui complique sa manipulation et sa conservation. De plus, cette technique ne nécessite pas d'expertise taxonomique, mais elle requiert néanmoins un savoir en biologie moléculaire et en bioinformatique nécessaire pour la mise en place de la technique dans un laboratoire. Cela peut donc s'avérer coûteux à mettre en place. Ensuite, des biais techniques propres à l'amplification par PCR et au séquençage peuvent altérer l'identification des espèces. Parmi eux, les biais liés aux amorces sont particulièrement importants, car ils peuvent limiter la détection de certaines espèces et fausser leur attribution. De plus, ces amorces PCR sont développées à partir de taxons déjà connus, ce qui signifie qu'elles peuvent ne pas permettre l'identification d'espèces qui n'ont pas encore été répertoriées. Cette limite souligne que la détection d'espèces est directement liée à la qualité des bases de données de référence, qui conditionne la précision des résultats obtenus. Enfin, contrairement aux méthodes plus traditionnelles, l'ADNe ne fournit pas d'informations spécifiques au spécimen échantillonné. Il est ainsi impossible de déterminer son âge, son sexe ou encore s'il est actuellement en vie (Li et al., 2023; Van Leeuwen and Michaux, 2023). Ainsi, bien que l'ADN environnemental représente une avancée majeure pour l'étude de la biodiversité et que cette technique est récente par rapport aux autres, ces limitations doivent être prises en compte pour optimiser son utilisation et interpréter les résultats avec précaution.

i. Statut du recensement au Cambodge

Au cours des vingt dernières années, le recensement des espèces de vertébrés présents au Cambodge a été peu fait. Il s'agit pourtant d'un pays touché par le déclin de sa biodiversité. Une grande partie de ces recensements se concentrait sur des espèces menacées notamment de mammifères de moyenne et de

grande taille tels que des grands ongulés (Gray et al., 2012) ou encore les éléphants d'Asie qui étaient estimés entre 250 et 600 individus à ce moment-là (Gray et al., 2014). Récemment, des initiatives ont été entreprises dans certaines zones spécifiques du pays, notamment le parc national de Virachey et les mangroves de Peam Krasop et Koh Kapik. Par exemple, un rapport de l'ONG Fauna & Flora International, mené par Roberts et al. En 2024, a identifié 89 espèces dans le parc national de Virachey, dont 19 sont classées comme menacées au niveau mondial. De même, le même organisme a publié en 2024 un rapport mené par Rog et al. cette fois-ci dans les mangroves de Peam Krasop et Koh Kapik et a révélé la présence de plus de 700 espèces en 2023, soulignant la richesse de ces écosystèmes particuliers. Un effort de recensement commence donc à être fait, mais ils restent concentrés sur des habitats protégés avec des écosystèmes bien particuliers, et ne couvrent pas l'ensemble des écosystèmes cambodgiens, notamment les forêts sèches qui sont au cœur de l'interface homme-animal. C'est le cas notamment des forêts sèches de dipterocarpes (DDF) qui demeurent largement sous-étudiées. Ces DDF sont des écosystèmes ouverts caractérisés par une végétation clairsemée et une saisonnalité marquée. Ces forêts, dominées par des arbres du genre *Dipterocarpus*, abritent des espèces telles que le grand ibis (*Thaumatibis gigantea*) et le banteng (*Bos javanicus*), et jouent un rôle crucial dans les interactions entre la faune sauvage et les populations humaines locales. En effet, on trouve entre autres dans ses forêts les trapaengs, des mares saisonnières qui sont essentielles tant pour la faune que pour les populations humaines (Srun Ty et al., 2014). L'absence de données détaillées sur la biodiversité de ces zones entrave ainsi la mise en place de stratégies de conservation efficaces, notamment en ce qui concerne les risques de transmission de maladies zoonotiques à l'interface homme-animal.

III. Objectif

Pour répondre au mieux aux objectifs fixés par le projet et face au manque de données sur la biodiversité des vertébrés au Cambodge, cette étude intervient en amont et vise à explorer l'utilisation de l'ADNe comme méthode complémentaire de surveillance et de recensement de la faune locale. L'objectif principal a été de déterminer les conditions optimales pour réaliser un inventaire de la biodiversité à la fois précis, exhaustif, simple à mettre en place et reproductible. L'enjeu étant de pouvoir recenser efficacement les espèces de vertébrés présentes au Cambodge, en particulier dans des zones peu étudiées, afin de contribuer à une meilleure compréhension du rôle de la biodiversité dans l'émergence des maladies zoonotiques.

Hypothèses :

Certains supports comme les feuilles et l'eau devraient permettre de détecter une plus grande diversité d'espèces vertébrées en comparaison avec d'autres supports à ADNe. Ces matrices représentent des supports qui sont généralement en contact avec un plus grand nombre d'espèces et possèdent des conditions physico-chimiques propices à la conservation de l'ADN pendant un certain temps, améliorant ainsi les chances de détection (Lynggaard et al., 2023).

Une différence de sensibilité à certains groupes taxonomiques devrait être observée entre les différents marqueurs génétiques utilisés. En effet, les amorces ciblent des régions spécifiques de l'ADN, dont la variabilité diffère selon les taxons. Par exemple, le marqueur COI-Bat est conçu pour amplifier efficacement l'ADN des chauves-souris, tandis que le 12S cible une région qui permet de détecter un large spectre de vertébrés, incluant mammifères, oiseaux et amphibiens.

La détection à partir d'ADNe devrait permettre de détecter des espèces généralement plus discrètes, rares ou présentes en faible abondance, et qui auraient échappé aux méthodes traditionnelles de capture.

En effet, l'ADNe peut permettre de révéler la présence d'espèces sans qu'il soit nécessaire de les observer directement.

Enfin, combiner l'utilisation de différents types d'échantillons et de marqueurs génétiques devrait permettre une détection plus exhaustive de la biodiversité. En effet, chaque échantillon capte une fraction particulière de l'ADNe en fonction de la localisation des espèces et de la persistance de l'ADN dans l'environnement, tandis que chaque marqueur cible des groupes taxonomiques spécifiques. Certaines combinaisons devraient donc maximiser la couverture taxonomique et améliorer la sensibilité de détection des espèces présentes.

Pour répondre à cette problématique et confirmer ou non ces hypothèses, plusieurs sous-objectifs ont été définis et structurés autour d'une phase de terrain et d'une phase d'analyse des données :

- **S.O.1** : Comparer les performances des trois marqueurs génétiques utilisés pour identifier celui offrant la meilleure capacité de détection et la meilleure précision d'identification de la faune cambodgienne.
- **S.O.2** : Identifier les combinaisons de marqueurs et types d'échantillonnage les plus performants et optimiser les futures sessions de terrain
- **S.O.3** : Évaluer la concordance entre les données issues de l'ADNe et les espèces de chauves-souris capturées par filet, afin de valider l'efficacité de la méthode d'échantillonnage.

6. Matériels et méthode

6.1 Zone d'échantillonnage 2024

Les échantillonnages ont été réalisés en fin de saison sèche, du 30 avril au 5 mai 2024 dans la province de Stung Treng, dans une zone constituée de forêts sèches fragmentées de diptérocarpes (DDF). Les trois zones échantillonnées où étaient toutes les trois localisées au niveau de collines karstiques abritant des réseaux de grottes o nichent des chauves-souris insectivores (*Taphozous melanopogon*, *Hipposideros sp.*, *Rhinolophus sp.*) et nectarivores (*Cynopterus sphinx*). Les trois zones étaient boisées et entourées de zones agricoles (plantation de manguiers, pommier-cajou et culture de manioc) (**Figure Annexe 1**). Les échantillonnages ont été réalisés en parallèle du piégeage de chauve-souris dans le cadre du projet BCOMING (**Tableau Annexe 1.A**). Les trois zones échantillonnées étaient respectivement Chhngauk, Ka Ngoark et Chab Pleurng, avec deux sessions d'échantillonnage pour chaque zone. Chaque zone était séparée en trois sous-sites pour l'échantillonnage. Au cours de chaque session et pour les différentes zones, différents types d'échantillonnages ont été réalisés avec des écouvillonnages de feuille et de toiles d'araignée, des prélèvements de sol en surface et en profondeur, ainsi que d'eau si cela était possible. En parallèle, trois machines composées de trois filtres à air et des pièges à poils ont été posés pendant six jours. Quarante pièges à poils ont été installés par zone avec les trois types d'appâts utilisés

6.2 Collecte de données

6.2.1 ADN environnemental

Différentes techniques ont été utilisées pour collecter l'ADNe. Ces collectes ont été réalisées en étant munis de gants en nitrile et d'un masque chirurgical pour limiter la contamination des échantillons. Les différents kits utilisés ont été fournis par l'entreprise Nature Metrics (UK). La nature des solutions tampons fournies dans ces kits était confidentielle et appartiennent exclusivement à cette entreprise. En raison de la durée des missions sur le terrain, les premiers échantillons collectés lors de chaque sortie sont restés à température ambiante pendant un maximum de 7 jours avant d'être placés en chambre froide à -20 °C.

6.2.1.1 Prélèvement sur des surfaces de feuilles

Pour réaliser un échantillonnage d'ADNe sur des feuilles (**Figure Annexe 2.A**), un périmètre d'environ 10mx10m a été mis en place avant d'enregistrer ses coordonnées GPS à l'aide d'un GPS de la marque GARMIN (Modèle OREGON 450). L'échantillonnage a été réalisé en utilisant un « surface swab kit » de Nature Metrics (UK). Ce kit contient trois écouvillons stériles, trois doses de solution tampon, une paire de gants en nitrile, un masque chirurgical et un sac d'échantillonnage stérile et scellable.

Le prélèvement d'ADNe sur des feuilles est réalisé à partir du kit en réalisant les étapes suivantes :

1. Tremper l'écouvillon dans un tampon (à défaut de ne pas utiliser la solution tampon fournie, le tremper dans de l'EtOH à 70 %). Faire en sorte que l'écouvillon soit bien humide avant de procéder à l'étape suivante.
2. Régler une minuterie sur 3 minutes. Durant ces 3 minutes, écouvillonner aléatoirement les feuilles, les surfaces comme l'écorce d'un tronc exposé, ou encore les toiles d'araignées qui se situent dans le périmètre préalablement délimité. Généralement les feuilles sont priorisées pendant les deux premières minutes et les autres matériaux pendant la dernière minute.

Écouvillonner de la hauteur de la cheville jusqu'au-dessus de la tête. La sélection des surfaces écouvillonnées se fait de façon aléatoire, tout en veillant à inclure les feuilles « sales », avec de la poussière, des matières fécales, ou des traces de consommation.

3. Une fois le temps écoulé, remettre l'écouvillon dans son tube d'origine qui est muni d'un étiquetage avec un numéro d'identification.
4. Répéter les trois premières étapes pour les deux autres écouvillons, en essayant de ne pas revenir sur les feuilles/arbres déjà échantillonnés pour survoler au mieux l'ensemble du périmètre.
5. Placer les trois tubes dans le sac d'échantillonnage et le fermer hermétiquement.
6. Noter dessus le nom du site et sous-site échantillonné, ainsi que la date.
7. Conserver de préférence les écouvillons dans un milieu frais, avant de les stocker en chambre froide.

6.2.1.2 Échantillonnage de toiles d'araignées

En parallèle de l'écouvillonnage sur des feuilles, les toiles d'araignées présentes dans le même périmètre d'écouvillonnage ont été prélevées selon le même procédé que pour l'échantillonnage sur les feuilles. Seules les toiles de type « orbitèle » (grande toiles régulières et géométriques réalisées à partir d'un centre de façon circulaire) et dont la soie est plus adhésive que les toiles en tunnel, ont été prélevées. Entre trois et cinq toiles ont été collectées par écouvillons. Les prélèvements ont ensuite été conservés dans un milieu frais, avant d'être stockés en chambre froide.

6.2.1.3 Utilisation de filtre à air

Du 30 avril 2024 au 5 mai 2024, des appareils ont été déployés aux mêmes sites que la collecte de surface de feuilles et que les piégeages de chauve-souris dans le but de collecter des échantillons d'air pour l'analyse de l'ADN.

Trois trépieds contenant chacun trois échantillonneurs d'air ont été installés aux différents sites (**Figure 2**). Ils fonctionnaient pendant des séances de sept heures, à partir de la pose des filets à chauve-souris (à environ 17h). Pour minimiser la contamination humaine, Les échantillons ont été manipulés en évitant tout contact avec leurs filtres, et en portant des gants et un masque. Les échantillons collectés ont été placés individuellement dans des sacs stérilisés aux UVs pour être stockés à sec.



Figure 2. Mise en place des "pièges à air" durant la mission de 2024 à Stung Treng. Un trépied est composé de trois échantillonneurs d'air. Le piège sur la photo est installé à l'entrée d'une cave abritant une colonie de chauves-souris

6.2.1.4 Prélèvement d'eau

Les collectes d'ADNe à partir de l'eau ont été réalisées grâce aux « aquatic kit » de Nature Metrics dans des marres, lac ou étangs, présents aux alentours des périmètres d'échantillonnage des feuilles. Un kit contient :

- D'une paire de gants en nitrile.
- D'un masque chirurgical.
- Une seringue de 50 ml.
- Un filtre à seringue (pore de 0.8µm).
- Une poche en plastique stérile d'une contenance de 50L.
- Une seringue de 3 ml contenant 1,5 ml de solution tampon (NAP buffer).
- Deux embouts en plastiques pour sceller le filtre à seringue.
- Un sac d'échantillonnage stérile et scellable.

Ce kit a permis de récupérer l'ADN qui était présent dans un point d'eau en filtrant les particules d'une taille supérieure à 0.8µm (**Figure Annexe 3**) Il s'utilise en remplissant la poche en plastique avec l'eau du spot échantillonné. Il faut veiller à ne pas récupérer toute l'eau au même endroit, mais essayer de remplir la poche en plusieurs fois en faisant le tour du point d'eau. Une fois la poche remplie, remplir la seringue au maximum avec l'eau de la poche (qsp 50 ml) avant d'y insérer le filtre en le vissant. Exercer une pression constante sur le piston pour vider la seringue. Les particules d'une taille supérieure à 0.8µm seront alors retenues dans le filtre. Enlever le filtre et effectuer à nouveau les premières étapes. Répéter le protocole jusqu'à ressentir une grosse résistance et qu'il ne soit plus possible de pousser le piston, le filtre est alors saturé. Enlever le filtre de la seringue et injecter progressivement le liquide de conservation présent dans la seringue de 3 ml en la vissant au filtre. Visser les embouts en plastique des deux côtés du filtre pour empêcher le filtrât de sécher. Placer le filtre dans le sac d'échantillonnage, le sceller et annoter dessus la date, le site et le nombre de pressions exercées avec la seringue d'eau.

6.2.1.5 Echantillonnage de sol

Les échantillonnages de sol ont été réalisés à partir de deux types de « soil kit » Nature Metrics (UK). Ces kits sont composés :

- D'une paire de gants en nitrile.
- D'un masque chirurgical.
- D'une seringue de 10 ml coupée à son extrémité pour le premier kit et d'une cuillère en plastique pour le second.
- D'un flacon de prélèvement stérile d'une contenance de 100 ml (type copro).
- D'un tube Falcon contenant 50 ml de solution tampon.
- D'un sac d'échantillonnage stérile et scellable.

a) Sol de surface

Dans la même zone que celle délimitée pour faire les écouvillons de feuilles, utiliser la cuillère en plastique pour prélever six cuillères de terre de surface en veillant à ne pas creuser en profondeur. Les prélèvements avaient généralement lieux aux endroits où les animaux ont pu laisser des traces de passage par exemple, ou toute autre marque distinctive. Transvaser les six cuillères dans le flacon de

prélèvement. Verser les 50 ml de la solution tampon dans le flacon. Le sécuriser dans le sac d'échantillonnage avant de le fermer et d'annoter la date et le site de prélèvements dessus.

b) Sol en profondeur

Dans la zone échantillonnée, six zones proches de la végétation ont été sélectionnées. Les prélèvements de terre ont été réalisés en utilisant la seringue découpée (**Figure Annexe 2.B**). Après avoir dégagé l'endroit en enlevant les feuilles mortes et les branches, enfoncer et tourner la seringue dans le sol, afin de récupérer une carotte de terre (qsp 5ml). La terre est ensuite transférée dans le flacon de prélèvement. Cette étape est reproduite dans les six endroits échantillonnés de la zone. Verser ensuite la solution tampon dans le flacon. Le flacon a alors été refermé avant d'être placé dans le sac d'échantillonnage qui a ensuite été scellé et annoté avec le nom de la zone et la date.

6.2.2 Ecouvillonnage accessoire

Un écouvillonnage a été réalisé lorsque cela a été possible, de façon indépendante aux échantillonnages d'ADNe, directement sur des animaux capturés par les filets ou encore sur des animaux retrouvés morts dans la zone d'échantillonnage.

6.2.3 Pièges à poils

a) Caractéristiques des pièges

Des pièges à poils ont été utilisés pour collecter les poils de rongeurs et autres petits mammifères présents sur la zone d'étude (**Figure Annexe 4**). Ces pièges existaient en deux formats et étaient constitués de cylindres en PVC mesurant 20 cm de longueur, avec un diamètre de 80 mm pour le grand format et 50 mm pour le petit format. Chaque tube comportait deux encoches : l'une, située sur la partie inférieure, permettait d'y insérer l'appât, tandis que l'autre, placée sur la partie supérieure, servait à fixer une languette. Les languettes étaient fabriquées à partir de goulottes électriques en plastique, initialement destinées à dissimuler les câbles électriques. Elles mesuraient 0.8 cm d'épaisseur, trois cm de largeur et 20 cm de longueur. Une vis fixée à l'extrémité de chaque languette permettait son insertion dans l'encoche supérieure du tube. Pour la capture des poils, une bande de scotch double face, de la même longueur que la languette, était appliquée en recouvrant également son extrémité.

b) Confection des appâts

Trois types d'appâts ont été utilisés au cours de cette étude : des croquettes solides pour poissons carnassiers de la marque Tropical, du maïs en conserve et un mélange banane/beurre de cacahuète dans une proportion de 70/30. Les appâts étaient préparés en déposant la nourriture sur une bandelette de gaze repliée sur elle-même, de dimensions six cm x six cm. Chaque type d'appât était dosé de la manière suivante : une cuillère à café du mélange banane/beurre de cacahuète, une cuillère à café de grains de maïs mous et deux croquettes pour poissons. Les bords de la gaze étaient ensuite rabattus et enroulés afin de former des ballotines de taille homogène. Au total, 80 ballotines de chaque type d'appât ont été confectionnées, puis stockées dans trois Ziploc différents au congélateur en attendant l'échantillonnage.

c) Préparation des pièges

Pour les missions de 2025, 120 pièges ayant déjà servi lors de la campagne de terrain en 2024 ont été réutilisés pour les missions de Phnom Penh et de Battambang. Afin d'éliminer toute trace d'ADN résiduel des missions précédentes, un protocole de nettoyage en trois étapes a été appliqué. Les pièges

(tubes et languettes sans scotch) ont d'abord été immergés pendant trois heures dans une bassine en plastique de 150 L contenant un litre de javel pure diluée dans 100 L d'eau, conformément aux recommandations de 10 ml de javel par litre d'eau. Ensuite, ils ont été rincés successivement dans deux bassines de 50 L remplies uniquement d'eau du robinet, afin d'éliminer toute trace de javel. Lors du passage dans la première bassine, une dizaine de mouvements de lavage étaient effectués avant de transférer les pièges dans la seconde bassine. L'eau des bassines était remplacée tous les 20 pièges. Enfin, les pièges étaient disposés sur une planche et laissés à sécher au soleil pendant 24 heures. Une fois secs, le scotch était placé sur les languettes en plastique, puis les pièges étaient stockés dans un carton jusqu'à leur utilisation.

d) Mise en place des pièges

L'installation des pièges à poils s'est faite en suivant les zones préalablement établies. Les pièges ont été positionnés au sol sur des trajets potentiels empruntés par les rongeurs et autres petits mammifères, notamment le long de murs, de barrières, de troncs couchés ou à proximité d'un terrier apparent. Chaque piège a été espacé d'environ cinq mètres pour optimiser la couverture du terrain.

Les pièges de petit format étaient équipés d'une vis permettant de les fixer solidement au sol en les enfonçant, tandis que ceux de grand format comportaient un trou conçu pour le passage d'une sardine de fixation. Si le sol était trop dur pour enfoncer la vis/sardine, le piège était bloqué avec des pierres. Dans tous les cas, il était nécessaire que les deux ouvertures soient bien accessibles pour que l'animal puisse entrer sans contraintes. Chaque piège était ensuite identifié avec un marqueur par le type d'appât utilisé ainsi que son numéro. De plus, une photographie du lieu d'installation était prise pour obtenir une localisation GPS et un ruban rouge était placé à proximité afin de faciliter la localisation des pièges lors de leur récupération.

e) Récupération et détection des poils

Les pièges ont été relevés après un minimum de trois jours d'exposition. Une première observation visuelle a permis d'évaluer si l'appât avait été consommé et si des poils étaient visibles à l'œil nu. Ces premiers résultats ont été consignés sur une fiche bilan. Une seconde observation a ensuite été réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire. Les poils détectés ont été prélevés à l'aide d'une pince fine préalablement trempée dans de l'EtOH à 70%, ce qui facilitait leur décollage du scotch, puis transférés dans des cryotubes Nunc de 1,8 ml. Le nom de la zone a été annoté sur le tube et reporté sur la fiche bilan, en vue d'une analyse en laboratoire. Ont été considérées comme des poils toutes structures souples, fines et linéaires, présentant généralement un bulbe à leur extrémité. Les poils de rongeurs se distinguaient généralement des autres par leur reflet « zébré » caractéristique sous la lumière.

6.2.4 Échantillons complémentaires

Les matières organiques d'origine animale qui ont été trouvées au cours des missions, qu'il s'agisse de poils, de mues, fèces ou encore de charogne, ont été échantillonnées afin d'augmenter nos informations sur la biodiversité environnante. Les échantillons prélevés ont ensuite été conservés dans des cryotubes Nunc de 1,8 ml en chambre froide (-20°C) avant d'être envoyés au laboratoire pour analyse avec les échantillons d'ADNe.

Durant le stage, les espèces qui ont été observées ont également été prises en photo pour pouvoir ensuite être identifiées à l'aide des livres « Birds of Cambodia » (Lynx Edicions, 2019) et « Field Guide to the mammals of South-east Asia (2nd Edition) » (Bloomsbury Wildlife). Ces informations complémentaires

avaient pour intérêt de compléter les données déjà à notre disposition pour recenser plus efficacement les espèces.

6.3 Préparation des échantillons en laboratoire

Un metabarcoding a été réalisé sur tous les échantillons d'ADNe. Cette technique utilise des amorces universelles pour amplifier par PCR de courts marqueurs d'ADN et identifier l'espèce cible (Lynggaard et al., 2022). L'analyse a suivi les étapes suivantes. Les étapes de laboratoire ont été menées par le sous-traitant Nature Metrics (UK). Les détails de réalisation sont donc tenus secrets mais doivent en théorie se rapprocher des étapes menées par le laboratoire GeCoLab de Liège.

Préparation de la librairie, séquençage et traitement bioinformatique

Trois jeux d'amorces codant pour 133 pb du gène mitochondrial CO1 (Galan et al., 2018)), un autre fragment CO1 spécifique aux chauve-souris (Nature Metrics (UK)) et un amplicon de 170 pb d'ARNr 12S (MiMammal ; Ushio et al., 2017) ont été utilisés pour amplifier l'ADN de vertébrés, suivis d'une étape de purification. Une seconde PCR permettant l'ajout de marqueurs spécifiques pour l'identification des échantillons a ensuite été réalisée. Ces produits de PCR ont subi une seconde étape de purification. Après purification, quantification et pooling de l'ADN à équimolarité, la construction et le séquençage de la banque d'ADN ont été réalisés par Nature Metrics (UK) à l'aide d'une cellule à flux Illumina®. Nature Metrics (UK) a ensuite effectué les traitements bioinformatiques. Brièvement, ils ont coupé les séquences appariées brutes, en supprimant les adaptateurs avec Cutadapt v2.9 (Martin, 2011). À l'aide d'un pipeline bio-informatique interne basé sur USEARCH (Edgar, 2010), ils ont détecté, regroupé et vérifié les séquences d'amplicons chimériques, qui ont ensuite été assignées à des bases de données de référence afin de déterminer leur abondance de lecture dans les échantillons d'ADN environnemental. L'identification des espèces a été réalisée via la base de données BOLD pour CO1 et une banque NCBI GENBANK pour 12S, avec un pourcentage d'identité correspondant aux séquences de référence les plus proches.

6.4 Retranscription et tri des données numériques

Après traitement, une liste d'identifications potentielles a été obtenue. Une méthode rigoureuse a été appliquée pour filtrer et classer les séquences, en supprimant les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) des contrôles PCR et en écartant les séquences de faible qualité. Après filtrage, nous avons vérifié la répartition géographique des espèces restantes, les classant comme « certaines » ou « potentielles » en fonction de leur présence dans la zone ou du genre apparenté. Seule la liste « certaines » a été utilisée pour l'analyse suivante afin de garantir des résultats précis.

6.4.1 Tri des données

Après avoir obtenu les données, un tri a été nécessaire. Tous les taxons détectés qui n'appartenaient pas au règne *Animalia* ont été supprimés. De plus, les résultats correspondant à l'espèce *Homo sapiens* et/ou appartenant à la famille *Hominidae*, ont été retirés afin d'éliminer toute contamination potentielle liée, entre autres, à l'échantillonnage. Les données ont été enregistrées sur un tableur Excel au format .CSV.

6.4.2 Vérification et validation des identifications

Deux étapes de validation supplémentaires ont ensuite été effectuées manuellement sur les données enregistrées dans le tableur Excel. Tout d'abord, la précision des identifications a été vérifiée en recherchant unes à unes chaque séquence sur l'outil BLAST du site NCBI. Si le marqueur utilisé était

le gène CO1 (marqueur Galan), une double vérification sur la base de données BOLD a été effectuée. Il a ensuite été précisé si l'identification de l'espèce était exacte ou non dans la base de données. Lorsque l'espèce identifiée n'était pas présente dans le jeu de données initial, les nouvelles valeurs « Percent Identity » et « Query Coverage » de NCBI ont été intégrées. Le « Percent Identity » représente le pourcentage de nucléotides identiques retrouvés entre la séquence d'intérêt et la séquence alignée, tandis que le « Query coverage » correspond au pourcentage d'alignement exact qu'il y a entre la séquence d'intérêt interrogée et celle provenant de la base de données.

6.4.3 Ajustement du niveau taxonomique

Dans certains cas, il a été nécessaire d'affiner l'identification des espèces en fonction du « percent identity » obtenu sur NCBI. Trois cas de figure ont été définis :

- **97 % ≤ x** : L'espèce est validée.
- **97 % > x ≥ 95 %** : Seul le genre est validé.
- **95 % > x ≥ 90 %** : Seule la famille est validée.

Lorsque l'identification d'une espèce devait être modifiée, le nom a été remplacé en fonction du rang taxonomique qui était applicable.

Exemple : Si *Panthera tigris* obtenait un « percent identity » de 96 %, son identification était ajustée en *Panthera sp.*

6.4.4 Vérification de la présence des espèces au Cambodge

Une dernière étape de validation a porté sur la présence géographique des espèces au Cambodge. Pour cela, la présence de chaque espèce restante a été vérifiée en consultant différentes bases de données comme INPN, IUCN ou encore GBIF, qui nous permettent d'avoir une vision sur la répartition géographique d'une espèce et son statut de conservation. Une colonne 'check_geo' a été ajoutée au tableur avec trois options possibles : oui / non / potentiel.

- **Oui** : L'espèce est répertoriée au Cambodge.
- **Non** : L'espèce n'a pas été signalée dans le pays.
- **Potentiel** : L'espèce n'est pas répertoriée dans le pays, mais sa présence aux frontières du pays ou dans un pays voisin laisse supposer qu'elle pourrait s'y trouver.

Enfin, il a été précisé qu'il s'agit d'espèces domestiques, qui ont été notées comme telles dans une colonne spécifique du tableur.

6.5 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir de Microsoft Excel (version 2108) et les données ont été analysées avec le logiciel RStudio version 4.4.2. Le package ggplot2 (Hadley Wickham) a été utilisé pour l'ensemble des résultats obtenus. La fonction `facet_grid` de ce package a été utilisée pour obtenir un facet grid. Le package ComplexUpset (Michał Krassowski) a permis d'obtenir un Upset à partir de la fonction `upset`. Des diagrammes de Venn ont été réalisés en utilisant le package ggVennDiagram (Chun-Hui Gao et al.) afin d'obtenir les valeurs brutes. Les diagrammes ont ensuite été réalisés manuellement sur Microsoft Word version 2108.

Afin d'évaluer l'efficacité de l'échantillonnage, des courbes de raréfaction ont été faites pour les différentes méthodes de collectes d'ADNe amplifiées avec les trois marqueurs, via la fonction `specaccum` du package vegan sous R (Jari Oksanen et al.). Pour modéliser la relation entre le nombre d'espèces observées (S) et le nombre d'échantillons (x), un modèle non linéaire de type Michaelis-

Menten a été ajusté. Ce modèle peut être utilisé dans les études écologiques pour prédire l'atteinte d'un plateau de richesse spécifique en fonction de l'effort d'échantillonnage.

La formule mathématique utilisée a été la suivante :

$$S(x) = \frac{b + x}{a \cdot x}$$

Où :

- S(x) est le nombre d'espèces observées pour un effort d'échantillonnage x,
- a est la richesse maximale attendue (asymptote),
- b est la valeur de x pour laquelle la moitié de cette richesse est observée.

L'ajustement a été réalisé par régression non linéaire (fonction `nls`) sur les données de richesse cumulée.

6.6 Echantillonnage 2025

Afin de pouvoir réaliser les prochaines analyses statistiques, trois missions de terrain ont été menées, à raison d'une mission par mois, afin de permettre la collecte des échantillons. Ces missions ont été réalisées selon un gradient d'urbanisation, dans trois zones géographiques distinctes (**Figure 3**) : la ville de Phnom Penh (capitale du Cambodge) en février, la province de Stung Treng (au nord-est du pays) en mars, et aux alentours de la ville de Battambang (au nord-ouest) en mai.

Les missions ont duré environ une semaine chacune, et les zones échantillonnées ont été subdivisées en plusieurs sites. À Phnom Penh, les prélèvements ont été effectués sur quatre sites : à l'Université Royale de Phnom Penh (RUPP), à l'Université Royale d'Agriculture (RUA), à l'Institut National d'Agriculture de Prek Leap (PLIA), ainsi que sur une parcelle de terrain située au nord-ouest de la ville (site NW). Dans la province de Stung Treng, les échantillonnages ont été réalisés dans une DDF, répartie en trois sites : Otalas, où se trouvait le campement de l'équipe, Chum Reas, et Trapeang Prich, un lac saisonnier abritant une biodiversité importante. Enfin, à Battambang, les prélèvements ont été effectués sur des sites à caractère religieux, tels que Phnom Sampov (une formation calcaire en hauteur), dans le district de Banan, ainsi que dans la commune de Ta Kream. Dans les trois régions, la proximité de grottes abritant des colonies de chauves-souris insectivores et nectarivores a également été notée. Les campagnes d'échantillonnage ont été organisées de manière à effectuer deux sessions d'échantillonnage pour le même site sur deux jours distincts pour les missions de Phnom Penh et de Battambang. Une expédition complémentaire a été réalisée à Battambang en février 2025 et a permis de récolter sur quatre jours des échantillons supplémentaires.

Zones d'échantillonnages d'ADNe au Cambodge

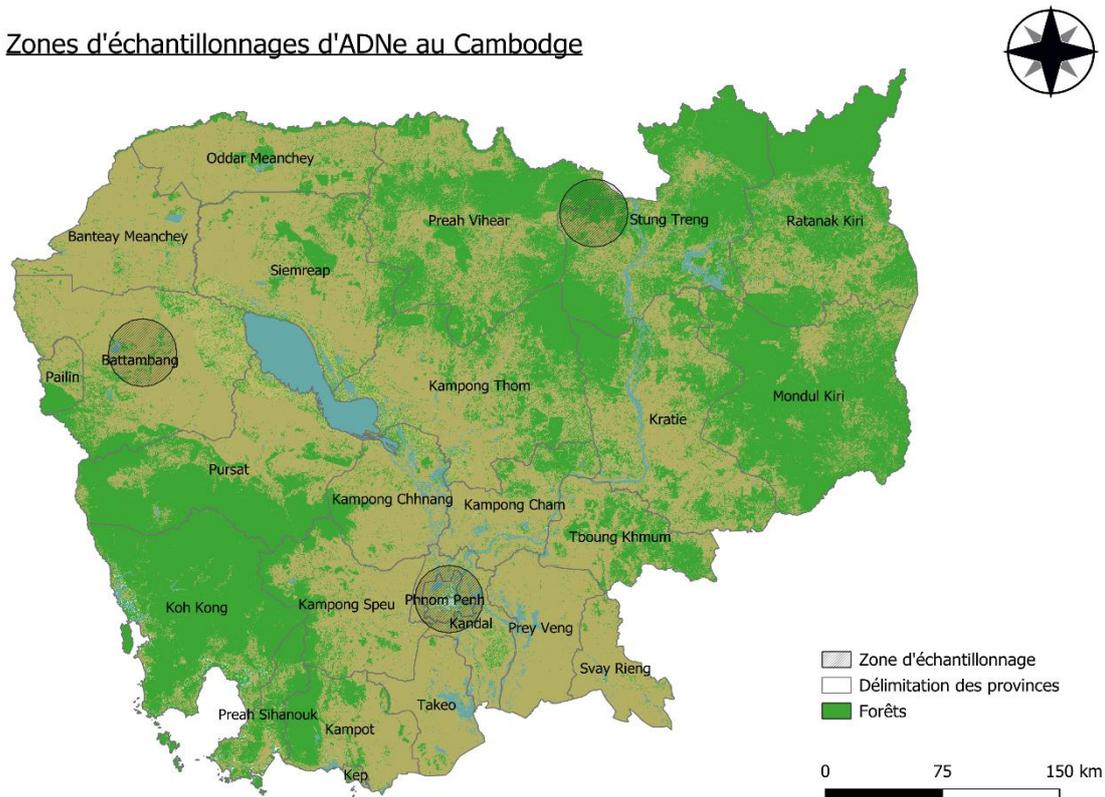


Figure 3. Répartition géographique des zones échantillonnées durant les missions de 2025 pour l'étude de l'ADNe au Cambodge (Carte réalisée à partir de QGIS version 3.42.3). La couche forestière a été récupérée sur le site OpenDevelopment Cambodia (Forest cover in Cambodia (2023))

Au sein même de ces sites, les échantillonnages ont été fait dans différents endroits (appelés sous-site). La localisation GPS a été enregistrée pour l'ensemble de ces sous-sites à l'aide d'un GPS Garmin (modèle OREGON 450). Le nom des identifiants GPS est basé sur l'acronyme du site d'échantillonnage. Les sous-sites sont documentés dans le tableau (**Tableau Annexe 5**), qui reprend l'ensemble des zones étudiées et les différents sites.

Lors de la mission à Phnom Penh, 70 pièges à poils ont été installés selon la répartition suivante : 30 sur le site RUA, 30 sur une parcelle située au nord-ouest de la ville et dix sur le site PLIA. Pour la mission de Battambang, 35 pièges ont été posés dans le district de Banan, et 40 ont été installés dans la commune de Ta Kream. Afin d'assurer une répartition homogène des quantités utilisées, les trois types d'appâts ont été alternés de manière équilibrée.

Les échantillons collectés seront ensuite amplifiés par technique de metabarcoding pour les prochaines analyses.

7. Résultats

7.1 Analyse descriptive des données de 2024

7.1.1 Échantillonnage

Au total, 152 des 180 échantillons initialement collectés lors des échantillonnages de la mission de 2024 dans la province de Stung Treng, ont pu être amplifiés en laboratoire à partir des trois marqueurs étudiés. Parmi ceux-ci, 48 proviennent de pièges à air (sur 54 échantillons au total) et 54 de l'écouvillonnage de feuilles (sur 56 échantillons). L'ensemble des sept échantillonnages de toiles d'araignées et des deux échantillons d'eau collectés ont pu être amplifiés. Tous les échantillons obtenus par la technique de swab (écouvillonnages accessoires) et des pièges à poils ont également été amplifiés en laboratoire, permettant d'obtenir respectivement neuf et dix-sept échantillons. En revanche, seulement sept échantillons de sol en surface et trois de sol en profondeur sur les 18 échantillons initialement prélevés pour chacun ont été amplifiés. Le taux de réussite d'amplification pour ces techniques est donc inférieur à 50% (**Tableau Annexe 1.B**).

Après le tri des données précédemment décrit (**6.4 Retranscription et tri des données numériques**), 139 des 152 échantillons amplifiés ont été conservés. Parmi eux, 45 provenaient des pièges à air, 49 de l'écouvillonnage de feuilles et sept de l'échantillonnage de toiles d'araignées. Les deux échantillons d'eau ont été conservés, tout comme les sept échantillons de sol en surface et les trois de sol en profondeur. Enfin, les échantillons obtenus par la technique du swab et ceux issus des pièges à poils ont également été conservés, avec respectivement neuf et dix-sept échantillons.

7.1.2 Espèces

Après le tri des données, 146 taxons différents ont été identifiés. Parmi ceux-ci, 91 correspondent à une identification précise au niveau de l'espèce (62,3%). La liste complète des espèces détectées peut être retrouvée dans le tableau en Annexe 6. Pour les taxons restants, 35 correspondent à une détection du genre (24 %) et 20 à la famille (13,7 %).

Les cinq grandes classes de vertébrés sont représentées (**Tableau 2**) : les oiseaux (Aves), les mammifères (Mammalia), les poissons (Actinopterygii), les amphibiens (Amphibia) et les reptiles (Reptilia). La majorité des identifications concerne les oiseaux, qui représentent à eux seuls 52,7 % des taxons recensés. Cette classe se distingue également par sa diversité taxonomique, avec 17 ordres différents, dont les Passeriformes (35 taxons) et les Columbiformes (8 taxons), qui sont les plus représentés. Les mammifères constituent 31,5 % de l'ensemble des identifications. Ils sont répartis en 6 ordres, dominés par les chauves-souris (Chiroptera, 17 taxons) et les rongeurs (Rodentia, 15 taxons). Les amphibiens (8,9 %), représentés uniquement par l'ordre des Anura, regroupent 13 taxons. Les poissons (2,8%) sont représentés par l'ordre des cypriniformes avec quatre taxons différents. De leur côté, les reptiles (4,1 %) sont uniquement représentés par l'ordre des Squamata (6 espèces).

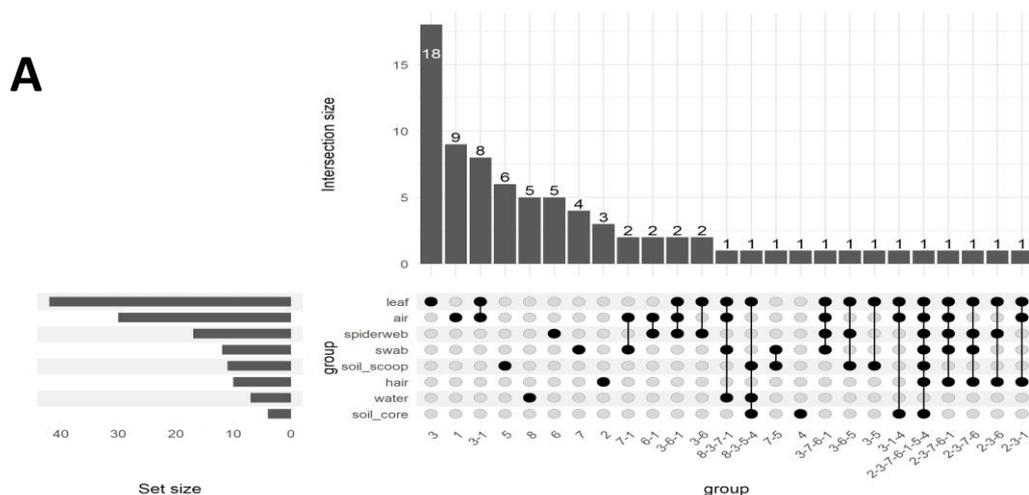
Tableau 2. Répartition des différents ordres détectés, à partir de l'analyse des données collectées durant la mission de Stung Treng en 2024 et selon un gradient de précision taxonomique. La détection a été faite pour tout marqueur et pour tout type d'échantillonnage confondu. (n=) correspond au nombre d'échantillons dans lesquels un taxon appartenant à l'Ordre attribué a été détecté

Classe	Ordre	Taxons totaux détectés	Espèces détectées	Genres détectés	Familles détectées
Aves (52,7%)	Accipitriformes	2 (n=3)	2	-	-
	Anseriformes	4 (n=53)	1	2	1
	Apodiformes	2 (n=2)	-	1	1
	Bucerotiformes	1 (n=7)	-	1	-
	Caprimulgiforme	1 (n=1)	1	-	-
	Charadriiformes	2 (n=3)	-	1	1
	Columbiformes	8 (n=20)	5	2	1
	Coraciiformes	2 (n=2)	1	1	-
	Cuculiformes	1 (n=1)	1	-	-
	Galliformes	2 (n=57)	2	-	-
	Gruiformes	1 (n=1)	1	-	-
	Passeriformes	35 (n=53)	21	6	8
	Pelecaniformes	2 (n=6)	2	-	-
	Piciformes	5 (n=7)	2	2	1
	Psittaciformes	4 (n=7)	2	1	1
	Strigiformes	3 (n=12)	3	-	-
Suliformes	2 (n=4)	2	-	-	
Mammalia (31,5%)	Artiodactyla	5 (n=38)	4	1	-
	Carnivora	4 (n=71)	3	1	-
	Chiroptera	17 (n=64)	12	4	1
	Primates	4 (n=33)	1	2	1
	Rodentia	15 (n=53)	8	6	1
	Scandentia	1 (n=8)	1	-	-
Actinopterygii	Cypriniformes	4 (n=5)	4	-	-
Amphibia (8,9%)	Anura	13 (n=22)	8	4	1
Reptilia (4,1%)	Squamata	6 (n=6)	4	-	2
TOTAL	26	146	91 (62,3%)	35 (24%)	20 (13,7%)

Enfin, certaines espèces ont été détectées dans un grand nombre d'échantillons. C'est le cas notamment de la poule (*Gallus gallus*) et du chien (*Canis lupus*), présents dans 56 échantillons chacun, mais aussi du Taphien à barbe noire (*Taphozous melanopogon*, 39 échantillons) et du macaque crabier (*Macaca fascicularis*, 24 échantillons).

6.1.3 Détection à partir de matrice d'eau et de sol pour le marqueur 12S

Les échantillons issus des prélèvements d'eau et du sol ont pu être testés avec le marqueur 12S uniquement et n'ont pas été testés avec les deux autres marqueurs. Les échantillons d'eau semblent plus performants par rapport à ceux du sol et donnent de meilleurs résultats. Les résultats obtenus avec l'Upset, qui représente le nombre de taxons obtenus par type d'échantillonnage, montrent que deux échantillons d'eau ont permis d'identifier sept taxons différents, dont cinq qui sont uniques à ce type d'échantillon (**Figure 4.A**). Cela correspond à un ratio de 3,5 taxons détectés en moyenne par échantillon. En comparaison, les échantillons de sol de surface (n = 6) ont permis de détecter onze taxons au total (ratio de 1,83), tandis que ceux prélevés en profondeur (n = 3) n'ont révélé que quatre taxons (ratio de 1,33). Ces résultats suggèrent une meilleure efficacité du prélèvement dans l'eau, ainsi qu'une diminution de la détection d'ADN en profondeur du sol. La détection de taxons à partir de l'eau est donc plus efficace, mais elle est également plus précise (**Figure 4.B**). Le ratio d'espèces précises par échantillon est de 2,5 espèces pour l'eau alors qu'il est seulement de 0,67 et 1 respectivement pour le sol en profondeur et celui en surface.



Type d'échantillonnage	Échantillons analysés	Taxons détectés	Espèces détectées	Genres détectés	Familles détectées	Espèces totales/échantillon	Espèces précises/échantillon
Soil core	3	4	2 (50,0%)	2 (50,0%)	-	1,33	0,67
Soil scoop	6	11	6 (54,5%)	4	1 (9,1%)	1,83	1,00
Water	2	7	5 (71,4%)	2	-	3,50	2,50

Figure 4. (A) Upset représentant l'analyse des co-détections de taxons de vertébrés entre différents types d'échantillons à partir du marqueur génétique 12S. Le « set size » correspond au nombre total de taxons détectés par le type d'échantillon approprié tandis que « intersection size » correspond au nombre de taxons détectés par un ou plusieurs types d'échantillonnage. (B) Performances des échantillons d'eau et de sol en termes de détection taxonomique. Le nombre d'échantillons correspond au nombre total d'échantillons dans lesquels le type d'échantillon considéré a permis de détecter au moins un ordre taxonomique, à partir du marqueur 12S. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la proportion de taxons identifiés au rang considéré.

7.1.4 Ecouvillonnages supplémentaires

Les échantillons obtenus à partir des écouvillons réalisés directement sur des espèces (technique « swab ») ont permis de trouver une bonne diversité de taxons. Sept échantillons ont permis de recenser vingt-huit taxons de vertébrés différents, dont vingt-trois espèces précisément identifiées, notamment d'amphibiens, d'oiseaux, ou de chauves-souris. Cette technique est donc celle qui s'est avérée la plus efficace, mais aussi la plus précise avec un ratio d'efficacité de 4 taxons détectés en moyenne par un échantillon et une précision de 3,29 espèces précisément identifiées par échantillon.

7.2 Comparaison des autres types d'échantillonnages

Les échantillonnages réalisés sur des feuilles et des toiles d'araignées, ainsi que ceux obtenus à partir des pièges à air et des pièges à poils, sont ceux qui ont été analysés et comparés de la même manière avec les trois marqueurs différents qui ont été utilisés. Les échantillons d'eau et de sol, spécifiques au marqueur 12S, n'ont donc pas été pris en compte dans cette partie.

7.2.1 Comparaison entre marqueurs

Aucun des trois marqueurs n'a permis à lui seul de couvrir l'intégralité de la diversité taxonomique observée, ce qui correspond au résultat attendu (**Figure 5**). Le marqueur 12S a détecté à lui seul 41 taxons qui lui sont spécifiques, CO1-Galan en a identifié 29, et CO1-Bat possède 12 taxons uniques. De plus, les marqueurs partagent des taxons en commun, ce qui souligne leur complémentarité. Le marqueur CO1-Bat qui doit être un marqueur spécifique des chauves-souris, est parvenu à détecter 8 taxons de chiroptères, soit seulement deux taxons de plus par rapport aux marqueurs 12S et CO1-Galan. Ce marqueur est également parvenu à détecter d'autres espèces notamment d'oiseaux, des reptiles ou encore des amphibiens, ce qui n'en fait pas réellement un marqueur spécifique aux chauves-souris.

L'analyse comparative des marqueurs permet de dégager les forces et faiblesses de chacun (**Tableau 3**). On considère à partir de ces résultats que les marqueurs ont tous les trois une efficacité de détection et une précision d'identification similaires. Le marqueur 12S se distingue par un très bon rendement global : il s'agit du marqueur ayant détecté le plus grand nombre de taxons (72). Le marqueur CO1-Bat est celui qui a permis la meilleure précision d'identification, avec 91,2 % de détections précises des espèces, ce qui lui confère un ratio d'espèces précises par échantillon légèrement supérieur aux deux autres (1,48). Cependant, il est aussi celui ayant détecté le moins d'espèces (34). Enfin, le marqueur CO1-Galan, possède un bon rapport efficacité et précision, tout en ayant révélé comme mentionné précédemment un plus grand nombre de taxons uniques par rapport à CO1-Bat. Ce marqueur reste donc pertinent en complément d'un autre, notamment pour sa capacité à cibler des taxons différents.

Tableau 3. Performances des trois marqueurs, en termes de détection taxonomique sur les échantillons d'ADNe collectés. Le nombre d'échantillons correspond au total d'échantillons dans lesquels chaque marqueur a permis de détecter au moins un ordre taxonomique, tous types d'échantillons confondus. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la proportion de taxons identifiés au rang considéré

Marqueur	Échantillons analysés	Taxons détectés	Espèces détectées	Genres détectés	Familles détectées	Espèces totales/ échantillon	Espèces précises/ échantillon
12S	42	72	51 (70,8%)	18 (25,0%)	3 (4,2%)	1.71	1.21
CO1-Galan	37	57	46 (80,7%)	9 (15,8%)	2 (3,5%)	1.54	1.24
CO1-Bat	21	34	31 (91,2%)	3 (8,8%)	0	1.61	1.48

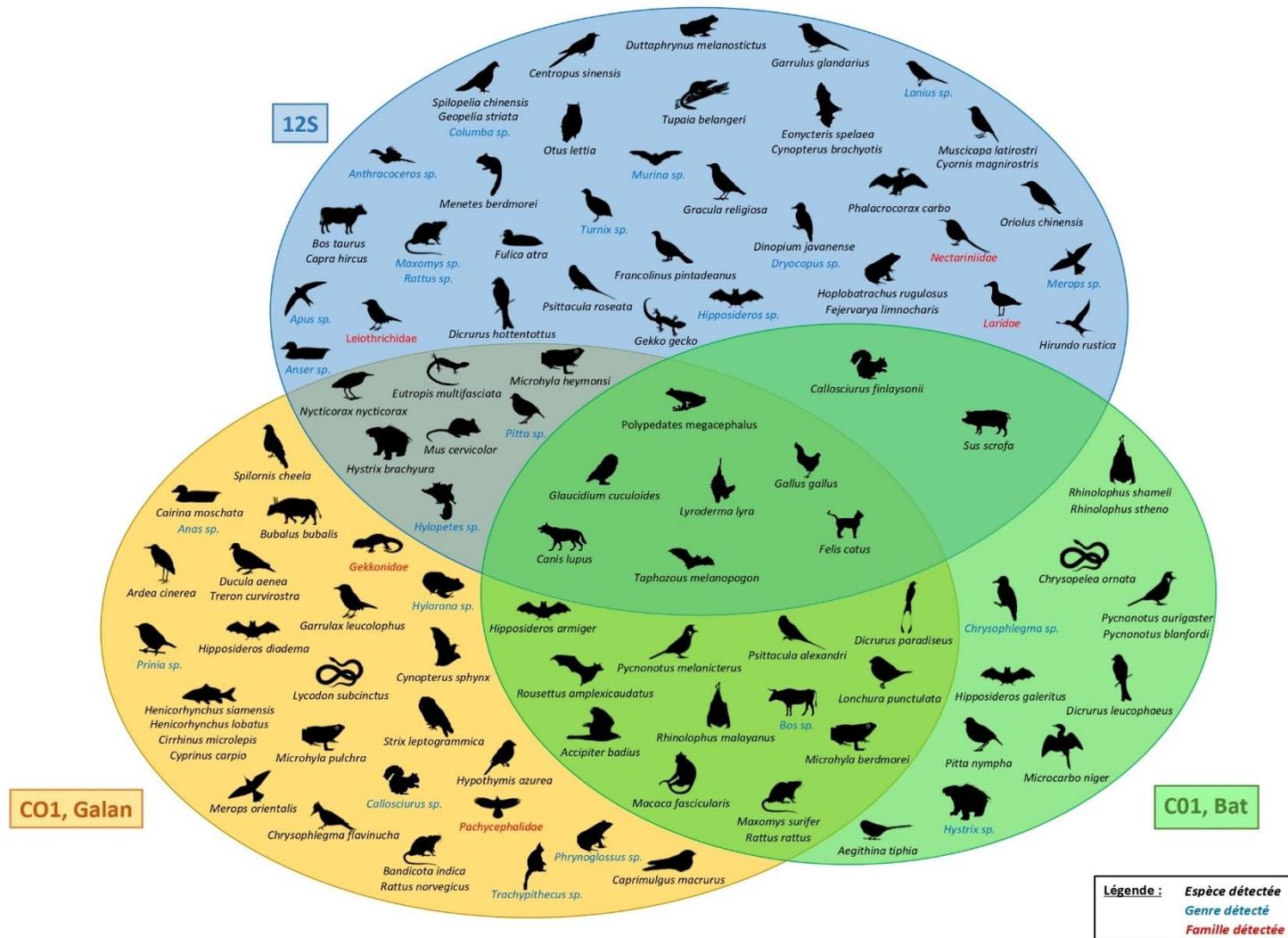


Figure 5. Diversité des taxons détectés selon le marqueur génétique utilisé. Les marqueurs ont été comparés dans ce diagramme de Venn à partir des différents échantillons amplifiés par les trois marqueurs (pas d'échantillons d'eau ou de sol). Les taxons sont représentés selon un gradient de précision taxonomique allant du noir pour les espèces précisément détectées, au rouge lorsque seule la famille a été détectée. Les images d'animaux utilisées ont été récupérées sur le site Phylopic

7.2.2 Comparaison entre types d'échantillons

Le diagramme de Venn (**Figure 6**) met en évidence que les différentes techniques d'échantillonnage permettent, elles aussi, de détecter des ensembles distincts de taxons. L'écouvillonnage de feuilles et les pièges à air se distinguent comme les techniques les plus performantes, avec respectivement 66 et 62 taxons détectés. Ces deux méthodes présentent également le plus grand nombre de taxons uniques, avec 30 taxons propres à l'écouvillonnage de feuilles (soit environ 45 % de l'ensemble des taxons détectés par cette méthode) et 27 pour les pièges à air (environ 43 %). Cela souligne leur spécificité dans la détection de la biodiversité locale. En revanche, la technique d'échantillonnage à partir des pièges à poils semble moins efficace en termes de diversité spécifique, ne permettant de détecter que quinze taxons respectivement, et un nombre très limité de taxons uniques avec uniquement quatre taxons. Le diagramme révèle également qu'un faible nombre de taxons (seulement cinq) est partagé entre l'ensemble des techniques, ce qui indique une faible redondance et suggère une complémentarité entre les différentes méthodes.

L'écouvillonnage de feuilles apparaît comme la technique la plus équilibrée (**Tableau 4**), alliant une détection élevée à une bonne précision taxonomique (ratios de 2,44 pour le nombre de taxons par échantillon et de 1,78 pour la précision d'identification). Les pièges à air offrent une efficacité légèrement inférieure mais restent comparables (1,65 pour le nombre de taxons par échantillon). À l'inverse, les pièges à poils présentent la plus faible performance, malgré un taux de réussite d'amplification de 100%, avec des ratios d'efficacité de 1,50 et de précision de seulement 1,20, traduisant une faible rentabilité de cette méthode au cours de notre étude. Enfin, l'échantillonnage sur toiles d'araignées, bien que limité en nombre d'échantillons, montre des résultats particulièrement prometteurs : 24 taxons ont été détectés à partir de seulement sept échantillons, dont six taxons propres à ce type d'échantillons, soit un ratio de 3,43 taxons par échantillon. De plus, la précision d'identification de ces échantillons est particulièrement élevée (2,57) par rapport aux trois autres techniques, suggérant un fort potentiel pour cette méthode. Toutefois, le faible nombre d'échantillonnage ne nous permet pas de généraliser ces résultats, nous incitant ainsi à mettre en place des tests complémentaires au cours de prochaines études pour valider cette approche.

Tableau 4. Performances des différents types d'échantillonnages en termes de détection taxonomique sur les échantillons d'ADNe collectés. Le nombre d'échantillons correspond au nombre total d'échantillons dans lesquels le type d'échantillons considéré a permis de détecter au moins un ordre taxonomique, tous types de marqueurs confondus. Les pourcentages entre parenthèses indiquent la proportion de taxons identifiés au rang considéré.

Type d'échantillonnage	Nombre d'échantillons	Taxons détectés	Espèces détectées	Genres détectés	Familles détectées	Espèces totales/ échantillon	Espèces précises/ échantillon
Air	31	62	51 (82,2%)	6 (9,7%)	5 (8,1%)	2,00	1,65
Hair	10	15	12 (80,0%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)	1,50	1,20
Leaf	27	67	49 (73,1%)	12 (17,9%)	6 (9,0%)	2,48	1,81
Spiderweb	7	24	18 (75%)	5 (20,8%)	1 (4,2%)	3,43	2,57

7.2.3 Comparaison entre type d'échantillons et par marqueur

Le type de marqueur utilisé ainsi que le type d'échantillon recueilli semblent être influencés conjointement pour la détection des taxons (**Figure 7**). De façon générale, les observations nous permettent de dire que le marqueur 12S semble globalement plus performant pour la détection des taxons de vertébrés, notamment pour détecter la classe des oiseaux avec trente taxons recensés à partir de l'échantillonnage de feuilles et celle des mammifères avec dix-sept taxons obtenus à partir des pièges à air. Ce marqueur a également permis de détecter des amphibiens avec trois taxons obtenus à partir des pièges à poils et trois avec les feuilles, mais également des reptiles avec les écouvillonnages de feuilles et de toiles d'araignées notamment. En comparaison avec ce marqueur, les deux autres semblent avoir moins bien fonctionné, avec moins de taxons détectés. Malgré tout, la majorité des détections se fait là aussi pour des oiseaux et des mammifères. Le marqueur CO1-Bat n'a permis de détecter que ces deux classes sans détecter les trois autres. Enfin, le marqueur CO1-Galan a permis de détecter des taxons de reptile et un seul d'amphibien, mais il a également été le seul à détecter des taxons de poissons à partir des pièges à air et du frottage de feuilles. En accord avec les résultats décrits précédemment, le type d'échantillon utilisé joue également un rôle important dans la détection de la biodiversité. Les écouvillonnages de feuilles et les pièges à poils offrent bien les meilleures performances en termes de richesse taxonomique détectée, notamment lorsqu'elles sont couplées au marqueur 12S. À l'inverse, les échantillons issus des pièges à poils montrent une richesse plus faible. Les toiles d'araignée offrent là aussi une alternative intéressante avec une capacité de détection efficace, notamment avec les oiseaux et plus particulièrement les mammifères, car seulement sept échantillons ont permis de détecter presque autant de mammifères qu'avec l'écouvillonnage de feuilles (ratio de 1,7 par rapport à 0,44)

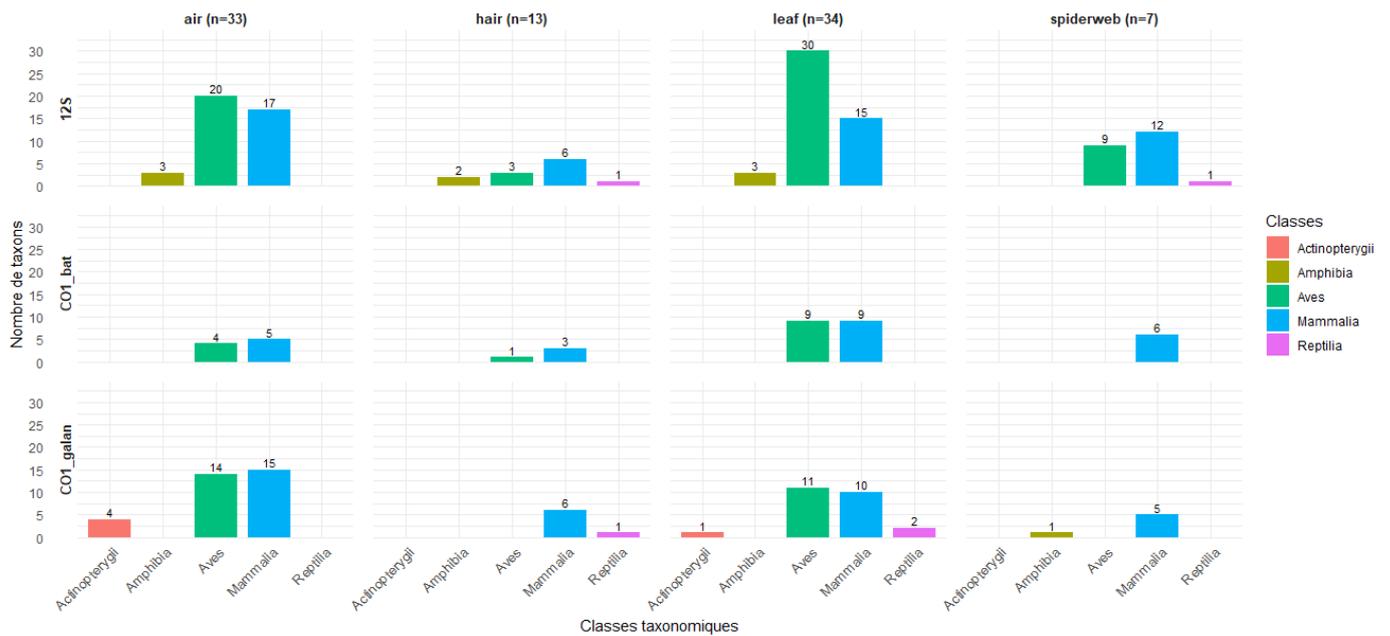


Figure 7. Facet grid représentant le nombre de taxons détectés par type d'échantillonnage et par marqueur. Les chiffres correspondent au nombre de taxons différents détectés pour chaque combinaison entre un marqueur considéré et le type d'échantillonnage prélevé.

7.3 Effort d'échantillonnage

Les courbes de raréfaction (**Figure 8**) indiquent que, de manière générale, l'effort d'échantillonnage réalisé n'était pas encore suffisant pour caractériser pleinement la richesse taxonomique de la zone étudiée. Les courbes obtenues à partir des 46 et 49 échantillons issus respectivement des pièges à air et des écouvillonnages de feuilles sont encore loin de former une asymptote, et continuent à croître (**Figure 8.A et B**). Cela suggère que l'effort déployé n'est pas encore suffisant pour détecter la majorité des espèces présentes, et qu'un échantillonnage plus important serait nécessaire pour estimer précisément la richesse spécifique. A partir des dix-sept échantillons issus des pièges à poils, les résultats sont différents avec une courbe qui tend vers une asymptote (**Figure 8.C**). Le modèle de Michaelis-Menten a donc pu être appliqué, permettant ainsi d'estimer sur R qu'un échantillonnage d'environ n=98 avec cette technique permettrait d'identifier 95% des espèces présentes, et par conséquent que l'asymptote serait atteinte. Ce résultat souligne la spécificité de ce type de piège, qui semble cibler un ensemble plus limité d'espèces. En revanche, l'ADNe provenant de l'échantillonnage des toiles d'araignées montre une courbe encore loin de former un plateau (**Figure 8.D**). Cette forme indique qu'un échantillonnage plus poussé permettrait probablement de révéler une richesse spécifique bien plus importante.

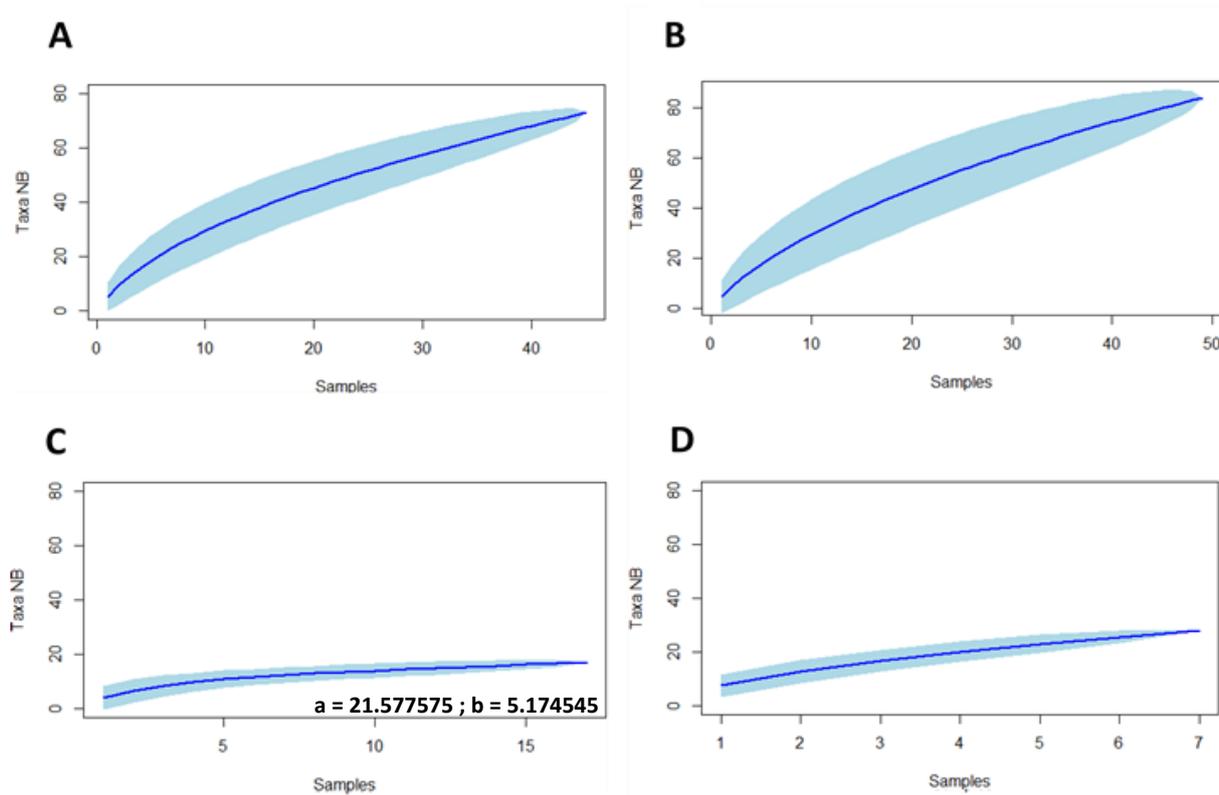


Figure 8. Courbes de raréfaction montrant la richesse taxonomique cumulée (Taxa NB) en fonction du nombre d'échantillons pour les différents types de substrats étudiés : (A) Air, (B) Feuilles, (C) Poils, (D) Toile d'araignée. La ligne bleue représente la moyenne de la richesse cumulée, tandis que la zone ombrée indique l'intervalle de confiance.

7.4 Comparaison d'identification ADNe/Méthodes conventionnelles

La mise en place de filets japonais durant la mission menée au mois de mai 2024 à Stung Treng a permis la capture de 265 chauves-souris. L'identification des spécimens capturés a révélé la présence de vingt espèces différentes dans la zone (**Tableau Annexe 1.A**), ainsi qu'un individu non identifié. Parmi les espèces recensées, figuraient notamment *Taphozous melanopogon* et plusieurs représentants du genre *Hipposideros* (*H. armiger*, *H. diadema*, *H. larvatus*), ainsi que du genre *Rhinolophus*, avec une forte dominance de *Rhinolophus shameli* (143 individus capturés). En parallèle, l'échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe) réalisé dans la même zone a permis de détecter dix-sept taxons. Parmi eux, neuf ont été identifiés à la fois par la méthode de capture et par celle de l'ADNe. De plus, quatre espèces n'ont été détectées que par l'analyse des échantillons environnementaux : *Cynopterus brachyotis*, *Rhinolophus stheno*, *Rousettus amplexicaudatus* et une espèce du genre *Murina*. Cela reste inférieur aux onze espèces identifiées uniquement par capture. L'identification basée sur la capture s'est également montrée plus précise : à un individu près, toutes les chauves-souris capturées ont pu être identifiées. En revanche, l'échantillonnage d'ADNe a permis d'identifier quatre genres et une famille sans pouvoir déterminer les espèces exactes auxquels ils appartenaient. Malgré tout, ces résultats soulignent une bonne complémentarité entre les deux méthodes.

7.5 Echantillonnage sur le terrain (mission 2025)

7.5.1 Mission à Phnom Penh

Lors de la mission menée à Phnom Penh, un total de 63 échantillons a été récolté grâce à l'écouvillonnage sur la surface de feuilles, à partir de 21 kits (composés de trois écouvillons chacun) répartis sur différents sites d'échantillonnage. Un nombre équivalent de kits a été utilisé pour l'échantillonnage de sol en profondeur, aboutissant à 21 échantillons. En parallèle, cinq points d'eau ont pu être échantillonnés.

Concernant les pièges à poils, sur les 70 pièges ont été installés au total, 10 pièges ont présenté des structures s'apparentant à des poils, et des écailles ont été retrouvées sur un onzième (soit un taux de réussite global de 15,7 %). Parmi eux, sept pièges sur 30 installés (23,3 %) étaient positifs à RUA. Deux des 10 pièges possédaient des poils à PLIA, et seulement deux pièges en possédaient sur les 30 installés à NW.

7.5.2 Mission à Stung Treng

Au cours de cette mission, neuf kits d'échantillonnage de surface ont été utilisés, permettant de récolter 27 échantillons sur une période de trois jours d'échantillonnage. De plus, neuf échantillons de sol et trois échantillons d'eau ont été collectés.

7.5.3 Mission à Battambang

À Battambang, 51 échantillons ont été obtenus à partir de 17 kits d'échantillonnages de surfaces de feuilles ont été utilisés, Parmi ceux-ci, 14 kits ont servi à écouvillonner la surface de feuilles et trois kits ont été spécifiquement utilisés pour des toiles d'araignées. Par ailleurs, 19 échantillons de sol et quatre échantillons d'eau ont été récoltés.

Pour les pièges à poils, 29 pièges sur les 75 initialement posés ont donné des résultats positifs, soit un taux de réussite de 38,7 %. Toutefois, une forte disparité a été observée entre les deux zones. Dans le district de Banan, 27 pièges étaient positifs sur 35 (77,1 %). Tandis qu'à l'inverse, sur les 40 pièges déposés dans la commune de Ta Kream, seuls deux d'entre eux ont affiché un résultat positif (5 %).

La mission complémentaire menée en février dans la province de Battambang a permis de collecter 24 échantillons de surface de feuilles (via huit kits), cinq échantillons de sol et quatre échantillons d'eau supplémentaires.

7.5.4 Bilan global d'échantillonnage

Ainsi, au cours des trois missions de terrain et de l'expédition additionnelle réalisées en 2025, un total 165 échantillons réalisés à la surface feuilles a été récolté, ainsi que 54 échantillons provenant du sol, et 16 échantillons d'eau. Les prélèvements sur les 16 points d'eau dans les différentes zones d'échantillonnage ont été réalisés en filtrant entre 100 et 750 ml d'eau.

8. Discussion

8.1 Détection des espèces

Parmi les 91 espèces que nous avons précisément détectées, certaines ont été détectées dans un grand nombre d'échantillons. Ces résultats sont parfaitement cohérents, car ces espèces ont été régulièrement observées sur les zones d'échantillonnages. D'autant plus que parmi les espèces identifiées, huit sont des animaux domestiques (par ex. *Gallus gallus*, *Canis lupus*, *Felis catus*), qui étaient également présents sur le terrain. Les données confirment donc une forte abondance de ces espèces dans la zone étudiée, et ou, du moins, une forte proximité de ces animaux avec les sites d'échantillonnage. La majorité des espèces précisément détectées dans notre étude menée dans une DDF concernait des oiseaux (46 espèces différentes). Cela reste en accord avec les données fournies par l'IUCN qui indique que les oiseaux sont la classe la plus importante en termes de diversité d'espèces dans les forêts sèches de Diptérocarpes au Cambodge (environ 33% des espèces présentes). Malgré tout, d'après la même source, la seconde classe la plus présente est celle des poissons, notamment présents dans des cours d'eau saisonniers et souvent pauvres en oxygène. Or nous n'en avons détecté que très peu (seulement quatre). Cela s'explique car les conditions d'échantillonnage n'étaient pas favorables à leur détection, notamment avec l'absence de milieu aquatique profond ou du moins d'habitats adaptés à la faune piscicole (rivières, lacs, zones de courant). En effet, l'échantillonnage a eu lieu durant la saison sèche, ce qui a limité le nombre de points d'eau pouvant être échantillonnés, particulièrement fin Avril 2024 pendant l'échantillonnage où l'Asie du Sud-Est était en canicule globale (Lhoyd, 2024). Les deux points échantillonnés concernaient une réserve d'eau qui servait notamment d'abreuvoir pour les animaux et d'un cours d'eau peu profond et avec un très faible courant, sans poissons. Une détection n'était donc pas attendue, mais la détection de certains taxons pourrait notamment s'expliquer par une contamination ou alors d'une prédation secondaire. La détection du reste des classes de vertébrés reste en accord avec les données fournies même si nous n'avons que très peu détecté de reptiles ou d'amphibiens de façon précise. Une explication pourrait être trouvée à travers un biais lié au choix du marqueur par exemple, d'autant plus que certaines études comme celle de Raemy et Ursenbacher, (2018), discutent du fait que les reptiles présenteraient des taux de perte d'ADN dans leur environnement plus faible que d'autres taxons.

8.2 Application de ces méthodes à la conservation des espèces

D'un point de vue conservation des espèces, sur les 91 espèces identifiées, aucune n'est actuellement classée en danger critique d'extinction, et la grande majorité présente un statut de conservation jugé peu préoccupant par l'IUCN. Toutefois, certaines espèces soulèvent une attention particulière. C'est le cas du Macaque crabier (*Macaca fascicularis*), désormais classé en danger et du Pitta à ventre bleu (*Pitta nympha*), considéré comme espèce vulnérable. De plus, deux autres espèces sont classées quasi menacées et nécessitent un suivi particulier : la Perruche à moustaches (*Psittacula alexandri*) et la Perruche à tête rose (*Psittacula roseata*). Le statut préoccupant de ces différentes espèces s'explique notamment en raison d'une déforestation intensive, qui entraîne la destruction de leur habitat, ainsi que par leur exploitation dans le commerce illégal d'animaux sauvages et il est intéressant de souligner que ces résultats ont permis leur détection.

8.3 Application de ces méthodes à la prévention des zoonoses

Cette étude s'inscrit avant tout dans le cadre du projet BCOMING, qui vise à établir le rôle de la biodiversité dans l'émergence des maladies. Parmi les différentes espèces recensées, certaines

apparaissent comme des hôtes potentiels de maladies zoonotiques. C'est notamment le cas des chauves-souris des genres *Rhinolophus* spp. et *Taphozous* spp., connues pour être des hôtes avérés de *Betacoronavirus*, ainsi que du genre *Rousettus* spp., potentiellement porteur de Paramyxovirus. Bien entendu, cette observation ne se limite pas aux chauves-souris : d'autres groupes, tels que les rongeurs identifiés au cours de l'étude, sont également associés à de nombreuses zoonoses d'origines bactérienne et virale. Par ailleurs, l'efficacité de détection observée chez les oiseaux suggère la possibilité d'un suivi efficace, en particulier pour les espèces migratrices, qui peuvent jouer un rôle important dans la diffusion du virus de l'influenza aviaire hautement pathogène.

Néanmoins, l'objectif principal de cette étude ne se limite pas à l'identification d'espèces réservoirs. Il s'agit avant tout de comprendre la composition des communautés et d'évaluer l'influence de la biodiversité sur la transmission et le risque d'émergence des pathogènes. La détection d'un large éventail d'espèces constitue à ce titre un enjeu majeur, car elle permet notamment d'explorer des mécanismes écologiques tels que l'effet de dilution. Il est donc important d'avoir des méthodes de mesure de la biodiversité accessibles et fiables.

8.4 Choix des marqueurs

Le choix des marqueurs génétiques utilisés est crucial et dépend entièrement du type de taxons qui sont ciblés. Dans le cadre de cette étude, seuls les vertébrés devaient être recensés, d'où le choix d'utiliser les marqueurs 12S et CO1, adaptés à ce cas de figure (Coissac et al., 2012). Ainsi, la comparaison de trois marqueurs différents a été souhaitée pour déterminer si l'utilisation d'un ou plusieurs marqueurs auraient un impact et de savoir quels marqueurs permettraient une détection plus exhaustive. D'après les résultats obtenus, la comparaison des taxons qu'ils ont permis de détecter soulignent bien leur complémentarité. Leur combinaison permet une meilleure couverture taxonomique et renforce la fiabilité des détections, en validant la présence de certains taxons via des identifications croisées. L'association des trois, offre donc un inventaire plus précis et plus exhaustif. Cependant, dans le contexte de cette étude, qui vise à établir un inventaire à la fois fiable, rapide et surtout peu coûteux, l'utilisation d'un troisième marqueur augmente les coûts de réactifs. Utiliser deux de ces trois marqueurs nous permettrait donc de trouver un compromis suffisant entre performance et faisabilité. Dans notre cas, la combinaison des marqueurs 12S et CO1-Galan semble être la plus efficace, car elle permet de détecter quasiment l'ensemble de la diversité observée par les trois marqueurs, tout en limitant l'effort technique et financier. Le marqueur CO1 spécifique des chauves-souris, bien qu'intéressant pour certaines identifications précises, est celui ayant apporté le moins d'informations. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de l'utilisation de plusieurs marqueurs pour maximiser la détection de la biodiversité. Chacun des trois marqueurs utilisés a présenté des caractéristiques qui lui sont propres et ont permis la détection de taxons uniques.

8.5 Importance des types d'échantillonnages utilisés

De même que pour la comparaison entre les marqueurs utilisés, les différents types d'échantillonnages ont offert des résultats propres à chacun. La détection d'un grand nombre de taxons à partir de seulement deux échantillons d'eau est cohérente, et est en accord avec les résultats décrits dans d'autres études qui accordent de nombreux avantages à ce support d'ADNe (Ficetola et al., 2008; Ruppert et al., 2019). Pour les échantillons issus du sol, il était attendu de récolter en profondeur des fragments d'ADN de vertébrés plus diffus et dégradés étant donné leur ancienneté et donc moins exploitables. Les résultats ont bien confirmé cela, d'autant plus que le pourcentage de réussite de

L'amplification des échantillons de sol a été inférieure à 50%. L'interprétation des résultats obtenus avec les écouvillonnages facultatifs a été faite séparément car la technique reste malgré tout opportuniste. Elle dépend entièrement de ce qui est observé sur le terrain au moment de la mission et est, par conséquent difficilement reproductible. Son utilisation est également plus invasive que les autres techniques d'échantillonnages utilisées, pouvant entraîner un stress chez l'animal lorsque l'écouvillonnage était effectué sur un animal vivant. Les résultats obtenus avec cette technique d'échantillonnages sont donc intéressants mais celle-ci ne peut pas être systématisée et standardisée.

Les résultats obtenus à partir des autres techniques d'échantillonnage suggèrent qu'il convient de privilégier les techniques offrant un bon compromis entre efficacité et précision, telles que l'écouvillonnage de feuilles ou l'utilisation des pièges à air. Toutefois, les contraintes logistiques doivent également être prises en compte. L'efficacité des pièges à air, avait déjà été démontrée notamment dans l'étude de Garrett et al. (2023). Bien que performants, leur utilisation s'avère malgré tout plus complexes à mettre en œuvre : cela nécessite la gestion de batteries, ils sont plus encombrants et moins adaptés à une collecte rapide sur le terrain. À l'inverse, l'écouvillonnage de feuilles est une méthode plus simple à utiliser, rapide à réaliser et facile à transporter, ce qui en fait une solution particulièrement pertinente durant des missions limitées en temps et en argent. Enfin, l'échantillonnage de toiles d'araignées constitue une piste intéressante, notamment en complément des autres techniques. Déjà mise en avant au cours de l'étude de Gregorič et al. (2022), cette technique d'échantillonnage n'a néanmoins jamais été comparée jusqu'à présent avec d'autres supports d'ADNe. La mise en place d'investigations supplémentaires pour en valider la robustesse pourrait donc permettre une avancée dans l'utilisation du metabarcoding. Cette remarque est soulignée par la courbe de raréfaction associée qui n'a pas encore atteint de plateau. Cela met en évidence le potentiel élevé de cette méthode, car cela suggère que cette technique d'échantillonnage pourrait permettre de détecter bien plus d'espèces que ce que nos résultats révèlent. Les toiles d'araignées avaient été échantillonnées séparément des feuilles durant la mission de 2024. Ne sachant pas à ce moment-là que nous obtiendrions ces résultats, nous avons décidé durant la mission de 2025 à Phnom Penh et Stung Treng d'associer les écouvillonnages des feuilles et des toiles d'araignées présentes ensemble. Un même écouvillon pouvait donc à la fois froter des feuilles et des toiles d'araignées. Un écouvillonnage séparé à néanmoins était réalisé durant la mission à Battambang afin de valider ou non l'efficacité des toiles d'araignées en tant que source d'ADNe.

Ainsi, cette étude est la première qui cherche à comparer la détection d'espèces à partir de l'ADN issu de toiles d'araignées et de l'écouvillonnage des feuilles avec les techniques utilisées à l'origine comme la collecte d'ADNe à partir d'une matrice aquatique ou du sol. Une optimisation de ces techniques est donc à envisager. Malgré tout, les résultats obtenus offrent un bon aperçu des espèces classiquement observées dans une DDF.

De leur côté, les pièges à poils n'ont pas permis de détecter un grand nombre de taxons différents. Comme le suggéraient Mullins et al. dans leur étude (2010), cette technique possède en revanche un taux de réussites élevés d'amplification. Mais cette faiblesse de recensement observée est néanmoins cohérente car les pièges étaient limités en taille et ne pouvaient laisser passer que de petits animaux, notamment des rongeurs et autres petits mammifères. Étonnamment, des espèces inattendues comme une espèce du genre *Taphozous* ont pu être détectées avec cette technique d'échantillonnage. Ces résultats sont intéressants et mettent potentiellement en évidence la volatilité de l'ADN ainsi que l'efficacité du pouvoir adhésif retrouvé dans ses pièges, et déjà mis en évidence par Allen et al., (2023). De plus, une espèce de reptiles a pu être identifiée à travers les pièges, il s'agissait d'un scinque doré

(*Eutropis multifasciata*). Cette observation concorde avec la présence d'écailles retrouvées directement sur la bande adhésive de l'un des pièges. Malgré tout, un certain nombre de points doivent être améliorés avec cette technique d'échantillonnage. Le problème qui s'est présenté au cours de la mission de Phnom Penh en janvier 2025 a été le manque de temps pour laisser les pièges plus longtemps et espérer un meilleur résultat. De plus, un changement de l'appât initialement prévu entre la pose et la récolte du piège n'a pas pu être effectué. En parallèle, les pièges installés durant la mission de 2024 avaient été installés durant une semaine entière avec un changement des appâts trois fois, ce qui était plus adapté. Ces appâts s'ils n'étaient pas changés étaient fréquemment mangés par des insectes, notamment par des fourmis qui étaient particulièrement abondantes dans les zones d'échantillonnage. Cela rendait donc une partie des pièges inefficaces. De plus, nous avons pu observer un très bon pourcentage de succès notamment sur le site de Banan durant la mission autour de Battambang, en revanche les pièges déposés sur le site Ta Kream durant cette même mission n'ont absolument pas fonctionné, les deux zones présentaient pourtant une grande quantité de rongeurs. Il y a donc une très grande variabilité liée à l'emplacement des pièges. Il est donc difficilement envisageable de trouver une solution à cette limitation, si ce n'est d'établir une vérification de l'état de l'appât de façon plus fréquente pour maximiser nos chances d'attirer un animal. Dans l'ensemble, cette technique d'échantillonnage présente donc une complexité dans sa mise en place et ne permet pas d'établir un recensement efficace des espèces par rapport aux autres techniques. Cela fait donc d'elle une technique moins pertinente par rapport aux autres, qui nous ont permis de détecter un plus grand nombre de taxons avec plus de facilité. Cette technique serait peut-être plus pertinente pour les suivis à long terme et plus ciblés sur le suivi des mammifères.

Il a alors été possible d'établir une combinaison idéale entre le type d'échantillon à privilégier et le marqueur à utiliser pour obtenir un recensement qui soit le plus exhaustif possible. En effet, la combinaison entre l'écouvillonnage de feuille et le marqueur 12S constitue l'association qui nous a permis de détecter le plus d'espèces. Bien entendu, cette conclusion ne peut pas être générique et dépend de nombreux facteurs comme les conditions environnementales au moment de l'échantillonnage ainsi que les espèces ciblées. Malgré tout, des résultats tout aussi convaincants ont également été obtenus dans l'étude menée en 2023 par Lynggaard et al. ce qui vient appuyer ces propos. Une limite importante de cette étude réside dans le nombre inégal d'échantillons prélevés selon les méthodes. L'écouvillonnage des feuilles et l'utilisation de pièges à air se sont révélés plus simples à mettre en œuvre sur le terrain, ce qui a facilité leur déploiement et conduit à un nombre plus élevé d'échantillons pour ces méthodes. À l'inverse, d'autres approches ont été moins représentées en raison de contraintes logistiques ou techniques. Cette disparité dans les effectifs complique les comparaisons entre les différentes méthodes d'échantillonnage, certaines étant appuyées par un nombre très limité de données. Dans ce contexte, le recours aux courbes de raréfaction s'avère pertinent afin de pouvoir comparer de manière plus équitable la richesse et la diversité obtenues par chaque méthode.

8.6 Comparaison avec les techniques conventionnelles

Le recensement à partir de l'ADNe présente malgré tout encore des lacunes. La comparaison entre les espèces de chiroptères capturées et celles identifiées par échantillonnage d'ADNe montre des résultats légèrement moins concluants pour cette dernière méthode. Son utilisation dépend en effet d'un certain nombre de facteurs. Les chauves-souris à titre d'exemple ne laissent pas forcément de trace d'ADN dans tous les milieux qu'elles traversent. De plus, la détection d'ADNe dépend fortement de l'endroit précis du prélèvement (eau, air, sol, surface végétale), ce qui ajoute une variable liée au

périmètre d'échantillonnage parfois difficile à maîtriser, mais également de l'état de conservation de l'ADN récolté. Une explication pourrait également résider dans le fait que la base génétique des espèces de chauves-souris au Cambodge reste très faible, l'identification des espèces à partir de la banque de données peut donc s'avérer particulièrement difficile.

En revanche, l'utilisation notamment de filet force l'interaction avec l'animal et permet une identification taxonomique fiable. Malgré tout, il est essentiel de rappeler que la capture à l'aide de filets japonais demeure une technique particulièrement contraignante. Elle requiert des moyens logistiques importants, du temps et une intervention humaine conséquente, de l'installation des filets à la capture nocturne, jusqu'à l'identification des individus. Par ailleurs, cette méthode est source de stress important pour les animaux. À l'inverse, l'échantillonnage d'ADNe est une méthode simple, rapide et non invasive. Elle peut être réalisée à tout moment de la journée, sans dépendre des activités nocturnes des espèces ciblées. Si cet exemple s'est concentré sur les chiroptères, les résultats pourraient varier considérablement selon le groupe animal étudié. Par exemple, dans le cas d'un inventaire de la faune aviaire, le recours à l'ADNe pourrait permettre de détecter un plus grand nombre d'espèces que la méthode de capture, car il serait possible d'identifier aussi bien les espèces diurnes que nocturnes sur une courte période. À l'inverse, une méthode de capture conventionnelle nécessiterait la mise en place permanente des filets, ce qui n'est pas envisageable. Une comparaison entre les différentes espèces de rongeurs capturés et ceux recensés devrait également être réalisée, une fois que l'équipe chargée de leur capture aura fourni ses résultats.

En conclusion, malgré certaines limites qui peuvent encore être atténuées durant de prochaines études, l'ensemble des résultats soulignent clairement l'intérêt de recourir à l'ADNe pour un recensement de la faune de vertébré. Bien entendu, il n'est absolument pas démontré que le recensement à partir de l'ADNe peut être utilisé comme une méthode de remplacement, mais il convient de l'envisager comme le décrivent les études de Leempoel et al., (2020) et Van Leeuwen et Michaux, (2023), en tant qu'outil complémentaire aux techniques traditionnelles. Il a été possible d'établir la combinaison idéale pour cette étude. Cependant, il est avant tout nécessaire et primordial de choisir de façon judicieuse le type d'échantillon et un marqueur moléculaire adapté aux objectifs établis au préalable et au type d'espèces qui doivent être recensées. Mais grâce à cela, cette technique permettrait alors d'élargir le panel d'espèces détectées, notamment en identifiant des hôtes potentiels de zoonoses comme cela était recherché. Cela offre ainsi un bon moyen pour assurer un suivi efficace des maladies émergentes, tout en limitant au maximum le contact entre l'homme et l'animal.

9. Bibliographie

- Abrahms, B., 2021. Human-wildlife conflict under climate change. *Science* 373, 484–485. <https://doi.org/10.1126/science.abj4216>
- Accueil | BCOMING [WWW Document], n.d. URL <https://bcoming.eu/fr/> (accessed 6.10.25).
- Allen, M.C., Kwait, R., Vastano, A., Kisurin, A., Zoccolo, I., Jaffe, B.D., Angle, J.C., Maslo, B., Lockwood, J.L., 2023. Sampling environmental DNA from trees and soil to detect cryptic arboreal mammals. *Sci Rep* 13, 180. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27512-8>
- Andersen, K., Bird, K.L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K.H., Orlando, L., Gilbert, M.T.P., Willerslev, E., 2012. Meta-barcoding of “dirt” DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Mol Ecol* 21, 1966–1979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x>
- Banerjee, O., Cicowicz, M., Honeck, E.C., Muthukumara, M.S., Stapleton, K.A., 2025. Investing in forests Enhances ecosystem services and economic Growth in Cambodia: Evidence from the Integrated Economic-Environmental Modelling (IEEM) approach. *Ecosystem Services* 71, 101695. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2024.101695>
- Beng, K.C., Corlett, R.T., 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodivers Conserv* 29, 2089–2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Calvignac-Spencer, S., Leendertz, F.H., Gilbert, M.T.P., Schubert, G., 2013. An invertebrate stomach’s view on vertebrate ecology: certain invertebrates could be used as “vertebrate samplers” and deliver DNA-based information on many aspects of vertebrate ecology. *Bioessays* 35, 1004–1013. <https://doi.org/10.1002/bies.201300060>
- Cappelle, J., Hoem, T., Hul, V., Furey, N., Nguon, K., Prigent, S., Dupon, L., Ken, S., Neung, C., Hok, V., Pring, L., Lim, T., Bumrungsri, S., Duboz, R., Buchy, P., Ly, S., Duong, V., Tarantola, A., Binot, A., Dussart, P., 2020. Nipah virus circulation at human–bat interfaces, Cambodia. *Bull World Health Organ* 98, 539–547. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.254227>
- Chen, S., McFarlane, S.E., 2025. Reappraisal of the Dilution and Amplification Effect Framework: A Case Study in Lyme Disease. <https://doi.org/10.1101/2025.01.13.632839>
- Coissac, E., Riaz, T., Puillandre, N., 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology* 21, 1834–1847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x>
- Diggle, R., 2006. Feasibility for a Community-Based Wildlife Monitoring System for the Srepok Wilderness Area, Cambodia.
- Dong, X., Soong, L., 2021. Emerging and Re-emerging Zoonoses are Major and Global Challenges for Public Health. <https://doi.org/10.15212/ZOONOSES-2021-0001>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- eDNA & Biodiversity Monitoring Solutions by NatureMetrics [WWW Document], n.d. URL <https://www.naturemetrics.com> (accessed 6.10.25).
- FAO, 2020. Global Forest Resources Assessment 2020. FAO ;
- Feng, Y., Ziegler, A.D., Elsen, P.R., Liu, Y., He, X., Spracklen, D.V., Holden, J., Jiang, X., Zheng, C., Zeng, Z., 2021. Upward expansion and acceleration of forest clearance in the mountains of Southeast Asia. *Nat Sustain* 4, 892–899. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00738-y>

- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett* 4, 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Frommolt, K.-H., Tauchert, K.-H., 2014. Applying bioacoustic methods for long-term monitoring of a nocturnal wetland bird. *Ecological Informatics, Ecological Acoustics* 21, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2013.12.009>
- Galan, M., Pons, J.-B., Tournayre, O., Pierre, É., Leuchtmann, M., Pontier, D., Charbonnel, N., 2018. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources* 18, 474–489. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749>
- Garrett, N.R., Watkins, J., Francis, C.M., Simmons, N.B., Ivanova, N., Naaum, A., Briscoe, A., Drinkwater, R., Clare, E.L., 2023. Out of thin air: surveying tropical bat roosts through air sampling of eDNA. *PeerJ* 11, e14772. <https://doi.org/10.7717/peerj.14772>
- Glidden, C.K., Nova, N., Kain, M.P., Lagerstrom, K.M., Skinner, E.B., Mandle, L., Sokolow, S.H., Plowright, R.K., Dirzo, R., Leo, G.A.D., Mordecai, E.A., 2021. Human-mediated impacts on biodiversity and the consequences for zoonotic disease spillover. *Current Biology* 31, R1342–R1361. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.070>
- Gómez-Hernández, E.A., Moreno-Gómez, F.N., Bravo-Gaete, M., Córdova-Lepe, F., 2023. Concurrent dilution and amplification effects in an intraguild predation eco-epidemiological model. *Sci Rep* 13, 6425. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33345-2>
- Gray, T.N.E., Phan, C., Pin, C., Prum, S., 2012. Establishing a monitoring baseline for threatened large ungulates in eastern Cambodia. *Wildlife Biology* 18, 406–413. <https://doi.org/10.2981/11-107>
- Gray, T.N.E., Vidya, T.N.C., Potdar, S., Bharti, D.K., Sovanna, P., 2014. Population size estimation of an Asian elephant population in eastern Cambodia through non-invasive mark-recapture sampling. *Conserv Genet* 15, 803–810. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0579-y>
- Gregorič, M., Kutnjak, D., Bačnik, K., Gostinčar, C., Pecman, A., Ravnikar, M., Kuntner, M., 2022. Spider webs as eDNA samplers: Biodiversity assessment across the tree of life. *Molecular Ecology Resources* 22, 2534–2545. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13629>
- Ibbett, H., Keane, A., Dobson, A.D.M., Griffin, O., Travers, H., Milner-Gulland, E.J., 2021. Estimating hunting prevalence and reliance on wild meat in Cambodia’s Eastern Plains. *Oryx* 55, 878–888. <https://doi.org/10.1017/S0030605319001455>
- IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document], n.d. URL <https://www.iucnredlist.org/> (accessed 6.10.25).
- Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K.E., Mitchell, C.E., Myers, S.S., Bogich, T., Ostfeld, R.S., 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468, 647–652. <https://doi.org/10.1038/nature09575>
- Kelly, T.R., Karesh, W.B., Johnson, C.K., Gilardi, K.V.K., Anthony, S.J., Goldstein, T., Olson, S.H., Machalaba, C., Mazet, J.A.K., 2017. One Health proof of concept: Bringing a transdisciplinary approach to surveillance for zoonotic viruses at the human-wild animal interface. *Preventive Veterinary Medicine, Special Issue on 14th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics, Yucatan, Mexico 2015* 137, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.11.023>
- Kluser, S., Peduzzi, P., 2007. (PDF) Global Pollinator Decline: A Literature Review [WWW Document]. ResearchGate. URL https://www.researchgate.net/publication/239903454_Global_Pollinator_Decline_A_Literature_Review (accessed 3.13.25).

- Kocher, A., de Thoisy, B., Catzeflis, F., Valière, S., Bañuls, A.-L., Murienne, J., 2017. iDNA screening: Disease vectors as vertebrate samplers. *Mol Ecol* 26, 6478–6486. <https://doi.org/10.1111/mec.14362>
- Lahoz-Monfort, J.J., Magrath, M.J.L., 2021. A Comprehensive Overview of Technologies for Species and Habitat Monitoring and Conservation. *BioScience* 71, 1038–1062. <https://doi.org/10.1093/biosci/biab073>
- Leempoel, K., Hebert, T., Hadly, E.A., 2020. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287, 20192353. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2353>
- Lloyd, 2024. Asia heatwave: Ministry says Cambodia temperatures could reach 42 °C, as at least 30 die in Thailand from heat - Khmer Times. URL <https://www.khmertimeskh.com/501478750/asia-heatwave-ministry-says-cambodia-temperatures-could-reach-42-c-as-at-least-30-die-in-thailand-from-heat/> (accessed 6.15.25).
- Li, J., Seeber, P., Axtner, J., Crouthers, R., Groenenberg, M., Koehncke, A., Courtiol, A., Chanratana, P., Greenwood, A.D., 2023. Monitoring terrestrial wildlife by combining hybridization capture and metabarcoding data from waterhole environmental DNA. *Biological Conservation* 284, 110168. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.110168>
- Lo, M.Y., Ngan, W.Y., Tsun, S.M., Hsing, H.-L., Lau, K.T., Hung, H.P., Chan, S.L., Lai, Y.Y., Yao, Y., Pu, Y., Habimana, O., 2019. A Field Study Into Hong Kong's Wet Markets: Raised Questions Into the Hygienic Maintenance of Meat Contact Surfaces and the Dissemination of Microorganisms Associated With Nosocomial Infections. *Front Microbiol* 10, 2618. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02618>
- Lynggaard, C., Calvignac-Spencer, S., Chapman, C.A., Kalbitzer, U., Leendertz, F.H., Omeja, P.A., Opito, E.A., Sarkar, D., Bohmann, K., Gogarten, J.F., 2023. Vertebrate environmental DNA from leaf swabs. *Curr Biol* 33, R853–R854. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.06.031>
- Magouras, I., Brookes, V.J., Jori, F., Martin, A., Pfeiffer, D.U., Dürr, S., 2020. Emerging Zoonotic Diseases: Should We Rethink the Animal–Human Interface? *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.582743>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 17, 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Meyer, C.F.J., Struebig, M.J., Willig, M.R., 2016. Responses of Tropical Bats to Habitat Fragmentation, Logging, and Deforestation, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, Cham, pp. 63–103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_4
- Miller, R.S., Farnsworth, M.L., Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock–wildlife interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* 110, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.021>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0332-x>
- Naggs, F., 2017. Saving living diversity in the face of the unstoppable 6th mass extinction: A call for urgent international action. *The Journal of Population and Sustainability* 1, 67–81. <https://doi.org/10.3197/jps.2017.1.2.67>
- Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2001. Biodiversity and Disease Risk: the Case of Lyme Disease. *Conservation Biology* 14, 722–728. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99014.x>
- Panel (OHHLEP), O.H.H.-L.E., Adisasmito, W.B., Almuhairi, S., Behraves, C.B., Bilivogui, P., Bukachi, S.A., Casas, N., Becerra, N.C., Charron, D.F., Chaudhary, A., Zanella,

- J.R.C., Cunningham, A.A., Dar, O., Debnath, N., Dungu, B., Farag, E., Gao, G.F., Hayman, D.T.S., Khaitsa, M., Koopmans, M.P.G., Machalaba, C., Mackenzie, J.S., Markotter, W., Mettenleiter, T.C., Morand, S., Smolenskiy, V., Zhou, L., 2022. One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. *PLoS Pathogens* 18, e1010537. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010537>
- Raemy, M., Ursenbacher, S., 2018. Detection of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) by environmental DNA: is eDNA adequate for reptiles? <https://doi.org/10.1163/15685381-17000025>
- Ratti, V., Winter, J.M., Wallace, D.I., 2021. Dilution and amplification effects in Lyme disease: Modeling the effects of reservoir-incompetent hosts on *Borrelia burgdorferi* sensu stricto transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases* 12, 101724. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101724>
- Roberts, Holden, Furey, Kok, Sean, Oeung, Chantha, Chourn, Barca, Sinovas, 2025. Virachey National Park Biodiversity Survey Report, Cambodia 2024. Fauna & Flora. URL <https://www.fauna-flora.org/publications/virachey-national-park-biodiversity-survey-report-cambodia-2024/> (accessed 5.14.25).
- Rog, S., Sin, S., Sinova, P., Furey, N., 2023. (PDF) Mangrove Biodiversity Survey Report: Peam Krasop Wildlife Sanctuary & Koh Kapik Ramsar Site, Cambodia 2023 [WWW Document]. ResearchGate. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25681.54889>
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., Rahman, M.S., 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Rush, E.R., Dale, E., Aguirre, A.A., 2021. Illegal Wildlife Trade and Emerging Infectious Diseases: Pervasive Impacts to Species, Ecosystems and Human Health. *Animals* 11, 1821. <https://doi.org/10.3390/ani11061821>
- Santos, N., Rio-Maior, H., Nakamura, M., Roque, S., Brandão, R., Álvares, F., 2017. Characterization and minimization of the stress response to trapping in free-ranging wolves (*Canis lupus*): insights from physiology and behavior. *Stress* 20, 513–522. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1368487>
- Shrestha, Y., Lapeyre, R., 2018. Modern Wildlife Monitoring Technologies: Conservationists versus Communities? A Case Study: The Terai-Arc Landscape, Nepal. *Conservation and Society* 16, 91. https://doi.org/10.4103/cs.cs_16_83
- Sponsel, L.E., 2013. Human Impact on Biodiversity, Overview, in: *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, pp. 395–409. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00152-8>
- Srun Ty, Net Yav, Sothearen Thi, Hong, L., Men, M., 2014. Conservation Ecology of Giant Ibis in Western Siem Pang IBA. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1636.4881>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol* 21, 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Teixeira, D., Maron, M., van Rensburg, B.J., 2019. Bioacoustic monitoring of animal vocal behavior for conservation. *Conservation Science and Practice* 1, e72. <https://doi.org/10.1111/csp2.72>
- Van Leeuwen, P., Michaux, J., 2023. Using eDNA for mammal inventories still needs naturalist expertise, a meta-analysis. *Ecol Evol* 13, e10788. <https://doi.org/10.1002/ece3.10788>
- Waetjen, D.P., Shilling, F.M., 2017. Large Extent Volunteer Roadkill and Wildlife Observation Systems as Sources of Reliable Data. *Front. Ecol. Evol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00089>
- Wang, L.-F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., 2006. Review of Bats and SARS. *Emerg Infect Dis* 12, 1834–1840. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060401>

- Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., Cooper, A., 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300, 791–795. <https://doi.org/10.1126/science.1084114>
- Williams, P.C., Bartlett, A.W., Howard-Jones, A., McMullan, B., Khatami, A., Britton, P.N., Marais, B.J., 2021. Impact of climate change and biodiversity collapse on the global emergence and spread of infectious diseases. *Journal of Paediatrics and Child Health* 57, 1811–1818. <https://doi.org/10.1111/jpc.15681>
- Wood, C.L., Lafferty, K.D., DeLeo, G., Young, H.S., Hudson, P.J., Kuris, A.M., 2014. Does biodiversity protect humans against infectious disease? *Ecology* 95, 817–832. <https://doi.org/10.1890/13-1041.1>
- Yang, C., Li, Q., Wang, X., Cui, A., Chen, J., Liu, H., Ma, W., Dong, X., Shi, T., Meng, F., Yan, X., Ding, K., Wu, G., 2023. Human Expansion-Induced Biodiversity Crisis over Asia from 2000 to 2020. *Research* 6, 0226. <https://doi.org/10.34133/research.0226>
- Zwerts, J.A., Stephenson, P.J., Maisels, F., Rowcliffe, M., Astaras, C., Jansen, P.A., van der Waarde, J., Sterck, L.E.H.M., Verweij, P.A., Bruce, T., Brittain, S., van Kuijk, M., 2019. Methods for wildlife monitoring in tropical forests: Comparing human observations, camera traps, and passive acoustic sensors. *Conservation Science and Practice* 3, e568. <https://doi.org/10.1111/csp2.568>

10. Annexe

Annexe 1. Echantillonnage dans la province de Stung Treng en 2024

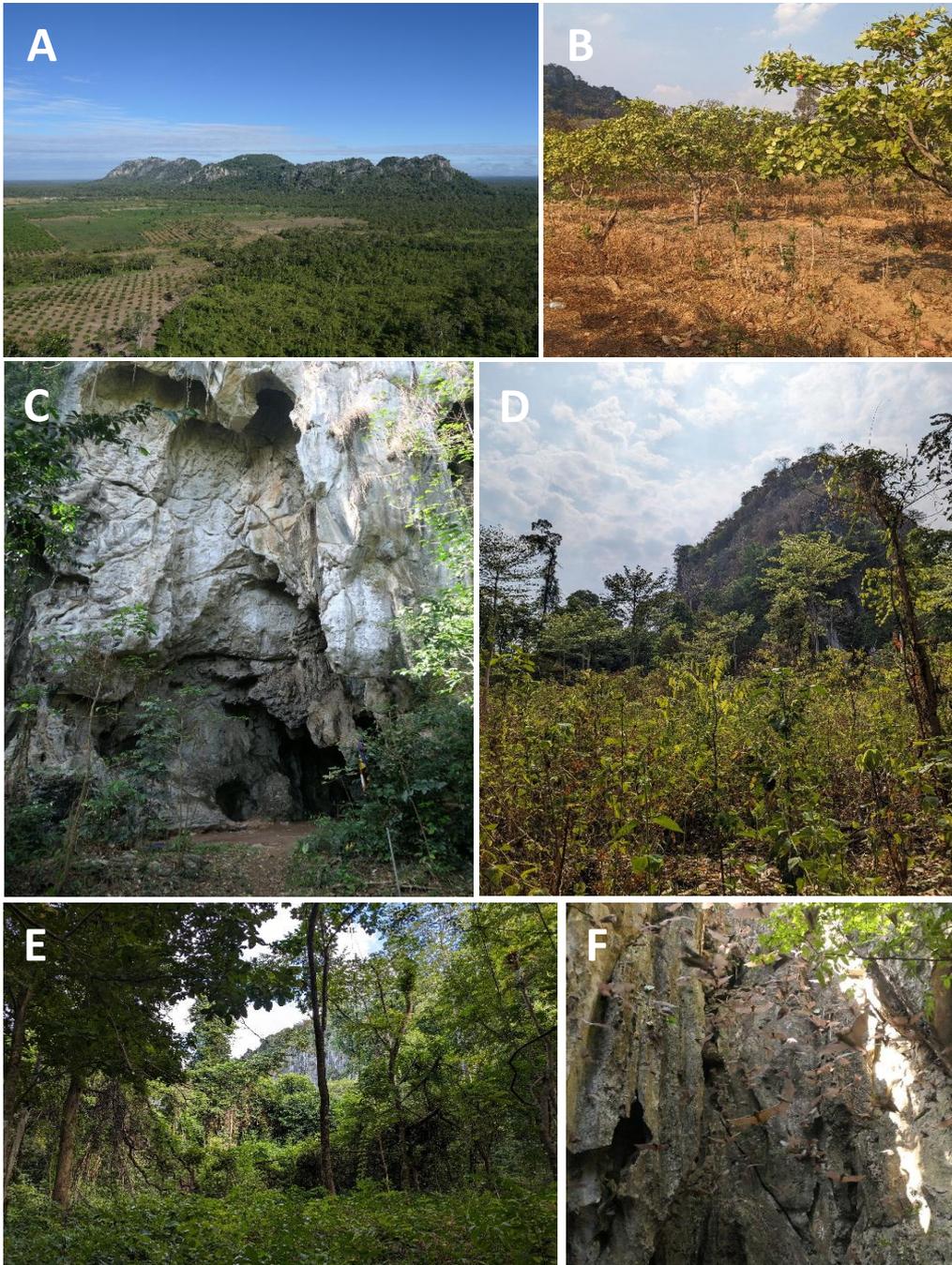


Figure 9 (Annexe 1). Zones échantillonnées dans la province de Stung Treng en 2024. Les trois zones échantillonnées étaient respectivement Ka Ngoark (A, B), Chnngauk (C, D) et Chab Pleurng (E, F). Ces zones étaient constituées des collines karstiques (A, D) qui abritent des réseaux de grottes (C) où vivent des chauves-souris nectarivores ou insectivores (F). Les trois zones étaient boisées (E) et entourées de zones agricoles notamment de pommier-cajou (B). (Photos prises par Pauline Van Leeuwen, 2024)

Tableau 5 (Annexe 1). (A) Liste des espèces de Chiroptères capturées en parallèle au cours de la mission réalisée dans la province de Stung Treng (Avril-Mai 2024). Les différentes espèces ont été capturées à l'aide de filets japonais. (B) Nombre d'échantillons collectés sur le terrain au cours de la même mission et d'échantillons qui ont pu être amplifiés en laboratoire. Les marqueurs ciblés sont ceux visés en fonction des différentes matrices. L'eau et les échantillons de sol n'ont été amplifiés qu'à partir du marqueur 12S.

A

Espèces de Chiroptères
<i>Cynopterus sphinx</i>
<i>Eonycteris spelaea</i>
<i>Hipposideros armiger</i>
<i>Hipposideros cineraceus</i>
<i>Hipposideros diadema</i>
<i>Hipposideros galeritus</i>
<i>Hipposideros gentilis</i>
<i>Hipposideros larvatus</i>
<i>Hypsugo dolichodon</i>
<i>Lyroderma lyra</i>
<i>Megaderma spasma</i>
<i>Pipistrellus coromandra</i>
<i>Rhinolophus acuminatus</i>
<i>Rhinolophus chaseni</i>
<i>Rhinolophus malayanus</i>
<i>Rhinolophus marshalli</i>
<i>Rhinolophus microglobosus</i>
<i>Rhinolophus pusillus</i>
<i>Rhinolophus shameli</i>
<i>Taphozous melanopogon</i>

B

Matrice d'ADNe	Marqueurs ciblés	Nombre d'échantillons collectés (sur le terrain)	Nombre d'échantillons amplifiés (avant tri)
Feuilles	12S, Bat, Galan	56	54
Air	12S, Bat, Galan	54	48
Ecouvillonnages accessoires	12S, Bat, Galan	9	9
Toiles d'araignées	12S, Bat, Galan	7	7
Poils	12S, Bat, Galan	17	17
Eau	12S	2	2
Sol en profondeur	12S	18	7
Sol en surface	12S	18	3

Annexe 2. Prélèvement d'ADNe sur des feuilles et dans le sol



Figure 10 (Annexe 2). Collecte d'ADNe à partir de l'écouvillonnage de feuilles (A) et du prélèvement de terre, réalisé en utilisant une seringue coupée au bout pour obtenir des carottes de terre (B). Photos prises durant la mission autour de la ville de Battambang (site de Banan) en mai 2025.

Annexe 3. Protocole de l'« aquatic kit » / Prélèvement d'eau

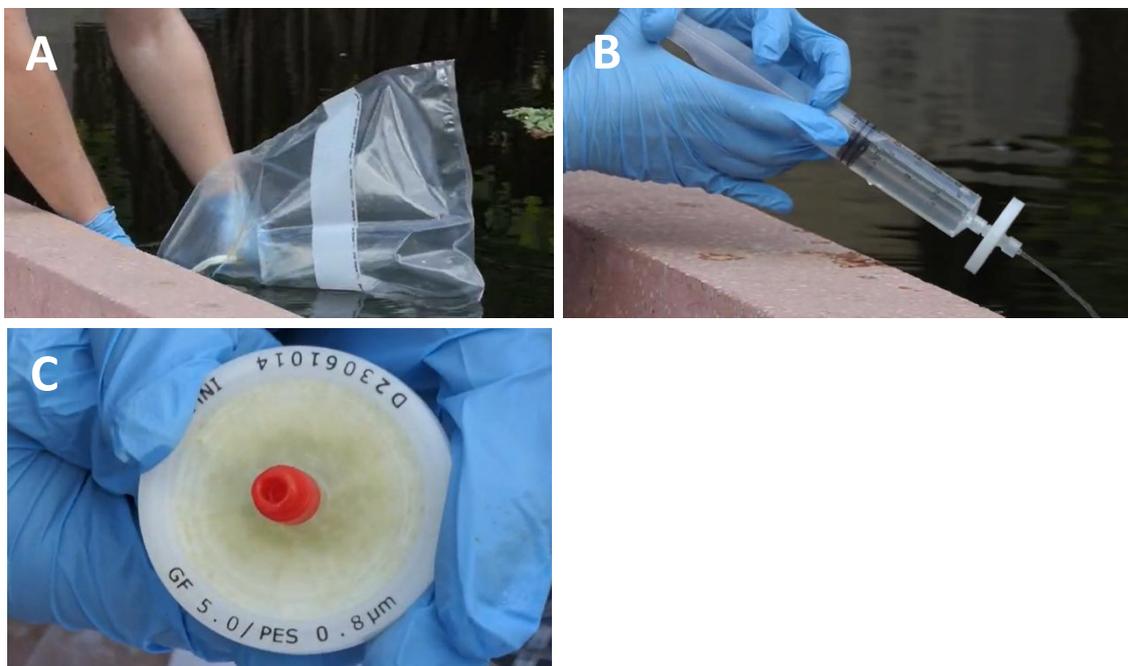


Figure 11 (Annexe 3). Utilisation d'un kit aquatique fourni par Nature Metrics (UK) pour collecter l'ADN présent dans l'eau. De l'eau est prélevée à différents endroits à partir du sac fourni dans kit (A) avant d'être filtrée autant que possible à partir d'une seringue associée à un filtre à seringue (limite de 0,8 μm) (B). Lorsqu'il n'est plus possible de pousser le piston, un produit de conservation est introduit dans le filtre avant de le conserver (C). Photos issues d'une vidéo tournée sur le site PLIA à Phnom Penh.

Annexe 4. Préparation et mise en place des pièges à poils



Figure 13 (Annexe 4). Utilisation de pièges à poils comme méthode de collecte d'ADNe. Les pièges sont formés d'un tube en PVC (de deux tailles différentes) dans lequel s'insère une languette de scotch double-face (A et B). Des appâts (ici de la nourriture pour poisson carnassier) à insérer dans le piège sont préalablement préparés (Figure C et D). Les pièges sont ensuite placés sur la zone d'échantillonnage (E et F), et un ruban rouge est placé pour retrouver le piège (E)

Annexe 5. Liste des emplacements échantillonnés durant les missions de terrain en 2025

Tableau 6 (Annexe 5). Liste des emplacements échantillonnés au cours des trois missions réalisées entre février et mai 2025 au Cambodge.

Province	Site	Acronyme	Latitude	Longitude
Phnom Penh	RUPP	RUPP1	11.56692548	104.88950671
		RUPP1.5	11.56772227	104.89128680
		RUPP2	11.568308	104.892519
		RUPP3	11.566925489	104.88950671
	RUA	RUA1	11.513698461	104.90253975
		RUA2	11.514831	104.902369
		RUA3	11.515025	104.902000
		RUA4	11.514265450	104.90350323
	PLIA	PLIA1	11.641236	104.919689
		PLIA2	11.642504725	104.91970615
		PLIA3	11.639862	104.919581
	NW	NW1	11.559827746	104.78460060
		NW2	11.557683002	104.78293157
NW3		11.557277057	104.78276720	
Stung Treng	Otalas	OT1	13.851944	105.759444
		OT2	13.852500	105.760000
		OT3	13.851944	105.760000
	Chum Reas	CR1	13.843750	105.735167
		CR2	13.843750	105.735167
		CR3	13.843750	105.735167
		CR4	13.843750	105.735167
	Trapeang Prich	TP1	13.827307	105.748027
		TP1.5	13.827222	105.746944
		TP2	13.827778	105.747778
Battambang	Phnom Sampov	PS1	13.022380	103.099284
		PS1.5	13.022380	103.099284
		PS2	13.021704	103.098363
		PS3	13.022424	103.098480
		PS4	13.024580	103.100061
	Banan	BAN1	12.955932	103.095286
		BAN1.5	12.955971	103.095472
		BAN2	12.955909	103.095107
		BAN3	12.955950	103.093829
		BAN4	12.949625	103.136263
		BAN5	12.949407	103.135742
		BAN6	12.949955	103.138789
	Ta Kream	BAN7	12.950626	103.142960
		TK1	13.075143	103.041633
		TK2	13.074906	103.043762
		TK3	13.070811	103.042321
		TK4	13.070743	103.042639
	TK5	13.074753	103.041536	

Annexe 6. Répartition des espèces détectées de façon précise selon leur classe taxonomique

Tableau 7 (Annexe 6). Liste des espèces identifiées par classe taxonomique à partir des échantillonnages réalisés au cours de la mission à Strung Treng en 2024. Les données compilées tiennent compte de tous les types d'échantillons collectés ainsi que de l'ensemble des marqueurs génétiques utilisés.

Aves (Oiseaux)	Mammalia (Mammifères)	Amphibia (Amphibiens)	Reptilia (Reptiles)	Actinopterygii (Poissons)
<i>Accipiter badius</i>	<i>Bandicota indica</i>	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	<i>Chrysopelea ornata</i>	<i>Cirrhinus microlepis</i>
<i>Aegithina tiphia</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Fejervarya limnocharis</i>	<i>Eutropis multifasciata</i>	<i>Cyprinus carpio</i>
<i>Ardea cinerea</i>	<i>Bubalus bubalis</i>	<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>	<i>Gekko gekko</i>	<i>Henicorhynchus lobatus</i>
<i>Cairina moschata</i>	<i>Callosciurus finlaysonii</i>	<i>Hylarana nigrovittata</i>	<i>Lycodon subcinctus</i>	<i>Henicorhynchus siamensis</i>
<i>Caprimulgus macrurus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Microhyla berdmorei</i>		
<i>Centropus sinensis</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Microhyla heymonsi</i>		
<i>Chrysophlegma flavinucha</i>	<i>Cynopterus brachyotis</i>	<i>Microhyla pulchra</i>		
<i>Cyornis magnirostris</i>	<i>Cynopterus sphynx</i>	<i>Polypedates megacephalus</i>		
<i>Dicrurus hottentottus</i>	<i>Eonycteris spelaea</i>			
<i>Dicrurus leucophaeus</i>	<i>Felis catus</i>			
<i>Dicrurus paradiseus</i>	<i>Herpestes javanicus</i>			
<i>Dinopium javanense</i>	<i>Hipposideros armiger</i>			
<i>Ducula aenea</i>	<i>Hipposideros diadema</i>			
<i>Francolinus pintadeanus</i>	<i>Hipposideros galeritus</i>			
<i>Fulica atra</i>	<i>Hystrix brachyura</i>			
<i>Gallus gallus</i>	<i>Lyroderma lyra</i>			
<i>Garrulax leucolophus</i>	<i>Macaca fascicularis</i>			
<i>Garrulus glandarius</i>	<i>Maxomys surifer</i>			
<i>Geopelia striata</i>	<i>Menetes berdmorei</i>			
<i>Glaucidium cuculoides</i>	<i>Mus cervicolor</i>			
<i>Gracula religiosa</i>	<i>Rattus norvegicus</i>			
<i>Hirundo rustica</i>	<i>Rattus rattus</i>			
<i>Hypothymis azurea</i>	<i>Rhinolophus malayanus</i>			
<i>Lonchura punctulata</i>	<i>Rhinolophus shameli</i>			
<i>Lonchura striata</i>	<i>Rhinolophus stheno</i>			
<i>Macronus gularis</i>	<i>Rousettus amplexicaudatus</i>			
<i>Merops orientalis</i>	<i>Sus scrofa</i>			
<i>Microrhynchus niger</i>	<i>Taphozous melanopogon</i>			
<i>Mixornis gularis</i>	<i>Tupaia belangeri</i>			
<i>Muscicapa latirostris</i>				
<i>Myophonus caeruleus</i>				
<i>Nycticorax nycticorax</i>				
<i>Oriolus chinensis</i>				
<i>Otus lettia</i>				
<i>Phalacrocorax carbo</i>				
<i>Pitta nympha</i>				
<i>Psittacula alexandri</i>				
<i>Psittacula roseata</i>				
<i>Pycnonotus aurigaster</i>				
<i>Pycnonotus blanfordi</i>				
<i>Pycnonotus melanicterus</i>				
<i>Spilopelia chinensis</i>				
<i>Spilornis cheela</i>				
<i>Streptopelia tranquebarica</i>				
<i>Strix leptogrammica</i>				
<i>Treron curvirostra</i>				