THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Ecologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Portée par

Unité de recherche Centre de Biologie pour la Gestion des Populations

Structure et fonctionnement des colonies de Grand rhinolophe en Poitou-Charentes

Présentée par Orianne TOURNAYRE
Le 13 décembre 2019

Sous la direction de Nathalie CHARBONNEL et Dominique PONTIER

Devant le jury composé de

M. Philippe CHRISTE, Associate Professor, Université de Lausanne	Rapporteur
M. Stéphane BOYER, Professeur des universités, Université de Tours	Rapporteur
Mme. Karen MCCOY, Directrice de recherche CNRS, IRD	Présidente du Jury
M. Erwan QUEMERE, Chargé de recherche INRA, CEFS	Examinateur
Mme. Dominique PONTIER, Professeur des universités, Université Claude-Bernard Lyon	Directrice de thèse
Mme. Nathalie CHARBONNEL, Directrice de recherche INRA, CBGP	Directrice de thèse
M. Maxime LEUCHTMANN, Chargé d'étude Patrimoine Naturel, Nature-Environnement 17	Membre invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Montpellier SupAgro

Remerciements

Cette thèse a été financée par une allocation doctorale du LabEx CeMEB, merci de m'avoir accordé cette opportunité.

Mille merci à Nathalie Charbonnel et Dominique Pontier mes deux directrices de thèse. Ces trois années auront été autant instructives qu'agréables. Un bel exemple de femmes scientifiques très inspirantes ! Et un grand merci supplémentaire à Nathalie qui m'a également encadré en M2, je te suis profondément reconnaissante de tout ce que tu as fait pour et avec moi !

Je tiens à remercier Karen McCoy, Philippe Christe, Stéphane Boyer et Erwan Quéméré d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse. Merci également à Aurélien Besnard pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux. Un grand merci à Carine Brouat, Eric Petit, Raphael Leblois, Annelise Tran et Maxime Leuchtmann d'avoir fait partie de mes comités de thèse. Merci beaucoup à David Pinaud pour ses conseils et toute son aide. Merci également à tous ceux qui ont participé à cet immense travail de terrain en France: Labex ECOFECT, Poitou-Charentes Nature (Deux-Sèvres Nature-Environnement, Nature-Environnement 17, la LPO France, Charente Nature et Vienne Nature), CREN Poitou-Charentes, Groupe Chiroptères des Pays-de-la-Loire, Groupe Chiroptères Aquitaine, Groupe Chiroptères du Groupe Mammalogique et Herpétologique du Limousin, Chauves-Souris Auvergne, Groupe Chiroptères de Provence, Groupe Mammalogique Normand, Amikiro, Coordination Mammalogique du Nord de la France, et à l'international : Ivana Budinksi, Simon Engelberger, Sébastien Puechmaille, Fabio Bontadina, Roberto Toffoli, Fiona Mathews. Merci également à la plateforme GenSeq.

Je remercie plus particulièrement Maxime Leuchtmann, Jean-Baptiste Pons, Ondine Filippi-Codaccioni, Jeanne Duhayer, Alice Cheron, Emilien Jomat, Stéphanie Péault, Anthony Le Nozahic, Jérémy Dechartre, Yoann Prioul, Matthieu Dorfiac, Naïs Aubouin, et Virginie Barret. Vous m'avez tout de suite intégré à votre grande famille et vous m'avez appris tant de choses, toujours dans une ambiance super agréable, vraiment merci du fond du cœur ! Je n'aurais pas pu mieux tomber pour découvrir le monde des chauves-souris. Un merci supplémentaire à Maxime qui m'a accueilli lors de mes venues. Et puis merci à toutes les personnes rencontrées

lors des comptages, des captures et des rencontres annuelles du projet, ce fut toujours très enrichissant.

Concernant le CBGP j'ai été on ne peut mieux entourée, c'est un laboratoire qui concentre des personnes brillantes, très accessibles et toujours agréables. Anne Loiseau et Maxime Galan qui m'ont tout appris sur la biologie moléculaire, vous avez été des « profs » plus que parfaits... Je suis vraiment très heureuse d'avoir travaillé et passé ces trois années avec vous, merci merci merci !!

Merci également à Sylvain Piry (ou devrais-je dire Bob?), Raphael Leblois et Karine Berthier pour tout le temps que vous m'avez accordé et pour tout ce que vous m'avez appris, je vous en suis très reconnaissante. Merci Marine Trillat, devenue une pro de la pipette lors de son stage de M2, c'était vraiment super de travailler avec toi. Et puis merci à toute l'équipe ex « rongeur », devenue « petits mammifères » avec l'arrivée des chauve-souris, votre bienveillance a été sans faille.

J'en profite d'ailleurs pour remercier mes encadrants de stages de master, qui m'ont mis sur la voie de la recherche. Carine Brouat, Nathalie Charbonnel et Christophe Diagne pour le stage de M2, Karen McCoy et Anaïs Appelgren pour mon stage de M1. Vous êtes sincèrement des personnes incroyables, merci d'avoir toujours veillé sur moi par la suite.

Une pensée pour les (ex)thésards et (ex)post-doc du labo avec qui j'ai passé de très beaux moments : Laure Olazcuaga, Mélodie Ollivier, Robin Guilhot, Pierre Arnal, Christophe Diagne, Julie Collet, Vincent Lesieur, Valentin Hivert, Antoine Rombaut, Ghais Zriki, Allan Debelle, Romain Gallet, Sarah Madrières, Vitor Pavinato, Timothée Virgoulay, Pauline Farigoule, Simon Roy. Un merci plus spécial à Maeva Miranda. Merci à l'équipe des nageurs et surtout Philippe Augier. Et puis merci à tous les autres pour ces trois belles années, la liste est longue !

Une pensée également pour mes amis, copains et belle-famille qui auront suivi cette aventure de près ou de loin, et puis évidemment à ma famille et Lucas.

Bonne lecture !

Table des matières

INTRODUCTION 20

1. La biodiversité et l'Homme 21

2. Tendances démographiques des populations et facteurs intrinsèques 25

2.1. Une combinaison de processus démographiques et génétiques 25

2.2. Applications en biologie de la conservation 28

3. L'importance des conditions environnementales dans la viabilité des populations 31

3.1. Les ressources alimentaires : un enjeu majeur en conservation 32

4. L'apport de la biologie moléculaire à la biologie de la conservation 37

5. Les chiroptères : un taxon menacé peu connu 40

5.1. Un taxon particulièrement sensible 40

5.2. Un taxon méconnu et difficile à étudier 46

6. Le Grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*) 49

7. Objectifs de la thèse 55

CHAPITRE I. Diversité et structure génétique du Grand rhinolophe 59

1. Contexte et objectif 60

2. Méthodologie 63

2.1. Echantillonnage 63

2.2. Biologie moléculaire 65

2.3. Diversité génétique 66

2.4. Structure génétique 67

2.5. Histoire démographique 68

3. Principaux résultats 71

3.1. Diversité génétique, consanguinité et apparentements 71

3.1. Différenciation génétique entre colonies 72

3.3. Histoire démographique 73

4. Discussion 75

Article 1. Integrating population genetics to define conservation units from the core to the edge of *Rhinolophus ferrumequinum* western range 79

Article 2. Génétique des populations et biologie de la conservation du Grand rhinolophe ... 99

CHAPITRE II. Mise au point et optimisation d'une approche de metabarcoding pour l'étude du régime alimentaire de chauve-souris insectivores : identification simultanée des proies et du prédateur 111

1. Contexte et objectif du chapitre 112

2. Identification simultanée des espèces de chauve-souris françaises et de leurs proies 118

2.1. Méthodologie 118

2.2. Validation par l'utilisation de communautés artificielles 120

2.3. Application de la méthode à des échantillons de guano 121

2.4. Principaux résultats 123

2.4.1. Une méthode sensible et résolutive 123

2.4.2. Identification simultanée de 16 espèces de chauves-souris et 290 espèces d'arthropodes 123

2.5. Discussion 126

Article 3. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis 129

Article 4. Qui mange quoi ? Zoom sur l'ADN des chauves-souris et de leurs proies contenues dans le guano 147

3. Optimisation de la méthode pour des colonies mixtes de Grand rhinolophe / Murin à oreilles échancrées 164

3.1. Méthodologie 166

3.1.1. Choix des amorces 166

3.1.2. Analyse in silico 168

3.1.3. Analyse in vitro sur les communautés artificielles d'arthropodes 168

3.1.4. Analyse in vitro sur les prélèvements de guano 169
3.2. Principaux résultats 169
3.2.1. Analyse in silico 169
3.2.2. Analyse in vivo sur les communautés artificielles d'arthropodes 172
3.2.3. Analyse in vivo sur les prélèvements de guano 174
3.3. Discussion 177
Article 5. *In silico* and empirical evaluation of twelve COI & 16S metabarcoding primer sets for insectivorous diet analyses 179
CHAPITRE III. Variation spatio-temporelle du régime alimentaire du Grand rhinolophe en Poitou-Charentes 226
Article 6. Spatio-temporal variation of the greater horseshoe bat diet in Western France . 227
1. Introduction 228
1.1. Régime alimentaire et biologie de la conservation 228
1.2. Le régime alimentaire, un élément clé pour les chauves-souris 229
1.3. Le Grand rhinolophe : un généraliste sélectif 232
1.4. Objectifs et hypothèses 234
2. Matériel et méthodes 235
2.1. Echantillonnage 235
2.2. Caractérisation paysagère des colonies 236
2.3. Analyses moléculaires, bio-informatiques et pré-traitement des données 237
2.4. Identification moléculaire et description des proies du Grand rhinolophe 238
2.4.1. Diversité taxonomique des proies détectées 238
2.4.2. Nombre de proies par guano 238
2.4.3. Validation de la stratégie d'échantillonnage 239
2.4.4. Relation nombre de séquences - occurrences 239
2.4.5. Analyses de la diversité alpha et beta du régime alimentaire 239

3. Résultats 241
3.1. Caractérisation paysagère des colonies 241
3.2. Pré-traitements des données de séquençage 243
3.2.1. Filtrage des données 243
3.2.2. Filtrage des taxons des prédateurs 243
3.3. Identification moléculaire et description des proies du Grand rhinolophe 245
3.3.1. Diversité taxonomique des proies détectées 245
3.3.2. Nombre de proies par guano 248
3.3.3. Validation de la stratégie d'échantillonnage 250
3.3.4. Relation nombre de séquences - occurrences 253
3.3.5. Diversité alpha 255
3.3.6. Diversité beta 258
4. Discussion 262
4.1. Une diversité taxonomique de proies inattendue 262
4.2. Vers une image plus précise du régime alimentaire du Grand rhinolophe 264
4.3. Effet du paysage et de la date d'échantillonnage sur le régime alimentaire 265
5. Perspectives de recherche 270
6. Implications en termes de conservation 273
7. Conclusion 274
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 291
1. Bilan des principaux résultats obtenus 292
2. La génétique des populations en biologie de la conservation : une approche nécessaire mais pas suffisante 295
2.1. Les limites de la génétique des populations pour comprendre le fonctionnement des populations 295
2.1.a. Limites liées aux marqueurs microsatellites 295

2.1.b. Difficultés d'estimation de la taille des populations et des mouvements individuels 297

2.2. Les suivis individuels, approches complémentaires et indispensables à la génétique des populations 301

2.3. Application à l'étude des colonies en limites d'aires de répartition 302

3. Déclin, pression de sélection et génomique de l'adaptation pour la conservation 304

4. Le régime alimentaire, un trait écologique complexe 308

4.1. Mieux décrire la plasticité du régime alimentaire 308

4.2. Comparer la plasticité du régime alimentaire des chiroptères généralistes et spécialistes 310

4.3. Développer les approches (semi) expérimentales pour les études de régime alimentaire 313

5. Conclusion générale 315

Annexe 6. Résultats des analyses en éléments traces métalliques (ETM) dans les poils de Grand rhinolophe en Poitou-Charentes. 317

Annexe 7. Analyse spatio-temporelle du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*). 319

BIBLIOGRAPHIE 369

Résumé/Abstract 400

Liste des figures

Figure 1. Nombre d'articles scientifiques annuels relatifs à la biodiversité entre 1987 et 2018 (recherche sur Web Of Science avec le mot clés « *biodiversity* » le 27/06/19)..... 21
Figure 2. La biologie de la conservation : un champ de recherche multidisciplinaire..... 24
Figure 3. Spirale d'extinction d'après Gilpin et Soulé 1986. La stochasticité environnementale correspond à des fluctuations aléatoires du milieu (biotiques et/ou abiotiques) qui causent des variations des taux de mortalité et/ou natalité : par exemple l'arrivée d'un pathogène virulent dans la population ou un évènement climatique extrême (ex : hiver sévère, sécheresse). La stochasticité démographique représente la variation individuelle aléatoire du taux de survie et de reproduction. La valeur sélective est un concept central en biologie évolutive : elle décrit la capacité d'un individu à survivre et se reproduire dans un environnement donné à un temps *t*. 27
Figure 4. Schéma illustratif de l'influence de la proportion d'immigrants par génération (m) sur la divergence adaptative des populations. La ligne en pointillé représente une population dans un habitat hétérogène. La ligne continue représente une population dans un habitat homogène. La « capacité K » représente la capacité d'accueil du milieu, c'est-à-dire l'ensemble des ressources environnementales disponible (ex : ressource alimentaires, nichoir, abris …). Cette représentation n'est pas quantitative : les formes réelles des courbes sont inconnues, ainsi que leurs hauteur et position relatives le long de l'axe des x. D'après Garant, Forde, et Hendry (2007)..... 31
Figure 5. Hypothèse du match/mismatch. (a) Un match (concordance) élevé correspond à un chevauchement temporel important du prédateur et de la proie. (b) Effet du changement climatique sur la synchronisation des pics de prédateur et de proie. Le match correspond à la synchronie entre le pic d'abondance de chenilles (proie de la mésange) et la période d'élevage des jeunes. Le mismatch correspond à un décalage entre ces deux évènements, entrainant une baisse des ressources alimentaires pendant une période très énergivore pour ces oiseaux. Figure extraite de Durant et al. (2007)..... 35
Figure 6. Pourcentages des plans de conservation - aux Etats-Unis (USA), en Australie et en Europe - qui incluent des données génétiques (I = included), qui incluent la collecte de données génétiques (T = Task assigned), les deux (IT = I + T) ou qui n'inclue aucune des données génétiques analysées (N = none specified). Figure extraite de Pierson et al. 2016. Les données

génétiques analysées sont de gauche à droite : la variation génétique au sein des populations (diversité génétique), la structure génétique (différenciation génétique entre les populations), les flux de gènes entre les populations et la taille efficace des populations. 39
Figure 7. Quotient de longévité (LQ= longévité observée/longévité attendue) en fonction de la masse de 779 espèces de mammifères. La ligne en pointillé indique un LQ = 1 c'est-à-dire une longévité observée et attendue égale. Les espèces de chauves-souris sont indiquées en bleu, les autres espèces de mammifères en orange. Cette figure est extraite de Foley et al. 2019. 41
Figure 8. Illustration de la diversité morphologique de trente espèces de chauves-souris dans le monde. © Merlin Tuttle's Bat Conservation. 43
Figure 9. Cycle de vie des chauve-souris. Cette figure est issue de la Déclinaison régionale du Plan d'Actions en faveurs des Chiroptères en Poitou-Charentes (Septembre 2013). 45
Figure 10. Récapitulatif des conventions et lois protégeant les chauves-souris au niveau national, européen et international. 47
Figure 11. Colonie de Grand rhinolophes sous un toit en Charente-Maritime. © M. Leuchtmann 49
Figure 12. Distribution (en orange) du Grand rhinolophe dans le monde. Carte issue de l'IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2016. 50
Figure 13. Carte de répartition du Grand rhinolophe en France issue du poster Chiroptères de l'annexe II de la Directive Habitat-Faune-Flore - Synthèse actualisée des populations en France - Bilan 2014 (Stéphane VINCENT - SFEPM) 52
Figure 14. Baisse significative des effectifs de Grand rhinolophe en Poitou-Charentes d'après les comptages hivernaux réalisé chaque année dans la région. Figure réalisée par Poitou-Charentes Nature (2015). 54
Figure 15. Schématisation de l'hypothèse du déplacement de deux individus de Grand rhinolophes issus respectivement des colonies A et B pour se reproduire. Dans le premier paysage (de type bocage) les deux individus se servent de points de repères pour se déplacer (arbres) et peuvent se rencontrer pour se reproduire. Dans le second paysage (de type plaine agricole), les individus ne détectent pas de points de repères pour se déplacer et se reproduisent donc dans leurs colonies respectives. Si les individus de différentes colonies ne peuvent plus se rencontrer et se reproduire à cause de ces barrières, alors chaque colonie va constituer sa propre population, plus petite que la population initiale. Or la taille de la

population est un facteur primordial de la viabilité d'une population car plus elle diminue, plus le risque d'extinction augmente, notamment du fait des conséquences génétiques et démographiques (Frankham 1996; Gilpin et Soulé 1986). 61
Figure 16. Carte des colonies échantillonnées pour l'étude. L'aire de répartition du Grand rhinolophe est représentée en gris (IUCN, 2016). Chaque colonie est nommée par un code : Bryanston (BRY), Buckfastleigh (BUC), Montreuil-sur-mer (MON), Kernascleden (KER), Lys-Haut-Layon (LYS), Allonne (ALL), Le Busseau (BUS), Le Pin (PIN), La Chapelle-Saint-Etienne (CHE), Xaintray (XAI), Airvault (AIR), Saint-Loup-sur-Thouet (LOU), Faye l'Abesse (FAY), Fenioux (FEN), Lessac (LES), Annepont (ANN), Sarran (SAR), Vignols (VIG), Aydat (AYD), Langeac (LAN), Lacanau (LAC), Argelouse (ARG), Arles (ARL), Bedous (BED), Lezate (LEZ), GHA. Les symboles (croix, carré, triangle, losange) indiquent le pays d'échantillonnage. 64
Figure 17. Photographies illustrant de gauche à droite : un « harp-trap » disposé en sortie de gîte (©N. Charbonnel), la mesure du 5ème doigt (D5) du Grand rhinolophe (© LPO49) et le prélèvement de patagium pour les analyses de génétique (© LPO49). Les deux dernières photos sont issues du rapport d'activité 2019 du programme Grand rhinolophe (Leuchtmann et al. 2019)..... 65
Figure 18. Estimation de la diversité génétique (indice d'hétérozygotie H_e) dans chaque colonie échantillonnée. L'aire de distribution du Grand rhinolophe d'après les données de l'UICN (2016) est représentée en gris. 71
Figure 19. Graphe représentant la probabilité d'appartenance d'un individu à un groupe génétique (logiciel STRUCTURE). Chaque barre verticale correspond à un individu et chaque couleur correspond à un groupe génétique. Les individus sont triés par colonies et une barre blanche en pointillé sépare les différentes colonies..... 74
Figure 20. Retour sur l'hypothèse initiale de l'étude. Contrairement à nos attentes, malgré une courte distance de détection cette espèce pourrait effectuer des trajets dans des milieux ouverts pour aller se reproduire (absence de structure génétique du Pays Basque espagnol au Nord de la France). 77
Figure 21. Photographie de fragments d'arthropodes (A, B, C, D) dans des fèces de chauve-souris (Figure issue de Clare et al. 2009)..... 113
Figure 22. Schéma du fonctionnement de l'approche en Two-step PCR. PCR1 : hybridation des amorces gène-spécifiques et de l'amplicon. Chaque amorce est constituée d'une séquence gène-spécifique (en bleu) en 3' qui permet l'hybridation à l'ADN cible, et d'une extrémité

universelle overhang (en vert) en 5'. A la fin de la PCR1, chaque amplicon possède à ses extrémités les séquences des amorces de séquençage Illumina (en vert) qui sont (1) utilisées comme linkers à la PCR2 et (2) utilisées comme site d'hybridation des amorces de séquençage lors du run MiSeq. PCR2 : hybridation des amorces d'indexage et de l'amplicon. La partie en 3' de chaque amorce (en vert) permet l'hybridation aux produits PCR1. A la fin de la PCR2, les amplicons possèdent à leurs extrémités les séquences des adaptateurs P5 et P7 Illumina (en orange), les index de multiplexage (en rouge) et les séquences complémentaires aux amorces de séquençage Illumina (en vert). D'après Galan et al. 2018. 119
Figure 23. Schéma récapitulatif des cinq étapes principales du protocole de traitement des échantillons dans le cas d'une communauté artificielle composée de six taxa d'arthropode. 121
Figure 24. Prélèvement de fèces sur un Grand rhinolophe en main. ©N. Charbonnel 122
Figure 25. Représentation hiérarchique de la diversité taxonomique d'arthropodes contenue dans les 216 échantillons de 16 espèces chauves-souris. Les différents cercles représentent les rangs taxonomiques (de l'ordre au centre à l'espèce en périphérie). La largeur attribuée à chaque taxon est proportionnelle au nombre d'occurrences détectées. 125
Figure 26. Appartenance taxonomique (ordre) des 63 espèces de nuisibles identifiées. 126
Figure 27. Histogramme indiquant la proportion et l'assignation taxonomique des séquences observées dans les fèces de chaque espèce de chauve-souris. « Autres » correspond aux séquences susceptibles d'appartenir à des organismes issus de contaminations environnementales, proies secondaires ou parasites. 165
Figure 28. Représentation visuelle de la longueur et de la position des couples d'amorces sur le gène COI. Les amorces sont représentées par une flèche colorée, chaque couleur représentant un couple d'amorces unique. Pour chaque couple d'amorces, le nombre sur la ligne grise indique la longueur de l'amplicon. La position de chaque amorce est indiquée par une barre verticale de sa couleur respective. 167
Figure 29. Évaluation in silico des ordres d'arthropodes représentés par au moins 100 UTO utilisant PrimerMiner. A) Les performances des ensembles d'amorces sont indiquées pour chaque ordre à l'aide de graphiques en camembert, les couleurs verte et rouge représentant respectivement le succès et l'échec de l'amplification. Le succès de l'amplification correspond au score de pénalité moyen de PrimerMiner < 120 et à l'échec de l'amplification à un score de pénalité moyen> = 120. La couleur grise indique une absence d'analyse lorsque l'ordre

d’arthropode était pas représenté par assez d’OTUs (<100 OTUs). B) Pourcentage du niveau de dégénérescence de chaque couple d’amorces. 171
Figure 30. Représentation graphique du nombre de reads des trois réplicats techniques de la communauté artificielle sans ADN de chauve-souris, pour chaque ordre d'arthropodes (N = 33) avec les couples d'amorces MG2 et Lep1. La ligne horizontale bleue indique le nombre attendu de reads. Chaque point représente une réplicat technique. Les barres verticales jaunes indiquent les cas où seulement un ou deux réplicat sur trois sont amplifiées. Les barres verticales rouges indiquent les situations où aucun des réplicats n'est amplifié. 173
Figure 31. Photographie de Murin à oreilles échancrées (à gauche) et de Grand rhinolophe (à gauche). © L-M Préau. 174
Figure 32. Occurrences des ordres d’arthropodes détectés dans des échantillons de guano pour chaque couple d'amorces et pour quatre combinaisons de couples d'amorces. Les lignes en pointillés séparent les couples d’amorces des combinaisons. N est le nombre d'échantillons de guano identifiés pour chaque espèce de chauve-souris. Les lignes verticales indiquent 50% des occurrences (55 occurrences pour les échantillons de M. emarginatus et 48 pour les échantillons de R. ferrumequinum). 176
Figure 33. Echantillonnage des guanos sous une colonie (à gauche ; ©J. Dechartre) et cartographie des sept colonies échantillonnées en Poitou-Charentes (à droite ; IGN BD ORTHO 2016). 236
Figure 34. Analyse en composantes principales des données paysagères (surface en hectares) entourant les colonies. Représentation des colonies (haut-gauche), des variables paysagères (haut-droite) et du graphe des valeurs propres (bas-gauche) qui indique le pourcentage de variance expliquée par chaque axe de l’ACP. 242
Figure 35. Identification des espèces de prédateurs dont proviennent les 1985 guanos individuels. 244
Figure 36. Représentation hiérarchique de la diversité taxonomique contenue dans les guanos du Grand rhinolophe, toutes colonies et mois d’échantillonnage confondus. Les différents cercles représentent les rangs taxonomiques (de l’espèce vers l’extérieur à la classe au centre). La largeur attribuée à chaque taxon est proportionnelle au pourcentage d’occurrences détectées. 246
Figure 37. Proportion de chaque ordre d’insecte parmi les ravageurs identifiés. 247

Figure 38. Nombre de proies par guano pour chaque colonie à chaque mois d'échantillonnage (Juin, Juillet, Aout 2018). Chaque point représente un guano. 249
Figure 39. Courbes d'accumulation représentant les proies détectés dans le régime alimentaire de *R. ferrumequinum* par ré-échantillonnage aléatoire de guano dans le jeu de données. A) Rang taxonomique de l'ordre, colonie d'Allonne, B) rang taxonomique de l'ordre, colonie de Beaumont, C) rang taxonomique de la famille, colonie de Xaintray et D) rang taxonomique du genre, colonie de Beaumont. La largeur du violon indique la densité de probabilité que le sous-échantillon contienne le nombre de proies affiché en ordonnée. Le point rouge correspond à la moyenne du nombre de taxons issus des tirages. 252
Figure 40. Fréquence moyenne de reads en fonction de l'occurrence des proies pour les deux rangs taxonomiques les plus éloignés : à l'ordre (haut) et à l'espèce (bas). 254
Figure 41. Variation de la diversité alpha à l'espèce pour q = 0 dans le jeu de données complet (haut) et dans le jeu de données réduit (bas) en fonction de la colonie (ALL, ANN, BEA, LES, SGE, XAI) et du mois d'échantillonnage (6 = Juin, 7 = Juillet, 8 = Août). Les barres horizontales indiquent les paires de colonie-date dont la diversité alpha est significativement différente (Test de Kruskall-Wallis et test post-hoc de Dunn corrigé pour les tests multiples d'après Benjamini-Hochberg ; seuil de significativité corrigé d'après Bonferroni : 0.0029). Les points et barres verticales associées correspondent à la moyenne et écart-type de chaque colonie - mois. 257
Figure 42. Pourcentage d'occurrence des proies pour chacune des six colonies (ALL, ANN, BEA, LES, SGE, XAI) à chaque pas temporel (6 = Juin, 7 = Juillet, 8 = Août), A) au rang taxonomique de l'ordre avec le jeu de données complet et B) au rang taxonomique de l'espèce avec le jeu de données réduit. 259
Figure 43. Représentation de la dissimilarité de Bray-Curtis en deux dimensions (NMDS) au range taxonomique de l'espèce : A) entre les six colonies avec le jeu de données complet (le barycentre d'ALL est recouvert par celui de LES), B) entre mois d'échantillonnage avec le jeu de données complet, C) entre colonies avec le jeu de données réduit aux espèces les occurrentes (fréquence > 5% ; le barycentre d'ALL est recouvert par celui de LES), D) entre mois d'échantillonnage avec le jeu de données réduit aux espèces les occurrentes (fréquence > 5%). 261
Figure 44. Guide de choix du couple d'amorces pour des analyses de régime alimentaire de chauve-souris insectivores. 294

Liste des tables

Tableau 1. Avantages et contraintes des différentes méthodes utilisées dans cette étude pour déterminer la structure génétique des colonies de Grand rhinolophe. 69

Tableau 2. Identification de l'espèce de prédateur des 1985 échantillons. GR= Grand rhinolophe, MOE = Murin à oreilles échancrées, GM = Grand murin, SN = Sérotine de Nilson, ORR=Oreillard roux, MD = Murin de Daubenton, MB = Murin de Bechstein, HIR= Hirondelle, R = Rongeur, MULT = Mélange de plusieurs espèces de rongeurs ou d'oiseaux, CHL = Verdier d'Europe, PAD = Moineau domestique, GAL = *Gallus sp.*, ANS = *Anser sp*. Les valeurs en gras indiquent les effectifs de Grand rhinolophe par colonie et par mois d'échantillonnage. 275

Tableau 3. Résultats des GLMS testant l'effet des variables paysagères (Axe 1 et 2 de l'ACP-1) et du mois d'échantillonnage (Juin, Juillet, Août) sur la valeur de diversité alpha pour q = 0 et q = 1 à chaque niveau taxonomique : ordre, famille, genre et espèce. Les p-values en gras correspondent aux p-values significatives après correction pour test multiples FDR. A) Sur le jeu de données complet, B) sur le jeu de données réduit (proies dont la fréquence est > 5%). 278

Tableau 4. Valeur de diversité beta *β* obtenues pour chaque rang taxonomique avec le jeu de données réduit. 280

Tableau S1. Concentration en Eléments Traces Métalliques (ETMs) dans les poils des Grands rhinolophes des 10 colonies échantillonnées. 318

Tableau S2. Comparaison des concentrations en Eléments Traces Métalliques (ETMs) dans les poils de chauves-souris dans la bibliographie avec notre étude. 318

Liste des encadrés

Encadré 1. Qu'est-ce que la Trame Verte et Bleue ? Cette politique publique initiée en 2007 vise à réduire la fragmentation des habitats semi-naturels et naturels (subdivision des habitats en îlots isolés) et à mieux prendre en compte la biodiversité dans l'aménagement du territoire. Le but est de préserver et restaurer un réseau de continuités écologiques constitué de réservoirs de biodiversité et corridors écologiques qui permettent de circuler entre les réservoirs. Elle est mise en œuvre à trois échelles : nationale (document cadre fixant les objectifs et lignes directrices), régionale (Schémas régionaux de cohérence écologique identifiant les continuités écologiques et prévoyant les mesures) et locale (projet et documents d'urbanisme des communes intègrent ces enjeux). 29
Encadré 2. Projet régional « Grand rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique de la population » (2016-2019), acteurs, objectifs et actions. Aquarelle du Grand rhinolophe : ©O. Filippi-Codaccioni 53
Encadré 3. Qu'est-ce qu'un marqueur microsatellite ? 66
Encadré 4. Principe de la coalescence. 70
Encadré 5. Méthode d'analyses pour la comparaison d'amorces en metabarcoding. 116

Liste des annexes

Annexe 1. Liste des espèces de ravageurs identifiées (base de données Arthemis, extraction le 04/10/19). Les espèces dont la fréquence est supérieure à 5% sont indiquées en gras. 281

Annexe 2. Diversité alpha moyenne par colonie – mois d'échantillonnage (6 = Juin, 7 = Juillet, 8 =Août) pour le jeu de données complet et le jeu de données réduit. Les valeurs indiquées en vert correspondent aux valeurs maximales par rang taxonomique et valeur de q, et les valeurs en rouge correspondent aux valeurs minimales par rang taxonomique et valeur de q. 285

Annexe 3. Résultats A) des analyses de permANOVA et B) d'analyse d'homogénéité de la variance par permutation (999 permutations), basé sur la dissimilarité de Bray-Curtis pour chaque rang taxonomique testé. Les p-values en gras correspondent aux p-values significatives après correction pour test multiples FDR. Ces analyses ont été réalisées sur le jeu de données complet et sur le jeu de données réduit (espèces dont la fréquence est > 5%) 286

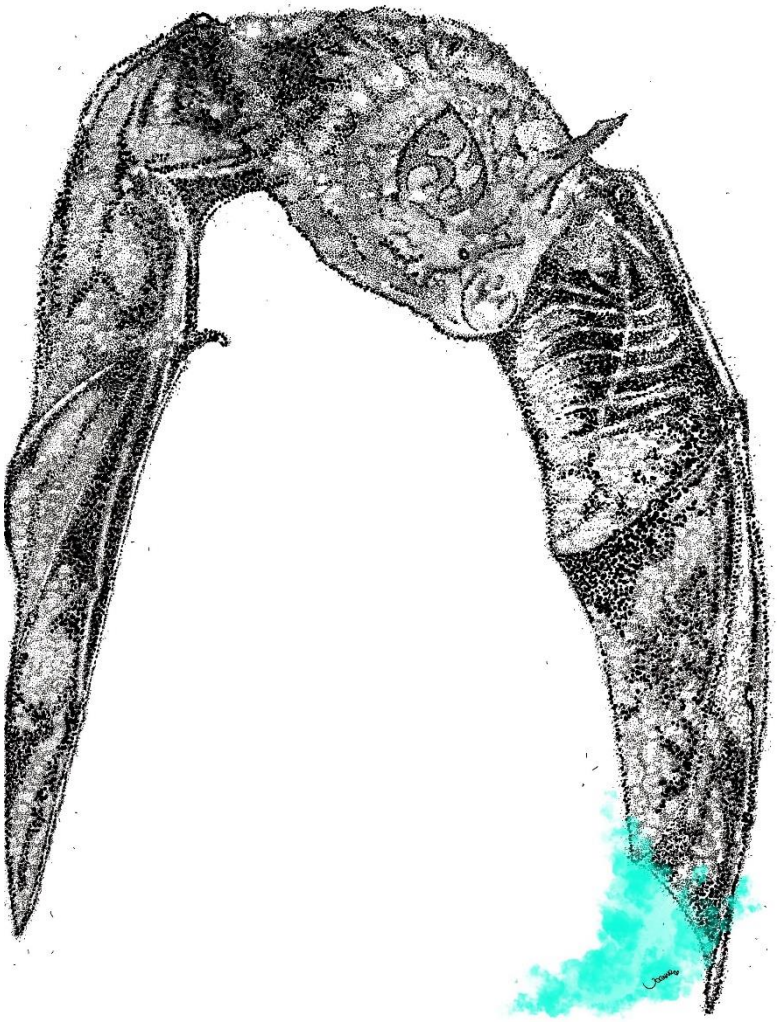
Annexe 4. Résultats des tests de Mantel réalisé entre la matrice de distances paysagères et la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis. Les p-values en gras indiquent une significativité après correction multiple (FDR). 288

Annexe 5. Indice de condition corporelle des femelles adultes non gestantes dans les cinq colonies où ont eu lieu une capture de Grand rhinolophe durant l'été 2018. L'indice de condition corporelle correspond au ratio de la masse sur la longueur de l'avant-bras. 289

Annexe 6. Résultats des analyses en éléments traces métalliques (ETM) dans les poils de Grand rhinolophe en Poitou-Charentes. 317

Annexe 7. Analyse spatio-temporelle du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*). 319

INTRODUCTION



1. La biodiversité et l'Homme

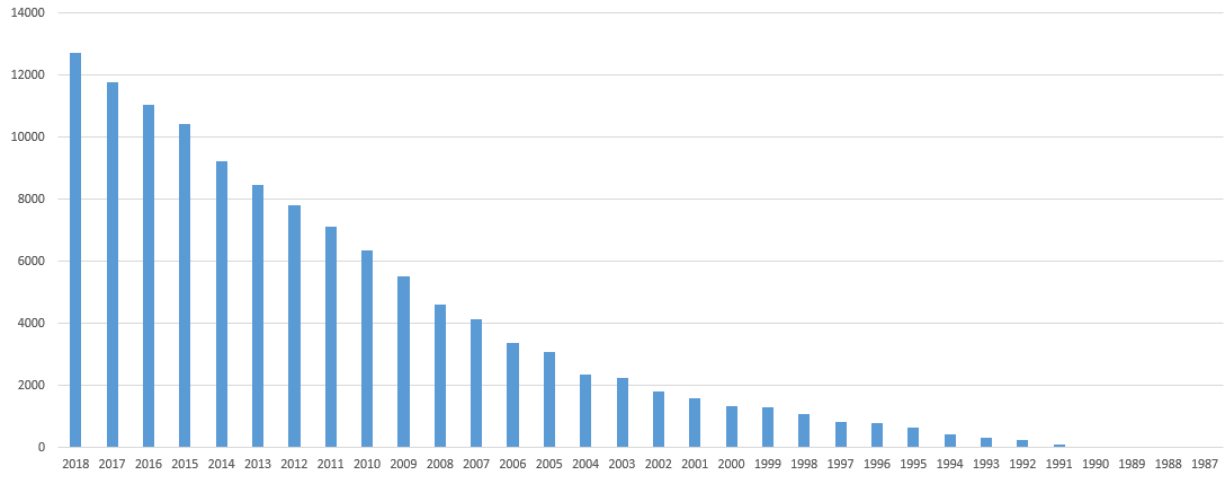


Figure 1. Nombre d'articles scientifiques annuels relatifs à la biodiversité entre 1987 et 2018 (recherche sur Web Of Science avec le mot clés « *biodiversity* » le 27/06/19).

L'étude de la biodiversité est en plein essor depuis les années 2000 (Figure 1), mais c'est en 1992 lors du sommet de la Terre à Rio de Janeiro que le concept de biodiversité a été popularisé. La biodiversité y a été définie comme la « variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes » (article 2 de la Convention sur la diversité biologique, 1992). Elle est composée de trois niveaux principaux : la diversité intra spécifique (génétique), inter spécifique (espèces) et écosystémique. Il n'existe pas de mesure englobant ces trois niveaux et la biodiversité est le plus généralement décrite par la richesse spécifique, c'est-à-dire le nombre d'espèces dans un milieu donné (Dirzo et Raven 2003). Notre connaissance de la biodiversité reste cependant incomplète avec seulement 1,2 millions d'espèces identifiées, alors que les estimations suggèrent que la Terre

abrite entre 7 et 10 millions d'espèces eucaryotes (i.e. Animaux, plantes, champignons, …) (Mora et al. 2011). Or, la biodiversité est aujourd'hui fortement menacée (Butchart et al. 2010). D'après la dernière édition de la Liste rouge mondiale (version 2019.1), 27 159 espèces sur les 98 512 étudiées sont menacées d'extinction, dont 40% des amphibiens, 14% des oiseaux, 25% des mammifères et 21% des arthropodes. L'extinction des espèces est un phénomène naturel et grâce aux fossiles il a pu être décrit cinq extinctions massives (jusqu'à -90% des espèces) entre -444 et -65 millions d'années (Raup et Sepkoski 1982). Or depuis 200 ans nous assistons à une explosion démographique de l'espèce humaine qui a engendré une accélération de l'extinction des espèces à un tel point que la biodiversité fait face à sa sixième grande crise d'extinction (Caro et al. 2012; Avise, Hubbell, et Ayala 2008; Ceballos et al. 2015; Johnson et al. 2017). La révolution industrielle au XIXème siècle est en effet souvent considérée comme une période clé de cette crise car elle constitue un changement drastique des moyens de produire et de consommer et est caractérisée par une augmentation brutale de la pression anthropique sur les écosystèmes naturels (Sanderson et al. 2002). La population mondiale a connu une croissance sans précédent, passant d'un milliard à plus de sept milliards d'individus en 200 ans (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2019). L'augmentation de la population humaine a engendré un besoin croissant de ressources et donc une modification profonde de son environnement (Foley et al. 2005; Steffen et al. 2006). Parmi les pressions anthropiques principales comme la surexploitation des ressources, la pollution et l'introduction d'espèces invasives, la transformation du paysage (ex : agriculture, urbanisation, déforestation) est considérée comme la première cause de la perte de la biodiversité (Lande 1998; Pereira, Navarro, et Martins 2012; Millenium Ecosystem Assessment 2005). La transformation du paysage a pour conséquence la dégradation et la destruction de l'habitat ce qui entraine une modification de la distribution, de la composition,

et de l'abondance des espèces. Ce phénomène est d'une ampleur mondiale puisque d'après le rapport de la Plateforme intergouvernementale sur la biodiversité et les services écosystémiques ('IPBES' en anglais), 75% de la surface de la planète a été modifiée par les activités humaines en 2019. Par exemple, entre 2000 et 2010, dans les régions tropicales il y a eu une perte nette de superficie forestière de sept millions d'hectares par an et un gain net de superficie des terres agricoles de six millions d'hectares par an (FAO 2016). La perte d'habitat liée au développement de l'agriculture concerne environ 80% des espèces menacées d'oiseaux et de mammifères terrestres (Tilman et al. 2017). La transformation du paysage a non seulement un effet local (ex : diminution de la richesse spécifique terrestre ; Newbold et al. 2015), mais également global puisque les nouvelles pratiques agricoles et industrielles ont contribué à la modification des cycles biogéochimiques - du carbone et de l'azote principalement - entrainant une hausse des gaz à effet de serre en partie à l'origine du réchauffement climatique (Canadell et al. 2007; Galloway et al. 1995; Lashof et Ahuja 1990). Ces pertes de biodiversité à différentes échelles pourraient mettre en péril le bon fonctionnement des écosystèmes actuels mais également affecter durablement les services rendus à l'Homme. En effet, à cause de la dégradation et de la perte de biodiversité engendrée par les activités humaines, 60% des services écosystémiques (bénéfices que l'être humain peut obtenir de la nature sans avoir à agir) sont menacés (Millenium Ecosystem Assessment 2005).

Face à la perte de la biodiversité, un champ de recherche multidisciplinaire s'est développé dans les années 1980 : la biologie de la conservation (Figure 2) (Soulé 1985).

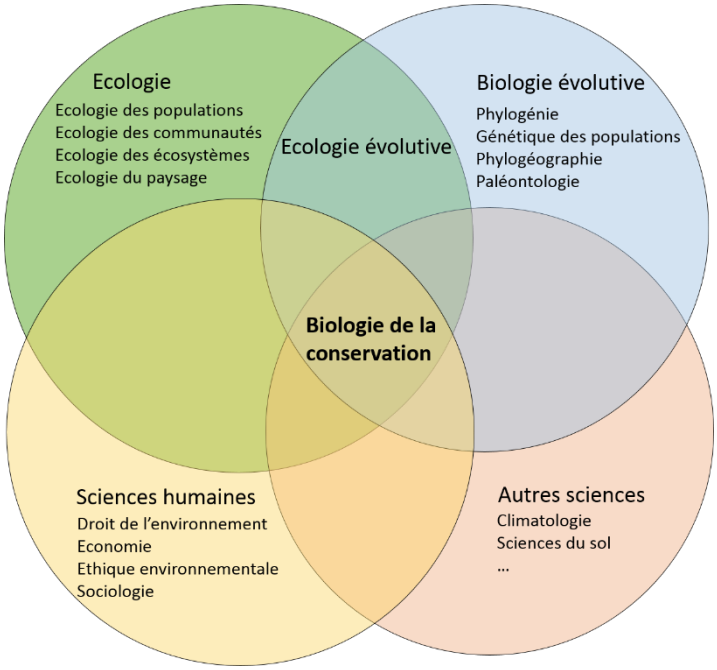


Figure 2. La biologie de la conservation : un champ de recherche multidisciplinaire.

La biologie de la conservation vise à identifier les populations vulnérables, déterminer les causes de cette vulnérabilité et proposer des moyens pour y remédier. La biologie de la conservation a d'abord été guidée par une philosophie spirituelle, puis une philosophie utilitaire basée sur la gestion des ressources et leur utilisation optimale, et à partir des années 2000 elle s'est orientée vers l'écologie évolutive (Callicott 1990; Kinnison et Hairston 2007; Lankau et al. 2011; Stockwell, Hendry, et Kinnison 2003). Dans cette perspective, l'objectif est d'identifier les menaces (ex : anthropiques, changement climatique) qui pèsent sur les populations et comprendre les adaptations et réponses des populations à ces pressions de sélection pour proposer des solutions de gestion adaptées.

2. Tendances démographiques des populations et facteurs intrinsèques

2.1. Une combinaison de processus démographiques et génétiques

Ces menaces peuvent causer l'extinction directe des espèces par une diminution du nombre des populations et leurs effectifs. Un paramètre fondamental pour les biologistes de la conservation et les gestionnaires est donc la tendance démographique des populations (Beissinger et Westphal 1998). En effet, savoir si une population croît ou diminue dans le temps est important pour mettre en place des mesures de gestion adaptées : une augmentation des populations d'une espèce introduite est un signe d'invasion tandis qu'une diminution des populations d'une espèce endémique annonce une espèce potentiellement menacée. La variation de la taille des populations (augmentation, régression, stabilité) dans le temps est appelée « dynamique des populations ». Plusieurs paramètres démographiques (survie, fécondité, émigration et immigration) influencent cette dynamique : les taux d'immigration et de natalité augmentent la taille de la population et les taux d'émigration et de mortalité la diminuent. Ces paramètres sont influencés par différents facteurs abiotiques (ex : température ; Marini et al. 2017; Townsend et al. 2016) et biotiques (ex : compétition interspécifique, Marini et al. 2017), dont la taille de la population elle-même (phénomène de densité dépendance). Classiquement, les tendances démographiques sont déterminées par un suivi temporel et spatial des individus capturés puis marqués (Lettink et Armstrong 2003), ce qui donne des informations démographiques précises telles que l'âge de première reproduction, le succès reproducteur, la mortalité et la dispersion (Mace et Waller 1998; Cuthbert et al. 2003). Ces informations sont précieuses pour comprendre la dynamique d'une population. Des analyses démographiques ont par exemple montré un diminution de

62% des effectifs de la population d'Eléphant de forêt d'Afrique (*Loxodonta cyclotis*) en moins de dix ans (Maisels et al. 2013) à cause du commerce de l'ivoire. Ces éléphants ont un faible taux de croissance dû à un taux de mortalité élevé, or les éléphants sont des animaux longévifs à faible taux de reproduction (un jeune tous les trois ans) et à maturité sexuelle très tardive (20 ans pour les femelles), ce qui ne permet pas aux populations de se rétablir (Turkalo, Wrege, et Wittemyer 2017). Ces études montrent que même si le braconnage était totalement éradiqué, il faudrait un peu moins d'un siècle pour que les éléphants de forêt retrouvent leur niveau de population de 2002. Ces nouveaux éléments ont ainsi permis un durcissement des restrictions sur le commerce de l'ivoire lors de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées (CITES) en 2016.

Cependant, pour comprendre les menaces pesant sur une population il faut aussi prendre en compte les processus évolutifs car ceux-ci sont étroitement liés aux processus démographiques (Pelletier, Garant, et Hendry 2009; Olivieri et al. 2016). Un paramètre clé pour la persistance d'une population est sa taille, car plus la taille d'une population diminue, plus la population est vulnérable aux menaces stochastiques (environnementales et démographiques) et donc plus le risque d'extinction augmente (Figure 3; Frankham 1996; Gilpin et Soulé 1986). Cela signifie qu'il n'est pas suffisant de se baser sur la dynamique de la taille d'une population pour déterminer sa viabilité, il faut également étudier sa diversité génétique et les phénomènes associés (ex : dérive, appariements) (Garner, Rachlow, et Hicks 2005; Santamaría et Méndez 2012; Brodersen et Seehausen 2014). Une perte de diversité génétique engendre une baisse, voire une disparition, du potentiel adaptatif nécessaire pour faire face aux changements globaux (Frankham 2005; Gonzalez Andrew et al. 2013). Elle implique aussi un risque plus élevé pour les nouveau-nés de recevoir des allèles récessifs délétères et ce risque est d'autant plus élevé lorsque la taille de la population est tellement

réduite que les individus ne peuvent se reproduire qu'entre apparentés (consanguinité). Cela peut engendrer une baisse de fécondité ou/et une augmentation de la mortalité des juvéniles (Keller et Waller 2002) qui entretient la spirale d'extinction (Figure 3).

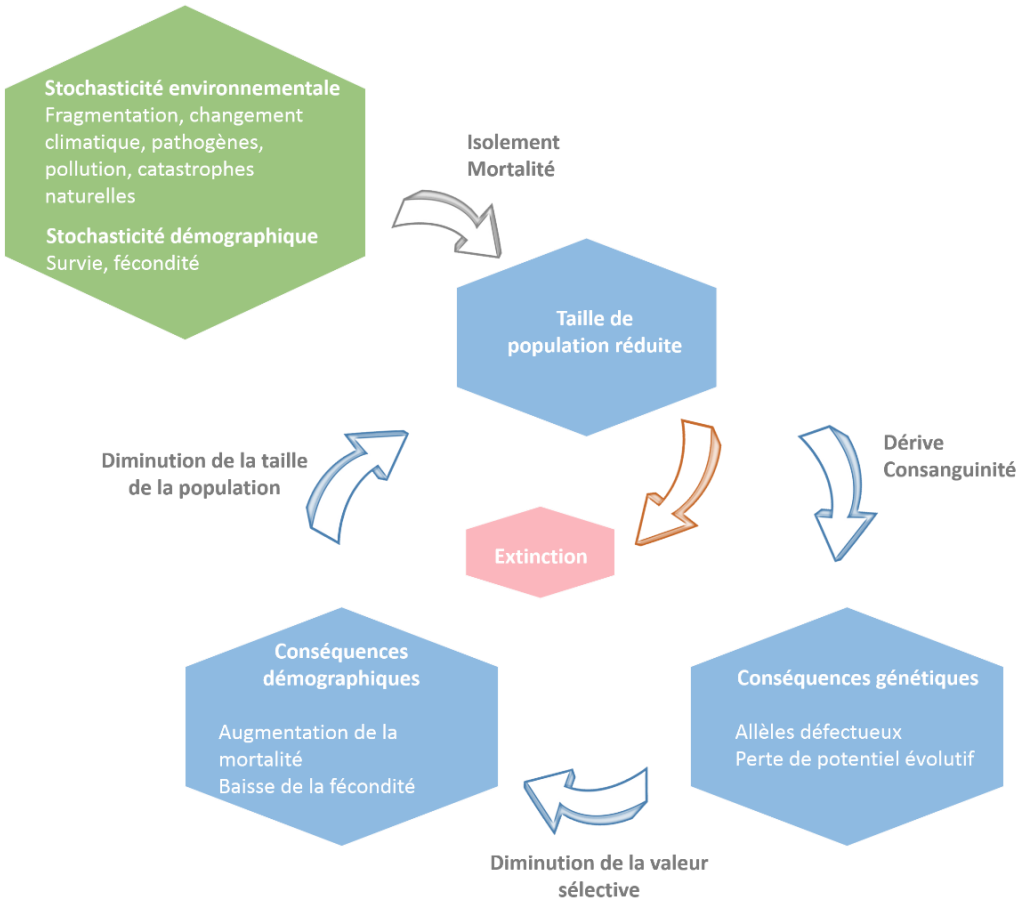


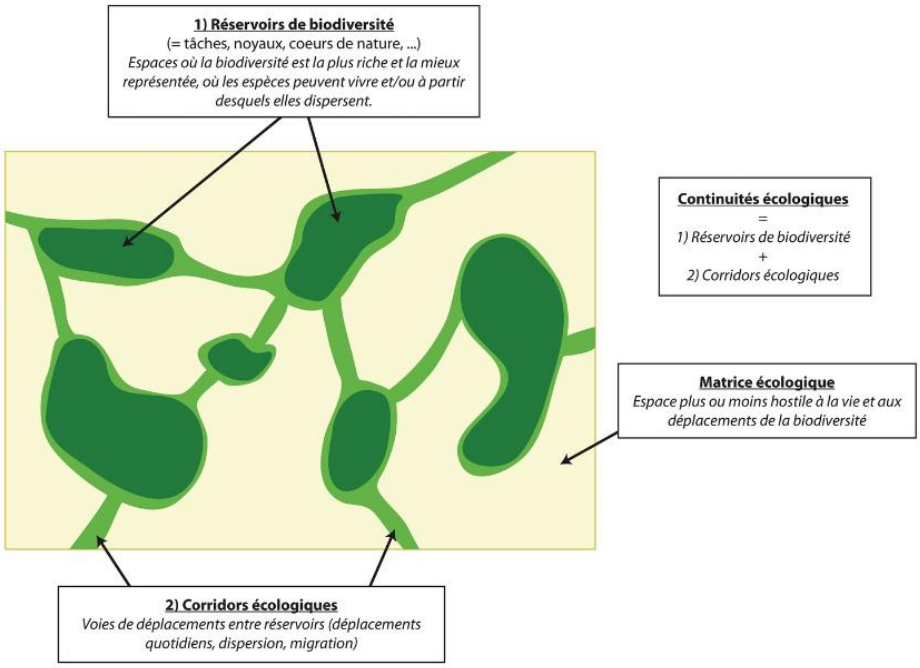
Figure 3. Spirale d'extinction d'après Gilpin et Soulé 1986. La stochasticité environnementale correspond à des fluctuations aléatoires du milieu (biotiques et/ou abiotiques) qui causent des variations des taux de mortalité et/ou natalité : par exemple l'arrivée d'un pathogène virulent dans la population ou un évènement climatique extrême (ex : hiver sévère, sécheresse). La stochasticité démographique représente la variation individuelle aléatoire du taux de survie et de reproduction. La valeur sélective est un concept central en biologie évolutive : elle décrit la capacité d'un individu à survivre et se reproduire dans un environnement donné à un temps *t*.

2.2. Applications en biologie de la conservation

Augmenter la diversité génétique d'une population vulnérable peut permettre d'éviter ces conséquences néfastes. Deux mécanismes permettent une augmentation de la diversité génétique : la mutation et les flux de gènes. Les flux de gènes, lorsqu'ils sont générés par la dispersion efficace des individus (déplacement uni-directionnel d'un point A à un point B où l'individu va s'installer et se reproduire), permettent la compensation démographique et génétique des déclins dans certaines populations (Garant, Forde, et Hendry 2007). L'intérêt de l'étude des patrons génétiques en biologie de la conservation est donc de fournir un état des lieux simultané de la diversité génétique des populations et des flux de gènes qui circulent entre elles. Ces informations sont d'autant plus intéressantes pour les biologistes de la conservation que ces derniers ne peuvent pas contrôler le phénomène de mutation pour maintenir la diversité génétique des populations vulnérables, mais ils peuvent par contre se focaliser sur la dispersion et les flux de gènes des individus.

Premièrement, il est possible de maintenir et/ou d'améliorer la connectivité des populations pour favoriser les flux de gènes (Lankau et al. 2011; Bennett 1999), par exemple par l'aménagement ou l'entretien de corridors. Les corridors sont des éléments du paysage qui permettent aux individus de se déplacer en reliant les habitats au sein d'un environnement défavorable (Gilbert-Norton et al. 2010). Plusieurs études ont montré que les corridors sont efficaces pour augmenter les flux de gènes entre des populations, réduisant ainsi la différenciation génétique entre habitats et augmentant la diversité génétique au sein des habitats (Christie et Knowles 2015; Mech et Hallett 2001). L'utilisation des corridors pour réduire les impacts liés à la fragmentation des habitats (Sordello et al. 2013; Sordello 2017) a donc été implémentée dans les politiques de conservation de plusieurs pays en Europe. En France par exemple, il a été initié en 2007 la politique publique « Trame Verte et Bleue »

(Encadré 1), et plus récemment d'autres trames émergent telles que la « Trame Noire » pour faire face à la pollution lumineuse.



Encadré 1. Qu'est-ce que la Trame Verte et Bleue ? Cette politique publique initiée en 2007 vise à réduire la fragmentation des habitats semi-naturels et naturels (subdivision des habitats en îlots isolés) et à mieux prendre en compte la biodiversité dans l'aménagement du territoire. Le but est de préserver et restaurer un réseau de continuités écologiques constitué de réservoirs de biodiversité et corridors écologiques qui permettent de circuler entre les réservoirs. Elle est mise en œuvre à trois échelles : nationale (document cadre fixant les objectifs et lignes directrices), régionale (Schémas régionaux de cohérence écologique identifiant les continuités écologiques et prévoyant les mesures) et locale (projet et documents d'urbanisme des communes intègrent ces enjeux).

Deuxièmement, il est possible de créer artificiellement des flux de gènes par apport d'individus dans des populations isolées (*translocation*). Par exemple, le transfert de panthères de Floride (*Puma concolor*) dans une population proche de l'extinction a engendré une augmentation de la valeur sélective des descendants et une augmentation du taux de croissance de la population (Benson et al. 2011; Johnson et al. 2010). On parle alors de sauvetage génétique (*genetic rescue*; Whiteley et al. 2015; Ralls et al. 2017). Le sauvetage génétique ne peut cependant être efficace que si les conditions environnementales ne sont pas limitantes et ne se détériorent pas davantage (Adams et al. 2011). A nouveau, exigences écologiques et génétiques apparaissent donc comme des facteurs intrinsèquement liés et primordiaux pour la pérennité des populations.

Cependant, les flux de gènes renforcés par ces programmes de gestion peuvent aussi avoir des conséquences négatives sur les populations (Lankau et al. 2011). Le transfert d'individus dans une population peut importer de nouveaux pathogènes ce qui va augmenter la mortalité ou/et la vulnérabilité à la prédation et à d'autres maladies, et diminuer le taux de reproduction (Cunningham 1996). Le transfert peut également engendrer l'apparition de dépression d'hybrides (*outbreeding depression*), c'est-à-dire une réduction de la valeur sélective des descendants issus du mélange des deux populations (Frankham et al. 2011). De plus, la réussite des sauvetages démographique et génétique dépendent fortement du milieu et de l'intensité des flux d'immigrants/gènes (Garant, Forde, et Hendry 2007; Whiteley et al. 2015). Une trop grande proportion d'immigrants par génération dans un habitat va entrainer le dépassement de la « capacité d'accueil » du milieu pour cette espèce (ressources insuffisantes) ou une perte d'adaptation locale (Figure 4). Pour éviter ces effets négatifs des recommandations de gestion génétique des populations fragmentées existent (Ralls et al. 2017; Frankham et al. 2017). Par exemple, Edmands (2007) recommande que la transfert

d'individus soit préconisé après avoir testé pendant au moins deux générations les effets des croisements entre les individus des deux populations.

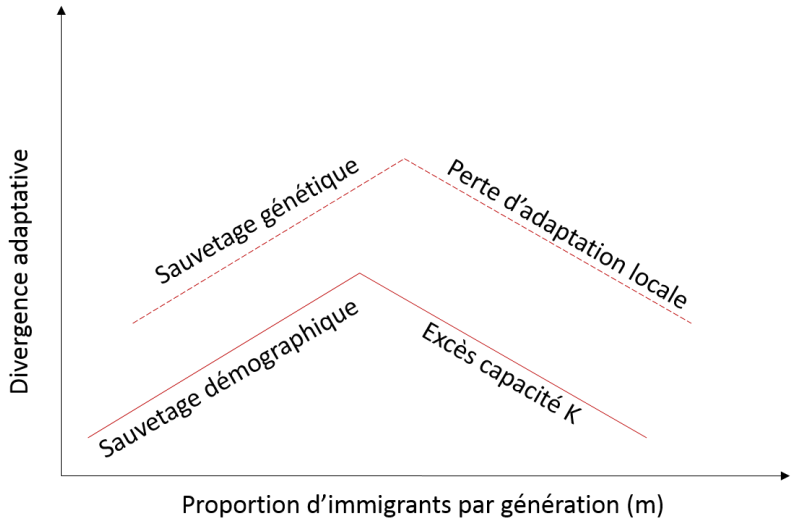


Figure 4. Schéma illustratif de l'influence de la proportion d'immigrants par génération (m) sur la divergence adaptative des populations. La ligne en pointillé représente une population dans un habitat hétérogène. La ligne continue représente une population dans un habitat homogène. La « capacité K » représente la capacité d'accueil du milieu, c'est-à-dire l'ensemble des ressources environnementales disponible (ex : ressource alimentaires, nichoir, abris …). Cette représentation n'est pas quantitative : les formes réelles des courbes sont inconnues, ainsi que leurs hauteur et position relatives le long de l'axe des x. D'après Garant, Forde, et Hendry (2007).

3. L'importance des conditions environnementales dans la viabilité des populations

La préservation de l'environnement est primordiale en biologie de la conservation, non seulement pour préserver les flux de gènes, mais également car les conditions environnementales affectent la valeur sélective (i.e. survie, reproduction) des individus.

L'ensemble des conditions environnementales affectant la valeur sélective des individus est appelé « niche écologique » (Kearney 2006). Cela signifie que pour comprendre et lutter contre le déclin d'une espèce (ou l'expansion d'une espèce invasive) il faut décrire finement sa niche, c'est-à-dire ses besoins abiotiques (ex : température, habitat) et biotiques (relation proie-prédateur, parasite-hôte, compétition). Par exemple, les causes du déclin majeur en Europe (disparition dans plus de 20 pays en 50 ans) de l'Outarde canepetière (*Tetrax tetrax*) sont la destruction de son habitat de reproduction et de ses ressources alimentaires : la destruction de 50% des nids lors des fauches de prairies et le manque de nourriture pour les poussins ayant éclos, notamment les criquets (Bretagnolle et al. 2011). Sur la base de ce constat, des Mesures Agro-Environnementales (ici une compensation pour planter de la luzerne au lieu des céréales et ne pas la récolter pendant la période de nidification = entre 300 et 450 euros/mois) ont été mise en place pour préserver les parties sensibles de la niche écologiques de cette espèce dans l'Ouest de la France (habitat de reproduction et proies) ce qui a permis une multiplication par sept des effectifs en moins de dix ans (Bretagnolle et al. 2011).

3.1. Les ressources alimentaires : un enjeu majeur en conservation

Parmi les besoins vitaux de la niche d'une espèce, les ressources alimentaires constituent un facteur majeur de la croissance, de la reproduction et de la survie des individus (Perrig et al. 2017; Yuan et al. 2018; Brodmann et al. 1997; Andersen, Færøvig, et Hessen 2007; Arnott, Brand, et Kos 1986). Dans le cas de l'Outarde canepetière dans l'Ouest de la France évoqué ci-dessus, il existe notamment une corrélation forte entre la densité de criquet et le succès reproducteur (nombre de poussins âgés de plus de 45 jours) (Bretagnolle et al. 2011). Une

diminution en ressources alimentaires a de sérieuses conséquences sur l'individu et la population (Johnsen et al. 2017). Par exemple, il a été montré qu'une réduction des ressources alimentaires pendant l'hiver engendre une baisse de la condition corporelle de la Paruline flamboyante (*Setophaga ruticilla*), ce qui retarde sa migration printanière (Cooper, Sherry, et Marra 2015). Or chaque jour de retard sur le lieu de la reproduction diminue le succès reproducteur des individus, impactant ainsi négativement la tendance démographique de la population. L'apport artificiel de nourriture à des stades clés du cycle de vie des individus constitue d'ailleurs une stratégie de conservation particulièrement explorée pour la conservation des oiseaux (Bretagnolle et al. 2004; Clout, Elliott, et Robertson 2002; González et al. 2006). La qualité de la nourriture peut également fortement impacter la valeur sélective des individus (Huis et al. 2008; Vanni et Lampert 1992). Une ressource alimentaire de moins bonne qualité peut être à l'origine d'une croissance réduite des juvéniles (Stephens, Berven, et Tiegs 2013) ou d'une réponse immunitaire moins efficace face à un parasite ou une maladie (Pap et al. 2009; Vass et Nappi 1998). Dans le cas de l'herbivorie il a notamment été montré que des plantes riches en tanins (métabolites secondaires utilisés par les plantes comme défense chimique contre les microbes pathogènes et herbivores) ont un effet anti-nématodes intestinaux chez l'herbivore (revue par Hoste et al 2006).

Déterminer les ressources alimentaires dont une espèce a besoin constitue donc une composante de la niche écologique importante en biologie de la conservation. Le régime alimentaire d'une espèce peut varier dans son aire de répartition (Zalewski 2005). Par exemple, le blaireau Européen (*Meles meles*) montre un gradient latitudinal de son régime alimentaire (Goszczyński, Jedrzejewska, et Jedrzejewski 2000). Aux latitudes Nord il exploite principalement des vers de terre, en Europe tempérée il montre un régime alimentaire varié et en région Méditerranéenne un régime alimentaire composé principalement de fruits et de

céréales. En termes de conservation cela signifie qu'il n'est pas recommandé d'extrapoler le régime alimentaire d'une espèce à partir d'un échantillonnage limité dans l'espace. De plus, la disponibilité des ressources est fortement influencée par les paramètres environnementaux telles que les saisons et le climat (Mulwa et al. 2013; Tsuji, Ito, et Kaneko 2019; Atkins et al. 2018). Un changement climatique, même mineur, peut créer une asynchronie entre le prédateur et sa ressource ce qui peut réduire le succès reproducteur des prédateurs concernés (Figure 5) (Durant et al. 2007). Une forte fluctuation du climat pourrait menacer davantage certaines espèces en réduisant la disponibilité et la stabilité de sources de nourriture à des stades critiques de leur cycle vital, lorsque les options alimentaires sont déjà limitées. Les résultats d'une étude sur le chat marsupial moucheté (*Dasyurus viverrinus*) – disparu sur le continent Australien et en déclin en Tasmanie – suggèrent que les fluctuations de l'abondance de cette espèce sont liées aux fluctuations de l'abondance des larves de la corbie de Tasmanie (*Oncopera intricata* ; lépidoptère) induites par les conditions météorologiques (Fancourt, Hawkins, et Nicol 2019). Une détérioration continue de ces conditions météorologiques pourraient donc menacer cette espèce dont l'aire de distribution est déjà réduite. Afin de mieux décrire la gamme des ressources alimentaires utilisées par une population il est donc recommandé ne pas se focaliser sur la description du régime alimentaire à partir d'un échantillonnage unique dans le temps et dans l'espace (Andriollo et al. 2019; Alberdi, Aizpurua, et al. 2019; Nielsen et al. 2018).

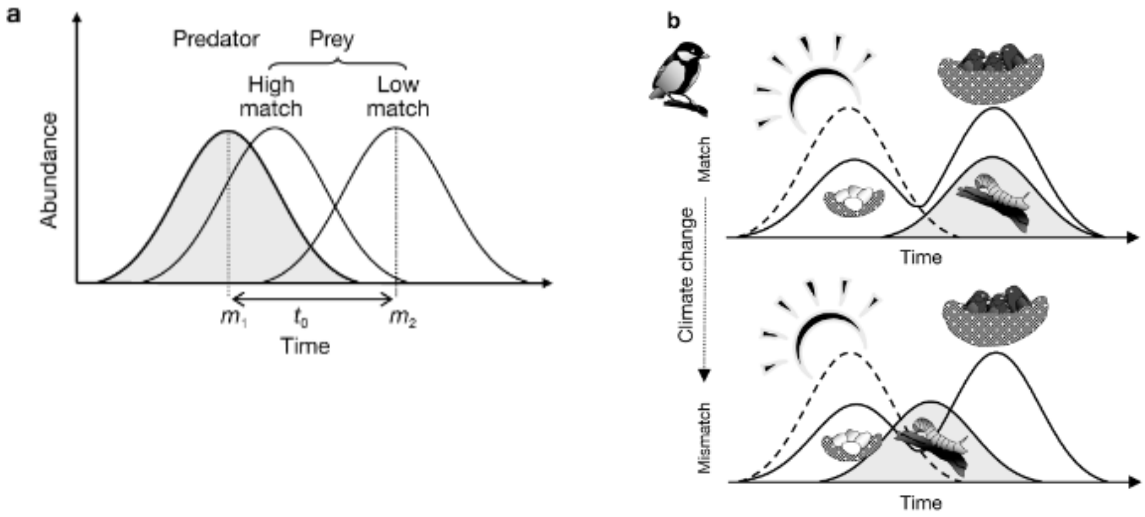


Figure 5. Hypothèse du match/mismatch. (a) Un match (concordance) élevé correspond à un chevauchement temporel important du prédateur et de la proie. (b) Effet du changement climatique sur la synchronisation des pics de prédateur et de proie. Le match correspond à la synchronie entre le pic d'abondance de chenilles (proie de la mésange) et la période d'élevage des jeunes. Le mismatch correspond à un décalage entre ces deux évènements, entrainant une baisse des ressources alimentaires pendant une période très énergivore pour ces oiseaux. Figure extraite de Durant et al. (2007).

Certaines caractéristiques liées au régime alimentaire des espèces favorisent le risque d'extinction. Par exemple plus le niveau trophique est élevé, plus le risque d'extinction est élevé car cela expose les espèces aux effets cumulatifs des perturbations le long de la chaine alimentaire (Purvis et al. 2000; Careddu et al. 2015; Mann 2011). La diminution des ressources est particulièrement problématique pour les espèces insectivores car ces dernières décennies la biodiversité et la biomasse des arthropodes ont été fortement diminuées par l'utilisation massive de pesticides (Hallmann et al. 2017; Mesléard et al. 2005; Wickramasinghe et al. 2004; Strong et al. 1996). Une méta-analyse réalisée sur les populations aviaires européennes a montré que, comme les insectes, les oiseaux insectivores Européens ont continuellement

décliné depuis environ 25 ans - contrairement aux espèces d'oiseaux omnivores (Bowler et al. 2019). D'autre part, une niche trophique (gamme des proies possibles) étroite et spécialisée peut augmenter également la vulnérabilité en cas de déclin des populations de proies (Pratchett, Wilson, et Baird 2006; Brooker et al. 2014). En réaction à la disparition de leur proies principales (*Diporeia*), les populations de Chabot visqueux (*Cottus cognatus*) et de Grand corégone (*Coregonus clupeaformis*), se sont effondrées dans l'est du lac Ontario (Owens et Dittman 2003). Actuellement, les ressources alimentaires alternatives ne semblent pas suffisantes pour maintenir ces deux prédateurs à leurs niveaux d'abondance antérieurs. Le rétablissement de ces deux espèces semble compromis tant que les niveaux d'abondance antérieurs de leur proies principales ne se rétablisse pas (Owens et Dittman 2003). Les résultats concernant l'effet de la spécialisation du régime alimentaire sur le risque d'extinction sont toutefois très contrastés (Williams 2005; Safi et Kerth 2004; Boyles et Storm 2007) et le risque de déclin serait multifactoriel selon les espèces (ex : niche climatique, spécialisation de l'habitat) (Williams, Araújo, et Rasmont 2007; Harcourt, Coppeto, et Parks 2002).

Les ressources alimentaires constituent donc une composante complexe, dans le temps et dans l'espace, importante à prendre en compte en conservation (Nielsen et al. 2018). C'est par exemple un des prérequis essentiel aux actions de restoration de l'habitat et de renforcement des populations dans un nouvel environnement car les individus doivent pouvoir y trouver les ressources nécessaires (Clare 2014). Si les ressources sont présentes, il également important de déterminer si les individus réintroduits y auront accès. En effet, les individus introduits peuvent être en compétition pour les ressources alimentaires avec des espèces locales ou invasives menaçant ainsi le succès de la réintroduction. Brown et al. (2014) ont par exemple montré qu'une espèce de lézard (*Leiolopisma telfairii*) - introduite sur deux îles pour diminuer sa vulnérabilité face aux évènements stochastiques - a subi une forte

compétition pour les ressources alimentaires face à une espèce de musaraigne (*Suncus murinus*) introduite et invasive sur ces îles. L'introduction de cette espèce de lézard sur une île où elle n'a pas de forte compétition pour les ressources alimentaires aurait permis un meilleur succès d'établissement des populations. Dans une autre mesure, la connaissance du régime alimentaire peut également permettre la détermination indirecte de la qualité de certaines composantes de l'habitat d'une espèce. La détection d'arthropodes décrits comme espèces indicatrices - c'est à dire assez sensibles aux conditions du milieu pour être utilisées comme évaluatrices de la qualité du milieu - dans les fèces de la Petite chauve-souris brune (*Myotis lucifugus*) a notamment permis de qualifier ses aires de chasse faibles en pollution organique et acidification (Clare et al. 2011; Clare et al. 2014).

4. L'apport de la biologie moléculaire à la biologie de la conservation

Le développement des approches de biologie moléculaire ont permis de nombreuses avancées en biologie de la conservation, notamment par l'intégration des enjeux évolutifs (ex : potentiel évolutif) (Caizergues 2005; Brodersen et Seehausen 2014). Un des prérequis essentiels à une gestion efficace repose sur une connaissance approfondie de la biologie et des exigences écologiques des espèces. La biologie moléculaire permet d'obtenir des informations génétiques qui permettent de faire des inférences démographiques et de réaliser des inventaires de biodiversité à partir de prélèvements ponctuels, potentiellement non invasifs (eau, sol, poils ou fèces). Ainsi, les méthodes d'inférences démographiques réalisées à partir de données de variation génétique permettent d'estimer la taille efficace des populations (nombre d'individus qui participent à la création de la génération suivante)

(Dussex et Robertson 2018), de rechercher des signaux d'expansion ou de contraction démographiques (Zenboudji et al. 2016). *In fine*, elles offrent des outils pour délimiter des populations et déterminer des unités de conservation (Hurt et al. 2017; Allendorf 2017), mettre en œuvre des renforcements de population par introduction d'individus (ex: Johnson et al. 2010) et modéliser les réponses des populations face aux changements environnementaux (Razgour et al. 2019). De plus les approches de metabarcoding (détection d'espèces à partir de mélanges d'ADN contenu dans un échantillon) permettent actuellement de reconstruire de façon détaillée les réseaux trophiques dans différents écosystèmes terrestres et marins (Sousa, Silva, et Xavier 2019). En Islande le phoque commun (*Phoca vitulina*), en déclin, est la cible d'abattages visant à réduire la pression de prédation sur les salmonidés (Hauksson 2010). Or, une étude moléculaire basée sur les fèces de cette espèce de phoque a montré l'absence de salmonidés dans le régime alimentaire de ces populations islandaises permettant ainsi de remettre en cause ces abattages intensifs (Granquist et al. 2018). La biologie moléculaire permet également la détection des espèces invasives sans nécessiter l'observation de l'individu (notamment grâce à des échantillons environnementaux tels que l'eau ; Dejean et al. 2012) et de mieux comprendre les phénomènes d'invasions biologiques (Estoup et al. 2016). Enfin, la combinaison d'échantillons environnementaux (eau, sol, poils, fèces; Bohmann et al. 2014) et d'analyses moléculaires est particulièrement intéressante en biologie de la conservation car cela permet de minimiser le dérangement occasionné aux individus de populations menacées et de récolter des informations sur des espèces peu accessibles (Lugg et al. 2018; Deiner et al. 2017; Lefort et al. 2019; Eiler et al. 2018).

Aujourd'hui, l'application en biologie de la conservation des données issues de la biologie moléculaire, et notamment de génétique, reste cependant sous-exploitée (Bowman et al. 2016; Arlettaz et al. 2010). D'après Pierson et al. (2016) sur 318 plans de conservation d'espèces menacées des Etats-Unis (100), d'Australie (108) et d'Europe (110, France, Pays-Bas, Royaume-Unis, Allemagne et Luxembourg) globalement moins de 50% considéraient les facteurs génétiques comme risques dans les populations. Seulement 12% de ces plans en Europe incluait des études de variation génétique ou estimation de taille efficace. Cette étude a également mis en évidence une disparité de l'inclusion des données génétiques selon l'aire géographique (Etats-Unis > Australie > Europe ; Figure 6).

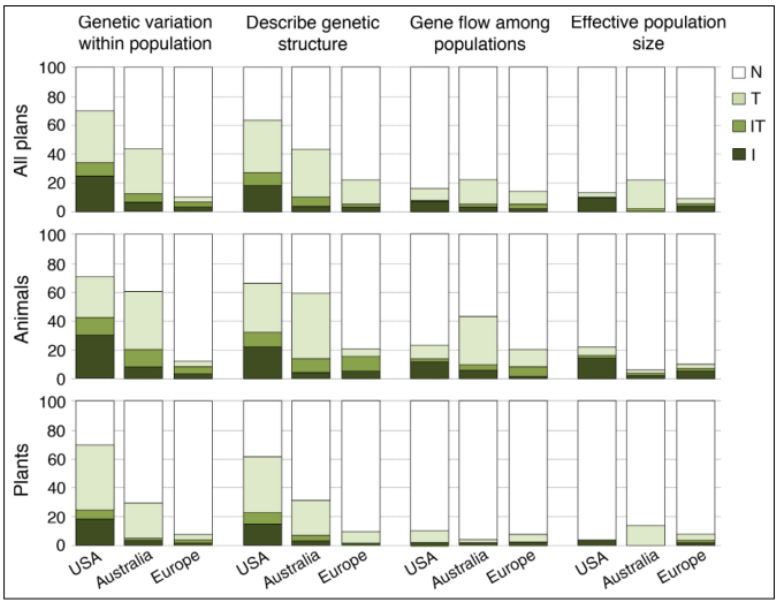


Figure 6. Pourcentages des plans de conservation - aux Etats-Unis (USA), en Australie et en Europe - qui incluent des données génétiques (I = included), qui incluent la collecte de données génétiques (T = Task assigned), les deux (IT = I + T) ou qui n'inclue aucune des données génétiques analysées (N = none specified). Figure extraite de Pierson et al. 2016. Les données génétiques analysées sont de gauche à droite : la variation génétique au sein des populations (diversité génétique), la structure génétique (différenciation génétique entre les populations), les flux de gènes entre les populations et la taille efficace des populations.

Plusieurs éléments freinent l'inclusion des concepts évolutifs dans les actions de conservation. D'une part, les facteurs génétiques sont perçus comme des menaces à long terme et ne sont donc pas considérés comme des priorités (Cook et Sgrò 2019). En Nouvelle-Zélande, le manque d'application provient également du ressentiment d'un manque d'expertise de la part des gestionnaires, d'un manque de financements pour mettre en œuvre les solutions adaptées (ex : translocation) et d'un accès limité à la littérature scientifique par les gestionnaires (Taylor, Dussex, et van Heezik 2017). Il est donc primordial que les chercheurs rendent plus visibles et plus accessibles leurs travaux de recherche. Afin d'assurer l'utilisation des données moléculaires acquises dans les plans de gestion, le futur de la biologie de la conservation repose donc sur l'établissement et la pérennisation de collaborations étroites entre partenaires académiques et non-académiques (Britt et al. 2018). L'implication des scientifiques à l'origine des recommandations de conservation auprès des acteurs locaux peut également réduire le délai entre l'émission des recommandations et les actions de conservation (Arlettaz et al. 2010). La biologie de la conservation est une science multidisciplinaire : les dimensions sociales (ex : implication des propriétaires des zones concernées, actions de sensibilisations et de transfert des connaissances), politiques et économiques ne doivent donc pas être négligées pour assurer le succès d'un programme de conservation (Arlettaz et al. 2010).

5. Les chiroptères : un taxon menacé peu connu

5.1. Un taxon particulièrement sensible

Les chiroptères représentent le deuxième ordre de mammifères le plus diversifié avec presque 1400 espèces répertoriées de par le monde – soit un quart de la diversité en espèces de

mammifères (Fenton et Simmons 2015; Russo et Jones 2015). Apparues il y a environ 60 millions d'années, ce sont les seuls mammifères capables de vol actif et certaines espèces sont dotées d'écholocation sophistiquée pour se diriger et chasser leurs proies dans l'obscurité (Gunnell et Simmons 2012). La plupart des espèces de chauve-souris sont exceptionnellement longévives pour leurs tailles et masses (> 20 ans ; Figure 7, Wilkinson et South 2002) et le record de 41 ans est détenu par le Murin de Brandt (*Myotis brandtii*) (Podlutsky et al. 2005).

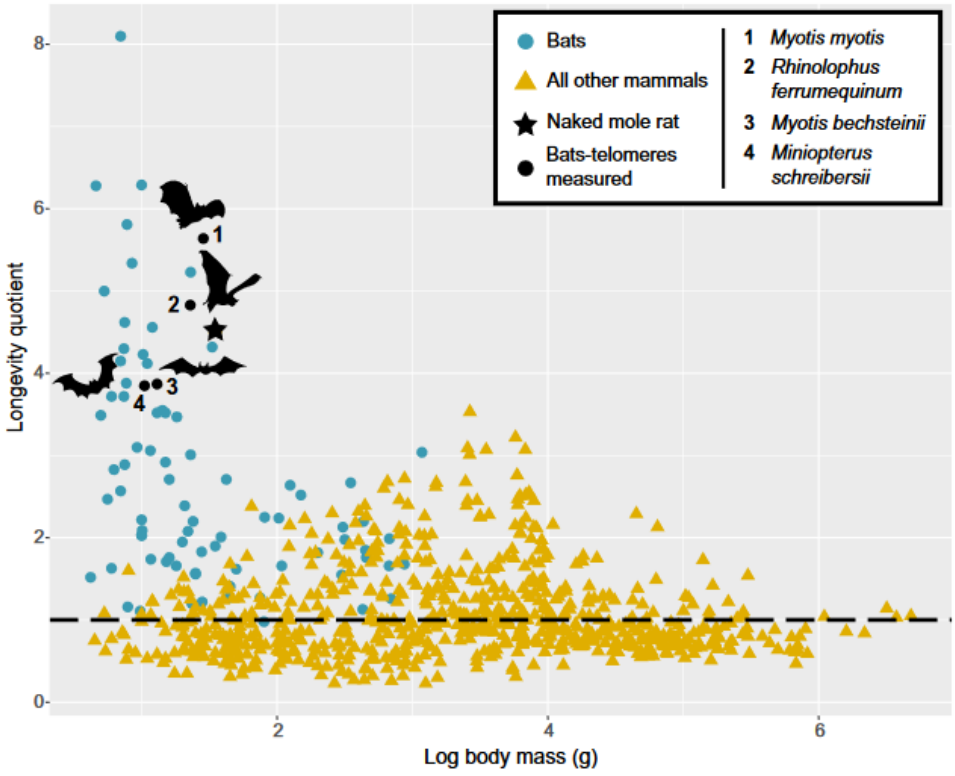


Figure 7. Quotient de longévité (LQ= longévité observée/longévité attendue) en fonction de la masse de 779 espèces de mammifères. La ligne en pointillé indique un LQ = 1 c'est-à-dire une longévité observée et attendue égale. Les espèces de chauves-souris sont indiquées en bleu, les autres espèces de mammifères en orange. Cette figure est extraite de Foley et al. 2019.

Présentes sur tous les continents excepté l'Antarctique, elles couvrent un panel extraordinaire d'habitats et de morphologies (Figure 8). Ne construisant pas leur propre abri, elles s'établissent dans des crevasses d'arbres, fissures dans les falaises, au plafond de cavités

et/ou dans des bâtis (ex : combles) (Dietz et Kiefer 2016). Elles montrent également une diversité de stratégies hivernales quand les ressources alimentaires se font rares dans les milieux froids et tempérés : certaines migrent, d'autres hibernent et certaines espèces montrent les deux comportements comme la chauve-souris cendrée *Lasiurus cinereus* (Weller et al. 2016). Leurs régimes alimentaires, tout comme leurs stratégies de chasse (affût, glanage, poursuite en vol), sont très variés car bien qu'une majorité des espèces de chauve-souris soient insectivores, les autres sont nectaires, frugivores, piscivores ou hématophages. Par le biais de leur régime alimentaire, les chauves-souris participent donc grandement au maintien de nombreux écosystèmes car elles assurent des services indispensables comme la pollinisation, la dispersion des graines et la régulation des populations d'arthropodes, notamment nuisibles pour l'agriculture et la santé humaine/vétérinaire (Kunz et al. 2011; Maas et al. 2019; Fleming et Holland 2018; Yazid et al. 2019).



Figure 8. Illustration de la diversité morphologique de trente espèces de chauves-souris dans le monde. © Merlin Tuttle's Bat Conservation.

De par leur proximité avec l'Homme (gîtes, zones de chasse), les chauves-souris sont très sensibles aux activités humaines (Frick, Kingston, et Flanders 2019; Voigt et Kingston 2016): changement d'utilisation du paysage (agriculture, déforestation, urbanisation), chasse, dérangement des gîtes, pollution, introduction d'espèces invasives, prédation par les animaux domestiques. En 2019, 15% des 1254 espèces de chiroptères recensées sur la liste rouge de l'UICN sont menacées, c'est-à-dire Vulnérable (VU), En danger (EN) ou En danger critique (CR) et 18,4% des 1254 espèces étudiées n'ont pas assez de données pour être évaluées mais pourrait potentiellement être menacées. Il est cependant important de souligner que l'impact des pressions anthropiques varient d'une espèce à l'autre et qu'il est donc important que les efforts de conservation soient adaptés en conséquence. Par exemple, l'urbanisation et ses émissions lumineuses profitent aux espèces non-lucifuges qui vont exploiter les gîtes disponibles et se nourrir des insectes attirés par la lumière (Rowse et al. 2016; Ancillotto, Tomassini, et Russo 2016), tandis que des espèces lucifuges vont être affectées négativement. Dans le cas du Murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*), la sortie de gîte des colonies estivales (bâtis) est retardée par les éclairages artificiels or, une période de chasse écourtée pour les mères allaitantes restreint la prise de masse des juvéniles ce qui peut impacter leur survie (Boldogh, Dobrosi, et Samu 2007).

En Europe les chauves-souris sont toutes insectivores et ont un cycle de vie composé de plusieurs étapes associées aux saisons (Figure 9). En hiver, en l'absence de proies, la majorité des chauve-souris hibernent dans des arbres creux ou en milieu souterrain. Leur reprise d'activité vers mars-avril va s'accompagner de la fécondation des femelles et d'un transit vers les gîtes d'été (souvent des bâtis). Les femelles de la plupart des espèces forment alors de plus ou moins grandes colonies (« colonies de maternité », quelques individus à plusieurs centaines) pour mettre bas et élever les jeunes pendant l'été. Les mâles restent quant à eux

majoritairement solitaires durant cette période. A l'automne les mâles et les femelles entament un transit vers les gîtes d'hibernation : c'est la saison des accouplements. Le sperme est alors stocké dans les voies génitales de la femelle jusqu'au printemps où la fécondation aura lieu.

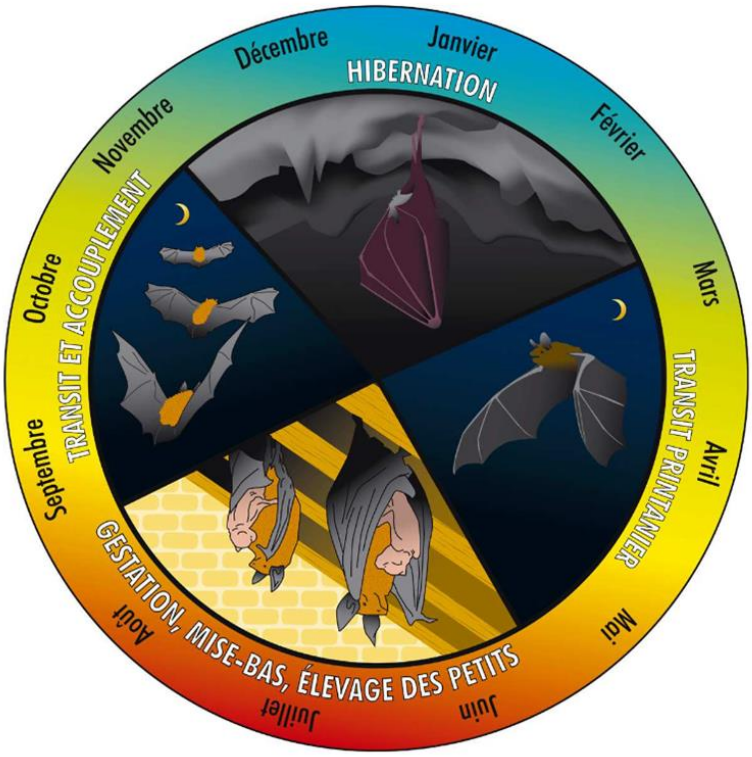


Figure 9. Cycle de vie des chauve-souris. Cette figure est issue de la Déclinaison régionale du Plan d'Actions en faveurs des Chiroptères en Poitou-Charentes (Septembre 2013).

Ce cycle de vie particulier les rend d'autant plus sensibles aux perturbations anthropiques et thermiques. Au-delà des mortalités directes dues à des épisodes de chaleur ou de froid trop intenses (Welbergen et al. 2008; Bourne et Hamilton-Smith 2007), les températures jouent un rôle très important dans les différentes étapes du cycle de vie des chauves-souris, telles que l'hibernation, la migration ou la reproduction (Sherwin, Montgomery, et Lundy 2013). Un changement des températures peut entraîner par exemple un décalage du pic d'abondance des proies, une précocité des naissances, une variation du taux de croissance des nouveaux

nés et des fréquences de réveils durant l'hibernation ce qui peut impacter la valeur sélective des individus (Ransome et McOwat 1994; Ransome 1971; Newson, Mendes, et Crick 2009; Humphrey, Richter, et Cope 1977). Tout au long de leur cycle de vie les chauves-souris requièrent une mosaïque d'habitats qui les exposent directement aux activités humaines (ex : colonies de maternité en bâtis en été, colonie d'hibernation en cavité souterraine) et les rendent ainsi particulièrement vulnérables. De plus, elles possèdent un faible taux de reproduction (un jeune par an) et une maturité sexuelle tardive (deux à cinq ans) (Barclay et al. 2004; Munshi-South et Wilkinson 2010; Jones, Purvis, et Gittleman 2003). En conséquent le renouvellement des populations est limité en cas d'épisodes de mortalité, et la survie de celles-ci repose donc en majorité sur la survie des adultes. Ainsi, la disparition d'une colonie rassemblant de très nombreux individus peut avoir des conséquences importantes sur la population.

5.2. Un taxon méconnu et difficile à étudier

Il existe 35 espèces de chiroptères en France métropolitaine dont huit espèces sont menacées et huit autres quasi-menacées (IUCN 2019), pourtant elles sont toutes protégées (Figure 10). A partir des années 30-40, les chauves-souris furent massivement étudiées par marquage individuel à l'aide de bagues, similaires à celles des oiseaux, avec pour but de mieux comprendre leurs déplacements, leur fidélité au gîte ou le taux de survie dans les colonies (Beaucournu 1962; Saint Girons 1973; Hutterer et al. 2005; Sluiter, van Heerdt, et Gruet 2009). En une trentaine d'années plus d'une centaine de milliers d'animaux furent marqués en France (Loïs, Julien, et Dewulf 2017). Néanmoins, cette pratique fut abandonnée dans les années 70 suite au constat de déclin alarmant des populations, probablement dû aux faits que

les marquages étaient réalisés pendant la léthargie hivernale et que les marqueurs (bagues) n'étaient pas adaptés aux chauves-souris, handicapant les animaux dans leurs activités (Beaucournu 1962). Aujourd'hui les populations sont donc majoritairement suivies grâce aux comptages régulier des individus en hibernation ou en sortie de gîtes estivaux (taille des populations; O'Shea, Bogan, et Ellison 2003), par suivis acoustiques (présence et activité des espèces, activité de chasse). Les comptages sont cependant difficilement applicables aux espèces peu grégaires (ex : Pipistrelle) et bien que les méthodes acoustiques aient fortement été améliorées au fil des années, elles restent limitées aux espèces identifiables avec confiance sur la base de leurs cris d'écholocations (Frick, Kingston, et Flanders 2019). Par exemple, les espèces de Murins sont difficiles à distinguer car la gamme des fréquences de leurs signaux se chevauchent (Kerbiriou et al. 2015). Des captures d'individus sont aussi réalisées (mesures biométriques, état sexuel, …) et sont parfois associées à du radiopistage par la fixation temporaire du radio-émetteur sur le dos de l'animal. Le radiopistage est utilisé pour découvrir des gîtes et connaître les déplacements des individus entre leur gîte et leur terrain de chasse. Cette technique, bien qu'efficace, reste souvent contraignante humainement et matériellement.

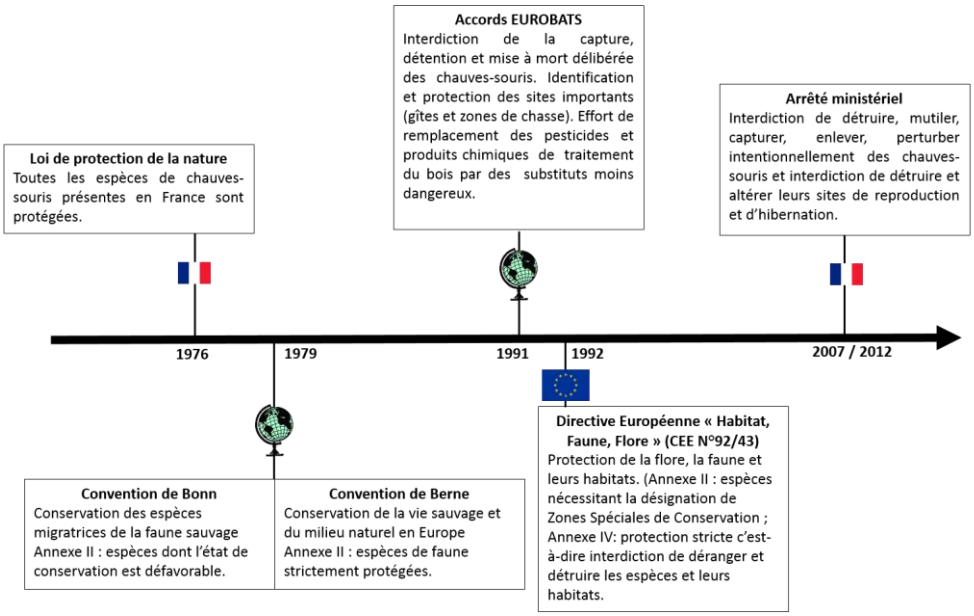


Figure 10. Récapitulatif des conventions et lois protégeant les chauves-souris au niveau national, européen et international.

Les caractéristiques des chauves-souris (nocturnes, très mobiles et la localisation de leurs gîtes souvent mal connue) rendent donc difficile le suivi des populations et l'évaluation de leur risque d'extinction pour de nombreuses espèces (O'Shea, Bogan, et Ellison 2003; Frick, Kingston, et Flanders 2019). Les chauves-souris représentent donc un taxon pour lequel l'utilisation de la biologie moléculaire est particulièrement intéressant. A partir de prélèvements ponctuels (généralement un petit morceau de membrane alaire ou du guano), des inférences ont pues être réalisée à partir des données de génétique : taille des populations et tendances démographiques (Vonhof et Russell 2015), identifications d'espèces cryptiques (non différentiables morphologiquement et acoustiquement) (von Helversen et al. 2001), modélisation de la vulnérabilité des espèces de chauve-souris face au changement climatique (Razgour et al. 2019). A des échelles de temps et d'espace larges des études phylogéographiques ont identifié des patrons de colonisation et de divergence des population européenne ainsi que des refuges glaciaires du Pléistocène (Rossiter et al. 2007; Flanders et al. 2009). L'utilisation de la biologie moléculaire a également permis de décrire et comparer les niches trophiques (Aldasoro et al. 2019) ou encore de mieux comprendre l'exceptionnelle longévité des chauves-souris (Foley et al. 2018).

6. Le Grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*)

Le grand rhinolophe est une espèce de chauve-souris insectivore longégive qui peut vivre jusqu'à une trentaine d'années (Caubère, Gaucher, et Julien 1984). Son cycle de vie est composé de plusieurs étapes associées aux saisons. En été les femelles se regroupent dans les bâtis (ex : comble, grenier ; Figure 11) pour la gestation, la mise bas et l'élevage des nouveau-nés tandis que les mâles sont plus solitaires. A l'automne les deux sexes se déplacent vers les sites d'hibernation - cavités souterraines naturelles ou artificielles (ex : champignonnière). La reprise d'activité au printemps s'accompagne de la fécondation des femelles et d'un transit vers les gîtes d'été. Les gîtes et les zones de chasse sont donc situés dans des milieux anthropisés, ce qui l'expose d'autant plus aux menaces liées aux activités humaines



Figure 11. Colonie de Grand rhinolophes sous un toit en Charente-Maritime. © M. Leuchtmann

Sa distribution s'étend de l'Europe de l'Ouest au Japon (Figure 12). Des études phylogéographiques ont montré un unique groupe génétique en Europe de l'Ouest - du Portugal à l'Italie (Suisse à part) - qui résulte de l'expansion d'une population originaire d'Asie (Flanders et al. 2009; Rossiter et al. 2007). De fortes différenciations génétiques ont cependant

était observées à des échelles fines, notamment au Royaume-Uni avec un isolement génétique des colonies du Pays de Galle (Rossiter et al. 2000). De fortes différenciations génétiques entre colonies du Sud-Ouest de la Grande-Bretagne ont également été observées, potentiellement à cause de la fragmentation du paysage (Rossiter et al. 2007). Ces études soulignent donc l'importance des études à des échelles plus fines pour cibler des conservations pertinentes dans le contexte local.



Figure 12. Distribution (en orange) du Grand rhinolophe dans le monde. Carte issue de l'IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2016.

Or bien qu'elle soit l'une des espèces de chauve-souris les plus répandues en Europe, elle a majoritairement subi un déclin de ses populations au XXe siècle, et plus particulièrement au Nord de l'Europe (ex : Belgique, Luxembourg, Angleterre) où elle est considérée comme rare ou éteinte (Battersby 2005; Kervyn et al. 2009; Pir 2009). La situation du Grand rhinolophe semble s'améliorer cependant dans certaines zones : Barlow et al. (2015) ont montré que suite au déclin drastique de cette espèce en Grande-Bretagne, ses populations sont désormais en

augmentation depuis la fin des années 90. Certains facteurs favorables à ce rétablissement ont pu être identifiés (Froidevaux et al. 2017), tel que l'augmentation des températures printanières qui entraine une augmentation de la quantité de proies. Cette étude a également mis en évidence le rôle primordial de la composition hétérogène des zones de chasse (bois de feuillus et prairies) sur le taux de croissance des colonies, permettant ainsi d'affiner les efforts de conservation de l'espèce.

En France, la biologie des populations du Grand rhinolophe est peu connue et les effectifs sont très variables au sein du pays (Figure 13, SFEPM, 2014). En effet, il est considéré comme presque éteint en Alsace (2 individus recensés en 2014), et les effectifs les plus abondants semblent concentrés dans l'Ouest de la France (Bretagne, Pays de la Loire, Centre, Nouvelle-Aquitaine) qui regroupe 46% des effectifs hivernaux et 37% des effectifs estivaux (Figure 13, SFEPM, 2014). La région Nouvelle-Aquitaine accueille ainsi l'une des plus importantes populations hibernantes (16 200 individus, 22% des effectifs nationaux) et estivantes (7 400 individus, 15% des effectifs nationaux) de France. Cette région porte donc une responsabilité importante dans la conservation du Grand rhinolophe à l'échelle nationale. Or, en 2015 l'Université de Lyon et l'association Poitou-Charentes Nature ont observé une diminution de 30% des effectifs du Grand rhinolophe en Poitou-Charentes, sur la base de comptages hivernaux (Figure 14).

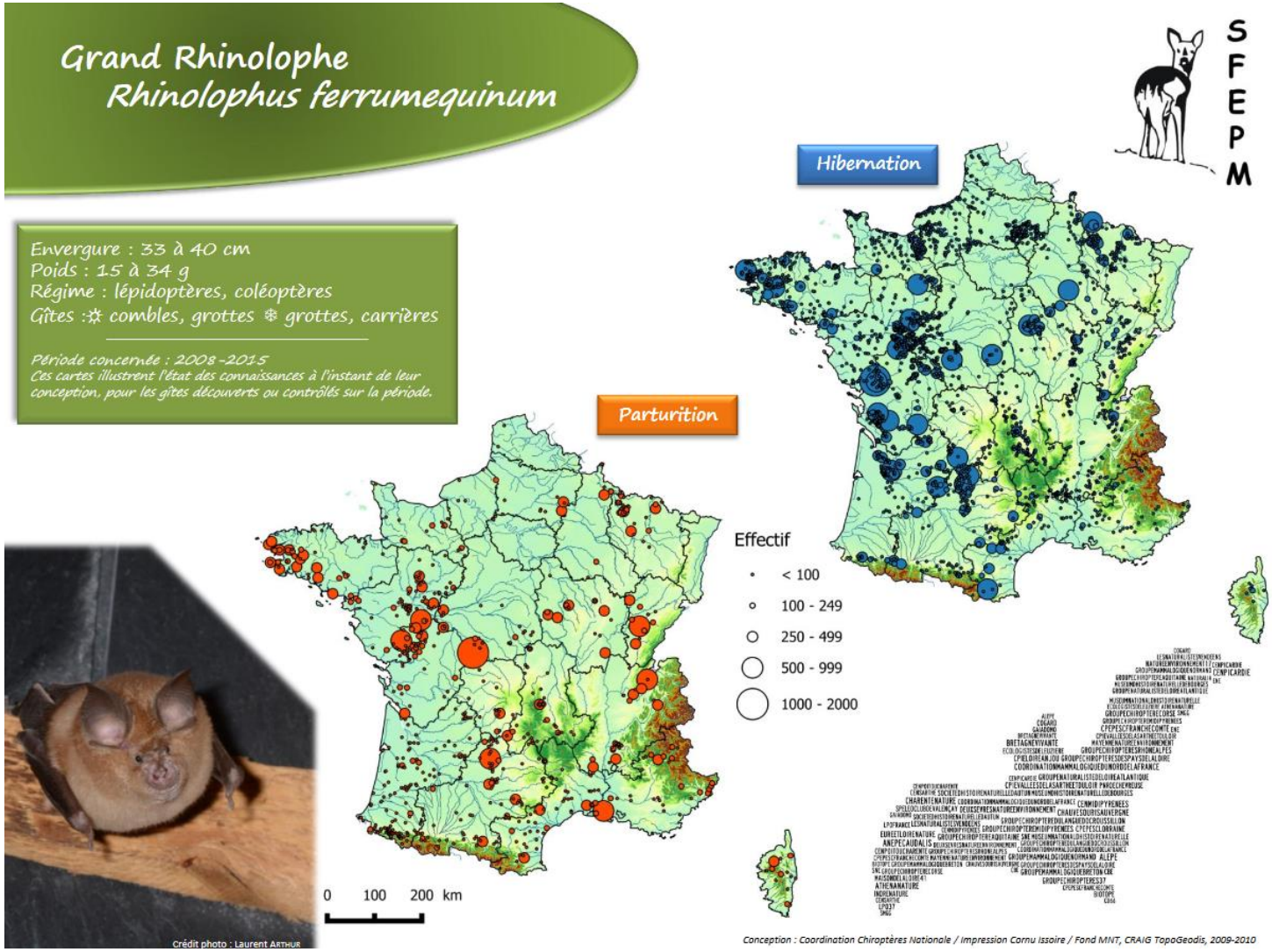
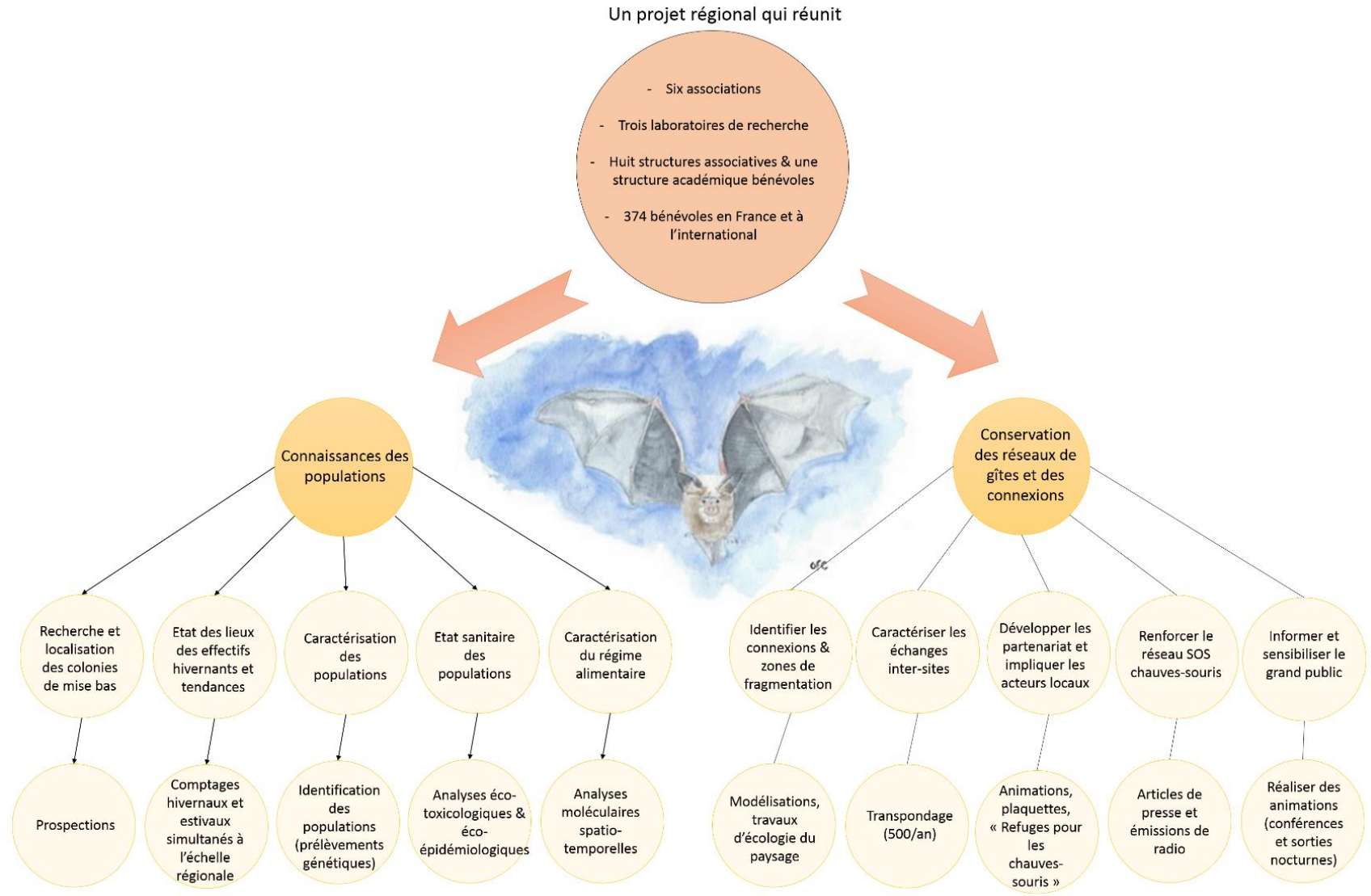


Figure 13. Carte de répartition du Grand rhinolophe en France issue du poster Chiroptères de l'annexe II de la Directive Habitat-Faune-Flore - Synthèse actualisée des populations en France - Bilan 2014 (Stéphane VINCENT - SFEPM).



Encadré 2. Projet « Grand rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique de la population » (2016-2019), acteurs, objectifs et actions. Aquarelle du Grand rhinolophe : ©O. Filippi-Codaccioni

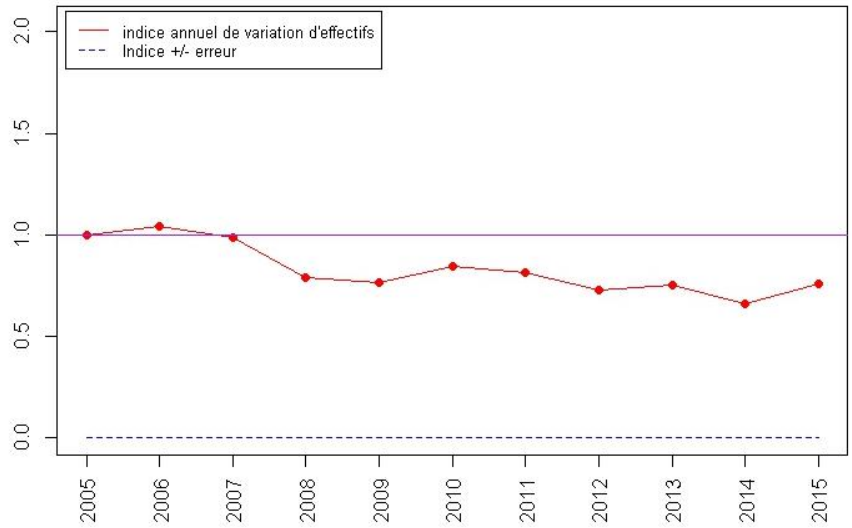


Figure 14. Baisse significative des effectifs de Grand rhinolophe en Poitou-Charentes d'après les comptages hivernaux réalisé chaque année dans la région. Figure réalisée par Poitou-Charentes Nature (2015).

Cette observation a conduit à classer le Grand rhinolophe comme Vulnérable (VU) sur la liste rouge régionale de Poitou-Charentes en 2016. Dans ce contexte, le projet régional initié par l'Université de Lyon et Poitou-Charentes Nature « Grand rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique de la population » vise à combler les lacunes sur les facteurs affectant la dynamique des colonies (reproduction, survie, dispersion) pour établir des stratégies de conservation pertinentes (Encadré 2). Par exemple, une étude de radio-pistage a été réalisée pour déterminer l'effet du paysage sur l'activité de chasse des individus pendant la saison de maternité (probabilité de franchissement des trouées de haie ; Pinaud et al. 2018). Un programme de Capture-Marquage-Recapture (à l'aide de transpondeurs <1.1mm et *m* =0.115g) a également été initié en 2015 pour appréhender la dynamique des populations et comprendre le fonctionnement des colonies (ex : taux de survie, déplacements inter-saisonniers, fidélités aux sites) (Encadré 2). Les individus marqués lors des captures estivales et automnales sont contrôlés manuellement lors des comptages

hivernaux et des captures, et automatiquement sur certains sites grâce à des lecteurs autonomes. Cependant, pour comprendre les patrons observés (ex : sont-ils répétables dans le temps ?) cette étude nécessite d'être réalisée sur plusieurs années et elle ne donne pas d'informations sur le contexte éco-évolutif des colonies. Or le déclin observé dans la région et la situation inquiétante du Grand rhinolophe dans certaines parties de son aire de répartition (ex : Luxembourg, Belgique) indiquent l'urgence de développer des approches complémentaires et rapides, ainsi que de développer des partenariats entre différentes disciplines et structures (académique, non-académique) pour maximiser la compréhension de l'espèce et optimiser en conséquent les efforts de conservation.

7. Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, mon objectif était de développer et appliquer des méthodes d'écologie évolutive et notamment moléculaires pour comprendre le fonctionnement des colonies en lien avec le paysage : le paysage est-il un facteur limitant les flux de gènes des populations ? Au travers du spectre des proies du Grand rhinolophe, peut-on identifier des paysages à conserver en priorité pour préserver les ressources clés de cette espèce ?

Dans un premier temps j'ai appliqué des méthodes d'inférence basée sur la génétique des populations pour déterminer la vulnérabilité des colonies et délimiter des unités de gestion pertinentes pour l'espèce. La délimitation des populations s'effectue alors sur la base des flux de gènes : une population représente un groupe d'individus de la même espèce dont n'importe quel membre du groupe peut potentiellement s'accoupler avec n'importe quel autre membre (Waples et Gaggiotti 2006). D'après les connaissances sur la biologie de l'espèce (ex : courte distance d'écholocation; Ortega, Moreno-Santillán, and Zamora-

Gutierrez 2016), nous nous attendions à l'identification de plusieurs groupes génétiques en Poitou-Charentes limités par des barrières paysagères telles que de grandes plaines agricoles. Puisqu'en 2015 les données de comptages hivernaux annuels suggéraient un déclin prononcé dans la région, nous nous attendions également à l'identification d'un signal de déclin des populations dans les données génétiques. Ce travail est présenté dans le Chapitre I, il a fait l'objet d'un article scientifique et d'un article en français dans la revue naturaliste nationale *Plume de naturalistes*.

- **Tournayre O**, Pons J-B, Leuchtmann M, Leblois R, Piry S, Loiseau A, Filippi-Codaccioni O, Duhayer J, Garin I, Mathews F, Puechmaille S, Charbonnel N, Pontier D. Integrating population genetics to define conservation units from the core to the edge of *Rhinolophus ferrumequinum* western range. 2019. *Ecology and Evolution*. doi: 10.1002/ece3.5714
- **Tournayre O**. Génétique des populations et biologie de la conservation du Grand Rhinolophe. 2019. *Plumes de Naturalistes* 3 : 249-258.

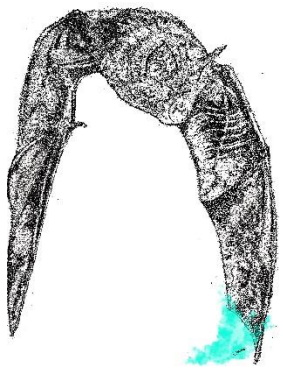
Dans un deuxième temps j'ai développé une approche d'étude du régime alimentaire qui minimise le dérangement des individus tout en évitant le risque de contaminations et d'assignation à la mauvaise espèce de chauve-souris. Cette approche permet une identification simultanée de l'espèce de chauve-souris et de ses proies - sans pénaliser l'amplification de l'ADN des proies par une suramplification de l'ADN du prédateur - à partir de l'ADN contenu dans les guanos. Deux articles scientifiques portant sur le développement de la méthodologie sont présentés dans le Chapitre II et un article en français dans la revue naturaliste nationale *Plume de naturalistes*.

- Galan M, Pons J-B, **Tournayre O**, Pierre E, Leuchtmann M, Pontier D, Charbonnel N. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. 2018. *Molecular Ecology Resources*.
- **Tournayre O**, Leuchtmann M, Trillat M, Piry S, Filippi-Codaccionni O, Pontier D, Charbonnel N, Galan M. *In silico* and empirical evaluation of twelve COI & 16S metabarcoding primer sets for the insectivorous diet analysis. (*soumis*). *Molecular Ecology Resources*. bioRxiv: http://biorxiv.org/cgi/content/short/742874v1
- **Tournayre O.** Qui mange quoi ? Zoom sur l'ADN des chauves-souris et de leurs proies contenues dans le guano. 2018. *Plume de Naturalistes* 2 : 61-76.

Enfin, à l'aide de la méthode développée dans le chapitre II, j'ai étudié la plasticité du régime alimentaire du Grand rhinolophe en fonction du paysage dans lequel se situe les colonies et tout au long de la saison de maternité qui induit des changements physiologiques et des besoins énergétiques forts chez les femelles. L'objectif était de déterminer si au travers du spectre des proies du Grand rhinolophe il est possible d'identifier des paysages à conserver en priorité pour préserver les ressources clés de cette espèce. Les résultats sont présentés dans le Chapitre III.

- **Tournayre O**, Galan M, Leuchtmann M, Trillat M, Filippi-Codaccionni O, Piry S, Pontier D, Charbonnel N. Spatio-temporal variation of the greater horseshoe bat diet in Western France (*en préparation*).

CHAPITRE I. Diversité et structure génétique du Grand rhinolophe



1. Contexte et objectif

Le Grand rhinolophe est une espèce de chiroptère particulièrement exigeante vis-à-vis de la configuration du paysage dans lequel elle se déplace. Sa feuille nasale concentre les ultrasons de hautes fréquences (environ 80 kHz) qu'il émet en un faisceau très étroit ce qui lui permet de détecter des détails très fins. Cette particularité lui confère de grands avantages pour la chasse, mais les hautes-fréquences s'atténuant rapidement dans l'air, le Grand rhinolophe possède une courte distance de détection, de l'ordre d'une dizaine de mètres (Ortega, Moreno-Santillán, et Zamora-Gutierrez 2016). Il semble donc être mieux adapté à des déplacements dans un paysage hétérogène et structuré, comme les bocages (champs ou prairies clos par des haies) où il utilise des points de repères pour se déplacer. Pinaud et al. (2018) ont ainsi récemment montré à l'échelle de la colonie une forte diminution de la probabilité de déplacement du Grand rhinolophe face à des ruptures de la connectivité paysagère pendant la période d'élevage des jeunes. Un paysage tel qu'une grande zone agricole sans repères ou de grandes infrastructures de transport pourraient constituer des barrières à ses déplacements et engendrer un isolement des colonies (Figure 15).

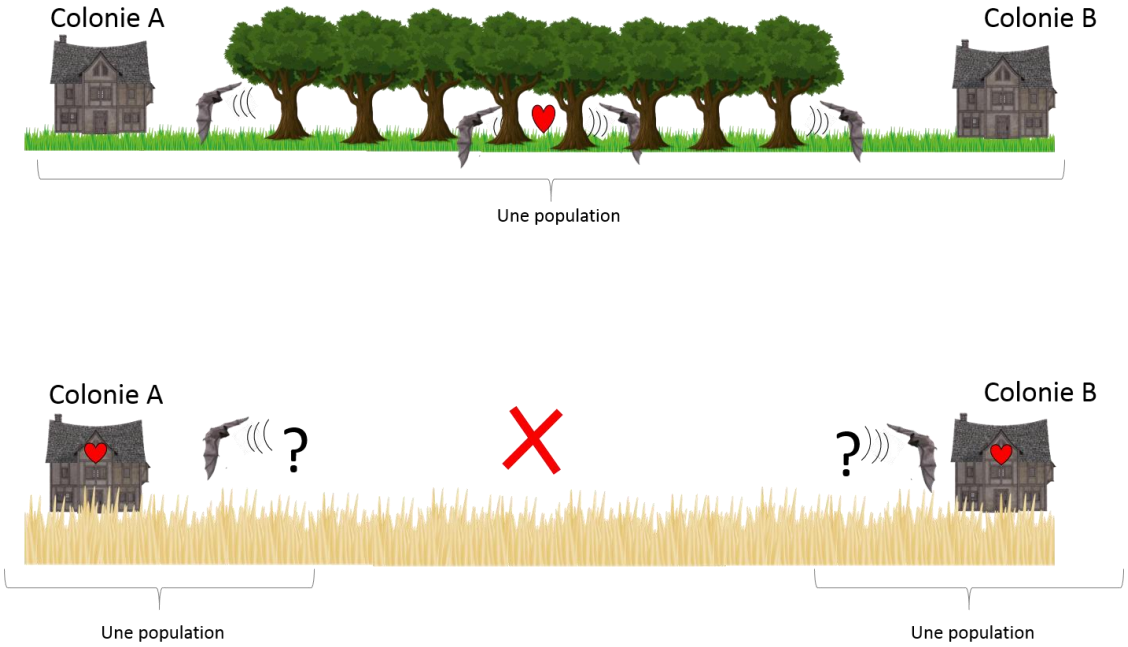


Figure 15. Schématisation de l'hypothèse du déplacement de deux individus de Grand rhinolophes issus respectivement des colonies A et B pour se reproduire. Dans le premier paysage (de type bocage) les deux individus se servent de points de repères pour se déplacer (arbres) et peuvent se rencontrer pour se reproduire. Dans le second paysage (de type plaine agricole), les individus ne détectent pas de points de repères pour se déplacer et se reproduisent donc dans leurs colonies respectives. Si les individus de différentes colonies ne peuvent plus se rencontrer et se reproduire à cause de ces barrières, alors chaque colonie va constituer sa propre population, plus petite que la population initiale. Or la taille de la population est un facteur primordial de la viabilité d'une population car plus elle diminue, plus le risque d'extinction augmente, notamment du fait des conséquences génétiques et démographiques (Frankham 1996; Gilpin et Soulé 1986).

En France, on estime la présence d'environ 40 000 individus dont la distribution est très hétérogène au sein du pays (Figure 13; SFEPM, 2014). Les effectifs les plus abondants semblent concentrés dans l'Ouest de la France (Bretagne, Pays de la Loire, Centre, Nouvelle-Aquitaine) qui regroupe 46% des effectifs hivernaux et 37% des effectifs estivaux (SFEPM, 2014). L'ex région Poitou-Charentes concentre la quatrième plus grosse population hibernante nationale (7,000 individus) et la dixième plus grosse population estivale (2000 individus) de France. Cette ancienne région porte donc une responsabilité importante dans la conservation du Grand rhinolophe à l'échelle nationale. Or les premières analyses des données de comptages réalisées en 2015 suggéraient une diminution des effectifs hivernaux de 30% dans l'ex région. Ces observations ont conduit à classer le Grand rhinolophe comme Vulnérable (VU) sur la liste rouge des mammifères de Poitou-Charentes (Poitou-Charentes Nature, 2016).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude débutée en 2016, est de mieux comprendre le fonctionnement des populations de Grand rhinolophe en apportant des éléments sur (i) la « vulnérabilité » génétique des colonies : Quelle est la diversité génétique des colonies ? Détecte-t-on des signatures de consanguinité ? (ii) la connectivité des colonies : Peut-on identifier une ou plusieurs populations ? Certaines colonies sont-elles isolées ? Si oui quelles sont les barrières à ses déplacements ? et (iii) la taille des populations : Quelle est la taille 'génétique' des populations de Grand rhinolophe ? Détecte-t-on des signatures de déclin ou d'expansion récents des populations sur la base des données génétiques ? Ces signatures corroborent-elles le déclin observé sur les données de comptage disponibles depuis 1995 ?

2. Méthodologie

2.1. Echantillonnage

Nous avons tout d'abord réalisé un échantillonnage dense en ex-Poitou-Charentes en 2016 (onze sites). Cette échelle permettait de tester des barrières « fines » à la dispersion, telles que les grandes plaines agricoles et réseaux de transport évoqués précédemment. Nous avons élargi l'échantillonnage à l'Aquitaine et au Limousin en 2017 (trois sites supplémentaires) puis à une plus large partie du territoire français, une colonie du Pays Basque espagnol, deux colonies d'Angleterre et une colonie de Tunisie en 2018 grâce à la collaboration de nombreux partenaires nationaux et internationaux. Sur les trois années d'échantillonnage, cette étude a mobilisé 11 partenaires naturalistes en France (Poitou-Charentes Nature, LPO France, CREN Poitou-Charentes, Groupe Chiroptères des Pays-de-la-Loire, Groupe Chiroptères Aquitaine, Groupe Chiroptères du Groupe Mammalogique et Herpétologique du Limousin, Chauves-Souris Auvergne, Groupe Chiroptères de Provence, Groupe Mammalogique Normand, Amikiro, Coordination Mammalogique du Nord de la France), cinq partenaires académiques (CBGP, LBBE-Ecofect, Université du Pays Basque, l'Université de Sussex et l'Université de Montpellier) et plusieurs centaines de bénévoles.

Au total nous avons utilisé 950 prélèvements de patagium de Grand rhinolophe, dont 864 collectés dans 24 colonies de maternité en France (2016 à 2018), 28 d'une colonie de maternité du Pays Basque espagnol (2012), 36 de deux colonies de maternité anglaises (2018) et 22 d'une colonie de maternité tunisienne (2012) (Figure 16).

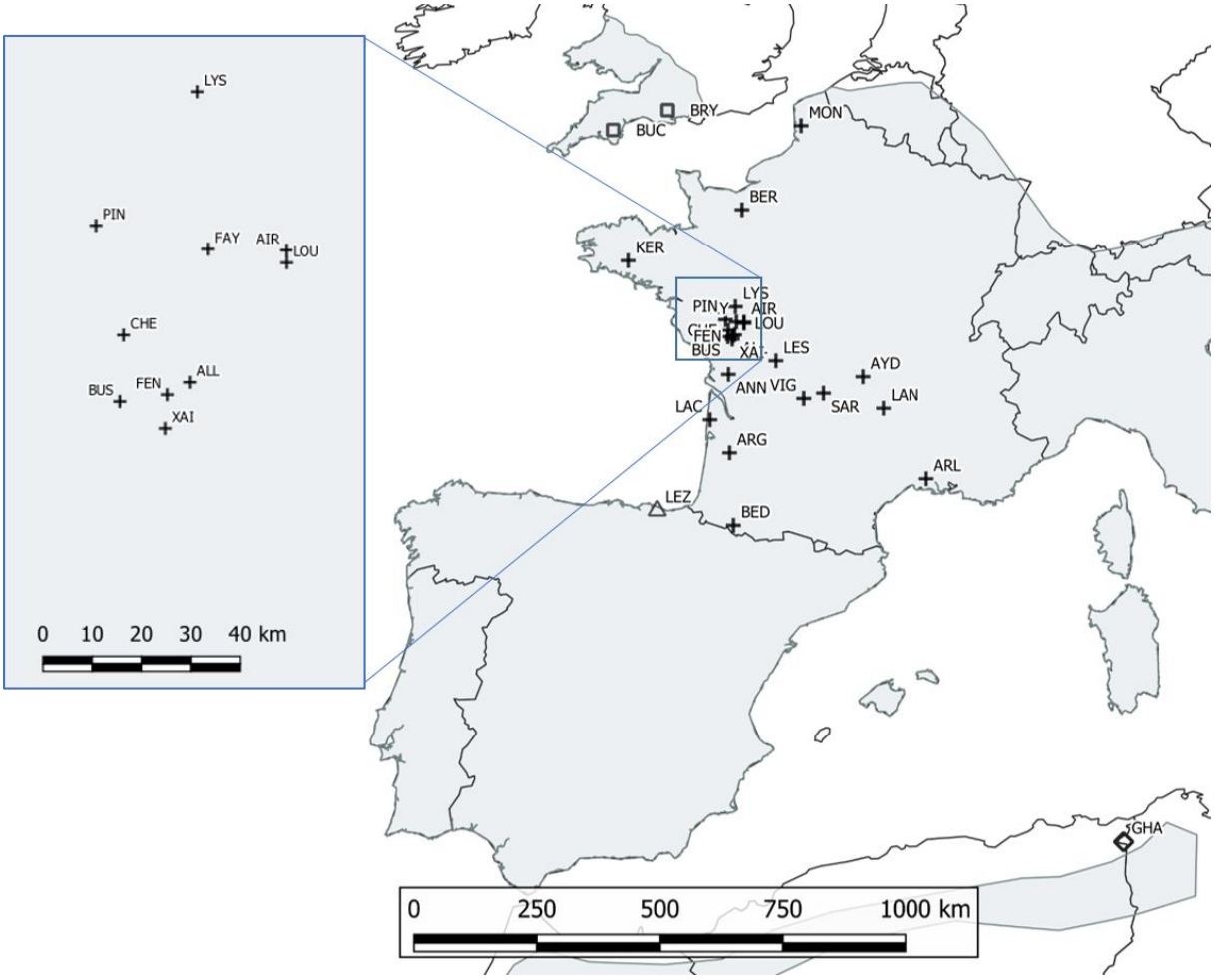


Figure 16. Carte des colonies échantillonnées pour l'étude. L'aire de répartition du Grand rhinolophe est représentée en gris (IUCN, 2016). Chaque colonie est nommée par un code : Bryanston (BRY), Buckfastleigh (BUC), Montreuil-sur-mer (MON), Kernascleden (KER), Lys-Haut-Layon (LYS), Allonne (ALL), Le Busseau (BUS), Le Pin (PIN), La Chapelle-Saint-Etienne (CHE), Xaintray (XAI), Airvault (AIR), Saint-Loup-sur-Thouet (LOU), Faye l'Abesse (FAY), Fenioux (FEN), Lessac (LES), Annepont (ANN), Sarran (SAR), Vignols (VIG), Aydat (AYD), Langeac (LAN), Lacanau (LAC), Argelouse (ARG), Arles (ARL), Bedous (BED), Lezate (LEZ), GHA. Les symboles (croix, carré, triangle, losange) indiquent le pays d'échantillonnage.

Les chauves-souris ont été capturées en sortie de gîtes à l'aide d'un piège harpe puis placées dans un sac de contention avant d'être identifiées, pesées, sexées, mesurées et relâchées (Figure 17). L'échantillonnage comprend 887 femelles dont 789 adultes, 91 juvéniles et sept dont l'âge n'a pas été déterminé, ainsi que 62 mâles dont 19 adultes, 39 juvéniles et quatre dont l'âge n'a pas été déterminé. Un individu supplémentaire est inclus mais le sexe et l'âge ne sont pas connus.

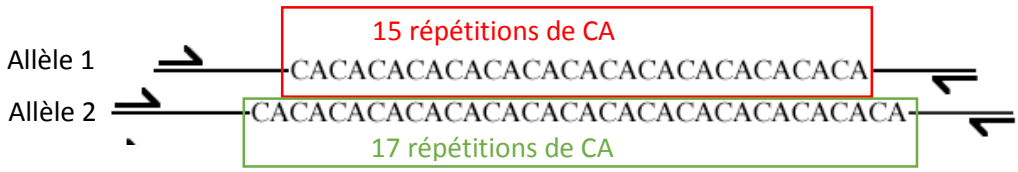


Figure 17. Photographies illustrant de gauche à droite : un « harp-trap » disposé en sortie de gîte (©N. Charbonnel), la mesure du 5ème doigt (D5) du Grand rhinolophe (© LPO49) et le prélèvement de patagium pour les analyses de génétique (© LPO49). Les deux dernières photos sont issues du rapport d'activité 2019 du programme Grand rhinolophe (Leuchtmann et al. 2019).

2.2. Biologie moléculaire

Nous avons génotypé ces 950 individus à l'aide de 17 marqueurs microsatellites autosomaux (Encadré 3) modifié par Anne Loiseau (INRA, CBGP) d'après les séquences disponibles dans la littérature pour le Grand rhinolophe et le Petit rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) (Rossiter et al. 1999; Dawson et al. 2004; Puechmaille, Mathy, and Petit 2005). La lecture des génotypes a été réalisée en double aveugle avec Anne Loiseau afin de minimiser les erreurs de lecture. L'absence d'allèles nuls (polymorphisme dans les séquences flanquantes des loci qui empêche leur amplification par PCR et crée des faux négatifs), de déséquilibre de liaison

(association non aléatoire entre deux allèles) et d'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg ('HWE' ; en l'absence de forces évolutives au sein d'une population idéale, il existe un équilibre des fréquences allélique et génotypique d'une génération à l'autre) a été vérifiée.



Si Allèle 1 = Allèle 2 : individu homozygote pour le microsatellite étudié
Si Allèle 1 ≠ Allèle 2 : individu hétérozygote pour le microsatellite étudié

Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN couramment utilisées en génétique des populations. Ce sont des régions de l'ADN qui ont pour particularité de varier en longueur (allèles), par variation du nombre de répétition du motif qui le compose. Le cas ci-dessus illustre deux allèles d'un microsatellite : l'un est composé de 15 répétitions du motif « CA » et l'autre de 17 répétitions de ce même motif.

Encadré 3. Qu'est-ce qu'un marqueur microsatellite ?

2.3. Diversité génétique

Nous avons évalué la diversité génétique au sein des colonies en estimant la richesse allélique corrigée pour la taille minimale de l'échantillon (A_r, N = 13) et l'hétérozygotie attendue (H_e) à l'aide des logiciels FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 1995) et GENETIX v.4.05.2 (Belkhir et al. 2004). Nous avons ensuite estimé et testé la significativité de l'indice de fixation F_{IS} (Weir et Cockerham 1984) avec le logiciel GENEPOP v4.6 (Rousset, 2008). C'est une mesure de l'écart à la panmixie (déficit d'hétérozygote) dû à la consanguinité du régime de reproduction au sein de la population. Enfin, afin de déterminer si les colonies représentaient des structures familiales nous avons estimé le coefficient d'apparentement (*r*) par maximum de vraisemblance entre paires d'individus sur une échelle absolue (0, non apparentés à 1, individus identiques). Le coefficient *r* correspond à la probabilité pour chaque locus que les

individus partagent zéro, un ou deux allèles identiques par descendance. Nous avons utilisé les groupes génétiques identifiés à partir des analyses de structure génétique décrites ci-dessous pour définir les populations de références et estimer *r* au sein de chaque colonie. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel ML-RELATE (Kalinowski, Wagner, & Taper, 2006).

2.4. Structure génétique

La différenciation génétique entre les colonies a d'abord été quantifiée à l'aide d'estimations de F_{ST} (Weir et Cockerham 1984). Cet indice mesure le degré de différenciation entre populations qui divergent uniquement sous l'effet de la dérive (variation aléatoire des fréquences alléliques au sein d'une population). La significativité de cette différenciation a été testée à l'aide de tests G exacts de différenciation pour chaque paire de colonies puis pour chaque paire de groupes génétiques identifiés ci-dessous.

Nous avons ensuite exploré la structure génétique des colonies à l'aide de plusieurs méthodes pour vérifier la robustesse de nos résultats (Tableau 1). Tout d'abord nous avons employé le logiciel STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard, Stephens, et Donnelly 2000) avec différents paramètres qui peuvent fortement influencer le résultat. Nous avons ensuite effectué une analyse en composantes principales (ACP) car contrairement à l'algorithme STRUCTURE, cette approche ne repose sur aucune hypothèse génétique de population spécifique, notamment l'équilibre de Hardy-Weinberg et l'équilibre de liaison (Pritchard, Stephens, et Donnelly 2000). Enfin nous avons utilisé le logiciel MAPI (*Mapping Averaged Pairwise Information*, Piry et al. 2016) pour détecter la (dis-) continuité génétique spatiale. Cette approche est peu sensible aux potentiels effets confondants de l'isolement par la distance (IBD) et ne nécessite pas de modèle génétique de population prédéfini.

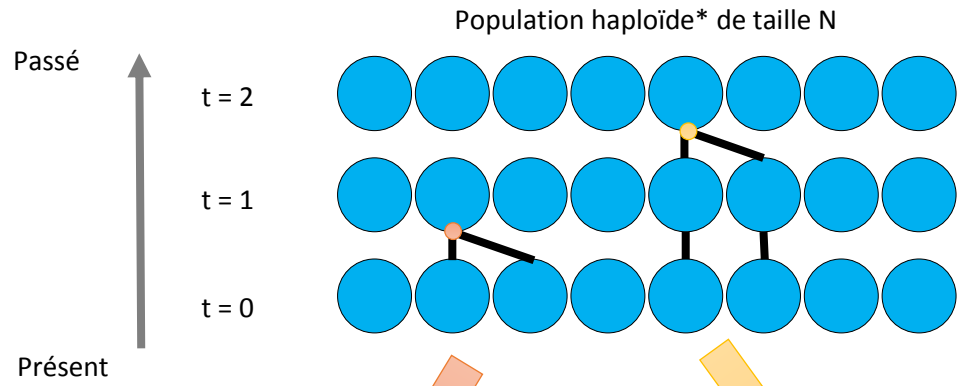
Enfin, l'isolement par la distance (IBD) a été analysé à partir de la régression entre l'estimation de la différenciation génétique entre paires de colonies (F_{ST}/(1-F_{ST}), Rousset, 1997) et la distance géographique euclidienne (en logarithme). Un isolement par la distance significatif indique que plus les individus sont éloignés géographiquement, plus ils seront différents génétiquement. Les analyses IBD ont été effectuées sur l'ensemble des données, en France et entre les paires de colonies échantillonnées dans les différents pays avec GENEPOP v4.6 (Rousset, 2008).

2.5. Histoire démographique

Nous avons utilisé le modèle OnePopVarSize, du logiciel MIGRAINE v.0.5.1 (Leblois et al. 2014) qui autorise une seule variation de taille de population sans *a priori* sur la nature (déclin, expansion) et l'ancienneté de l'événement démographique. Ce modèle fait l'hypothèse d'un changement de taille de population exponentiel (expansion ou contraction), dans une population panmictique isolée, initié à un temps de T générations dans le passé jusqu'au moment de l'échantillonnage. Trois paramètres sont estimés : la taille de population diploïde actuelle et ancestrale ($\theta = 4N\mu$; $\theta_{anc} = 4N_{anc}\mu$) - où N et N_{anc} sont le nombre de gènes et μ le taux de mutation sur l'ensemble des loci par génération (*generalized stepwise mutation model* GSM) et D le moment où a commencé le changement démographique (D=T/2N). L'ensemble des estimations repose sur des analyses de maximum de vraisemblance basées sur la coalescence (Encadré 4).

Tableau 1. Avantages et contraintes des différentes méthodes utilisées dans cette étude pour déterminer la structure génétique des colonies de Grand rhinolophe.

Méthodes	Conditions d'application	Avantages	Logiciel
Clustering - Modèle hiérarchique bayésien	- Population à l'équilibre d'Hardy-Weinberg - Equilibre de liaison - Indépendance entre loci - Equiprobabilité entre les populations d'être la population d'origine - La population d'origine est échantillonnée	- Estime le degré d'introgression des individus	STRUCTURE (Pritchard, Stephens, et Donnelly 2000)
Analyse de données multidimensionnelles - Analyse en Composantes Principales (ACP)	- Pas de condition mais le minimum de différenciation génétique détectable dépend de la taille de l'échantillon et du nombre de marqueurs	- Rapidité d'analyse - Pas de modèle génétique sous-jacent	*adegenet* (Jombart 2008)
Analyse de la variation spatiale de la distance génétique entre échantillons géo référencés	- Structure génétique spatiale	- Peu sensible au phénomène d'isolement par la distance - Pas de modèle génétique sous-jacent	MAPI (Piry et al. 2016)



Les différentes lignées coalescent (« probabilité que deux allèles possèdent un parent commun ») au fur et à mesure que l'on remonte vers le passé.

Probabilité de coalescer (t = ●) = $\frac{1}{N}$

Probabiilité de coalescer (t = ●) = (Probabilité de ne pas avoir coalescé à t=1)*(probabilité de coalescer à t=2)

$$= \left(1 - \frac{1}{N}\right) * \frac{1}{N}$$

La coalescence reconstruit la généalogie des gènes. Pour cela elle modélise le processus de dérive génétique en remontant dans le temps jusqu'à l'ancêtre commun d'un échantillon de gènes. Dans le cas le plus simple, la théorie de la coalescence suppose qu'il n'y a ni recombinaison, ni sélection naturelle, ni flux de gènes, et que la population n'est pas structurée.

*Haploïde signifie que les individus de cette population ne possédent qu'un exemplaire de chaque chromosome.

Encadré 4. Principe de la coalescence.

3. Principaux résultats

3.1. Diversité génétique, consanguinité et apparentements

Nos résultats montrent que la diversité génétique est élevée et homogène en France et au Pays Basque espagnol, à l'exception de la colonie française de Montreuil-sur-Mer ('MON', Pas-de-Calais) où la diversité génétique est plus faible (Figure 18). Nous observons également que les niveaux de diversité génétique des colonies anglaises et tunisiennes sont plus faibles que ceux détectés pour les colonies continentales. De plus, nous n'avons pas détecté de signature de consanguinité au sein des colonies étudiées.

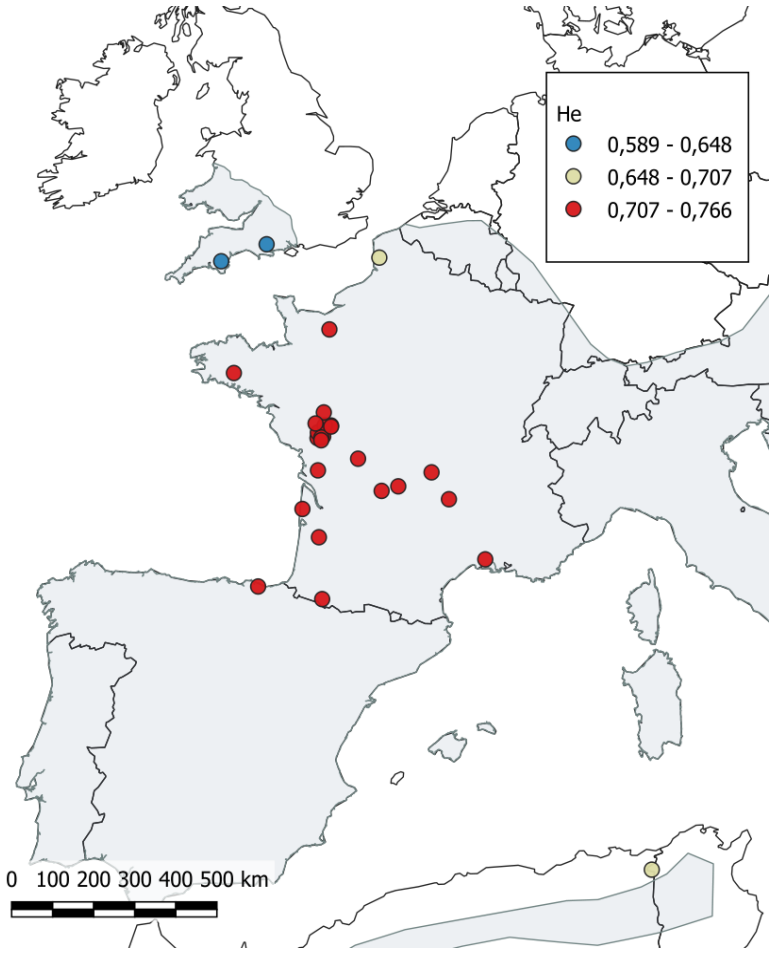


Figure 18. Estimation de la diversité génétique (indice d'hétérozygotie H_e) dans chaque colonie échantillonnée. L'aire de distribution du Grand rhinolophe d'après les données de l'UICN (2016) est représentée en gris.

L'analyse de la distribution du coefficient d'apparentement *r* intra-colonie montre que chaque colonie est composée en très grande majorité d'individus non-apparentés et d'une proportion décroissante d'individus apparentés. Seule la colonie du Pas-de-Calais à Montreuil-sur-Mer ('MON') montre une proportion plus uniforme d'individus apparentés et non-apparentés. Le coefficient d'apparentement *r* entre individus de colonies différentes nous indique de forts apparentements ($r > 0.5$) entre colonies éloignées de 2 à 861km. Ces forts apparentements impliquent 537 femelles, 33 mâles et un individu dont le sexe n'a pas été déterminé. La majorité des femelles impliquées sont adultes (474 adultes, 59 juvéniles et 4 indéterminées), ce qui n'est pas le cas pour les mâles (12 adultes, 19 juvéniles, deux indéterminés).

3.1. Différenciation génétique entre colonies

La différenciation génétique est faible sur le continent (indices de différenciation F_{ST} inférieurs à 3%). Seule la colonie 'MON' (Montreuil-sur-Mer, Pas-de-Calais) montre une différenciation génétique forte avec les autres colonies continentales ($3.49\% < F_{ST} < 6.46\%$). Cette différenciation entre 'MON' et les autres colonies de France est aussi élevée que la différenciation génétique observée entre les colonies d'Angleterre ($F_{ST} = 5.4\%$). La différenciation génétique entre les colonies anglaises, tunisiennes et les colonies continentales est très élevée ($F_{STAngleterre-\ continent} \approx 10\%$, $F_{STTunisie-continent} \approx 12\%$).

L'ensemble des méthodes utilisées montre l'existence de trois groupes génétiques : (i) les colonies de France et du Pays Basque espagnol, (ii) les colonies anglaises et (iii) la colonie tunisienne (Figure 19). Nos résultats ont révélé l'absence de migration génétique entre ces trois groupes génétiques, et des événements de migration génétique unidirectionnels au sein

du cluster génétique Franco-Basque (de la France vers le Pays Basque et vers la colonie 'MON').

3.3. Histoire démographique

Nous n'avons pas détecté de changement démographique (déclin ou expansion) significatif dans les groupes génétiques identifiés précédemment. Ceci indique que les 'effectifs efficaces' (nombre d'adultes participant à la génération suivante) de ces groupes peuvent être considérés comme stables. Nous avons pu estimer leur taille génétique, ce qui a révélé des 'effectifs efficaces' environ deux fois plus faibles en Angleterre et dans la colonie du Nord de la France (Montreuil-sur-Mer, 'MON') que sur le continent.

Nous avons mis en évidence une signature d'expansion démographique significative dans la colonie Tunisienne ('GHA'). Nous n'avons cependant pas pu dater cette expansion par manque de puissance statistique car l'intervalle de confiance est trop grand.

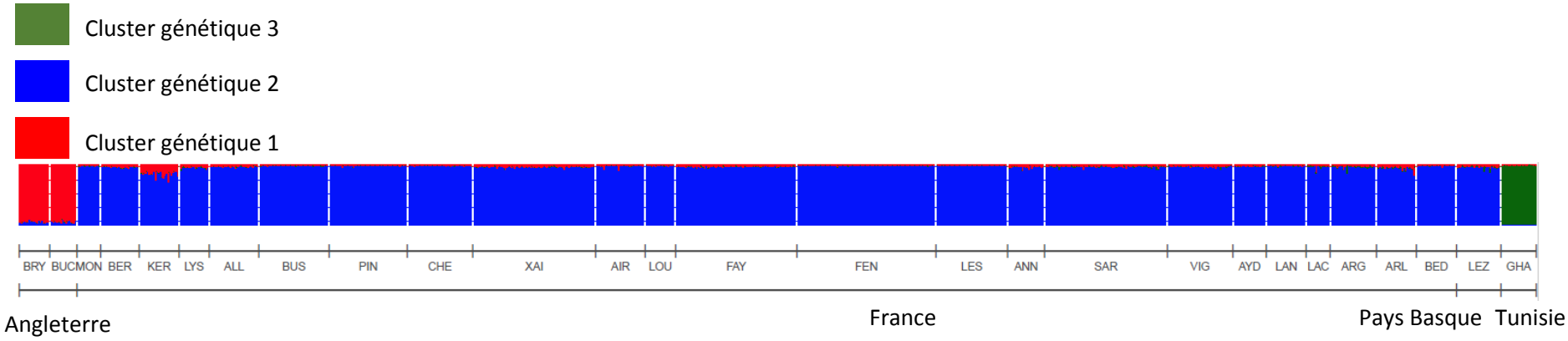


Figure 19. Graphe représentant la probabilité d'appartenance d'un individu à un groupe génétique (logiciel STRUCTURE). Chaque barre verticale correspond à un individu et chaque couleur correspond à un groupe génétique. Les individus sont triés par colonies et une barre blanche en pointillé sépare les différentes colonies.

4. Discussion

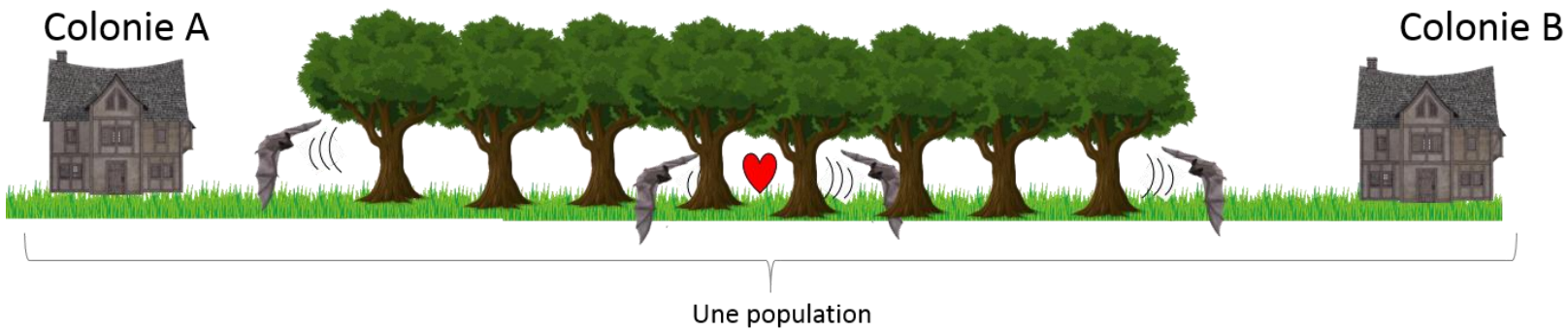
Notre étude a révélé que les colonies de Grand rhinolophe échantillonnées en France et au Sud-Ouest des Pyrénées (Pays Basque espagnol) forment une large population, malgré les différentes barrières paysagères potentiellement présentes (fleuve, fragmentation des surfaces boisées). Cette grande population Franco-Basque montre une diversité génétique élevée et aucune signature de consanguinité, ce qui permet d'écarter un risque d'extinction dû à des phénomènes génétiques. Cette population serait délimitée au nord par la Manche et très probablement au sud par la Mer Méditerranée. Notre échantillonnage ne nous permet pas de tester l'hypothèse que les Pyrénées constituent une barrière aux flux de gènes, du fait de l'utilisation possible de corridors sur les côtes Atlantiques et Méditerranéennes. Pour tester l'effet de ces potentielles barrières, l'échantillonnage devrait être renforcés de part et d'autres de celles-ci. L'absence d'échantillonnage dans l'Est de la France ne nous permet pas non plus de mettre en évidence la limite Est de la population.

Grâce à ces résultats d'analyses génétiques et aux données préliminaires de transpondage acquises sur les Grands rhinolophes, nous savons désormais que juvéniles, adultes, mâles et femelles se déplacent sur de longues distances au sein de cette région et dans les régions voisines (M. Leuchtmann & O. Filippi-Codaccioni, comm. pers. 2019). Ce résultat peut sembler contradictoire avec les précédentes données de Pinaud et al. (2018) qui montraient à l'échelle de la colonie une forte diminution de la probabilité de déplacement du Grand rhinolophe face à des ruptures de la connectivité paysagère. Ces études suggèrent en fait que le Grand rhinolophe prendrait plus de risques face aux absences de « repères paysagers » structurants lors de ses grands déplacements inter-saisonniers que lors de ses déplacements vers les terrains de chasse autour de la colonie (Figure 20). D'un point de vue

démographique, nous avons montré que la taille génétique de cette population Franco-Basque est stable. Nous n'avons pas pu convertir cette taille génétique en nombre d'individus participant à la reproduction (« taille efficace », N_e), ni en en nombre total d'individus adultes (propagation du biais) du fait de nombreux biais notamment sur le taux de mutation μ qui est inconnu pour cette espèce (Luikart et al. 2010; Vonhof, Strobeck, et Fenton 2008). Cela souligne le fait que les approches génétiques sont complémentaires de celles de suivis des individus et colonies et qu'à ce jour l'une ne peut pas se substituer à l'autre.

Ainsi, nos résultats soulignent l'importance d'approfondir les connaissances sur la délimitation des populations du Grand rhinolophe, et plus généralement des chauves-souris, car celles-ci ne suivent pas les frontières administratives et leur conservation peut nécessiter des collaborations inter-régionales voire internationales.

De plus, nous avons montré que la colonie du Pas-de-Calais Montreuil-sur-mer ('MON') - bien qu'intégrée dans la grande population continentale - possède un fonctionnement particulier. Sa diversité génétique plus faible, sa différenciation génétique plus élevée et son niveau d'apparentement intra-colonie plus fort suggèrent que cette colonie est plus petite, plus isolée et donc plus vulnérable. Cette situation pourrait être due à un manque d'habitats favorables aux alentours de la colonie, et/ou à sa situation en limite d'aire de répartition de l'espèce (Eckert, Samis, et Lougheed 2008). Cette colonie nécessite donc une attention particulière en termes de conservation.



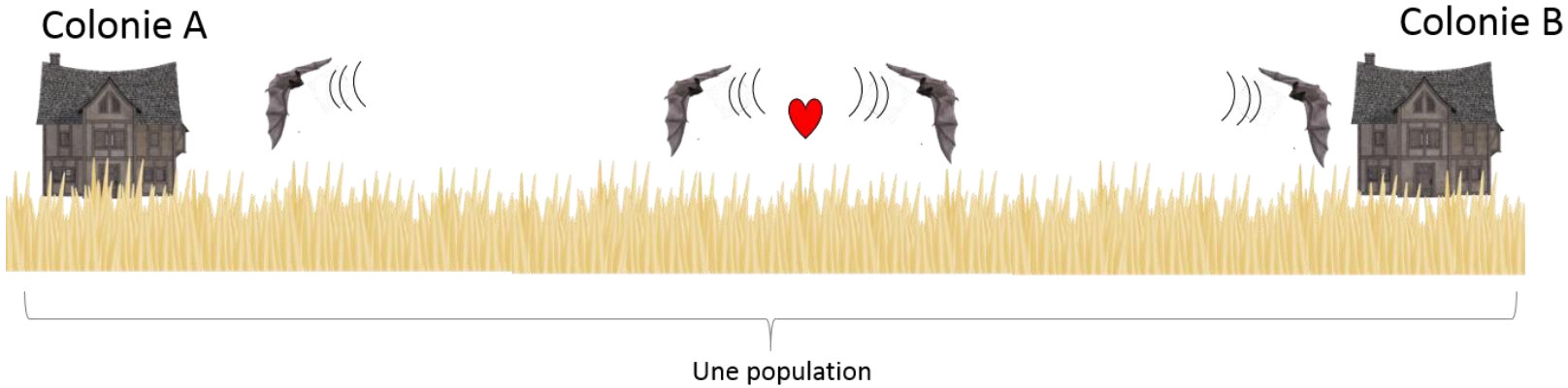


Figure 20. Retour sur l'hypothèse initiale de l'étude. Contrairement à nos attentes, malgré une courte distance de détection cette espèce pourrait effectuer des trajets dans des milieux ouverts pour aller se reproduire (absence de structure génétique du Pays Basque espagnol au Nord de la France).

Il serait donc particulièrement pertinent de compléter l'étude avec d'autres colonies limitrophes au nord de l'aire de distribution du Grand rhinolophe. Cela montre à nouveau l'importance de poursuivre les suivis des colonies à l'échelle locale puisque que bien que la grande population soit stable grâce à la forte connectivité entre les colonies, on ne peut pas exclure que localement certaines colonies particulières soient vulnérables. L'étude des relations entre les colonies proches de MON serait une piste intéressante à creuser.

Article 1. Integrating population genetics to define conservation units from the core to the edge of *Rhinolophus ferrumequinum* western range

Received: 19 July 2019 | Revised: 11 September 2019 | Accepted: 11 September 2019

DOI: 10.1002/ece3.5714

ORIGINAL RESEARCH

Ecology and Evolution Open Access WILEY

Integrating population genetics to define conservation units from the core to the edge of *Rhinolophus ferrumequinum* western range

Orianne Tournayre[1] | Jean-Baptiste Pons[2] | Maxime Leuchtmann[3] | Raphael Leblois[1] | Sylvain Piry[1] | Ondine Filippi-Codaccioni[2] | Anne Loiseau[1] | Jeanne Duhayer[2] | Inazio Garin[4] | Fiona Mathews[5] | Sébastien Puechmaille[6,7] | Nathalie Charbonnel[1] | Dominique Pontier[2,8]

[1]CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montferrier-sur-Lez Cedex, France

[2]LabEx ECOFECT «Ecoevolutionary Dynamics of Infectious Diseases», Université de Lyon, Lyon, France

[3]Nature Environnement, Surgères, France

[4]Department of Zoology and Animal Cell Biology, University of the Basque Country, Leioa, The Basque Country

[5]College of Life Sciences, University of Sussex, Falmer, UK

[6]ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

[7]Groupe Chiroptères de Midi-Pyrénées (CREN-GCMP), Toulouse, France

[8]CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR5558, Université Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne, France

Correspondence
Orianne Tournayre, CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montferrier-sur-Lez Cedex, France.
Email: orianne.tournayre@supagro.fr

Funding information
LABEX CEMEB, Grant/Award Number: ANR-11-IDEX-0007; Nouvelle-Aquitaine region; LABEX ECOFECT, Grant/Award Number: ANR-11-LABX-0048; European

Abstract

The greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) is among the most widespread bat species in Europe but it has experienced severe declines, especially in Northern Europe. This species is listed Near Threatened in the European *IUCN Red List of Threatened Animals*, and it is considered to be highly sensitive to human activities and particularly to habitat fragmentation. Therefore, understanding the population boundaries and demographic history of populations of this species is of primary importance to assess relevant conservation strategies. In this study, we used 17 microsatellite markers to assess the genetic diversity, the genetic structure, and the demographic history of *R. ferrumequinum* colonies in the western part of its distribution. We identified one large population showing high levels of genetic diversity and large population size. Lower estimates were found in England and northern France. Analyses of clustering and isolation by distance suggested that the Channel and the Mediterranean seas could impede *R. ferrumequinum* gene flow. These results provide important information to improve the delineation of *R. ferrumequinum* management units. We suggest that a large management unit corresponding to the population ranging from Spanish Basque Country to northern France must be considered. Particular attention should be given to mating territories as they seem to play a key role in maintaining high levels of genetic mixing between colonies. Smaller management units corresponding to English and northern France colonies must also be implemented. These insular or peripheral colonies could be at higher risk of extinction in the near future.

Pons, Leuchtmann, Leblois, and Piry contributed equally.

Filippi-Codaccioni, Loiseau, and Duhayer contributed equally.

Garin, Mathews, and Puechmaille contributed equally.

Charbonnel and Pontier contributed equally and are senior authors.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2019 The Authors. *Ecology and Evolution* published by John Wiley & Sons Ltd.

Regional Development Fund; DREAL Nouvelle-Aquitaine

KEYWORDS
Chiroptera, connectivity, conservation, demographic inference, microsatellites, population genetics

1 | INTRODUCTION

Biodiversity is dramatically declining at an accelerating rate for most animal groups (Butchart et al., 2010; Hoffmann et al., 2010; Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019). According to the IUCN Red List, more than 26,500 species (27% of all assessed species) are threatened with extinction. This phenomenon results from a combination of ecological factors (e.g., habitat fragmentation and destruction, pollution, introduction of invasive species, and climate change) that affect population sizes and connectivity. As a consequence, these populations become strongly exposed to the negative impacts of inbreeding and genetic drift (Frankham, 2005). Preserving the genetic diversity of such small and isolated populations is therefore essential to avoid inbreeding depression, to maintain genetic variability that may be useful for adaptation, in particular in response to environmental changes, and ultimately, to promote population persistence (Reed & Frankam, 2003). To address this issue and before drawing efficient conservation programs, an important prerequisite is to gather knowledge on population boundaries and demography. In recent decades, population genetics has been combined with more classical ecological studies to infer population demographic features, including the detection of recent demographic declines or the quantification of connectivity between populations (e.g., Vignaud et al., 2014; Vonhof & Russell, 2015). Ultimately, these population genetics studies may help delineating functional and evolutionary conservation units such as "Management Units," which are appropriate for species monitoring and management. There are several ways to define management units, among which are the assessment of panmixia (Moritz, 1994) or the estimation of population genetic divergence (Palsbøll, Bérubé, & Allendorf, 2007). Designing appropriate management units is thus far from being trivial. There is no general framework for determining at which dispersal rate populations become demographically correlated (therefore requiring a single management unit), and there is no easy way to translate gene flow estimates provided by population genetics into dispersal rates. Yet, too large units may increase the risk of extinction of "cryptic" populations that would require specific strategies. On the other hand, splitting a large population into different conservation units with different strategies may lead to excessive management strategies beyond requirements, or to inappropriate strategies limiting connectivity.

The application of population genetics to such issues of conservation biology has been especially important for endangered species that are difficult to monitor with ecological methods, such as bats. Indeed, bats are very sensitive to climate change and human activities (Jones, Jacobs, Kunz, Willig, & Racey, 2009; Voigt & Kingston, 2016). Almost one-quarter of bat species in the world are considered to be Threatened and another quarter as Near Threatened (Mickleburgh, Hutson, & Racey, 2002). Temperate-zone bats are nocturnal, small, highly mobile, and the location of their roosts are often poorly known, characteristics that make monitoring and assessment of their extinction risk difficult (O'Shea, Bogan, & Ellison, 2003). Conservation programs are often established considering local and national scales. Unfortunately, these scales are usually not defined on the basis of biological knowledge on population delineation and demography, but instead conform to administrative borders that rarely correspond to natural ecological boundaries. This is likely to limit the efficiency and coherence of conservation strategies. Population genetics might therefore improve the definition of appropriate management units of bat populations (e.g., Dool, O'Donnell, Monks, Puechmaille, & Kerth, 2016; Ibouroi et al., 2018). Besides, demographic inferences based on population genetics may be particularly relevant to highlight the need of conservation management for bat species. As such, Durrant, Beebee, Greenaway, and Hill (2009) have been able to evidence a recent decline and high levels of inbreeding in British populations of Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*).

Among European bat species, the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) is particularly relevant to address conservation issues from population genetics. This insectivorous species—which seasonally uses hibernation and maternity roosts—has experienced dramatic declines, particularly in Northern Europe (e.g., Belgium, Luxembourg, England) where it is now considered rare or extinct (Kervyn, Lamotte, Nyssen, & Verschuren, 2009; Mathews et al., 2018; Pir, 2009). In some countries, such as the UK, there is evidence of recent population increases (Mathews et al., 2018). The species is included in Appendix II of Bern Convention, Appendix II of the Bonn Convention, Annex II and Annex IV of the European Directive on the conservation of Natural Habitat and of Wild Fauna and Flora, and is listed in the *IUCN Red List of Threatened Animals* (International Union for the Conservation of Nature, 2017). The reasons for the disappearance of the populations of *R. ferrumequinum* are difficult to identify but it is likely that anthropogenic factors (e.g., intensification of agriculture, urbanization, and loss of roosts) are responsible for it (Froidevaux, Boughey, Barlow, & Jones, 2017; Mathews et al., 2018). It is therefore important to implement conservation programs, at adequate geographical scales and based on a solid knowledge of *R. ferrumequinum* population dynamics.

Previous phylogeographic studies of *R. ferrumequinum* have revealed a unique genetic cluster in Western Europe mainland, ranging from Portugal to Italy (Switzerland apart), that resulted from the expansion of a single population originating from a Western Asian refugium (Flanders et al., 2009; Rossiter, Benda, Dietz, Zhang, & Jones, 2007). However, these studies are based on sparse sampling, especially in mainland Europe (e.g., one location in France). Yet, where

populations have been intensively sampled, a strong genetic differentiation was observed at smaller spatial scales (over tens to several hundreds of kilometers), for instance, within the United Kingdom (Rossiter, Jones, Ransome, & Barrattt, 2000). These patterns underline the importance of sampling density in population genetics studies to detect finer genetic clustering and particular population functioning (e.g., source–sink dynamics), despite an apparent lack of genetic differentiation detected over thousands of kilometers. More specifically, only one French location of *R. ferrumequinum* had been included in these previous phylogeographic studies (Flanders et al., 2009; Rossiter et al., 2007, 2000). However, *R. ferrumequinum* distribution in France is very disparate, and its status can be very contrasted between regions (Vincent & Bat Group SFEPM, 2014). These patterns are suggestive of differences in population size, connectivity levels, and therefore extinction risk. Most of the known roosts of *R. ferrumequinum* in France are located on the Atlantic coast (Vincent & Bat Group SFEPM, 2014). The 4th largest hibernating population (about 7,000 individuals) and the 10th largest summer population (about 2,000 individuals) are found in the Poitou-Charentes region. This region has therefore a strong conservation responsibility to preserve this species, and several programs have been dedicated to study *R. ferrumequinum* at this regional scale. *R. ferrumequinum* population dynamics are being assessed using counts of individuals performed in hibernation and summer roosts by local NGOs for over three decades. *R. ferrumequinum* experiences important seasonal fluctuations in abundance that reflect seasonal changes of roosts. These fluctuations suggest large movements and potential gene flow of bats during winter and summer. However, we still have only limited knowledge about connectivity and genetic mixing between French *R. ferrumequinum* colonies.

In this study, we proposed to identify population boundaries of *R. ferrumequinum* in its western distribution and to infer the demographic history of these populations. More specifically, we aimed at assessing the biological relevance of considering the French Poitou-Charentes region as a singular Management Unit (MU), as it is currently done on the basis of political constraints. We combined several population genetics approaches based on a dense sampling of *R. ferrumequinum* maternity colonies in the Poitou-Charentes region and we also added further samples in France, encompassing the northern edge of *R. ferrumequinum* distribution, Spanish Basque Country, England, and Tunisia. This sampling scheme, based on concentric circles of sampling, should be able to identify at which geographical scales *R. ferrumequinum* gene flow may decrease with distance. It should also allow testing for gene flow disruption that might result from population divergence associated with geographic elements such as seas or mountains. We estimated the genetic diversity and genetic effective size of colonies. These are important criteria to assess population viability, so that they may be useful to infer conservation priority. We expected lower levels of genetic diversity and higher levels of genetic differentiation at the edge of *R. ferrumequinum* distribution range. Indeed, peripheral populations are likely to suffer from reduced gene flow, genetic drift, and small effective population size, compared to central populations (central-margin hypothesis, Eckert, Samis, & Lougheed, 2008). In addition, we examined patterns of genetic differentiation to evaluate the connectivity between *R. ferrumequinum* colonies. We expected a disruption of gene flow between colonies located on either side of the Mediterranean Sea or Channel Sea, as it has already been shown that sea is a barrier to dispersal for several bat species (Castella et al., 2000; García-Mudarra, Ibáñez, & Juste, 2009). Considering previous studies, we did not expect a strong disruption of gene flow due to the Pyrenees between French and Spanish Basque colonies (Rossiter et al., 2007).

Altogether, our results provide important information about *R. ferrumequinum* population genetics that will complement ecological knowledge gathered by local NGOs to define appropriate management units. In this study, we assumed an intermediate MU definition between those of Moritz (1994) and Palsbøll et al. (2007). Both academic and nonacademic partners were involved in this work to guarantee that the results would directly inform conservation and management action (Britt, Haworth, Johnson, Martchenko, & Shafer, 2018). More broadly, this study illustrates how population genetics may bring important information to delineate bat management units and to design conservation programs of bat species at relevant geographical scales.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Ethical statements

Authorization for bat capture in France was provided by the Ministry of Ecology, Environment and Sustainable development over the period 2015–2020 (approval no. C692660703 from the Departmental Direction of Population Protection (DDPP), Rhone, France). All methods were approved by the Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN) and the Société Française pour l'Étude et la Protection des Mammifères (SFEPM). Authorization for bat captures in Spanish Basque Country was provided by the corresponding regional Ministries and Councils. Capture and handling protocols followed published guidelines for treatment of animals in research and teaching (Buchanan et al., 2012) and were approved by the Ethics Committee at the University of the Basque Country (Ref. CEBA/219/2012/GARIN ATORRASAGASTI). Authorization for capture in England was given by Natural England (Ref. 2017-29766-SCI-SCI) and sampling was undertaken under license from the Home Office (PPL 3003431).

2.2 | Biological material

This study is based on 950 captured individuals: 864 were captured in 23 maternity colonies in France (summer 2016 to 2018), 28 were captured in one maternity colony in the Spanish Basque Country (summer 2012), 36 were captured in two maternity colonies in England (summer 2018), and 22 were captured in one maternity colony in Tunisia (Puechmaille, Hizem, Allegrini, & Abiadh, 2012). Details are provided in Table 1 and Figure 1. Maternity

TABLE 1 Genetic diversity parameters for each locality studied in France, Spanish Basque Country, England, and Tunisia

Region	Locality code	Locality	*N*	A_r	*pA*	H_e	F_{IS}
France							
Poitou-Charentes region	AIR	Airvault	31	6.46	0.02	0.74	0.036
	ALL	Allonne	31	6.67	0.03	0.76	0.008
	ANN	Annepont	23	6.42	0.1	0.72	0.027
	BUS	Le Busseau	44	6.74	0.07	0.76	0.006
	CHE	La Chapelle-Saint-Etienne	41	6.35	0.02	0.75	0.006
	FAY	Faye l'Abesse	76	6.57	0.04	0.75	0.032
	FEN	Fenioux	87	6.51	0.04	0.75	−0.006
	LES	Lessac	45	6.59	0	0.75	0.022
	LOU	Saint-Loup-sur-Thouet	19	6.54	0.02	0.73	0.030
	PIN	Le Pin	49	6.57	0.01	0.74	0.002
	XAI	Xaintray	77	6.77	0.04	0.76	0.002
	ARG	Argelouse	29	6.48	0.01	0.75	−0.001
	SAR	Sarran	77	6.78	0.04	0.76	0.008
	VIG	Vignols	41	6.45	0.03	0.75	−0.0001
	BED	Bedous	25	6.18	0.05	0.74	0.003
	LAC	Lacanau	15	6.96	0.03	0.73	0.039
	LAN	Langeac	25	6.31	0.04	0.74	−0.021
	AYD	Aydat	21	6.33	0	0.72	0.060
	KER	Kernascleden	25	6.08	0.03	0.74	−0.013
	LYS	Lys-Haut-Layon	19	6.72	0	0.75	0.020
	BER	Bernières d'Ailly	24	6.70	0.01	0.75	−0.030
	ARL	Arles	25	6.77	0.08	0.75	−0.022
	MON	Montreuil-sur-mer	15	5.53	0	0.67	−0.037
Spanish Basque Country	LEZ	Lezate	28	6.35	0.05	0.73	0.020
England	BRY	Bryanston	19	4.61	0	0.59	−0.004
	BUC	Buckfastleigh	17	4.90	0.07	0.60	0.120
North Africa	GHA	El Feidja National Park	22	6.69	0.97	0.68	0.002

Note: Sample size (*N*), corrected allelic richness (A_r), corrected private allele richness (*pA*), expected heterozygosity (H_e), and inbreeding coefficient (F_{IS}).

colonies correspond to the roosts where female bats gather from May to August, give birth, and rear their young (Ransome & Hutson, 2000). This sampling leads to unbalanced sex and age ratios, with 887 females, 62 males, and one undetermined, and 808 adults, 130 juveniles (less than two years old), and 12 undetermined, respectively. Distances between sampling colonies varied from 2.53 km (closest colonies from western France) to 1,830 km (colonies from England and Tunisia).

For each bat, a tissue sample was collected from the wing membrane (patagium) using a 3-mm diameter biopsy punch. Samples were either preserved in 95° ethanol and quickly stored at 4°C until DNA extraction or preserved in silica-gel (Puechmaille et al., 2011). Biopsy punches were cleaned with bleach, water, and then ethanol between each sample collection.

2.3 | DNA extraction and microsatellite genotyping

DNA was extracted from each wing sample using the EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit for Animal (BioBasic) following the manufacturer's instruction with a final elution of twice 50 µl in elution buffer. We amplified 17 microsatellite loci using primers modified from those previously designed for *R. ferrumequinum* (Dawson, Rossiter, Jones, & Faulkes, 2004; Rossiter, Burland, Jones, & Barratt, 1999) and the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus*

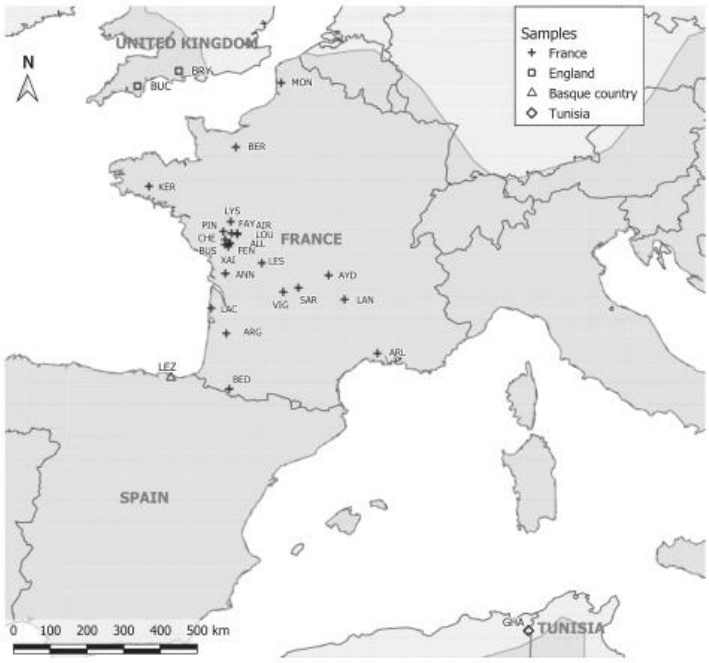


FIGURE 1 Map of the colonies included in this study. The geographic range of the species is colored in gray according to the IUCN data (2016). Bryanston (BRY), Buckfastleigh (BUC), Montreuil-sur-mer (MON), Kernascleden (KER), Lys-Haut-Layon (LYS), Allonne (ALL), Le Busseau (BUS), Le Pin (PIN), La Chapelle-Saint-Etienne (CHE), Xaintray (XAI), Airvault (AIR), Saint-Loup-sur-Thouet (LOU), Faye l'Abesse (FAY), Fenioux (FEN), Lessac (LES), Annepont (ANN), Sarran (SAR), Vignols (VIG), Aydat (AYD), Langeac (LAN), Lacanau (LAC), Argelouse (ARG), Arles (ARL), Bedous (BED), Lezate (LEZ), and El Feidja National Park (GHA)

hipposideros; Puechmaille, Mathy, & Petit, 2005; Table S1). Amplifications were organized into three multiplex PCRs that were conducted in 10 µl reaction volumes containing 5 µl of the QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (1×) (including *Taq*, dNTPs, and 3 mM of Mg_{2+} as final concentration), 2 µl of extracted DNA, and 0.2 µl of each primer (0.2 µM as final concentration). We used the following PCR conditions: 95°C for 15 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 90 s and 72°C for 60 s, and a final elongation step at 60°C for 30 min. Twenty microliters of H_2O was added to 10 µl of each product in a new plate, and 2 µl of this final solution was mixed with 15 µl of formamide and 0.08 µl of GeneScan 500 LIZ. The samples were genotyped using an ABI3130 automated sequencer and the GeneMapper v.5.0 software. Two independent readings were performed by different people to minimize genotyping errors.

Null alleles, large allele dropout, stuttering, and scoring inconsistencies were tested for each colony using MICROCHECKER (Van Oosterhout, Hutchinson, Wills, & Shipley, 2004). Null allele frequencies were estimated for each locus and population using FreeNA, with 1,500 replicates for the computation of the bootstrap 95% confidence intervals (Chapuis & Estoup, 2007). We performed the exact tests implemented in GENEPOP v4.6 (Rousset, 2008) to detect linkage disequilibrium for each pair of loci in each colony and to investigate departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for the whole dataset and for each colony and for each locus under the hypothesis of heterozygote deficit. We used the false discovery rate (FDR) to account for multiple testing (Benjamini & Hochberg, 1995). The adjusted *p*-value thresholds after FDR correction ($p_{critical}$) were calculated following Castro and Singer (2006).

2.4 | Genetic diversity and relatedness within colonies

We assessed genetic diversity within colony by estimating the allelic richness and private allele richness corrected for minimal sample size (A_r and pA, $N = 13$), the expected (H_e) heterozygosity, using FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995), HP-RARE (Kalinowski, 2005), and GENETIX v.4.05.2 (Belkhir, Borsa, Chikhi, Raufaste, & Bonhomme, 2004), respectively. Differences in A_r and H_e between colonies were evaluated using the comparison among groups of samples implemented in FSTAT with 1,000 permutations. The adjusted *p*-value thresholds after FDR correction ($p_{critical}$) were calculated following Castro and Singer (2006).

We estimated the fixation index F_{IS} (Weir & Cockerham, 1984) using GENEPOP v4.6. We next performed relatedness analyses to verify whether population genetic structure could not be due to the comparison of different family units rather than populations (Schweizer, Excoffier, & Heckel, 2007). We estimated the maximum likelihood pairwise coefficient of relatedness *r* between pairs of individuals on an absolute scale (0, unrelated to; 1, identical individuals), using the ML-RELATE software (Kalinowski, Wagner, & Taper, 2006). Indeed maximum likelihood estimate is less biased than commonly used estimators (Milligan, 2003). The coefficient *r* corresponds to the probability for each locus that individuals share

zero, one, or two alleles that are identical by descent. We used the genetic clusters identified from further clustering analyses (see below) as population references for estimating *r* within each colony.

2.5 | Population structure and genetic differentiation between colonies

The genetic differentiation between colonies was quantified using estimates of global and pairwise F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984). Significance was assessed using exact G-test of differentiation implemented in GENEPOP v4.6 (Rousset, 2008). Pairwise F_{ST} and exact G-tests were computed for each pair of colonies and each pair of genetic clusters identified from further clustering analyses. Analyses were performed with and without juveniles. We accounted for multiple testing using false discovery rate (FDR). In order to control for potential effects of null alleles on genetic differentiation, we also estimated pairwise F_{ST} corrected for null alleles using the "Excluding Null Alleles" (ENA) correction implemented in FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007).

Genetic structure was also investigated using several complementary approaches to give a robust cross-validation of our results and prove that the observed genetic signature is robust despite the potential violation of the underlying hypothesis. First, we used the clustering approach implemented in the STRUCTURE program v2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) to determine the presence of genetic discontinuities without any a priori knowledge. We determined the most likely number of genetic clusters using the log-likelihood of *K* and Δ*K* statistic (Evanno, Regnaut, & Goudet, 2005) implemented in the website STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012). We used the admixture model with uncorrelated frequencies and an alpha-value of 1/*K*, as recommended by Wang (2017) in the case of unbalanced sampling. The same results were obtained with the default alpha-value and when applying or not the LOCPRIOR model to the population model (Hubisz, Falush, Stephens, & Pritchard, 2009) and were therefore not presented here. Puechmaille (2016) demonstrated that the Δ*K* statistic was biased in the case of uneven sampling (as in our current study). However, in the present study, given the fact that three recovered clusters (see Section 3) were geographically coherent, were composed of colonies with nonsignificant or very low F_{ST} values (see Section 3), and were consistent with previous genetic findings, we did not perform further subsampling or used alternative estimators. We performed 20 independent runs with a burn-in period of 1,000,000 iterations and 50,000 MCMC repetitions after burn-in, testing $K = 1$ to $K = 28$ (*N* colonies + 1). We used the R package *pophelper* (Francis, 2017) to compute the plots. In addition, we also performed a principal component analysis (PCA) implemented in the R packages *ade4* (Dray & Dufour, 2007) and *factoextra* (Kassambara & Mundt, 2017). Contrary to STRUCTURE algorithm, this approach does not rely on any specific population genetic assumption including Hardy–Weinberg equilibrium and linkage equilibrium (Pritchard et al., 2000).

We next used MAPI program (Mapping Averaged Pairwise Information, Piry et al., 2016), implemented in the R package *mapi*, to detect spatial genetic discontinuity. This approach has low sensitivity to potential confounding effects resulting from isolation by distance (IBD) and does not require predefined population genetic model. It is based on a spatial network in which pairwise genetic distance between georeferenced samples is attributed to ellipses. A grid of hexagonal cells covers the study area and each cell receives the weighted arithmetic mean of the pairwise genetic distance associated to the ellipses intersecting the cell (Piry et al., 2016). We used the Rousset's coefficient $\hat{a}$ (Rousset, 2000) computed with SPAGeDi 1.4 (Hardy & Vekemans, 2002) as an index of pairwise genetic differentiation between individuals and default parameter value for the eccentricity of the ellipses (0.975). We used the permutation procedure (1,000 permutations) to identify areas exhibiting significantly higher or lower levels of genetic differentiation than expected by chance.

Lastly, isolation by distance (IBD) was analyzed with the regression of the genetic distances between colonies ($F_{ST}/1-F_{ST}$; Rousset, 1997) and the logarithm of the Euclidean geographic distances, implemented in GENEPOP v4.6. Confidence intervals and significance of regression slope and intercept were assessed by bootstrapping over loci. It was then tested using Mantel tests with 10,000 permutations. IBD analyses were performed on the complete dataset, within France and between pairs of colonies sampled in the different countries. The comparison of the results gathered from these IBD analyses should enable the identification of geographic barriers (Pyrenees mountain range, Channel Sea, and Mediterranean Sea) that might reduce *R. ferrumequinum* gene flow.

2.6 | Inference of demographic parameters

We first inferred the demographic history of *R. ferrumequinum* colonies. We used the software MIGRAINE v.0.5.1 (Leblois et al., 2014) and the model *OnePopVarSize*. This model assumes a unique variation starting *T* generations ago in population size of an isolated panmictic population that was followed by continuous exponential change in population size until the moment of sampling. This model estimates three scaled parameters: the current scaled population size ($\theta = 4N_e\mu$) and the ancestral scaled population size ($\theta_{anc} = 4N_{anc}\mu$). N_e and N_{anc} are the current and ancestral diploid population sizes, μ is the mutation rate per generation of the loci, and *D* is the time scaled by current population size ($D = T/4N$) at which an already existing population experienced a demographic change. The mutation model used was a generalized stepwise mutation model (GSM) which is characterized by a geometric distribution of mutation steps with the parameter pGSM. We used the ratio *Nratio* (N/N_{anc}) to characterize the strength of demographic events. In the case of a contraction, the *Nratio* is <1, and in the case of an expansion, it is >1. The change in population size was considered significant when the 95% confidence intervals (95% CIs) of the *Nratio* did not include the value "1." Runs were performed independently for each colony and for each genetic cluster that was previously identified. We used 1,000 to 20,000 trees per point,

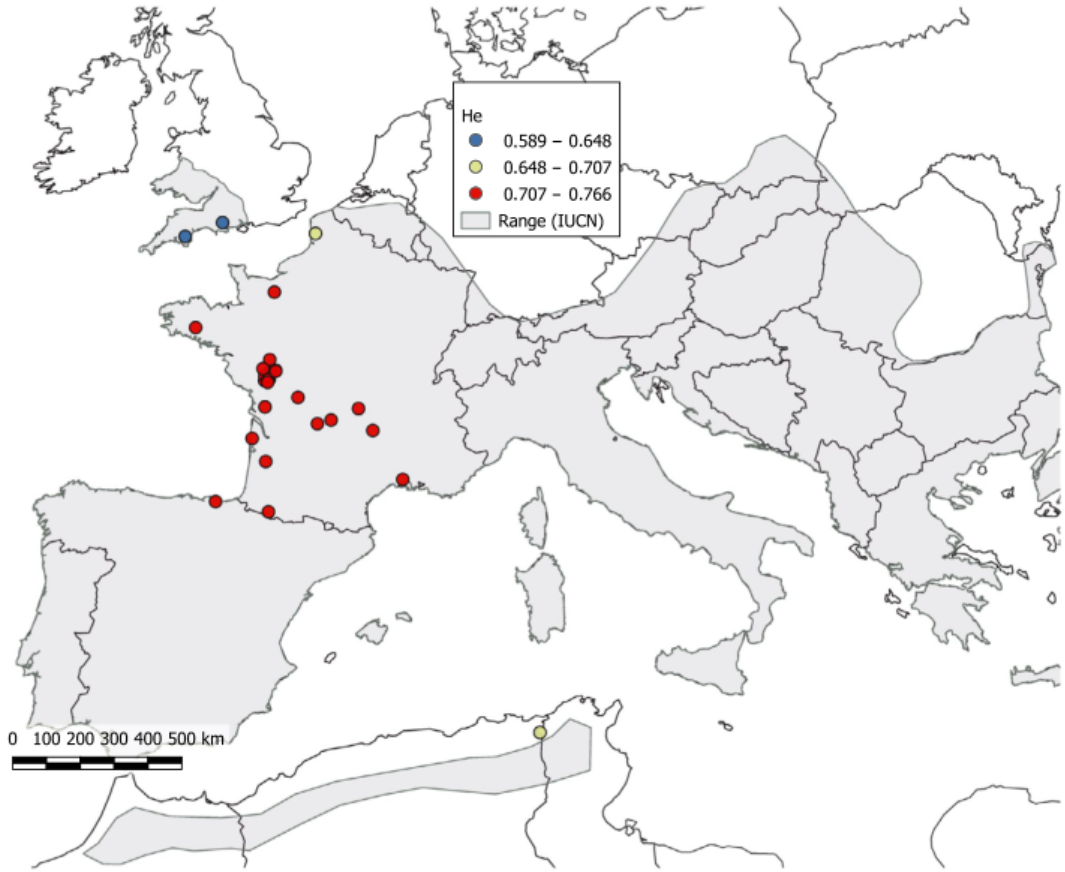


FIGURE 2 Expected heterozygosity (H_e) estimated for each colony. Blue to red colors indicate low to high levels of H_e. The geographic range of *R. ferrumequinum* is shaded in gray

600 to 800 points, and eight iterations by run. When no signal of demographic change was found, we used the *OnePop* model implemented in MIGRAINE to estimate the scaled effective population size $\theta = 4N_e\mu$ of stable and panmictic population.

We then inferred contemporary levels and directions of migration between the main genetic clusters using the program BAYESASS v3.0.4 (Wilson & Rannala, 2003). We performed five independent runs of 10,000,000 iterations sampled every 2000 iterations, with a burn-in of 1,000,000. For each run, we calculated the Bayesian deviance using the R script provided by Meirmans (2014). We used this deviance as a criterion to find the run that provided the best fit and to identify runs with convergence problems (Faubet, Waples, & Gaggiotti, 2007; Meirmans, 2014). We ran preliminary runs to adjust the maximum parameter change per iteration (Delta values). It is important to optimize the acceptance rates for proposed changes to parameters (20% to 60% is ideal; Wilson & Rannala, 2003). The adjustments are important because if the acceptance rates are too low or too high, the chain does not mix well and fails to adequately explore the state space. In the final run, we used delta values of 0.45, 0.40, and 0.51 for allele frequency, migration, and inbreeding, respectively.

3 | RESULTS

Three of the 17 microsatellites genotyped were excluded from further genetic analyses: one of them was monomorphic and the other two had poor quality profiles. Results gathered using MICROCHECKER showed no large allele dropout or scoring inconsistencies due to stuttering. Null alleles were suspected at loci Rferr06 in three colonies from France ("AIR," freq = 0.074; "FEN," freq = 0.046; "XAI," freq = 0.041), and at loci RHD103 (France, "ARL," freq = 0.078), Rferr27 (France, "BED," freq = 0.152), and Rferr01 (England, "BUC," freq = 0.149). Nevertheless, we did not detect any

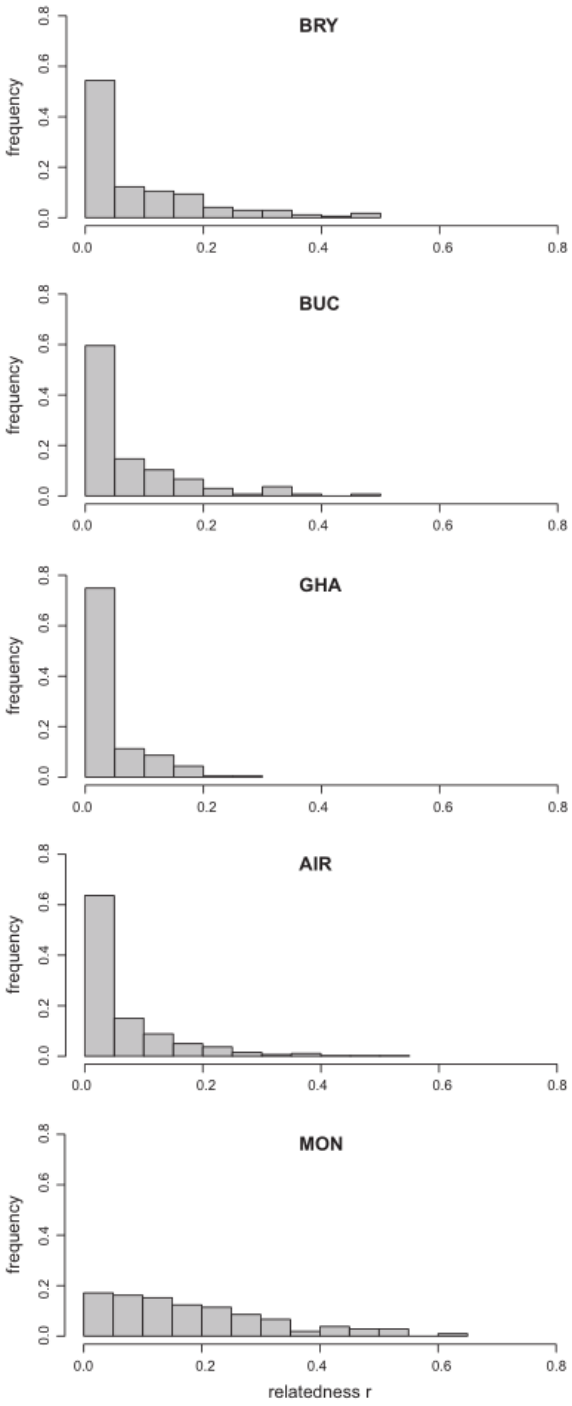


FIGURE 3 Distribution of the pairwise relatedness coefficient *r* estimated with the ML-relate software (Kalinowski et al., 2006) within colonies from France (AIR, MON), England (BRY, BUC), and Tunisia (GHA)

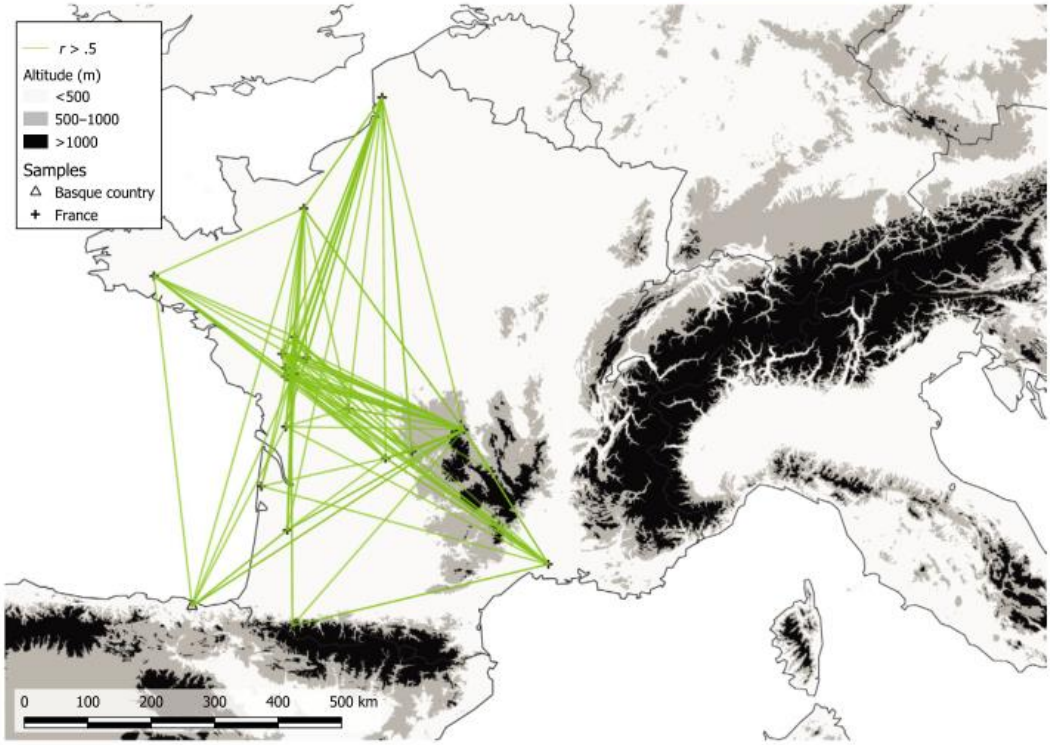


FIGURE 4 Geographic distribution of the higher values of pairwise relatedness coefficient ($r > .5$) between *R. ferrumequinum* colonies from the continental genetic cluster (France and the Spanish Basque Country)

deviation from HWE in any colony. Fifteen out of the 2,418 pairs of loci (0.62%) exhibited significant linkage disequilibrium, but the loci involved were not consistent among colonies. Therefore, we did not exclude any other loci.

3.1 | Genetic diversity and relatedness

A summary of the genetic diversity indices (F_{IS}, A_r, H_e) based on the 14 validated microsatellites is presented in Table 1. Global Hardy–Weinberg test (H1 = heterozygote deficit) was significant ($p = .017$, $F_{IS} = 0.009$). Local F_{IS} estimates (i.e., for each colony) ranged from −0.037 ("MON," northern France) to 0.120 ("BUC," England). All tests of departure from local HWE were nonsignificant after FDR correction (adjusted $p > p_{critical}$). The English colonies showed significant lower estimates of allelic richness (adjusted $p = .004 < p_{critical} = .012$) and expected heterozygosity (adjusted $p = .030 < p_{critical} = .037$) than the French ones (Table 1, Figure 2). The northern French colony "MON" showed lower allelic richness estimate than the other French colonies (adjusted $p = .030 < p_{critical} = .037$) but similar H_e estimate (adjusted $p = .059 > p_{critical} = .037$). The Tunisian colony "GHA" showed similar levels of allelic richness and expected heterozygosity than the French colonies (adjusted $p > p_{critical}$). Private allelic richness was low in all colonies except the Tunisian one ("GHA"; Table 1).

The distributions of the pairwise coefficient of relatedness r within each colony showed a common pattern in all colonies except in the northern French colony "MON" (Figure 3). For all colonies, the distribution of the r coefficient was L-shaped with a peak of unrelated individuals ($r = 0$) and a decreasing proportion of related individuals. In the northern French colony "MON," we observed a more uniform proportion of unrelated and relatively closely related individuals (r ranging between .0 and .3). When considering pairwise relatedness between individuals from different colonies, we still observed high levels of relatedness ($r > .5$; Figure 4). The high levels of relatedness involved female–female pairs and female–male pairs but never male–male pairs. It concerned 537 females, 33 males, and one undetermined individual. The majority of the females were adults (474 adults, 59 juveniles, and four undetermined), but this was not the case when considering males (12 adults, 19 juveniles, and two undetermined).

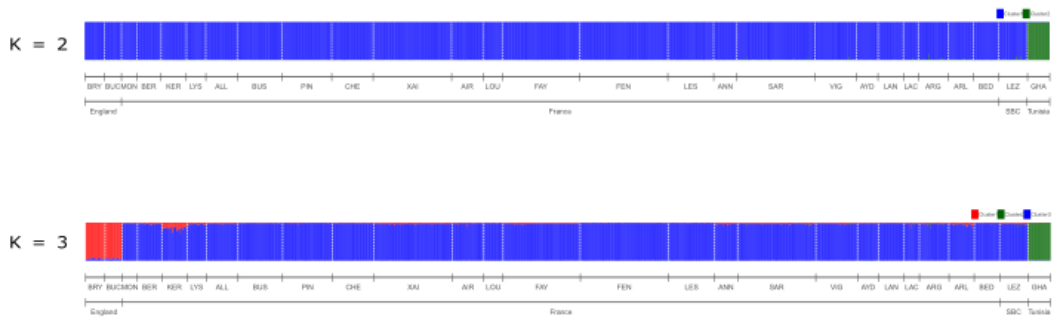


FIGURE 5 STRUCTURE plots for $K = 2$ and $K = 3$ clusters. Each bar represents an individual colored according to its membership probability to a given cluster. Individuals are sorted by localities. The white dashed lines separate the 27 colonies where the individuals were sampled: Bryanston (BRY), Buckfastleigh (BUC), Montreuil-sur-mer (MON), Kernascleden (KER), Lys-Haut-Layon (LYS), Allonne (ALL), Le Busseau (BUS), Le Pin (PIN), La Chapelle-Saint-Etienne (CHE), Xaintray (XAI), Airvault (AIR), Saint-Loup-sur-Thouet (LOU), Faye l'Abesse (FAY), Fenioux (FEN), Lessac (LES), Annepont (ANN), Sarran (SAR), Vignols (VIG), Aydat (AYD), Langeac (LAN), Lacanau (LAC), Argelouse (ARG), Arles (ARL), Bedous (BED), Lezate (LEZ), and El Feidja National Park (GHA). Abbreviation: SBC, Spanish Basque Country

3.2 | Population structure and genetic differentiation between colonies

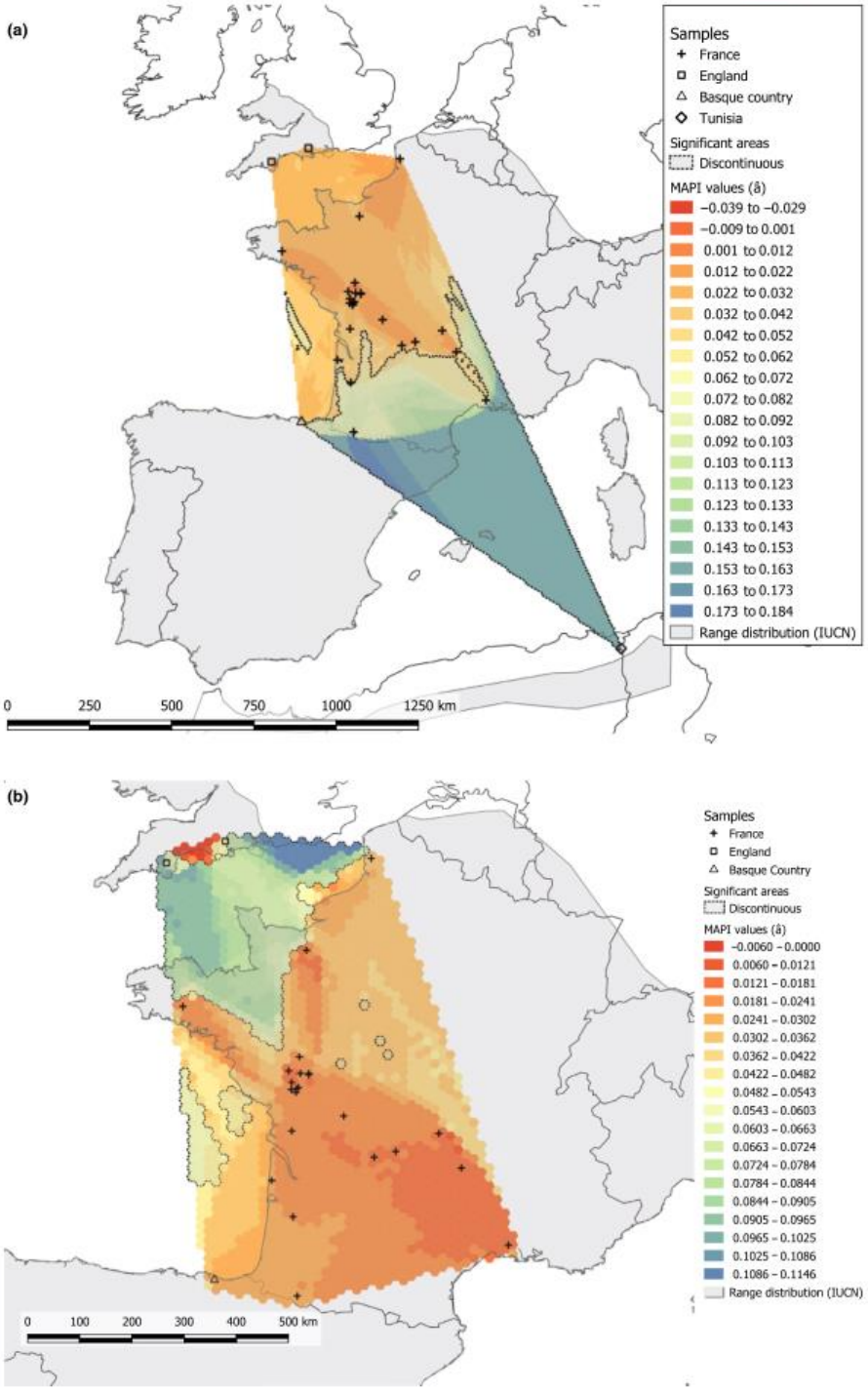
F_{ST} estimates calculated with and without excluding null alleles (ENA) were very similar, and analyses without juveniles did not substantially change F_{ST} estimates. Therefore, we only reported the uncorrected estimates for the dataset including juveniles. The pairwise F_{ST} estimates between colonies and associated *G*-tests are presented in Table S2. Low but significant genetic differentiation was observed between colonies within western France ($F_{ST} < 3\%$, 65.24% of the G-tests with $p < .05$; Table S2). The northern French colony "MON" exhibited higher estimates of pairwise F_{ST} than the other colonies ($3.49\% < F_{ST} < 6.46\%$, *G*-tests $p < 10^{-3}$). Among the French colonies, "MON" was also the colony that exhibited the highest levels of genetic differentiation with the English ($F_{ST} > 16\%$, *G*-tests $p < .001$), Spanish Basque ($F_{ST} = 7.17\%$, *G*-tests $p < .001$), and Tunisian colonies ($F_{ST} = 17.05\%$, *G*-tests $p < .001$). The Spanish Basque colony "LEZ" was more genetically differentiated from colonies in England and Tunisia (England: $9.88\% < F_{ST} < 11.9\%$, *G*-tests $p < .001$ and Tunisia: $F_{ST} = 14.87\%$, *G*-tests $p < .001$) than from colonies in France ($F_{ST} < 3\%$).

Using STRUCTURE, we found that the ΔK statistics (Evanno et al., 2005) were highest for $K = 2$, but the likelihood of the number of genetic clusters Ln (L(*K*)) showed similar values for $K = 2$ and $K = 3$ (Figure S1). For $K = 2$, the first genetic cluster included all colonies from England, France, and Spanish Basque Country and the second genetic cluster included the Tunisian colony. For $K = 3$, the first main genetic cluster included all colonies from western France and Spanish Basque Country. The second main genetic cluster included the two colonies from England and the third genetic cluster included the Tunisian colony (Figure 5). Increasing *K* did not change this clustering pattern. The PCA showed similar results, with three main genetic clusters (England, western France, Spanish Basque Country, and Tunisia, Figure S2).

While including all colonies, the program MAPI revealed that the Mediterranean Sea corresponded to an area of significantly higher genetic dissimilarity (Figure 6a). A second analysis excluding the Tunisian colony highlighted a significantly higher genetic dissimilarity between the English colonies on the one hand and the French and Basque colonies on the other. It also showed the existence of genetic homogeneity in the continent (Figure 6b).

We found a significant positive relationship between genetic differentiation and geographic distance within France (slope of the regression = 0.0063 [0.0042–0.0090]; $p_{Mantel} < .001$), between France and Spanish Basque Country (slope of the regression = 0.0212 [0.0120, 0.0412]; $p_{Mantel} < .001$), and between France and Tunisia (slope of the regression = 0.0457 [0.0009, 0.1390]; $p_{Mantel} = 10^{-3}$). The northern French colony "MON" was more genetically differentiated from the other French colonies (Figure 7). When excluding this particular colony "MON" from the regression analyses, we still found a positive relationship between genetic differentiation and geographic distance among French colonies but the slope was weaker (slope of the regression = 0.0025 [0.0015–0.0036]; $p_{Mantel} < .001$). Moreover, considering only differentiation between pairs for French–English, French–Basque, and French–Tunisian colonies without including the northern French colony "MON," the isolation by distance relationship was not significant (Table 2). All results are presented in Table 2 and Figure 7.

FIGURE 6 Geographic distribution of the pairwise Rousset's genetic distance â (Rousset, 2000) resulting from MAPI (Piry et al., 2016). (a) All colonies are included. (b) The Tunisian colony is not included in the analysis. Dots correspond to the colonies sampled in this study. Levels of genetic dissimilarity are indicated using a color scale ranging from red (lower genetic dissimilarity) to blue (higher genetic dissimilarity). Significant areas are represented by dashed lines


(a)
Samples
France
England
Basque country
Tunisia
Significant areas
Discontinuous
MAPI values (å)
−0.039 to −0.029
−0.009 to 0.001
0.001 to 0.012
0.012 to 0.022
0.022 to 0.032
0.032 to 0.042
0.042 to 0.052
0.052 to 0.062
0.062 to 0.072
0.072 to 0.082
0.082 to 0.092
0.092 to 0.103
0.103 to 0.113
0.113 to 0.123
0.123 to 0.133
0.133 to 0.143
0.143 to 0.153
0.153 to 0.163
0.163 to 0.173
0.173 to 0.184
Range distribution (IUCN)
0 250 500 750 1000 1250 km
(b)
Samples
France
England
Basque Country
Significant areas
Discontinuous
MAPI values (å)
−0.0060 – 0.0000
0.0060 – 0.0121
0.0121 – 0.0181
0.0181 – 0.0241
0.0241 – 0.0302
0.0302 – 0.0362
0.0362 – 0.0422
0.0422 – 0.0482
0.0482 – 0.0543
0.0543 – 0.0603
0.0603 – 0.0663
0.0663 – 0.0724
0.0724 – 0.0784
0.0784 – 0.0844
0.0844 – 0.0905
0.0905 – 0.0965
0.0965 – 0.1025
0.1025 – 0.1086
0.1086 – 0.1146
Range distribution (IUCN)
0 100 200 300 400 500 km

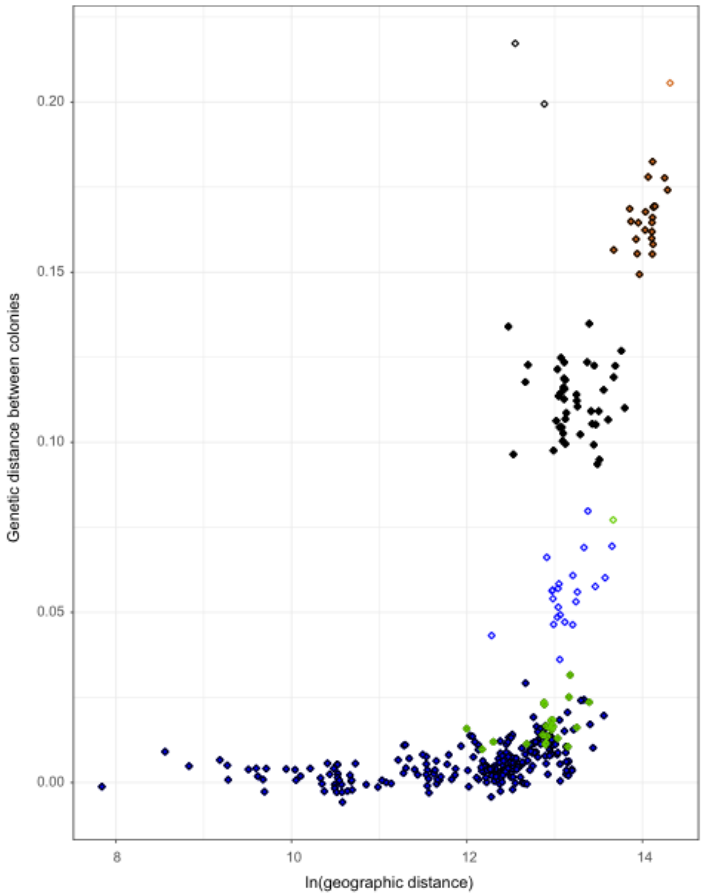


FIGURE 7 Plots of the within/between isolation by distance analyses. The genetic distance between colonies was estimated as ($F_{ST}/1 - F_{ST}$). The color of the dots indicates the geographic origin of the pairs of colonies: within France (blue), between France and Spanish Basque Country (green), between France and Tunisia (brown) and between France and England (black). The pairs of colonies that include the French colony "MON" are not color filled

3.3 | Inference of demographic parameters

Using MIGRAINE, we detected a significant signature of expansion for the Tunisian colony ("GHA"; N_{ratio} = 2.989 [1.63–8063]), with an estimated origin of this demographic change D = 0.811 [2.17 e−06–2.201]. None of the other colonies or genetic clusters showed significant signature of demographic change (Table S3). The marginally significant signature of contraction observed for the western French colony "CHE" in the Poitou-Charentes region was also considered to be nonsignificant because the higher value of the confidence interval was very close to 1 (0.99) and because we performed a high number of tests.

We estimated the scaled current population size θ ($4N_e\mu$) for all stable colonies, and θ estimates ranged between 1.854 and 6.465 (Table S4, Figure 8). The lowest estimates were found for the English colonies ("BRY" θ = 1.854; "BUC" θ = 2.107) and for the northern French colony "MON" (θ = 3.030). Other colonies and pool of colonies exhibited similar levels of θ estimates (from 4.066 to 6.465). Kruskal–Wallis tests and post-hoc pairwise comparisons of θ estimates using Wilcoxon test (with FDR correction for multiple testing) revealed a significant difference of θ estimates between the western French–Spanish Basque and the English genetic clusters (p = .002) and nonsignificant differences between the other clusters (p > .115). We observed a significant negative relationship between the estimated θ of each colony and the distance of the colony to the centroid of our sampling (p < .05; Figure S3).

The five runs implemented in BAYESASS provided similar results and converged well, with values ranging from D_{run2} = 67,128.6 to D_{run4} = 67,134.7. None of the migration rates estimated between the three main genetic clusters was significant (Table 3). Within the western French–Spanish Basque cluster, we found significant unidirectional migration rates from the French to Spanish Basque colonies (m = 0.2921 ± 0.0192). As our results emphasized particular signatures for the northern French colony "MON" all along the study, we also estimated migration rates considering "MON" apart

TABLE 2 Isolation by distance characteristics using the genetic differentiation parameter ($F_{ST}/1-F_{ST}$) between colonies against the logarithm of the Euclidian geographical distance

	Geographic zone	Intercept [CI]	Slope [CI]	*p* Mantel test
Including "MON"	All datasets	−0.3395 [−0.5402, 0.2411]	0.0303 [0.0217, 0.0475]	**0*****
	Within France	−0.0667 [−0.0963, −0.0428]	0.0063 [0.0042, 0.0090]	**0*****
	Between France and England	0.4177 [0.0645, 0.9419]	−0.0229 [−0.0603, 0.0025]	.912
	Between France and Tunisia	−0.4755 [−1.7182, 0.1382]	0.0457 [0.0009, 0.1390]	**.001*****
	Between France and SBC	−0.2547 [−0.5020, −0.1373]	0.0212 [0.0120, 0.0412]	**.0001*****
Excluding "MON"	All datasets	−0.3328 [−0.5279, −0.2406]	0.0296 [0.0217, 0.0463]	**0*****
	Within France	−0.0242 [−0.0357, −0.0142]	0.0025 [0.0015, 0.0036]	**0*****
	Between France and England	0.1304 [−0.1185, 0.4372]	−0.0014 [−0.0229, 0.0166]	.563
	Between France and Tunisia	−0.2265 [−0.7600, 0.2584]	0.0279 [−0.0050, 0.0687]	**.013***
	Between France and SBC	−0.0774 [−0.1841, 0.0483]	0.0073 [−0.0021, 0.0158]	**.010***

Note: 95% confidence intervals (CI) for the slope and the intercept of the IBD were obtained by ABC bootstrapping. Significant *p*-values of Mantel tests are represented in bold with *** for $p < .001$, ** for $p < .01$, and * for $p < .05$. "MON" is the northern French colony of the study area.
Abbreviation: SBC, Spanish Basque Country.

TABLE 3 Means of the posterior distributions of contemporary migration rate (m) with standard deviation in parentheses

	Migration from				
	Genetic cluster 1			Genetic cluster 2	Genetic cluster 3
Migration into	MON	France	Basque	England	Tunisia
MON	**0.6825 (0.0152)**	**0.2700 (0.0276)**	0.0161 (0.0153)	0.0158 (0.0148)	0.0156 (0.0153)
France	0.0004 (0.0004)	**0.9975 (0.0013)**	0.0004 (0.0004)	0.0012 (0.0011)	0.0004 (0.0004)
Basque	0.0101 (0.0095)	**0.2921 (0.0192)**	**0.6768 (0.0101)**	0.0109 (0.0108)	0.0102 (0.0100)
England	0.0082 (0.0081)	0.0128 (0.0116)	0.0083 (0.0082)	**0.9626 (0.0169)**	0.0080 (0.0078)
Tunisia	0.0129 (0.0125)	0.0126 (0.0121)	0.0129 (0.0122)	0.0124 (0.0119)	**0.9493 (0.0229)**

Note: Migration and nonmigration rates that are significantly > 0 are represented in bold.

from the other French colonies. Our results revealed significant unidirectional migration rates from all western French colonies to the northern French colony "MON" ($m = 0.2700 \pm 0.0276$).

4 | DISCUSSION

4.1 | A large and stable population of *R. ferrumequinum* ranging from Spanish Basque Country to northern France

Our study revealed high and homogeneous levels of genetic diversity within the western French and Spanish Basque colonies examined. These levels were similar to those previously detected in colonies from the eastern part of *R. ferrumequinum* distribution (Rossiter et al., 2007, 2000), or in other bat species such as *Rhinolophus euryale* and *Myotis myotis* (Budinski et al., 2019; Castella, Ruedi, & Excoffier, 2001). We did not find evidence of departure from Hardy–Weinberg equilibrium within colonies or when considering the western French and Spanish Basque colonies altogether. We also found very low levels of genetic differentiation between these colonies of *R. ferrumequinum*, as indicated by F_{ST} estimates. These colonies were identified as a unique genetic cluster according to the results provided by STRUCTURE and MAPI analyses and the slight isolation by distance pattern detected which suggests that some admixture occurs at long-distance, thus interconnecting the sampled localities. Altogether, these results indicated high gene flow between colonies at this scale and suggested that the western French and Spanish Basque colonies form a single and large population. In that respect, our results supported the previous studies of *R. ferrumequinum* phylogeography which had revealed a unique genetic cluster in Western Europe (Switzerland apart, Flanders et al., 2009; Rossiter et al., 2007). In addition to these findings, we could infer the scaled effective size θ ($4N_e\mu$) of this population. We found homogeneous θ among the western French and Spanish Basque colonies and for the pool of these colonies. This result was congruent with our finding of one large population with each colony representing a replicate of the whole population. We could not transform this estimate θ into an effective number of individuals (N_e) because it requires fixing the mutation rate of microsatellite markers in this species. This is a crucial issue because estimates of mutation rates can greatly vary between and within species and any inaccuracy in the mutation rate estimate is propagated in the estimation of N_e (Waples, 2010).

We did not reveal any signature of demographic decline, neither for the colonies of the French Poitou-Charentes region nor

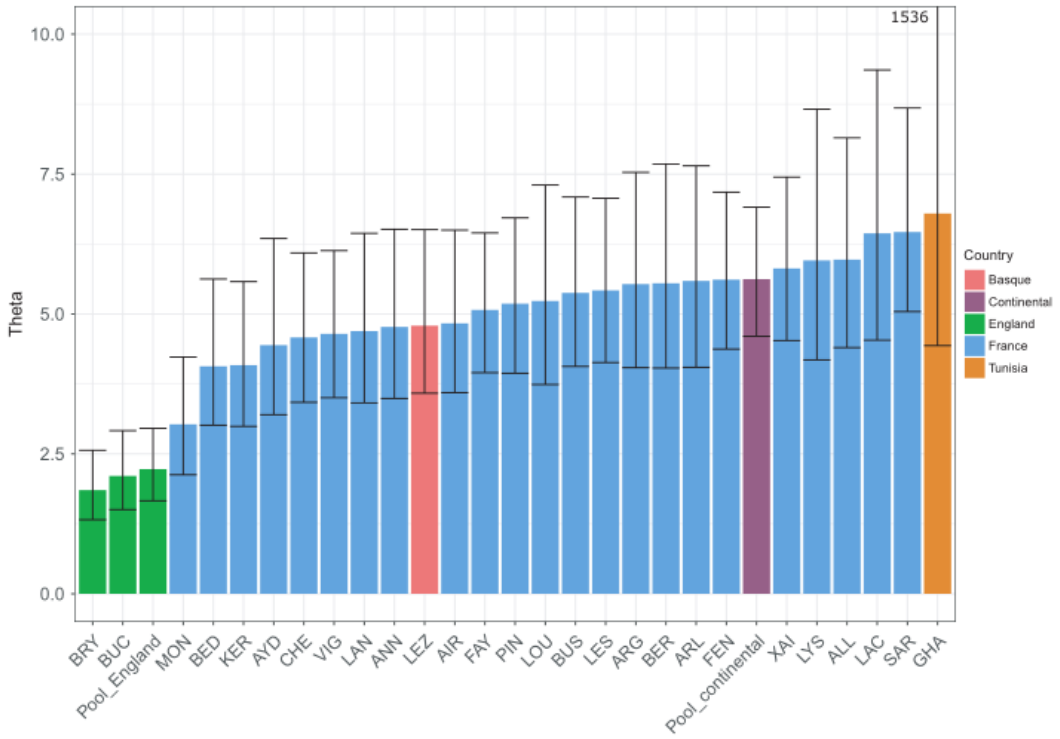


FIGURE 8 Estimation of θ ($4N_e\mu$) for each colony and genetic cluster based on the OnePop model for stable colonies and OnePopVarSize for the Tunisian colony "HA" which experienced expansion. As the confidence interval of Tunisian θ is very large (4.435–1536), the superior born was not represented to avoid the flattening of the graph. Pool_England and Pool_continental respectively correspond to the English and French-Spanish Basque colonies. Colonies are classified by θ estimates

for the delineated western French and Spanish Basque population of *R. ferrumequinum*. Several biases could have lead to the nondetection of a demographic event. First, Leblois et al. (2014) showed that the capacity to detect demographic events from genetic data depends on the number of genetic markers used, the strength of the event, and the time when it happened. Therefore, because the decline was recent and we used 14 microsatellites, our study may have suffered from a lack of power that could explain the absence of signature of demographic decline in our data. Second, the maximum lifespan of these bats is 30 years (Caubère, Gaucher, & Julien, 1984), and simulations of microsatellite data analyzed under similar conditions using MsVar (Beaumont, 1999; Storz & Beaumont, 2002) on the eastern red bat *Lasiurus borealis* have shown a significant delay in the response of coalescent-based N_e estimates to recent population declines (Munster, 2015). However, our results are congruent with the very recent analysis of the historical Poitou-Charente roost counts, which revealed a stable population in this region over the past 15 years (M. Leuchtmann, personal communication).

4.2 | Dispersal and reproduction of *R. ferrumequinum*

Our results revealed that the Mediterranean Sea and the English Channel may act as barriers to *R. ferrumequinum* gene flow. Seas have often been shown to limit bat gene flow, irrespectively of bat flight capacity (García-Mudarra et al., 2009). The high genetic differentiation observed between the English colonies in this study was expected because of the potential founder effects associated with *R. ferrumequinum* colonization since the Late Glacial Maximum (LGM; Flanders et al., 2009; Rossiter et al., 2007). Our demographic inferences also revealed the absence of current gene flow between the two English and western French–Spanish Basque clusters. The high genetic differentiation observed between Tunisian and western French–Spanish Basque colonies may also rely on historical colonization history. *R. ferrumequinum* seems to have been present in North Africa before the Late Glacial Maximum (Flanders et al., 2009; Rossiter et al., 2007), and there is no evidence that North Africa was recolonized from Europe post-LGM. These historical patterns of

genetic differentiation might have been reinforced by the current absence of gene flow between Europe and North Africa. However, our sampling is too sparse to assess gene flow over this large landscape feature, and we cannot exclude the possibility that the Strait of Gibraltar, which leaves a gap of just 14 km, connects populations of *R. ferrumequinum* across the Mediterranean Sea. The degree of permeability of the Mediterranean Sea for this bat species therefore deserves a dedicated study, aiming at assessing the potential pathways of *R. ferrumequinum* movements and gene flow between Europe and North Africa.

Similarly, as we only had a few samples from both sides of the Pyrenees, we could not assess the potential effect of this mountain as a barrier to gene flow. The absence of (or weak) gene flow disruption associated with western Pyrenees in this study may therefore suggest that this mountain may not impede dispersal or that *R. ferrumequinum* uses the shoreline as corridor along both the Atlantic and Mediterranean edges of the Pyrenees, where altitude is lower than 500 m, as has been seen for migratory birds (Galarza & Tellería, 2003). The situation is different from another *Rhinolophus* species, *R. hipposideros*, where the Pyrenees most likely act as a strong barrier (Dool et al., 2013). Future genetic and ecological studies including dense sampling from both sides and all along the Pyrenees are now required to assess whether *R. ferrumequinum* movements and genetic mixing are restricted by mountains.

In the absence of important landscape barriers such as seas or, potentially, mountains, we showed that *R. ferrumequinum* is able to move over hundreds of kilometers, as exemplified by the low levels of genetic differentiation observed at large geographical scales, the inference of significant migration rates between the western French–Spanish Basque maternity colonies, and the high levels of relatedness observed between individuals sampled in distant colonies.

These results also revealed the high genetic mixing that occurs at large scale between *R. ferrumequinum* western French and Spanish Basque colonies. Several demographic processes may underlie this genetic mixing. First, mating dispersal at large distance would lead to extracolony copulations and to the relaxation of colonies' genetic borders (Veith, Beer, Kiefer, Johannesen, & Seitz, 2004). Second, because we also found high levels of relatedness between juveniles (under two years old) sampled at considerable distances (up to 861 km), natal dispersal (one-way movement of juveniles during their first year, from their colony of birth to another) and/or movements of adults from one maternity colony to another between two consecutive reproduction events (years) are also potential mechanisms shaping genetic mixing. These alternatives are still difficult to evaluate due to a lack of knowledge with regard to *R. ferrumequinum* mating behavior (where and when) and dispersal, in particular the one of males. Ringing data from *R. ferrumequinum* from across Europe suggest the species is mostly sedentary but with occasional movements over 100 km. Indeed, although rare, there are documented movements of 180 km in Spain, 320 in Hungary (reviewed in Hutterer, Ivanova, Meyers-Cords, & Rodrigues, 2005), and 500 km in France (Saint Girons, 1973), clearly demonstrating the species is occasionally able to move over large distances. In the future, long-term capture-mark-recapture surveys of adults and juveniles could provide invaluable information to assess the relative importance of mating, natal, and breeding dispersal in the genetic mixing of colonies within management units. Given the scale at which the species is suspected to move given the available ringing data and our current genetic results (weak population structure), it would be important to monitor sites (for recaptures) not only close to the ringing sites but also several hundreds of kilometers away. This will make these studies, which would ideally be long-term studies, logistically challenging.

4.3 | Differences in the functioning of central–peripheral and island–continental colonies

Our results revealed contrasting patterns of genetic structure within and between populations when comparing *R. ferrumequinum* western French–Spanish Basque population with colonies from Tunisia, England, and northern France ("MON"). In these latter colonies, we detected lower levels of genetic diversity (H_e up to 20% lower) and smaller estimates of Θ ($4N_e\mu$; up to half the size) than in the western French–Spanish Basque population. They were also more genetically differentiated than the western French–Spanish Basque ones, as revealed by F_{ST} estimates and isolation by distance and clustering analyses. Some of these particular colonies might be insular (England), but are commonly located near the edge of *R. ferrumequinum* distribution range. Contrasting levels of genetic diversity between insular and continental populations are common in animals (Frankham, 1995, 1995, 1996) and have already been observed between England and the continent in several bat species such as *R. ferrumequinum* (Rossiter et al., 2000), *Myotis bechsteinii* (Wright et al., 2018), *R. hipposideros* (Dool et al., 2013), *Plecotus austriacus* (Razgour et al., 2013), and *Eptesicus serotinus* (Moussy et al., 2015). The contemporary isolation of colonies from UK with the continent might have maintained higher levels of genetic drift, as shown by the low N_e estimates, which reinforces their vulnerability (Newman & Pilson, 1997). These colonies may face stochastic reduction of genetic diversity that could limit their evolutionary potential, in particular in the face of environmental changes.

More surprisingly, the northern French colony at Montreuil-sur-Mer ("MON") exhibited genetic patterns that were similar to those observed in the English colonies (lower level of genetic diversity, smaller effective population size, and higher levels of genetic differentiation compared to the other western French–Spanish Basque colonies). This colony was also the only one that exhibited a high proportion of strongly related individuals. Overall, these results suggested that this colony experienced strong genetic drift, due to a small effective population size and limited gene flow with other western French–Spanish Basque colonies. This situation could be explained by a lack of favorable habitat surrounding the colony, leading to limited dispersal and reduced extracolony mating. It could also be explained by the location of the colony at the northern limit of *R. ferrumequinum* distribution range (central-margin hypothesis, Eckert et al., 2008). Indeed, we observed asymmetric gene flow from the core

to the edge of the western French–Spanish Basque population. We also detected a decrease of effective population size and genetic diversity and an increase of genetic differentiation while moving further away from the core (source–sink functioning). Finer population genetics and landscape analyses in north-eastern France and in Belgium should assess whether this pattern can be extrapolated to all colonies located within this northern limit of *R. ferrumequinum* distribution range or whether it is very specific to this colony.

The last particular situation emphasized in this study concerned Tunisia. The level of genetic diversity detected in this colony was close to the levels observed in the western French–Spanish Basque colonies, but private allele richness was higher. Moreover, this Tunisian colony exhibited a signature of demographic expansion, although we have to be cautious with this result as the confidence interval of the estimated time since the expansion started was extremely large. Larger and denser sampling of colonies of *R. ferrumequinum* from North Africa would be necessary to assess whether it might apply to all colonies located on this southern part of the Mediterranean Sea.

4.4 | Implications for conservation

In this study, we have shown that connectivity, genetic diversity levels, and effective population size are high and homogeneous in the western French–Spanish Basque population, when excluding the northern French colony "MON." Therefore, the French Poitou-Charentes region does not need to be considered as a management unit by itself. We rather recommend considering the large population as a unique management unit. The development of new partnerships or the reinforcement of existing ones between NGOs from different neighboring countries (Spain, France) and French administrative regions are needed to improve the knowledge and conservation of this (and other) bat species in France. This large population could be resilient to local disturbance because of its strong interconnection between colonies. However, we cannot exclude that some particular colonies within this population might be vulnerable. It is therefore still important to pursue colony surveys at local scales and also to standardize monitoring procedures at the national and international scale (Battersby, 2010). Our sampling scheme did not enable us to identify the eastern boundaries of this population or to test for large geographical barriers to gene flow. It would require more sampling in Eastern France and in neighboring countries (e.g., Belgium, Germany, Luxembourg, and Switzerland). In the future, this delineation and inference of bat population demography might be of particular importance as *R. ferrumequinum* experienced severe declines there, so that some populations might be at higher risk of extinction and deserve special management attention (see Ransome & Hutson, 2000).

We have also shown in this study that peripheral colonies are genetically poorer than those at the core range, because of genetic drift, low gene flow, and small effective population size. Thus, these colonies are more vulnerable to extinction and deserve particular management efforts. Interestingly, these colonies located at the edge of the species range are genetically divergent and may harbor some genetic and phenotypic variability that could be important for adaptation to global changes (Lesica & Allendorf, 1995). For example, these colonies may play a key role in the face of climate change by facilitating species range shift northward (Rebelo, Tarroso, & Jones, 2010).

Lastly, our results advocate for paying particular attention to mating territories and to movement pathways that enable extracolony mating. Conservation programs should include the identification and protection of mating site and their associated habitats, and the maintenance of connected and structured semi-open habitats (i.e., mosaic landscapes of broadleaf woodland and grassland connected with tree lines) that are needed for bats to complete their yearly life cycle. Further collaborations between NGOs and academics are required to evaluate these relationships between landscapes, movements at different scales, mating, and genetic mixing, through the development of joint ecological and genetic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

First of all, we are indebted to all of our collaborators in the naturalist associations who helped us to generate this comprehensive bat sampling: Poitou-Charentes Nature (Deux-Sèvres Nature-Environnement, Nature-Environnement 17, la LPO France, Charente Nature et Vienne Nature), CREN Poitou-Charentes, Groupe Chiroptères des Pays-de-la-Loire, Groupe Chiroptères Aquitaine, Groupe Chiroptères du Groupe Mammalogique et Herpétologique du Limousin, Chauves-Souris Auvergne, Groupe Chiroptères de Provence, Groupe Mammalogique Normand, Amikiro, Coordination Mammalogique du Nord de la France, and all the numerous volunteers that contributed to fieldwork.

Financial support was received from the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR), Nouvelle-Aquitaine region, Nouvelle-Aquitaine DREAL, and European Regional Development Fund. Orianne Tournayre, PhD, is funded by the LabEx CeMEB, an ANR "Investissements d'Avenir" program (ANR-10-LABX-04-01). Raphael Leblois was supported by the Agence Nationale de la Recherche (project GENOSPACE ANR-16-CE02-0008). Data were produced using the genotyping facilities on the GenSeq platform of LabEx CeMEB (Centre Méditerranéen Environnement et Biodiversité). Part of this work was carried out by using the resources of the INRA MIGALE (http://migale.jouy.inra.fr) and GENOTOUL (Toulouse Midi-Pyrénées) bioinformatics HPC platforms, as well as the CBGP and the Montpellier Bioinformatics Biodiversity (MBB, supported by the LabEx CeMEB, an ANR "Investissements d'avenir" program ANR-10-LABX-04-01) HPC platform services.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

O.T., D.P., N.C., M.L., and J.-B.P have conceived the study; M.L., J.-B.P, and D.P. have organized the fieldwork; M.L., J.-B.P, O.F.-C, J.D., O.T., A.L., N.C., I.G., F.M., S.P., and D.P. have helped in collecting the biological material; O.T. and A.L. have conducted the DNA analyses; O.T., R.L., and S.P have analyzed the data; O.T., N.C., and D.P. have drafted much of the manuscript. All authors read, criticized, and approved the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Microsatellite genotypes for this study are available at: https://doi.org/10.5061/dryad.r44t5dk.

ORCID

Orianne Tournayre https://orcid.org/0000-0002-0260-8189

REFERENCES

Battersby, J. (2010). *Guidelines for surveillance and monitoring of European bats*. EUROBATS Publication Series No. 5. Bonn, Germany: UNEP/EUROBATS Secretariat, 95 pp.

Beaumont, M. A. (1999). Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics*, *153*(4), 2013–2029.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (2004). *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Montpellier, France: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II.

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*, 289–300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Britt, M., Haworth, S. E., Johnson, J. B., Martchenko, D., & Shafer, A. B. A. (2018). The importance of non-academic coauthors in bridging the conservation genetics gap. *Biological Conservation*, *218*, 118–123. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.12.019

Buchanan, K., Burt de Perera, T., Carere, C., Carter, T., Hailey, A., Hubrecht, R., … Thompson, M. (2012). Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Animal Behaviour*, *83*(1), 301–309. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.10.031

Budinski, I., Blagojević, J., Jovanović, V. M., Pejić, B., Adnađević, T., Paunović, M., & Vujošević, M. (2019). Population genetic structure of the Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* in the central Balkans. *PLoS ONE*, *14*(1), e0210321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210321

Butchart, S. H. M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J. P. W., Almond, R. E. A., … Watson, R. (2010). Global biodiversity: Indicators of recent declines. *Science*, *328*(5982), 1164–1168. https://doi.org/10.1126/science.1187512

Castella, V., Ruedi, M., & Excoffier, L. (2001). Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology*, *14*(5), 708–720. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00331.x

Castella, V., Ruedi, M., Excoffier, L., Ibáñez, C., Arlettaz, R., & Hausser, J. (2000). Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Molecular Ecology*, *9*(11), 1761–1772. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01069.x

Caubère, B., Gaucher, P., & Julien, J. F. (1984). Un record mondial de longévité in Natura pour un Chiroptère insectivore? *Revue d'ecologie (Terre Vie)*, *39*, 351–353.

Chapuis, M.-P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(3), 621–631. https://doi.org/10.1093/molbev/msl191

Dawson, D. A., Rossiter, S. J., Jones, G., & Faulkes, C. G. (2004). Microsatellite loci for the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Rhinolophidae, Chiroptera) and their cross-utility in 17 other bat species. *Molecular Ecology Notes*, *4*(1), 96–100. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00580.x

de Castro, M. C., & Singer, B. H. (2006). Controlling the false discovery rate: A new application to account for multiple and dependent tests in local statistics of spatial association. *Geographical Analysis*, *38*(2), 180–208. https://doi.org/10.1111/j.0016-7363.2006.00682.x

Dool, S. E., O'Donnell, C. F. J., Monks, J. M., Puechmaille, S. J., & Kerth, G. (2016). Phylogeographic-based conservation implications for the New Zealand long-tailed bat, (*Chalinolobus tuberculatus*): Identification of a single ESU and a candidate population for genetic rescue. *Conservation Genetics*, *17*(5), 1067–1079. https://doi.org/10.1007/s10592-016-0844-3

Dool, S. E., Puechmaille, S. J., Dietz, C., Juste, J., Ibáñez, C., Hulva, P., … Teeling, E. C. (2013). Phylogeography and postglacial recolonization of Europe by *Rhinolophus hipposideros*: Evidence from multiple genetic markers. *Molecular Ecology*, *22*(15), 4055–4070. https://doi.org/10.1111/mec.12373

Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, *22*(4), 1–20.

Durrant, C. J., Beebee, T. J. C., Greenaway, F., & Hill, D. A. (2009). Evidence of recent population bottlenecks and inbreeding in British populations of Bechstein's bat, *Myotis bechsteinii*. *Conservation Genetics*, *10*(2), 489–496. https://doi.org/10.1007/s10592-008-9639-5

Earl, D. A., & von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, *4*(2), 359–361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7

Eckert, C. G., Samis, K. E., & Lougheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: The central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, *17*(5), 1170–1188. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, *14*(8), 2611–2620. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Faubet, P., Waples, R. S., & Gaggiotti, O. E. (2007). Evaluating the performance of a multilocus Bayesian method for the estimation of migration rates. *Molecular Ecology*, *16*(6), 1149–1166. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03218.x

Flanders, J., Jones, G., Benda, P., Dietz, C., Zhang, S., Li, G., … Rossiter, S. J. (2009). Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: Contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology*, *18*(2), 306–318. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04021.x

Francis, R. M. (2017). pophelper: An R package and web app to analyse and visualize population structure. *Molecular Ecology Resources*, *17*, 27–32. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509

Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, *29*(1), 305–327. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001513

Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetics Research*, *66*(2), 95–107. https://doi.org/10.1017/S0016672300034455

Frankham, R. (1996). Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, *10*(6), 1500–1508. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10061500.x

Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, *126*(2), 131–140. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002

Froidevaux, J. S. P., Boughey, K. L., Barlow, K. E., & Jones, G. (2017). Factors driving population recovery of the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) in the UK: Implications for conservation. *Biodiversity and Conservation*, *1–21*, https://doi.org/10.1007/s10531-017-1320-1

Galarza, A., & Tellería, J. L. (2003). Linking processes: Effects of migratory routes on the distribution of abundance of wintering passerines. *Animal Biodiversity and Conservation*, *26*(2), 19–27.

García-Mudarra, J. L., Ibáñez, C., & Juste, J. (2009). The Straits of Gibraltar: Barrier or bridge to Ibero-Moroccan bat diversity? *Biological Journal of the Linnean Society*, *96*(2), 434–450. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.01128.x

Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, *86*, 485–486. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627

Hardy, O. J., & Vekemans, X. (2002). spagedi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, *2*, 618–620. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x

Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T. M., Butchart, S. H. M., … Stuart, S. N. (2010). The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, *330*(6010), 1503–1509. https://doi.org/10.1126/science.1194442

Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, *9*(5), 1322–1332. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x

Hutterer, R., Ivanova, T., Meyers-Cords, C., & Rodrigues, L. (2005). *Bat migrations in Europe: A review of banding data and literature*. Bonn, Gemany: Bundesamt für Naturschutz.

Ibouroi, M. T., Cheha, A., Arnal, V., Lagadec, E., Tortosa, P., Le Minter, G., … Besnard, A. (2018). The contrasting genetic patterns of two sympatric flying fox species from the Comoros and the implications for conservation. *Conservation Genetics*, *19*(6), 1425–1437. https://doi.org/10.1007/s10592-018-1111-6

Jones, G., Jacobs, D. S., Kunz, T. H., Willig, M. R., & Racey, P. A. (2009). Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research*, *8*, 93–115. https://doi.org/10.3354/esr00182

Kalinowski, S. T. (2005). HP-RARE: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*, *5*, 539–545.

Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ml-relate: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, *6*(2), 576–579. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x

Kassambara, A., & Mundt, F. (2017). *Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. R package (Version 1.0.5)*.

Kervyn, T., Lamotte, S., Nyssen, P., & Verschuren, J. (2009). Major decline of bat abundance and diversity during the last 50 years in southern Belgium. *Belgian Journal of Zoology*, *139*, 124–132.

Leblois, R., Pudlo, P., Néron, J., Bertaux, F., Reddy Beeravolu, C., Vitalis, R., & Rousset, F. (2014). Maximum-Likelihood inference of population size contractions from microsatellite data. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(10), 2805–2823. https://doi.org/10.1093/molbev/msu212

Lesica, P., & Allendorf, F. W. (1995). When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology*, *9*(4), 753–760. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.09040753.x

Mathews, F., Kubasiewicz, L., Gurnell, J., Harrower, C., McDonald, R., & Shore, R. (2018). *A review of the population and conservation status of British mammals*. A report by the Mammal Society under contract to Natural England, Natural Resources Wales and Scottish Natural Heritage. Peterborough, UK: Natural England.

Meirmans, P. G. (2014). Nonconvergence in Bayesian estimation of migration rates. *Molecular Ecology Resources*, *14*(4), 726–733. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12216

Mickleburgh, S. P., Hutson, A. M., & Racey, P. A. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx*, *36*(1), 18–34. https://doi.org/10.1017/S0030605302000054

Milligan, B. G. (2003). Maximum-Likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, *163*(3), 1153–1167.

Moritz, C. (1994). Defining 'Evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, *9*(10), 373–375. https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4

Moussy, C., Atterby, H., Griffiths, A. G. F., Allnutt, T. R., Mathews, F., Smith, G. C., … Hosken, D. J. (2015). Population genetic structure of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) across Europe and implications for the potential spread of bat rabies (European bat lyssavirus EBLV-1). *Heredity*, *115*(1), 83–92. https://doi.org/10.1038/hdy.2015.20

Munster, S. K. (2015). *Evaluating accuracy and bias in genetic monitoring under scenarios of population decline*. MS thesis, Grand Valley State University.

Newman, D., & Pilson, D. (1997). Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: Experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution*, *51*(2), 354–362. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1997.tb02422.x

O'Shea, T. J., Bogan, M. A., & Ellison, L. E. (2003). *Monitoring trends in bat populations of the United States and Territories: Status of the science and recommendations for the future*. USGS Staff – Published Research. Retrieved from https://digitalcommons.unl.edu/usgsstaffpub/35

Palsbøll, P. J., Bérubé, M., & Allendorf, F. W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, *22*(1), 11–16. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.003

Pir, J. (2009). *Plan national pour la protection de la nature (PNPN). Plan d'Action Espèces: Grand rhinolophe* (Rhinolophus ferrumequinum).

Piry, S., Chapuis, M.-P., Gauffre, B., Papaïx, J., Cruaud, A., & Berthier, K. (2016). Mapping Averaged Pairwise Information (MAPI): A new exploratory tool to uncover spatial structure. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*(12), 1463–1475. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12616

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945–959.

Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources*, *16*(3), 608–627. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512

Puechmaille, S. J., Gouilh, M. A., Piyapan, P., Yokubol, M., Mie, K. M., Bates, P. J., … Teeling, E. C. (2011). The evolution of sensory divergence in the context of limited gene flow in the bumblebee bat. *Nature Communications*, *2*, 573. https://doi.org/10.1038/ncomms1582

Puechmaille, S. J., Hizem, W. M., Allegrini, B., & Abiadh, A. (2012). Bat fauna of Tunisia: Review of records and new records, morphometrics and echolocation data. *Vespertilio*, *16*, 211–239.

Puechmaille, S., Mathy, G., & Petit, E. (2005). Characterization of 14 polymorphic microsatellite loci for the lesser horseshoe bat, *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera). *Molecular Ecology Notes*, *5*(4), 941–944. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01123.x

Ransome, R. D., & Hutson, A. M. (2000). *Action plan for the conservation of the greater horseshoe bat* (Rhinolophus ferrumequinum) *in Europe (No. 109)*.

Razgour, O., Juste, J., Ibáñez, C., Kiefer, A., Rebelo, H., Puechmaille, S. J., … Jones, G. (2013). The shaping of genetic variation in edge-of-range populations under past and future climate change. *Ecology Letters*, *16*(10), 1258–1266. https://doi.org/10.1111/ele.12158

Rebelo, H., Tarroso, P., & Jones, G. (2010). Predicted impact of climate change on European bats in relation to their biogeographic

patterns. *Global Change Biology*, *16*(2), 561–576. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02021.x

Reed, D. H., & Frankam, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, *17*(1), 230–237. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x

Rossiter, S. J., Benda, P., Dietz, C., Zhang, S., & Jones, G. (2007). Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: Implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology*, *16*(22), 4699–4714. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03546.x

Rossiter, S. J., Burland, T. M., Jones, G., & Barratt, E. M. (1999). Characterization of microsatellite loci in the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, *8*(11), 1959–1960. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00778-2.x

Rossiter, S. J., Jones, G., Ransome, R. D., & Barrattt, E. M. (2000). Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, *9*(8), 1131–1135. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00982.x

Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, *145*(4), 1219–1228.

Rousset, F. (2000). Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, *13*(1), 58–62. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00137.x

Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, *8*, 103–106. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Saint Girons, M.-C. (1973). *Les Mammifères de France et du Benelux*. Paris, France: Doin.

Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, *232*, 8–27. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020

Schweizer, M., Excoffier, L., & Heckel, G. (2007). Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology*, *16*(12), 2463–2473. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03284.x

Storz, J. F., & Beaumont, M. A. (2002). Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: An empirical analysis of Microsat TEL-lite DNA variation using a hierarchical Bayesian Model. *Evolution*, *56*(1), 154–166. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00857.x

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Resources*, *4*(3), 535–538. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Veith, M., Beer, N., Kiefer, A., Johannesen, J., & Seitz, A. (2004). The role of swarming sites for maintaining gene flow in the brown long-eared bat (*Plecotus auritus*). *Heredity*, *93*(4), 342–349. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800509

Vignaud, T. M., Maynard, J. A., Leblois, R., Meekan, M. G., Vázquez-Juárez, R., Ramírez-Macías, D., … Planes, S. (2014). Genetic structure of populations of whale sharks among ocean basins and evidence for their historic rise and recent decline. *Molecular Ecology*, *23*(10), 2590–2601. https://doi.org/10.1111/mec.12754

Vincent, S., & Bat Group SFEPM (2014). *Chiroptères de l'annexe II de la Directive Habitats-Faune-Flore. Synthèse actualisée des populations en France – Bilan 2014*. SFEPM.

Voigt, C. C., & Kingston, T. (2016). *Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a changing world*. Springer Science + Business Media.

Vonhof, M., & Russell, A. L. (2015). Genetic approaches to understanding the population-level impact of wind energy development on migratory bats: A case study of the eastern red bat (*Lasiurus borealis*). *PeerJ PrePrints*, *3*, e788v1.

Wang, J. (2017). The computer program structure for assigning individuals to populations: Easy to use but easier to misuse. *Molecular Ecology Resources*, *17*(5), 981–990. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12650

Waples, R. S. (2010). Spatial-temporal stratifications in natural populations and how they affect understanding and estimation of effective population size. *Molecular Ecology Resources*, *10*(5), 785–796. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02876.x

Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, *38*(6), 1358–1370. https://doi.org/10.2307/2408641

Wilson, G. A., & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, *163*(3), 1177–1191.

Wright, P. G. R., Hamilton, P. B., Schofield, H., Glover, A., Damant, C., Davidson-Watts, I., & Mathews, F. (2018). Genetic structure and diversity of a rare woodland bat, *Myotis bechsteinii*: Comparison of continental Europe and Britain. *Conservation Genetics*, *19*(4), 777–787. https://doi.org/10.1007/s10592-018-1053-z

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Tournayre O, Pons J-B, Leuchtmann M, et al. Integrating population genetics to define conservation units from the core to the edge of *Rhinolophus ferrumequinum* western range. *Ecol Evol*. 2019;00:1–19. https://doi.org/10.1002/ece3.5714

Article 2. Génétique des populations et biologie de la conservation du Grand rhinolophe

Génétique des populations et biologie de la conservation du Grand rhinolophe.

Par **Orianne Tournayre**
(orianne.tournayre@supagro.fr)





Grand rhinolophe © Michel Barataud

Cet article est extrait de la publication Tournayre, O., Pons, J.-B., Leuchtmann, M., Loiseau, A., Leblois, R., Piry, S., Filippi-Codacionni, O., Duhayer, J., Garin, I., Mathews, F., Puechmaille, S., Charbonnel, N., Pontier, D. 2019. Integrating population genetics to define conservation units from the core to the edge of *Rhinolophus ferrumequinum* Western range. **https://doi.org/10.1101/662643**

Résumé

Dans cette étude nous avons utilisé une approche de génétique des populations pour déterminer la diversité et la structure génétique ainsi que l'histoire démographique des populations du Grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*) dans l'Ouest de son aire de répartition. Nous avons mis en évidence une unique grande population à forte diversité génétique couvrant la France et le Pays basque espagnol, et de plus petites populations à moindre diversité génétique en périphérie de l'aire de répartition, en Angleterre et au Nord de la France. L'effectif de l'ensemble des populations identifiées est historiquement stable, voire en expansion pour la colonie Tunisienne. Nos résultats soulignent l'importance des collaborations nationales et internationales pour la conservation

du Grand rhinolophe - les frontières administratives régionales ne correspondant pas à la réalité biologique du fonctionnement des populations.

Introduction

Le Grand rhinolophe est une espèce de chiroptère insectivore particulièrement exigeante vis-à-vis de la configuration du paysage dans lequel elle se déplace. Sa feuille nasale concentre les ultrasons de hautes fréquences (environ 80 kHz) qu'il émet en un faisceau très étroit ce qui lui permet de détecter des détails très fins. Cette particularité lui confère de grands avantages pour la chasse, mais les hautes fréquences s'atténuant rapidement dans l'air, le Grand rhinolophe possède une courte distance de détection, de l'ordre d'une dizaine de mètres. Il semble donc avoir besoin d'évoluer dans un paysage hétérogène et structuré, comme les bocages (champs ou prairies clos par des haies) où il utilise des points de repères pour se déplacer. Pinaud *et al.* (2018) ont ainsi récemment montré que le Grand rhinolophe ne franchissait pas une trouée de plus de 50 mètres durant ses activités de chasse. Un paysage tel qu'une grande zone agricole sans repères ou de grandes infrastructures de transport pourraient donc constituer des barrières à ses déplacements et engendrer un isolement des colonies. Les individus de différentes colonies ne pouvant plus se rencontrer et se

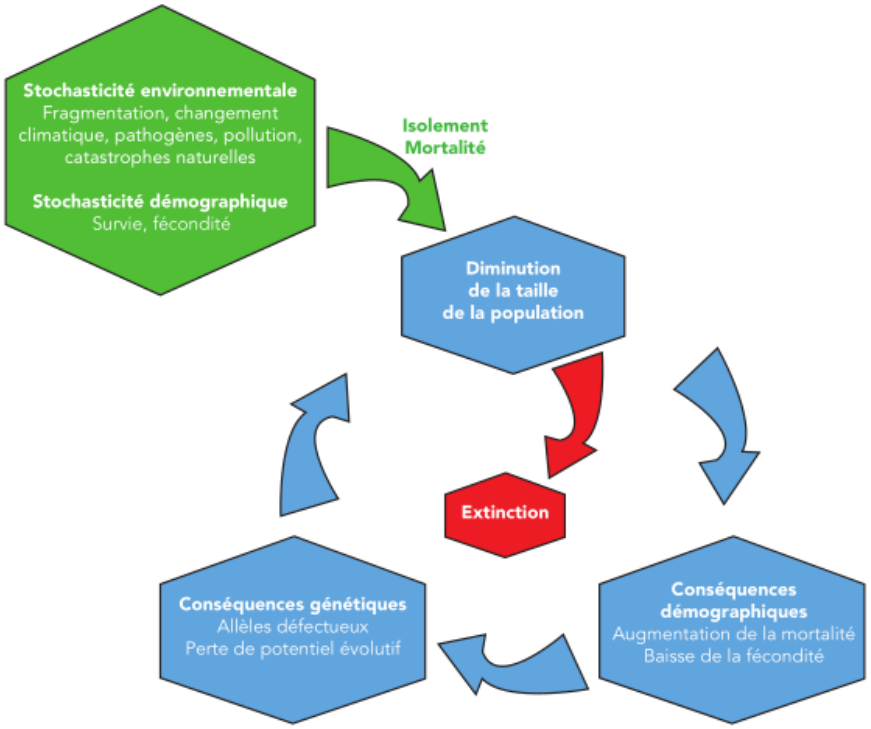


Figure 1.
Causes et conséquences principales de l'extinction des espèces. D'après la spirale d'extinction de Gilpin & Soulé (1986).

reproduire à cause de ces barrières, chaque colonie va constituer une population, plus petite que la population initiale. Or la taille de la population est un facteur primordial de la pérennité d'une population car plus elle diminue, plus le risque d'extinction augmente (Frankham 1996 ; Gilpin & Soulé 1986) : c'est ce qu'on appelle le vortex d'extinction (**Figure 1**).

Une conséquence négative majeure est la perte de diversité génétique. Une perte de diversité génétique implique un risque plus élevé pour les nouveau-nés de recevoir des allèles récessifs délétères et ce risque est d'autant plus élevé lorsque la taille de la population est tellement réduite que les individus ne peuvent se reproduire qu'entre apparentés (consanguinité). Cela peut engendrer une baisse de fécondité ou/et une augmentation de la mortalité des juvéniles (Keller & Waller 2002). De plus, une perte de diversité génétique engendre une baisse, voire une disparition, du potentiel adaptatif nécessaire pour faire face aux changements globaux (Frankham 2005). Il est donc essentiel d'identifier la structure génétique des populations, de déterminer leur diversité génétique et d'étudier leur connectivité pour pouvoir mettre en place des programmes de conservation adaptés aux différents niveaux de vulnérabilité des populations. Les effectifs du Grand rhinolophe sont hétérogènes en France, avec une concentration importante dans l'Ouest de la France (Bretagne, Pays de la Loire, Centre-Val-de-Loire, Nouvelle-Aquitaine) qui regroupe 46 % des effectifs hivernaux et 37 % des effectifs estivaux (SFEPM 2014). La région Nouvelle-Aquitaine accueille ainsi l'une des plus importantes populations hibernantes (16200 individus, 22 % des effectifs nationaux) et estivantes (7400 individus, 15 % des effectifs nationaux) de France. Cette région porte donc une responsabilité importante dans la conservation du Grand rhinolophe à l'échelle nationale.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de mieux comprendre le fonctionnement de cette population en apportant des éléments sur (i) la santé génétique des colonies : quelle est la diversité génétique des colonies ? Trouve-t-on des signatures de consanguinité ? (ii) la connectivité des colonies : certaines colonies sont-elles isolées ? Si oui quelles sont les barrières

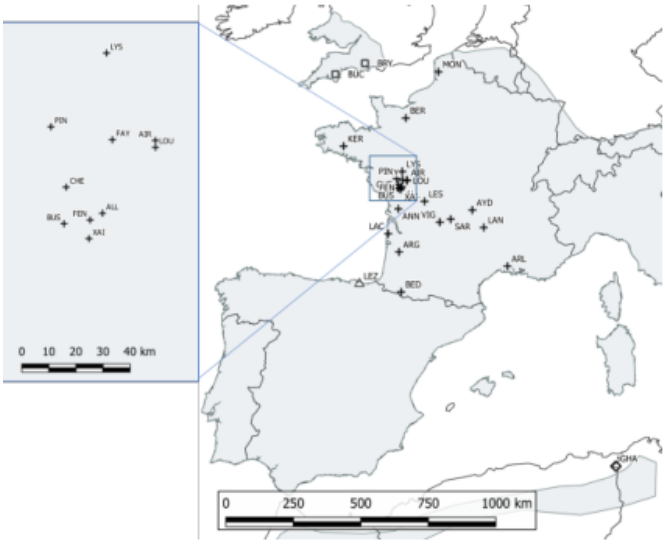


Figure 2.
Carte des colonies échantillonnées pour l'étude. L'aire de répartition du Grand rhinolophe est représentée en gris (IUCN, 2016). Chaque colonie est nommée par un code : Bryanston (BRY), Buckfastleigh (BUC), Montreuil-sur-mer (MON), Kernascleden (KER), Lys-Haut-Layon (LYS), Allonne (ALL), Le Busseau (BUS), Le Pin (PIN), La Chapelle-Saint-Etienne (CHE), Xaintray (XAI), Airvault (AIR), Saint-Loup-sur-Thouet (LOU), Faye l'Abesse (FAY), Fenioux (FEN), Lessac (LES), Annepont (ANN), Sarran (SAR), Vignols (VIG), Aydat (AYD), Langeac (LAN), Lacanau (LAC), Argelouse (ARG), Arles (ARL), Bedous (BED), Lezate (LEZ), GHA. Les symboles (croix, carré, triangle, losange) indiquent le pays d'échantillonnage.

aux déplacements des individus ? (iii) la taille des populations : quelle est la « taille génétique » (aussi appelée « taille efficace ») des populations de Grand rhinolophe ? Détecte-t-on des signatures de déclin ou d'expansion récents dans les données génétiques ? Ces éléments permettront d'apporter des informations pertinentes en terme de conservation des populations de Grand rhinolophe sur le territoire français.

Matériel et méthodes

Nous avons utilisé 864 prélèvements de patagium de Grand rhinolophe (Encadré 1) collectés dans 24 colonies de maternité en France (partenaires associatifs, LabEx Ecofect et LBBE, été 2016 à 2018), 28 d'une colonie de maternité du Pays Basque espagnol (Inazio Garin, 2012), 36 de deux colonies de maternité anglaises (Fiona Mathews, été 2018) et 22 d'une colonie de maternité tunisienne (Sébastien Puechmaille, été 2012) (Figure 2).

Encadré 1
Choix du matériel biologique pour des analyses de génétique des populations de chiroptères.



Image chiroptère : pixabay.com

Bien que la cicatrisation soit rapide et ne mette pas en danger l'animal, l'utilisation de patagium pour les analyses de génétique est parfois controversée car elle nécessite la capture de l'individu ce qui lui induit du stress. Une méthode alternative consiste à travailler sur du guano collecté sous la colonie lorsque les individus sont sortis pour chasser. Cependant l'utilisation du guano possède de nombreux points faibles par rapport à l'utilisation du patagium. Tout d'abord, l'ADN de chauve-souris contenu dans le guano est dégradé à cause de son environnement (humidité, UV, champignons, ...). Pour éviter tout biais dû à cette dégradation, chaque échantillon doit être analysé trois fois a minima. De plus, comme il est impossible de distinguer si les guanos proviennent du même individu, il faut collecter et analyser beaucoup d'échantillons pour être sûr d'avoir échantillonné assez d'individus différents. L'utilisation de guano ne permet pas de savoir l'âge et la condition corporelle des individus, et connaître le sexe nécessite l'utilisation de marqueurs particuliers. Pour l'ensemble de ces raisons, le coût et le temps des analyses sont grandement augmentés. Ainsi, bien que très prometteuse, l'utilisation de guano reste encore limitée par rapport au patagium et dépend fortement des questions posées, du modèle étudié, du temps et du budget disponible.

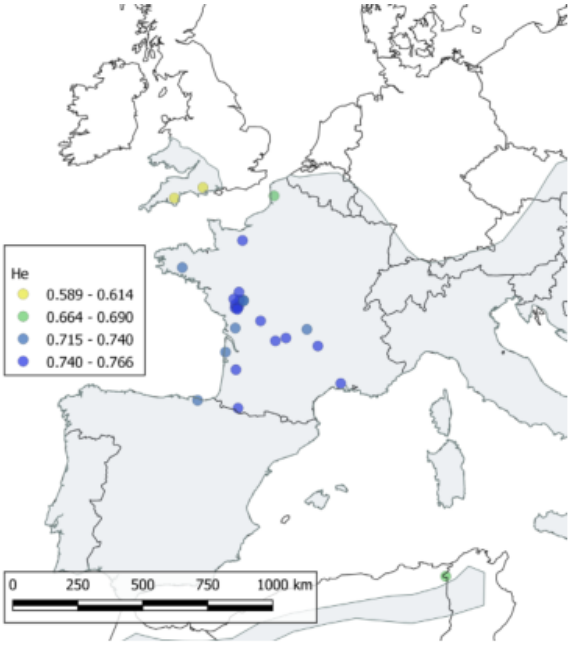


Figure 3
Estimation de la diversité génétique (indice d'hétérozygotie He) dans chaque colonie échantillonnée. L'aire de distribution du Grand rhinolophe d'après les données de l'UICN (2016) est représentée en gris.

Cet échantillonnage en cercles croissants permet de décrire la diversité et la structure génétique des populations de Grand rhinolophe à différentes échelles, locale, régionale et internationale, et d'inclure de potentielles barrières géographiques aux mouvements (zones agricoles, autoroutes, fleuve, montagne, mer).

Les chauves-souris ont été capturées à l'aide d'un « Harp-Trap », puis placées dans un sac de contention avant d'être identifiées, pesées, sexées, mesurées puis relâchées. L'échantillonnage comprend un individu dont le sexe et l'âge n'ont pas été reportés, 887 femelles (789 adultes, 91 juvéniles, sept dont l'âge n'a pas été déterminé), et 62 mâles (19 adultes, 39 juvéniles et quatre dont l'âge n'a pas été déterminé).

Résultats

(i) - Diversité génétique, consanguinité et apparentements

Nos résultats montrent que la diversité génétique est élevée et homogène au Pays Basque espagnol et en France, à l'exception de la colonie de Montreuil-sur-Mer ('MON', Pas-de-Calais) où la diversité génétique est plus faible. Nous observons également que le niveau de diversité génétique des colonies anglaises et tunisiennes est plus faible que celui détecté sur les colonies continentales (Figure 3).

De plus, nous n'avons pas détecté de signature significative de consanguinité au sein des colonies étudiées.

Enfin, l'analyse de la distribution du coefficient d'apparentement r intra-colonie montre que chaque colonie est composée en très grande majorité d'individus non-apparentés (r = 0, Figure 4) et d'une proportion décroissante d'individus apparentés. Seule la colonie du Pas-de-Calais à Montreuil-sur-Mer ('MON') montre une proportion uniforme d'individus apparentés et non-apparentés (Figure 4).

Le coefficient d'apparentement r entre individus de colonies différentes nous indique de forts apparentements (r > 0.5) entre colonies éloignées de 2 à 861 km (Figure 5). Ces forts apparentements impliquent 537 femelles, 33 mâles et un individu dont le sexe n'a pas été déterminé. La majorité des femelles impliquées sont adultes (474 adultes, 59 juvéniles et 4 indéterminées), ce qui n'est pas le cas pour les mâles (12 adultes, 19 juvéniles, deux indéterminés).

(ii) - Analyses démographiques

Nous n'avons pas détecté de changement démographique (déclin ou expansion) significatif dans les colonies étudiées de France et d'Angleterre. Ceci indique que les effectifs « génétiques » de ces colonies peuvent être considérés comme stables. Nous avons pu estimer les tailles génétiques de ces colonies, ce qui a révélé des « tailles efficaces » environ deux fois plus faibles en Angleterre et dans la colonie du Nord de la France (Montreuil-sur-Mer, 'MON') que sur le continent.

Nous avons mis en évidence une signature d'expansion démographique significative dans la colonie Tunisienne ('GHA'). Nous n'avons pas pu dater cette expansion par manque de puissance statistique car l'intervalle de confiance estimé varie de 1 à 11 000 générations, c'est-à-dire de quelques années au dernier maximum glaciaire environ.

(iii) - Différenciation génétique entre colonies

Nos résultats montrent l'existence de trois groupes génétiques : (i) les colonies de France et du Pays Basque espagnol (appelées 'continentales' par la suite), (ii) les colonies anglaises et (iii) la colonie tunisienne. La différenciation génétique (FST) entre les colonies anglaises, tunisiennes et les colonies continentales est très élevée (FST Angleterre- continent ≈ 10 %, FST Tunisie-continent ≈ 12 %).

La différenciation génétique est faible sur le continent (indices de différenciation FST inférieurs à 3 %). Seule la colonie 'MON' (Montreuil-sur-Mer, Pas-de-Calais) montre une différenciation génétique forte avec les autres colonies continentale (3.49 % < FST < 6.46 %). Cette différenciation entre 'MON' et les autres colonies de France est aussi élevée que la différenciation génétique observée entre les colonies d'Angleterre (FST = 5.4 %).

Nous avons réalisé une estimation plus fine des taux de migration génétique (mouvements ayant conduit à la reproduction d'individus provenant de

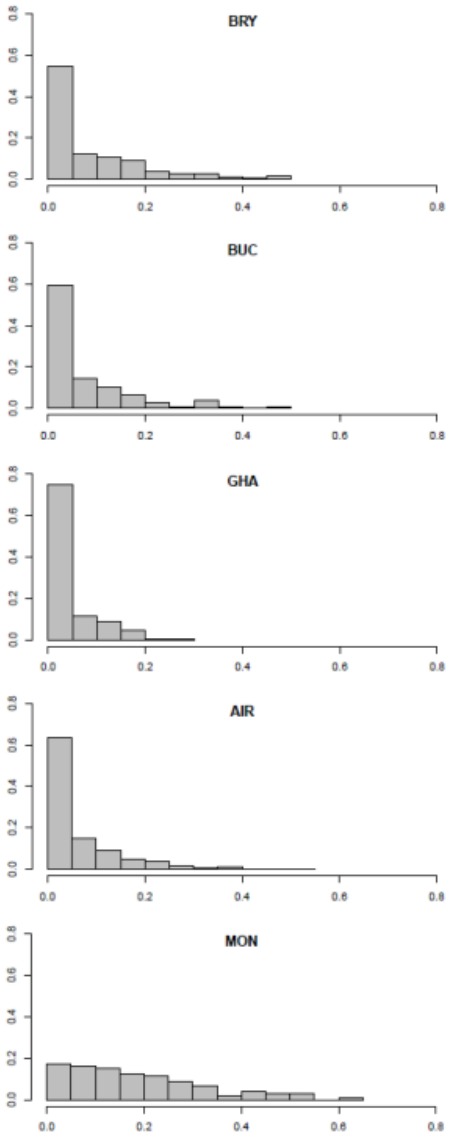


Figure 4
Distribution du degré d'apparentement r au sein de colonies françaises ('AIR', 'MON'), anglaises ('BRY', 'BUC') et tunisienne ('GHA').

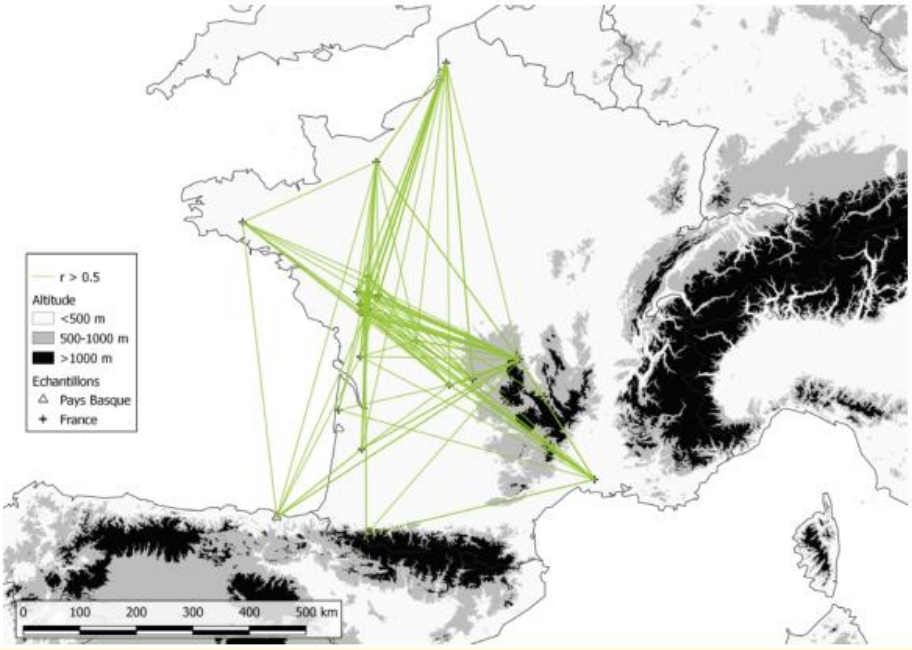


Figure 5
Distribution géographique des fortes valeurs du coefficient d'apparentement r (r > 0.5) entre individus de colonies françaises et de la colonie basque espagnole.

colonies différentes). Cette analyse a révélé l'absence de migration génétique entre les trois groupes précédemment déterminés (Continent, Angleterre, Tunisie), et des événements de migration génétique unidirectionnels au sein du continent. La reproduction entre individus de colonies différentes semble se produire entre Grands rhinolophes migrant de la France vers le Pays Basque espagnol ('LEZ') ou des colonies françaises vers celle de Montreuil-sur-Mer ('MON') (**Figure 6**).

Discussion

Notre étude a révélé que les colonies de Grand rhinolophe échantillonnées en France et au Sud-Ouest des Pyrénées (Pays Basque espagnol) forment une unique et large population, malgré les différentes potentielles barrières paysagères présentes (fleuve, montagne, fragmentation des surfaces boisées). Cette population est délimitée au nord par la Manche et très probablement au sud par la Mer Méditerranée, bien qu'un passage par le détroit de Gibraltar ne puisse pas être totalement exclu. Cette population montre une bonne santé génétique car la diversité génétique y est élevée et aucune signature de consanguinité n'y est observée, ce qui permet d'écarter un risque d'extinction dû à des phénomènes génétiques. Des échantillons dans l'Est de la France et pays limitrophes sont requis pour identifier la limite est de cette population, et pour déterminer si les massifs montagneux que l'on y rencontre (Vosges, Alpes, etc.) jouent un rôle de barrière avec les autres populations de l'Europe continentale.
Grâce à ces résultats d'analyses

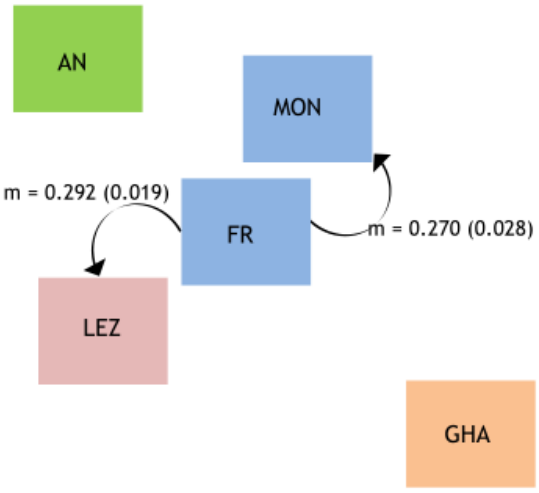


Figure 6
Taux de migration génétique entre les deux colonies d'Angleterre (AN), la colonie du Pays Basque espagnol (LEZ), la colonie de Tunisie (GHA), la colonie française de Montreuil-sur-Mer (MON) et les autres colonies de France (FR). Seuls les taux de migration génétiques significativement différents de zéro sont représentés. Les flèches indiquent la direction de la migration et « m » indique la valeur du taux de migration génétique et son écart-type entre parenthèses.

génétiques et aux analyses préliminaires des données de captures-recaptures des Grands rhinolophes transpondés en Nouvelle-Aquitaine et régions limitrophes, nous savons désormais que juvéniles, adultes, mâles et femelles se déplacent sur de longues distances au sein de cette région et dans les régions voisines (M. Leuchtmann & O. Filippi-Codaccioni, 2019). Ce résultat peut sembler contradictoire avec les précédentes données de Pinaud *et al.* (2018) qui montraient à l'échelle de la colonie une forte diminution de la probabilité de déplacement du Grand rhinolophe face à des ruptures de la connectivité paysagère – suggérant que les modalités de déplacement diffèrent selon les activités (chasse, reproduction, etc.). Ainsi, le Grand rhinolophe prendrait plus de risque face aux absences de « repères paysagers » structurants lors de ses grands déplacements inter-saisonniers que lors de ses déplacements vers ses terrains de chasse autour de la colonie.

Toutefois, notre échantillonnage ne permet pas de tester l'hypothèse selon laquelle les Pyrénées constituent une barrière aux flux de gènes, du fait de l'utilisation possible de corridors sur les côtes Atlantiques et Méditerranéennes. Un meilleur échantillonnage de part et d'autre des Pyrénées permettrait d'obtenir des éléments de réponse.

D'un point de vue démographique, nous avons montré que la taille génétique de cette population continentale Franco-Basque est stable. Cependant il est très délicat de convertir la « taille génétique efficace » en nombre total d'individus adultes du fait de nombreux biais (Luikart *et al.*, 2010; Vonhof *et al.*, 2008). Selon les paramètres utilisés, nos estimations varieraient entre 4135 et 41352 individus adultes. Celles-ci sont inférieures aux estimations réalisées en période estivale en France – 47600 individus mais en prenant en compte adultes et juvéniles (Coordination Chiroptères Nationale SFEPM - Vincent S. (Coord.), 2014). L' approche génétique est donc complémentaire de celle des suivis par comptage des individus et colonies et l'une ne peut pas se substituer à l'autre.

Ainsi, nos résultats soulignent l'importance d'approfondir les connaissances sur la délimitation des populations du Grand rhinolophe, et plus généralement des chauves-souris, car celles-ci ne suivent pas les frontières administratives et leur conservation peut nécessiter des collaborations inter-régionales voire internationales. De plus, nous avons montré que la colonie du Pas-de-Calais Montreuil-sur-mer ('MON') - bien qu'intégrée dans la grande population continentale - possède

un fonctionnement particulier. Sa diversité génétique plus faible, sa différenciation génétique plus élevée et son niveau d'apparentement intra-colonie plus fort suggèrent que cette colonie est plus petite, plus isolée et donc plus vulnérable. Cette situation pourrait être due à un manque d'habitats favorables aux alentours de la colonie, et/ou à sa situation en limite d'aire de répartition de l'espèce (Eckert *et al.*, 2008). Cette colonie nécessite donc une attention particulière en termes de conservation et l'étude des relations entre les colonies proches de 'MON' serait une piste intéressante à creuser.

Ces résultats montrent à nouveau l'importance de poursuivre les suivis des colonies à l'échelle locale. En effet, bien que la grande population soit stable grâce à la forte connectivité entre les colonies, on ne peut pas exclure que localement certaines colonies particulières soient vulnérables, d'autant plus avec la pression croissante des activités humaines et le changement climatique. Il nous paraît donc important de bien comprendre le fonctionnement de ces colonies isolées pour anticiper les mesures de conservation du Grand rhinolophe.

Bibliographie

Eckert, C.G., Samis, K.E., Lougheed, S.C., 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17, 1170–1188. **https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x**

Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126, 131–140. **https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002**

Frankham, R., 1996. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology* 10, 1500–1508. **https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10061500.x**

Gilpin, M.E., Soulé, M.E., 1986. Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 230–241. **https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8**

Luikart, G., Ryman, N., Tallmon, D.A., Schwartz, M.K., Allendorf, F.W., 2010. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conserv Genet* 11, 355–373. **https://doi.org/10.1007/s10592-010-0050-7**

Pinaud, D., Claireau, F., Leuchtmann, M., Kerbiriou, C., 2018. Modelling landscape connectivity for greater horseshoe bat using an empirical quantification of resistance. *Journal of Applied Ecology* 0. **https://doi.org/10.1111/1365-2664.13228**

Vincent, S., 2014. Chiroptères de

l'annexe II de la Directive Habitats-Faune-Flore. Synthèse actualisée des populations en France – Bilan 2014. SFEPM.

Vonhof, M.J., Strobeck, C., Fenton, M.B., 2008. Genetic Variation and Population Structure in Big Brown Bats (*Eptesicus fuscus*): Is Female Dispersal Important? *Journal of Mammalogy* 89, 1411–1420. **https://doi.org/10.1644/08-MAMM-S-062.1**

Pour citer cet article :

Tournayre O. 2019.
Génétique des populations
et biologie de la conservation
du Grand Rhinolophe.

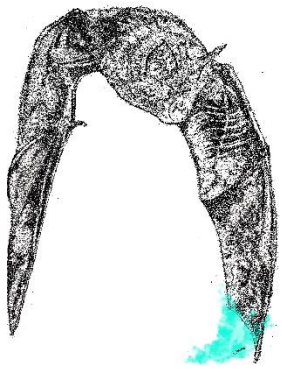
Pour télécharger tous les articles
de Plume de Naturalistes:
www.plume-de-naturalistes.fr

ISSN 2607-0510

Remerciements

Ce projet initié par l'Université de Lyon (LabEx ECOFECT) et Poitou-Charentes Nature repose sur l'implication de nombreux bénévoles et associations qui ont permis l'élargissement géographique de l'échantillonnage organisé et réalisé par l'Université de Lyon et les associations membre de Poitou-Charentes Nature (Deux-Sèvres Nature-Environnement, Nature-Environnement 17, Charente Nature, Vienne Nature, LPO France) et le CREN Poitou-Charentes. Les autres associations sont : Groupe Chiroptères des Pays-de-la-Loire, Groupe Chiroptères Aquitaine, Groupe Chiroptères du Groupe Mammalogique et Herpétologique du Limousin, Chauves-Souris Auvergne, Groupe Chiroptères de Provence, Groupe Mammalogique Normand, Amikiro, Coordination Mammalogique du Nord de la France.
La capture des chauves-souris sur le terrain et les prélèvements biologiques sont réalisés dans le cadre du projet Feder "Grand rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique des populations" porté par Poitou-Charentes Nature et le Labex EcOFECT.
Ce travail a été financé par le LabEx ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) de l'Université de Lyon via le programme "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) opéré par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), un financement interne du Centre de Biologie pour la Gestion des Populations et a reçu un soutien financier de la région Nouvelle-Aquitaine et de la DREAL Nouvelle Aquitaine. Ce travail est issu de la thèse d'Orianne Tournayre financée par le LabEx CeMEB (ANR «Investissements d'Avenir» program ANR-10-LABX-04-01) et co-encadrée par N. Charbonnel et D. Pontier.
Les données de génotypage obtenues dans cette étude ont été produites grâce aux installations du LabEx Centre Méditerranéen Environnement Biodiversité (LabExCeMEB, plateforme GenSeq). Les analyses ont été réalisées sur la plateforme de calcul CBGP HPC et sur la plateforme de calcul Genotoul.

CHAPITRE II. Mise au point et optimisation d'une approche de metabarcoding pour l'étude du régime alimentaire de chauve-souris insectivores : identification simultanée des proies et du prédateur



1. Contexte et objectif du chapitre

Les chauves-souris insectivores sont particulièrement sensibles à l'abondance et la qualité de proies disponibles par leurs besoins énergétiques élevés pour voler, hiberner et s'occuper de leur progéniture. Par exemple les femelles Molosses du Brésil (*Tadarida brasiliensis*) peuvent consommer une quantité de proies équivalente à 73 % de leur masse par nuit en période de lactation (Kunz, Whitaker, et Wadanoli 1995). Une connaissance approfondie du régime alimentaire de ces chiroptères est nécessaire pour mettre en place et évaluer les mesures de conservation, qui pourraient cibler une meilleure protection de l'habitat de chasse ou des préconisations en termes de réductions de pesticides sur les territoires de chasse protégés.

Cependant, la caractérisation précise du régime alimentaire des chauves-souris insectivores est un réel challenge car ces dernières sont difficilement observables en chasse et se nourrissent de proies pouvant être minuscules et impossibles à identifier de nuit. De plus, de nombreuses espèces de chauves-souris sont menacées et donc protégées, de sorte que les méthodes invasives ne peuvent pas être utilisées pour effectuer des analyses de régime alimentaire. Jusqu'à récemment, la méthode classique d'étude du régime alimentaire reposait sur l'identification morphologique des restes de fragments durs des proies (ex : élytres, tarses, antennes) retrouvés dans les fèces (Figure 21) (Kurta et Whitaker 1998; Jones 1990; Hayes et al. 2019; Kervyn et al. 2012). Cette méthode d'analyse peut être très chronophage et nécessite de faire appel à des experts en taxonomie si l'on souhaite atteindre une identification taxonomique précise des arthropodes correspondant aux fragments observés. L'identification n'est généralement possible qu'à l'ordre ou à la famille, et elle n'est pas exhaustive puisque les parties molles des individus sont digérées et donc inaccessibles à l'observateur (ex : chenilles) (Clare et al. 2009).

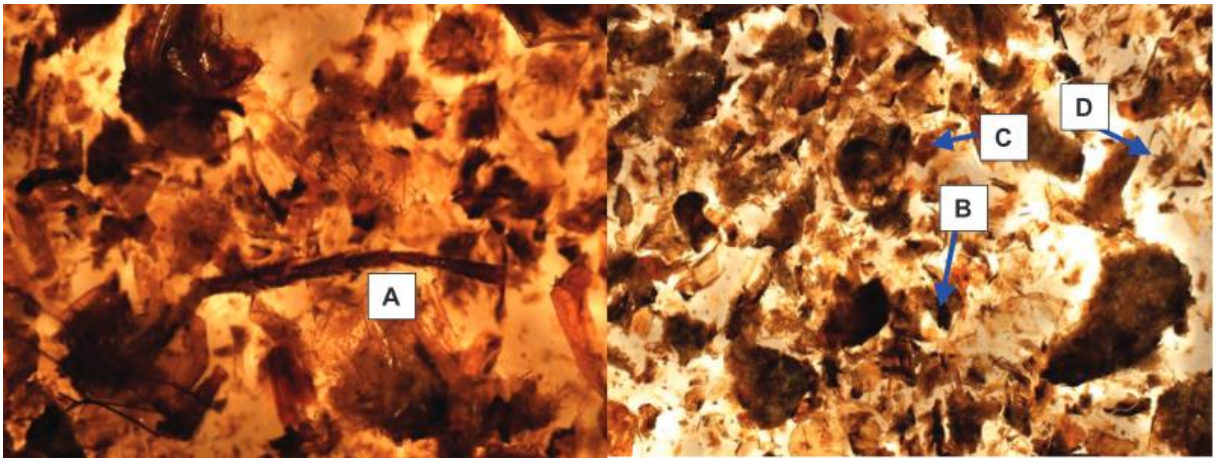


Figure 21. Photographie de fragments d'arthropodes (A, B, C, D) dans des fèces de chauve-souris (Figure issue de Clare et al. 2009).

L'application d'approches moléculaires de séquençage de nouvelle génération aux études de régime alimentaire permet aujourd'hui de pallier à certains de ces problèmes. C'est ce qu'on appelle le « metabarcoding », c'est à dire la description qualitative de l'ADN d'organismes différents présents dans un même échantillon (Taberlet et al. 2012). Les organismes sont identifiés par une courte région de l'ADN, appelée code-barres ADN, dont la séquence est propre à chaque espèce. Le code-barres ADN généralement utilisé pour identifier les animaux à partir de leur ADN est une portion d'ADN mitochondrial de 658 paires de base (pb) provenant d'un gène appelé cytochrome oxydase 1 (COI) (Andújar et al. 2018). La séquence de ce gène a la particularité de beaucoup varier entre espèces mais pas ou peu au sein de l'espèce (Hebert et al. 2003). Cependant, l'ADN contenu dans le guano est souvent dégradé en courtes séquences ce qui rend difficile voire impossible de déchiffrer la totalité de la séquence de 658pb du COI. Pour ce type d'échantillon, on se contente de séquencer un fragment court (inférieur à 200pb) qui doit idéalement conserver un pouvoir de discrimination à l'espèce et pour des organismes très différents : on parle alors d'un « minibarcode ADN universel » (Hajibabaei et al., 2006; Pompanon et al., 2012). Après séquençage, le déchiffrage

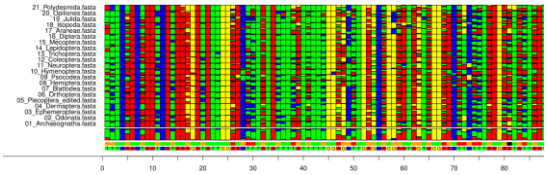
des multiples codes-barres ADN contenus dans un même échantillon est réalisé en interrogeant des bases de données publiques de séquences de référence qui ont été alimentées par le travail conjoint de taxonomistes et de biologistes moléculaires. Grâce à ces bases de données et à l'avènement du séquençage à haut-débit, il est aujourd'hui possible de déterminer rapidement et avec fiabilité les espèces présentes en mélange à partir d'échantillons environnementaux tels que l'eau, le sol, les déjections et bien d'autres prélèvements susceptibles de contenir de l'ADN (Bohmann et al. 2014). Cependant, le metabarcoding est sujet à de nombreux biais biologiques et techniques à chaque étape de son processus (collecte sur le terrain, analyses de laboratoire et bio-informatique). En effet, le stockage dans de mauvaises conditions, les contaminations, les inhibiteurs et la stochasticité de la PCR, ainsi que la création de chimères sont des biais communs qui influencent la fiabilité des résultats (pour une revue voir Alberdi et al. 2019). De nombreuses études méthodologiques ont été réalisées pour limiter certains de ces biais et fournir des lignes directrices pour l'élaboration de protocoles de metabarcoding, comme par exemple l'inclusion systématique de réplicas techniques et de contrôles négatifs (Alberdi et al. 2018; Corse et al. 2017; Elbrecht et Steinke 2019; Galan et al. 2016; Mata et al. 2018).

L'analyse par metabarcoding de l'ADN contenu dans les guano de chauve-souris a été développée (i) pour mieux comprendre l'écologie de la chauve-souris (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015; Clare et al. 2014), (ii) pour mettre en évidence les services écosystémiques potentiels fournis par les chauves-souris en tant que suppresseurs de ravageurs de cultures (Aizpurua et al. 2018; Maslo et al. 2017b), et (iii) pour mettre en place des stratégies de conservation efficaces (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015). Or, la plupart de ces études ont utilisé des amorces spécifiques aux arthropodes car l'amplification de l'ADN de prédateur est supposée réduire la sensibilité de la détection de l'ADN des proies (Pompanon et al. 2012;

Vestheim et Jarman 2008). Les auteurs utilisent classiquement des combinaisons d'amorces et des méthodologies différentes pour identifier les espèces de chauves-souris d'une part et les arthropodes de l'autre (par exemple, Bohmann et al., 2011; Van den Bussche et al., 2016). Cela pose deux problèmes majeurs lorsque l'on travaille avec du guano récolté sur le sol des colonies. Premièrement, il est très courant que plusieurs espèces de chauves-souris cohabitent (Ashrafi et al. 2010; Berthier, Excoffier, et Ruedi 2006; Dietz, Pir, et Hillen 2013a), dont des espèces cryptiques (Filippi-Codaccioni et al. 2018), et deuxièmement le guano n'est pas facilement reconnaissable entre les espèces de chauves-souris. Il est donc essentiel, d'une part d'être capable d'identifier les espèces de chauves-souris pour éviter l'assignation de proies aux mauvaises espèces de chauves-souris par erreur et d'autre part pour éliminer les échantillons de guano contaminés par les fèces d'autres espèces de chauves-souris ou d'espèces insectivores (ex : oiseaux).

Un biais technique majeur à considérer dans les études de metabarcoding concerne le choix des amorces. En effet, le fragment d'ADN ciblé doit être suffisamment variable pour discriminer les espèces proches, mais également abondamment référencé dans des bases de données de séquences publiques pour permettre l'identification des séquences obtenues. Or, bien que le nombre d'études sur le choix des amorces soit croissant, à ce jour aucun consensus n'existe et les différentes études de comparaison d'amorces adoptent des méthodes contrastées (Encadré 5).

Analyse in silico



Une analyse in silico désigne une recherche effectuée au moyen de modèles informatiques. Dans le cadre du metabarcoding elle est basée sur des séquences ADN disponibles dans les bases de données publiques. Le graphique ci-gauche illustre un alignement de 21 séquences consensus d'ordres d'arthropodes (en ligne, axe Y) pour la création d'amorces, chaque couleur représente un nucléotide.

Communauté artificielle



Une communauté artificielle est un mélange artificiel de taxa identifiés morphologiquement au préalable. Elle simule un repas dont la composition est connue. Cela permet de tester la sensibilité (« est-ce que je détecte tous les taxons ? ») et la résolution (« à quel rang taxonomique est-ce que je les identifie ?») du/des couples d'amorces.

Echantillon environnemental



Un échantillon environnemental est un échantillon prélevé dans l'environnement qui ne nécessite pas la capture de l'individu (ex : eau, sol, fèces) et dont la composition est inconnue.

Encadré 5. Méthode d'analyses pour la comparaison d'amorces en metabarcoding.

Ainsi, certaines études se focalisent uniquement sur des comparaisons *in silico* (Marquina, Andersson, et Ronquist 2019), sur des communautés artificielles (Braukmann et al. 2019), ou sur de « vrais échantillons » (Esnaola et al. 2018; Rytkönen et al. 2019). D'autres combinent des comparaisons *in silico* et de communautés artificielles (Elbrecht et Leese 2017), ou des comparaisons de communautés artificielles et de « vrais échantillons » (Galan et al. 2018; Jusino et al. 2018). A notre connaissance aucune étude ne combine les trois approches sur des couples d'amorces variés. Or, les recommandations issues de ces études comparatives sont

très contrastées. Certains auteurs recommandent l'utilisation conjointe de plusieurs couples d'amorces du gène COI (Corse et al. 2019; Esnaola et al. 2018) ou de plusieurs gènes dont l'ADNr 16S mitochondrial et le COI (Alberdi et al. 2018; Bohmann et al. 2018), afin d'accroître la gamme du spectre taxonomique des proies détectées. Par exemple, Esnaola et al. (2018) ont montré que la combinaison des amorces proposées par Zeale et al. (2011) et Gillet et al. (2015) permet de détecter 37,2% d'espèces en plus que le couple d'amorces de Gillet seul. Cependant, la combinaison de plusieurs couples d'amorces augmente considérablement non seulement le coût financier, mais également la durée des travaux de laboratoire et des analyses. Dans ce contexte, l'utilisation d'un seul couple d'amorces hautement dégénéré est potentiellement très prometteur. Certaines études ont mis en évidence l'efficacité des amorces dégénérées (Elbrecht et Leese 2017; Vamos, Elbrecht, et Leese 2017; Galan et al. 2018). Des bases dégénérées sont utilisées aux positions où des disparités sont observées entre les séquences de taxa variés (*mismatch*). Grâce aux mélanges de bases à certaines positions de la séquence d'amorce, l'amorce dégénérée correspond à un mélange de plusieurs versions différentes d'amorces pour les mêmes positions, ce qui permet l'amplification et l'identification de différents taxons. Cependant, les amorces dégénérées doivent être soigneusement conçues, car des niveaux élevés de dégénérescence peuvent entraîner des taux élevés d'amplification non ciblée (Innis et al. 2012).

Dans le cadre de ce travail, nous avons dans un premier temps développé une approche de metabarcoding qui soit capable d'identifier simultanément pour des centaines d'échantillons l'ensemble des espèces de chauve-souris de Nouvelle-Aquitaine et leurs proies. Dans un second temps, nous avons optimisé cette méthode pour l'étude spécifique

d’échantillons collectés dans des colonies mixtes de Grand rhinolophe et de Murin à oreilles échancrées, notamment par la recherche du/des couple(s) d’amorce(s) optimal(aux).

2. Identification simultanée des espèces de chauve-souris françaises et de leurs proies

2.1. Méthodologie

Nous avons développé une approche de metabarcoding en two-step PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Figure 22). La première PCR sert à amplifier le fragment d’intérêt et la seconde PCR sert à indexer les échantillons avec des étiquettes moléculaires uniques. Cette technique permet de multiplexer des centaines d’échantillons sur un même run de séquençage.

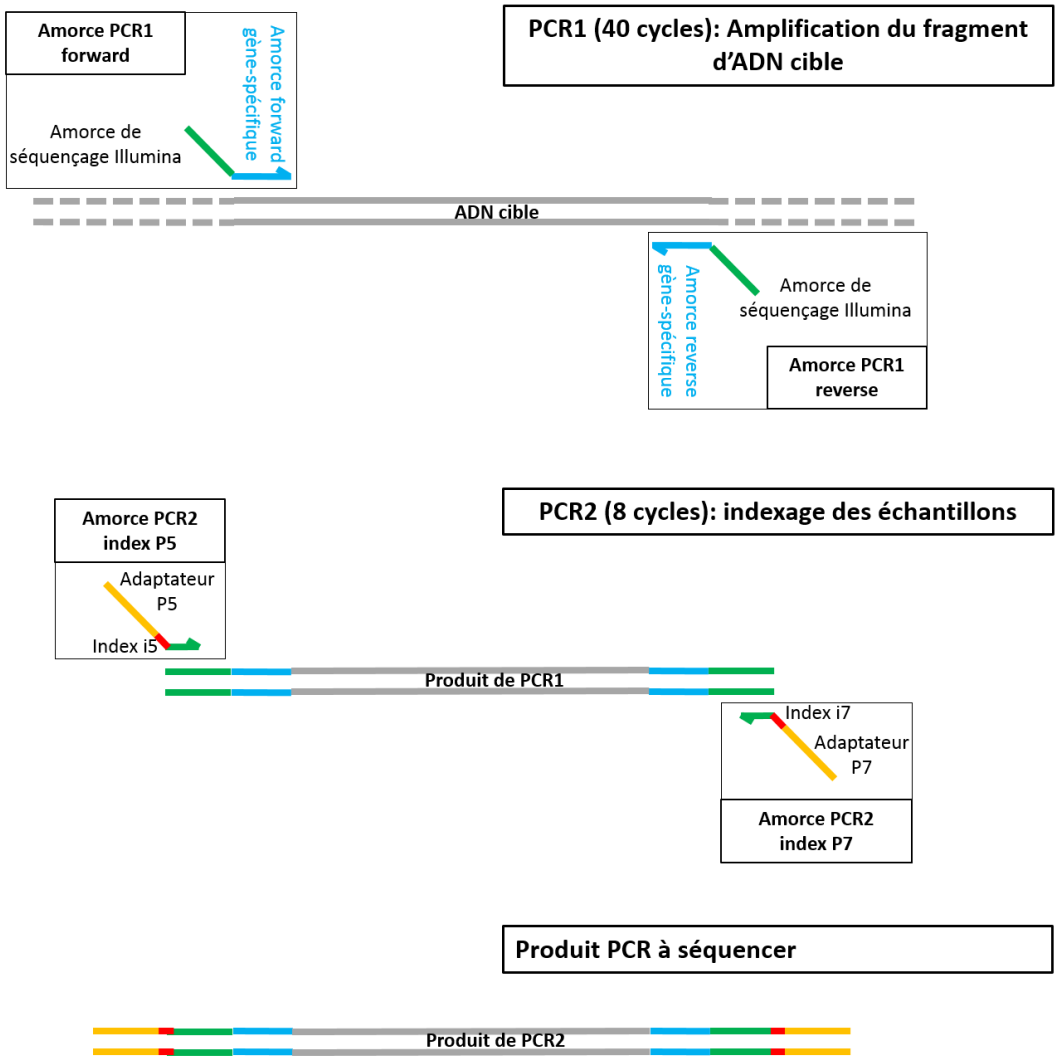


Figure 22. Schéma du fonctionnement de l'approche en Two-step PCR. PCR1 : hybridation des amorces gène-spécifiques et de l'amplicon. Chaque amorce est constituée d'une séquence gène-spécifique (en bleu) en 3' qui permet l'hybridation à l'ADN cible, et d'une extrémité universelle overhang (en vert) en 5'. A la fin de la PCR1, chaque amplicon possède à ses extrémités les séquences des amorces de séquençage Illumina (en vert) qui sont (1) utilisées comme linkers à la PCR2 et (2) utilisées comme site d'hybridation des amorces de séquençage lors du run MiSeq. PCR2 : hybridation des amorces d'indexage et de l'amplicon. La partie en 3' de chaque amorce (en vert) permet l'hybridation aux produits PCR1. A la fin de la PCR2, les amplicons possèdent à leurs extrémités les séquences des adaptateurs P5 et P7 Illumina (en orange), les index de multiplexage (en rouge) et les séquences complémentaires aux amorces de séquençage Illumina (en vert). D'après Galan et al. 2018.

Chaque extrait d'ADN a été amplifié et séquencé sur MiSeq en triplicat, et chaque run de séquençage inclut des contrôles positifs et négatifs. Ces réplicas techniques permettent de confirmer la présence d'un taxa dans un échantillon et d'éviter les faux-positifs (espèce détectée comme présente alors qu'elle ne l'est pas) (Alberdi et al. 2018). Après filtrage grâce aux différents contrôles et réplicas, les séquences ont été comparées à celles renseignées dans BOLD pour le COI et GenBank pour le 16S , et attribuées à un taxon avec un critère de confiance modifié d'après Razgour et al. (2011).

2.2. Validation par l'utilisation de communautés artificielles

Nous avons testé la capacité de notre méthode de metabarcoding à identifier différents ordres d'arthropodes en réalisant des mélanges d'insectes (communautés artificielles), identifiés au préalable par des entomologistes du CBGP, pour simuler des repas de chauve-souris. Deux communautés artificielles contenant des insectes d'ordres diversifiés (orthoptères, lépidoptères, coléoptères, hémiptères, dermaptères, neuroptères et diptères) ont été analysées. La première (communauté artificielle 1) est composée de douze espèces présentes en France et la seconde (communauté artificielle 2) de sept espèces d'autres pays. Chaque insecte a été séquencé individuellement et en mélange (ADN de chaque insecte mélangé en proportions égales).

Le protocole utilisé est composé de cinq étapes principales (Figure 23) : extraction de l'ADN, amplification du code-barres par PCR, séquençage, analyse bio-informatique et comparaison des séquences à celles archivées dans la base de données BOLD (Barcode Of Life Database : http://www.boldsystems.org/). Pour les communautés artificielles, une sixième étape est ajoutée (comparaison des identifications moléculaires à celles réalisées par les entomologistes). La comparaison du séquençage individuel et en mélange permet de mesurer

d’éventuels biais de détection de certaines espèces pour les mélanges.

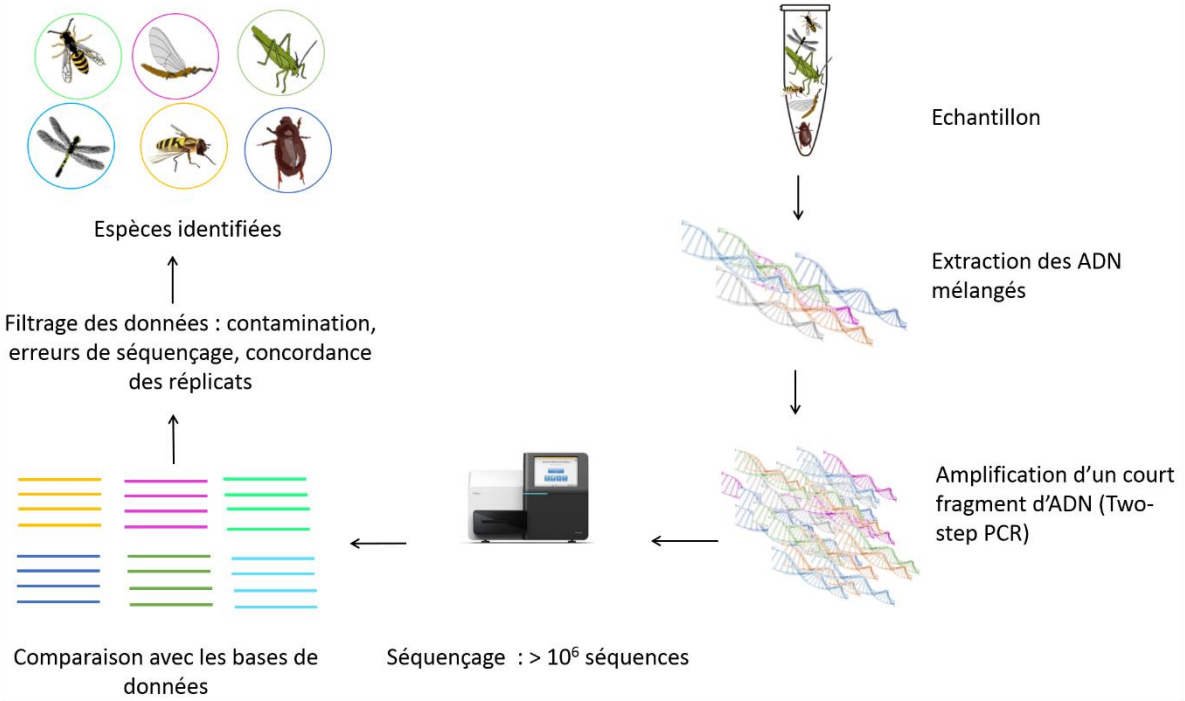


Figure 23. Schéma récapitulatif des cinq étapes principales du protocole de traitement des échantillons dans le cas d’une communauté artificielle composée de six taxa d’arthropode.

2.3. Application de la méthode à des échantillons de guano

Les chauves-souris ont été capturées dans 18 sites de Poitou-Charentes entre Juin et Septembre 2015.

Pour chaque site, les pièges harpe ont été positionnées une nuit devant l’ouverture du gîte avant le coucher du soleil. Chaque chauve-souris capturée a été placée dans un sac en polaire avant d’être identifiée morphologiquement par des experts, pesée, sexée, mesurée puis relâchée. Les fèces ont été prélevés soit sur l’animal pendant la manipulation, soit dans le sac qui le contenait (Figure 24). Au total, 357 fèces provenant de 16 espèces de chauves-souris ont été récoltés, placés individuellement dans des tubes hermétiques et laissés à température

ambiante jusqu'à extraction quelques mois après. Les échantillons de guano ont été analysés avec la même méthode de metabarcoding que les échantillons d'insectes des communautés artificielles.

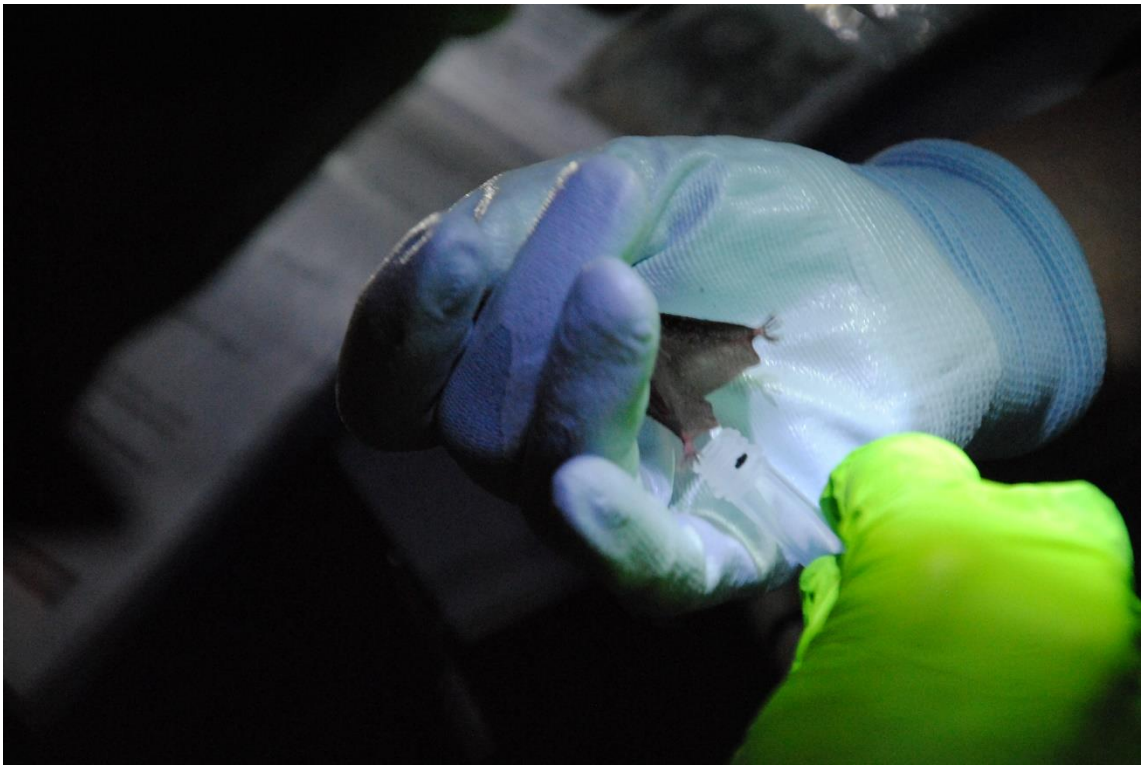


Figure 24. Prélèvement de fèces sur un Grand rhinolophe en main. ©N. Charbonnel

Le régime alimentaire obtenu pour chaque espèce de chiroptère a été comparé aux données trouvées dans la littérature. Afin d'explorer la possibilité d'appliquer notre technique de metabarcoding en agronomie et en santé publique en tant qu'outils de surveillance des espèces de ravageurs ("Chirosurveillance"; Maslo et al., 2017) et de vecteurs de maladies, nous avons identifié parmi les arthropodes ceux considérés comme des ravageurs ou comme des espèces d'importance vétérinaire/santé publique.

2.4. Principaux résultats

2.4.1. Une méthode sensible et résolutive

Pour les deux communautés artificielles analysées, nous avons identifié l'ensemble des 19 espèces d'insectes incluses, que ce soit en séquençage individuel ou en mélange. Cependant nous avons observé que certains taxa en mélange sont détectés avec une plus grande proportion de séquences que d'autres, malgré le mélange équimolaire de l'ADN des différentes espèces initialement réalisé. La majorité (74 %) des insectes introduits dans les communautés artificielles ont été identifiés à l'espèce mais certains n'ont pas pu l'être car ils ne sont pas référencés dans la base de données.

2.4.2. Identification simultanée de 16 espèces de chauves-souris et 290 espèces d'arthropodes

L'identification moléculaire des chauves-souris est parfaitement concordante avec l'identification morphologique faite sur le terrain pour 238 des 336 échantillons (70.8 %). Pour 72 échantillons (21.5 %), l'identification n'a pas pu être confirmée entre réplicas techniques à cause d'échecs d'amplification PCR. Pour 17 échantillons (5.1 %), un mélange de deux espèces de chauves-souris est obtenu, et pour 9 échantillons (2.7 %), l'identification moléculaire est complétement différente de celle obtenue sur le terrain.

La composition du régime alimentaire a été décrite pour 216 échantillons, ces échantillons remplissant les conditions suivantes : identifications morphologique et moléculaire de l'espèce de chauve-souris concordantes pour au moins un réplica technique et présence de codes-barres ADN de proies bien identifiés et obtenus de manière répétable entre les trois réplicas. Au total, nous avons identifié 18 ordres d'arthropodes, 117 familles, 282 genres et

290 espèces (Figure 25). Enfin, notre méthode a permis d'identifier une large gamme d'arthropodes, même à partir d'un faible nombre de fèces : 17 taxa de proies identifiés à l'espèce à partir de huit fèces de Petit rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) et 23 taxa de proies identifiés à l'espèce à partir de quatre fèces de Murin de Natterer (*Myotis nattereri*).

Au total, notre jeu de données a révélé la présence de 63 espèces de nuisibles (ravageurs, arthropodes à impact vétérinaire/sur la santé publique) (Figure 26), dont certaines sont d'intérêt agronomique (par exemple, la noctuelle de la tomate *Helicoverpa armigera*, la drosophile à ailes tachetées *Drosophila suzukii* ou pour la santé (par exemple, le vecteur du paludisme *Anopheles claviger* et la mouche charbonneuse *Stomoxys calcitrans*).

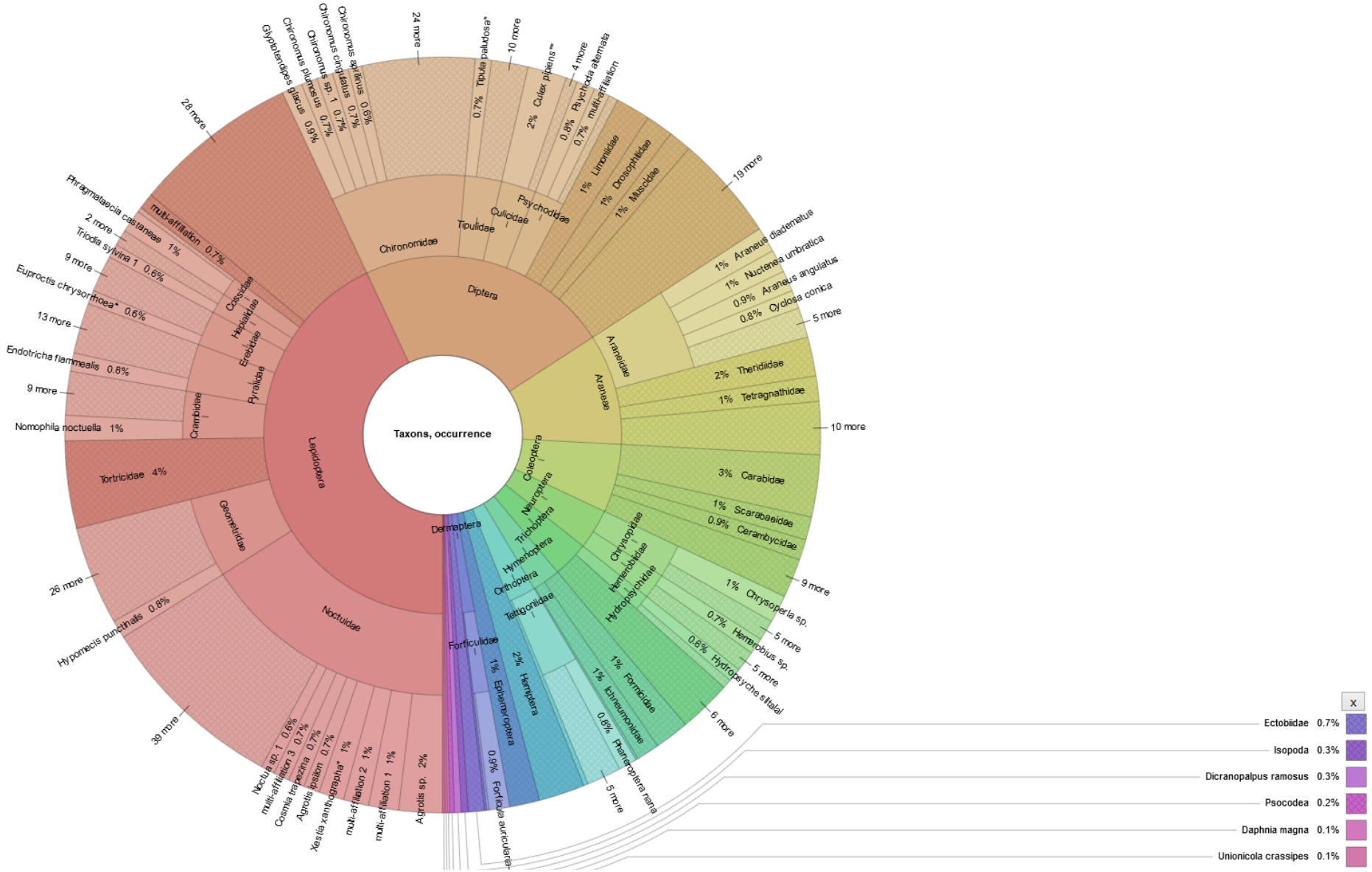


Figure 25. Représentation hiérarchique de la diversité taxonomique d'arthropodes contenue dans les 216 échantillons de 16 espèces chauves-souris. Les différents cercles représentent les rangs taxonomiques (de l'ordre au centre à l'espèce en périphérie). La largeur attribuée à chaque taxon est proportionnelle au nombre d'occurrences détectées.

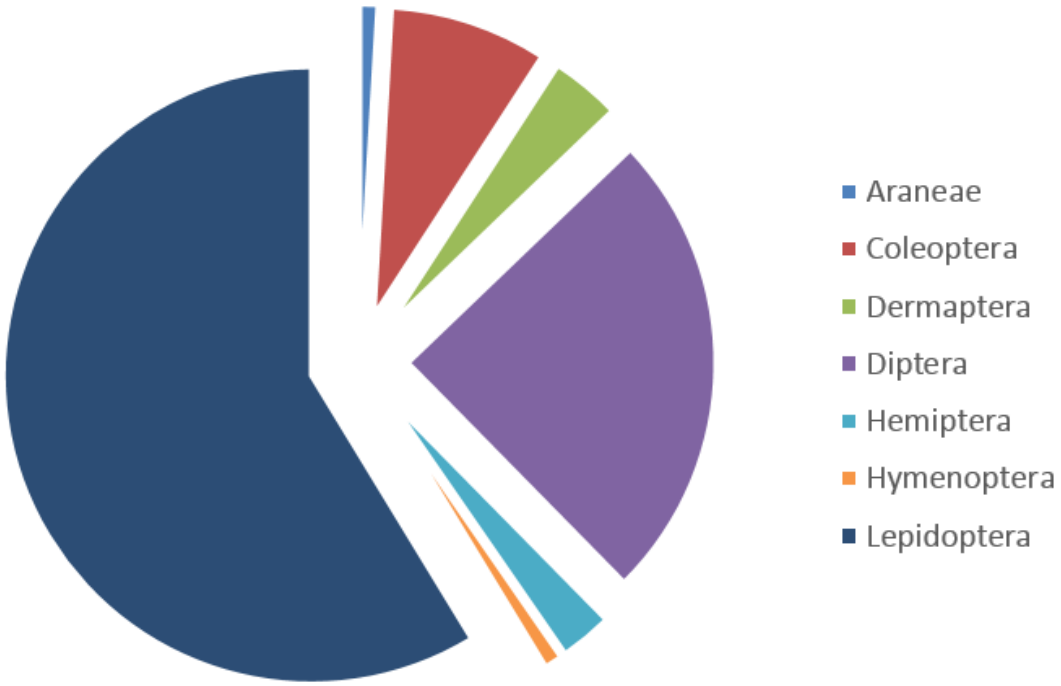


Figure 26. Appartenance taxonomique (ordre) des 63 espèces de nuisibles identifiées.

2.5. Discussion

Nos résultats sur communautés artificielles montrent que notre méthode est sensible car la totalité des taxa a été détectée. Cependant, nous avons mis en évidence la présence de biais de détection possible en fonction des espèces en mélange et de leur biomasse respective. Ce phénomène, déjà observé dans d'autres études (Piñol et al. 2015), peut s'expliquer par des biais d'amplification PCR (Nichols et al. 2018).

Notre méthode s'est avérée résolutive avec la quasi-totalité des taxa identifiés à l'espèce. Trois taxa d'arthropodes des communautés artificielles montrent des identifications équivalentes entre plusieurs espèces du même genre. Ce manque de résolution taxonomique peut provenir d'erreurs possibles dans la base de données de référence. De plus, deux taxa n'ont pas pu être identifiés car leurs codes-barres ne sont pas référencés dans la base de données BOLD. Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'exhaustivité des bases de

données où sont référencés les codes-barres ADN. Sans code-barres de référence auxquels comparer les séquences ADN obtenues par metabarcoding, aucune identification n'est possible. C'est pourquoi il est parfois nécessaire d'échantillonner des taxa candidats qui n'ont pas été séquencés et renseignés, de les identifier morphologiquement avec l'aide d'entomologistes puis de les séquencer par barcoding classique afin de mettre à disposition ces informations dans les bases de données publiques.

Les résultats de régime alimentaire obtenus sont concordants avec les études précédentes basées sur l'analyse microscopique des parties dures d'arthropodes présents dans le guano. Par exemple, le régime alimentaire du Murin de Daubenton (*Myotis daubentonii*) est connu pour être principalement composé de diptères (Vesterinen et al. 2013), ce que nous retrouvons dans nos résultats avec 79 % des échantillons analysés de cette espèce de chauve-souris contenant des diptères. Notre méthode apporte cependant une meilleure résolution taxonomique de la composition du régime alimentaire des chauves-souris puisque leurs proies ne sont généralement décrites qu'à l'ordre ou la famille dans les analyses microscopiques (Arlettaz, Godat, et Meyer 2000).

Les échecs d'amplification PCR observés dans certains échantillons de guano peuvent être dus à la mauvaise conservation des échantillons qui ont été laissés à température ambiante dans des tubes hermétiques pendant plusieurs mois (Alberdi, Aizpurua, et al. 2019). Cela a entrainé une forte dégradation de l'ADN par la prolifération de micro-organismes, rendant certains codes-barres ADN impossibles à amplifier par PCR. Pour 17 échantillons (5.1 %), un mélange de deux espèces de chauves-souris est obtenu, et pour 9 échantillons (2.7 %), l'identification moléculaire est complétement différente de celle obtenue sur le terrain. Dans ces deux derniers cas, le protocole d'échantillonnage pourrait également être mis en cause. En effet,

les sacs en tissus sont utilisés pour plusieurs captures successives, pouvant entrainer la contamination du guano entre plusieurs espèces ou l'oubli du guano dans le sac qui par erreur entraine son attribution à la capture suivante.

Ces résultats montrent également que nous sommes capables d'identifier des chauves-souris à l'espèce à partir de leur fèces, ce qui permet de mettre en place des études de régime alimentaire qui ne nécessitent pas la capture des individus pour des analyses à l'échelle de la colonie, et qui sont donc moins invasives et plus faciles à mettre en œuvre. Ces résultats soulignent également l'importance primordiale de la qualité des échantillons. Un soin tout particulier doit être apporté à la manière dont sont collectés et conservés les fèces pour éviter les contaminations entre échantillons (vérification systématique du sac en tissu, prélèvement avec du matériel à usage unique avec par exemple des cure-dents) et la dégradation des échantillons (stockage à -20°C rapidement après collecte).

Article 3. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis

Received: 28 June 2017 | Revised: 29 November 2017 | Accepted: 23 December 2017

DOI: 10.1111/1755-0998.12749

RESOURCE ARTICLE

WILEY MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis

Maxime Galan[1] | Jean-Baptiste Pons[2] | Orianne Tournayre[1] | Éric Pierre[1] | Maxime Leuchtmann[3] | Dominique Pontier[2,4*] | Nathalie Charbonnel[1*]

[1]CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montferrier sur Lez Cedex, France

[2]LabEx ECOFECT Ecoevolutionary Dynamics of Infectious Diseases, Université de Lyon, Lyon, France

[3]Nature Environment, Surgères, France

[4]CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR5558, Université de Lyon, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

Correspondence
Maxime Galan, INRA, CBGP (INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier), Montferrier sur Lez Cedex, France.
Email: maxime.galan@inra.fr

Funding information
Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-11-LABX-0048; LabEx ECOFECT, Grant/Award Number: ANR-11-LABX-0048; CBGP laboratory

Abstract

Assessing diet variability is of main importance to better understand the biology of bats and design conservation strategies. Although the advent of metabarcoding has facilitated such analyses, this approach does not come without challenges. Biases may occur throughout the whole experiment, from fieldwork to biostatistics, resulting in the detection of false negatives, false positives or low taxonomic resolution. We detail a rigorous metabarcoding approach based on a short COI minibarcode and two-step PCR protocol enabling the "all at once" taxonomic identification of bats and their arthropod prey for several hundreds of samples. Our study includes faecal pellets collected in France from 357 bats representing 16 species, as well as insect mock communities that mimic bat meals of known composition, negative and positive controls. All samples were analysed using three replicates. We compare the efficiency of DNA extraction methods, and we evaluate the effectiveness of our protocol using identification success, taxonomic resolution, sensitivity and amplification biases. Our parallel identification strategy of predators and prey reduces the risk of mis-assigning prey to wrong predators and decreases the number of molecular steps. Controls and replicates enable to filter the data and limit the risk of false positives, hence guaranteeing high confidence results for both prey occurrence and bat species identification. We validate 551 COI variants from arthropod including 18 orders, 117 family, 282 genus and 290 species. Our method therefore provides a rapid, resolutive and cost-effective screening tool for addressing evolutionary ecological issues or developing "chirosurveillance" and conservation strategies.

KEYWORDS
Arthropoda, Chiroptera, environmental DNA (eDNA), false positives, high-throughput sequencing, predator–prey interactions

1 | INTRODUCTION

DNA metabarcoding has revolutionized our approaches of biodiversity assessment this last decade (Taberlet, Coissac, Pompanon, Brochmann, & Willerslev, 2012). The method is based on the high-throughput sequencing (HTS) of DNA barcode regions (i.e., small fragments of DNA that exhibit low intraspecies and high interspecies variability), which are amplified using universal PCR primers (Hebert, Cywinska, Ball, & deWaard, 2003). Nowadays, recent HTS technologies generate millions of sequences concurrently. Metabarcoding

*These authors contributed equally to this work.

 © 2017 John Wiley & Sons Ltd

therefore enables to characterize quickly and in a single experiment a very large number of species present in an environmental sample, and also to analyse simultaneously several hundreds of samples using tags/index and multiplexing protocols (Binladen et al., 2007). Metabarcoding has proved to be useful for a wide variety of applications (Bohmann et al., 2014; Taberlet et al., 2012).

Dietary analyses have been facilitated by the advent of metabarcoding and its application to the analysis of faeces or stomach contents (Pompanon et al., 2012). Compared to traditional morphological analyses of remaining hard parts, a large sampling can be processed quickly. Results are more sensitive, allowing the identification of a larger array of specimens (e.g., juvenile life stages) and providing a greater taxonomic resolution (e.g., cryptic species might be detected, Hebert, Penton, Burns, Janzen, & Hallwachs, 2004). In addition, traditional molecular approaches (real-time PCRs, Sanger sequencing) require several assays or reactions to discriminate the different taxa present in the same sample, while a single run of metabarcoding provides the identification of a broad range of taxa with no a priori (Tillmar, Dell'Amico, Welander, & Holmlund, 2013). Research on insectivorous bat dietary analyses has been pioneering in benefiting from these advantages of DNA metabarcoding (Bohmann et al., 2011). Indeed, direct observations of prey consumption are made difficult as these species fly and are nocturnal. Moreover, because many bat species are vulnerable or endangered around the world, catching might be difficult, even forbidden during hibernation, and invasive methods cannot be applied. Morphologic examinations of faeces and guano have therefore initially provided important knowledge on bat diets (Hope et al., 2014; Lam et al., 2013). These methods have major limits (time-consuming, taxonomic expertise required, low resolution and ascertainment biases due to the reject of insect hard parts, see refs in Iwanowicz et al., 2016). In particular, identifying prey at the species level is not possible based on morphological analyses of faecal samples.

Obtaining reliable and reproducible results from metabarcoding is not straightforward. Several biases may occur throughout the whole experiment, resulting in the detection of false negatives, false positives or low taxonomic resolution (Ficetola, Taberlet, & Coissac, 2016). These biases take place from fieldwork to biostatistics (see for a review in an epidemiological context, Galan et al., 2016). Contaminations occurring during sampling or in the laboratory (Champlot et al., 2010; Goldberg et al., 2016) may be further amplified and sequenced due to the high sensitivity of the PCR and to the high depth of sequencing provided by the HTS, leading to further misinterpretations (see examples in Ficetola et al., 2016). The choice of the DNA extraction method, the barcode region and primers may also influence the issue of metabarcoding studies. Low efficiencies of sample disruption, high losses of genetic material or the presence of PCR inhibitors may lead to false-negative results (Deiner, Walser, Machler, & Altermatt, 2015). Incorrect design of primers and unsuitable barcode region may prevent or bias the amplification of the taxonomic taxa studied, or may result in an identification at low-resolution levels (Hajibabaei et al., 2006). In addition to these well-known precautions required for metabarcoding studies, other considerations need to be made. First, multiplexing samples within HTS runs results in mis-assignments of reads after bioinformatic demultiplexing (Kircher, Sawyer, & Meyer, 2012). The detection of one or a few reads assigned to a given taxon in a sample therefore does not necessarily mean this taxon is actually present in that sample (Galan et al., 2016). These errors may originate from (i) contamination of tags/index, (ii) production of between samples chimera due to jumping PCR (Schnell, Bohmann, & Gilbert, 2015) when libraries require the bulk amplification of tagged samples or (iii) the presence of mixed cluster of sequences (i.e., polyclonal clusters) on the Illumina flowcell surface. They may have dramatic consequences on the proportion of false positives (e.g., up to 28.2% of mis-assigned unique sequences reported in Esling, Lejzerowicz, & Pawlowski, 2015). Unfortunately, read mis-assignments due to polyclonal clusters during Illumina sequencing are difficult to avoid and concern 0.2–0.6% of the reads generated (Galan et al., 2016; Kircher et al., 2012; Wright & Vetsigian, 2016). It is therefore of main importance to filter the occurrence data obtained through metabarcoding experiments, using both controls and replicates (Ficetola et al., 2016; Galan et al., 2016; Robasky, Lewis, & Church, 2014). The second set of parameters still scarcely considered during metabarcoding experiments includes the sensitivity and taxonomic resolution of the protocol designed. They can be assessed empirically by analysing mock communities (MC), that is, pools of DNA belonging to different species, hence simulating a predator meal of known composition (Pinol, Mir, Gomez-Polo, & Agusti, 2015).

Here, we propose a rigorous metabarcoding approach based on a two-step PCR protocol and bioinformatic analyses enabling the *"all at once"* identification, potentially at the species level, of bats and their arthropod prey for several hundreds of samples. We use faecal pellets from 357 bats representing 16 species. Our aims are threefold. First, we compare the efficiency of DNA extraction and purification methods among six available commercial kits. Second, we design a scrupulous experimental protocol that includes negative and positive controls as well as systematic technical replicates. They enable to filter occurrence results (Ficetola et al., 2016; Galan et al., 2016). Then, we evaluate the effectiveness of this protocol using a set of criteria including the rate of identification success, taxonomic resolution, sensitivity and amplification biases. To this end, we analyse arthropod mock communities and we validate bat identifications by comparing molecular results with morphological identifications performed during fieldwork by experts. Third, we apply this DNA metabarcoding protocol to identify the consumed prey of the 357 faecal bat samples analysed, and we examine our results with regard to dietary analyses of bats previously published in the literature.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study sites and sample collection

Bats were captured from summer roost sites between June and September 2015 in 18 sites located in Western France (Poitou-Charentes). For each site, harp traps were placed one night, at the

opening of cave or building before sunset. Each captured bat was placed in a cotton holding bag until it was weighted, sexed and measured. Species identification was determined based on morphological criteria. Bats were then released. All faecal pellets were collected from holding bag and stored in microtubes at room temperature until DNA was extracted 45–162 days later. Storage conditions did not follow the recommendations described for metabarcoding studies, as samples were initially collected for diet analyses based on morphological identifications. Authorization for bat capture was provided by the Ministry of Ecology, Environment, and Sustainable development over the period 2015–2020 (approval no. C692660703 from the Departmental Direction of Population Protection (DDPP, Rhône, France). All methods were approved by the MNHN and the SFEPM.

2.2 | Laboratory precautions and controls

Throughout the experiment, we strictly applied the laboratory protocols to prevent contamination by alien DNA and PCR products. All pre-PCR laboratory manipulations were conducted with filter tips under a sterile hood in a DNA-free room. The putative presence of contamination was checked at this stage and along the whole laboratory procedure using different negative and positive controls. Many researches have highlighted several biases occurring at different steps of amplicon HTS (for a detailed list, see Galan et al., 2016). These biases can be estimated directly from data by including several controls together with samples in the experiment (for details see Appendix S1): negative controls for DNA extraction (NC_{ext}), negative controls for PCR (NC_{PCR}), negative controls for indexing (NC_{index}: unused dual-index combinations), positive controls for PCR (PC_{PCR}) including mock communities (MC) and positive controls for indexing (PC_{alien}: DNA from beluga whale—*Delphinapterus leucas*—used to estimate the read mis-assignment frequency).

2.3 | DNA extraction from faecal samples

We analysed faecal pellets from 357 bats corresponding to 16 species. Details are provided in Table S1 (Supporting information). One pellet per individual was frozen at −80°C, bead-beaten for 2 × 30s at 30 Hz on a TissueLyser (Qiagen) using a 5-mm stainless steel bead then extracted. We randomized the 357 faecal samples between six silica-membrane DNA extraction kits to compare their efficiency: EZ-10 96 DNA Kit, Animal Samples (BioBasic; $n = 113$), QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen; $n = 47$), DNeasy mericon Food Kit (Qiagen; $n = 47$), ZR Fecal DNA MiniPrep (Zymo; $n = 46$), NucleoSpin 8 Plant II (Macherey-Nagel; $n = 95$) and NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel; $n = 9$). The EZ-10 96 DNA and NucleoSpin 8 Plant II kits provide high-throughput DNA isolation (up to 192 samples in parallel) thanks to a 96-well format unlike the other kits using tube format. For all kits, we followed manufacturer's recommendations except for the NucleoSpin 8 Plant II as we used the slight modifications recommended in Zarzoso-Lacoste et al. (2017).

We compared DNA extraction kits' efficiency using three criteria: (i) the mean number of reads per PCR obtained after sequencing; (ii) the success rate of host sequencing (presence of chiropter reads from the same variant, found repeatedly between the three PCR replicates) and (iii) the success rate of prey sequencing (presence of variants corresponding to arthropods, found repeatedly between the three PCR replicates). Because storage duration could have influenced sequencing results, we included this variable in the statistical models performed. The number of reads was analysed with a Gaussian function and the success of sequencing was analysed with a binomial function and a logit error (see Appendix S2 for details of statistical analyses). All analyses were performed in R 3.1.0 (R Core Team, 2013).

2.4 | Mock community preparation

To better evaluate the sensitivity of our metabarcoding approach, we created two artificial communities of arthropods that mimic insectivorous bat diets. The first mock community (MC_1) was composed of 12 species and the second one (MC_2) included seven species (see details in Table 1; Table S1).

Arthropod DNA was extracted individually using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Sanger sequences were available for the cytochrome oxidase I (COI) gene of each individual (see the alignment file of the 19 insect species included in the mock communities deposited in Dryad: https://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.kv02g/14). DNA extractions were normalized to 5 ng/μl after Qubit fluorimeter quantification (Invitrogen). First, each normalized DNA was amplified and sequenced independently. Second, normalized DNA extractions were pooled in equal proportion to build the two mock communities MC_1 and MC_2. These latter were amplified and sequenced (see details in Table S1). Results provided by independent (insect individual) and pooled (mock communities) sequencing were compared. It enabled to estimate biases resulting from the co-amplification of different species mixed within the same reaction.

2.5 | COI minibarcode, PCR and library construction

We used the 133-bp minibarcode of COI described in Gillet et al. (2015). Its efficiency to identify a wide taxonomic range of arthropods from France has been proven recently: 20 arthropod orders were detected in the diet of *Galemys pyrenaicus* and 24 in the diet of *Neomys fodiens* (Biffi, Gillet, et al., 2017; Biffi, Laffaille, et al., 2017). We have verified the discriminatory power of this minibarcode for resolving bat species identification using an in silico analysis based on 444 BOLD (Barcode of Life DataBase) reference sequences corresponding to the 33 bat species found in France (see the phylogenetic tree provided in Figure S1 and the Table S2).

We performed a two-step PCR strategy (see Illumina Application Note Part 15044223) combined with the dual-index paired-end sequencing approach described in Kozich, Westcott, Baxter, Highlander, & Schloss, 2013 (Figure 1). The 32 index i5 and 48 index i7 allow to multiplex up to 1,536 PCR products in the same MiSeq run.

TABLE 1 Proportion of reads for two arthropod mock communities (MC_1 and MC_2)

	Mock community content	Order	Theoretical proportion (%)	Individual sequencing: Observed proportion for the three PCR replicates (% ± *SD*)	Pool sequencing: Observed proportion for the three PCR replicates (% ± *SD*)	Identification using BOLD: top hit(s) & identity (%)
Mock community MC_1	*Monochamus galloprovincialis*	Coleoptera	8.3	8.2 ± 0.5	30.1 ± 2.1	*Monochamus galloprovincialis* (100)
	Forficula lesnei	Dermaptera	8.3	6.0 ± 0.3	14.8 ± 0.5	Unclassified (<90)
	Thaumetopoea pityocampa	Lepidoptera	8.3	8.4 ± 0.8	9.1 ± 0.7	*Thaumetopoea pityocampa* (100)
	Athous bicolor	Coleoptera	8.3	5.5 ± 1.4	7.4 ± 0.8	*Athous bicolor* (100)
	Forficula auricularia	Dermaptera	8.3	5.9 ± 0.5	7.1 ± 0.2	*Forficula auricularia* (100)
	Monochamus sutor	Coleoptera	8.3	8.2 ± 0.6	7.0 ± 0.4	*Monochamus sutor/sartor* (100)
	Chrysopa formosa	Neuroptera	8.3	10.8 ± 0.5	4.3 ± 0.4	*Chrysopa formosa* (100)
	Chrysopa perla	Neuroptera	8.3	8.7 ± 0.5	3.6 ± 0.2	*Chrysopa perla/intima* (100)
	Himacerus mirmicoides	Hemiptera	8.3	9.4 ± 0.4	2.7 ± 0.6	*Himacerus mirmicoides* (100)
	Calliptamus barbarus[a]	Orthoptera	8.3	5.0 ± 0.4	1.7 ± 0.2	*Calliptamus barbarus* (100)
	Phymata crassipes[a]	Hemiptera	8.3	7.5 ± 0.3	0.4 ± 0.1	*Phymata crassipes* (100)
	Protaetia morio[ab]	Coleoptera	8.3	7.0 ± 0.4	0.1 ± 0.02	*Protaetia morio* (100)
	Unexpected parasitoid in *F. lesnei*	Diptera	NA	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	*Triarthria setipennis* (100)
	Chimeric reads	NA	NA	NA	3.4 ± 0.1	NA
	Putative pseudogenes	NA	NA	6.7	5.9 ± 0.2	NA
	Reads removed after filter steps	NA	NA	1.7	2.0 ± 0.2	NA
Mock community MC_2	*Papilio demodocus*	Lepidoptera	14.3	14.9 ± 0.8	27.3 ± 0.4	*Papilio demodocus* (100)
	Thaumetopoea wilkinsoni	Lepidoptera	14.3	19.1 ± 1.1	26.3 ± 0.5	*Thaumetopoea wilkinsoni* (100)
	Tessaratoma papillosa	Hemiptera	14.3	12.3 ± 0.2	17.9 ± 0.8	*Tessaratoma papillosa* (99)
	Acorypha sp.	Orthoptera	14.3	13.3 ± 0.5	9.2 ± 0.6	Unclassified (93)
	Diabrotica virgifera	Coleoptera	14.3	6.5 ± 0.9	6.5 ± 0.5	*Diabrotica virgifera* (100)
	Iberorhyzobius rondensis	Coleoptera	14.3	10.6 ± 0.6	4.3 ± 0.3	*Iberorhyzobius rondensis* (100)
	Bactrocera dorsalis[a]	Diptera	14.3	9.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	*Bactrocera dorsalis/invadens/philippinensis/musae/cacuminata* (100)
	Chimeric reads	NA	NA	NA	5.1 ± 0.4	NA
	Putative pseudogenes	NA	NA	10.5	0.2 ± 0.03	NA
	Reads removed after filter steps	NA	NA	3.2	1.4 ± 0.4	NA

NA, not applicable.

The species names in the column "mock community content" are based on the morphological identification realized by experts for each taxa group. The theoretical proportions correspond to the genomic DNA proportion for each species in the equimolar mix of DNA (i.e., the pool) before PCR amplification of the mock community. The observed proportions correspond to the mean proportions of the number of reads for the three PCR replicates. The observed proportions for the individual sequencing are calculated after summing the number of reads for all the individual PCRs of each species.

[a]species showing a substitution T–>C that creates a mismatch between the COI target sequence and the 3′-end of the reverse PCR primer.

[b]species removed for the sequencing results of the pool after data filtering process (only 2–5 reads per PCR replicate).

This makes it possible to multiplex several hundreds of samples while performing several technical replicates per sample. The two-step PCR strategy enables to build all libraries independently for each sample and technical replicate, without presequencing PCR enrichment of a mix of PCR products from different samples. This method prevents the production of between samples chimera due to jumping PCR (Schnell et al., 2015). It therefore reduces drastically the risk of mistaging/misindexing.

During the first PCR (PCR_1), we used a primer pair corresponding to highly modified and degenerated versions of forward primer LepF1 (Hebert et al., 2004) and reverse primer EPT-long-univR (Hajibabaei, Shokralla, Zhou, Singer, & Baird, 2011). We added the partial

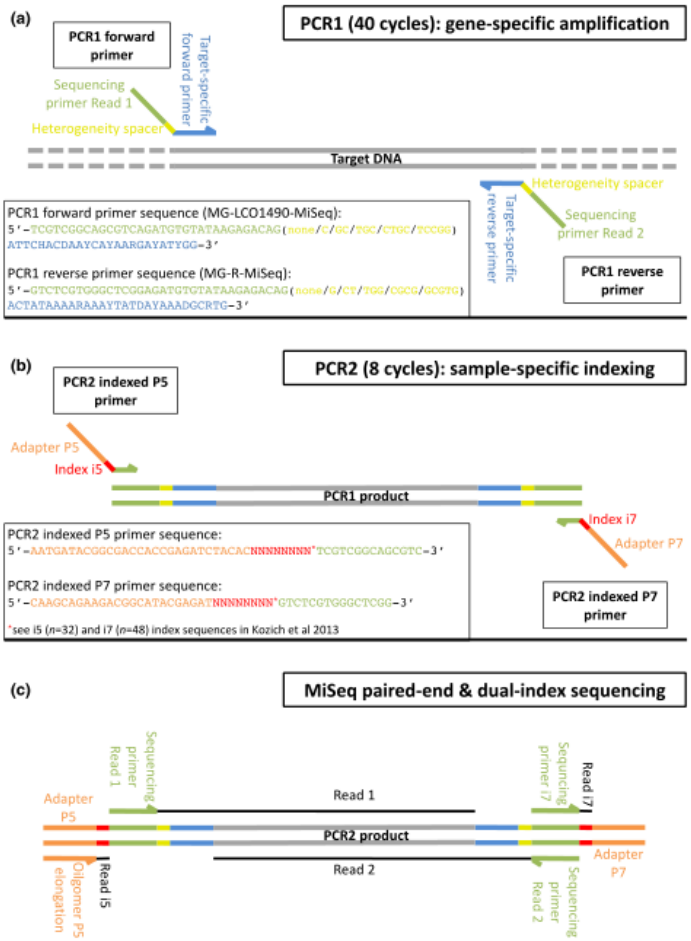


FIGURE 1 Schematic description of the library construction using two-step PCR and MiSeq sequencing. (a) During PCR_1, the COI minibarcode was amplified for each sample using the gene-specific forward and reverse primers (in blue) tailed with the overhang Illumina sequencing primer sequences (in green), and alternative bases called heterogeneity spacers (in yellow) to create an artificial nucleotide diversity during the first cycles of the Illumina sequencing. (b) The PCR_2 aims at adding the Illumina adapters (in orange) and the multiplexing dual-indices (in red) to each sample replicate by performing a limited-cycle amplification step. (c) After PCR_2, all sample libraries are pooled together and then sequenced. During the MiSeq paired-end sequencing, each nucleotide of the target gene is read twice (read 1 & read 2) and the dual-index reads allow to assign the millions of sequences to the corresponding original samples. For the future studies, we propose a new version of the target-specific reverse primer MG-univR: 5′-ACTATAAARAARATYATDAYRAADGCRTG-3′ (see details in Section 4)

overhang Illumina sequencing primers in 5′-end and a heterogeneity spacer of each target-specific primer (Figure 1): MG-LCO1490-MiSeq 5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG(none/C/GC/TGC/CTGC/TCCGG) ATTCHACDAAYCAYAARGAYATYGG-3′ and MG-R-MiSeq 5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG(none/G/CT/TGG/CGCG/GCGTG) ACTATAAAARAAAYTATDAYAAADGCRTG-3′. The alternative bases between the partial adaptors and the target-specific primers correspond to a 0- to 5-bp "heterogeneity spacer" designed to mitigate the issues caused by low sequence diversity in Illumina amplicon sequencing (Fadrosh et al., 2014). These five versions of each forward and reverse primer were mixed together before PCR_1. During the first cycles of the Illumina sequencing, they created an artificial diversity of the four nucleobases to improve the detection of the sequencing clusters at the flowcell surface, what consequently increased the quality of the reads. This PCR_1 was performed in 11 μl reaction volume using 5 μl of 2× Qiagen Multiplex Kit Master Mix (Qiagen), 0.5 μM of each mix of forward and reverse primers, and 2 μl of DNA extract. The

PCR conditions consisted in an initial denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 45°C for 45 s, and extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension step at 72°C for 10 min.

During the second PCR (PCR_2), we used the PCR_1 as DNA template. This PCR_2 consists of a limited-cycle amplification step to add multiplexing indices i5 and i7 and Illumina sequencing adapters P5 and P7 at both ends of each DNA fragment. The indexed primers P5 (5′-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(8-base i5 index) TCGTCGGCAGCGTC-3′) and P7 (5′-CAAGCAGAAGACGGCATAC-GAGAT(8-base i7 index)GTCTCGTGGGCTCGG-3′) were synthetized with the different 8-base index sequences described in Kozich et al. (Kozich et al., 2013). PCR_2 was carried out in a 11-μl reaction volume using 5 μl of Qiagen Multiplex Kit Master Mix (Qiagen) and 0.7 μM of each indexed primer. Then, in a post-PCR room, 2 μl of PCR_1 product was added to each well. The PCR_2 started by an initial denaturation step of 95°C for 15 min, followed by 8 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72°C for 60 s followed by a final extension step at 72°C for 10 min.

PCR_2 products (3 μl) were verified by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. One PCR blank (NC_{PCR}) and one negative control for indexing (NC_{index}) were systematically added to each of the 15 PCR microplates. Each DNA extraction was amplified and indexed in three independent PCR reactions. These PCR replicates were used as technical replicates to confirm the presence of taxa in a sample and further remove the false-positive results (Robasky et al., 2014). A MiSeq (Illumina) run was conducted, including PCR_2 products from bat faecal samples (number of PCRs $n = 357 \times 3$), the positive ($n = 21 \times 3$ arthropods used in the mock communities and $n = 9$ PCR replicates from a DNA beluga whale used as positive internal control PC_{alien}) and negative ($n = 58$) controls (see details in Table S1).

2.6 | MiSeq sequencing

The MiSeq platform was chosen because it generates lower error rates than other HTS platforms (D'Amore et al., 2016). For this study, the number of PCR products multiplexed was 1168 (Table S1). PCR products were pooled by volume for each 96-well PCR microplate. Mixes were checked by electrophoresis in 1.5% agarose gel before generating a "super-pool" including all PCR products. We subjected 60 μl of the super-pool to size selection for the full-length amplicon (expected size: 312 bp including primers, indexes and adaptors) by excision on a low-melting agarose gel (1.25%). It enabled to discard nonspecific PCR products and primer dimers. The PCR Clean-up Gel Extraction kit (Macherey-Nagel) was used to purify the excised band. The super-pool of amplicon libraries was quantified using the KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems) before loading 8 pM and 10% of PhiX control on a MiSeq flow cell (expected cluster density: 700–800 K/mm^2) with a 500-cycle Reagent Kit v2 (Illumina). We performed a run of 2×200 bp paired-end sequencing, which yielded high-quality sequencing through the reading of each nucleotide of the COI minibarcode fragments twice after the assembly of reads 1 and reads 2 (see details below). Information about PCR products and fastq file names are provided in Table S1.

2.7 | Sequence analyses and data filtering

We used MOTHUR program v1.34 (Schloss et al., 2009) to create an abundance table for each variant and each PCR product (Table S3). Briefly, MOTHUR enabled to (i) contig the paired-end read 1 and read 2; (ii) remove the reads with low quality of assembling (>200 bp); (iii) dereplicate the redundant reads; (iv) align the variants on a COI minibarcode reference alignment; (v) remove PCR primers; (vi) remove misaligned variants; (vii) correct a part of the PCR and sequencing errors by clustering the variants that are within one mutation of each other for each PCR replicate independently; (viii) remove the singleton and rare variants (*cut-off* = 8 reads); and (ix) remove chimeric variants using UCHIME (Edgar, Haas, Clemente, Quince, & Knight, 2011). Note that step (i) enabled to remove an important number of sequencing errors: the pairs of sequences were aligned and any positions with discongruence between the two reads were identified and corrected using the quality score of each read position (see https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP). If one sequence exhibited a base and the other one a gap, the quality score of the base had to be higher than 25 to be considered real. If both sequences had a base at that given position, then we required one of the bases to have a quality score of six or more points than the other. Step (vii) is applied independently for each sample and technical replicate by keeping only the most abundant variant among the cluster of similar variants at one mutation. This procedure enables to remove an important part of PCR or sequencing errors, and to validate variants differing by a single mutation when they are found in different PCR replicates or biological samples. Hereafter, a variant will correspond to a cluster of similar reads obtained for a given technical replicate and potentially differing by a single mutation difference.

We used the multiple controls introduced during the process to estimate potential biases and define read number thresholds above which the PCR product may be considered as positive for a given sequence. Following Galan et al. (2016), two different thresholds were set for each variant, and a cross-validation using the three PCR replicates was applied to confirm the positivity of each sample for each variant.

First, T_{CC} threshold was used to filter cross-contaminations during the laboratory procedure. For each variant, we used the maximum number of reads observed in the different negative controls (NC) as threshold. PCR products with fewer than this number of reads for this particular variant were not considered to be positive because this number of reads is not distinguishable from noise. For the positive samples, the information of the observed number of reads for each variant is kept. Second, T_{FA} threshold was applied to filter the false assignments of reads to a PCR product due to the generation of mixed clusters during the sequencing (Kircher et al.,

2012). This phenomenon was estimated in our experiment using "alien" positive controls (PC_{alien}) sequenced in parallel with the bat faecal samples. As the PC_{alien} (i.e., DNA from beluga whale) were handled separately from bat samples before sequencing, the presence of reads from beluga whale in a bat sample indicated a sequence assignment error due to the Illumina sequencing (i.e., generation of mixed clusters). We determined the maximal number of reads of beluga whale assigned to a bat PCR product. We then calculated the false-assignment rate (R_{FA}) for this PCR product by dividing this number of reads by the total number of reads from beluga in the sequencing run. Moreover, the number of reads for a specific variant mis-assigned to a PCR product should increase with the total number of reads of this variant in the MiSeq run. We therefore defined T_{FA} threshold as the total number of reads in the run for a variant multiplied by R_{FA}. PCR products with fewer than T_{FA} for a particular variant were considered to be negative. We then discarded positive results associated with numbers of reads below the thresholds T_{CC} and T_{FA}. Lastly, we discarded not-replicated positive results for the three PCR replicates to remove inconsistent variants due to PCR or sequencing errors or unconfident variants that could be associated with remaining false-positive results. Finally, for each sample and variant, the reads obtained for the three PCR replicates were summed.

2.8 | Taxonomic assignment

We used BOLD Identification System (Ratnasingham & Heber, 2007) and species level barcode records (2,695,529 sequences/175,014 species in January 2017) to provide a taxonomic identification of each variant passing our filtering processes. We provided a five-class criteria describing the confidence level of the sequence assignments, modified from Razgour et al. (2011). They were applied to hits with similarity higher than 97% (see details in Appendix S3). For multitaxonomic affiliation, we kept the common parent of all possible taxa. For sequences exhibiting similarity results lower than 97% in BOLD, we performed a BLAST in GENBANK to improve the taxonomic identification. Finally, results with similarity lower than 97% in BOLD and GENBANK were assigned to the phylum level using the closest taxa, or were considered as unclassified taxa when no match was found in the databases.

3 | RESULTS

3.1 | Sequencing results and data filtering

The MiSeq sequencing of 1,162 PCR products including bat samples, positive and negative controls analysed in three PCR replicates generated a total paired-end read output of 6,918,534 reads of the COI minibarcode. MOTHUR program removed seven negative controls because they produced less than 8 reads, 633,788 (9.2%) of paired-end reads because they were misassembled, 312,336 (4.5%) of reads because they were misaligned, 125,606 (1.8%) of reads because they corresponded to rare variants (<9 reads) and 11,445 (0.2%) of reads because they were chimeric (Table S3). The remaining reads represented a total of 5,751 variants and 5,835,359 reads. The abundance table produced was next filtered.

Filtering cross-contaminations using threshold T_{CC}: We observed between 0 and 6,230 reads (total: 34,586; mean: 629 reads; *SD*: 1,289) in the negative controls (NC; n = 58). In these NC, 90% of the reads represented 11 variants, and 38% belonging to a human haplotype that was detected with a maximum of 3,775 reads in the most contaminated negative control (NC_{PCR}). T_{CC} thresholds ranged between 0 and 3,775 reads, depending on the variant considered. After filtering the data set using these T_{CC} thresholds, we kept 5,704,150 reads representing 5,697 variants (Table 2).

Filtering false assignments of reads using threshold T_{FA}: The "alien" positive control (PC_{alien}) produced a total of 30,179 reads among which 30,111 were assigned to the nine independent PCRs performed on this DNA. The other 68 reads, that is, 0.23%, were mis-assigned to 52 other samples, with a maximum of 13 reads observed for a given bat faecal sample. The maximum false-assignment rate R_{FA} was therefore equal to 0.043%, and T_{FA} varied between 0 and 244 reads depending on the variant considered. After filtering, the result table included 5697 variants and 5,684,166 reads. Note that T_{FA} excluded reads but not taxa (Table 2).

Filtering inconsistent results using the three PCR replicates: 74.1% of occurrence (i.e., cells showing at least one read in the abundance table) were not replicated and were removed. Among these inconsistent results, 74.6% were positive for only one of the three PCR replicates. The remaining reads represented 2,636 variants and 5,172,708 reads (Table 2).

Finally, for each sample and variant, the reads of the replicated PCRs were summed in the abundance table. The 21 bat samples that did not include any read after data filtering were discarded from the data set.

3.2 | Comparison of DNA extraction kits

We removed the NucleoSpin Soil kit of this comparison regarding the low number of samples (n = 9). The five other DNA extraction kits differed in their performance levels (Table 3; Table S1). Statistical results are detailed in Appendix S2.

The total number of reads obtained per sample and the sequencing success of bats were significantly influenced by the extraction kits, but not by storage duration. The NucleoSpin 8 Plant II DNA extraction kit produced the highest number of reads. This variation resulted partly from PCR failures whose rate could reach 14% (QIAamp Fast DNA Stool and EZ-10 96 DNA). The NucleoSpin 8 Plant II DNA extraction kit also lead to the highest success of bat sequencing. 84% of the faecal samples analysed with this kit produced replicable bat identifications (only 68% to 72% of the samples with the four other kits).

The sequencing success of prey did not depend on the extraction kit, although the NucleoSpin 8 Plant II provided the best result. Prey sequencing was marginally influenced by storage duration, with a

TABLE 2 Objectives and impacts of the data filtering steps on the number of reads, variants and (putative false and true) positive occurrences of variants in the abundance table

				Nb of positive occurrences:			
Filter step	Objectives	Nb of reads	Nb of variants	For 3 to 3 PCR replicates	Only for 2 to 3 PCR replicates	Only for 1 to 3 PCR replicates	Total
Raw abundance table	NA	5,835,359	5,751	4,969	4,092	14,374	23,435
Threshold T_{CC}	Filter out cross-contaminations generated during the presequencing procedures using the maximal number of reads per variant observed in various negative controls	5,704,150	5,697	4,689	3,496	11,618	19,803
Threshold T_{FA}	Filter out misindexing generated during the sequencing using the rate of read false assignment calculated thanks to a DNA internal control (here a beluga whale DNA)	5,684,166	5,697	4,466	3,243	9,527	17,236
PCR replicates	Eliminate inconsistent results between the three PCR replicates from the same sample to remove putative false-positive occurrences	5,172,708	2,636	4,466	NA	NA	4,466

NA, not applicable.

marked decrease being visible after three months storage at room temperature.

3.3 | Mock community analyses

The 19 arthropod DNA extracts from the mock communities were first amplified and sequenced independently in the MiSeq run. The MiSeq sequences produced similar identifications than Sanger sequences when considering the 19 most abundant MiSeq variants (Table 1). These 19 variants were 100% identical to the reference Sanger sequences (see the alignment file of the 19 insect species included in the mock communities deposited in Dryad: https://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.kv02g/14). They represented 79% of the reads for these individual PCRs, confirming the high quality of the MiSeq sequencing. BOLD identification tool enabled to identify specifically 14 of the 19 COI minibarcode sequences. *Forficula lesnei* (MC_1) and *Acorypha* sp. (MC_2) were not identified using the public databases BOLD and GENBANK because they were not referenced. Concerning *Monochamus sutor*, *Chrysopa perla* (MC_1) and *Bactrocera dorsalis* (MC_2), we obtained equivalent multi-affiliations with two to five candidate taxa matching with phylogenetically close species (*Monochamus sutor* or *M. sartor*; *Chrysopa perla* or *C. intima*; *Bactrocera dorsalis*, *B. invadens*, *B. philippinensis*, *B. musae* or *B. cacuminata*).

Other nonexpected variants were detected at low frequencies (mean: 0.46%, min.: 0.02%, max.: 17.12%) and corresponded to heteroplasmy, pseudogenes (NUMTs: Nuclear insertions of mitochondrial sequences) or to parasitoid sequences. Indeed, in *Forficula lesnei* sample, the tachinid parasitoid *Triarthria setipennis* was detected (Table 1).

We next analysed results of both mock communities amplified and sequenced in pools. MC_1 sequencing revealed 11 of the 12 insect expected sequences (Table 1). Frequencies of reads varied from 0.4% to 30.1% (expected frequencies 8.3%) while genomic DNA extracts were mixed in equimolar concentrations, therefore revealing biases in PCR amplification. *Protaetia morio* was not detected after data filtering. Insights into the raw data set showed that some reads were obtained in all three PCRs but with numbers below T_{CC} threshold (T_{CC} = 5 reads for this variant). Sequences of the parasitoid fly *Triarthria setipennis* were detected at low frequency (0.2%). The seven insect species included in MC_2 were detected, with frequencies ranging from 1.5% to 27.3% (expected frequencies 14.3%). For both mock communities, chimeric reads were detected visually despite the filtering processes using UCHIME program, with frequency levels reaching 3.4% and 5.1%, for MC_1 and MC_2, respectively (see the data for the mock communities in the abundance table after filtering deposited in Dryad : https://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.kv02g/11).

3.4 | Taxonomic identification of bats and their prey

Up to now, less than half of COI sequences deposited in BOLD Systems are made public (Species Level Barcode Records in January 2017: 2,697,359 Sequences/175,125 Species; Public Record Barcode Database: 1,018,338 Sequences/85,514 Species). Because we could not identify all variants using the web application of BOLD Systems, we decided to analyse the 1,318 most abundant variants of the whole data set (including bat samples and mock communities). They were represented by more than 100 reads what was equivalent to 99.1% of all remaining reads. Further analyses revealed that a majority of the remaining 1318 rare sequences (<100 reads) could not be assigned clearly to any taxa. They are mainly chimeric sequences or pseudogenes that had not been removed during the filtering process (see the data for the mock communities in the abundance table after filtering deposited in Dryad: https://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.kv02g/11).

TABLE 3 Comparison of six DNA extraction kits used for the metabarcoding of bat faecal pellets

DNA extraction kit	Sample size	Mean number of reads per PCR	PCR failure (<500 reads), %	Success of sequencing (%)	
				Host (bat)	Prey (arthropod)[a]
DNeasy mericon Food Kit (Qiagen)	47	3,489	7	68	83
EZ-10 96 DNA Kit, Animal Samples (BioBasic)[b]	113	4,822	14	70	81
NucleoSpin 8 Plant II (Macherey-Nagel)[b]	95	6,712	1	84	88
NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel)[c]	9	7,300	0	67	89
QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	47	2,901	14	70	79
ZR Fecal DNA MiniPrep (Zymo)	46	6,209	1	72	80

[a]Including unclassified arthropod that were not recorded in the sequence databases.
[b]96-well format for high-throughput DNA isolation.
[c]Removed of the statistical analysis.

The analysis of the 336 bat faecal samples in three PCR replicates led to the detection of 1,080 abundant variants and 1,232 rare ones. The abundant variants included 47 variants assigned to bat species (1,974,394 reads) and 925 variants belonging to the phylum Arthropoda (1,619,773 reads). Among these latter, 654 variants were assigned with similarity level higher than 97% in BOLD (1,305,633 reads). Finally, 35 variants could not be assigned to any taxa either in BOLD or GENBANK (80,977 reads; Figure 2; Figure S2). Within samples, the proportion of reads between bats and arthropods was quite balanced, except for *Myotis nattereri*, *Myotis mystacinus* and *Myotis alcathoe* for which lower frequencies of reads from bats were observed (Figure S2).

Surprisingly, other nonexpected taxa were also detected, including 73 variants (133,423 reads) attributed to nematodes (39,186 reads), plants (28,444 reads), gastropods (19,915 reads), algae or fungi (18,972 reads), rotifers (11,925 reads), tardigrades (462 reads), birds (285 reads) as well as mammals (14,234 reads). The 1,232 remaining rare variants (32,868 reads) corresponded to 0.7% of the 4,932,226 reads and were considered as unclassified (Figure 2; Figure S2).

3.5 | Comparison of field and molecular identification of bat species

As expected, the COI minibarcode was resolutive to the species level, except for two species sampled, *Myotis myotis* and *Eptesicus serotinus*. Their assignments were equivalent between two species, *M. myotis* and *M. blythii* on one hand, and *E. serotinus* and *E. nilssonii* on the other hand. We found a congruent taxonomic identification of bat species between molecular and morphological analyses for 238 of the 336 faecal samples analysed (70.8%). The 98 remaining samples that did not provide a reliable taxonomic identification mainly resulted from amplification failures for at least one PCR replicate (72 samples, i.e., 21.5%: for one (5.4%), two (5.4%) or the three (10.7%) PCR triplicates performed for each sample). Details are provided in Figure S3. They mostly concerned *Myotis nattereri* (12 failures over 19 samples tested) and *Rhinolophus ferrumequinum* (24 failures over 60 samples tested). A mismatch (T/C) at the 3′-end of the reverse primer could be at the origin of these higher rates of amplification failure for these bat species (Table S4). Finally, 17 samples provided ambiguous molecular results with two bat species detected for one pellet and ten samples lead to incongruent taxonomic identification with regard to bat morphology (Figure S3).

3.6 | Diet composition

In further diet analyses, we considered the 268 bat faecal samples for which we had a congruent taxonomic identification between morphological and molecular analyses based on the results of one (n = 15 samples), two (n = 15) or three (n = 238) PCR replicates (Figure S3). We removed samples for which no prey data could be analysed, including 20 samples for which only bat sequences were recovered, six samples with only unclassified sequences, eight samples with only sequences of nematodes, plants, fungi and/or algae, and 18 samples for which arthropod sequences were recovered, but with levels of similarity that were too low (<97%) to provide a reliable assignation to a precise taxon. Altogether, diet compositions were described on 216 bat faecal samples, corresponding to 16 bat species. Among the 551 validated arthropod variants of these samples, we identified 18 arthropod orders, 117 family, 282 genus and 290 species (Table S5). We observed a wide heterogeneity in the taxonomic diversity and composition of diets between bat species (Figure 3).

4 | DISCUSSION

4.1 | Importance of data filtering and controls

Assessing diet variability between individuals and populations is of main importance to better understand the biology of species, here bats. Although the procedures limiting false-positive results have been well described (Ficetola et al., 2016), they still remain scarcely included in methodological procedures (but see in an epidemiological context, Galan et al., 2016). Negative controls are often included during DNA extraction and PCRs, they are not always sequenced and only checked using gel electrophoresis. This procedure is not

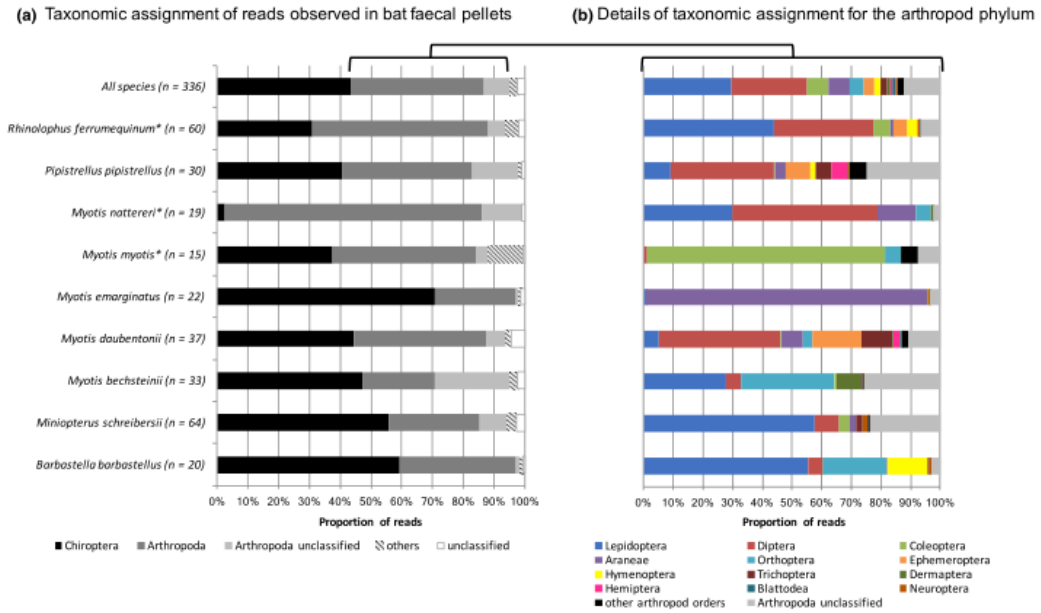


FIGURE 2 Proportion and taxonomic assignment of reads obtained from high-throughput sequencing of bat faecal pellets. The "All species" bars describe results obtained for all 336 samples from the 16 bat species. Specific results are only detailed for bat species whose sample sizes were over 19. (a) Histogram showing the proportion and assignment of all reads. "Others" (striped bars) includes reads that correspond to sequences that likely belong to organisms from bloodmeal/coprophagia/necrophagia or secondary prey, parasites, diet of insect and putative contaminants. (b) Histogram detailing the proportion and assignment at the order level of reads corresponding to arthropod phylum only. * indicates bats species showing a substitution T–>C that creates a mismatch between the COI target sequence and the position 3′-end of the reverse PCR primer

satisfactory as most contaminating sequences cannot be visually detected. In particular, cross-contaminations of index/tags, tags jumps (Schnell et al., 2015) or polyclonal/mixed clusters during Illumina HTS (Kircher et al., 2012) that may lead to the mis-assignments of reads. The positive control PC_{alien} proposed here enabled to estimate these read mis-assignments for the whole run (0.23%) or for a given sample (up to 0.043%).

Here, we proposed a set of filtering and validation procedures based on negative, positive controls and three independent PCR replicates. This strategy based on nonarbitrary filtering thresholds has recently been applied in Corse, Meglecz, Archambaud, and Martin (2017) to study the diet of a critically endangered fish species. Our results showed that applying T_{CC} and T_{FA} thresholds removed relatively few reads and variants compared to the replicate validation procedure. Hence the rates of laboratory contaminations or mis-assignments during HTS seemed to be low while the proportion of nonrepeatable variants seemed to be high. The reasons might be methodological (e.g., PCR chimera, sequencing errors or PCR drop-out) or biological (presence of NUMTs at low frequencies, low biomass prey, traces of ancient meals). Despite our filtering pipeline, an important proportion of variants that were validated by the three replicates remained at low frequencies. They can be attributed to chimera, pseudogenes or PCR and nonrandom sequencing errors (see the data for the mock communities in the abundance table after filtering deposited in Dryad: https://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.kv02g/11). We therefore had to eliminate 50% of the less frequent variants (1,318 variants over 2,636) in order to make taxonomic assignment in BOLD Systems easier. This important number of potentially artefactual variants could be decreased by applying the filtering procedure recently proposed by Corse et al. (2017). In addition to the nonarbitrary filters described in our method, they applied algorithms that removed errors (Obiclean, see Boyer et al., 2016), filtered chimera more efficiently (UCHIME 2, Edgar, 2016) as well as pseudogenes. These procedures enabled to keep a high proportion of reads (70%) and a low proportion of variants (0.3% corresponding to 61–81 variants depending on the minibarcodes considered). The cross-comparison of taxonomic identification results obtained with different assignment methods is therefore feasible for the variants validated (Corse et al., 2017). Finally, the sensibility of prey detection could be improved by applying the relaxed restrictive approach of between-PCR replicate validation proposed by Alberdi, Aizpurua, Gilbert, and Bohmann (2017). As such, variants found in at least two of the three replicates could be considered positive, but this strategy may also increase false-positive results.

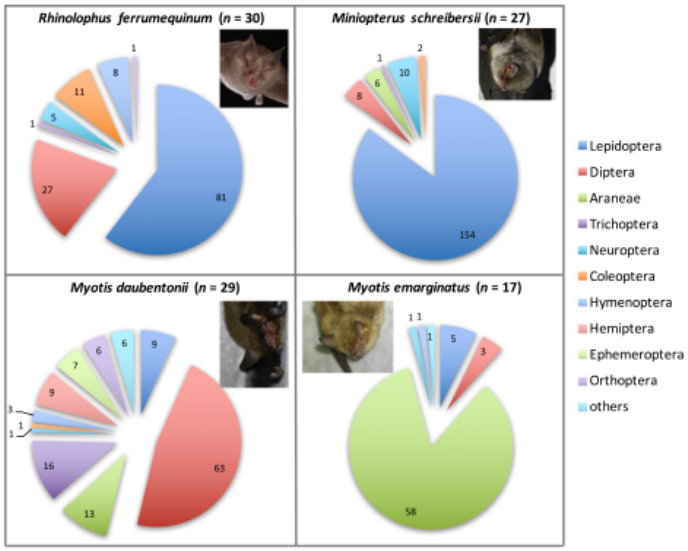


FIGURE 3 Number of occurrence of prey taxa within faecal pellets of four bat species with contrasted diets. The details of taxa names and occurrences for the diet of the 16 bat species are reported in Table S5 (Supporting information). Photos by: Jérémy Dechartre, Matthieu Dorfiac & Maxime Leuchtmann

Finally, mock communities are not systematically tested in animal metabarcoding studies (but see Pinol et al., 2015) although it enables to empirically assess the efficiency and biases of both molecular designs and bioinformatic pipelines. We recommend to include diversified artificial communities in metabarcoding studies, ideally encompassing the whole potential phylogenetic diversity of the samples to be studied.

4.2 | Methodological framework to avoid biases

Fieldwork remains a crucial step for diet analyses, even with such molecular approaches. The way faecal pellets are collected may lead to cross-individual contaminations, as revealed in our study by the detection of bat sequences corresponding to the wrong species. Considering invasive sampling, cotton holding bags in which individuals are kept before morphological analyses must be carefully checked to avoid the collection of faecal samples belonging to successively captured bats. When possible, a disposable collection system or a UV decontamination procedure between captures could be performed. Faecal pellets should also be carefully handled and stored to avoid contaminations. These points reinforce the importance of performing species bat identification for each pellet to prevent misassignment of a diet and to an individual of the wrong species. In the case of noninvasive sampling, it is highly recommended to use clean supports and single-use instruments to collect the pellets. Reducing time-delay between bat faeces release and collection might also be important to avoid DNA degradation (Oehm, Juen, Nagiller, Neuhauser, & Traugott, 2011) and cross-contaminations due to urine from different species of bats or coprophagous arthropods, for example.

Further storage conditions of faecal samples are of main importance to guarantee DNA integrity and limit the proliferation of micro-organisms. The rate of amplification failures observed in our study was hence likely to result from the storage of all the bat faecal samples at room temperature in empty tubes during several months. Samples should be frozen at −20°C or in liquid nitrogen, or stored in an appropriate storage buffer (e.g., ethanol) to prevent DNA degradation (Renshaw, Olds, Jerde, McVeigh, & Lodge, 2015). The method proposed here enabled to obtain satisfying results even if samples had not been stored in the optimal conditions required for metabarcoding analyses. It is therefore likely that samples that were not initially collected for genetic/metabarcoding purposes, potentially including ancient samples (from guano collected several weeks after dropping to guano accumulated during decades), could also be successfully assessed for diet analyses using our sequencing protocol.

We also showed that extraction methods may influence the success of metabarcoding studies. Our results evidenced that NucleoSpin 8 Plant II kit provided the best results in terms of host sequencing success, number of reads produced per PCR and prey sequencing success. It therefore seems to be the best compromise between cost per extraction, throughput (96-well format) and quality of the DNA purification for metabarcoding applications.

In addition, we have evidenced PCR amplification biases for particular prey and bat taxa that lead to a high variability in sequencing depth and even to the amplification failure for particular species. Sources of PCR biases can be multiple (too stringent PCR conditions (e.g., high hybridization temperature), differential DNA degradation, interspecific mitochondrial copy number variation…). Nevertheless primer mismatches are one of the most important source of PCR biases (Pinol et al., 2015). A *post hoc* analysis performed on 693 COI

sequences available for the 33 bat species found in France revealed that 17 bat species had a frequent mismatch at the 3′-end of the reverse primer (see Table S4). The analyses of mock communities (MC) also revealed amplification biases with regard to arthropod species, as previously described in other empirical studies (Pinol et al., 2015). It was probably due to the same 3′-end mismatch described above between PCR reverse primer and arthropod species DNA, and to further primer annealing competition during DNA amplification of the community. Indeed, the four species that showed the lowest proportion of reads (MC1: *Calliptamus barbarus*; *Phymata crassipes*; *Protaetia morio*; MC_2: *Bactrocera dorsalis*, see Table 1) have this mismatch in their sequences. For future studies, we recommend a new version of the target-specific reverse primer (modifications in bold: MG-univR-MiSeq 5′-ACTATAAA**RAARATY**ATDAY**RA**ADGCRTG-3′) to limit the observed biases for most bat and arthropod species.

Recent studies have also proposed the use of several minibarcoding primer sets (Alberdi et al., 2017; Corse et al., 2017) to maximize the taxonomic coverage of metabarcoding approaches and minimize false-negative results. Indeed, it is noteworthy that designing COI universal primers generating no PCR amplification biases might not be achievable (Deagle, Jarman, Coissac, Pompanon, & Taberlet, 2014). Therefore the use of ribosomal rRNA, either mitochondrial 16S or 12S, with conserved flanking regions among taxonomical distant species, might be encouraged. Although this proposal should reduce amplification biases among taxa, it is yet not suitable for arthropod metabarcoding approaches due to the absence of public databases similar to BOLD (i.e., curated database with reference sequences linked to taxonomically verified voucher specimens). Moreover, the taxonomic resolution of these barcodes at the species level remaining largely unknown (Elbrecht et al., 2016). In conclusion, COI minibarcodes still remain an imperfect, but "not so bad" solution for taxonomic identification when this latter requires to reach the species level.

4.3 | Prey-bat simultaneous identification and taxonomic resolution

In addition to the methodological framework provided, the originality of our approach also resided in the simultaneous identification of prey and of a wide diversity of bat species. Despite the low quality of our faecal samples due to inappropriate storage conditions, we obtained a specific identification for 74% of the bat samples studied, including only 3% of incongruent results between the molecular and field identifications due to remaining faecal pellets in the cotton holding bags. Among the 26% unidentified, 21% were due to bat sequencing failure of at least one PCR replicate, 5% corresponded to the detection of several bat species. The failure rate associated with our molecular approach was therefore equivalent with what is observed in studies where species identification from bat faecal pellets was performed using traditional Sanger sequencing (e.g., 19% reported in Hope et al., 2014). It could be easily improved with the use of appropriate storage conditions and DNA extraction method. Our approach is thus relevant for bat species identification too.

The simultaneous identification of predators and prey is generally avoided in diet analyses as it may induce biases in the pool of sequences produced (Pompanon et al., 2012). In particular, high success of predator amplification will reduce prey amplification, what will in turn affect the sensibility of diet analyses. Here, we reported well-balanced proportions of reads for bats and their prey, with a mean of 43.3% of bat reads whereas other studies reported higher proportion of predator sequences (91.6% for the leopard cat in Shehzad et al., 2012). The lower proportion of bat reads observed in our study may result from several phenomena: a lower proportion of predator DNA in the faecal pellets analysed, a lower DNA degradation of prey due to the very quick bat digestion in bats, or a lower primer specificity to amplify target DNA from bats. It enabled an important sequencing depth for arthropods that guarantees the high sensitivity for prey detection. However, few samples produced low numbers of arthropod sequences. Results between PCR replicates were therefore not repeatable, what led to potential false negatives. The increase in sequencing depth, for example, using an Illumina HiSeq platform, associated with the relaxed restrictive approach of between-PCR replicate validation could improve our ability to detect prey.

Our approach provided a high level of taxonomic resolution for bats (Figure S1) and their prey as evidenced by the congruent identifications obtained using the 658-bp Sanger sequences and the 133-bp minibarcode for the arthropod mock community. Particularly, we confirmed the possibility to discriminate morphologically close insect species including the pine processionary moth complex *Thaumetopoea pityocampa/T. wilkinsoni* (Kerdelhue et al., 2009), the longhorn beetle *Monochamus galloprovincialis* and its sister species *M. sutor* (Haran, Koutroumpa, Magnoux, Roques, & Roux, 2015) or the green lacewing *Chrysopa perla/C. formosa* (Bozsik, 1992). Such taxonomic resolution is highly important when dealing with arthropod pests or arthropod species involved in biological pest control. In particular cases (Mayer & von Helversen, 2001), knowledge on geographic distribution may help to decipher the most likely taxa in presence (e.g., *Eptesicus serotinus* and *Eptesicus nilssonii*, or *Myotis myotis* and *Myotis blythii* that cannot be distinguished whatever the mitochondrial marker used).

We have also evidenced some limitations with regard to public sequence databases. Two arthropod species included in the mock communities could not be identified as they were not included in BOLD and GENBANK databases. We have also emphasized some errors that may have consequences for further identification (Figure S1). For example, one sequence of *Pipistrellus pipistrellus* included in BOLD is mis-assigned to *Pipistrellus kuhlii* (GENBANK Accession JX008080/BOLD Sequence ID: SKBPA621-11.COI-5P). This mistake made it impossible to distinguish both species using BOLD Systems tool. Although recently reported (Shen, Chen, & Murphy, 2013), it has not yet been cleaned. It seems that such errors are quite frequent in GENBANK (Shen et al., 2013), and unfortunately BOLD database does not appear to be spared. Completeness and reliability of public databases are therefore still a main pitfall in metabarcoding studies.

4.4 | Dietary composition for 16 bat species in Western France

The combination of HTS and filtering procedures described here provided a detailed diet characterization of the 16 bat species sampled in Western France. At the order level, our results were congruent with previous knowledge of prey consumed detected using morphological analyses. For example, the diet of *Myotis daubentonii* and *Pipistrellus pipistrellus* is known to be dominated by Diptera (e.g., Arlettaz, Godat, & Meyer, 2000; Vesterinen, Lilley, Laine, & Wahlberg, 2013), what was confirmed by our results showing, respectively, 79% and 74% of faeces samples positive for Diptera. Lepidoptera were also highly frequent in *Pipistrellus pipistrellus* samples, being the second order detected in faecal samples (48% of positive faecal pellets), as described in Arlettaz et al. (2000). The diet of *Barabastella barbastellus* was dominated by Lepidoptera with 100% positive samples, as previously described in Andreas, Reiter, and Benda (2012). Finally, the lowest dietary richness was found for *Myotis emarginatus*, with sequences of Arenae detected in 100% of faecal samples, what was previously described in Goiti et al. (2011).

Compared to morphological studies that enabled prey taxonomic identification at the order (sometimes family) level (Arlettaz et al., 2000), our approach provided greater details on dietary composition by increasing prey taxonomic resolution. It may even allow distinguishing species that could not be recognized based on morphological criteria of mixed insect hard parts. In addition, our approach enabled to detect unexpected interactions including secondary predation events and gastrointestinal infestations. We reported the presence of snails (*Cepaea hortensis* and *Cepaea nemoralis*) and slugs (*Arion intermedius*) in diets that included Carabidae prey (*Abax parallelepipedus* and *Carabus* sp.) in three *Myotis myotis* samples. Also surprisingly, three *Myotis nattereri* and one *Myotis daubentonii* bat faecal samples contained *Bos taurus* sequences. It is likely that these findings result from traces of bovine animal blood in the gut of the biting house fly *Stomoxys calcitrans* that were also detected as consumed prey in the *M. daubentonii* sample, or traces of bovine animal excrements coming from green bottle fly (*Neomyia cornicina*), crane flies (*Tipula* sp.) or scavenger cokroach (*Ectobius* sp.) for the *M. nattereri* samples. Similarly, grey heron (*Ardea cinerea*) and dormouse (*Glis glis*) sequences found in two *Myotis daubentonii* bat faecal samples may be due to blood traces in biting insects, the common house mosquito *Culex pipiens* and the autumn housefly *Musca autumnalis*, respectively. These results must be considered with caution because field contamination cannot be fully discarded. In addition, secondary predation can sometimes be difficult to distinguish from primary predation. Nevertheless the detection of prey diet traces in bat faeces indicates the possibility to use our results to improve our knowledge of trophic relationships.

Altogether, our data set enabled to reveal the presence in bat diets of 61 pest species (Table S5) among which some are important for agricultural management (e.g., the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*, the spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii* and the pine processionary *Thaumetopoea pityocampa*) or veterinary and Public Health issues (e.g., the malaria vector *Anopheles claviger*, the biting house fly *Stomoxys calcitrans*, the common house mosquito *Culex pipiens*). Our results therefore confirmed the possibility to use our metabarcoding approach as an indirect tool for "chirosurveillance" without any a priori with regard to the pests that need to be surveyed (Maslo et al., 2017). This study also illustrated the capacity of our approach to reveal variation in diet richness and composition. Combining bat species molecular identification with diet analyses will provide a more complete understanding of how bat diet varies along season, life-history stage, gender and age. It will be of main importance to understand the influence of diet on bat fitness and colony viability and to answer questions about niche size and niche overlap for coexisting species.

5 | CONCLUSION

The DNA metabarcoding approach described here enables the simultaneous identification of bat species and their arthropod diets from faeces, for several hundreds of faecal samples analysed at once. This strategy reduces the number of molecular steps than usually required in other metabarcoding studies and minimizes the probability to mis-assigned prey to the wrong bat species. The two-step PCR protocol proposed here makes easier the construction of libraries, multiplexing and HTS, at a reduced cost (about 8€ per faecal pellet for the entire wet laboratory workflow). Our study also includes several controls during the laboratory procedures associated to a bioinformatic strategy that enables to filter data in a way that limits the risk of false positive and that guarantees high confidence results for both prey occurrence and bat species assignment. This study therefore provides a rapid, resolutive and cost-effective screening tool for addressing "chirosurveillance" application or evolutionary ecological issues in particular in the context of bat conservation biology. It may be easily adapted for use in other vertebrate insectivores and more widely for other amplicon sequencing applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, we are indebted to all of our collaborators in the naturalist associations who helped us to gather and generate this comprehensive bat sampling: Matthieu Dorfiac (Charente Nature), Anthony Le Guen (Deux-Sèvres Nature Environnement), Virginie Barret and Philippe Jourde (LPO France), Sébastien Roué (Groupe Chiroptères Aquitaine) and all the numerous volunteers that contributed to fieldwork. We thank Jean-Claude Streito, Guenaelle Genson, Antoine Foucard, Laure Benoit, Carole Kerdelhué and Laure Sauné for the insect DNA provided to constitute the mock communities. Many thanks to Emese Meglecz, Vincent Dubut and Emmanuel Corse for the constructive discussions and sharing about the metabarcoding analyses. We thank Eric Petit and two anonymous reviewers for their constructive comments and suggestions on a previous version of the manuscript. Data used in this work were partly produced

through the genotyping and sequencing facilities of ISEM (Institut des Sciences de l'Evolution-Montpellier) and LabEx Centre Méditerranéen Environnement Biodiversité. Analyses were performed on the CBGP HPC computational platform thanks to Alexandre Dehne-Garcia. This work was funded by the LabEx ECOFECT and the internal funding from the CBGP laboratory. Orianne Tournayre PhD is funded by the LabEx CeMEB. Part of this work (JBP, DP) was performed within the framework of the LabEx ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon and the Poitou-Charentes Nature Feder project "*Grand Rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique des populations* " (ML, JBP, DP).

DATA ACCESSIBILITY

Supplementary data deposited in Dryad (https://doi.org/10.5061/dryad.kv02g) include: (i) raw sequence reads (fastq format), (ii) raw output files generated by the MOTHUR program, (iii) raw abundance table, (iv) filtered abundance table including taxonomic affiliations, (v) alignment of 444 COI minibarcode sequences from BOLD corresponding to 33 bat species found in France used to construct the phylogenetic tree, (vi) alignment of 693 COI reverse primer target sequences from BOLD corresponding to 33 bat species found in France and (vii) alignment of the COI haplotypes obtained by Sanger and MiSeq sequencing for the 19 insect species included in the mock communities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The study was conceived and designed by M.G., D.P. and N.C. J.-B.P and M.L. supervised the fieldwork. M.G. and J.-B.P carried out the molecular biology procedures and validated the MiSeq data. M.G. contributed to the development of bioinformatics methods, and M.G., J.-B.P and E.P. validated taxonomic assignments. D.P. and N.C. coordinated the funding projects (resp. Ecofect and AAP CBGP). M.G., J.-B.P, O.T. and N.C. analysed the data. M.G. and N.C. wrote the manuscript. J.-B.P, O.T., E.P., M.L and D.P. helped to draft and to improve the manuscript. All co-authors read and approved the final manuscript.

ORCID

Maxime Galan http://orcid.org/0000-0001-6981-5732
Nathalie Charbonnel http://orcid.org/0000-0002-7907-6539

REFERENCES

Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., & Bohmann, K. (2017). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 1–14. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849

Andreas, M., Reiter, A., & Benda, P. (2012). Prey selection and seasonal diet changes in the western barbastelle bat (*Barbastella barbastellus*). *Acta Chiropterologica*, *14*(1), 81–92. https://doi.org/10.3161/150811012x654295

Arlettaz, R., Godat, S., & Meyer, H. (2000). Competition for food by expanding pipistrelle bat populations (*Pipistrellus pipistrellus*) might contribute to the decline of lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*). *Biological Conservation*, *93*, 55–60. https://doi.org/10.1016/s0006-3207(99)00112-3

Biffi, M., Gillet, F., Laffaille, P., Colas, F., Aulagnier, S., Blanc, F., … Michaux, J. R. (2017). Novel insights into the diet of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) using next-generation sequencing molecular analyses. *Journal of Mammalogy*, *98*(5), 1497–1507. https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx070

Biffi, M., Laffaille, P., Jabiol, J., André, A., Gillet, F., Lamothe, S., … Buisson, L. (2017). Comparison of diet and prey selectivity of the Pyrenean desman and the Eurasian water shrew using next-generation sequencing methods. *Mammalian Biology*, *87*, 176–184. https://doi.org/doi: 10.1016/j.mambio.2017.09.001

Binladen, J., Gilbert, M. T. P., Bollback, J. P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., & Willerslev, E. (2007). The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS ONE*, *2*(2), e197. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000197

Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., … de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, *29*(6), 358–367. https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003

Bohmann, K., Monadjem, A., Noer, C. L., Rasmussen, M., Zeale, M. R. K., Clare, E., … Gilbert, M. T. P. (2011). Molecular diet analysis of two African free-tailed bats (Molossidae) using high throughput sequencing. *PLoS ONE*, *6*(6), e21441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021441

Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). OBITOOLS: A UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, *16*, 176–182. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428

Bozsik, A. (1992). Natural adult food of some important Chrysopa species (Planipennia: Chrysopidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica*, *27*, 141–146.

Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T., & Geigl, E. M. (2010). An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS ONE*, *5*(9), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013042

Corse, E., Meglecz, E., Archambaud, G., & Martin, J. F. (2017). A from-benchtop-to-desktop workflow for validating HTS data and for taxonomic identification in diet metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*, *17*(6), 146–159. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12703

D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., … Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics*, *17*(1), 55. https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9

Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: Not a perfect match. *Biology Letters*, *10*(9), 20140562. https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562

Deiner, K., Walser, J. C., Machler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, *183*, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018

Edgar, R. C. (2016). UCHIME2: Improved chimera prediction for amplicon sequencing. *biorxiv*, 074252. https://doi.org/10.1101/074252

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*(16), 2194–2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381

Elbrecht, V., Taberlet, P., Dejean, T., Valentini, A., Usseglio-Polatera, P., Beisel, J. N., … Leese, F. (2016). Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, *4*, e1966. https://doi.org/10.7717/peerj.1966

Esling, P., Lejzerowicz, F., & Pawlowski, J. (2015). Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research*, *43*(5), 2513–2524. https://doi.org/10.1093/nar/gkv107

Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M., & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, *2*(1), 6. https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6

Ficetola, G. F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources*, *16*(3), 604–607. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12508

Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Brouat, C., Charbonnel, N., Dehne-Garcia, A., … Cosson, J. F. (2016). 16S metagenomics for epidemiological survey of bacteria in wildlife. *mSystem*, *1*(4), e00032-00016. https://doi.org/10.1128/mSystems. 00032-16

Gillet, F., Tiouchichine, M. L., Galan, M., Blanc, F., Nemoz, M., Aulagnier, S., & Michaux, J. R. (2015). A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. *Mammalian Biology*, *80*, 505–509. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.08.002

Goiti, U., Aihartza, J., Guiu, M., Salsamendi, E., Almenar, D., Napal, M., & Garin, I. (2011). Geoffroy's bat, *Myotis emarginatus*, preys preferentially on spiders in multistratified dense habitats: A study of foraging bats in the Mediterranean. *Folia Zoologica*, *60*(1), 17–24.

Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., … Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*(11), 1299–1307. https://doi.org/10.1111/2041-210x.12595

Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE*, *6*(4), e17497. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017497

Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., & Hebert, P. D. N. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, *6*(4), 959–964. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x

Haran, J., Koutroumpa, F., Magnoux, E., Roques, A., & Roux, G. (2015). Ghost mtDNA haplotypes generated by fortuitous NUMTs can deeply disturb infra-specific genetic diversity and phylogeographic pattern. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *53*(2), 109–115. https://doi.org/10.1111/jzs.12095

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B, 270*, 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(41), 14812–14817. https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101

Hope, P. R., Bohmann, K., Gilbert, M. T. P., Zepeda-Mendoza, M. L., Razgour, O., & Jones, G. (2014). Second generation sequencing and morphological faecal analysis reveal unexpected foraging behaviour by *Myotis nattereri* (Chiroptera, Vespertilionidae) in winter. *Frontiers in Zoology*, *11*, 39. https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-39

Iwanowicz, D. D., Vandergast, A. G., Cornman, R. S., Adams, C. R., Kohn, J. R., Fisher, R. N., & Brehme, C. S. (2016). Metabarcoding of fecal samples to determine herbivore diets: A case study of the endangered pacific pocket mouse. *PLoS ONE*, *11*(11), e0165366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165366

Kerdelhue, C., Zane, L., Simonato, M., Salvato, P., Rousselet, J., Roques, A., & Battisti, A. (2009). Quaternary history and contemporary patterns in a currently expanding species. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 220. https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-220

Kircher, M., Sawyer, S., & Meyer, M. (2012). Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research*, *40*(1), e3. https://doi.org/10.1093/nar/gkr771

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5112–5120. https://doi.org/10.1128/aem.01043-13

Lam, M. M. Y., Martin-Creuzburg, D., Rothhaupt, K. O., Safi, K., Yohannes, E., & Salvarina, I. (2013). Tracking diet preferences of bats using stable isotope and fatty acid signatures of faeces. *PLoS ONE*, *8*(12), e083452. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083452

Maslo, B., Valentin, R., Leu, K., Kerwin, K., Hamilton, G. C., Bevan, A., … Fonseca, D. M. (2017). Chirosurveillance: The use of native bats to detect invasive agricultural pests. *PLoS ONE*, *12*(3), e0173321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173321

Mayer, F., & von Helversen, O. (2001). Cryptic diversity in European bats. *Proceedings of the Royal Society of London, B, 268*(1478), 1825–1832. https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1744

Oehm, X. A., Juen, A., Nagiller, K., Neuhauser, S., & Traugott, M. (2011). Molecular scatology: How to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Molecular Ecology Resources*, *11*, 620–628. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03001.x

Pinol, J., Mir, G., Gomez-Polo, P., & Agusti, N. (2015). Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, *15*(4), 819–830. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355

Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, W. O. C., Brown, D. S., Jarman, S. N., & Taberlet, P. (2012). Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1931–1950. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x

R Core Team (2013). *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

Ratnasingham, S., & Heber, S. (2007). BOLD. The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, *3*, 355–364. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x

Razgour, O., Clare, E. L., Zeale, M. R. K., Hanmer, J., Schnell, I. B., Rasmussen, M., … Jones, G. (2011). High-throughput sequencing offers insight into mechanisms of resource partitioning in cryptic bat species. *Ecology and Evolution*, *1*(4), 556–570. https://doi.org/10.1002/ece3.49

Renshaw, M. A., Olds, B. P., Jerde, C. L., McVeigh, M. M., & Lodge, D. M. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, *15*(1), 168–176. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12281

Robasky, K., Lewis, N. E., & Church, G. M. (2014). The role of replicates for error mitigation in next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, *15*(1), 56–62. https://doi.org/10.1038/nrg3655

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., … Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537–7541. https://doi.org/10.1128/aem.01541-09

Schnell, I. B., Bohmann, K., & Gilbert, M. T. P. (2015). Tag jumps illuminated - reducing sequence-to-sample misidentifications in metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*, *15*(6), 1289–1303. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12402

Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M. A., Miquel, C., Poillot, C., Shah, S. A., … Taberlet, P. (2012). Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: Application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1951–1965. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x

Shen, Y. Y., Chen, X., & Murphy, R. W. (2013). Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control. *PLoS ONE*, *8*(2), e57125. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057125

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, *21*(8), 2045–2050. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x

Tillmar, A. O., Dell'Amico, B., Welander, J., & Holmlund, G. (2013). A universal method for species identification of mammals utilizing next generation sequencing for the analysis of DNA mixtures. *PLoS ONE*, *8*(12), e83761. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083761

Vesterinen, E. J., Lilley, T., Laine, V. N., & Wahlberg, N. (2013). Next generation sequencing of fecal DNA reveals the dietary diversity of the widespread insectivorous predator Daubenton's bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland. *PLoS ONE*, *8*(11), e82168. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082168

Wright, E. S., & Vetsigian, K. H. (2016). Quality filtering of Illumina index reads mitigates sample cross-talk. *BMC Genomics*, *17*, 876. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3217-x

Zarzoso-Lacoste, D., Jan, P.-L., Lehnen, L., Girard, T., Besnard, A. L., Puechmaille, S. J., & Petit, E. (2017). Combining noninvasive genetics and a new mammalian sex-linked marker provides new tools to investigate population size, structure and individual behaviour: An application to bats. *Molecular Ecology Resources*, https://doi.org/10.1111/1755-0998.12727

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Galan M, Pons J-B, Tournayre O, et al. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Mol Ecol Resour*. 2018;00:1–16. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749

Article 4. Qui mange quoi ? Zoom sur l'ADN des chauves-souris et de leurs proies contenues dans le guano

Qui mange quoi ?

Zoom sur l'ADN des chauves-souris et de leurs proies contenues dans le guano

Par **Orianne Tournayre**
(orianne.tournayre@supagro.fr)



Grand rhinolphe © Maxime LEUCHTMANN

Cet article est extrait d'une publication réalisée dans le cadre du programme ECOFECT (Ecoevolutionary Dynamics of Infectious Diseases ; Université de Lyon, France) : 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

Résumé

Le régime alimentaire peut être directement impliqué dans le déclin des espèces car la qualité et la quantité de proies sont des paramètres primordiaux pour la survie et la reproduction des individus. En effet, si les proies sont contaminées par des substances toxiques ou si leur abondance diminue, les populations de prédateurs seront menacées. Connaître le régime alimentaire des chiroptères est donc essentiel pour améliorer leur conservation. Dans cette étude, nous décrivons une méthode d'analyse du régime alimentaire des chauves-souris insectivores basée sur le metabarcoding, c'est-à-dire l'identification sans a priori des espèces présentes dans un échantillon, à partir

du séquençage à haut débit de l'ADN qu'il contient. Nous avons tout d'abord validé son efficacité à partir de régimes alimentaires artificiels constitués de mélanges d'insectes connus. Puis, nous avons appliqué cette méthode sur plusieurs centaines d'échantillons de guano récoltés en Poitou-Charentes en 2015. Cela nous a permis d'une part de valider la possibilité d'identifier les 16 espèces de chauves-souris des sites d'études, et d'autre part de décrire leur régime alimentaire via la détection d'environ 300 espèces d'Invertébrés en une seule analyse. Cette méthode d'identification « 2 en 1 » peut désormais être utilisée directement à partir de guano prélevé sur le sol pour répondre à des questions spécifiques portant sur l'écologie des chauves-souris. La description exhaustive de la variabilité interspécifique ou intra-spécifique, spatiale et temporelle, de leurs régimes alimentaires permettra en particulier de mieux comprendre les relations entre les mouvements des chauves-souris, le paysage et les ressources alimentaires ainsi que les relations entre l'écotoxicologie, la santé des chauves-souris et les ressources alimentaires. Au-delà de l'apport de cette méthode pour la biologie de la conservation des chauves-souris, il faut noter les applications potentielles pour la conservation des invertébrés, la santé humaine ou animale, ou l'agronomie. En effet cette approche permet de caractériser efficacement des espèces patrimoniales, des vecteurs de maladies, ainsi que des ravageurs et auxiliaires des cultures ingérés par les chauves-souris. Elle est un formidable atout pour la mise en place et l'évaluation de stratégies de chirosurveillance visant à établir des modes de gestion intégrée ou de lutte biologique en milieu agricole.

Introduction

Les chauves-souris insectivores sont particulièrement sensibles à l'abondance et la qualité de proies disponibles par leurs besoins énergétiques élevés pour voler, hiberner et s'occuper de leur progéniture. Par exemple les femelles Molosses du Brésil (*Tadarida brasiliensis*) peuvent consommer une quantité de proies équivalente à 73 % de leur masse par nuit en période de lactation (Kunz *et al.*, 1995).

Une connaissance approfondie du régime alimentaire de ces chiroptères est nécessaire pour mettre en place et évaluer les mesures de conservation, qui pourraient cibler une meilleure protection de l'habitat de chasse ou des préconisations en termes d'utilisations de pesticides sur les territoires de chasse protégés. Cependant, la caractérisation précise du régime alimentaire des chauves-souris insectivores est un réel challenge car ces dernières sont difficilement observables en chasse et se nourrissent de proies pouvant être minuscules et difficiles à identifier de nuit. Jusqu'à récemment, la méthode classique d'analyse du régime alimentaire reposait sur l'identification morphologique des restes de fragments durs des proies (élytres, tarses, antennes …) retrouvés dans les déjections. Cette méthode d'analyse est très chronophage et nécessite de faire appel à des experts en taxonomie si l'on souhaite atteindre une identification taxonomique précise des arthropodes correspondant aux fragments observés. L'identification n'est généralement possible qu'à l'ordre ou à la famille, et elle n'est pas exhaustive puisque les parties non-dures des individus sont digérées et donc inaccessibles à l'observateur (ex des chenilles et autres larves). Cette méthode permet par contre une quantification

relative des taxons identifiables dans les crottes, même si elle reste approximative à cause de plusieurs biais. L'application d'approches moléculaires de séquençage de nouvelle génération aux études de régime alimentaire permet aujourd'hui de pallier ces problèmes. La description qualitative du régime alimentaire est désormais réalisable à partir des restes d'ADN contenus dans les fèces. C'est ce qu'on appelle le « barcoding », ou encore « metabarcoding » lorsque plusieurs ADN d'organismes différents sont présents dans un même échantillon (Taberlet *et al.*, 2012). Les organismes présents sont identifiés par une courte région de l'ADN, appelée code-barres ADN, dont la séquence est propre à chaque espèce. Après séquençage, le déchiffrage de ces multiples codes-barres ADN contenu dans un même échantillon est réalisé en interrogeant des bases de données publiques de séquences de référence qui ont été alimentées par le travail conjoint de taxonomistes et de biologistes moléculaires. Grâce à ces bases de données et à l'avènement du séquençage à haut-débit, il est aujourd'hui possible de déterminer rapidement et avec fiabilité les espèces présentes en mélange à partir d'échantillons environnementaux tels que l'eau, le sol, les déjections et bien d'autres prélèvements susceptibles de contenir de l'ADN.

Le code-barres ADN généralement utilisé chez les animaux est une portion d'ADN mitochondrial de 658 paires de base (pb) provenant d'un gène appelé cytochrome oxydase 1 (COI). La séquence de ce gène a la particularité de varier beaucoup entre espèces mais pas ou peu au sein d'une espèce (Hebert *et al.*, 2003). Cependant, l'ADN contenu dans des échantillons environnementaux tel que le guano est souvent dégradé en courtes séquences ce qui rend difficile voire impossible de déchiffrer la totalité de la séquence de 658pb du COI. Pour ce type d'échantillon, on se contente de séquencer un fragment court (< à 200pb) qui doit idéalement conserver un pouvoir de discrimination à l'espèce et pour des organismes très différents (insectes, poissons, mammifères, etc.) : on parle alors d'un « minibarcode ADN universel ».

Grâce aux séquenceurs haut-débit de nouvelle génération, le grand nombre de séquences obtenues permet de détecter et d'identifier spécifiquement l'ensemble des organismes présents dans un échantillon, même les plus petits ou ceux faiblement abondants. Cette approche permet donc d'obtenir une description plus exhaustive (proies à corps durs et mous) du régime alimentaire des chauves-souris insectivores comparativement aux analyses morphologiques classiques. Elle permet également une résolution taxonomique plus précise et une rapidité d'analyse plus importante pour de nombreux échantillons.

Dans certains cas, les analyses de régime alimentaire peuvent être biaisées (Pompanon *et al.*, 2012) si il y a une surreprésentation de l'ADN du prédateur dans les résultats de séquençage. Ce phénomène tend à réduire la sensibilité de détection de certaines proies présentes en faible quantité dans l'échantillon (Shehzad *et al.*, 2012). Jusqu'à présent, l'identification des prédateurs et de proies était donc réalisée par des analyses distinctes pour un même échantillon, en utilisant des codes-barres ADN spécifiques aux prédateurs puis aux proies, ou en ne ciblant que les proies. Pourtant, il apparait primordial de pouvoir être certain de l'espèce à qui appartient le guano analysé lorsqu'il est prélevé dans l'environnement. L'originalité de notre méthode de metabarcoding repose donc sur l'identification simultanée des chauves-souris et de leurs proies grâce à l'obtention

d'une proportion équilibrée de chaque type de séquences ADN à partir de guano (Galan *et al.*, 2018). La sensibilité et la résolution de notre méthode ont d'abord été validées sur des mélanges artificiels d'espèces d'insectes connues, puis sur des échantillons de guano collectés à partir d'individus piégés à la harpe et donc appartenant à des chiroptères d'espèces connues.

Matériels et Méthodes

Validation par l'utilisation de communautés artificielles

Nous avons testé la capacité de notre méthode de metabarcoding à identifier différents ordres d'arthropodes en réalisant des mélanges d'insectes ('communautés artificielles'), identifiés au préalable par des entomologistes, pour simuler des repas de chauve-souris. Deux communautés artificielles contenant des insectes d'ordres diversifiés (Orthoptères, Lépidoptères, Coléoptères, Hémiptères, Dermaptères, Neuroptères et Diptères) ont été analysées. La première (communauté artificielle 1) est composée de douze espèces présentes en France et la seconde (communauté artificielle 2) de sept espèces étrangères. Chaque insecte a été séquencé individuellement et en mélange (ADN de chaque insecte mélangé en proportion égale).
Le protocole utilisé est composé de cinq étapes principales (**Fig. 1**) : extraction de l'ADN, amplification du code-barres par PCR (Polymerase Chain Reaction) en triple réplicats indépendants, séquençage, analyse bio-informatique et comparaison des séquences à celles archivées dans les bases de données telles que BOLD (Barcode Of Life Database : http://www.boldsystems.org/). Pour les communautés artificielles, une sixième étape est ajoutée (comparaison des identifications moléculaires à celles des entomologistes). La comparaison du séquençage individuel et en mélange permet de mesurer d'éventuels biais de détection de certaines espèces pour les mélanges. Ce test permet de vérifier (1) la sensibilité de la méthode (« détecte-t-on tous les insectes ? ») et (2) sa résolution (« identifie-t-on à l'espèce ou à un rang taxonomique moins précis ? »).

Application de la méthode à des échantillons de guano

Récolte des échantillons

Les chauves-souris ont été capturées dans 18 sites de Poitou-Charentes entre juin et septembre 2015 (**Fig. 2**).
Pour chaque site, les harpes ont été positionnées une nuit devant l'ouverture du gîte avant le coucher du soleil (**Fig. 3**). Chaque chauve-souris capturée a été placée dans un sac en polaire avant d'être identifiée morphologiquement par des experts, pesée, sexée, mesurée puis relâchée. Les fèces ont été prélevées soit sur l'animal pendant la manipulation, soit dans le sac qui le contenait. Au total, 357 crottes provenant de 16 espèces de chauves-souris différentes ont été récoltées.

Analyses moléculaire et bio-informatique

Les échantillons de guano ont été analysés trois fois indépendamment (réplicats techniques) avec la même méthode de metabarcoding que les échantillons d'insectes des communautés artificielles (**Fig. 1**).



Fig. 1. Principales étapes de l'approche d'identification par metabarcoding.
Photos: Nathalie Charbonnel (prélèvement de guano), František ŠARŽÍK – CC By SA (Agrotis segetum), Das Nili – CC By SA (Anoxia villosa).

Analyses écologiques de la variabilité du régime alimentaire

Le régime alimentaire obtenu pour chaque espèce de chiroptère a été comparé aux données trouvées dans la littérature. Le nombre d'espèces de proies détectées par échantillon a été utilisé pour évaluer la variabilité du régime alimentaire entre individus d'une même espèce de chiroptère. Enfin, nous avons décrit sommairement la variabilité spatiale et temporelle du régime alimentaire de certaines espèces de chauve-souris.

Application de la méthode

Afin de tester la possibilité d'appliquer notre technique de metabarcoding en agronomie et en santé publique en tant qu'outils de surveillance des espèces de ravageurs («Chirosurveillance»; Maslo *et al.*, 2017) et de vecteurs de maladies, nous avons cherché parmi les arthropodes identifiés ceux considérés comme des ravageurs ou comme des espèces d'importance vétérinaire/santé publique.

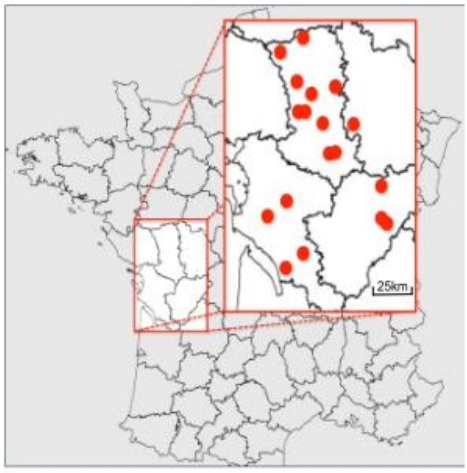


Fig. 2.
Carte des sites échantillonnés en région Poitou-Charentes (N=18).



Fig. 3.
Harpe disposée devant l'entrée d'un site avant le coucher du soleil pour une session de capture.

Résultats et discussion

Validation par l'utilisation de communautés artificielles

Sensibilité de détection

Pour les deux communautés artificielles analysées, nous retrouvons des codes-barres ADN appartenant à l'ensemble des 19 espèces d'insectes incluses (communautés artificielles 1 et 2), que ce soit en séquençage individuel ou en mélange (Fig. 4). De manière surprenante, un vingtième taxon a été détecté alors qu'il n'avait pas été introduit volontairement. Il s'agit de *Triarthria setipennis*, un diptère parasitoïde (organisme qui se nourrit et se développe sur ou à l'intérieur d'un organisme hôte) qui était présent dans l'échantillon de forficule *Forficula lesnei*. Ces résultats indiquent une bonne sensibilité de la méthode et donc sa capacité à reconstruire des interactions à plusieurs niveaux trophiques : il est non seulement possible d'identifier des proies directes mais également indirectes de prédation secondaire ou de parasitisme.

Cependant nous observons que certains taxa en mélange sont détectés avec une plus grande proportion de séquences que d'autres, malgré le mélange équimolaire de l'ADN des différentes espèces initialement réalisé. Par exemple *Monochamus galloprovincialis* de la communauté artificielle n°1 correspond à plus de 30% des séquences observées en mélange (**Fig. 4.A2**). Cela indique la présence de biais de détection possible en fonction des espèces en mélange et de leur biomasse respective. Ce phénomène déjà observé dans d'autres études (Piñol *et al.*, 2015) s'explique par des biais d'amplification PCR. Nous sommes récemment parvenus à réduire ces biais en améliorant notre protocole d'amplification PCR. Cependant cette approche ne permet pas de quantifier la biomasse ou le nombre d'individus d'une même espèce de proie retrouvé dans un guano.

Résolution taxonomique

La majorité (74 %) des insectes introduits dans les communautés artificielles ont été identifiés à l'espèce sur la base de leur code-barres. Cependant nos résultats moléculaires pour trois taxa (*Monochamus sutor*, *Chrysopa perla* et *Bactrocera dorsalis*) conduisent à des identifications équivalentes entre plusieurs espèces du même genre. Dans ces cas, le manque de résolution taxonomique observé peut découler de l'existence d'espèces génétiquement indifférenciées car

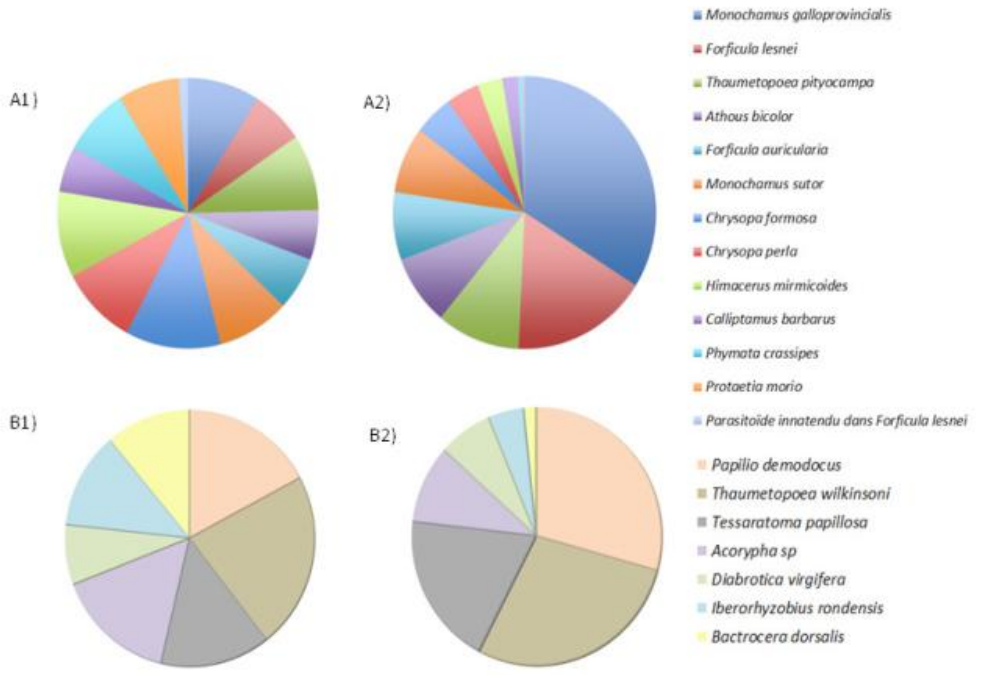


Fig. 4.
Proportions observées des codes-barres ADN des insectes introduits dans A) la communauté artificielle 1 : A1- réplicats individuels et A2- réplicats en mélange ; B) la communauté artificielle 2 : B1- réplicats individuels et B2- réplicats en mélange.

proches et donc présentant des codes-barres ADN identiques. Il peut également s'agir d'erreurs possibles dans la base de données de référence. Ces problèmes peuvent ainsi empêcher l'identification de certains taxons à l'espèce.
De plus, deux taxa (*Forficula lesnei* et *Acorypha* sp.) n'ont pas pu être identifiés car leurs codes-barres ADN ne sont pas référencés dans la base de données BOLD. Ce résultat met en évidence l'importance de l'exhaustivité des bases de données où sont référencés les codes-barres ADN. Sans code-barres de référence auxquels comparer les séquences ADN obtenues par metabarcoding, aucune identification n'est possible. C'est pourquoi il est parfois nécessaire d'échantillonner des taxa candidats qui n'ont pas été séquencés et renseignés, de les identifier morphologiquement avec l'aide d'entomologistes puis de les séquencer par barcoding classique afin de mettre à disposition ces informations dans les bases de données publiques.

Analyse des échantillons de guano

Identification des espèces de chauves-souris

L'identification moléculaire des chiroptères est parfaitement concordante avec l'identification morphologique faite sur le terrain pour 238 des 336 échantillons (70.8 %). Pour 72 échantillons (21.5 %), l'identification n'a pas pu être confirmée entre réplicats techniques à cause d'échecs d'amplification PCR. Ces échecs d'amplification peuvent être dus à la mauvaise conservation des échantillons qui ont été laissés à température ambiante dans des tubes hermétiques pendant plusieurs mois. Cela a entraîné une forte dégradation de l'ADN par la prolifération de micro-organismes, rendant certains codes-barres ADN impossibles à amplifier par PCR. Pour 17 échantillons (5.1 %), un mélange de deux espèces de chauves-souris est obtenu, et pour 9 échantillons (2.7 %), l'identification moléculaire est complétement différente de celle obtenue sur le terrain. Dans ces deux derniers cas, le protocole d'échantillonnage pourrait être mis en cause. En effet, les sacs en tissus sont utilisés pour plusieurs captures successives, pouvant entraîner la contamination du guano entre plusieurs espèces ou l'oubli du guano dans le sac qui par erreur entraîne son attribution à la capture suivante.
En termes de résolution taxonomique, nous avons vérifié que le code-barres ADN est résolutif pour 31 des 35 espèces de chauves-souris présentes en France. Deux paires d'espèces ne sont pas différentiables par leur ADN mitochondrial : le Grand murin *Myotis myotis* et le Petit murin *Myotis blythii* d'une part, la Sérotine commune E*ptesicus serotinus* et la Sérotine de Nilsson *Eptesicus nilsonii* d'autre part. Pour ces cas particuliers, seul l'ADN nucléaire pourrait permettre une identification à l'espèce, mais ce type d'ADN est plus difficile à caractériser à partir de guano. La connaissance biogéographique de la répartition de ces deux paires d'espèces peut également permettre de valider l'espèce présente pour le site de collecte des guanos. Par exemple, la Sérotine de Nilsson n'est pas présente dans l'Ouest de la France, donc on peut en déduire que les échantillons de notre étude correspondent à la Sérotine Commune.
Ces résultats montrent que nous sommes capables d'identifier la plupart des chauves-souris à l'espèce à partir de leur guano, ce qui permettra de mettre en place des études de régime alimentaire qui ne nécessitent pas la capture des individus (pour une analyse à l'échelle

de la colonie), et qui sont donc moins invasives et plus faciles à mettre en œuvre. Ces résultats soulignent également l'importance primordiale de la qualité des échantillons. Un soin tout particulier doit être apporté à la manière dont sont collectés et conservés les guanos pour éviter les contaminations entre échantillons (vérification systématique du sac en tissu, prélèvement avec du matériel à usage unique avec par exemple des cure-dents) et la dégradation des échantillons (stockage à -20°C rapidement après collecte).

Identification des proies

La composition du régime alimentaire a été décrite pour 216 échantillons, ces échantillons remplissant les conditions suivantes : identification morphologique et moléculaire de l'espèce de chauve-souris concordantes pour au moins un réplica technique et présence de codes-barres ADN de proies bien identifiés et obtenus de manière répétable entre les 3 réplicats. Au total, nous avons identifié 18 ordres d'arthropodes, 117 familles, 282 genres et 290 espèces. Les **tableaux 1A et 1B** illustrent l'efficacité de la méthode pour identifier cette large gamme d'arthropodes, même à partir d'un faible nombre de fèces : 17 taxa de proies identifiés à l'espèce à partir de huit fèces de Petit rhinolophe *Rhinolophus hipposideros* et 23 taxa de proies identifiés à l'espèce à partir de quatre fèces de Murin de Natterer *Myotis nattereri*.

Analyses écologiques de la variabilité du régime alimentaire

Nos résultats confirment la forte diversité des régimes alimentaires parmi les chiroptères insectivores (**Fig. 5**) : certaines espèces, comme la Pipistrelle commune *Pipistrellus pipistrellus*, ont un régime alimentaire varié, tandis que d'autres ont un régime alimentaire spécialisé sur certains types de proies comme le Minioptère de Schreibers *Miniopterus schreibersii* qui se nourrit principalement de lépidoptères.

Les résultats obtenus sont concordants avec les études précédentes basées sur l'analyse microscopique des parties dures d'arthropodes présents dans le guano. Par exemple, le régime alimentaire du Murin de Daubenton *Myotis daubentonii* est connu pour être principalement composé de diptères (Vesterinen *et al.*, 2013), ce que nous retrouvons dans nos résultats avec 79 % des échantillons analysés de cette espèce de chauve-souris contenant des diptères. De même pour le Murin à oreilles échancrées *Myotis emarginatus* pour lequel 100 % des échantillons analysés contiennent des araignées, comme décrit précédemment par Goiti *et al.* (2011). Notre méthode apporte cependant une meilleure résolution taxonomique de la composition du régime alimentaire des chauves-souris puisque leurs proies ne sont généralement décrites qu'à l'ordre ou la famille dans les analyses microscopiques (Arlettaz *et al.*, 2000).

Notre approche permet de mettre en évidence une forte variabilité du régime alimentaire entre individus d'une même espèce de chiroptère. Nous trouvons en moyenne environ cinq espèces de proies par échantillon, et les valeurs s'étendent de une à douze espèces de proies pour le Murin de Daubenton, une à dix pour le Murin à oreilles échancrées, une à onze pour le Grand rhinolophe *Rhinolophus ferrumequinum* et la Pipistrelle commune et une à 19 pour le Minioptère de Schreibers (**Fig. 6**). Le nombre de proies détectées dans le futur devrait être augmenté grâce aux améliorations récentes apportées à notre protocole de récolte et de conservation des échantillons.

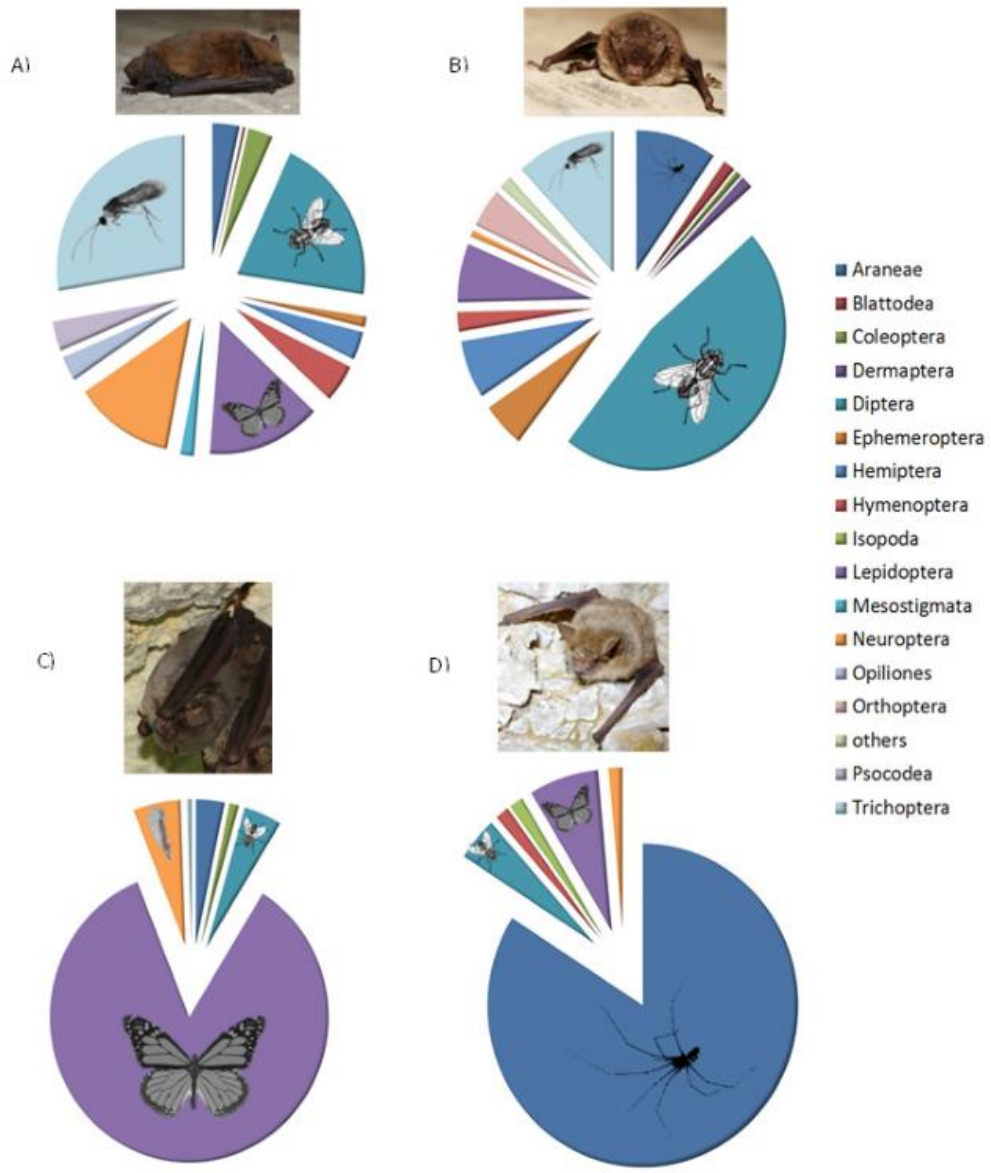


Fig. 5.
Occurrence d'espèces de proies dans les fèces pour A) la Pipistrelle commune (N=23), B) le Murin de Daubenton (N=29), C) le Minioptère de Schreibers (N=27) et D) le Murin à oreilles échancrées (N=17).
Photos chiroptères : A &B par Gilles San Martin – CC By SA; C par Maxime Leuchtmann et D par Karol Tabarelli – CC By SA.

Tableau 1 A. Diversité de proies identifiées par metabarcoding dans huit échantillons de guano de Petit rhinolophe.
Le niveau de confiance des identifications a été déterminé selon cinq niveaux dérivés de Razgour *et al. (2011) : 1a = correspondance du code-barres ADN à une seule espèce dans la base de données publique BOLD avec une similarité >99 % ; 1b = correspondance du code-barres à une seule espèce dans la base de données publique BOLD avec une similarité comprise entre 98 et 99 % ; 2 = correspondance à plusieurs espèces (« multi-affiliation ») du même genre et avec une similarité >98 % ; 3 = correspondance à plusieurs espèces de différents genres d'une même famille et avec une similarité >98 % ; 4 = correspondance à plusieurs espèces de familles différentes et/ou avec une similarité comprise entre 97 et 98 %. * signifie que l'espèce est considérée comme ravageur de culture et ** signifie que l'espèce est considérée d'importance en santé humaine ou vétérinaire (vecteur).*

Ordre	Famillle	Espèce	Niveau de confiance	Similarité de la séquence (%)	Nombre de fèces positifs
Blattodea	Ectobiidae	*Ectobius vittiventris*	1b	98.48	2
Diptera	Chironomidae	*Microtendipes pedellus*	1a	100.00	1
	Culicidae	*Culex pipiens***	1a	100.00	1
	Drosophilidae	*Drosophila suzukii**	1a	100.00	1
	Limoniidae	*Limonia nubeculosa*	1a	100.00	2
		Neolimonia dumetorum	1a	100.00	1
	Tipulidae	*Tipula oleracea**	1a	99.10	1
		*Tipula paludosa**	1a	100.00	2
	Trichoceridae	*multi-affiliation*	4	100.00	1
Lepidoptera	Cossidae	*Phragmataecia castaneae*	1a	99.24	1
	Depressariidae	*multi-affiliation*	3	100.00	1
	Hepialidae	*Triodia sylvina*	1a	100.00	2
	Sphingidae	*Agrius convolvuli*	1a	100.00	1
	Tortricidae	*Acleris rhombana**	1a	100.00	2
		*Acleris sparsana**	1a	100.00	1
		*Cydia splendana**	1a	100.00	1
		Eudemis sp.	2	100.00	1
		*Hedya nubiferana**	1a	100.00	1
		multi-affiliation	3	100.00	1
Trichoptera	Limnephilidae	*Halesus radiatus*	1a	100.00	1
		Limnephilus sparsus	1a	100.00	1

Tableau 1 B. Diversité de proies identifiées par metabarcoding dans quatre échantillons du Murin de Natterer.

Ordre	Famillle	Espèce	Niveau de confiance	Similarité de la séquence (%)	Nombre de fèces positifs
Araneae	Araneidae	*Araneus angulatus*	*1a*	*100.00*	*1*
		Argiope bruennichi	*1a*	*100.00*	*2*
	Lycosidae	*multi-affiliation*	*4*	*97.85*	*1*
		Pardosa sp.	*2*	*100.00*	*1*
	Tetragnathidae	*Tetragnatha extensa*	*1a*	*100.00*	*1*
		Tetragnatha nigrita	*1a*	*100.00*	*1*
		Tetragnatha obtusa	*1a*	*100.00*	*1*
	Theridiidae	*Enoplognatha ovata*	*1a*	*100.00*	*1*
	Thomisidae	*Xysticus erraticus*	*1a*	*100.00*	*1*
Coleoptera	Curculionidae	*Sitona gressorius**	*1a*	*100.00*	*1*
Dermaptera	Forficulidae	*Forficula auricularia-A**	*1a*	*100.00*	*1*
Diptera	Anthomyiidae	*Botanophila sp.*	*2*	*100.00*	*1*
		Lasiomma seminitidum	*1a*	*100.00*	*1*
	Chloropidae	*Meromyza lidiae*	*1a*	*100.00*	*1*
	Drosophilidae	*multi-affiliation*	*4*	*97.33*	*1*
	Heleomyzidae	*Suillia bicolor*	*1a*	*100.00*	*1*
	Lauxaniidae	*Calliopum aeneum*	*1a*	*100.00*	*1*
	Muscidae	*Azelia sp.*	*2*	*100.00*	*1*
		*Musca domestica***	*1a*	*100.00*	*1*
		Neomyia cornicina	*1a*	*100.00*	*1*
		*Stomoxys calcitrans***	*1a*	*100.00*	*1*
	Sarcophagidae	*Sarcophaga sp.*	*2*	*100.00*	*1*
		Scathophaga sp.	*2*	*100.00*	*1*
	Syrphidae	*Melanostoma sp.*	*2*	*100.00*	*1*
		Sphaerophoria sp.	*2*	*100.00*	*1*
	Tachinidae	*Phasia obesa*	*1a*	*100.00*	*1*
	Tipulidae	*Tipula oleracea**	*1a*	*99.10*	*1*
		*Tipula paludosa**	*1a*	*99.24*	*3*
Lepidoptera	Depressariidae	*Carcina quercana**	*1a*	*100.00*	*1*
	Hepialidae	*Triodia sylvina*	*1a*	*100.00*	*2*
Opiliones	Phalangiidae	*Dicranopalpus ramosus*	*1a*	*100.00*	*1*
Orthoptera	Acrididae	*Mecostethus parapleurus*	*1a*	*100.00*	*1*
		multi-affiliation	*3*	*100.00*	*1*

Là encore, une meilleure conservation des échantillons permettrait une description plus exhaustive et résolutive par la disponibilité d'ADN moins dégradé. De plus, nos conditions d'analyse étaient très strictes : nous avons éliminé les codes-barres ADN les plus rares (< à 100 séquences) ou non-répétés pour les trois réplicats techniques de l'échantillon. Des conditions moins strictes de validation des codes-barres (ex : deux réplicats positifs sur les trois), voir Alberdi *et al.*, (2018), permettraient de décrire plus de proies sans augmenter significativement le risque d'erreur.

Enfin, nos résultats montrent une variation temporelle de la composition du régime alimentaire. On observe par exemple dans les échantillons de Murins de Daubenton une variation au cours de l'été avec par exemple les trichoptères et les orthoptères absents de son régime en juillet et présents en août (Fig. 7), ainsi qu'une variation entre les deux mois d'été et septembre avec une forte augmentation de la prévalence de diptères et une diminution (ex : éphémères, trichoptères), voire une disparition (ex : hémiptères), en septembre des autres ordres qui étaient fortement présents en juillet-aout.

Un suivi temporel à intervalles réguliers ainsi que des effectifs plus importants permettraient d'évaluer plus finement la variabilité du régime alimentaire et ses causes, la disponibilité en proies pouvant dépendre des émergences d'insectes, des dates de traitements des cultures, etc.

Applications

Parmi les 290 taxa d'arthropodes identifiés à l'espèce, 61 sont considérés comme des ravageurs dont certains pouvant causer des dommages importants (la noctuelle de la tomate *Helicoverpa armigera*, la drosophile à ailes tachetées *Drosophila suzukii* et la processionnaire du pin *Thaumetopoea pityocampa*) ou comme espèce d'importance en santé vétérinaire et humaine (les moustiques vecteurs du paludisme *Anopheles claviger* ou de la fièvre du Nil Occidental *Culex pipiens*, la mouche piquante *Stomoxys calcitrans* inféodée au bétail et qui peut transmettre la maladie du charbon).

Ces résultats soulignent la possibilité d'utiliser notre technique de metabarcoding en agronomie et en santé publique en tant qu'outils de « chirosurveillance ».



Grand murin © Maxime LEUCHTMANN

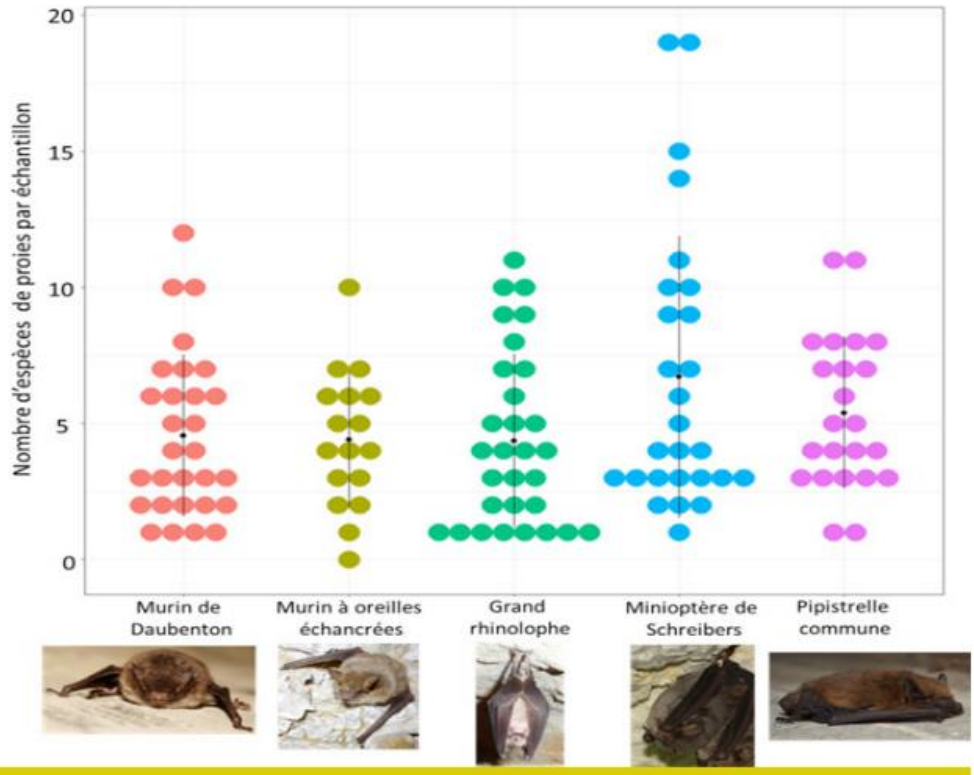


Fig. 6.
Distribution du nombre d'espèces de proies par échantillon (1 point = 1 échantillon) de Murin de Daubenton (N=29), de Murin à oreilles échancrées (N=17), de Grand rhinolophe (N=30) et de Pipistrelle commune (N=23).
Auteurs des photos, de gauche à droite : Gilles San Martin – CC By SA; Karol Tabarelli – CC By SA; Marie Jullion – CC By SA; Maxime Leuchtmann, Gilles San Martin – CC By SA.

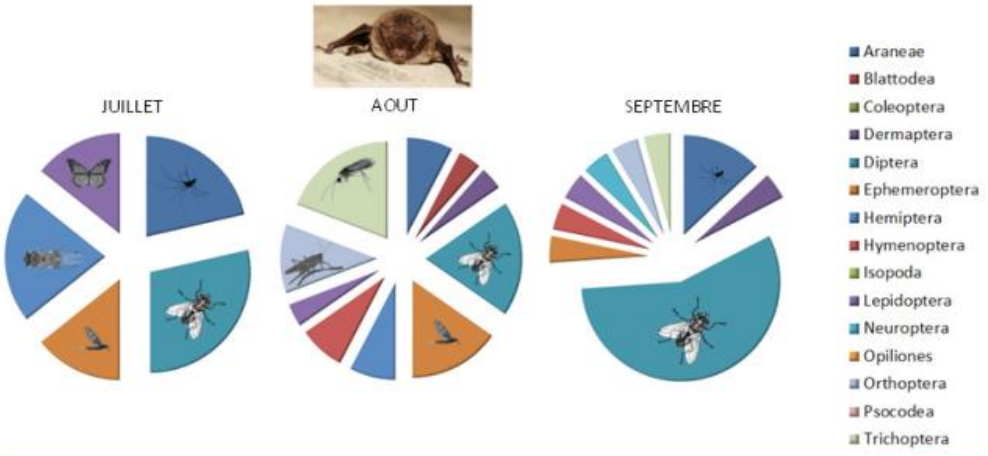


Fig. 7.
Variation de l'occurrence d'espèces de proies dans les échantillons de Murin de Daubenton selon le mois d'échantillonnage : juillet (N=5), août (N=9) et septembre (N=14).
Photos chiroptère: Gilles San Martin – CC By SA

Conclusion

La méthode de metabarcoding que nous proposons permet de décrire simultanément, à l'aide du même échantillon, l'espèce de chauve-souris et son régime alimentaire en arthropodes à partir de fèces ou de guano. Son application permet d'aborder des questionnements écologiques sur les chiroptères ou les arthropodes avec des approches non-invasives (ex. de la récolte de guano sous les colonies) en minimisant la probabilité d'assigner des proies à la mauvaise espèce de chauves-souris. Elle constitue également un outil rapide, exhaustif et résolutif pour l'étude des interactions trophiques dans des contextes de biologie de la conservation, mais également dans des contextes agronomique et de santé publique (chirosurveillance). Cette méthode peut également être facilement adaptée à d'autres organismes insectivores.

Pour citer cet article :

Tournayre, O. 2018. Qui mange quoi ? Zoom sur l'ADN des chauves-souris et de leurs proies contenues dans le guano. *Plume de Naturalistes* 2 : 61-76.

ISSN 2607-0510

Pour télécharger les articles de Plume de Naturalistes

http://www.plume-de-naturalistes.fr/index.php/numeros/

Remerciements

Ce travail est issu de la thèse d'Orianne Tournayre financée par le LabEx CeMEB et co-encadrée par N. Charbonnel et D. Pontier. Le monitoring des chauves-souris sur le terrain est réalisé dans le cadre du LabEx ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) de l'Université de Lyon et du projet Feder "Grand Rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique des populations" porté par Poitou-Charentes Nature. Nous remercions tous nos collaborateurs des associations naturalistes qui nous ont aidés à organiser et réaliser cet échantillonnage : Matthieu Dorfiac (Charente Nature), Anthony Le Guen (Deux-Sèvres Nature Environnement), Virginie Barret et Philippe Jourde (LPO France), Sébastien Roué (Groupe Chiroptères Aquitaine) et tous les nombreux bénévoles qui ont contribué au terrain. Nous remercions également Jean-Claude Streito, Guenaelle Genson, Antoine Foucard, Laure Benoit, Carole Kerdelhué et Laure Sauné, pour nous avoir donné de l'ADN d'insectes permettant de constituer les communautés artificielles. Un grand merci à Emese Meglecz, Vincent Dubut et Emmanuel Corse pour les discussions constructives et les échanges sur les analyses de metabarcoding.
Les données de séquençage obtenues dans cette étude ont en partie été produites grâce aux installations de l'ISEM (Institut des Sciences de l'Evolution-Montpellier) et du LabEx Centre Méditerranéen Environnement Biodiversité (LabEx CeMEB). Les analyses ont été réalisées sur la plateforme de calcul CBGP HPC grâce à Alexandre Dehne-Garcia. Ce travail a été financé par le LabEx ECOFECT et un financement interne du CBGP.

Bibliographie

Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M.T.P., Bohmann, K., 2018. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods Ecol Evol* 9, 134–147. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849

Arlettaz, R., Godat, S., Meyer, H., 2000. Competition for food by expanding pipistrelle bat populations (*Pipistrellus pipistrellus*) might contribute to the decline of lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*). *Biological Conservation* 93, 55–60. https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00112-3

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

Goiti, U., Aihartza, J., Guiu, M., Salsamendi, E., Almenar, D., Napal, M., Garin, I., 2011. Geoffroy's bat, *Myotis emarginatus*, preys preferentially on spiders in multistratified dense habitats: a study of foraging bats in the Mediterranean. *Folia Zoologica* 60, 17–24.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Biol. Sci. 270, 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Kunz, T.H., Whitaker, J.O., Wadanoli, M.D., 1995. Dietary energetics of the insectivorous Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) during pregnancy and lactation. *Oecologia* 101, 407–415. https://doi.org/10.1007/BF00329419

Maslo, B., Valentin, R., Leu, K., Kerwin, K., Hamilton, G.C., Bevan, A., Fefferman, N.H., Fonseca, D.M., 2017. Chirosurveillance: The use of native bats to detect invasive agricultural pests. *PLoS ONE* 12, e0173321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173321

Piñol J., Mir G., Gomez-Polo P., Agustí N., 2015. Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources* 15, 819–830. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355

Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N., Taberlet, P., 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21, 1931–1950. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x

Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M.A., Miquel, C., Poillot, C., Shah, S.A., Pompanon, F., Coissac, E., Taberlet, P., 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Molecular Ecology* 21, 1951–1965. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789–1793. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x

Vesterinen, E., Lilley, T., Laine, V., Wahlberg, N., 2013. Next Generation Sequencing of Fecal DNA Reveals the Dietary Diversity of the Widespread Insectivorous Predator Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland. *PloS one* 8, e82168. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082168

3. Optimisation de la méthode pour des colonies mixtes de Grand rhinolophe / Murin à oreilles échancrées

Le couple d'amorces utilisé (MG ; Galan et al. 2018) a montré qu'il était capable d'amplifier et d'identifier en proportions équilibrées l'ADN de chauve-souris et de ses nombreuses proies. Cependant, nous avons observé une variation de la proportion de reads correspondant à de l'ADN de chauves-souris selon l'espèce (Figure 27), et notamment entre le Grand rhinolophe (30%) et le Murin à oreilles échancrées (70%). Or trop amplifier l'ADN de prédateur réduit potentiellement la détection des proies (Pompanon et al. 2012; Vestheim et Jarman 2008). De plus, de nombreux travaux ont montré ces dernières années que le choix du couple d'amorces influence grandement la détection et identification des proies, et proposent des solutions contrastées pour y pallier (ex: Alberdi et al. 2018; Corse et al. 2019; Elbrecht et Leese 2017).

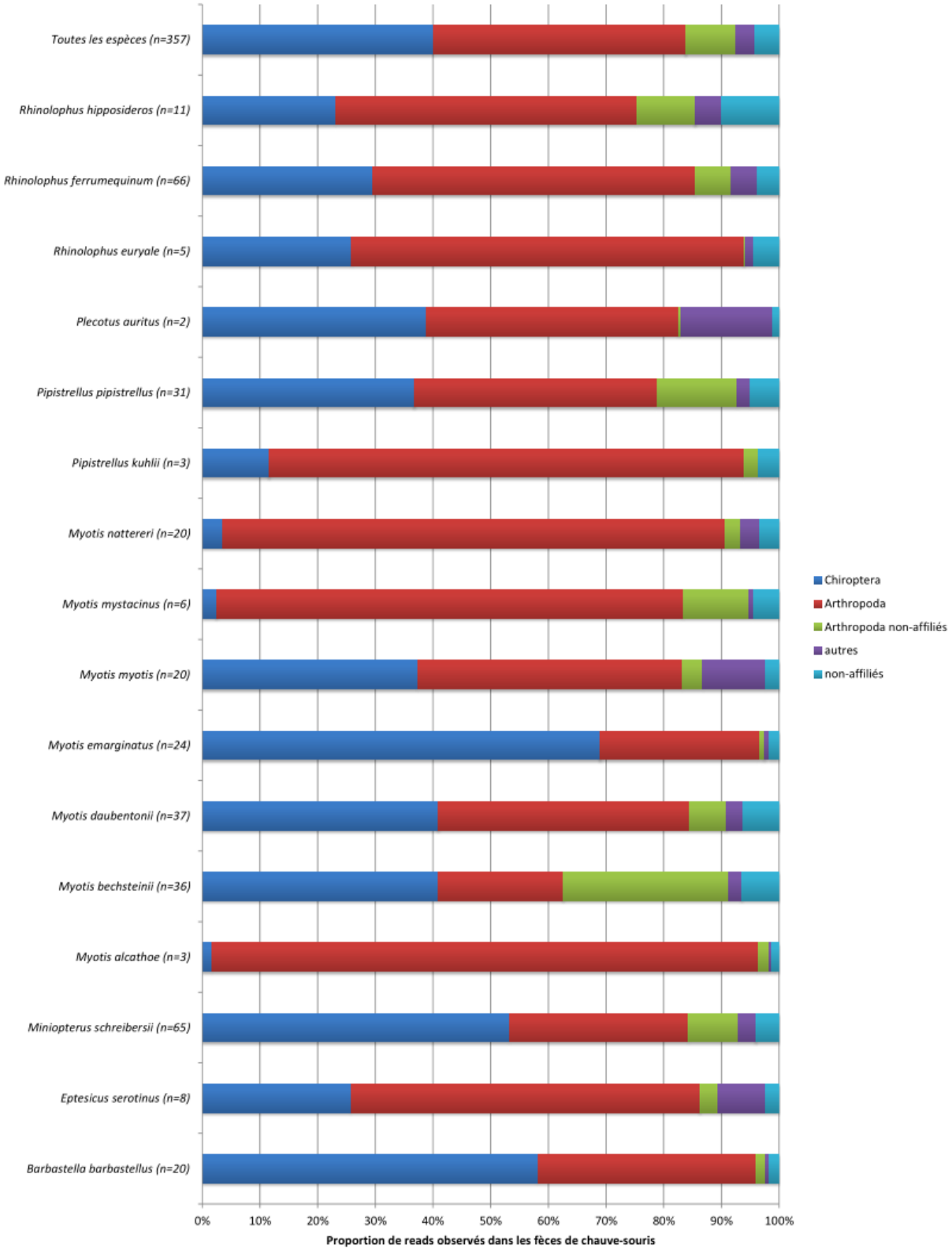


Figure 27. Histogramme indiquant la proportion et l'assignation taxonomique des séquences observées dans les fèces de chaque espèce de chauve-souris. « Autres » correspond aux séquences susceptibles d'appartenir à des organismes issus de contaminations environnementales, proies secondaires ou parasites.

L'objectif de cette étude était donc de définir une méthode de détection et d'identification taxonomique optimisée pour l'analyse du régime alimentaire du Grand rhinolophe et du Murin à oreilles échancrées avec qui il partage ses colonies de maternité (environ 70% de ses colonies sont mixtes en Poitou-Charentes). L'analyse parallèle sur le Murin à oreilles échancrées a été réalisée dans le cadre d'une extension du projet Grand rhinolophe, par Marine Trillat en stage de M2 IEGB (bourse d'Equipe de Recherche Junior du LabEx ceMEB 2019).

Ainsi, nous avons évalué parmi les stratégies d'amorces qui sont proposées dans la littérature laquelle serait la plus adaptée, en prenant en compte les contraintes biologiques (fèces collectés sous des colonies mixtes, grande diversité de proies) et les différents facteurs pouvant affecter le succès d'amplification des proies de chauve-souris insectivores : gène cible (COI *vs* 16S), proportion de séquences de chauve-souris, longueur de l'amplicon et dégénérescence des amorces.

3.1. Méthodologie

3.1.1. Choix des amorces

Tout d'abord, nous avons sélectionné les amorces couramment utilisées pour la détection et l'identification des arthropodes en metabarcoding. Six couples d'amorces ont été sélectionnés sur le gène COI et un sur le gène 16S. Nous avons privilégié les couples d'amorces ciblant soit des régions courtes (entre 133 et 218 pb), soit des fragments plus longs (entre 313 et 322 pb), afin d'évaluer l'effet potentiel de la longueur de l'amorce sur la détection des proies dans le guano de chauve-souris. Ensuite, nous avons conçu quatre nouveaux couples d'amorces COI et un couple d'amorces 16S sur la base des sept couples d'amorces choisis précédemment.

Nous avons augmenté le niveau de dégénérescence des bases pour améliorer le succès d'amplification. Pour cela, nous nous sommes basés sur l'alignement de la séquence consensus de milliers de séquences de 21 ordres d'arthropodes obtenus des bases BOLD et NCBI avec le package R *PrimerMiner* (Elbrecht et Leese 2016). Les couples d'amorces varient en fonction de la longueur de la région cible et du niveau de dégénérescence (Figure 28).

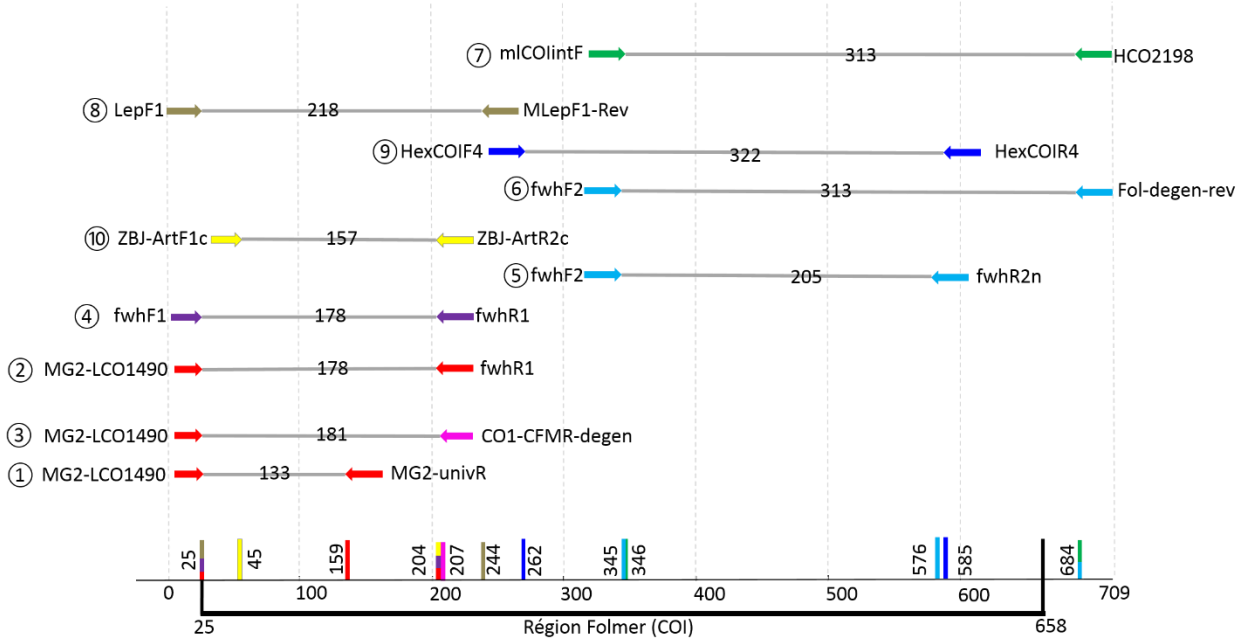


Figure 28. Représentation visuelle de la longueur et de la position des couples d'amorces sur le gène COI. Les amorces sont représentées par une flèche colorée. Pour chaque couple d'amorces, le nombre sur la ligne grise indique la longueur de l'amplicon. La position de chaque amorce est indiquée par une barre verticale de sa couleur respective.

3.1.2. Analyse in silico

Pour les analyses *in silico* nous avons utilisé le logiciel *PrimerMiner* car contrairement aux autres logiciels d'évaluation d'amorces comme *ecoPCR* (Ficetola et al. 2010), *PrimerMiner* permet de prendre en compte la position et le type de *mismatch* dans l'évaluation des amorces. Ceci est très important car par exemple un *mismatch* en 3' (fin de la séquence de l'amorce) peut avoir plus d'effets négatifs sur le succès d'amplification PCR que d'autres *mismatch* (Stadhouders et al. 2010; Piñol et al. 2015). Des scores de pénalité sont calculés selon les critères suivant : position du *mismatch* (5' 3'), type du *mismatch* (A, T, G, C), adjacence avec un autre *mismatch* (augmente le score de pénalité), réduction de la pénalité si présence de bases dégénérées (*match* partiel). Comme recommandé par Elbrecht & Leese (2016), nous avons uniquement conservé pour les analyses les ordres présentant plus de 100 OTUs, car cela permet de capturer une partie suffisante de la variabilité génétique au niveau des sites de liaison de l'amorce.

3.1.3. Analyse in vitro sur les communautés artificielles d'arthropodes

Nous avons réalisé une sélection de 33 taxa d'arthropodes préalablement identifiés morphologiquement par les entomologistes du CBGP. Les amplifications ont d'abord été faites indépendamment pour chaque arthropode en séquençage Sanger pour obtenir les séquences de référence de chaque taxa et constituer ensuite deux communautés artificielles. La première communauté MC_{arthr} est composée des 33 taxa d'arthropodes et la deuxième $MC_{arthr+bat}$ des 33 taxa d'arthropodes ainsi que de l'ADN de Grand rhinolophe (concentration égale de l'ADN d'arthropodes et de chauves-souris) pour tester l'effet de la présence d'ADN du prédateur (dans notre cas la chauve-souris).

3.1.4. Analyse in vitro sur les prélèvements de guano

Les couples d'amorces ont été testés sur 22 fèces prélevés par les partenaires associatifs dans des colonies mixtes de Grand rhinolophe et de Murin à oreilles échancrées en ex-Poitou-Charentes.

Pour les deux analyses *in vivo* nous avons utilisé la stratégie de 2-step PCR développée dans l'article 2 (PCR1 = amplification du gène, PCR2= indexage ; Galan et al. 2018). Chaque extrait d'ADN a été amplifié et séquencé sur MiSeq en triplicat, et chaque run de séquençage inclut des contrôles positifs et négatifs. Après filtrage, les séquences ont ensuite été comparées à celles renseignées dans BOLD pour le COI et GenBank pour le 16S , et attribuées à un taxa avec un critère de confiance (voir Galan et al., 2018).

Dans cette analyse nous raisonnons principalement en termes d'occurrences de proies et non en termes de nombre de proies pour donner moins de poids aux proies très rares. Cela est particulièrement utile pour révéler la sensibilité d'un couple d'amorces. Lors de la comparaison de plusieurs couples d'amorces, les occurrences vont nous renseigner sur la capacité d'un couple à détecter systématiquement un taxa donné par rapport à un autre couple d'amorces qui ne détecte le taxa que dans quelques échantillons.

3.2. Principaux résultats

3.2.1. Analyse in silico

Nous avons obtenu près de 50 fois plus de séquences pour le gène COI (4 259 845 séquences) que pour le gène 16S (83 651 séquences) dans les bases de données BOLD et NCBI. Les scores moyens de pénalité et le succès théorique d'amplification (score de pénalité par ordre

d’arthropodes > 120) variaient fortement entre les couples d'amorces et entre les ordres d'arthropodes (Figure 29). Nous avons trouvé une influence négative significative du niveau de dégénérescence de l’amorce sur les scores de pénalité moyens (GLMM, p = 1,01e-12) et une influence positive sur le succès de l’amplification théorique (GLMM, p = 2,88e-09). Les scores de pénalité moyens élevés (> 165) et les succès d'amplification faibles (moyenne <50%) ont été observés pour les couples d'amorces avec de faibles niveaux de dégénérescence. Par exemple, le score de pénalité moyen des amorces Epp était environ 12 fois supérieur au score de sa version dégénérée Epp-degen.

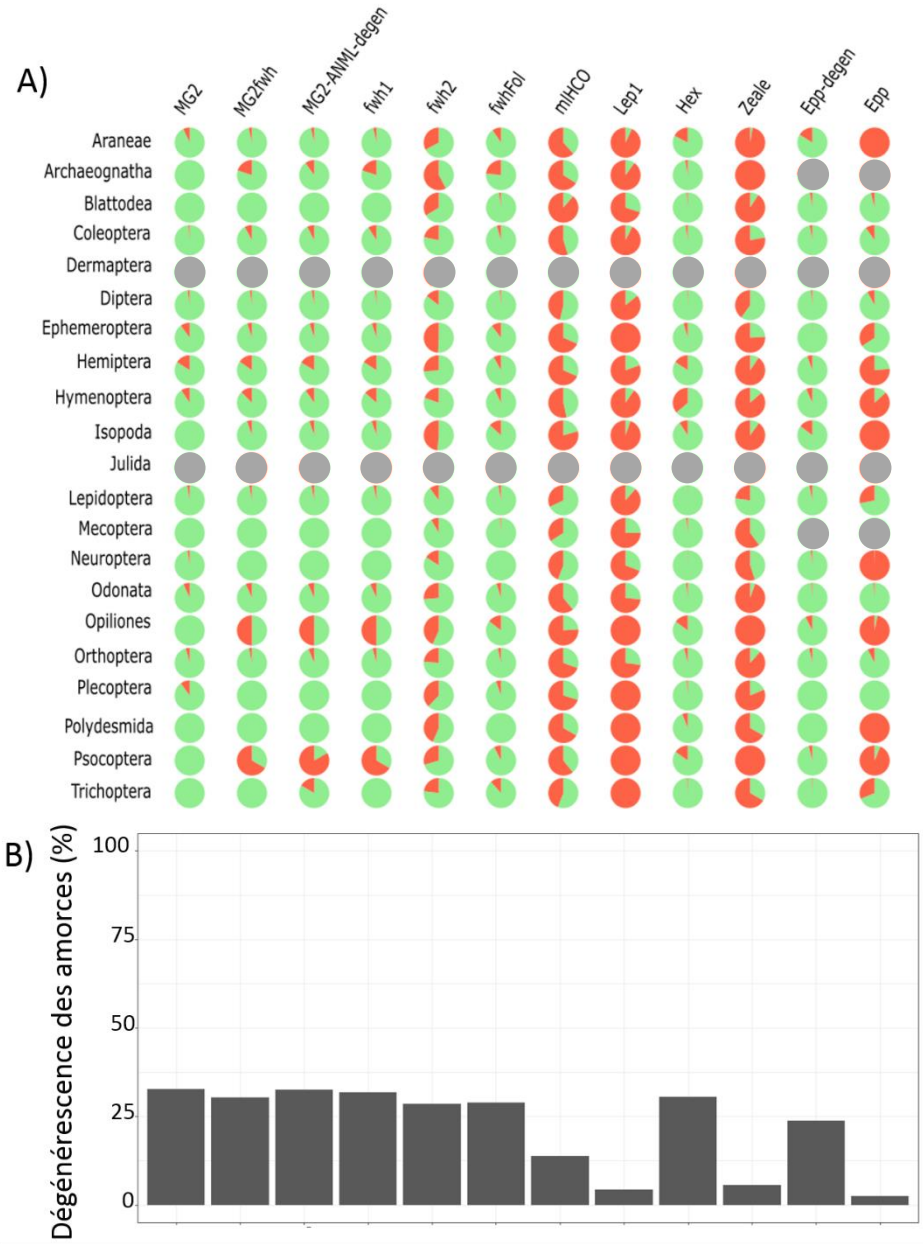


Figure 29. Évaluation in silico des ordres d'arthropodes représentés par au moins 100 UTO utilisant PrimerMiner. A) Les performances des ensembles d'amorces sont indiquées pour chaque ordre à l'aide de graphiques en camembert, les couleurs verte et rouge représentant respectivement le succès et l'échec de l'amplification. Le succès de l'amplification correspond au score de pénalité moyen de PrimerMiner < 120 et à l'échec de l'amplification à un score de pénalité moyen> = 120. La couleur grise indique une absence d'analyse lorsque l'ordre d'arthropode n'était pas représenté par assez d'OTUs (<100 OTUs). B) Pourcentage du niveau de dégénérescence de chaque couple d'amorces.

3.2.2. Analyse in vivo sur les communautés artificielles d'arthropodes

Les amorces non dégénérées ont produit peu de reads (Hex, mlHCO et Epp ; moyenne de réplicas <0,01%) ou n'ont amplifié aucun ADN de chauve-souris (Zeale et Lep1). Les amorces dégénérées fwh2 et MG2-ANML-degen ont amplifié moins de 1% des reads de chauve-souris et fwh1 et MG2fwh moins de 5,2%. Les meilleurs couples d'amorces pour l'amplification de l'ADN de chauve-souris étaient donc Epp-degen (10,17%), fwhFol (7,53%) et MG2 (7,43%).

Le pourcentage de taxons d'arthropodes détectés dans MC_{arthr} et $MC_{arthr+bat}$ variait de 67% à 100% (exemple pour deux couples d'amorces en Figure 30). Les résultats entre les deux communautés artificielles étaient très similaires et nous n'avons trouvé aucun effet du pourcentage de reads de chauve-souris sur le pourcentage de taxa d'arthropodes (GLM, p = 0.668). Nous n'avons pas trouvé non plus d'effet de la taille de l'amplicon (GLM, p = 0.781), par contre nous avons montré un effet positif du niveau de dégénérescence des bases sur le pourcentage de taxa d'arthropodes détectés dans les communautés artificielles (GLM, p = 0.001).

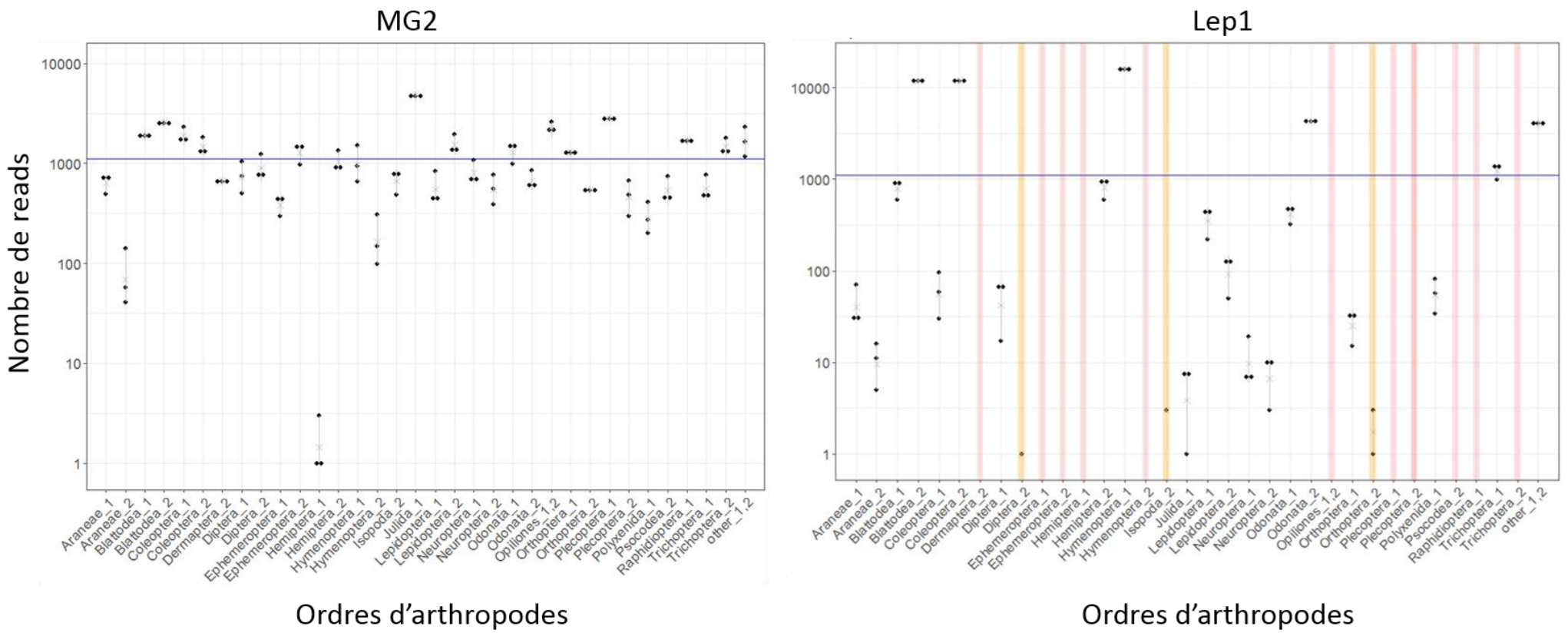


Figure 30. Représentation graphique du nombre de reads des trois réplicats techniques de la communauté artificielle sans ADN de chauve-souris, pour chaque ordre d'arthropodes (N = 33) avec les couples d'amorces MG2 et Lep1. La ligne horizontale bleue indique le nombre attendu de reads. Chaque point représente une réplicat technique. Les barres verticales jaunes indiquent les cas où seulement un ou deux réplicat sur trois sont amplifiées. Les barres verticales rouges indiquent les situations où aucun des réplicats n'est amplifié.

Nos résultats ont révélé une identification identique pour les couples d'amorces COI avec seulement quelques légères différences de résolution taxonomique. En revanche, les couples d'amorces COI et 16S ont souvent montré des identifications et des niveaux de résolution taxonomique différents. Seulement huit taxa d'arthropodes parmi les 33 avaient une identification COI et 16S identique. Les couples d'amorces 16S ont en tout cas toujours montré un niveau de résolution taxonomique inférieur. Les seules exceptions étaient i) Lepidoptera-2 identifié à l'espèce (*Melitae deione*) par les couples d'amorces 16S et au genre uniquement par les couples d'amorces COI, et ii) Psocoptera-2 identifié au niveau du genre (*Myopsocus sp.*) par les couples d'amorces 16S et non identifié par les couples d'amorces COI.

3.2.3. Analyse in vivo sur les prélèvements de guano

Nous avons identifié deux espèces de chauve-souris dominantes dans nos échantillons : le Grand rhinolophe (N = 10 échantillons) et le Murin à oreille échancrées (N = 11 échantillons) (Figure 31).



Figure 31. Photographie de Murin à oreilles échancrées (à gauche) et de Grand rhinolophe (à gauche). © L-M Préau.

Nos résultats ont cependant montré la présence d'une troisième espèce (Grand Murin *Myotis myotis*) et la présence de contaminations entre les espèces de chauve-souris plus ou moins importante (de < 1% à plus de 15%). Certains couples d'amorces n'ont amplifié aucune des deux espèces de chauves-souris principales ou une seule espèce de chauve-souris, tandis que les autres ont amplifié les deux espèces principales. Cependant, le pourcentage de reads de chauve-souris dans les échantillons de Grand rhinolophe était toujours plus bas que dans les fèces de Murin à oreilles échancrées, quel que soit le couple d'amorces considéré.

Nous avons trouvé un effet négatif de la taille de l'amplicon (p= 0.030), aucun effet du niveau de dégénérescence des bases (p = 0.140) et aucun effet du pourcentage de reads de chauve-souris sur le nombre d'occurrences détectées.

Les 12 couples d'amorces ont permis l'identification de 96 occurrences de proies dans les dix échantillons de Grand rhinolophe (10 ordres, 32 familles, 56 genres, 60 espèces) et 109 occurrences de proies dans les 11 échantillons de Murin à oreilles échancrées (11 ordres, 34 familles, 63 genres et 65 espèces) (Figure 32). Nos résultats ont montré une disparité entre les couples d'amorces. Le couple d'amorces de Zeale a révélé le plus d'occurrences de proies dans les échantillons des deux espèces de chauve-souris mais il ne permet pas d'amplifier l'ADN de chauve-souris. Le couple d'amorces qui amplifie l'ADN de chauves-souris et permet d'obtenir le plus grand nombre d'occurrences était fwh1. En revanche, aucun couple d'amorces seul n'a pu révéler l'ensemble des occurrences révélées par la combinaison des 12 couples d'amorces. En cumulant les résultats de deux à quatre couples d'amorces COI et 16S, nous avons détecté neuf à 18 occurrences de plus dans les échantillons de Grand rhinolophe (89.58% des occurrences

détectées en combinant tous les couples) et 20 à 25 de plus dans les échantillons de Murin à oreilles échancrées (85.32% des occurrences détectées en combinant tous les couples).

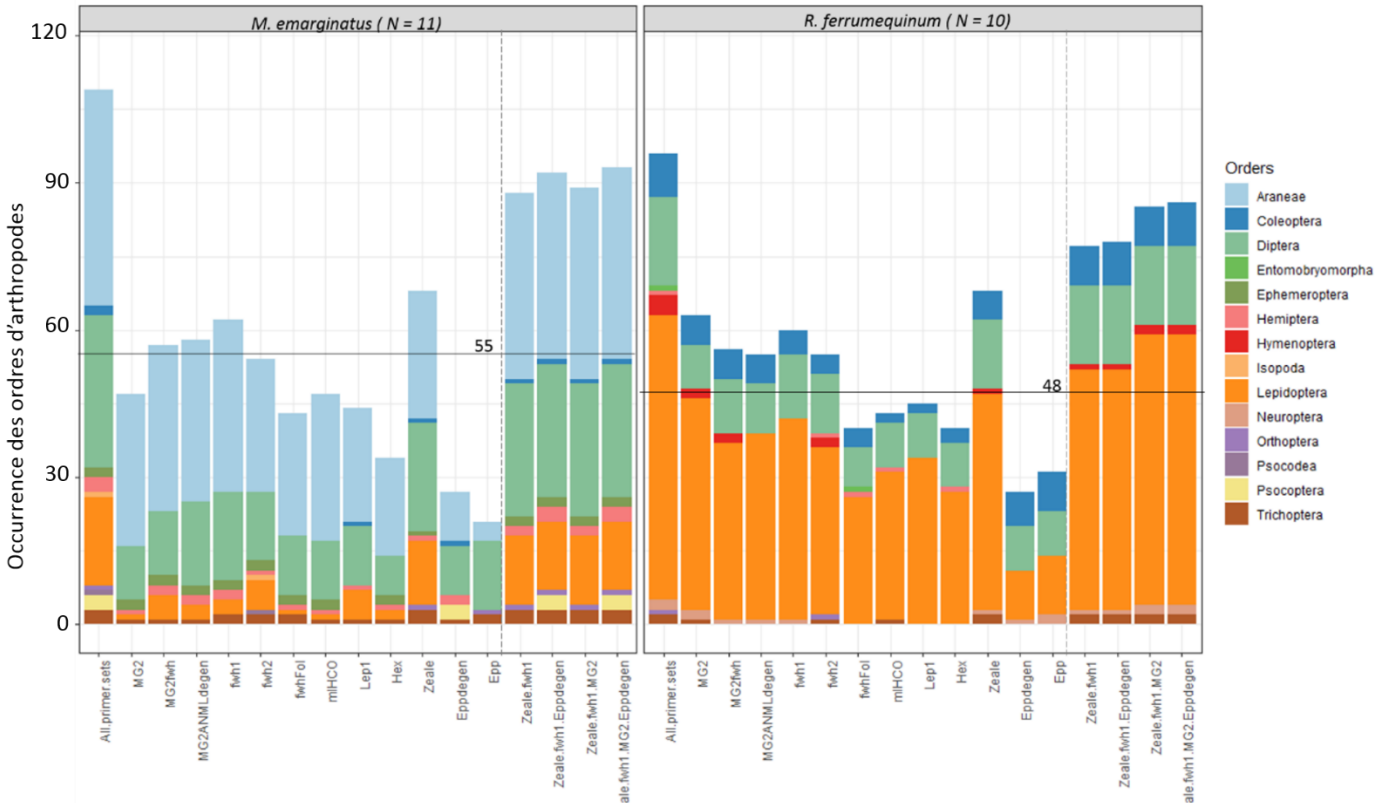


Figure 32. Occurrences des ordres d'arthropodes détectés dans des échantillons de guano pour chaque couple d'amorces et pour quatre combinaisons de couples d'amorces. Les lignes en pointillés séparent les couples d'amorces des combinaisons. N est le nombre d'échantillons de guano identifiés pour chaque espèce de chauve-souris. Les lignes horizontales indiquent 50% des occurrences (55 occurrences pour les échantillons de *M. emarginatus* et 48 pour les échantillons de *R. ferrumequinum*).

Enfin, nos résultats ont mis en évidence l'existence d'occurrences de proies peu répétables (2PCR/3 ; faible nombre de reads), qui représentent un tiers des occurrences.

3.3. Discussion

En révélant des contaminations entre les échantillons des deux espèces étudiées (*R. ferrumequinum* et *M. emarginatus*) et d'une troisième espèce (*M. myotis*), nos résultats ont mis en évidence l'importance de l'identification systématique de l'espèce de chauve-souris lorsque les analyses sont réalisées sur des échantillons fécaux environnementaux. De plus, nous avons montré que l'amplification de la chauve-souris n'a pas impacté la détection des proies. L'utilisation parallèle de méthodes moléculaires diagnostiques spécifiques de l'espèce attendue (PCR, séquençage Sanger, Forin-Wiart et al. 2018; Bohmann et al. 2011) pour déterminer l'espèce du prédateur représente donc des coûts financier et de main d'œuvre supplémentaire non nécessaires. Mais surtout ces approches ne révèlent ni la présence d'espèces non-attendues, ni le taux de contamination des échantillons. Puisque la capacité à amplifier l'espèce de chauve-souris varie selon les couples d'amorces (zéro espèce sur trois, une espèce sur trois, ou trois espèces sur trois) il est primordial de procéder à des tests préliminaires sur différents échantillons pour s'assurer de la polyvalence du couple d'amorces choisis dans les études de régime alimentaire par metabarcoding.

Dans les trois analyses (*in silico* et *in vivo*) que nous avons réalisées, les amorces 16S étaient toujours moins efficaces et moins résolutives que les amorces COI. Cela est surprenant car le couple d'amorces 16S Epp-degen possède des caractéristiques favorables au succès d'amplification (taille d'amplicon courte, niveau de dégénérescence élevé) et d'excellents résultats *in silico*. La faible performance de ce couple dans les analyses *in vivo* pourrait refléter le manque de séquences de références dans les bases de données 16S (Clarke et al. 2014; Elbrecht

et al. 2016; Marquina et al. 2019). Une solution pour pallier à ce genre de biais serait de construire préalablement une base de référence adaptée au système d'étude (ex: Sow et al. 2018). En l'absence d'une base 16S correctement étayée nous recommandons l'utilisation du gène COI pour le metabarcoding animal.

Nos résultats ont montré que même en combinant quatre couples d'amorces - ce qui augmente déjà considérablement le coût financier, le travail de laboratoire et les analyses - nous n'atteignons pas le plateau des occurrences de proies. De plus, un tiers des occurrences de proies qui ne sont pas partagées entre couple d'amorces - et qui sont donc intéressantes à « récupérer » par la combinaison de plusieurs couples - sont peu répétables entre réplicas et sont représentées par un très faible nombre de reads. Il n'existe donc pas de couple d'amorces 'parfait' qui soit parfaitement exhaustif, et la décision de combiner des couples d'amorces repose ainsi sur un compromis entre la nécessité de détecter la totalité des occurrences de proies - en sachant qu'une grande partie n'est probablement pas fiable - et le coût supplémentaire engendré par les combinaisons. D'après l'ensemble de nos résultats, nous recommandons donc plutôt l'utilisation d'un seul couple d'amorces dégénérées amplifiant un fragment de petite taille pour être efficace sur l'ADN dégradé contenu dans le guano. Pour notre étude, le meilleur couple d'amorces identifiant à la fois le Grand rhinolophe, le Murin à oreilles échancrées et les proies est le couple fwh1 (Vamos, Elbrecht, et Leese 2017).

Article 5. *In silico* and empirical evaluation of twelve COI & 16S metabarcoding primer sets for insectivorous diet analyses

Submitted to Molecular Ecology Resources

TITLE

In silico and empirical evaluation of twelve COI & 16S metabarcoding primer sets for insectivorous diet analyses

RUNNING TITLE

Metabarcoding of insectivorous bat diet

AUTHORS

Orianne TOURNAYRE[1†],

Maxime LEUCHTMANN[2],

Ondine FILIPPI-CODACCIONI[3,4],

Marine TRILLAT[1],

Sylvain PIRY[1],

Dominique PONTIER[2,3*]

Nathalie CHARBONNEL[1*],

Maxime GALAN[1]

[1]CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montpellier, France

[2]Nature Environnement, Surgères, France

[3]LabEx ECOFECT « Ecoevolutionary Dynamics of Infectious Diseases », Université de Lyon, Lyon, France

[4] CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR5558, Université de Lyon, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

*equal contribution

† corresponding authors

Abstract

This last decade, environmental DNA metabarcoding approaches have been developed and improved to minimize biological and technical biases; some challenges, however, remain, as the design of primers. Here we have performed a comprehensive assessment of ten COI and two 16S primer sets. We have combined *in silico*, *in vivo*-mock community of 33 arthropod taxa from 16 orders and guano analyses to identify primer sets that should maximize arthropod detection and taxonomic identification, whilst identifying bat species and minimizing labour time and cost. We have focused on two insectivorous bat species living in mixed-colonies, the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) and Geoffroy's bat (*Myotis emarginatus*). We have found that the level of primer degeneracy is the main factor influencing arthropod detection for *in silico* and mock community analyses, while the amplicon length is critical for the detection of arthropods from degraded DNA samples. Our results confirm the importance of performing predator detection and taxonomic identification, simultaneously with arthropod sequencing, as faeces samples can be contaminated by different insectivorous species. Moreover, amplifying bat DNA does not affect the primers' capacity to detect arthropods. We therefore recommend the systematic simultaneous identification of predator and prey. Finally, we evidenced that one third of the prey occurrences are unreliable and probably not of primary interest in diet studies, which might decrease the relevance of combining several primer sets instead of using one efficient primer set. In conclusion, this study provides general criteria enabling the selection of primers whilst considering different scientific and methodological constraints.

KEYWORDS

Arthropod, bat, environmental DNA (eDNA), predator feeding, high-throughput sequencing

1 INTRODUCTION

Environmental DNA (eDNA) metabarcoding, the genetic analysis of environmental samples such as soil, water or faeces, provides a rapid and cost-effective tool for the study of species that are difficult to detect or monitor (Bohmann et al. 2014). This approach allows the simultaneous identification of the taxa composition of environmental samples, without requiring the initial isolation of organisms (Clare 2014; Taberlet et al. 2012). eDNA metabarcoding is of particular interest for the diet analysis of rare or elusive species, and this approach has been applied to a large spectrum of organisms (Clare et al., 2009; Shehzad et al., 2012; Rytkönen et al., 2019; Kartzinel and Pringle, 2015; Corse et al., 2017). Compared to the traditional microscopic study of the undigested prey fragments in faecal remains, eDNA metabarcoding has two key advantages for diet analysis : (i) a finer resolution (potentially to the species level), and (ii) the simultaneous processing and sequencing of several hundred samples (Galan et al. 2018). However, eDNA metabarcoding is subject to many biological and technical distortions at each step of its process, including fieldwork, laboratory analysis and bio-informatics. Old-established samples, storage in poor conditions, contaminations, PCR inhibitors, PCR stochasticity and chimera development are common biases influencing the reliability of results (for a review see, Alberdi et al., 2019). Many methodological studies have been made to limit some of these biases and to provide some guidelines for the elaboration of metabarcoding protocols, as for example the systematic inclusion of technical replicates and negative controls (Alberdi et al. 2018; Corse et al. 2017; Elbrecht et Steinke 2019; Galan et al. 2016; Mata et al. 2018).

Another major issue of eDNA metabarcoding that still needs to be solved, despite a growing attention, is the selection of the primer set(s). This is crucial because primers targeting the DNA fragment to be amplified and sequenced, should be suitable for all the taxa present in the environmental samples. The targeted DNA fragment has to be variable enough to discriminate close species, but also sufficiently abundantly referenced in public sequence databases to allow for the identification of sequences gathered. The cytochrome c oxidase I (COI) mitochondrial gene fulfils these criteria. It is the most widely used gene in animal metabarcoding analyses (Andújar et al. 2018; Hebert et al. 2003). The targeted 'Folmer region' of the COI sequence used for the standardized DNA barcoding is 658 base pairs (bp), which is too long to be sequenced efficiently by the second generation of High-Throughput Sequencing (HTS) platforms. Moreover, eDNA is often highly degraded, because of digestion processes (faecal samples), or exposure of samples to the outer environment (*i.e.* rain, sunlight, etc, Oehm et al., 2011). This makes the use of the entire 'Folmer region' COI sequence irrelevant (Deagle, Eveson, et Jarman 2006). 'Mini COI barcodes' (*i.e.* with a targeted region range of < 200bp; Hajibabaei et al., 2006; Pompanon et al., 2012) are therefore more commonly used in eDNA metabarcoding analyses, although lack of conserved regions in the COI sequence can make the design of universal primers difficult (Deagle et al. 2014). Thus, some authors have argued for the joint use of several COI primer sets (Corse et al. 2019; Esnaola et al. 2018), or of the combination of mitochondrial 16S rRNA and COI primer sets (Alberdi et al. 2018; Bohmann et al. 2018). This should allow the coverage of the taxonomic spectrum of prey to be increased. For example, Esnaola et al. (2018) have shown that the combination of the Zeale et al. (2011) and Gillet et al. (2015) primer sets allows 37.2% more

90 species to be detected than Gillet's primer set alone. However, the combination of several primer
91 sets greatly increases not only the financial cost but also the duration of both laboratory work
92 and analyses of metabarcoding studies. In this context, the use of a single highly degenerated
93 primer set is potentially very promising. Some studies have highlighted the efficiency of
94 degenerated primers (Elbrecht et Leese 2017; Galan et al. 2018; Vamos, Elbrecht, et Leese 2017).
95 Degenerated bases are used in primer's sequences to avoid mismatches at the variable positions
96 between the different targeted taxa. In theory, this enables the amplification and identification
97 of different taxa with a unique primer set in a single PCR reaction. However, degenerated primers
98 have to be carefully designed because high levels of degeneracy can lead to high rates of non-
99 target amplification (Innis et al. 2012). Up to now, no consensus has been reached and a multitude
100 of primer sets have been designed for the COI and 16S genes that differ in their target length,
101 degeneracy levels and position.

102 Designing metabarcoding protocols for the study of insectivorous bat diet is still an important
103 issue. Such molecular analysis is critical because the direct observation of bat feeding is virtually
104 impossible. The morphological identification of prey remains in the guano is not resolutive and
105 can be highly time consuming. Finally, many bat species are endangered and therefore protected
106 so that invasive methods cannot be applied to carry out diet surveys. Metabarcoding analysis of
107 the DNA contained in bat guano has thus been developed, (i) to better understand bat ecology
108 (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015; Clare et al. 2014), (ii) to highlight the potential ecosystem
109 services provided by bats as pest suppressors (Aizpurua et al. 2018; Maslo et al. 2017b), and (iii)
110 ultimately to set up effective conservation strategies (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015).

111 However, most of these studies have used arthropod specific primer sets. The resulting problem
112 when working with guano collected from roost sites comes from the fact that several bat species
113 may roost in the same sites, and that the guano is not easily distinguishable between bat species.
114 In this case, it is critical to identify bat species to avoid mis-assigning preys to the wrong bat
115 species and also to discard guano samples that could be contaminated with excreta from other
116 bat species. To this end, Galan et al. (2018) optimized a metabarcoding approach to
117 simultaneously identify bat species and their prey, instead of using different primer sets and
118 methodologies to identify bat species on one hand and the arthropods on the other hand (e.g.
119 Bohmann et al., 2011; Van den Bussche et al., 2016). As the amplification of bat DNA may reduce
120 the sensitivity of prey DNA detection (Pompanon et al. 2012), it is important to find a trade-off
121 between the success of an exhaustive prey amplification and bat species identification.

122 In this study, we have addressed this question of the design of an optimal DNA
123 metabarcoding approach in order to study the diet of two European insectivorous bat species:
124 the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) and the Geoffroy's bat (*Myotis*
125 *emarginatus*). These two species are of particular interest regarding this methodological issue
126 because they share maternity roosts during summer but have contrasted diets. It is therefore
127 important to be able to assign guano collected from one or other of these two species. In this
128 context, our main objective was to compare different primer sets to identify the primer
129 characteristics that would maximize the accuracy of arthropod detection and identification, while
130 minimizing the time and cost of labour. We also compared the capacity of primer sets to provide
131 identification of bat species without over amplifying bat DNA. Following the recent

recommendations of Elbrecht et al. (2019), we carried out a complete primer assessment consisting of three stages. We first made an *in silico* comparison of primer sets, based on hundreds of thousands of arthropods' sequences gathered from public databases. This step enabled to evaluate the primers' efficiency to detect a wide taxonomic array of arthropods, independently of the quality of the samples and the effects of laboratory procedures (extraction, PCR, etc). We then performed an *in vivo* comparison of primer sets on two mock communities (MC) – one containing only arthropod DNA and the other one containing both arthropod and bat DNA. This step enabled to evaluate the efficiency of primer sets in detecting a wide taxonomic array of known arthropod taxa, and to assess whether the presence of bat DNA influences the efficiency of detecting prey. Lastly, we made an *in vivo* comparison of primer sets on guano samples from two insectivorous bat species. This step allowed to compare the efficiency of primer sets in amplifying degraded arthropod DNA which is likely to be encountered when working with guano samples collected from roost sites.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *In silico* evaluation

First, we selected primers commonly used for arthropod detection and identification in metabarcoding approaches (Table 1). Six primer sets were selected on the COI gene and one on the 16S gene. We favoured primer sets targeting either short region length (between 133 and 218 bp), but also some longer fragments (between 313 and 322 bp) to evaluate the potential effect

152 of primer length on prey detection in bat guano. Then, based on existing primers, we designed
153 four new COI combinations of primers and one new 16S combination of primers on the basis of
154 the seven previously chosen primer sets. For the COI reverse primer from Jusino et al. (2018) and
155 the 16S primers from Epp et al. (2012), we increased the base degeneracy level to improve their
156 success of hybridization on DNA prey during the PCR amplification. To estimate the efficiency of
157 the 12 primer sets, we applied the R package *PrimerMiner* (Elbrecht et Leese 2016) to cluster
158 4,259,845 sequences from BOLD database in 327,412 COI OTUs (Operational Taxonomic Units)
159 and 83,651 sequences from NCBI database in 25,505 16S OTUs for 21 arthropod orders including
160 potential bat prey (details in Table S1). COI and 16S sequences were aligned separately using
161 MAFFT v7.017 (Katoh et al. 2002) as implemented in GENEIOUS v8.1.7 (Kearse et al. 2012). The
162 consensus sequence alignment for each order of arthropods was visualized using *PrimerMiner*
163 which allows to identify suitable primer binding sites (Figure S1). All primer sets are detailed in
164 Table 1. They varied in target region length and degeneration level (Figure 1).

165 These 12 primer sets were evaluated and compared using *PrimerMiner*. This comparison is
166 based on a mean penalty score per arthropod order. It is calculated as a mismatch scoring that
167 considers the adjacency, position and type of mismatch between primers and template
168 sequences. Primers' evaluation was only made for arthropod orders represented by at least 100
169 OTUs, as recommended by Elbrecht and Leese (2016). This enables to capture a sufficient part of
170 the variability potentially existing at primer binding sites. We evaluated each primer set by
171 combining the penalty scores from both the forward and reverse primers. We determined

whether the arthropod OTUs should be theoretically successfully amplified using the default value (success: penalty score < 120).

2.2 *In vivo* evaluation

2.2.1 Mock community: sample collection and preparation

Sampling details are provided in Table S2. Briefly, we collected 33 arthropod individuals representing 16 orders (two taxa per order except for Opiliones, Dermaptera, Isopoda, Psocodea, Julida, Polyxenida and Raphidioptera). They were captured alive in May and June 2019 in the South of France, then immediately frozen at -20°C to avoid DNA degradation. Bat DNA was obtained from tissue samples. They were collected in Western France from the wing membrane (patagium) of greater horseshoe bats (*R. ferrumequinum*) using a 3-mm diameter biopsy punch. Bat samples were preserved in 95% ethanol solution at 4°C until DNA extraction and pooling.

The DNA of arthropods and bats was extracted using EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit for Animal (BioBasic) following the manufacturer's instruction. DNA extractions were normalized to 7 ng/µL after Qubit fluorimeter quantification (Invitrogen). The integrity of DNA was evaluated by electrophoresis on a 1,5% agarose gel.

We built two versions of the same mock community (MC) of 33 different arthropods taxa. The first one contained the 33 arthropod DNA extracts mixed in equimolar proportion (MC_{arthr}). The second one contained 50% of this mock community and 50% of bat DNA ($MC_{arthr+bat}$).

We used the same DNA extractions of bats and arthropods to build reference sequences for the COI and 16S genes. Normalized DNA was amplified and sequenced for each individual to provide reference sequences for each gene. Firstly, we sequenced the 658bp 'Folmer region' of the COI gene using Sanger technology as described in Sow et al. (2018). Secondly, we sequenced the 106bp target region of the two 16S minibarcodes using the Epp-degen primer set and MiSeq sequencing technology for each DNA extractions independently, following the same protocol used for the analysis of the mock and guano samples, as described below.

2.2.2 Guano samples: collection and preparation

We collected 22 faecal pellets from five mixed maternity colonies of the greater horseshoe bat and Geoffroy's bat in Western France (see details in Table S2). Each guano was retrieved from paper plates let on the ground during 10 days using single-usage pliers in order to avoid contaminations between samples. Paper plates were renewed at each collection to avoid contaminations. Samples were stored at -20°C until DNA extraction.

DNA extraction was performed according to Zarzoso-Lacoste et al. (2018). Briefly, guano samples were frozen at -80°C then bead-beaten for 2 x 30s at 30 Hz on a TissueLyser (Qiagen) using a 5-mm stainless steel bead. DNA was extracted using the NucleoSpin 8 Plant II kit (Macherey Nagel) with the slight modifications recommended in Zarzoso-Lacoste et al. (2018).

2.2.3 PCR and library construction

We made four versions of each primer by adding a 5' heterogeneity spacer of 0 to 3 bp to the primer sequence (Table S3). This increased the diversity at each sequencing cycle, improved the detection of the sequencing clusters at the flowcell surface and thus increased the quality of the reads. The four versions of each primer were mixed together before PCR.

We used the two-step PCR protocol described in Galan et al. (2018) with slight modifications. First, we increased the time of extension step (2min instead 45s) in PCR_1 and PCR_2 to reduce chimera formation. Second, for each PCR replicate multiplexed in the same run, we used a double indexing strategy as recommended in Kircher et al. (2012): each 9-bp i5 and i7 dual-index were used only for one PCR sample, eliminating the problem of 'leak' due to false index-pairing (J.-F. Martin 2019). The lists of the dual-index used are described in Table S4. We used the same PCR programs for all the primer sets with a low annealing temperature (45°C) as recommended in recent studies (Elbrecht et al. 2019; Jusino et al. 2018). We validated this program by checking the quality of PCR amplification on the mock community for the 12 primer sets (Figure S2). The PCR_1 was performed in 10 µl reaction volume using 5 µl of 2x Qiagen Multiplex Kit Master Mix (Qiagen), 2.5 µl of ultrapure water, 0.5 µl of each mix of forward and reverse primers (10 µM), and 1.5 µl of DNA extract. The PCR_1 conditions consisted in an initial denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 45°C for 45 s, and extension at 72°C for 2min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR_2 consisted in a limited-cycle amplification step to add multiplexing index i5 and i7 (9 bases each) and Illumina sequencing adapters P5 and P7 at both ends of each DNA fragment from PCR_1. PCR_2 was carried out in a 10µl reaction volume using 5 µl of Qiagen Multiplex Kit Master Mix (Qiagen)

and 2µL of each indexed primer i5 and i7 (0.7 µM). Then, 2 µL of PCR_1 product was added to each well. The PCR_2 started by an initial denaturation step of 95°C for 15 min, followed by 8 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72°C for 2min followed by a final extension step at 72°C for 10 min.

We included in each 96-well microplate a negative control for extraction (NC_{ext}), a negative control for PCR (NC_{PCR}) and a negative control for indexing (NC_{index}). We performed three PCR technical replicates per sample on each DNA extract. For the guano samples, we considered a positive sample for a particular taxon if at least two replicates over three were positive, to overcome the stochasticity of the PCR in the detection of rare prey while reducing the number of putative false-positive results (*i.e.* one positive replicate over three is considered as a false-positive result, Alberdi et al., 2018).

We checked the homogeneity of amplifications between primer sets and the absence of nonspecific amplification by electrophoresis of 3 µL of each PCR_2 product on a 1.5% agarose gel. Then PCR_2 products were pooled separately for each of the 12 primer sets and put on a low-melting agarose gel (1.25%) for excision. After electrophoresis, the excision step aimed at eliminating the primer dimers and non-specific amplifications. We used the PCR Clean-up Gel Extraction kit (Macherey-Nagel) to purify the excised bands. The 12 pools were quantified using the KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems) taking into account the different fragment length, normalized at 4nM, and pooled in equimolar concentration before loading 14 pM and 5% of PhiX control on a MiSeq flow cell with a 500-cycle Reagent Kit v2 (Illumina).

2.2.4 Taxonomic assignments

First, we used a R pre-processing script (Sow et al. 2019) to merge pair sequences into contigs with FLASH v.1.2.11 (Magoč et Salzberg 2011) and to trim primers with CUTADAPT v.1.9.1 (M. Martin 2011). We then used the FROGS pipeline ('Find Rapidly OTU with Galaxy Solution', Escudié et al., 2018) to create an abundance table for each variant. Briefly, this pipeline enabled to (i) filter sequences by length (+/- 20 bp from the expected length), (ii) cluster in Operational Taxonomic Units (OTUs) the variants using a maximum aggregation distance of one mutation with the SWARM algorithm (Mahé et al. 2014), (iii) remove chimeric variants using VSEARCH with *de novo* UCHIME method (Edgar et al. 2011; Rognes et al. 2016), and (iv) filter by keeping only OTUs present in at least two PCR replicates.

Taxonomic assignments were carried out for each primer set, following different procedures. We used the reference sequences produced to analyse mock community results (see above). This enabled to identify the genuine sequences of the two mock communities (Table S5). With regard to guano samples, we analysed the 16S OTUs using BLASTN (Altschul et al. 1990) and the NCBI Nucleotide database (D. A. Benson et al. 2008). Taxonomic assignments of COI OTUs were made using the NCBI BLAST+ automatic affiliation tool available in the FROGS pipeline, with the Public Record Barcode Database (data related to BOLD database http://v3.boldsystems.org in February 2019, with maximum 1% of N). We determined the final affiliations following the description provided in Appendix S1.

2.3 Statistical analyses

2.3.1 *In silico* data

We tested the effect of the level of primer degeneracy on the mean penalty score and on theoretical amplification success. We used respectively a Poisson and a binomial Generalized Linear Mixed Model (GLMM), with the primer set and the order as random effects.

2.3.2 Mock communities data

We tested the effect of the amplicon length, the level of primer degeneracy and the percentage of bat reads on the percentage of arthropod taxa detected using a binomial Generalized Linear Model (GLM).

2.3.3 Guano samples data

We tested the effect of the amplicon length, the level of primers degeneracy, the total number of reads and the percentage of bat reads on the number of arthropod occurrences using a Poisson GLM. Taxa occurrence was considered instead of the absolute number of taxa in order to take into account the frequency of detection of a particular taxon for each primer set, and to minimize the detection of rare taxa (*i.e.* detected in a single sample).

290 We did not include the 16S primer sets in the *in vivo* statistical analyses (mock communities
291 and guano samples) because of confounding factors (e.g. smaller size of the 16S reference
292 database compared to the COI database).

293

294 **2.3.4 Defining a strategy to determine the best primer set(s) for the study**

295 We developed a multi-criteria table that included criteria for each step of the primer set
296 evaluation (*in silico*, mock community and guano sample analyses). We provided a score for each
297 criteria with regard to the objectives and constraints of our future metabarcoding studies. All
298 criteria are detailed in Table S7.

299

300 # 3 RESULTS

301 ## 3.1 *In silico* evaluation

302 The *in silico* evaluation was performed on 21 arthropod orders (see list in Table S1). We recovered
303 almost fifty times more sequences for the COI (4,259,845 sequences) than for the 16S gene
304 (83651 sequences) using BOLD and NCBI databases. The two orders Dermaptera and Julida, and
305 the four orders Archaeognatha, Dermaptera, Julida and Mecoptera, were respectively excluded
306 from the COI and 16S analyses using *PrimerMiner* because of their insufficient number of OTUs
307 (< 100; Table S1).

The mean penalty scores and the theoretical amplification success varied strongly between primer sets and between arthropod orders (Figure 2, Tables S8 and S9). We found a significant negative influence of the level of primer degeneracy on the mean penalty scores (GLMM, p = 1.01e-12) and a positive influence on the theoretical amplification success (GLMM, p = 2.88e-09) (Table S10). The high mean penalty scores (> 165) and low amplification success (mean < 50%) were observed for the primer sets exhibiting a lack of degeneracy (e.g. mlHCO, Lep1, Zeale and Epp). For example, the mean penalty score of Epp primers was around 12 times higher than the score of its degenerated version Epp-degen.

3.2 *In vivo* evaluation - Mock communities

3.2.1 Sequencing results

DNA quality checks revealed that DNA showed a good integrity for all the taxa considered, except for the Hemiptera-1 (*Uroleucon sp.*) which was degraded (Figure S2). PCR products of the MCs on agarose gels revealed that amplification was homogeneous between primer sets (Figure S2). MiSeq sequencing produced a total of 3,100,343 reads for the two MCs. Removing reads with unexpected length excluded up to 6.3 % of the reads (Hex primer set), removing chimera excluded up to 4.67% of the reads (fwhFol primer set) and removing reads not shared by at least two PCR replicates excluded up to 21.64% of the reads (mlHCO primer set). The remaining reads varied from 168,815 for Hex to 284,216 for Lep1 (Table S11).

3.2.2 Detection of bat DNA

All primer sets amplified less bat DNA (up to 18.36% of the number of reads; replicate 2 of Epp-degen) than expected (50% because arthropod and bat DNA were in equimolar proportions in the $MC_{arthr+bat}$, see Figure S3). Primers with a lack of degeneracy amplified only few reads (Hex, mlHCO and Epp; mean of triplicate < 0.01%) or did not amplify any bat DNA at all (Zeale and Lep1). The degenerated primers fwh2 and MG2-ANML-degen amplified less than 1% of bat reads and fwh1 and MG2fwh less than 5.2%. The best primer sets for the amplification of bat DNA were Epp-degen (mean triplicate 10,17%), fwhFol (mean triplicate 7.53%) and MG2 (mean triplicate 7.43%).

3.2.3 Detection of arthropod taxa

The percentage of arthropod taxa detected in MCs varied from 67% to 100% (see Figure 3 and Figure S4). In the mock community with no bat DNA (MC_{arthr}), only MG2 amplified all arthropod orders in triplicate. Five other primer sets (MG2fwh, MG2-ANML-degen, fwh1, fwh2 and fwhFol) amplified all arthropod orders; however, the taxa with degraded DNA (*Uroleucon sp.* Hemiptera-1) amplified only few reads in two replicates over three. Hex was also among the best primer sets as it amplified all taxa except the degraded Hemiptera-1. Hemiptera-1 was mis-amplified by less than half of the primer sets (only one to three reads were recorded) and not amplified by the others. In accordance with the *in silico* evaluation, mlHCO, Lep1, Zeale and Epp failed to detect an important number of taxa, and Zeale and Lep1 were the less efficient primer sets with respectively eight and 14 taxa not amplified or mis-amplified (two replicates over three). Our

results revealed a positive effect of the COI primers degeneracy level on the percentage of detected taxa in MC_{arthr} (GLM, p = 6.54e-05; Table S10) but no effect of the amplicon length (GLM, p = 0.681; Table S10). The influence of the degeneracy is also illustrated by the two 16S primer sets: Epp mis-amplified or did not amplified five (MC_{arthr}) and six taxa ($MC_{arthr+bat}$), while its degenerated version Epp-degen mis-amplified or did not amplify only two taxa over the 33 of each mock community.

In the mock community with bat DNA ($MC_{arthr+bat}$), four primer sets MG2, MG2-ANML-degen, fwh2 and fwhFol amplified all taxa in triplicates (Figure S4). The primer set fwh1 performed with reduced efficiency as it did not amplify Hemiptera-1 at all. The two primer sets Zeale and Lep1 were still the less efficient ones with respectively eight and 13 taxa that were not amplified or mis-amplified. Our results revealed a positive effect of the level of COI primers degeneracy on the percentage of detected taxa in $MC_{arthr+bat}$ (GLM, p = 0.001; Table S10). We found no effect of the amplicon length (GLM, p = 0.781; Table S10) or of the percentage of bat reads (GLM, p = 0.668; Table S10).

In both MCs, the primer sets that detected the smaller number of taxa also exhibited the largest variation of read number between arthropod taxa and between the observed and expected number of reads (Zeale, Lep1, mlHCO and Epp, Figure S4).

3.2.4 Taxonomic identification of arthropod taxa

The COI primer sets provided identical identification and exhibited only slight differences in taxonomic resolution (Table S12). By contrast, the COI and 16S primer sets often provided different identifications and levels of taxonomic resolution. Identical identifications were found for only eight taxa among the 33 arthropod taxa included in the MCs. The 16S primer sets always reached lower level of taxonomic resolution. The only exceptions were (i) Lepidoptera-2 that was identified at the species level (*Melitae deione*) by the 16S primer sets and at the genus level only by the COI primer sets, and (ii) Psocoptera-2 that was identified at the genus level (*Myopsocus sp.*) by the 16S primer sets and not identified by the COI primer sets.

3.3 *In vivo* evaluation – Guano samples

3.3.1 PCR verification and sequencing results

DNA amplification was relatively homogeneous between primer sets and pellet samples, except for Hex and Lep1 which led to amplification failures and non-specific products (Figure S2). MiSeq sequencing produced a total of 9,190,350 reads. Removing reads with unexpected length excluded 0.52% (Epp-degen) to 10.57% (Lep1) of the reads (except 40.16 % of the reads for Hex). Removing chimera excluded 0.1% (Epp-degen) to 6.42% (mlHCO) of the reads. Removing reads not shared by at least two PCR replicates excluded 0.3% (Epp-degen) to 16.17% (Hex) of the reads (Table S11). Finally, the primer set Hex apart (368,121 reads), the remaining reads varied from 552,914 (Epp-degen primer set) to 808,594 (Zeale primer set).

3.3.2 Detection of bat taxa

Two bat species were mainly identified: *Rhinolophus ferrumequinum* and *Myotis emarginatus*. *R. ferrumequinum* was predominant (mean percentage of reads > 98.9% of all the Chiroptera reads) in ten samples, *M. emarginatus* in eleven samples (mean percentage of reads > 99.2%) and both species were found in high mixed proportions in one sample (mean percentage of *R. ferrumequinum* reads = 84.2% and mean percentage of *M. emarginatus* reads = 15.80%). This sample was discarded from further analyses. For eight primer sets and 12 samples, a mix of *R. ferrumequinum* and *M. emarginatus* reads was also observed but in highly unbalanced proportion, indicating very slight traces of cross-contaminations between pellets from different bat species in the colonies (median of reads contamination < 0.05%, Table S13). Traces of DNA from another bat species, *Myotis myotis*, were also found in three samples by four primer sets (mean of 0.0001% of bat reads; Epp-degen, fwh1, MG2 and MG2fwh). Moreover, some primer sets amplified none of the two bat species (Hex) or only one bat species (Zeale, Lep1) whereas others amplified both bat species (Figure S5). However, the percentage of bat reads in *R. ferrumequinum* pellets was always lower than in *M. emarginatus* pellets, whatever the primer set considered (Figure S5).

3.3.3 Detection of arthropod taxa

We found a negative effect of the amplicon length (p = 0.030) and a positive effect of the number of reads (p = 0.032) on the number of occurrences detected (Table S10). However, the number of

reads was not significant (p = 0.397) when the primer set with the lowest number of reads (Hex) was excluded. The degeneracy level of the primers and the percentage of bat reads had no effect on the number of occurrences detected (p = 0.140 and p = 0.111, respectively).

Taken together, our result showed that the 12 primer sets allowed the identification of 96 occurrences of prey items in the *R. ferrumequinum* samples (10 orders, 32 families, 56 genus and 60 species) and 109 occurrences of prey items in the *M. emarginatus* samples (11 orders, 34 families, 63 genus and 65 species). The 16S primer sets revealed respectively about 30% and 20% of the occurrences in *R. ferrumequinum* and *M. emarginatus* samples (Figure 4A). Only six of the ten COI primer sets allowed the detection of at least 50% of the occurrences of prey items in *R. ferrumequinum* samples and only four in *M. emarginatus* samples (Figure 4A). The other COI primer sets revealed from 31.2% to 49.5% of the total number of occurrences. Zeale primer set revealed the highest number of arthropod occurrences for both bat species (N = 68; 62% of *R. ferrumequinum* occurrences and N= 68, 71% of *M. emarginatus* occurrences); however, it did not allow the amplification and identification of bat species. The optimal primer set that amplified bat DNA and provided the highest number of arthropod occurrences for both bat species was fwh1 (number of occurrence$_{(R.ferrumequinum)}$ = 60; number of occurrence$_{(M.emarginatus)}$ = 62) although MG2 was slightly better than fwh1 for *R. ferrumequinum* samples (number of occurrence$_{(R.ferrumequinum)}$ = 63). The combination of one to four primer sets (Epp-degen, fwh1, MG2 and Zeale) allowed a gain from nine to 18 occurrences in *R. ferrumequinum* samples (89.58% of the occurrences detected by combining all primer sets) and from 20 to 25 occurrences in *M. emarginatus* samples (85.32% of the occurrences detected by combining all primer sets) (Figure

4B). However, one third of all the occurrences corresponded to mis-amplification associated with a low number of reads (amplification in two PCRs out of three, Figure 4B and Figure S6). In *R. ferrumequinum* samples, these unreliable occurrences represented a very low number of reads whatever the primer set considered (median < 39 reads). In *M. emarginatus* samples, these unreliable occurrences also represented a very low number of reads ranging from 5 to 575 (except 4,186 for Zeale) for all primer sets (Figure 4B). The maximum number of unreliable reads was lower in *R. ferrumequinum* than in *M. emarginatus* samples (591 reads, Zeale, Figure 4B). Finally, we observed that 79.3% (*M. emarginatus*) and 86.7% (*R. ferrumequinum*) of the occurrences revealed by only one primer set were unreliable (Figure S6).

3.4 Multi-criteria evaluation of primer sets

Based on the *PrimerMiner* scores of mean penalty and theoretical amplification success, the multi-criteria table enabled to identify seven appropriate primer sets (MG2, MG2fwh, MG2-ANML-degen, fwh1, fwhFol, Hex and Epp-degen), one intermediate (fwh2) and four inefficient primer sets (Lep1, mlHCO, Zeale and Epp) (Table 2). The number of detected taxa (bat and arthropods) and the taxonomic resolution of their identification indicated that six primer sets were equivalent considering mock community results: MG2, MG2fwh, MG2-ANML-degen, fwh1, fwh2 and fwhFol (Table 2). Finally, Zeale was identified as the optimal primer set when bat DNA amplification is not needed, otherwise fwh1 or MG2 primer sets should be selected (Table 2).

4 DISCUSSION

The recent technique of eDNA metabarcoding has proven to be a promising tool for describing biodiversity in a broad array of contexts (Bohmann et al. 2014). Beyond the objectives of scientific quality, the accuracy and completeness of the results gathered by metabarcoding are critical as they are potentially at the core of further management strategies. Previous metabarcoding studies have highlighted how the choice of primer sets may influence the detection of particular arthropod species in diet analyses, and in turn the interpretation of trophic ecology (e.g. for bats, Esnaola et al., 2018).

4.1 Need for primers that identify predator species and discard contaminated samples

The requirement for the molecular identification of predators in insectivorous diet analyses depends on the sampling scheme and on the ecology of these organisms. It is especially important when using environmental samples, such as faecal samples, to ensure that samples correspond to the species of interest and to avoid erroneous assignation of prey (Ware et al. 2019). For example, a metabarcoding study by Forin-Wiart et al. (2018) on cat faecal samples revealed that 2.4% of these later belonged to another predator species. Similarly, Biffi et al. (2017) identified the presence of several host species in 57% of the faecal samples supposed to come from the Pyrenean desman. In the particular case of insectivorous bats, the identification of bat species from guano is critical when guano is collected from under the roost, especially when bat colonies

469 are known to be mixed, whereas it is potentially less important when guano is retrieved from
470 trapped bats, or from mono-specific bat colony. However, even colonies supposed to be mono-
471 specific can be shared by cryptic bat species (Filippi-Codaccioni et al. 2018) or other insectivorous
472 species (e.g. birds). Furthermore, we showed that some of the guano sampled under the roosts
473 of mixed colonies (*R. ferrumequinum* / *M. emarginatus*) are contaminated with excreta from
474 different bat species, including *M. myotis* that are not expected to be present in the studied
475 colony. Hence, in future diet analyses, the simultaneous identification of bat species will enable
476 the presence of unexpected species in the roost to be revealed and also allow guano that is too
477 contaminated to be discarded. It is thus particularly important to ensure that primer sets are able
478 to identify all bat species potentially present in the roosts. Indeed, our results showed that some
479 primer sets do not amplify bat species at all, and that others can only provide bat identification
480 for some of the bat species of interest (one out of three).

481 The simultaneous identification of predator and prey is often avoided in diet analyses as an
482 elevated predator amplification is expected to dampen that of prey (Pompanon et al. 2012;
483 Vestheim et Jarman 2008). Other approaches are applied to ensure that the samples belong to
484 the relevant species, including the diagnostic PCR which is specific for the expected species and/or
485 Sanger sequencing which reveals only the major DNA sequence of the sample (Bohmann et al.
486 2011; Forin-Wiart et al. 2018). However, these alternatives add a supplementary step to the
487 process, thereby increasing the time and cost of the analyses. Most importantly, they do not
488 reveal the presence of non-target predator species, or the rate of between-species contamination
489 of samples which – unlike metabarcoding – prevents contaminated samples being discarded.

Moreover, we have shown that simultaneous predator amplification by metabarcoding does not necessarily lead to a drop in prey detection. Our results revealed that there is no effect of the percentage of bat reads on the percentage of arthropod taxa detected in mock communities, neither on the number of arthropod occurrences in guano samples. This corroborates the results of Galan et al. (2018) which highlighted the well-balanced proportions of reads for bats and their prey with a particular primer sets. We therefore recommend the systematic identification of predator species when working on environmental faecal samples.

4.2 Choosing between the "16S + COI" and "COI alone" strategies

In this study, we have compared primers designed from two mitochondrial genes that are frequently used in eDNA metabarcoding of animals (Deagle et al. 2014): the COI and 16S genes. Our results showed that the 16S primer sets are always less efficient and have lower levels of taxonomic resolution than most of the COI primer sets tested. This was surprising, as for example, the 16S Epp-degen was identified as one of the best primer sets from the *in silico* analysis and we expected a high amplification success due to its short amplicon length and high level of degeneration. In consequence, it is likely that the poor performance of 16S primers revealed from guano analyses is due to the paucity of reference sequences in the 16S database, as has been emphasized in previous studies (Clarke et al., 2014; Elbrecht et al., 2016; Marquina et al., 2019b). This difference in diversity between COI and 16S reference databases could explain the differences in the number of taxa affiliated. Lack of reference sequences could also bias results

510 when analysing short length amplicons. Indeed, as there are less reference sequences, the risk of
511 obtaining an identification with strong confidence levels for the wrong taxa are potentially higher.
512 Moreover, this lack of reference sequences also increases the possibility that 16S affiliations are
513 different from COI ones, therefore leading to false increase in species richness when combining
514 both genes, as it was observed in this study for mock community analyses (Trichoptera-1
515 identified as *Stenophylax vibex* for COI primer sets and *Anabolia bimaculata* for 16S primer sets*;*
516 Table S12). Therefore, the choice of the marker in metabarcoding studies should strongly be
517 guided by the comprehensiveness of the reference database. We advocate for the use of the COI
518 gene in animal metabarcoding studies because of its extensive database. However 16S gene can
519 be used if a sequence database of local species of interest is specifically created (Elbrecht et al.
520 2016).

521

522 **4.3 How many COI primer sets should be used?**

523 To counter the negative effect of primer bias, two main strategies have recently been proposed
524 based on the COI gene. Corse et al. (2019) advocate for the use of multiple primer sets as a key
525 to finely describe species diversity**,** to reveal greater diversity and to decrease false negative
526 results. However, the *in silico* analysis of the three primer sets used in their study showed that
527 they are not degenerated enough to correctly amplify a large spectrum of prey. Nevertheless, the
528 negative effects of primer bias can be reduced by incorporating primer degeneracy and carefully
529 choosing primer sets suited for the targeted ecosystem and taxonomic groups of interest

530 (Elbrecht et al. 2019). In our study no primer set alone was able to detect all occurrences. This
531 was also the case in the very recent primer set comparison of Elbrecht et al. (2019) on a Malaise
532 trap. At first glance, our results show that combining up to four primer sets allows a gain of
533 between 8.5% (Zeale + fwh1) and 17% (Zeale + fwh1 + MG2 + Epp-degen) of arthropod
534 occurrences in *R. ferrumequinum* samples and between 20.8% (Zeale + fwh1) and 26% (Zeale +
535 fwh1 + MG2 + Epp-degen) of arthropod occurrences in *M. emarginatus* samples, therefore
536 advocating for the use of multiple primers. Deciphering between the 'one-locus versus several
537 locus strategies hence relies on the trade-off between on one hand the completeness and on the
538 other hand the cost of combining several primers. However, a mean of 23.8% (*R. ferrumequinum*)
539 and 31.6% (*M. emarginatus*) of these occurrences were characterized by the amplification of only
540 two replicates out of three and a small number of reads (median < 125 reads, except Zeale > 4,000
541 reads in *M. emarginatus* samples). These particular occurrences are the reason why the plateau
542 of taxa occurrence cannot be reached with the combination of a reasonable number of primer
543 sets. These less repeatable occurrences could be due to the weak biomass of prey (low DNA
544 quantity), traces of old meals (degraded DNA, as observed with the Hemiptera-1 of our mock
545 community), traces of secondary predation (e.g. meal of Araneae, the more frequent order in the
546 *M. emarginatus* diet), or environmental contaminations potentially from other bat or
547 insectivorous species. Moreover, 79.3% (*M. emarginatus*) and 86.7% (*R. ferrumequinum*) of the
548 occurrences that were revealed by a single primer set, and therefore that could be interesting to
549 recover by combining several primer sets, are less repeatable between PCR replicates (i.e. only
550 two positive PCRs over three for these taxa; small number of reads). These results bring new

551 insights into the real benefit of attempting to recover all taxa occurrences, in the case where one
552 third of them are less repeatable with regard to PCR replication, and not replicable between
553 primer sets. We therefore recommend the use of a single primer set, following the characteristics
554 described below.

555

556 4.4 What is the best COI primer set for characterizing insectivorous diets?

557 *In silico* and *in vivo* tests have been shown to be complementary and critical for assessing the
558 performance of primers (Alberdi et al. 2018; Corse et al. 2019; Elbrecht et al. 2019). Indeed, in
559 our study combining both *in silico*, mock community and guano analyses enabled us to reveal
560 both the strong and weak points of 12 primer sets for a large spectrum of taxa. DNA quality is not
561 of importance during *in silico* and mock community analyses, so that the amplicon length has no
562 significant effect on the number of arthropod taxa detected, while the degeneracy level of the
563 primers has a major positive effect as it minimizes mismatches for DNA from diverse taxonomic
564 assemblages (Braukmann et al. 2019). On the other hand, when considering DNA from guano
565 samples, amplicon length was the most important factor influencing the success of arthropod
566 detection. Too long amplicons (> 313 bp), such as Hex and fwhFol, were less effective, which could
567 be explained by the low proportion of large size DNA fragments in degraded samples. Therefore,
568 our results strongly supported the use of short length amplicon and degenerated primers to
569 maximize biodiversity coverage in metabarcoding analyses (Elbrecht et al. 2019; Elbrecht et Leese
570 2017; Galan et al. 2018; Vamos, Elbrecht, et Leese 2017).

571 Zeale primer set (Zeale et al. 2011) showed important amplification failure in the *in silico* and
572 mock community analyses but not in the guano analysis. Low taxon recovery of the Zeale primer
573 set has previously been observed for terrestrial arthropods (Brandon-Mong et al. 2015; Clarke et
574 al. 2014; Elbrecht et al. 2019). Zeale primer set seems well suited for detecting Lepidoptera
575 because it has a high taxonomic coverage for this order (Clarke et al. 2014; Zeale et al. 2011). As
576 the diet of European bats is mainly dominated by Lepidoptera and Diptera (Alberdi, Razgour, et
577 al. 2019), the Zeale primer set remains mostly used in insectivorous bat diet studies (e.g. Aizpurua
578 et al., 2018; Andriollo et al., 2019; Clare et al., 2014b; Vesterinen et al., 2018). However, it is not
579 well suited when facing a large spectrum of arthropods. Moreover, it is important to note that
580 the Zeale primer set does not enable to identify bat species. It is thus not recommended in eDNA
581 studies, especially when several insectivorous predator species live on the same sites. Lastly,
582 numerous taxa detected with Zeale primer set are not observed using other primer sets, as noted
583 by Elbrecht et al 2019 who underlined the putative presence of false positive results, or are
584 weakly reliable considering PCR replication results. Therefore, previous results of insectivorous
585 (bat) diet gathered from this primer set only might be affected by the potential biases revealed
586 here.

587 Here, the best primer set identified to characterize simultaneously the diet of *R.*
588 *ferrumequinum* and *M. emarginatus* from guano samples collected under mixed roosts was fwh1
589 (Vamos et al., 2017) (Table 2). The contrasted performances of the primer sets between bat
590 species for arthropod detection highlight the need to test several primer sets on a representative

591 subset of eDNA samples before undergoing large-scale metabarcoding study in order to
592 determine which is the most suitable for the sampling scheme and biological model.

593

594 5 Conclusion

595 Our study supports the importance of combining *in silico*, mock communities and field sample
596 preliminary analyses to determine the benefits and the limits of the potential primer sets before
597 conducting research based on metabarcoding. This three-stage assessment of primer
598 performance confirms that primer success is determined by amplicon length, base degeneracy
599 level and completeness of reference databases. Our work also emphasizes that the identification
600 of the best primer sets for insectivorous diet studies is not only highly dependent on the objective
601 and financial resources of the study, but also on the sampling scheme and fieldwork constraints
602 that impact DNA quality and the need to identify the predator species. Finally, we have evidenced
603 the presence of unreliable occurrences that significantly reduces the benefits of using
604 combinations of primer sets. In conclusion, we advocate for the use of multi-criteria assessment
605 that summarizes all the information required to evaluate primer sets performance to guide the
606 choice of the investigator. This analytical framework can easily be adapted to other
607 metabarcoding studies of predator diet.

608

609

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to A. Cheron, J. Dechartres, M. Dorfiac, Y. Prioul, J.B. Pons and all the people involved in the guano and patagium sampling. We also thank L. Benoit, A. Foucart, L. Soldati, M. Sorel and J-C. Streito for the arthropod sampling and identification, V. Elbrecht for the COI sequence alignments, J-F. Martin for the dual-indices, F. Dorkeld for the *blastn* script used for the 16S taxonomic assignment. Financial support was received from the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR), from the Institut National de la Recherche Agronomique (EFPA department) and the internal funding from the CBGP laboratory. O. Tournayre PhD is funded by the LabEx CeMEB, an ANR "Investissements d'Avenir" program (ANR-10-LABX-04-01). Data used in this work were partly produced through the genotyping and sequencing facilities of ISEM (Institut des Sciences de l’Evolution-Montpellier) and LabEx Centre Méditerraneen Environnement Biodiversité.

DATA ACCESSIBILITY

Supplementary data deposited in Dryad (https://doi.org/10.5061/dryad.4v9n227) include: (i) raw sequence reads (fastq format), (ii) raw abundance tables and (iii) reference sequences of the 33 arthropod taxa and the bat used in the mock communities.

AUTHORS CONTRIBUTION

The study was conceived and designed by M.G., O.T., D.P. and N.C. The sampling schemes were designed by M.L., M.G., O.T., O.F.C., D.P., N.C., and conducted by M.L., O.F.C., O.T. and M.G. Laboratory protocols were designed and performed by M.G. and O.T. S.P., M.G., O.T. and M.T. performed the bioinformatics analyses and O.T. carried out the statistical analyses. A first draft of the manuscript was written by O.T, M.G., D.P. and N.C. All authors contributed to the writing of the final version of this paper.

TABLES

Table 1. Primer sets information. Bases in bold indicate the bases which were degenerated in this study.

	Custom name	Region	Primer names	Sequence 5'-3'	Targeted region length	Amplicon length	References
①	**MG2**	COI	F: MG2-LCO1490	TCHAC**H**AAYCAYAARGAYATYGG	133	185	this study, based on Galan et al. 2018 (Gillet et al. 2015)
			R: MG2-univ-R	AC**Y**AT**R**AA**RA**A**R**AT**TY**ATDAY**R**AADGCRTG			
②	**MG2fwh**	COI	F: MG2-LCO1490	TCHAC**H**AAYCAYAARGAYATYGG	178	221	this study, based on Galan et al. 2018
			R: fwhR1	ARTCARTTWCCRAAHCCHCC			Vamos et al. 2017
③	**MG2-ANMLdegen**	COI	F: MG2-LCO1490	TCHAC**H**AAYCAYAARGAYATYGG	181	224	this study, based on Galan et al. 2018
			R: CO1-CFMR-degen	A**YN**A**R**TCA**R**TT**H**CC**R**AA**H**CC			this study, based on Jusino et al. 2018
④	**fwh1**	COI	F: fwhF1	YTCHACWAAYCAYAARGAYATYGG	178	222	Vamos et al. 2017
			R: fwhR1	ARTCARTTWCCRAAHCCHCC			
⑤	**fwh2**	COI	F: fwhF2	GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC	205	254	Vamos et al. 2017
			R: fwhR2n	GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG			
⑥	**fwhFol**	COI	F: fwhF2	GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC	313	365	Vamos et al. 2017
			R: Fol-degen-rev	TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA			Yu et al. 2012
⑦	**mlHCO**	COI	F: mlCOIintF	GWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	313	364	Leray et al. 2013
			R: HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA			Folmer et al. 1994
⑧	**Lep1**	COI	F: LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	218	265	Brandon-Mong et al. 2015
			R: MLepF1-rev	CGTGGAAAWGCTATATCWGGTG			

⑨ **HEX**	COI	F: HexCOIF4	HCCHGAYATRGCHTTYCC	322	358	Maquina et al. 2018
		R: HexCOIR4	TATDGTRATDGCHCCNGC			
⑩ **Zeale**	COI	F: ZBJ-ArtF1c	AGATATTGGAACWTTATATTTTATTTTTGG	157	211	Zeale et al. 2011
		R: ZBJ-ArtR2c	WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC			
⑪ **Epp-degen**	16S	F: Epp-degen-F	T**R**C**W**AAGGTAGCATAATMA**H**T**W**G	106	148	this study, based on Epp et al. 2012
		R: Epp-degen-R	T**YW**AT**R**GGGTCTT**V**T**Y**GTC			
⑫ **Epp**	16S	F: Coleop_16Sc	TGCAAAGGTAGCATAATMATTAG	106	148	Epp et al. 2012
		R: Coleop_16Sd	TCCATAGGGTCTTCTCGTC			

Table 2. Multi-criteria table indicating the score of each primer set for the three assessment steps performed. Scores range from 1 ("poorly efficient") to 3 ("very efficient"). Criteria are detailed in Table S7.

Analyses	Criteria	MG2	MG2fwh	MG2-ANML-degen	fwh1	fwh2	fwhFol	Lep1	mlHCO	Hex	Zeale	Epp-degen	Epp
In silico	Mean amplification success	3	3	3	3	2	3	1	1	3	1	3	1
	Mean penalty	3	3	3	3	2	3	1	1	3	1	3	1
In vivo – Mock communities	Bat amplification	3	3	3	3	3	3	1	3	1	1	3	2
	Taxa amplification fails	3	3	3	3	3	3	1	3	3	1	3	2
	Resolution at the species level	3	3	3	3	3	3	1	2	2	1	1	1
In vivo - Guano	Bat amplification	3	3	3	3	3	3	2	3	1	1	3	3
	Occurrence of taxa	2	2	2	3	2	1	1	1	1	3	1	1
	Number of orders	2	2	2	2	3	2	1	1	1	3	2	1
	Number of families	2	3	2	3	3	1	2	1	1	3	1	1
	Number of genus	2	2	2	3	2	2	1	2	1	3	1	1
	Number of species	2	2	2	3	2	1	2	1	1	3	1	1
	Resolution at the species level	2	2	2	2	2	1	1	1	1	3	1	1

	Cumulative score	**30**	**31**	**30**	**34**	**30**	**26**	**15**	**20**	**19**	**24**	**23**	**16**

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Visual representation of primer length and position on the COI gene. Primers are represented by a number (see Table 1) and a coloured arrow, with each colour representing a unique primer set. For each primer set, the number on the grey line correspond to the amplicon length. This information is synthetized on the bottom of the figure, with the whole COI Folmer region represented and each primer set indicated with traits of its respective colour.

Figure 2. *In silico* evaluation of arthropod orders represented by at least 100 OTUs using *PrimerMiner*. A) Primer sets performance is shown for each order using pie charts, with green and red colours representing respectively success and failure of amplification. Success of amplification corresponded to *PrimerMiner* mean penalty score < 120 and amplification failure to a mean penalty score >= 120. B) Boxplots of the median of *PrimerMiner* mean penalty scores over all arthropod orders and for each primer set, with mean values represented by a circle within boxplots. C) Percentage of degeneracy level of each primer set.

Figure 3. Representation on a log-scale of the number of reads gathered for each arthropod order with the MG2 and Zeale COI primer sets, and Epp and Epp-degen 16S primer sets, from the three technical replicates of the mock community MC_{arthr}. The blue line indicates the expected number of reads. Each point represents a technical replicate. Yellow bars emphasize situations where only one or two PCR over three amplified. Red bars emphasize situations where none of the replicate amplified.

Figure 4. Occurrences of arthropod prey items detected in guano samples for each primer set and for four combination of primer sets. These later include primer sets that provided the best results in terms of occurrence of arthropod orders. Dashed lines separate the primer sets from the combinations of primer sets. *N* is the number of guano samples analysed for each bat species. A) Occurrences of arthropod orders. Black lines represent 50% of the occurrences (55 occurrences for *M. emarginatus* samples and 48 for *R. ferrumequinum* samples). B) Comparison of the number of occurrences of arthropod orders considering the repeatability of the technical PCR replicates (dark green = occurrences validated in three PCR over three; light green = occurrences validated in two PCR over three). Numbers correspond to the number of reads gathered for each class of occurrence validation (three PCR over three *vs* two PCR over three).

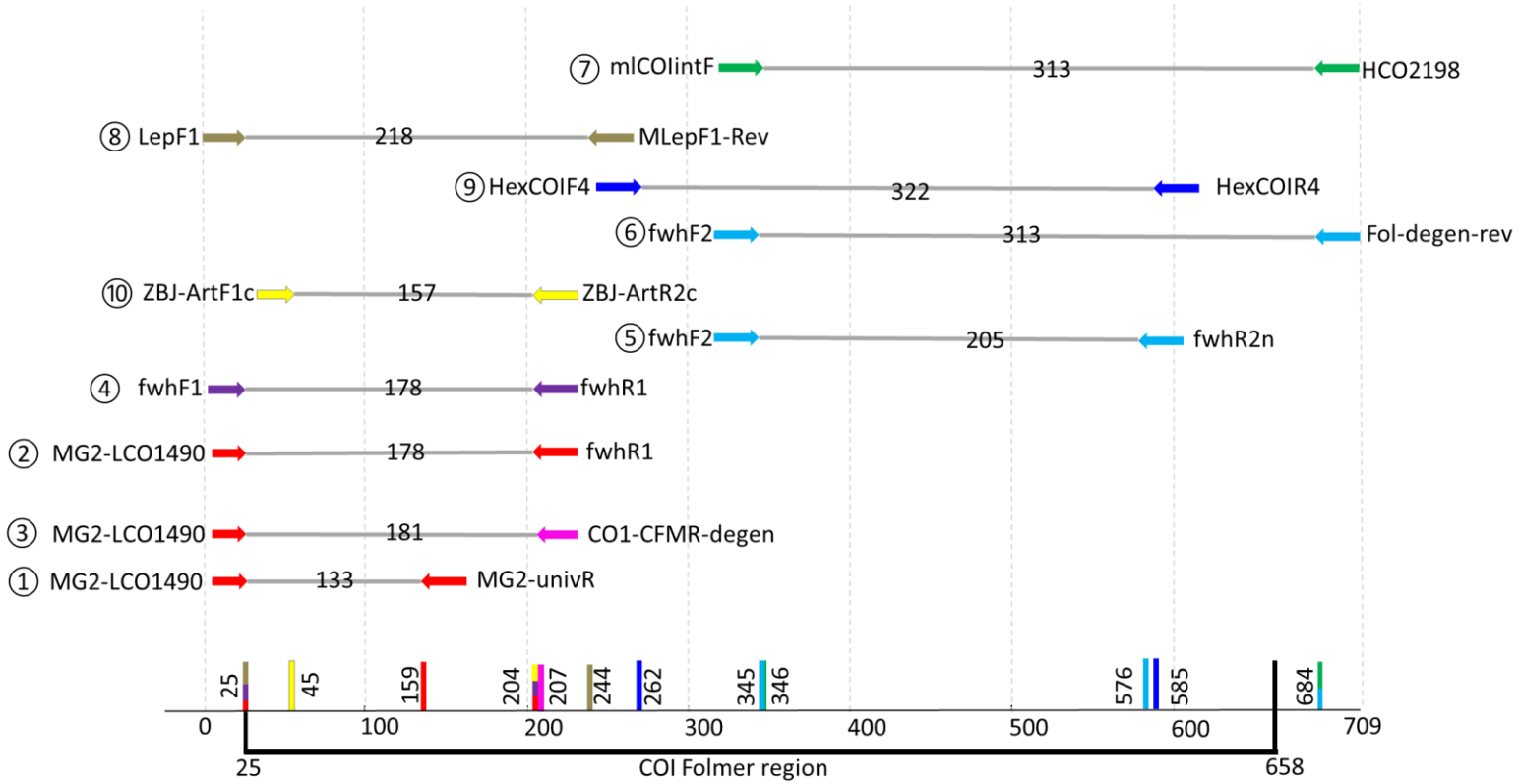


Figure 1. Visual representation of primer length and position on the COI gene. Primers are represented by a number (see Table 1) and a coloured arrow, with each colour representing a unique primer set. For each primer set, the number on the grey line correspond to the amplicon length. This information is synthetized on the bottom of the figure, with the whole COI Folmer region represented and each primer set indicated with traits of its respective colour.

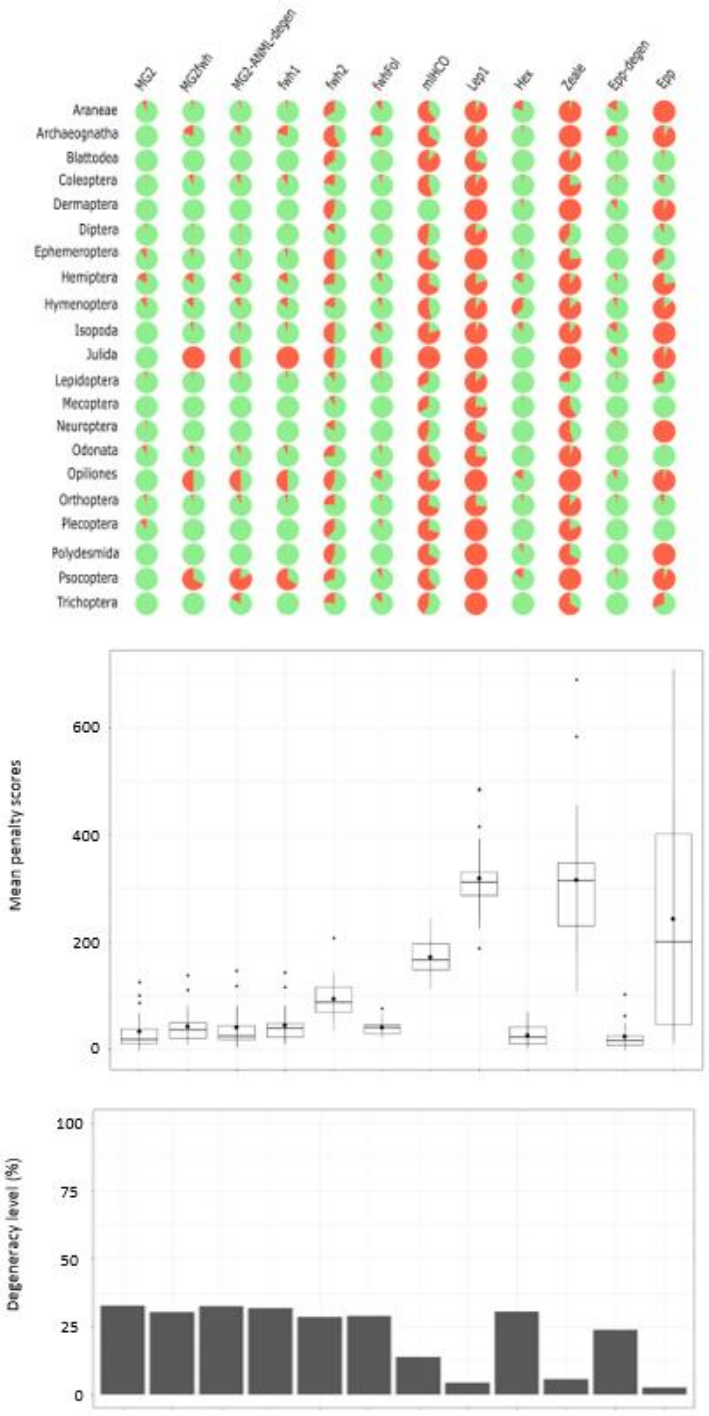


Figure 2. *In silico* evaluation of arthropod orders represented by at least 100 OTUs using *PrimerMiner*. A) Primer sets performance is shown for each order using pie charts, with green and red colours representing respectively success and failure of amplification. Success of amplification corresponded to *PrimerMiner* mean penalty score < 120 and amplification failure to a mean penalty score >= 120. B) Boxplots of the median of *PrimerMiner* mean penalty scores over all arthropod orders and for each primer set, with mean values represented by a circle within boxplots. C) Percentage of degeneracy level of each primer set.

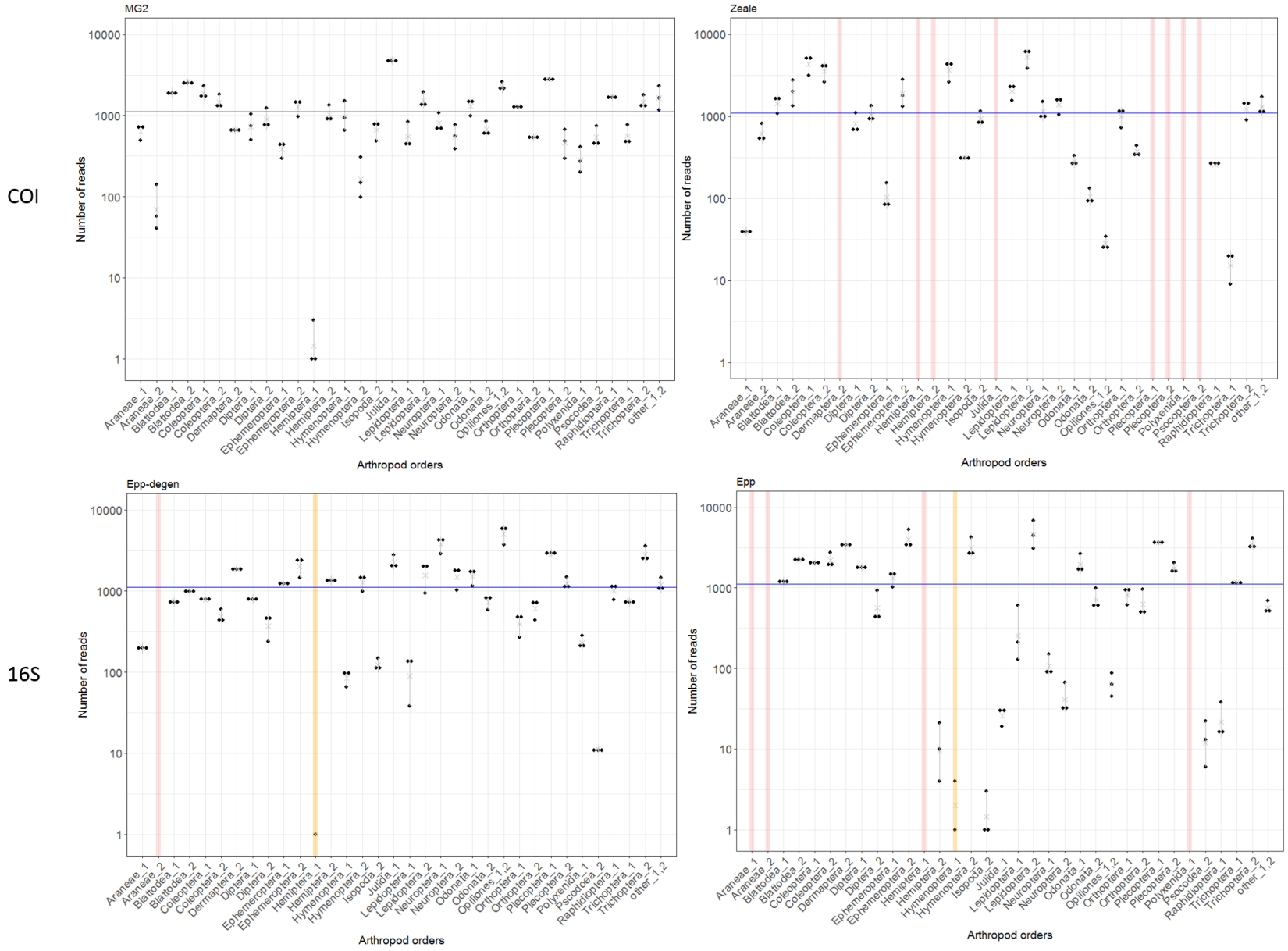


Figure 3. Representation on a log-scale of the number of reads gathered for each arthropod order with the MG2 and Zeale COI primer sets, and Epp and Epp-degen 16S primer sets, from the three technical replicates of the mock community MC_{arthr}. The blue line indicates the expected number of reads. Each point represents a technical replicate. Yellow bars emphasize situations where only one or two PCR over three amplified. Red bars emphasize situations where none of the replicate amplified.

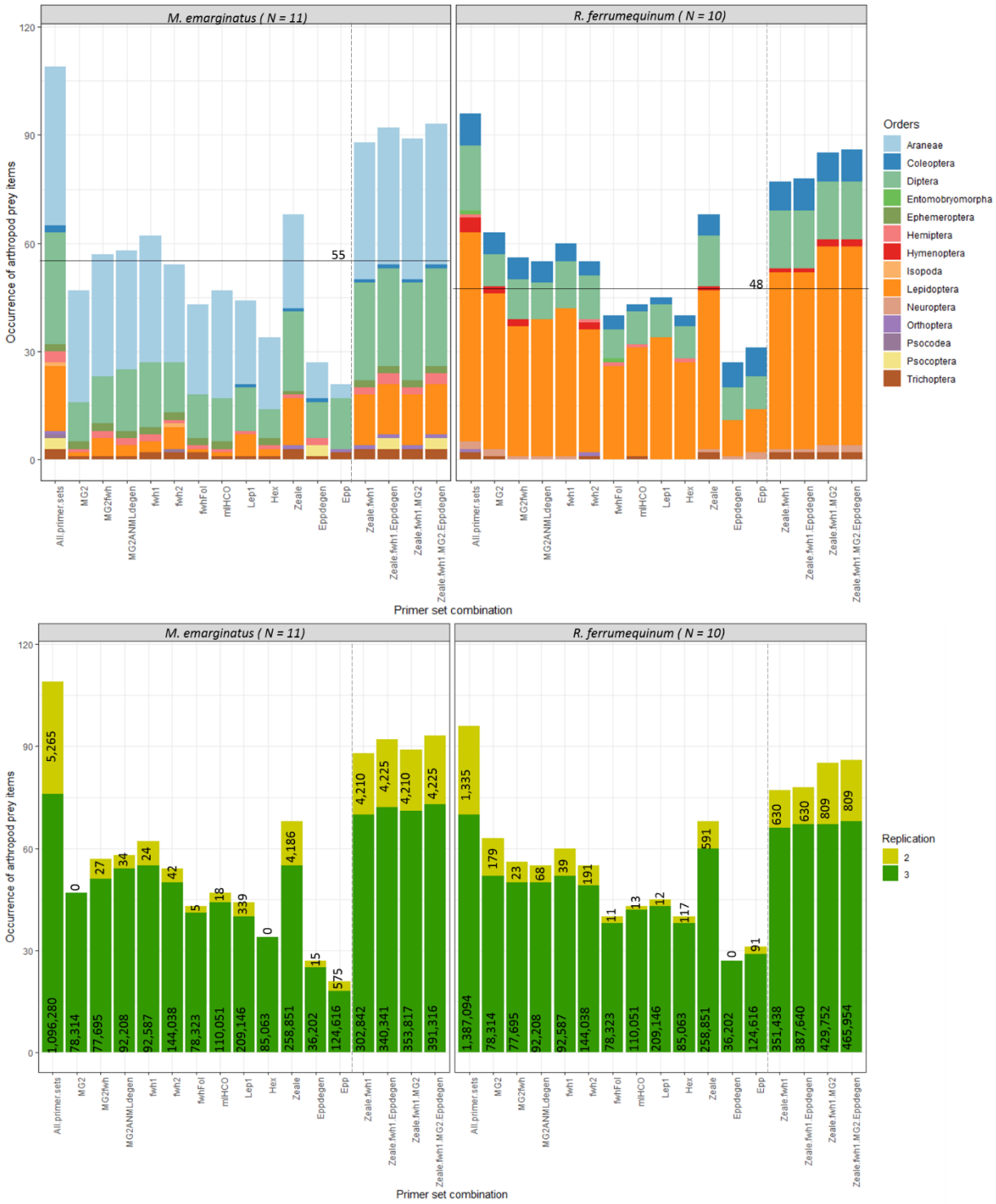


Figure 4. Occurrences of arthropod prey items detected in guano samples for each primer set and for four combination of primer sets. Dashed lines separate the primer sets from the combinations of primer sets. *N* is the number of guano samples analysed for each bat species. A) Occurrences of arthropod orders. Black lines represent 50% of the occurrences (55 occurrences for *M. emarginatus* samples and 48 for *R. ferrumequinum* samples). B) Comparison of the number of occurrences of arthropod orders considering the reliability of the technical PCR replicates (dark green = occurrences validated in three PCR over three; light green = occurrences validated in two PCR over three) for each primer set and four primer set combinations. These later include primer sets that provided the best results in terms of occurrence of arthropod orders. Dashed lines

separate the primer sets from the combinations of primer sets. Numbers correspond to the number of reads gathered for each class of occurrence validation (three PCR over three *vs* two PCR over three).

SUPPORTING INFORMATION

(https://www.biorxiv.org/content/10.1101/742874v1)

Appendix S1. Rules used to determine the final identifications of OTUs in guano samples.

Table S1. Number of COI and 16S OTUs, obtained respectively with sequences from BOLD and NCBI databases.

Table S2. Information about the samples, the laboratory controls and the technical replicates.

Table S3. Versions of the primers used in PCR_1 of the 2-step PCR including heterogeneity spacers and Illumina sequencing primer sequences.

Table S4. Information about the samples, the laboratory controls and the technical replicates. Error-proof indexes for high throughput sequencing were created by Martin (2019).

Table S5. Genuine sequences of the two mock communities. Number of reads are reported for each replicate and each primer set.

Table S6. Examples of affiliation errors for several primer sets in reference databases.

Table S7. Detailed criteria and results for the *in silico* and empirical comparison of the twelve primer sets.

Table S8. Mean penalty scores obtained for each arthropod order (OTUs > 100) with each primer set using *PrimerMiner* program.

Table S9. *In silico* amplification success obtained for each arthropod order (OTUs > 100) and primer set using *PrimerMiner* program.

Table S10. Effect of the primer set characteristics on the *in silico* amplification success and mean penalty score, the detection of mock community taxa and the detection of arthropod occurrences in guano samples. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

Table S11. Objectives and impact of the pre-process and FROGS pipelines on the number of reads. ¶ 'Complete run ' indicates that the run included other samples than those of the two mock communities. ¥ = genuine sequences, † = identity > 97% and coverage > 90%, ‡ identity < 97% and/or coverage <90%.

Table S12. Molecular identification of the taxa in the mock communities obtained using the genuine sequences of each specimen. '<97%' indicated a percentage of identity lower than 97%.

Table S13. Percentage of each bat species in mixed samples. Rf = *R. ferrumequinum*, Me = *M. emarginatus*.

Figure S1. Consensus sequence alignment of 21 arthropod orders using the *PrimerMiner* R package.

Figure S2. PCR products of the mock communities (left column) and guano samples (right column) on agarose gel.

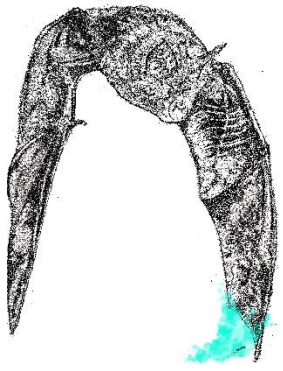
Figure S3. Percentage of bat reads for each primer set in the mock community $MC_{arthr+bat}$. The red line indicated the expected value for percentage of bat reads (50%).

Figure S4. Representation on a log-scale of the number of reads gathered for each arthropod order with the 12 primer sets, from the three technical replicates of the mock community MC_{arthr} and $MC_{arthr+bat}$. The blue line indicates the expected number of reads. Each point represents a technical replicate. Yellow bars emphasize situations where only one or two PCR over three amplified. Red bars emphasize situations where none of the replicate amplified.

Figure S5. Percentage of bat reads gathered in the guano samples (N_{Rf} = 10, N_{Me}=11) for each primer set. Me = *Myotis emarginatus*, Rf = *Rhinolophus ferrumequinum.*

Figure S6. Occurrences of taxa in *M. emarginatus* samples (*N* = 11) and *R. ferrumequinum* (*N* = 10) not shared between primer sets, or shared by at least one COI primer set and one 16S primer set, or shared by at least two COI primer sets. Number of PCR replicates: '2' (light green) = occurrence in two PCR over three, '3' (green) = occurrence in three PCR over three.

CHAPITRE III. Variation spatio-temporelle du régime alimentaire du Grand rhinolophe en Poitou-Charentes



Article 6. Spatio-temporal variation of the greater horseshoe bat diet in Western France

En préparation

1. Introduction

1.1. Régime alimentaire et biologie de la conservation

Les ressources alimentaires constituent un facteur majeur de la croissance, de la reproduction et de la survie des individus (Perrig et al. 2017; Yuan et al. 2018; Brodmann et al. 1997; Andersen, Færøvig, et Hessen 2007; Arnott, Brand, et Kos 1986). Outre une disponibilité insuffisante, des ressources alimentaires de moins bonne qualité peuvent être à l'origine d'une croissance réduite des juvéniles (Stephens, Berven, et Tiegs 2013) ou d'une réponse immunitaire moins efficace face à un parasite ou une maladie (Pap et al. 2009; Vass et Nappi 1998). En conséquence de nombreuses études montrent des liens entre les ressources alimentaire et la valeur sélective des individus (ex : Sorensen et al. 2009; Serrano-Davies et Sanz 2017) ou la viabilité des populations (ex : Taylor et Schultz 2008). De plus certaines caractéristiques du régime alimentaire des espèces favorisent leur risque d'extinction. Il s'agit par exemple d'un niveau trophique élevé qui expose les espèces aux effets cumulatifs des perturbations le long de la chaine alimentaire (Purvis et al. 2000; Careddu et al. 2015; Mann 2011). Une niche trophique (gamme des proies possibles) étroite et spécialisée peut augmenter également la vulnérabilité des espèces en cas de déclin des populations de proies (Pratchett, Wilson, et Baird 2006; Brooker et al. 2014). Les ressources alimentaires constituent donc une composante importante à prendre en compte en biologie de la conservation pour déterminer la vulnérabilité d'une espèce ou d'une population. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces insectivores. A cause de l'utilisation massive de pesticides ces dernières décennies la biodiversité et la biomasse des arthropodes ont été fortement diminuées, ce qui rend les espèces insectivores potentiellement très vulnérables (Hallmann et al. 2017; Mesléard et al. 2005; Wickramasinghe et al. 2004; Strong et al. 1996).

1.2. Le régime alimentaire, un élément clé pour les chauves-souris

La connaissance du régime alimentaire est particulièrement importante pour la conservation des chauves-souris car les proies ingérées doivent leur permettre de couvrir leurs forts besoins énergétiques requis pour voler, hiberner et s'occuper de leur progéniture. Chez les chauves-souris insectivores, chaque individu peut ainsi consommer entre 20 et 40% de son poids en insectes chaque nuit (Kunz et al. 2011), et en période de lactation la consommation peut atteindre plus de 70% comme c'est le cas pour les femelles Molosses du Brésil (*Tadarida brasiliensis*) (Kunz, Whitaker, and Wadanoli 1995). La qualité du régime alimentaire est également importante par rapport à ces forts besoins énergétiques. Par exemple, la teneur d'un insecte en acide gras ou en calcium est un critère de qualité de proies important car les acides gras permettent de faire des réserves de graisse pour l'hiver et le calcium participe à la production de lait (ex : Sérotine brune *Eptesicus fuscus*, Clare, Symondson, and Fenton 2014; Agosta, Morton, and Kuhn 2003). Une étude réalisée par Levin, Yom-Tov, and Barnea (2009) a montré que la période de lactation des femelles de Grand rhinopome (*Rhinopoma microphyllum*) est synchronisée avec la période des vols nuptiaux de fourmis riches en graisse et protéines (*Camponotus sp.*) dont elles se nourrissent alors quasi exclusivement (90% du régime alimentaire). Les besoins et dépenses énergétiques des chauves-souris varient avec leurs états physiologiques et notamment la gestation et l'allaitement (Kunz 1974). Les besoins énergétiques accrus des femelles en gestation, allaitantes ou en pré-torpeur hivernale sont généralement compensés par une augmentation de la prise alimentaire (Speakman et Rowland 1999; Kurta et al. 1989). Kunz, Whitaker, et Wadanoli (1995) ont montré que les taux d'alimentation représentent respectivement en moyenne 39% et 73% de la masse corporelle d'une femelle entre le début et le milieu de la période de lactation. Ces variations d'utilisation

des ressources peuvent aussi être liées à des changements dans leur aptitude à chasser (ex : juvénile *vs* adulte ; Rolseth, Koehler, et Barclay 1994; Salsamendi et al. 2008) et de changements de disponibilité en ressources alimentaires (ex. fluctuations saisonnières ; Wang et al. 2010). Quelques études ont déjà montré que le régime alimentaire des espèces de chauve-souris est fortement influencé par la saison. Par exemple, en Suisse, il existe un pic de richesse de proies dans les fèces d'Oreillard roux (*Plecotus auritus*) pendant l'été quand les femelles élèvent les jeunes (Andriollo et al. 2019). Celles-ci, subissant de fortes contraintes énergétiques, pourraient être potentiellement plus opportunistes, ce qui conduirait à un régime alimentaire plus diversifié. Le paysage est également une composante importante du régime alimentaire des chauves-souris (Wickramasinghe et al. 2003). En effet, le paysage restreint leurs activités de chasse : par exemple, le Rhinolophe euryale (*Rhinolophus euryale*) ne chasse qu'en bordure des forêts de feuillus et des haies (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015). Une disparition des éléments clés du paysage de chasse pourrait donc menacer ces chauves-souris. Une connaissance approfondie du régime alimentaire et de sa variation est donc nécessaire pour identifier les proies importantes pour les chauves-souris aux périodes clés de leur cycle de vie, ainsi que pour déterminer les paysages requis pour que les chauves-souris puissent avoir accès à ces proies dans leur rayon de chasse (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015).

Malgré les fortes contraintes qui semblent façonner la composition du régime alimentaire des chauves-souris insectivores, il existe une grande diversité de stratégies depuis les espèces spécialistes jusqu'aux espèces très généralistes. Par exemple l'Oreillard montagnard (*Plecotus macrobullaris*) se nourrit quasi-exclusivement de lépidoptères (97.8% ; Alberdi et al. 2012) tandis que la Sérotine brune (*Eptesicus fuscus*) possède un régime alimentaire plus diversifié (lépidoptères, coléoptères, éphéméroptères ; Clare, Symondson, et Fenton 2014). Les espèces

qualifiées de généralistes peuvent cependant montrer des préférences envers certaines proies (ex: *Myotis daubentonii*; Vesterinen et al. 2016) et être particulièrement sélectives lorsque leurs proies favorites sont disponibles dans l'environnement (ex: *Eptesicus fuscus*; Agosta, Morton, et Kuhn 2003). Plus restreintes dans leur gamme de proies potentielles, les espèces spécialistes pourraient être plus vulnérables par rapport aux changements globaux qui affectent les insectes. Ainsi, la réduction des populations de lépidoptères (principalement due aux changements de pratiques agricoles et à l'expansion des zones urbaines) pourrait avoir affecté la survie et la reproduction de la Barbastelle commune (*Barbastella barbastellus*), qui est spécialisée sur ces insectes (Sierro et Arlettaz 1997; Warren et Bourn 2011; Rydell et al. 1996) et est en déclin dans l'Ouest de l'Europe (IUCN 2019).

Face aux pressions anthropiques, une plasticité du régime alimentaire pourrait permettre un déplacement du régime alimentaire vers d'autres espèces d'insectes disponibles dans le milieu et éviter ainsi l'effondrement des colonies de chauves-souris. Cette question reste à ce jour peu abordée, notamment à cause de l'accès limité à la diversité des proies par analyses microscopiques des fèces (Nielsen et al. 2018). En effet, le régime alimentaire décrit par les études microscopiques des fragments durs d'arthropodes n'a pas une résolution taxonomique fine (à l'ordre ou à la famille, très rarement à l'espèce) et n'est pas exhaustive puisque les parties molles des individus sont digérées - donc inaccessibles à l'observateur - et les parties trop endommagées ne sont pas identifiables (Clare et al. 2009). Il est donc possible que ces études donnent une image en partie erronée, biaisée ou incomplète de la complexité du régime alimentaire des chiroptères insectivores.

1.3. Le Grand rhinolophe : un généraliste sélectif

Le Grand rhinolophe est un modèle biologique intéressant pour étudier cette question de la plasticité du régime alimentaire des chiroptères car c'est à la fois une espèce généraliste et capable de sélectionner ses proies (Koselj, Schnitzler, et Siemers 2011).

Des études basées sur l'analyse morphologique des proies contenues dans des fèces récoltés sous des colonies de Grand rhinolophe, principalement en Grande-Bretagne, montrent que celui-ci se nourrit majoritairement de grands papillons nocturnes, de coléoptères pour la plupart associés aux bouses et de diptères (Jones 1990; Flanders and Jones 2009). L'utilisation de pesticides et de traitements antiparasitaires du bétail pourrait donc mener à l'accumulation de polluants par les chauves-souris et à la diminution de ses proies principales. Ces études montrent également que la proportion de chaque ordre de proies dans les fèces varie dans l'année et au cours de la saison et que le Grand rhinolophe chasse préférentiellement les papillons lorsque ceux-ci sont abondants et est moins sélectif lorsqu'ils sont plus rares (Ransome 1996; Boireau 2007; Jones 1990). La sélection de proies chez cette espèce de chauve-souris serait liée à la structure de ses cris d'écholocation (FC, Fréquence constante), qui le rendraient capable de discriminer les taxons d'insectes sur la base des fréquences de leurs battements d'ailes (von der Emde et Menne 1989; Koselj, Schnitzler, et Siemers 2011). La technique de chasse des Grands rhinolophes varie selon l'heure de la nuit et en fonction de la densité d'insectes : ils pratiquent une chasse active quand les proies sont abondantes mais lorsque les températures sont basses et les densités d'insectes faibles, ils chassent plutôt à l'affût (Billington et Rawlinson 2006; Jones et Rayner 1989; Boireau 2007). Le paysage joue un rôle primordial dans l'activité de chasse de cette espèce très sensible à la structure paysagère qui entoure la colonie, notamment les éléments naturels et semi-naturels, tels que les haies et les forêts, qui connectent les zones de chasse aux colonies

(Froidevaux et al. 2017; Pinaud et al. 2018). Ces linéaires boisés apportent un repère acoustique pour les déplacements, une protection contre le vent et les prédateurs, et une grande concentration et diversité d'insectes (Verboom et Spoelstra 1999; Lewis 1969; Forman et Baudry 1984; Holland et Fahrig 2000). D'après les études acoustiques par radiopistage menées sur cette espèce, les boisements de feuillus et les pâtures constituent des zones de chasse préférentielles, riches en insectes notamment grâce au bétail et à une modification réduite du sol (Flanders et Jones 2009; Jones 1990; Dietz, Pir, et Hillen 2013).

La question de la plasticité du régime alimentaire de cette espèce est donc très intéressante à aborder car bien qu'elle soit généraliste, elle montre une forte sélection de proies et est très contrainte par le paysage environnant pour chasser. A ce jour seulement trois études basées sur des analyses moléculaires décrivent le régime alimentaire du Grand rhinolophe (deux en France, une au Pays Basque espagnol). Les deux premières - issues de cette thèse - sont des études méthodologiques qui visent à mettre au point une approche de metabarcoding adaptée à une collecte non invasive des échantillons de guano dans des colonies potentiellement mixtes. Ces études n'ont pas été conçues pour répondre à des questions d'écologie (échantillonnage non robuste). Une troisième étude, réalisée au Nord de la Péninsule ibérique par Aldasoro et al. (2019), vise à déterminer le chevauchement des régimes alimentaires de trois espèces du genre *Rhinolophus*, dont *R. ferrumequinum*. Les trois études montrent qu'à l'ordre, les résultats sont globalement en accord avec les analyses microscopiques. Malheureusement ces études moléculaires n'abordent pas la question de la plasticité du régime alimentaire du Grand rhinolophe.

1.4. Objectifs et hypothèses

Notre objectif principal est d'analyser la composition et la plasticité du régime alimentaire du Grand rhinolophe dans l'espace, par le choix de paysages contrastés où la surface d'habitats présumés favorables est plus ou moins importante, et dans le temps au cours de la saison de maternité qui induit des changements physiologiques et des besoins énergétiques forts chez les femelles. En termes de conservation, l'objectif est ainsi de déterminer au travers du spectre des proies du Grand rhinolophe, si nous pouvons identifier des paysages à conserver en priorité pour préserver les ressources clés de cette espèce.

Nous nous attendons à une variation spatiale du régime alimentaire en fonction de la qualité du paysage environnant la colonie. D'après Emlen (1966), le prédateur devrait être plus sélectif lorsque les proies sont abondantes et moins sélectif lorsqu'elles sont plus rares. Une colonie entourée de forêts, haies et prairies permanentes constituerait un environnement favorable (Froidevaux et al. 2017; Flanders et Jones 2009) qui permettrait au Grand rhinolophe d'être plus sélectif sur ses proies (diversité du régime alimentaire plus faible, choix de proies de meilleure qualité). A l'inverse nous nous attendons à ce qu'un paysage moins favorable (proies moins abondantes, de moins bonne qualité, moins de linéaires pour chasser) favorise l'ingestion opportuniste de proies (diversité du régime alimentaire plus élevée). Enfin, nous nous attendons également à une variation du régime alimentaire au cours de la saison de maternité, malgré les forts besoins énergétiques des femelles durant cette période (gestation, lactation, stockage de graisses avant l'hiver). En effet des variations estivales pourraient être induites par des changements de capacité de chasse des femelles (plus faibles pendant la gestation et les deux premières semaines d'élevage), et / ou une diminution des proies disponibles en fin d'été. Ces deux facteurs pourraient diminuer la sélectivité des Grands rhinolophes en début et fin de saison de maternité.

Pour tester ces hypothèses, nous avons appliqué une méthode moléculaire de metabarcoding à des centaines de guanos prélevés tout au long de la saison de maternité dans sept colonies de maternité du Grand rhinolophe, en Poitou-Charentes, une région très agricole (Nouvelle-Aquitaine : 46.77% de surfaces agricoles en 2017) avec des paysages plus ou moins bocagers.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

L'échantillonnage consiste en des collectes bimensuelles de 95 guanos individuels par colonie, réalisées entre mai et septembre 2018 par les partenaires de l'association Poitou-Charentes Nature, au sein de sept colonies de mise-bas mixtes Grand rhinolophe/Murin à oreilles échancrées en Poitou-Charentes (Figure 33). Ces colonies ont été choisies selon plusieurs critères et contraintes logistiques (autorisation des propriétaires et facilité d'accès pour limiter le dérangement des chauves-souris). Le Grand rhinolophe se déplace en moyenne entre 2,5 et 5 km de sa colonie pour se nourrir (Flanders et Jones 2009; Dietz, Pir, et Hillen 2013b), nous avons donc choisi des colonies éloignées d'au minimum 10 km. Pour cette première étude, nous avons sélectionné trois pas temporels qui coïncident avec les périodes de gestation (fin-mai à mi-juin), lactation (mi-juillet à fin juillet) et post-lactation (mi-aout à fin août). Au total 1995 échantillons, appartenant sans *a priori* au Grand rhinolophe ou au Murin à oreilles échancrées, ont été traités.

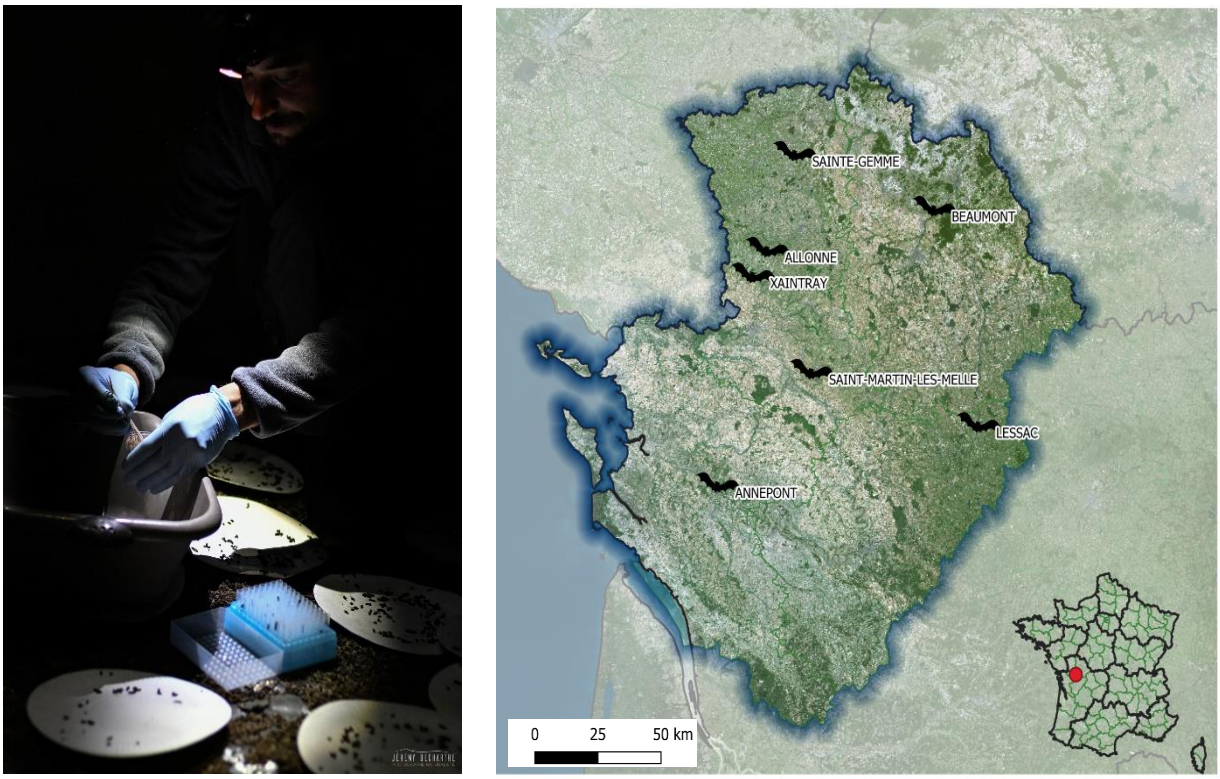


Figure 33. Echantillonnage des guanos sous une colonie (à gauche ; ©J. Dechartre) et cartographie des sept colonies échantillonnées en Poitou-Charentes (à droite ; IGN BD ORTHO 2016).

2.2. Caractérisation paysagère des colonies

Les variables paysagères ont été extraites autour des colonies pour une zone tampon d'un rayon de 7 km, qui correspond à la distance de chasse maximale des femelles de Grand rhinolophe en période d'allaitement (Pinaud et al. 2018). Les données de végétation proviennent de la base BDTopo de l'IGN (version 2018) et les données de cultures agricoles de la base du Registre Parcellaire Graphique (RPG ; occupation du sol en 2017). Les proportions de surface des catégories "Bois", "Forêt fermée de conifères", "Forêt fermée de feuillus" et "Forêt fermée mixte" de la BDTopo végétation ont été regroupées pour former la variable "Forêt fermée". Les proportions de haie correspondent à la somme des surfaces en haies autour des colonies. Pour les cultures RPG, les catégories "Prairie permanente - herbe prédominante (ressources fourragères ligneuses absentes ou peu présentes)" (code PPH) et

"Prairie en rotation longue (6 ans ou plus)" (PRL) ont été regroupées pour former la variable "Prairies permanentes" et les catégories "Autre prairie temporaire de 5 ans ou moins" (PTR) et "Ray-grass de 5 ans ou moins" (RGA) ont été regroupées pour former la variable "Prairies temporaires". Les opérations spatiales sur les entités géographiques ont été réalisées à l'aide du Système d'Information Géographique QGIS 3.4.6 (QGIS Development Team 2019). Nous avons ensuite réalisé une Analyse en Composantes Principales (ACP) pour caractériser le paysage des colonies à l'aide du package R *FactoMineR* (Lê, Josse, et Husson 2008). Le paysage de chaque colonie est décrit selon les coordonnées des colonies sur les axes principaux de l'ACP.

2.3. Analyses moléculaires, bio-informatiques et pré-traitement des données

Sur la base de l'étude de Tournayre et al. (soumis), le couple d'amorces choisi pour cette étude est fwh1 (Vamos, Elbrecht, et Leese 2017). Nous avons appliqué les protocoles de biologie moléculaire et de traitements bio-informatiques décrits dans Tournayre et al. (soumis). Une étape de déchimérisation supplémentaire - script R écrit par S. Piry (INRA, CBGP) et L. Benoît (CIRAD, CBGP) faisant appel à l'outil *isBimeraDenovo* du programme *dada2* (Callahan et al. 2016) - a été ajoutée suite à l'observation de chimères non détectées lors de l'exécution du pipeline FROGS (*Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution*, Escudié et al. 2018). Seuls les occurrences de proies répétables entre les trois réplicas techniques ont été conservés pour les analyses. Chaque guano a été attribué à une espèce de prédateur vertébré grâce à l'amplification des séquences du prédateur. Un critère de confiance a été attribué aux proies selon Galan et al. (2018). Les espèces d'arthropodes non référencées en Europe d'après Fauna Europea (Jong et al. 2014) et l'INPN (Muséum national d'Histoire naturelle, 2003), et les

espèces microscopiques (ex : Macrochelidae, Uropodidae, Cheyletidae) ont été écartées du jeu de données. Seuls les échantillons de Grand rhinolophe non contaminés par d'autres espèces de vertébrés (oiseaux, rongeurs, chauve-souris) ont été conservés pour les analyses de régime alimentaire.

2.4. Identification moléculaire et description des proies du Grand rhinolophe

2.4.1. Diversité taxonomique des proies détectées

Nous avons détaillé les proies de Grand rhinolophe avec une représentation hiérarchique de Krona qui tient compte de la taxonomie et de la fréquence des taxons dans le jeu de données (Ondov, Bergman, et Phillippy 2011). Nous avons également identifié les proies assignées à l'espèce qualifiées comme ravageurs selon la base de données Arthemis (http://arthemisdb.supagro.inra.fr/). Cette base de données, en constante évolution, contient 2185 espèces d'insectes répertoriés en tant que ravageurs à la date d'extraction (04/10/19 par E. Pierre - INRA). En l'absence de données plus précises sur ces insectes et sur les cultures dans la zone d'étude (méthodes culturales, choix variétaux, protections phytosanitaires etc.), nous n'avons pas distingué les différentes classifications de ravageurs.

2.4.2. Nombre de proies par guano

Nous avons vérifié que l'effort de séquençage (nombre de séquences / guano) était suffisant pour décrire la diversité de proies contenues dans les guanos étudiés à l'aide du package R *hilldiv* (Alberdi et Gilbert 2019).

Nous avons ensuite testé l'effet du mois d'échantillonnage, du paysage (Axe 1 et 2 de l'ACP) sur le nombre de taxons détectés par guano à l'aide d'un GLM de famille d'erreur quasi-Poisson qui prend en compte la sur-dispersion des données.

2.4.3. Validation de la stratégie d'échantillonnage

Nous avons réalisé des courbes d'accumulation par colonie et date pour visualiser si le nombre de guanos est suffisant pour décrire la diversité du régime alimentaire (1000 tirages aléatoires sans remise en jeu). Cette analyse a été réalisée à différents rangs taxonomiques, de l'espèce à l'ordre.

2.4.4. Relation nombre de séquences - occurrences

Nous avons ensuite réalisé pour chaque colonie-mois une courbe de la fréquence moyenne des séquences en fonction de l'occurrence des proies quand elles sont détectées, afin d'identifier d'éventuels groupes de taxons peu occurrents et/ou mal amplifiés. D'après Tournayre et al. (soumis), la présence de ces proies mal amplifiées, et plus ou moins spécifiques au couple d'amorces utilisé, pourrait être une source importante de bruit dans les données.

2.4.5. Analyses de la diversité alpha et beta du régime alimentaire

L'ensemble des analyses de diversité ont été réalisées sur le jeu de données complet et sur un jeu de données réduit composé seulement des espèces les plus présentes (fréquences d'occurrence > 5% sur l'ensemble des données) pour faire abstraction des proies très rares et

mal amplifiées dont la détection est fortement soumise à la stochasticité. Cette double analyse permet également d'inférer l'influence des proies rarement ingérées sur la variation spatio-temporelle du régime alimentaire.

La diversité alpha (diversité locale) et la diversité beta (dissimilarité entre colonies) ont été estimées à chaque rang taxonomique (ordre, famille, genre, espèce) des proies avec les indices de Hill, à l'aide du package *hilldiv*, pour des valeurs du paramètre *q* égales à 0 (richesse spécifique locale) et 1 (exponentielle de l'indice de Shannon). Lorsque *q* = 0, on favorise les espèces rares en donnant le même poids aux proies rares et abondantes et lorsque *q* = 1 on donne du poids aux taxa selon leur fréquence sans favoriser ni les rares ni les abondants. Les effets du paysage (coordonnées des colonies sur les axes x et y de l'ACP) et du mois d'échantillonnage sur la diversité alpha ont été testés à l'aide d'un modèle linéaire généralisé (GLM) de famille d'erreur Poisson (pour *q* = 0) et quasi-Poisson (pour *q* = 1). Puisque nous avons réalisé deux fois (*q* = 0 et *q* = 1) chacun des quatre modèles (à l'ordre, à la famille, au genre et à l'espèce) nous avons corrigé les *p*-values de ces modèles à l'aide de la correction pour tests multiples FDR (False Discovery Rate FDR ; Benjamini & Hochberg, 1995). Le seuil de significativité après correction FDR (*p critical*) a été calculé d'après Castro & Singer (2006).

La dissimilarité des régimes alimentaires (diversité beta ; indice de Bray-Curtis qui tient compte de l'abondance des proies dans le jeu de données) entre colonies et mois d'échantillonnage est décrite par des histogrammes cumulés réalisés avec le package R *ggplot2* (Wickham 2016) puis testée à l'ordre, à la famille, au genre et à l'espèce par perMANOVA (999 permutations) avec la fonction *adonis* (*Analysis of variance using distance matrices*) du package *vegan* (Oksanen et al. 2019). L'homogénéité des variances a été contrôlée à l'aide de la fonction *betadisper* du même package. Puisque nous avons réalisé

deux fois (jeu de données complet et réduit) chacune des analyses (à l'ordre, à la famille, au genre et à l'espèce) nous avons corrigé les p-values de ces modèles à l'aide de la correction pour tests multiples FDR (False Discovery Rate FDR ; Benjamini & Hochberg, 1995). Les dissimilarités de régime alimentaire ont ensuite été visualisées avec des analyses multivariées non métriques (NMDS) avec la fonction *metaMDS* du package *vegan* (try = 20, trymax = 5000). La qualité de la solution trouvée a été évaluée à l'aide de la valeur de stress. Si le stress < 0.05 alors la solution trouvée pourvoit une très bonne représentation et si le stress > 0.2 la représentation est mauvaise (Kruskal 1964).

Enfin, nous avons voulu étudier la relation entre les dissimilarités de régime alimentaire et de paysage. Pour cela, pour chaque rang taxonomique (ordre, famille, genre, espèce), nous avons réalisé des tests de Mantel (permutation = 999) entre la matrice de dissimilarité du régime alimentaire (indice de Bray-Curtis) et la matrice de dissimilarité paysagère. Les p-values de ces modèles ont été corrigées à l'aide de la correction pour tests multiples FDR (False Discovery Rate FDR ; Benjamini & Hochberg, 1995).

3. Résultats

3.1. Caractérisation paysagère des colonies

Les deux premiers axes de l'ACP expliquent 77.73% (respectivement 54.74% et 22.99%) de l'inertie totale. Les trois autres axes n'expliquent pas de part significative de l'inertie totale des données. L'axe 1 discrimine les colonies entourées de paysages très boisés (Beaumont, Annepont) des colonies situées dans de paysages plus ouverts (Lessac, Sainte-Gemme, Xaintray et Allonne) (Figure 34). L'axe 2 discrimine plus faiblement les colonies, et oppose

principalement la colonie Lessac (présence importante de prairies temporaires) aux autres colonies. La colonie de Saint-Martin-les-Melle n'a pas été inclut dans cette analyse car le nombre d'échantillons obtenus pour cette colonie était trop faible (voir détails dans la partie 3.2.b).

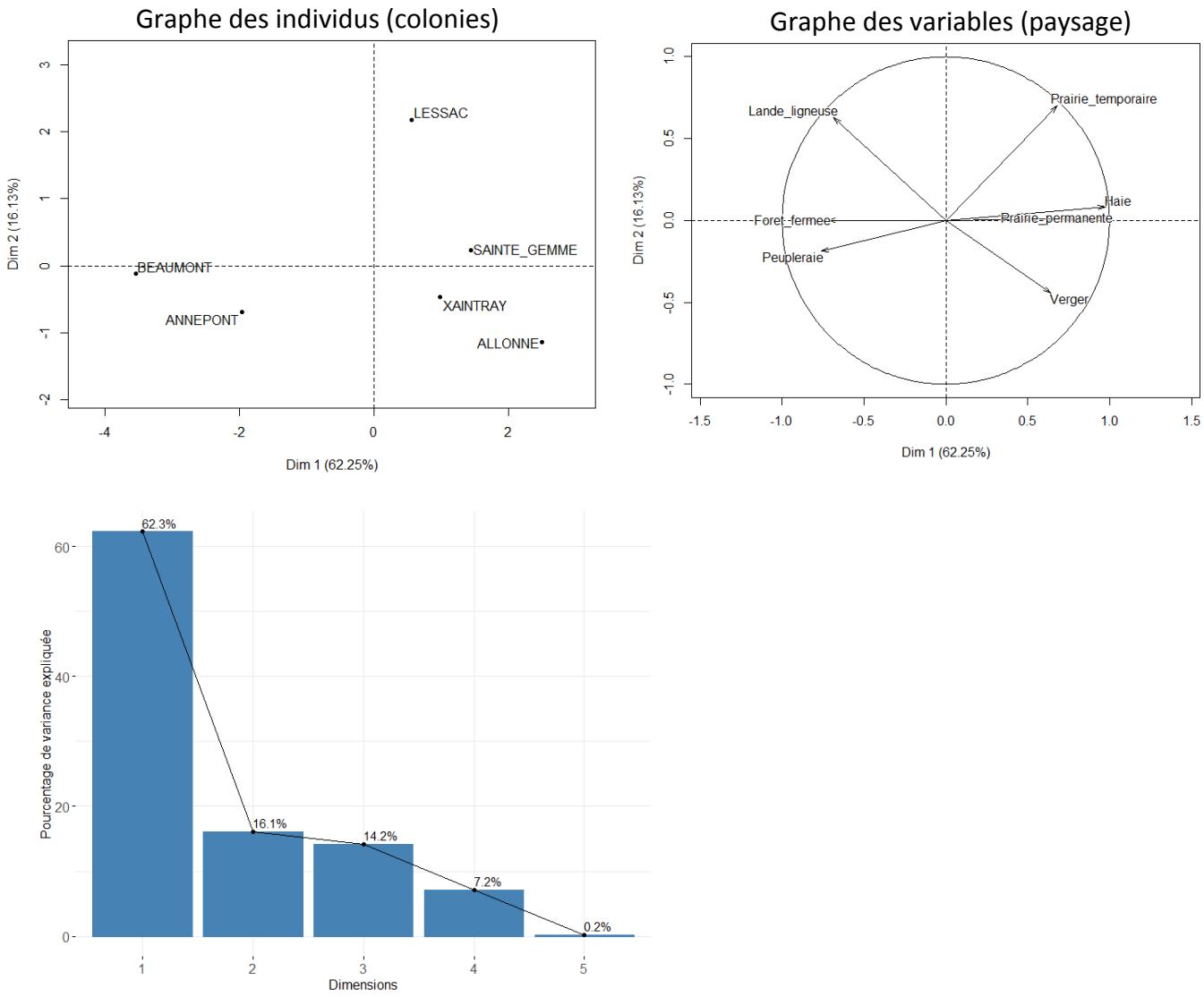


Figure 34. Analyse en composantes principales des données paysagères (surface en hectares) entourant les colonies. Représentation des colonies (haut-gauche), des variables paysagères (haut-droite) et du graphe des valeurs propres (bas-gauche) qui indique le pourcentage de variance expliquée par chaque axe de l'ACP.

3.2. Pré-traitements des données de séquençage

3.2.1. Filtrage des données

26 737 OTUs (44 801 072 séquences) ont été obtenus après traitement via le pipeline FROGS et 8839 OTUS ont été écartés car ils sont considérés comme des chimères supplémentaires par l'outil *isBimeraDenovo* de *dada2* (33.05% des séquences). Après application des filtres (contrôles négatifs, positifs, triplication), le jeu de données est composé de 7206 OTUs (41 797 239 séquences) pour 2014 échantillons. Sur ces 7206 OTUs : 3231 OTUs n'ont pas pu être assignées (absence dans la base de données), 2152 n'ont pas pu être assignées avec confiance car le pourcentage d'identité était trop faible (<97%) et/ou la couverture était insuffisante (<90%) (ex : pseudogènes, organismes non-cibles tels que des champignons). Parmi les 1200 OTUs restants, 70 ont été écartés car ils correspondent à des taxons a priori absents d'Europe, à des bactéries d'insectes (ex : *Wolbachia*, Rickettsiales) ou probablement des contaminations environnementales (ex : acariens). A ce stade, le jeu de données comporte donc 1130 OTUs. A l'issue du filtrage des données, 30 échantillons de Petit rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) concernant un autre projet ont été retirés du jeu de données.

3.2.2. Filtrage des taxons des prédateurs

Parmi les 1984 guanos obtenus après les filtres, 1194 échantillons correspondent au Grand rhinolophe (60.1%), 381 au Murin à oreilles échancrées (19.2%), 32 au Grand Murin (*Myotis myotis*, 1.6%) et un au genre Sérotine (*Serotinus*, 0.05%) (Figure 35). D'autres espèces de chauves-souris ont été identifiées en mélange avec les quatre principales dans huit échantillons : Oreillard roux (*Plecotus auritus*), Murin de Bechstein (*Myotis bechsteinii*) et

Murin de Natterer (*Myotis nattereri*) (Tableau 2). Douze échantillons ont été identifiés comme appartenant à un rongeur ou à un mélange de rongeur et de chauve-souris (0.6%) et 104 échantillons comme appartenant à un oiseau (dont 15 échantillons d'Hirondelle *Hirundo sp.*) ou à un mélange d'oiseaux et de chauves-souris (89 échantillons). 178 guanos (8.9%) n'ont pas d'identification du prédateur et 52 n'ont pas d'identification ni du prédateur ni des proies (2.6%). A noter que l'absence de séquences de l'un des deux prédateurs majoritaires dans les échantillons est principalement due aux filtres très stringents que nous avons appliqué. Ces filtres permettent de prévenir contre l'important risque de contaminations croisées durant la chaine de traitement (de l'échantillonnage au séquençage).

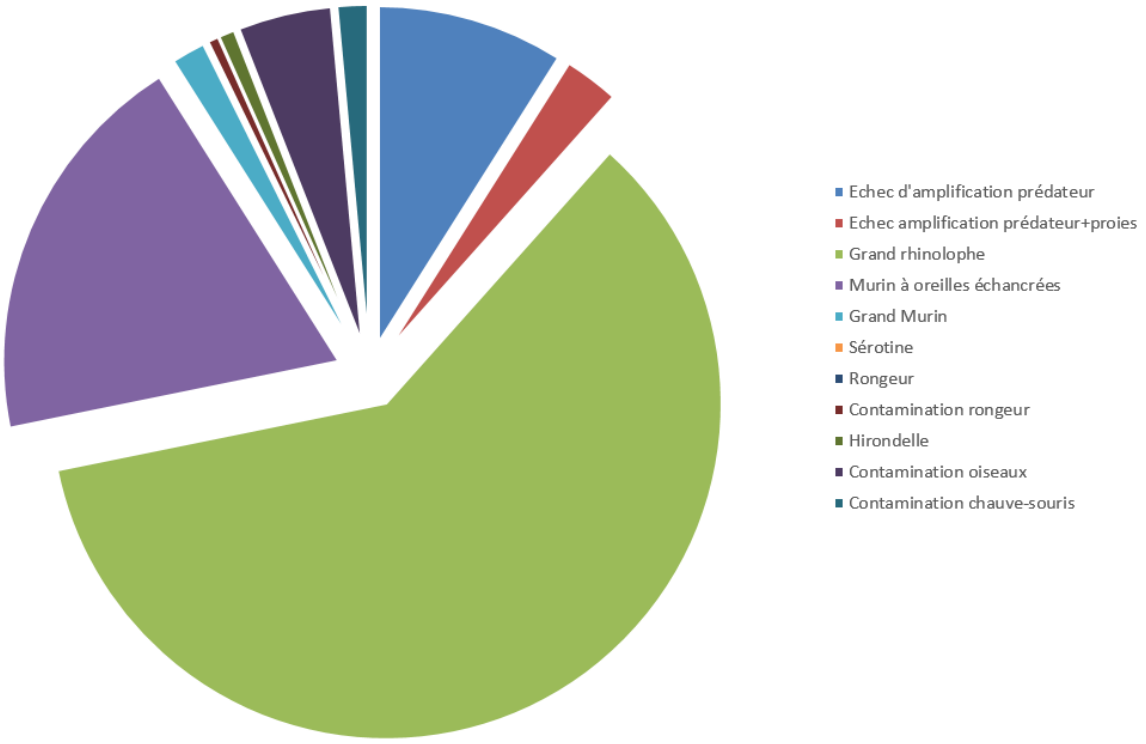


Figure 35. Identification des espèces de prédateurs dont proviennent les 1985 guanos individuels.

Pour la suite des analyses, la colonie de Saint-Martin-les-Melle a été écartée car le nombre de guano de Grand rhinolophe était insuffisant (juin : 0, juillet : 1, août : 78 ; Tableau 1). Parmi les 1115 échantillons de Grand rhinolophe des six colonies restantes, des proies sont

détectées pour uniquement 1033 d'entre eux. Le jeu de données analysé concerne donc ces 1033 guanos de Grand Rhinolophe provenant de six colonies pour trois pas temporels.

3.3. Identification moléculaire et description des proies du Grand rhinolophe

3.3.1. Diversité taxonomique des proies détectées

Nous avons identifié 679 OTUs correspondant à 17 ordres d'insectes, 121 familles, 412 genres et 527 espèces (Figure 36). Trois ordres majoritaires ont été détectés : Lepidoptera (57% des occurrences globales), Diptera (23% des occurrences) et Coleoptera (13% des occurrences). Les espèces les plus occurrentes (fréquence d'occurrence > 5%) sont : *Celypha striana* (Lepidoptera), *Serica brunnea* (Coleoptera), *Limonia nubeculosa* (Diptera), *Musca autumnalis* (Diptera), un diptère assigné à l'ordre seulement (pourcentage d'identité = 97.18%), *Triodia sylvina* (Lepidoptera), *Tortrix viridana* (Lepidoptera), *Laothoe populi* (Lepidoptera), *Stenagostus rhombeus* (Coleoptera), *Tipula fascipennis* (Diptera), *Korscheltellus lupulina* (Lepidoptera), *Agrotis bigramma* (Lepidoptera), *Copris lunaris* (Coleoptera), *Zeiraphera isertana* (Lepidoptera), *Tipula maxima* (Diptera) et *Euthrix potatoria* (Lepidoptera).

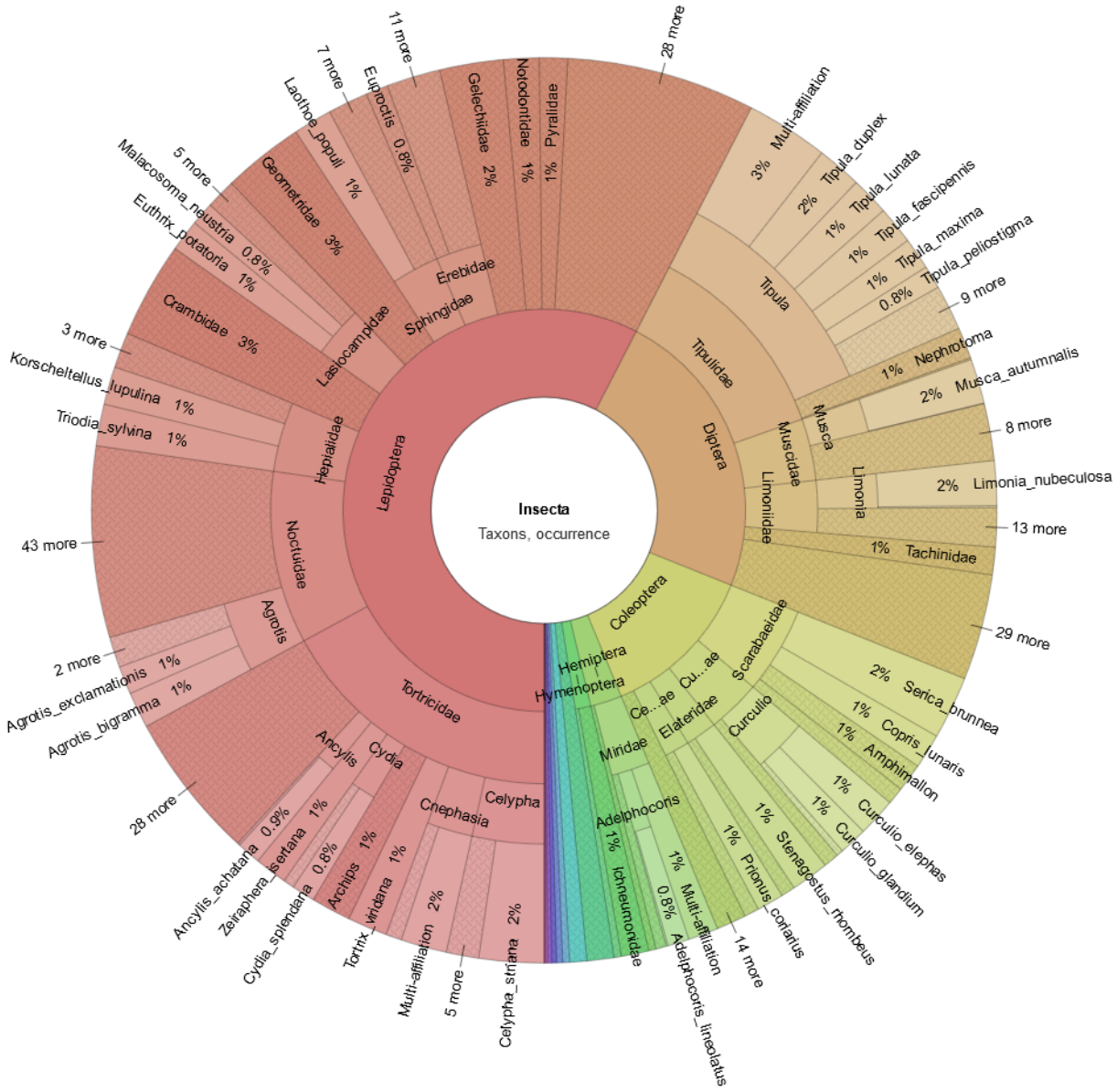


Figure 36. Représentation hiérarchique de la diversité taxonomique contenue dans les guanos du Grand rhinolophe, toutes colonies et mois d'échantillonnage confondus. Les différents cercles représentent les rangs taxonomiques (de l'espèce vers l'extérieur à la classe au centre). La largeur attribuée à chaque taxon est proportionnelle au pourcentage d'occurrences détectées.

Nous avons identifié 133 espèces de ravageurs/ravageurs potentiels dans le régime alimentaire du Grand rhinolophe (Annexe 1) : 70.9% sont des lépidoptères, 13.9% sont des coléoptères, 12.2% des diptères, 2.7% des hémiptères, 0.07% des orthoptères et 0.1% des thysanoptères (Figure 37). Cela représente 31.86% des occurrences détectées. Trois des espèces de ravageurs identifiées et une espèce vectrice de maladie du bétail et des chevaux appartiennent aux 15 espèces d'arthropodes les plus fréquentes du jeu de données (fréquence >5%) : le petit hanneton brun (*S. brunnea*), la tordeuse verte du chêne (*T. viridana*), la tipule géante (*T. maxima*) et la mouche de l'automne (*M. autumnalis*).

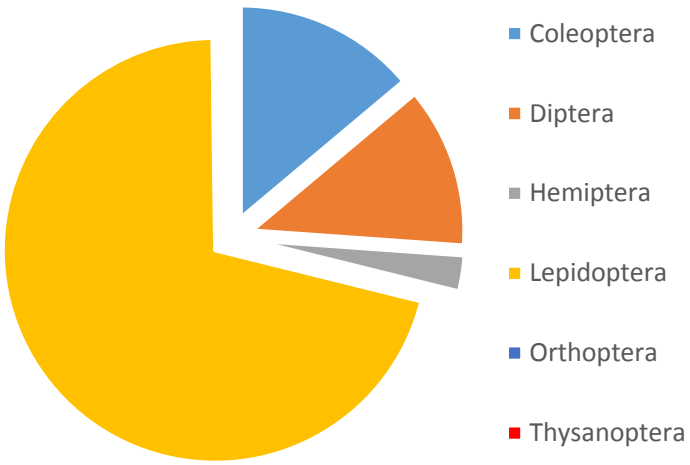


Figure 37. Proportion de chaque ordre d'insecte parmi les ravageurs identifiés.

3.3.2. Nombre de proies par guano

Les analyses par simulation réalisées avec le package *Hilldiv* révèlent qu'aucun guano ne montre de différence significative entre la diversité taxonomique attendue et la diversité observée, quel que soit le rang taxonomique considéré (ordre, famille, genre). Le nombre de séquences par guano est donc suffisant pour décrire les proies présentes, pour tous les guanos retenus après pré-traitement des données de séquences.

Le nombre de taxons de proies détectés dans chaque guano est très variable. Il est en moyenne de quatre et la valeur maximale est de 19 (guano de Sainte-Gemme récolté en juin 2018) (Figure 38). Nous avons détecté un effet significatif du mois d'échantillonnage (χ = 21.65, p = 1.98E-05). Les plus fortes valeurs sont observées en juillet. Les variables paysagères résumées par l'axe 1 de l'ACP ont également un effet significatif (χ = 21.35, p = 3.81E-06). Nous observons un plus grand nombre de proies dans les guanos issus des colonies entourées de haies et de prairies permanentes, comparé au nombre de proies dans les guanos des colonies entourées de landes ligneuses et forêts. Nous n'avons pas détecté d'effet des variables paysagères résumées par l'axe 2 de l'ACP (χ = 3.53, p = 0.06).

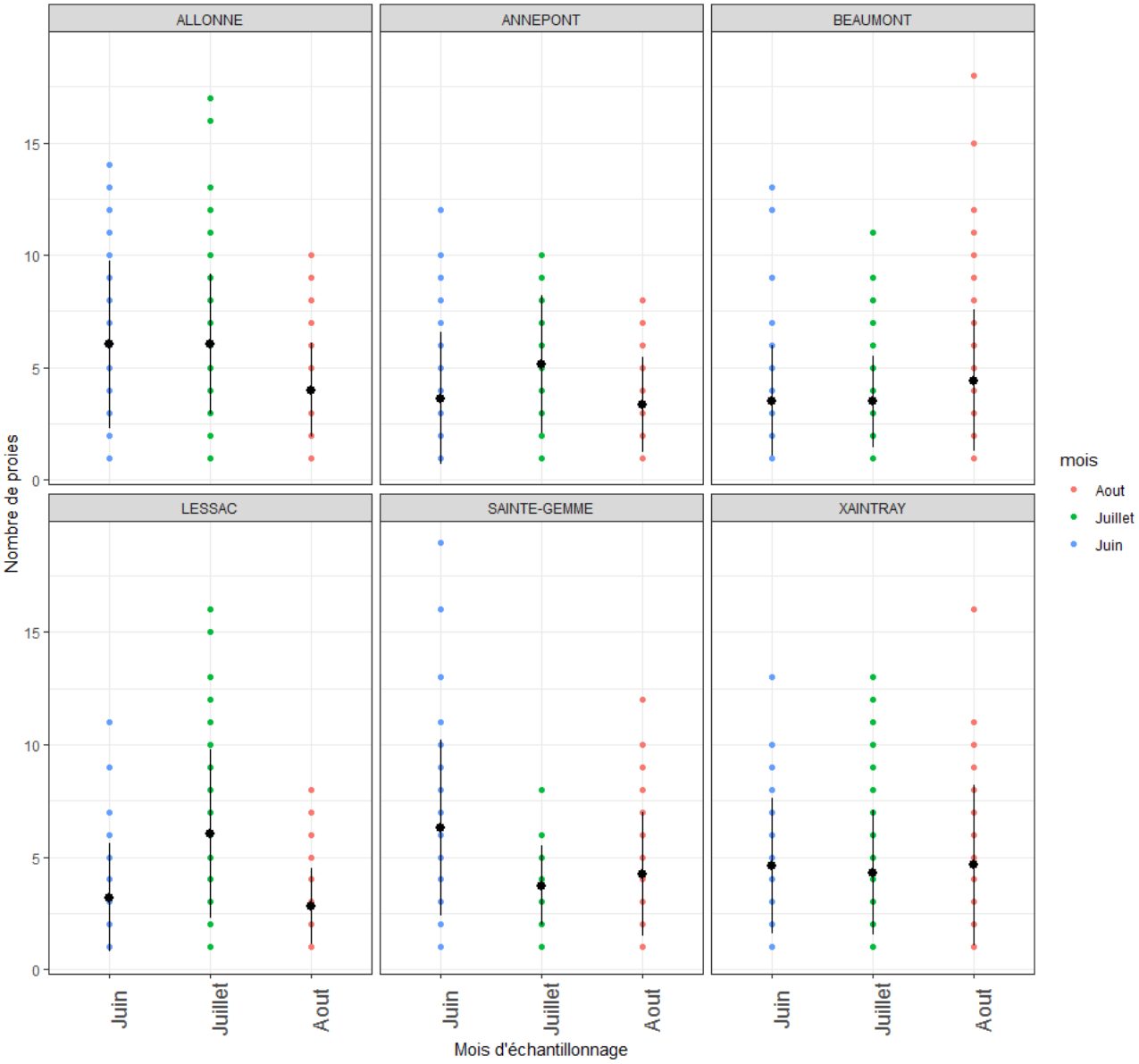
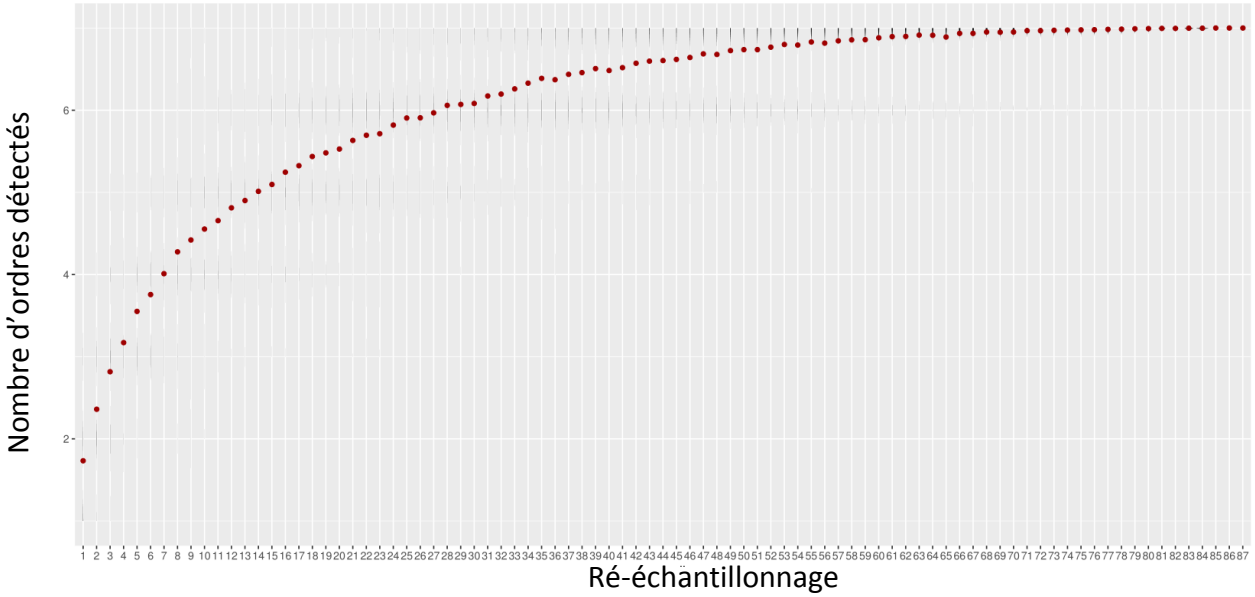


Figure 38. Nombre de proies par guano pour chaque colonie à chaque mois d'échantillonnage (Juin, Juillet, Aout 2018). Chaque point représente un guano.

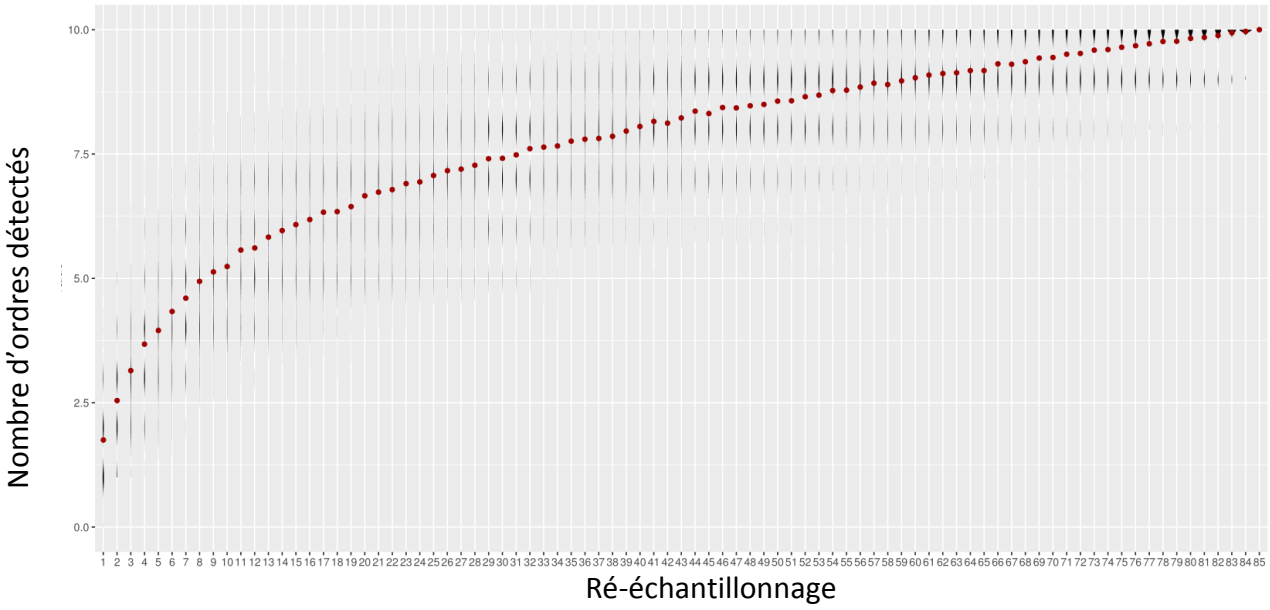
3.3.3. Validation de la stratégie d'échantillonnage

Les courbes d'accumulation indiquent qu'au rang taxonomique de l'ordre, le plateau de diversité est globalement atteint pour chaque colonie et date d'échantillonnage. Cependant, le nombre de guano minimal pour atteindre le plateau varie d'un échantillonnage (colonie x date) à l'autre. Par exemple, en août le plateau est atteint pour environ 60 guanos à Allonne (Figure 39A), tandis qu'il est à peine atteint pour 80 guanos à Beaumont (Figure 39B). Au rang taxonomique de la famille, le plateau n'est pas complètement atteint (Figure 39C). Pour les rangs taxonomiques inférieurs (genre et espèce), le plateau n'est pas atteint et l'inflexion de la courbe est faible même pour les échantillonnages comprenant un nombre important de guanos (ex : Beaumont en juin, N= 86 ; Figure 39D).

Allonne - Août



Beaumont - Août



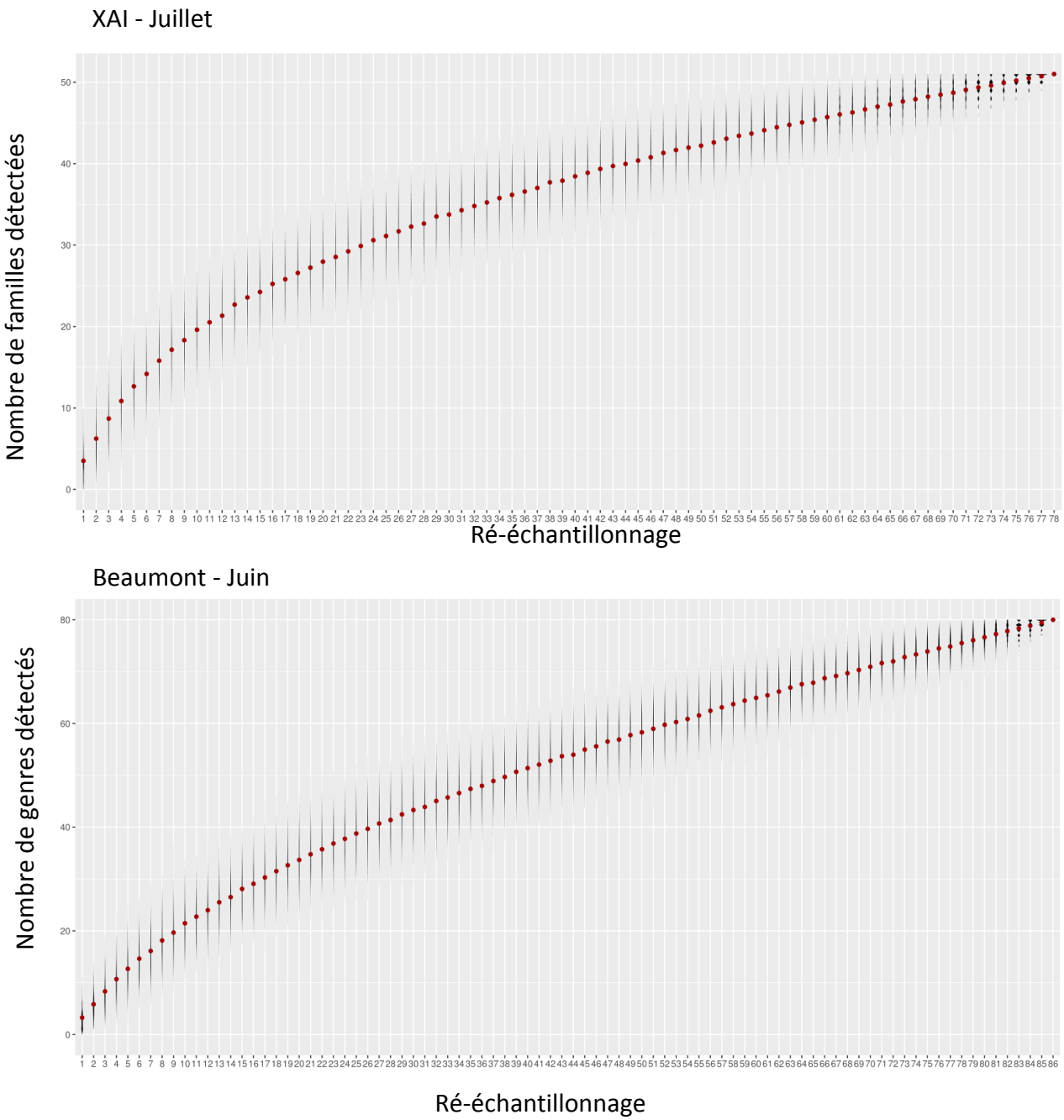


Figure 39. Courbes d'accumulation représentant les proies détectés dans le régime alimentaire de *R. ferrumequinum* par ré-échantillonnage aléatoire de guano dans le jeu de données. A) Rang taxonomique de l'ordre, colonie d'Allonne, B) rang taxonomique de l'ordre, colonie de Beaumont, C) rang taxonomique de la famille, colonie de Xaintray et D) rang taxonomique du genre, colonie de Beaumont. La largeur du violon indique la densité de probabilité que le sous-échantillon contienne le nombre de proies affiché en ordonnée. Le point rouge correspond à la moyenne du nombre de taxons issus des tirages.

3.3.4. Relation nombre de séquences - occurrences

Quel que soit le rang taxonomique étudié (ordre - espèce) nous n'avons pas observé de relation linéaire entre l'occurrence d'un taxon dans le jeu de données et la moyenne de la fréquence relative du nombre de séquences dans les guanos où il est détecté. Les taxa très rares et très occurrents peuvent être fortement représentés dans les séquences obtenues pour chaque guano (Figure 40). Cette analyse nous permet néanmoins d'observer le grand nombre de taxa (déterminés à l'ordre et à l'espèce) qui sont très rarement détectés dans le jeu de données. A l'ordre, deux taxa sont représentés par une unique occurrence, et quatre taxa (lépidoptères, diptères, coléoptères et hémiptères) sont représentés dans plus de 5% des occurrences (ratio d'occurrence = nombre d'occurrence de la proie / nombre d'échantillons). A l'espèce, 300 taxa sont représentés par une unique occurrence et seuls 17 taxa sont présents dans plus de 5% des occurrences.

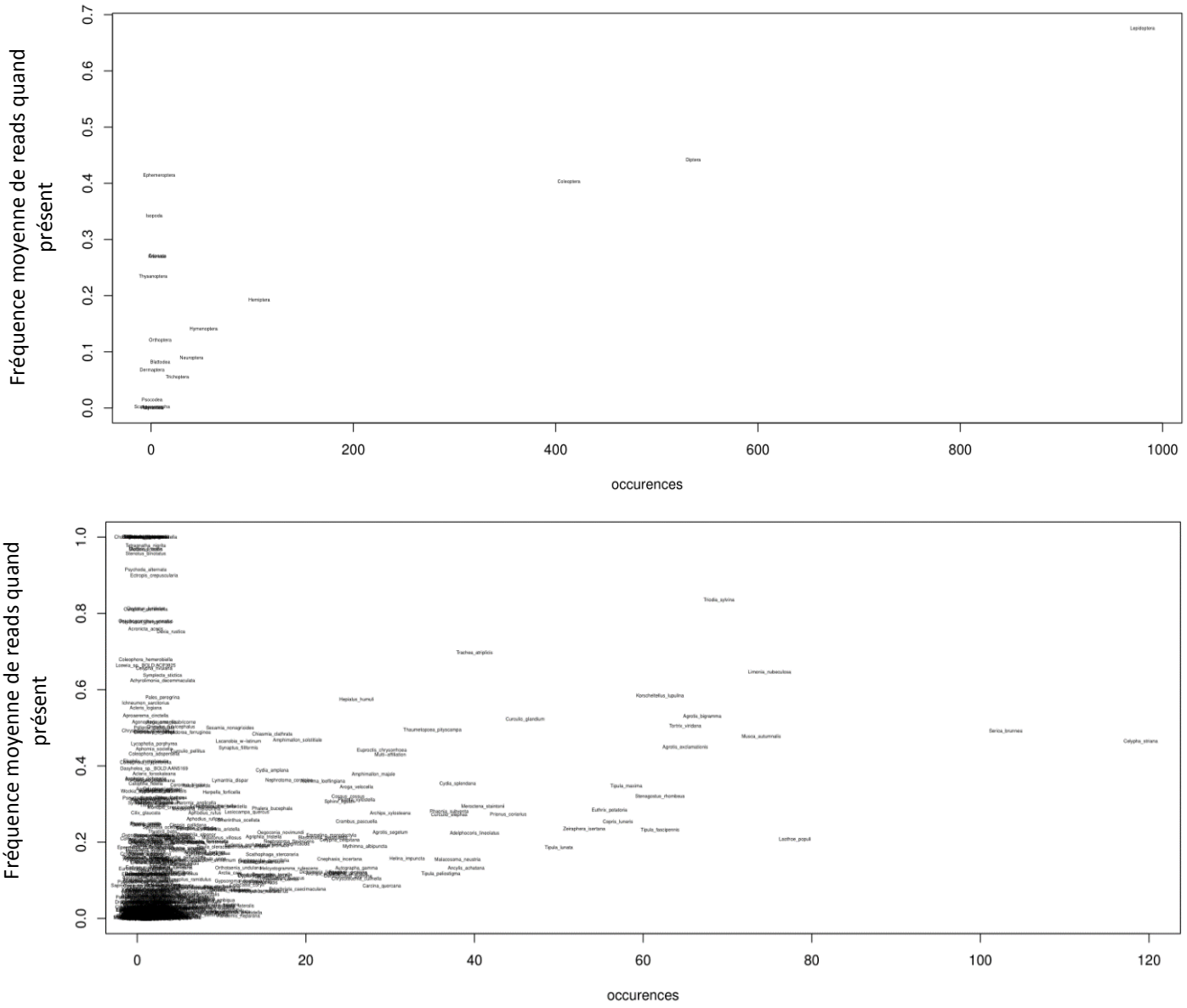


Figure 40. Fréquence moyenne de reads en fonction de l'occurrence des proies pour les deux rangs taxonomiques les plus éloignés : à l'ordre (haut) et à l'espèce (bas).

3.3.5. Diversité alpha

Valeurs moyennes estimées de la diversité alpha

Jeu de données complet - Les estimations de diversité alpha avec q = 0 et q = 1 donnent un patron similaire quel que soit le rang taxonomique considéré : les valeurs moyennes les plus faibles sont observées à Lessac en juin et août, et les plus élevées à Lessac et Allonne en juillet (Annexe 2).

Jeu de données réduit (occurrences > 5%) - Les valeurs maximales de diversité alpha obtenues sur la majorité des rangs taxonomiques considérés sont observées à Xaintray en juin. Les valeurs minimales sont détectées à Beaumont en juillet (q= 0), ou août (q= 1) (Annexe 2).

Effets du paysage et du mois d'échantillonnage sur la diversité alpha

Jeu de données complet - Quel que soit le rang taxonomique considéré, pour q =0 les modèles GLM ont révélé un effet significatif des variables paysagères résumées par l'axe 1 de l'ACP et du mois d'échantillonnage sur les valeurs estimées de diversité alpha (Tableau 3A). La diversité alpha augmente avec les coordonnées sur l'axe 1 de l'ACP, c'est-à-dire dans des colonies entourées de haies et de prairies permanentes, tandis qu'elle est plus faible dans les colonies entourées de forêts fermées et de landes ligneuses. La diversité alpha augmente en juillet puis diminue en août. Pour q = 1, quel que soit le rang taxonomique, nous détectons les mêmes effets significatifs du mois d'échantillonnage et des variables paysagères résumées par l'axe 1. Nous détectons également un effet négatif des coordonnées sur l'axe 2 de l'ACP (Tableau 3A). La diversité alpha est plus faible pour la colonie entourée de prairies temporaires et landes ligneuses (Lessac) comparée aux autres habitats/colonies.

Jeu de données réduit - Quel que soit le rang taxonomique considéré, les mêmes variables significatives sont détectées, à l'exception de l'axe 2 qui n'est plus significatif pour q = 1 (Tableau 3B).

Enfin, lorsque l'on compare les diversités alpha estimées par colonie-mois d'échantillonnage, on remarque que les colonies d'Allonne (valeurs élevées) et de Lessac (valeurs faibles) sont impliquées dans la majorité des paires significativement différentes (pour q =0 et pour q=1, quel que soit le rang taxonomique considéré, et pour les jeux de données complet et réduit) (Figure 41).

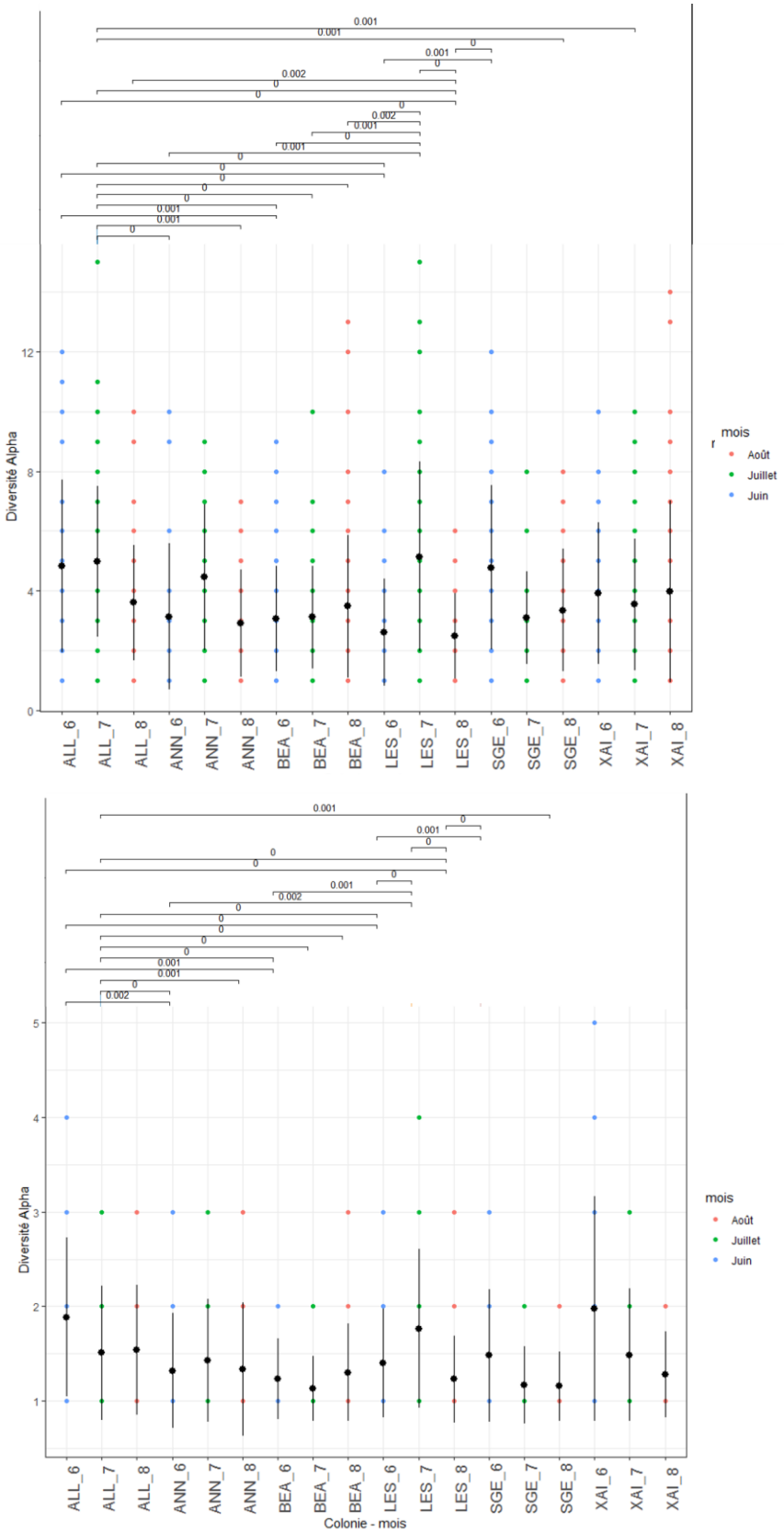


Figure 41. Variation de la diversité alpha à l'espèce pour q = 0 dans le jeu de données complet (haut) et dans le jeu de données réduit (bas) en fonction de la colonie (ALL, ANN, BEA, LES, SGE, XAI) et du mois d'échantillonnage (6 = Juin, 7 = Juillet, 8 = Août). Les barres horizontales indiquent les paires de colonie-date dont la diversité alpha est significativement différente (Test de Kruskall-Wallis et test post-hoc de Dunn corrigé pour les tests multiples d'après Benjamini-Hochberg ; seuil de significativité corrigé d'après Bonferroni : 0.0029). Les points et barres verticales associées correspondent à la moyenne et écart-type de chaque colonie - mois.

3.3.6. Diversité beta

Estimation de la diversité beta

Nous observons une variation des pourcentages d'occurrence des différentes proies entre colonies et entre mois pour une même colonie, et également des différences de patrons de variation entre colonies au cours de la saison de maternité (Figure 42).

Jeu de données complet - La diversité beta estimée par la distance de Bray-Curtis est très forte et avoisine la valeur maximale de 1 pour q = 0, pour tous les rangs taxonomiques étudiés (ordre : β = 0.882 ; famille : β = 0.974 ; genre : β = 0.991, espèce : β =0.994). Les valeurs estimées de β diminuent fortement quand q =1 (ordre : β = 0.124, famille : β = 0.369, genre : β = 0.542, espèce : β = 0.582).

Jeu de données réduit - La même variation pour q = 0 et q = 1 est observée avec cependant des valeurs de β plus faibles : 0.563 < β < 0.904 (q = 0) et 0.139 < β < 0.382 (q = 1) (Tableau 4).

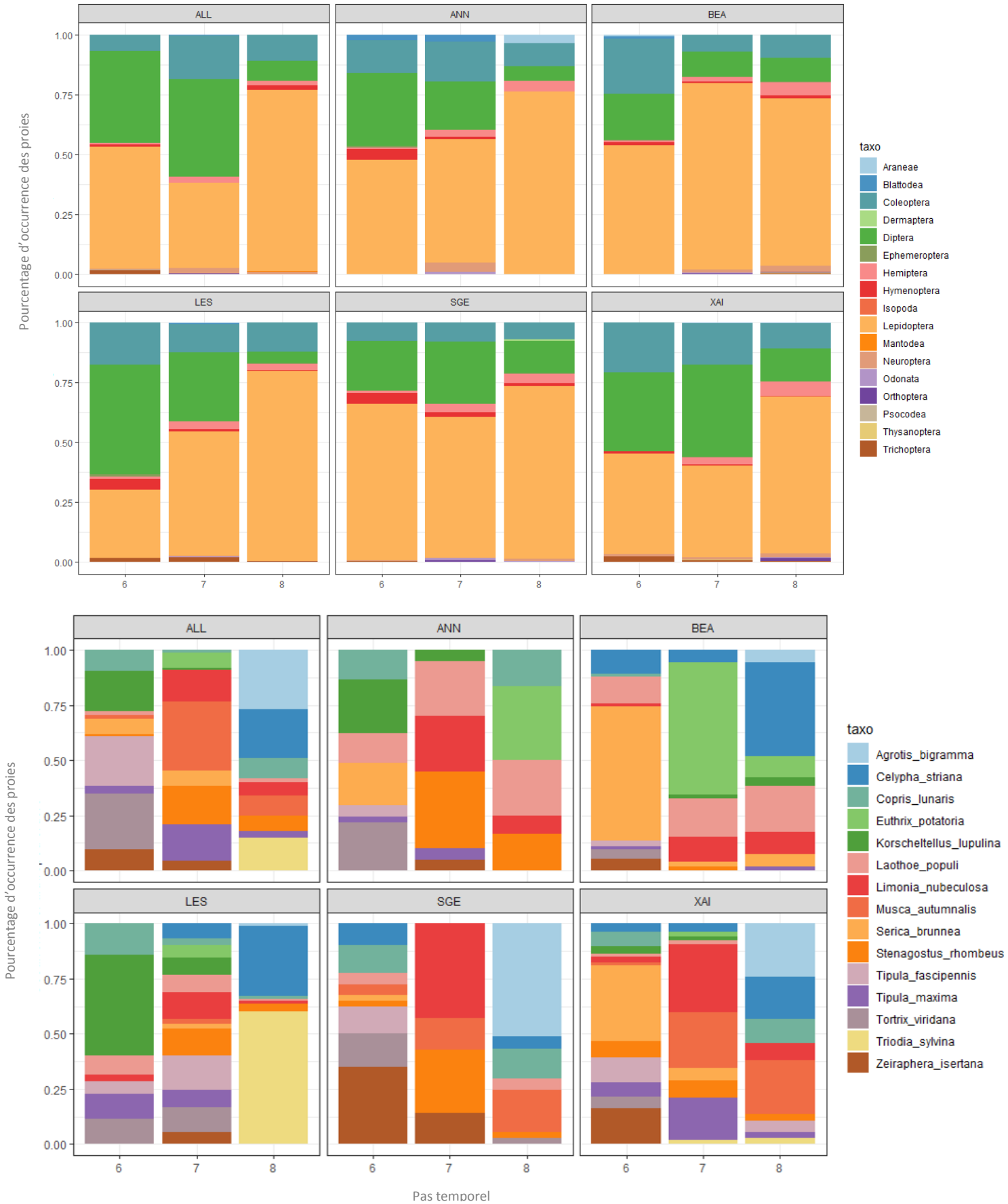


Figure 42. Pourcentage d'occurrence des proies pour chacune des six colonies (ALL, ANN, BEA, LES, SGE, XAI) à chaque pas temporel (6 = Juin, 7 = Juillet, 8 = Août), A) au rang taxonomique de l'ordre avec le jeu de données complet et B) au rang taxonomique de l'espèce avec le jeu de données réduit.

Variation de la diversité beta entre colonies et mois d'échantillonnage

Sur le jeu de données complet et sur le jeu de données réduit, quel que soit le rang taxonomique, les analyses PerMANOVA ont révélé une variation significative du régime alimentaire entre les colonies et les mois d'échantillonnage (Annexe 3A). Ces différences proviennent de l'hétérogénéité de la variance entre groupes (colonies ou mois), comme le révèle l'analyse *betadisper* qui montre également des résultats toujours significatifs (Annexe 3B).

Jeu de données complet - malgré de très bonnes valeurs de stress (ex : stress = 0.002 au genre) les analyses NMDS ne convergent pas aux rangs taxonomiques de la famille, du genre et de l'espèce. Quel que soit le rang taxonomique considéré, les analyses NMDS montrent cependant un fort recouvrement des proies entre colonies et mois d'échantillonnage mais la présence de quelques proies rares explique la dissimilarité entre les colonies et entre les mois. Par exemple, au rang taxonomique de l'espèce, la colonie Beaumont se différencie des autres colonies par la présence des espèces rares *Caenis luctuosa* (éphéméroptère) et *Mamestra brassicae* (lépidoptère) et le mois de juin se distingue de juillet et août par la présence des espèces rares *Choristoneura hebenstreitella* (lépidoptère) et de *Caenis luctuosa* (éphéméroptère) (Figure 43A et Figure 43B).

Jeu de données réduit - malgré de bonnes valeurs de stress les analyses NMDS ne convergent pas non plus au genre (stress = 0.066) et à l'espèce (stress = 0.061). Le recouvrement des proies entre colonies et entre mois est très fort : chaque proie est partagée par au moins deux colonies/mois d'échantillonnage (Figure 43C et Figure 43D) sauf *Zeiraphera isertana* (lépidoptère) observé uniquement en juin et *Triodia sylvina* (lépidoptère) uniquement en août (Figure 43D).

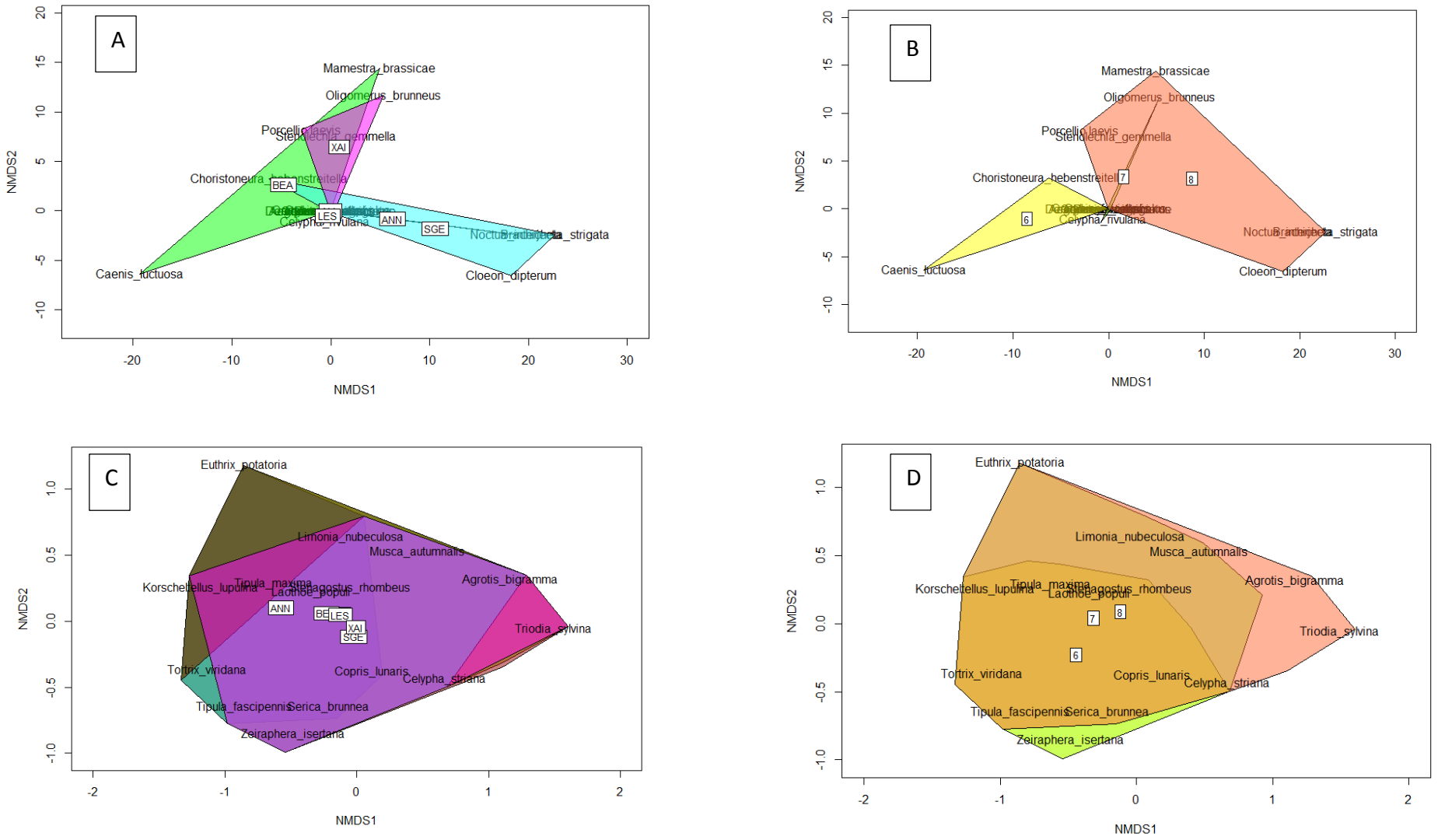


Figure 43. Représentation de la dissimilarité de Bray-Curtis en deux dimensions (NMDS) au range taxonomique de l'espèce : A) entre les six colonies avec le jeu de données complet (le barycentre d'ALL est recouvert par celui de LES), B) entre mois d'échantillonnage avec le jeu de données complet, C) entre colonies avec le jeu de données réduit aux espèces les occurrentes (fréquence > 5% ; le barycentre d'ALL est recouvert par celui de LES), D) entre mois d'échantillonnage avec le jeu de données réduit aux espèces les occurrentes (fréquence > 5%). Abréviation : 6 = Juin (jaune), 7 = Juillet (ocre), 8 = Août (rose), ANN = Annepont (vert clair), ALL= Allonne (bleu marine), BEA = Beaumont(vert), LES = Lessac (rouge), SGE = Sainte-Gemme (cyan) et XAI = Xaintray (magenta). Lorsque les ellipses se recouvrent les couleurs se superposent.

Jeu de données complet - Les tests de Mantel effectués entre la matrice de dissimilarité du régime alimentaire et la matrice de distances paysagères montrent que la diversité beta et le paysage sont positivement corrélés aux rangs taxonomiques de la famille ($p = 0.006$), du genre ($p = 0.001$) et de l'espèce ($p = 0.006$), mais pas de l'ordre ($p = 0.215$) (Annexe 4). Plus les colonies sont situées dans des paysages différents, plus leurs régimes alimentaires divergent.

Jeu de données réduit – Les tests de Mantel révèlent que la diversité beta et le paysage sont positivement corrélés à tous les rangs taxonomiques ($p < 0.01$; Annexe 4).

4. Discussion

4.1. Une diversité taxonomique de proies inattendue

Nos résultats ont mis en évidence une très grande diversité taxonomique de proies de l'ordre (17 ordres) à l'espèce (527 espèces) dans le régime alimentaire du Grand rhinolophe. Cette diversité inclut des insectes terrestres de toutes tailles (ex : *Thrips tabaci* 1mm et *Tipula maxima* > 30mm), des insectes qui émergent de l'eau (stades larvaires aquatiques ; éphéméroptères, odonates et trichoptères) et des araignées. Cette diversité démontre le caractère plus généraliste (majorité d'espèces peu occurrentes) du régime alimentaire qu'attendu pour cette espèce (Flanders et Jones 2009). En effet, les analyses morphologiques des guanos de Grand rhinolophe décrivaient sept ordres plus ou moins couramment détectés (Jones 1990; Flanders et Jones 2009): Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera, Hymenoptera, Trichoptera, Dermaptera et deux taxons supplémentaires en Algérie (Araneae et Chilopoda ; Ahmim et Moali 2013). Les analyses moléculaires du régime alimentaire du

Grand rhinolophe, qui reposent sur un échantillonnage beaucoup moins conséquent que le nôtre (> 100 échantillons *vs* >1000 échantillons), ont mis en évidence cinq ordres et 62 espèces (24 échantillons ; Aldasoro et al. 2019), sept ordres et 57 espèces (60 échantillons; Galan et al. 2018), 10 ordres et 60 espèces (10 échantillons ; Tournayre et al. soumis).

Nous ne pouvons cependant pas exclure que parmi les 527 espèces que nous avons détectées, certaines soient (1) des proies secondaires (ex : proies des araignées) ou (2) des contaminations environnementales. Nous estimons toutefois avoir fortement réduit cette seconde possibilité grâce à l'important filtrage des données réalisé en amont des analyses statistiques. L'échantillonnage de guanos sous les colonies, contrairement aux récoltes de fèces lors des captures de chiroptères, augmente les probabilités de contaminations des guanos par les animaux coexistant (oiseaux, rongeurs, autres espèces de chauves-souris) et démontre l'importance d'amplifier et d'identifier l'espèce de prédateur. La détection de contaminations par d'autres espèces de prédateur permet d'identifier et retirer les guanos des analyses, ce qui limite l'intégration de proies non ingérées par l'espèce insectivore d'intérêt.

Les autres études moléculaires du régime alimentaire du Grand rhinolophe (Aldasoro et al. 2019 ; Galan et al. 2018) provenaient d'échantillons collectés par capture de chauve-souris et n'étaient donc pas concernés par ce potentiel biais. De même l'étude de Tournayre et al. (soumis) incluait l'amplification et l'identification de l'espèce de chauve-souris. La différence de diversité observée entre notre étude et ces dernières pourraient provenir de la différence du nombre d'échantillons étudiés (Mata et al. 2018). D'autres études moléculaires sur les chauves-souris au nombre d'échantillons importants ont également montré des diversités très élevées (ex: 521 espèces, Andriollo et al. 2019; 277 espèces, Vesterinen et al. 2018) même si

ces chiffres sont probablement en dessous de la réalité, notamment à cause de l'absence de certaines espèces d'arthropodes dans les bases de données de séquences de références. Notre étude démontre cette influence du nombre de guanos étudiés sur la diversité observée. Notre échantillonnage nous permet d'atteindre le plateau des courbes d'accumulation seulement au rang taxonomique de l'ordre et pas aux rangs taxonomiques inférieurs (famille, genre, espèce). Ceci est probablement dû à la présence de très nombreuses espèces rares ingérées de manière très occasionnelle (300 taxons à une seule occurrence, quelques taxons à plus de 10000 séquences) (Razgour et al. 2011). Cela signifie que potentiellement plus on rajoute des échantillons, plus on augmente la diversité, mais également plus on ajoute d'espèces rares qui nous éloignent du plateau de diversité. La présence de ces espèces rares souligne l'importance de comparer les résultats du jeu de données complet et du jeu de données comprenant seulement les espèces les plus fréquentes et d'analyser la diversité en tenant compte ou non de ces espèces de proies rares (richesse spécifique *vs* indices de diversité corrigés).

4.2. Vers une image plus précise du régime alimentaire du Grand rhinolophe

Nos résultats permettent de décrire assez précisément le régime alimentaire du Grand rhinolophe, et donnent une image globalement en accord avec les résultats précédemment décrits par les analyses microscopiques au rang taxonomique de l'ordre (majorité de lépidoptères, diptères et coléoptères ; Jones 1990; Flanders et Jones 2009) sur le jeu de données complet et réduit. De plus, nos résultats confirment les comparaisons précédemment effectuées entre analyses morphologiques et moléculaires : nous obtenons une bien meilleure résolution (77.6 % des taxons affiliés le sont à l'espèce) et nous détectons beaucoup plus de

proies rares (Clare et al. 2009; Razgour et al. 2011). Nos résultats décrivent la présence de très nombreux ravageurs avérés ou potentiels dans le régime alimentaire du Grand rhinolophe. Certains ravageurs avaient déjà été identifiés dans les études morphologiques et moléculaires, tels que les coléoptères *Serica brunnea et Melolontha melolontha* ou le diptère *Tipula maxima* (Galan et al. 2018; Aldasoro et al. 2019; Jones 1990). Cependant aucune étude sur cette espèce de chauve-souris n'avait décrit autant d'espèces problématiques ou potentiellement problématiques. Or le rôle de chirosurveillance (Maslo et al. 2017b) ou agent naturel de lutte du Grand rhinolophe pourrait prendre de plus en plus d'ampleur dans le futur car le changement climatique favorise l'installation et la pullulation de nombreux insectes problématiques (Trumble et Butler 2009). La fine résolution apportée par la méthode moléculaire de metabarcoding apporte plus d'informations pour décrire et analyser la plasticité du régime alimentaire dans l'espace et dans le temps. Ceci permet d'étudier le comportement de nutrition du Grand rhinolophe (opportunisme *versus* sélectivité vis-à-vis des proies disponibles) à travers les variations de diversité et de composition du régime alimentaire entre et au sein des colonies.

4.3. Effet du paysage et de la date d'échantillonnage sur le régime alimentaire

Cette étude révèle que le régime alimentaire du Grand rhinolophe varie en fonction des sites géographiques et au long de la saison de maternité, comme cela a été observé pour d'autres chiroptères insectivores (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015; Razgour et al. 2011; Clare, Symondson, et Fenton 2014; Andriollo et al. 2019; Aizpurua et al. 2018). Les patrons de variation observés sont fortement liés à la typologie de paysage déduite de l'analyse multivariée réalisée. Ainsi, nos résultats montrent que le paysage semble affecter le régime

alimentaire du Grand rhinolophe, tant en terme de nombre de taxons détectés par échantillon de guano, que de diversité et de composition en proies.

Les Grands rhinolophes dont les colonies de maternité sont entourées de haies et de prairies permanentes (Allonne, Sainte-Gemme et Xaintray) ont des régimes alimentaires plus diversifiés et montrent des régimes alimentaires assez similaires. Ces colonies sont toutes situées dans les Deux-Sèvres, un département encore fortement bocager où se concentrent la plupart des colonies de maternité de la région.

Au sein des colonies entourées de paysages supposés favorables, nous détectons de la variabilité temporelle de la diversité et de la composition du régime alimentaire du Grand rhinolophe, au cours de la saison de maternité. Dans le jeu de données réduit aux espèces de proies les plus fréquentes, nous avons observé dans les trois colonies situées dans des paysages favorables (Allonne, Sainte-Gemme et Xaintray) une augmentation de la moyenne et de la variance du nombre de taxons par guano et une diminution de la moyenne et de la variance de la richesse spécifique du régime alimentaire entre juin et août. Cela signifie qu'en fin d'été, les individus mangent plus de proies différentes, mais dans un ensemble de proies plus réduit. Ceci est au moins en partie lié à la phénologie des insectes : par exemple le lépidoptère *Zeiraphera isertana* en vol en juin et juillet dans la région n'est pas retrouvé en août dans le régime alimentaire. A l'inverse le lépidoptère *Agrotis bigramma* en vol en août et septembre n'est retrouvé qu'en août dans nos données. Ces patrons de variation temporelle peuvent également refléter une sélectivité moindre/un opportunisme plus élevé des Grands rhinolophes en juin. En effet, en juin nous observons un rapport plutôt équilibré entre les trois ordres lépidoptères, diptères et coléoptères. En août nous observons globalement plus de lépidoptères (dont *Agrotis bigramma et Triodia sylvina* dont les adultes volent seulement en août-septembre) au détriment des diptères, et plus du coléoptère *Copris*

lunaris (en vol tout l'été ; identifié en juin et août mais pas juillet). De plus nous détectons une fréquence d'occurrence plus faible du diptère *Limonia nubeculosa* en août, alors que la phénologie de cette espèce indique un vol tout au long de l'été. Ces variations temporelles suggèrent ainsi une plus forte sélectivité du Grand rhinolophe en août, les proies préférentielles étant de gros lépidoptères nocturnes. Lorsque l'on considère le jeu de données complet, qui contient une très grande diversité de proies rares, nous observons globalement une diminution en fin d'été du nombre de taxons par guano et de la richesse spécifique dans le régime alimentaire de ces trois colonies (patron moins marqué pour la colonie de Xaintray), ce qui confirme le patron observé précédemment sur le jeu de données des proies les plus occurrentes. Ces patrons de variation temporelle de la composition, de la diversité et du nombre de proies par guano suggèrent ainsi plus de sélectivité des proies en août, et plus d'opportunisme en juin. Une sélectivité des proies plus fortes en août pourrait être associée à des contraintes moins fortes liées au sevrage des jeunes et à un besoin énergétique fort requis pour l'accumulation de graisse pour préparer la saison d'accouplement et d'hibernation. Un tel comportement est observé en laboratoire : Koselj, Schnitzler, et Siemers (2011) ont montré que le Grand rhinolophe est moins sélectif et prend une plus grande proportion de toutes les proies présentes lorsque les proies sont rares. Mais des analyses plus poussées de la disponibilité et de la qualité des proies potentiellement sélectionnées par la Grand rhinolophe dans cette étude restent actuellement indispensables pour mieux déterminer l'influence relative des variations environnementales de la communauté d'insectes et du changement comportemental du Grand rhinolophe (opportunisme et sélectivité) dans les modifications temporelles de régime alimentaire observées au long de l'été.

Les colonies d'Annepont et de Beaumont, situées dans des habitats supposés moins favorables (forêts fermées, peupleraies et dans une moindre mesure de landes ligneuses), montrent des patrons de diversité différents de ceux observés sur les colonies entourées de paysages supposés favorables (bocagers). Sur le jeu de données réduit, nous observons en moyenne un nombre de taxons par guano et une diversité plus faible que pour les colonies situées dans des paysages favorables. Ce patron pourrait s'expliquer par une plus faible disponibilité en proies dans ces milieux moins favorables, ce qui ne semble donc pas corroborer l'attendu de la théorie de l'approvisionnement optimal, qui prédit une plus grande sélectivité lorsque les proies disponibles sont plus abondantes et diverses. Cependant, il faudrait comparer le ratio des proies consommées *versus* disponibles dans le milieu pour réellement tester cette prédiction.

Nous observons également que les indices de diversité spécifique du régime alimentaire sont stables au cours de l'été pour les deux colonies. Parallèlement, il existe une forte variation de la composition du régime alimentaire au cours de l'été. Bien que les espèces impliquées dans ces variations diffèrent entre les deux colonies, ces dernières montrent toutes deux une très forte augmentation de la proportion de lépidoptères (principalement *Euthrix potatoria*) dans le régime alimentaire du Grand rhinolophe en août à Annepont, et dès juillet à Beaumont (jusqu'à environ 80% de lépidoptères ; principalement *Celypha striana* et *Laothoe populi*). La phénologie des espèces les plus occurrentes en août pour Annepont et en juillet-août pour Beaumont nous indique que ces espèces volent sur toute la période estivale. Les variations temporelles de composition du régime alimentaire vis à vis de ces espèces ne semblent donc pas uniquement liées à des changements de disponibilité des proies dans l'environnement. Ainsi, nos résultats pourraient signifier qu'en milieu supposé peu favorable, la diversité et/ou l'abondance des proies disponibles sont plus faibles qu'en milieu supposé favorable, ce qui

aurait pour conséquences un régime alimentaire du Grand rhinolophe moins diversifié. Ce patron serait renforcé en fin de saison de maternité avec un biais vers les lépidoptères, qui résulterait à la fois du changement des communautés de proies disponibles mais également d'une plus grande sélectivité vers les papillons, comme observé dans les milieux favorables.

Le jeu de données complet apporte des informations complémentaires sur l'importance des nombreuses espèces rares dans le régime alimentaire des Grands rhinolophes de ces deux colonies. Nous observons un pic du nombre de taxa par guano et de la richesse spécifique en juillet à Annepont, une stabilité de ces indices à Beaumont et une variation de la composition similaire à celle observée sur le jeu de données réduit (plus de lépidoptères en août à Annepont et dès juillet à Beaumont). Cela suggère qu'en juillet, lors de la lactation, le Grand rhinolophe à Annepont serait plus opportuniste et complèterait son régime alimentaire grâce aux émergences d'insectes (beaucoup plus de diptères et de coléoptères qu'à Beaumont) ce qui ne serait pas le cas à Beaumont. Une différence de disponibilité des proies dans le milieu, liée aux différences paysagères ou de traitements insecticides, pourrait expliquer les patrons observés dans les deux colonies. Cette question constitue une piste intéressante à explorer pour mieux comprendre la plasticité du régime alimentaire du Grand rhinolophe en milieu hétérogène.

Enfin, la colonie de Lessac semble entourée d'un paysage différent des autres colonies avec en particulier plus de landes ligneuses, et est située sous un viaduc au-dessus de la Vienne. Le régime alimentaire du Grand rhinolophe dans cette colonie montre un pic du nombre de taxa par guanos et de richesse spécifique en juillet, que l'on prenne en compte les proies rares ou non (jeu de données complet et réduit). Parmi les espèces occurrentes, aucune ne prédomine à cette période tandis qu'en juin et en août nous observons une majorité de lépidoptères (majoritairement *Korscheltellus lupulina* - vol d'avril à juin- et *Triodia sylvina* – vol d'août à

octobre -, respectivement). Ce patron pourrait indiquer une très faible sélectivité et/ou un très fort opportunisme d'approvisionnement des Grands rhinolophes de cette colonie en juillet. Ceci pourrait être lié potentiellement à une forte abondance de l'ensemble des espèces de proies disponibles. Avec le jeu de données complet le patron observé est similaire à celui décrit pour Annepont, c'est-à-dire une augmentation progressive de la part de lépidoptères dans le régime alimentaire au cours de l'été. Notamment on retrouve une fréquence élevée des lépidoptères *Triodia sylvina* dont les adultes volent seulement en août-octobre (variations dans le régime alimentaire liées à la phénologie) et de *Celypha striana* dont les adultes volent tout l'été (variations dans le régime alimentaire non liées à la phénologie). Les variations de régime alimentaire du Grand rhinolophe à Lessac pourraient donc être influencées par la communauté de proies disponibles - une communauté plus riche étant potentiellement associée à un comportement d'approvisionnement plus opportuniste - et par les besoins énergétiques - des besoins accrus en fin de saison pouvant être associés à une plus forte sélectivité en faveur des lépidoptères -. Encore une fois, ces suggestions d'interprétation nécessitent d'être confirmées et validées par de nouvelles données environnementales (analyse des communautés d'insectes disponibles).

5. Perspectives de recherche

D'après Emlen (1966), les préférences alimentaires ne peuvent être correctement décrites que si un certain nombre de facteurs autres que les fréquences relatives dans le régime alimentaire sont connus. L'approche généralement adoptée dans les études de « sélection de proies » consiste à comparer une mesure des proies disponibles (attendu) à ce qui a été réellement consommé (observé) (Jones 1990; Arrizabalaga-Escudero et al. 2019). Or la qualité

des proies ou rentabilité (contribution de caractéristiques telles que la taille, la masse ou la vitesse de vol) détermine un compromis coût de chasse / bénéfice de se focaliser sur un certain type de proies (Koselj, Schnitzler, et Siemers 2011). Dans le futur, il sera donc important d'acquérir des données sur la qualité nutritionnelle (acides gras, masse …) et la disponibilité des proies dans l'environnement, au cours de l'été et pour les différents paysages, afin de mieux discriminer la part du choix du Grand rhinolophe de la contrainte liée à la variabilité environnementale de l'abondance et la richesse des proies dans le milieu.

Une deuxième perspective importante sera de poursuivre les suivis de déplacements de chasse du Grand rhinolophe dans les paysages composés de vergers, prairies temporaires, forêts fermées, peupleraies et landes ligneuses, par radiopistage par exemple, qui pourront nous aider à mieux interpréter nos données sur l'interaction paysage/saison/régime alimentaire et notamment sur l'hétérogénéité des patrons observés dans les colonies d'Annepont, Beaumont et Lessac.

Il serait également intéressant d'associer des données écotoxicologiques aux données de régime alimentaire pour déterminer s'il existe un lien entre le régime alimentaire et l'exposition aux pesticides de cette espèce et de ses proies. En effet, les insecticides peuvent impacter la physiologie et la survie des chauves-souris (Bayat et al. 2014; Clark, LaVal, et Swineford 1978; Hooton et al. 2016). Il faudrait donc quantifier la présence des molécules de pesticides ou de traitements du bétail dans le guano de chaque colonie. Or ces analyses sont habituellement réalisées à partir des organes prélevés sur des individus morts (ex: tissus graisseux; Kannan et al. 2010) et nécessitent donc une mise au point préalable pour être effectuées sur du guano. De plus, il n'existe pas de valeur de références donc nous manquerions d'informations sur la signification toxicologique des molécules et concentrations

détectées. Les analyses seraient donc seulement comparatives entre colonies. Les informations disponibles publiquement sur la quantité de pesticides achetés en 2017 par les communes de la région Poitou-Charentes (données Mediapart) ne permettent en tout cas pas d'expliquer les patrons observés (ex : deux fois plus de pesticides à Sainte-Gemme qu'à Annepont). Des informations plus précises (ex : date de traitement, produits utilisés), pourraient potentiellement être récupérées via les chambres d'agriculture concernées.

Enfin nos résultats montrent des variations de régime alimentaire au cours de la saison de maternité et entre les colonies, cependant nous ne connaissons pas l'impact de ces variations sur la valeur sélective des individus. Une analyse du ratio masse/avant-bras comme indicateur de la condition corporelle des individus dans cinq des sept colonies de cette étude en 2018 montre des conditions corporelles homogènes entre colonies sauf à Lessac où elle est plus élevée (Annexe 5). Pour estimer l'impact du régime alimentaire sur la valeur sélective des individus et la santé des colonies, il faudrait estimer les paramètres de reproduction et la survie juvénile à partir des guanos collectés. Ceci a récemment été développé sur le Petit rhinolophe à partir d'une approche de capture-marquage-recapture basée sur des échantillons de guano (Jan 2017). Afin de mieux analyser le bruit potentiel créé par les facteurs individuels sur le régime alimentaire (ex : différences de besoins énergétiques mâles/femelles, moindre performance des juvéniles à la chasse ; Mata et al. 2016; Arrizabalaga-Escudero et al. 2019) il serait intéressant de déterminer le sexe et l'âge des individus à partir de ces guanos. Par exemple chez le Rhinolophe euryale notamment, les adultes se nourrissent de gros papillons qui volent vite, tandis que les jeunes consomment plutôt des papillons plus petits, plus lents et qui ne perçoivent pas les ultrasons (à l'inverse des papillons tympanés) en attendant d'améliorer leur performances de chasse (Aldasoro et al. 2019; Dietz, Pir, et Hillen 2013b). Déterminer le sexe des individus à partir du guano a déjà été réalisé sur le Petit

rhinolophe (Zarzoso-Lacoste et al. 2018) et serait facilement applicable au Grand rhinolophe. En revanche, déterminer l'âge des chauves-souris à partir de l'ADN n'a été développé à ce jour que sur des échantillons de patagium de Murin de Bechstein et pourrait être compromis par la qualité dégradée de l'ADN des guanos récoltés sous les colonies (Wright et al. 2018).

6. Implications en termes de conservation

En termes de conservation, notre objectif était de définir si, à travers le spectre de proies, nous pouvions identifier des paysages à conserver en priorité pour préserver les ressources clés de cette espèce. Nos résultats ont montré que le Grand rhinolophe se nourrit de proies très diverses (terrestres, aquatiques, …), mais les espèces les plus fréquemment détectées sont majoritairement associées aux prairies et zones boisées. Nos analyses suggèrent que les colonies entourées d'une majorité de haies et de prairies permanentes permettent une plus grande diversité de proies dans le régime alimentaire. Réduire la coupe des haies permettrait par exemple une meilleure conservation des lépidoptères (Froidevaux, Broyles, et Jones 2019; Boughey et al. 2011), qui composent la majeure partie du régime alimentaire du Grand rhinolophe. Le rayon de protection du paysage autour de la colonie est souvent proposé aux alentours de quatre kilomètres, sur la base des données de radiopistage (Flanders et Jones 2009). Or les proies peuvent venir de plus loin que ce rayon (entre stade larvaire et adulte) (Arrizabalaga-Escudero et al. 2015). Un travail d'écologie des proies est donc nécessaire pour déterminer le rayon de protection et les différents types d'habitats à protéger pour favoriser les proies. Il faut également être prudent dans l'extrapolation de nos résultats car les patrons de régime alimentaire saisonniers peuvent changer d'une année à l'autre par exemple en fonction des températures (Clare, Symondson, et Fenton 2014). En l'absence de plus

d'informations sur les proies et le paysage il n'est pas prudent de déterminer un rayon de protection du paysage autour des colonies, du fait de la diversité de patrons observés.

7. Conclusion

Nos résultats confirment le caractère généraliste du régime alimentaire du Grand rhinolophe, composé d'une diversité taxonomique hors norme dans l'ensemble des colonies, dominé principalement par des lépidoptères, diptères et coléoptères. Cependant nous avons montré que le Grand rhinolophe peut faire preuve d'une grande plasticité dans son régime alimentaire selon le paysage dans lequel la colonie est située et probablement en fonction des variations de besoins énergétiques des femelles pendant la saison de maternité, en modulant la balance opportunisme/sélectivité des proies. Ces fluctuations entre colonies et au cours du temps soulignent l'importance d'un plan d'échantillonnage rigoureux dans le temps et l'espace, incluant l'estimation de la disponibilité des proies dans le milieu pour pouvoir mieux caractériser la cause d'un telle plasticité (sélectivité ou opportunisme au gré des émergences). A ce jour, nous manquons encore d'éléments pour bien cerner les patrons observés et donc pour les intégrer dans des plans de conservation concrets. Des analyses complémentaires (ex : stabilité des patrons observés dans le temps, écologie et appétences des proies, paysages) sont nécessaires avant de pouvoir mettre en place des actions de conservation pertinentes pour le Grand rhinolophe et ses proies.

Tables

Tableau 2. Identification de l'espèce de prédateur des 1985 échantillons. GR= Grand rhinolophe, MOE = Murin à oreilles échancrées, GM = Grand murin, SN = Sérotine de Nilson, ORR=Oreillard roux, MD = Murin de Daubenton, MB = Murin de Bechstein, HIR= Hirondelle, R = Rongeur, MULT = Mélange de plusieurs espèces de rongeurs ou d'oiseaux, CHL = Verdier d'Europe, PAD = Moineau domestique, GAL = *Gallus sp.*, ANS = *Anser sp*. Les valeurs en gras indiquent les effectifs de Grand rhinolophe par colonie et par mois d'échantillonnage.

		Juin							Juillet							Août						
		ALL	ANN	SGE	LES	SMM	BEA	XAI	ALL	ANN	SGE	LES	SMM	BEA	XAI	ALL	ANN	SGE	LES	SMM	BEA	XAI
Echec	Prédateur	28	4	7	22		3	32	19	5	2	8		3	5	4	4	4	14	7	4	3
	Proie & prédateur	3		1	7	8		14	1	1	2			4	1		1	1	3	2	2	1
Chauve-souris et mélanges de chauve-souris	**GR**	**64**	**57**	**42**	**36**		**86**	**46**	**73**	**22**	**32**	**78**	**1**	**81**	**78**	**87**	**30**	**52**	**77**	**78**	**85**	**89**
	MOE		31	20		80	5	3		59	17	3	87	3	7		57	4		5		
	GM				28							1		1							2	
	SN																				1	
	GR + MOE		3		2					1	1	2					1	1		2		1
	GR + GM											1			1					1	1	
	GR + ORR													1								
	GR + SN													1							1	
	MOE + MD					2							4									
	MOE + MB					1																

	MOE + GM													1									
Rongeur et mélange	R								2														
	R + GR														3	3							
	R + MOE												2				1						
	R+ MD +MOE					1																	
Oiseaux et mélange oiseaux-chauve-souris	HIR			8							4							3					
	HIR + GR			10							22					1		18					
	CHL + GR																	2					
	PAD + GR						1																
	GAL + GR																	1					
	ANS + GR																	1					
	TUR + GR																						1
	MULT + GR										1							2					
	HIR + GR + MOE										1							2					
	HIR + MOE			7		1					12							1					
	GAL + MOE					1																	
	PIC + MOE												1										
	TUR + MOE					1																	

	MULT + MOE										1							1				

Tableau 3. Résultats des GLMS testant l'effet des variables paysagères (Axe 1 et 2 de l'ACP-1) et du mois d'échantillonnage (Juin, Juillet, Août) sur la valeur de diversité alpha pour q = 0 et q = 1 à chaque niveau taxonomique : ordre, famille, genre et espèce. Les p-values en gras correspondent aux p-values significatives après correction pour test multiples FDR. A) Sur le jeu de données complet, B) sur le jeu de données réduit (proies dont la fréquence est > 5%).

A)		q = 0			q = 1		
		Df	Chi	*p*	Df	Chi	*p*
Ordre	Axe1	1	18,446	**1,75E-05**	1	14,421	**0,0001**
	Axe2	1	3,155	0,076	1	7,478	**0,0062**
	mois	2	68,772	**1,17E-15**	2	49,596	**1,70E-11**
Famille	Axe1	1	15,296	**9,19E-05**	1	13,056	**0,0003**
	Axe2	1	7,307	0,00687	1	14,556	**0,0001**
	mois	2	52,178	**4,67E-12**	2	65,638	**5,58E-15**
Genre	Axe1	1	18,245	**1,94E-05**	1	11,923	**0,0005**
	Axe2	1	3,263	0,071	1	10,542	**0,001**
	mois	2	24,087	**5,88E-06**	2	52,936	**3,20E-12**
Espèce	Axe1	1	23,084	**1,55E-06**	1	13,637	**0,0002**
	Axe2	1	3,067	0,079	1	11,497	**0,0007**
	mois	2	20,757	**3,11E-05**	2	36,096	**1,45E-08**

B)		q = 0			q = 1		
		Df	Chi	*p*	Df	Chi	*p*
Ordre	Axe1	1	26.25	**2.99E-07**	1	22.785	**1.812E-06**
	Axe2	1	0.017	0.895	1	0.065	0.799
	mois	2	33.558	**5.163E-08**	2	24.740	**4.245E-06**
Famille	Axe1	1	45.832	**1.288E-11**	1	41.857	**9.822E-11**
	Axe2	1	0.348	0.555	1	0.902	0.342

	mois	2	19.389	**6.163E-05**	2	20.402	**3.714E-05**
	Axe1	1	44.325	**2.781E-11**	1	39.470	**3.332E-10**
	Axe2	1	0.541	0.462	1	1.015	0.3137
Genre	mois	2	22.437	**1.342E-05**	2	20.203	**4.101E-05**
	Axe1	1	40.659	**1.812E-10**	1	36.790	**1.316E-09**
Espèce	Axe2	1	0.010	0.919	1	0.002	0.967
	mois	2	18.021	**0.0001**	2	13.459	**0.001**

Tableau 4. Valeur de diversité beta *β* obtenues pour chaque rang taxonomique avec le jeu de données réduit.

	q = 0	q = 1
Ordre	0.563	0.139
Famille	0.854	0.307
Genre	0.895	0.369
Espèce	0.904	0.382

Annexes

Annexe 1. Liste des espèces de ravageurs identifiées (base de données Arthemis, extraction le 04/10/19). Les espèces dont la fréquence est supérieure à 5% sont indiquées en gras.

Order	Family	Genus	Species	Nombre d'occurrences
Coleoptera	Scarabaeidae	*Serica*	***Serica brunnea***	103
Coleoptera	Curculionidae	*Curculio*	*Curculio elephas*	37
Coleoptera	Scarabaeidae	*Amphimallon*	*Amphimallon majale*	28
Coleoptera	Scarabaeidae	*Amphimallon*	*Amphimallon solstitiale*	18
Coleoptera	Dermestidae	*Anthrenus*	*Anthrenus verbasci*	8
Coleoptera	Scarabaeidae	*Melolontha*	*Melolontha melolontha*	7
Coleoptera	Dermestidae	*Attagenus*	*Attagenus pellio*	1
Coleoptera	Laemophloeidae	*Cryptolestes*	*Cryptolestes pusillus*	1
Diptera	Muscidae	*Musca*	***Musca autumnalis***	73
Diptera	Tipulidae	*Tipula*	***Tipula maxima***	52
Diptera	Tipulidae	*Nephrotoma*	*Nephrotoma flavescens*	18
Diptera	Tipulidae	*Tipula*	*Tipula lateralis*	12
Diptera	Tipulidae	*Nephrotoma*	*Nephrotoma appendiculata*	10
Diptera	Tipulidae	*Tipula*	*Tipula oleracea*	9
Diptera	Tipulidae	*Tipula*	*Tipula vernalis*	4
Diptera	Syrphidae	*Eristalis*	*Eristalis tenax*	1
Hemiptera	Miridae	*Adelphocoris*	*Adelphocoris lineolatus*	35
Hemiptera	Cicadellidae	*Fieberiella*	*Fieberiella florii*	1
Hemiptera	Cicadellidae	*Oncopsis*	*Oncopsis flavicollis*	1
Hemiptera	Miridae	*Orthops*	*Orthops kalmii*	1
Hemiptera	Aphrophoridae	*Philaenus*	*Philaenus spumarius*	1
Hemiptera	Aphididae	*Tuberculatus*	*Tuberculatus annulatus*	1
Lepidoptera	Tortricidae	*Tortrix*	***Tortrix viridana***	65
Lepidoptera	Noctuidae	*Agrotis*	*Agrotis exclamationis*	46
Lepidoptera	Tortricidae	*Ancylis*	*Ancylis achatana*	39
Lepidoptera	Lasiocampidae	*Malacosoma*	*Malacosoma neustria*	38
Lepidoptera	Tortricidae	*Cydia*	*Cydia splendana*	37
Lepidoptera	Notodontidae	*Thaumetopoea*	*Thaumetopoea pityocampa*	35
Lepidoptera	Tortricidae	*Archips*	*Archips xylosteana*	30
Lepidoptera	Noctuidae	*Agrotis*	*Agrotis segetum*	29
Lepidoptera	Depressariidae	*Carcina*	*Carcina quercana*	29
Lepidoptera	Erebidae	*Euproctis*	*Euproctis chrysorrhoea*	29
Lepidoptera	Crambidae	*Chrysoteuchia*	*Chrysoteuchia culmella*	26
Lepidoptera	Hepialidae	*Hepialus*	*Hepialus humuli*	26
Lepidoptera	Noctuidae	*Autographa*	*Autographa gamma*	25
Lepidoptera	Tortricidae	*Celypha*	*Celypha lacunana*	25
Lepidoptera	Cossidae	*Cossus*	*Cossus cossus*	25

Lepidoptera	Plutellidae	*Plutella*	*Plutella xylostella*	25
Lepidoptera	Sphingidae	*Sphinx*	*Sphinx ligustri*	24
Lepidoptera	Noctuidae	*Trachea*	*Trachea atriplicis*	24
Lepidoptera	Tortricidae	*Aleimma*	*Aleimma loeflingiana*	22
Lepidoptera	Tortricidae	*Archips*	*Archips podana*	22
Lepidoptera	Geometridae	*Chiasmia*	*Chiasmia clathrata*	16
Lepidoptera	Notodontidae	*Phalera*	*Phalera bucephala*	16
Lepidoptera	Tortricidae	*Cydia*	*Cydia amplana*	15
Lepidoptera	Pterophoridae	*Emmelina*	*Emmelina monodactyla*	15
Lepidoptera	Lasiocampidae	*Gastropacha*	*Gastropacha quercifolia*	15
Lepidoptera	Lasiocampidae	*Dendrolimus*	*Dendrolimus pini*	14
Lepidoptera	Praydidae	*Prays*	*Prays fraxinella*	14
Lepidoptera	Tortricidae	*Gypsonoma*	*Gypsonoma dealbana*	12
Lepidoptera	Noctuidae	*Noctua*	*Noctua pronuba*	12
Lepidoptera	Tortricidae	*Orthotaenia*	*Orthotaenia undulana*	12
Lepidoptera	Tortricidae	*Pandemis*	*Pandemis heparana*	12
Lepidoptera	Tortricidae	*Acleris*	*Acleris variegana*	11
Lepidoptera	Erebidae	*Arctia*	*Arctia caja*	11
Lepidoptera	Geometridae	*Crocallis*	*Crocallis elinguaria*	11
Lepidoptera	Lasiocampidae	*Lasiocampa*	*Lasiocampa quercus*	11
Lepidoptera	Erebidae	*Lymantria*	*Lymantria dispar*	11
Lepidoptera	Noctuidae	*Sesamia*	*Sesamia nonagrioides*	11
Lepidoptera	Tortricidae	*Archips*	*Archips crataegana*	10
Lepidoptera	Crambidae	*Agriphila*	*Agriphila straminella*	9
Lepidoptera	Tortricidae	*Pandemis*	*Pandemis cerasana*	9
Lepidoptera	Tortricidae	*Lozotaenia*	*Lozotaenia forsterana*	8
Lepidoptera	Noctuidae	*Macdunnoughia*	*Macdunnoughia confusa*	8
Lepidoptera	Sphingidae	*Deilephila*	*Deilephila elpenor*	7
Lepidoptera	Erebidae	*Euproctis*	*Euproctis similis*	7
Lepidoptera	Tortricidae	*Hedya*	*Hedya nubiferana*	7
Lepidoptera	Tortricidae	*Notocelia*	*Notocelia roborana*	7
Lepidoptera	Noctuidae	*Cosmia*	*Cosmia trapezina*	6
Lepidoptera	Sphingidae	*Mimas*	*Mimas tiliae*	6
Lepidoptera	Gelechiidae	*Aproaerema*	*Aproaerema anthyllidella*	5
Lepidoptera	Noctuidae	*Mythimna*	*Mythimna unipuncta*	5
Lepidoptera	Tortricidae	*Acleris*	*Acleris rhombana*	4
Lepidoptera	Noctuidae	*Acronicta*	*Acronicta rumicis*	4
Lepidoptera	Tortricidae	*Epinotia*	*Epinotia tenerana*	4
Lepidoptera	Geometridae	*Lomaspilis*	*Lomaspilis marginata*	4
Lepidoptera	Erebidae	*Lymantria*	*Lymantria monacha*	4
Lepidoptera	Coleophoridae	*Coleophora*	*Coleophora alcyonipennella*	3
Lepidoptera	Tortricidae	*Grapholita*	*Grapholita funebrana*	3
Lepidoptera	Tortricidae	*Hedya*	*Hedya pruniana*	3
Lepidoptera	Noctuidae	*Phlogophora*	*Phlogophora meticulosa*	3
Lepidoptera	Tortricidae	*Spilonota*	*Spilonota ocellana*	3

Lepidoptera	Tortricidae	*Acleris*	*Acleris forsskaleana*	2
Lepidoptera	Tortricidae	*Acleris*	*Acleris holmiana*	2
Lepidoptera	Noctuidae	*Amphipyra*	*Amphipyra pyramidea*	2
Lepidoptera	Noctuidae	*Anarta*	*Anarta trifolii*	2
Lepidoptera	Geometridae	*Apeira*	*Apeira syringaria*	2
Lepidoptera	Coleophoridae	*Coleophora*	*Coleophora spinella*	2
Lepidoptera	Tortricidae	*Cydia*	*Cydia fagiglandana*	2
Lepidoptera	Geometridae	*Ectropis*	*Ectropis crepuscularia*	2
Lepidoptera	Geometridae	*Gymnoscelis*	*Gymnoscelis rufifasciata*	2
Lepidoptera	Tortricidae	*Neosphaleroptera*	*Neosphaleroptera nubilana*	2
Lepidoptera	Tortricidae	*Notocelia*	*Notocelia uddmanniana*	2
Lepidoptera	Geometridae	*Peribatodes*	*Peribatodes rhomboidaria*	2
Lepidoptera	Noctuidae	*Peridroma*	*Peridroma saucia*	2
Lepidoptera	Crambidae	*Pleuroptya*	*Pleuroptya ruralis*	2
Lepidoptera	Erebidae	*Scoliopteryx*	*Scoliopteryx libatrix*	2
Lepidoptera	Crambidae	*Sitochroa*	*Sitochroa verticalis*	2
Lepidoptera	Notodontidae	*Stauropus*	*Stauropus fagi*	2
Lepidoptera	Noctuidae	*Subacronicta*	*Subacronicta megacephala*	2
Lepidoptera	Crambidae	*Udea*	*Udea ferrugalis*	2
Lepidoptera	Tortricidae	*Acleris*	*Acleris ferrugana*	1
Lepidoptera	Noctuidae	*Acronicta*	*Acronicta aceris*	1
Lepidoptera	Noctuidae	*Amphipyra*	*Amphipyra tragopoginis*	1
Lepidoptera	Geometridae	*Biston*	*Biston betularia*	1
Lepidoptera	Gracillariidae	*Caloptilia*	*Caloptilia alchimiella*	1
Lepidoptera	Geometridae	*Campaea*	*Campaea margaritaria*	1
Lepidoptera	Noctuidae	*Caradrina*	*Caradrina clavipalpis*	1
Lepidoptera	Coleophoridae	*Coleophora*	*Coleophora hemerobiella*	1
Lepidoptera	Tortricidae	*Crocidosema*	*Crocidosema plebejana*	1
Lepidoptera	Tortricidae	*Ditula*	*Ditula angustiorana*	1
Lepidoptera	Crambidae	*Elophila*	*Elophila nymphaeata*	1
Lepidoptera	Epermeniidae	*Epermenia*	*Epermenia chaerophyllella*	1
Lepidoptera	Pyralidae	*Euzophera*	*Euzophera pinguis*	1
Lepidoptera	Crambidae	*Evergestis*	*Evergestis forficalis*	1
Lepidoptera	Tortricidae	*Gypsonoma*	*Gypsonoma sociana*	1
Lepidoptera	Tortricidae	*Hedya*	*Hedya ochroleucana*	1
Lepidoptera	Noctuidae	*Mamestra*	*Mamestra brassicae*	1
Lepidoptera	Geometridae	*Menophra*	*Menophra abruptaria*	1
Lepidoptera	Tortricidae	*Notocelia*	*Notocelia rosaecolana*	1
Lepidoptera	Lasiocampidae	*Odonestis*	*Odonestis pruni*	1
Lepidoptera	Geometridae	*Opisthograptis*	*Opisthograptis luteolata*	1
Lepidoptera	Geometridae	*Pasiphila*	*Pasiphila rectangulata*	1
Lepidoptera	Gelechiidae	*Recurvaria*	*Recurvaria leucatella*	1
Lepidoptera	Erebidae	*Spilosoma*	*Spilosoma lubricipeda*	1
Lepidoptera	Noctuidae	*Spodoptera*	*Spodoptera exigua*	1
Lepidoptera	Gelechiidae	*Stenolechia*	*Stenolechia gemmella*	1

Lepidoptera	Noctuidae	*Xestia*	*Xestia xanthographa*	1
Lepidoptera	Ypsolophidae	*Ypsolopha*	*Ypsolopha parenthesella*	1
Lepidoptera	Ypsolophidae	*Ypsolopha*	*Ypsolopha scabrella*	1
Lepidoptera	Cossidae	*Zeuzera*	*Zeuzera pyrina*	1
Orthoptera	Tettigoniidae	*Ruspolia*	*Ruspolia nitidula*	1
Thysanoptera	Thripidae	*Thrips*	*Thrips tabaci*	2

Annexe 2. Diversité alpha moyenne par colonie – mois d'échantillonnage (6 = Juin, 7 = Juillet, 8 =Août) pour le jeu de données complet et le jeu de données réduit. Les valeurs indiquées en vert correspondent aux valeurs maximales par rang taxonomique et valeur de q, et les valeurs en rouge correspondent aux valeurs minimales par rang taxonomique et valeur de q.

			ALL6	ALL7	ALL8	ANN6	ANN7	ANN8	BEA6	BEA7	BEA8	LES6	LES7	LES8	SGE6	SGE7	SGE8	XAI6	XAI7	XAI8
Jeu de données complet	Ordre	q=0	2,302	2,699	1,724	2,105	2,500	1,680	1,964	1,618	1,843	1,912	2,474	1,461	2,225	2,033	1,824	2,311	2,243	1,831
	Famille		3,667	4,699	3,207	2,553	4,050	2,680	2,821	3,026	3,012	2,242	4,276	2,355	3,000	3,167	3,078	3,047	3,622	3,237
	Genre		4,603	5,438	3,667	3,132	4,350	3,200	3,262	3,257	3,783	2,333	5,467	2,539	5,225	3,333	3,725	3,884	3,905	4,068
	Espèce		4,841	4,986	3,609	3,135	4,450	2,920	3,072	3,116	3,481	2,606	5,147	2,487	4,775	3,100	3,353	3,907	3,542	3,983
	Ordre	q=1	1,549	1,713	1,252	1,407	1,603	1,184	1,359	1,209	1,306	1,288	1,518	1,118	1,523	1,354	1,231	1,524	1,455	1,299
	Famille		1,907	2,274	1,693	1,400	2,070	1,463	1,480	1,794	1,572	1,290	1,996	1,329	1,732	1,647	1,587	1,666	1,901	1,732
	Genre		2,081	2,511	1,811	1,648	2,214	1,519	1,608	1,856	1,729	1,271	2,315	1,384	2,415	1,707	1,704	1,874	1,967	1,902
	Espèce		2,192	2,400	1,843	1,615	2,273	1,473	1,588	1,853	1,704	1,405	2,210	1,361	2,320	1,593	1,745	1,860	1,852	1,937
Jeu de données réduit	Ordre	q=0	1,613	1,400	1,303	1,286	1,286	1,222	1,250	1,085	1,150	1,280	1,574	1,072	1,444	1,143	1,125	1,700	1,250	1,138
	Famille		1,823	1,700	1,530	1,321	1,500	1,333	1,250	1,128	1,300	1,360	1,792	1,232	1,407	1,286	1,156	1,850	1,676	1,276
	Genre		1,887	1,700	1,530	1,393	1,500	1,333	1,267	1,128	1,300	1,360	1,792	1,232	1,481	1,286	1,156	2,000	1,676	1,276
	Espèce		1,885	1,509	1,538	1,321	1,429	1,333	1,233	1,130	1,300	1,400	1,765	1,232	1,481	1,167	1,156	1,975	1,486	1,276
	Ordre	q=1	1,282	1,153	1,131	1,070	1,216	1,001	1,088	1,036	1,031	1,124	1,241	1,014	1,164	1,050	1,058	1,309	1,108	1,081
	Famille		1,396	1,398	1,219	1,091	1,354	1,112	1,092	1,063	1,060	1,126	1,353	1,117	1,163	1,094	1,070	1,368	1,361	1,178
	Genre		1,400	1,398	1,219	1,139	1,354	1,112	1,093	1,063	1,060	1,126	1,353	1,117	1,167	1,094	1,070	1,425	1,361	1,178
	Espèce		1,397	1,289	1,222	1,112	1,281	1,112	1,090	1,064	1,060	1,165	1,355	1,117	1,167	1,058	1,070	1,397	1,229	1,178

Annexe 3. Résultats A) des analyses de permANOVA et B) d'analyse d'homogénéité de la variance par permutation (999 permutations), basé sur la dissimilarité de Bray-Curtis pour chaque rang taxonomique testé. Les p-values en gras correspondent aux p-values significatives après correction pour test multiples FDR. Ces analyses ont été réalisées sur le jeu de données complet et sur le jeu de données réduit (espèces dont la fréquence est > 5%)

A)			permANOVA		
			Df	F	*p*
Jeu de données complet	Ordre	Mois	2	51.160	**0.001**
		Site	5	10.527	**0.001**
		Mois * site	10	9.401	**0.001**
	Famille	Mois	2	38.527	**0.001**
		Site	5	11.620	**0.001**
		Mois * site	10	7.827	**0.001**
	Genre	Mois	2	28.939	**0.001**
		Site	5	8.7538	**0.001**
		Mois * site	10	7.38	**0.001**
	Espèce	Mois	2	24.992	**0.001**
		Site	5	8.207	**0.001**
		Mois * site	10	7.460	**0.001**
Jeu de données réduit	Ordre	Mois	2	91.334	**0.001**
		Site	5	17.592	**0.001**
		Mois * site	10	12.845	**0.001**
	Famille	Mois	2	46.668	**0.001**
		Site	5	15.561	**0.001**
		Mois * site	10	8.993	**0.001**
	Genre	Mois	2	54.269	**0.001**
		Site	5	14.853	**0.001**
		Mois * site	10	10.056	**0.001**
	Espèce	Mois	2	53.585	**0.001**
		Site	5	14.235	**0.001**

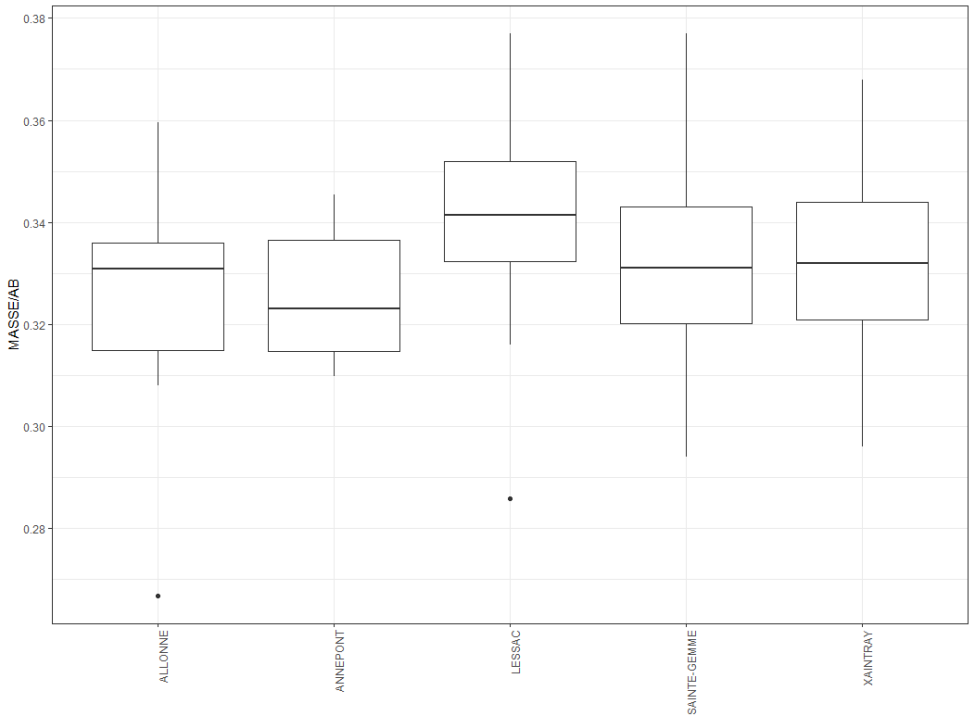
Mois * site	10	10.181	**0.001**

B)		permTest		
		Df	F	p
Jeu de données complet	Ordre	17	11.066	**0.001**
	Famille	17	8.819	**0.001**
	Genre	17	9.928	**0.001**
	Espèce	17	10.419	**0.001**
Jeu de données réduit	Ordre	17	6.782	**0.001**
	Famille	17	4.554	**0.001**
	Genre	17	4.5064	**0.001**
	Espèce	17	4.749	**0.001**

Annexe 4. Résultats des tests de Mantel réalisé entre la matrice de distances paysagères et la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis. Les p-values en gras indiquent une significativité après correction multiple (FDR).

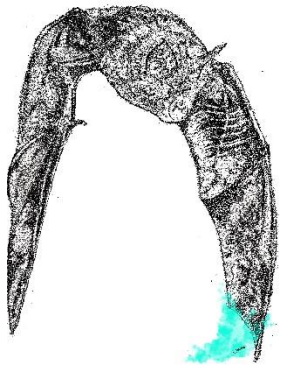
	Jeu de données complet		Jeu de données réduit	
	Observation	*p*	Observation	*p*
Ordre	0,006	0,215	0.023	**0.012**
Famille	0,016	**0,006**	0.017	**0.003**
Genre	0,014	**0,001**	0.030	**0.001**
Espèce	0,011	**0,006**	0.026	**0.001**

Annexe 5. Indice de condition corporelle des femelles adultes non gestantes dans les cinq colonies où ont eu lieu une capture de Grand rhinolophe durant l'été 2018. L'indice de



Grâce aux sessions de captures-recaptures annuelles des Grands rhinolophes en Poitou-Charentes, nous disposons des données biométriques des individus des colonies échantillonnées en 2018 à l'exception de la colonie de Beaumont dans la Vienne pour laquelle aucune capture n'a été réalisée. Les dates de captures s'étendent sur trois semaines de fin juillet à mi-Août 2018 selon les colonies : Allonne (18/07/18), Xaintray (23/07/18), 26/07/18 (Sainte-Gemme), 01/08/18 (Saint-Martin-les-Melle), 02/08/18 (Lessac) et Annepont (13/08/18). La condition corporelle des femelles adultes non gestantes (pour éviter tout biais lié au sexe, à l'âge et à l'état reproducteur) est estimée grâce à ces mesures par le calcul du ratio masse/avant-bras. Un test de Kruskall-Wallis et un test post hoc de Dunn (avec correction pour tests multiples de Benjamini-Hochberg) ont été utilisés pour tester une différence d'indices de condition corporelle entre les colonies. L'indice de condition corporelle des individus en 2018 n'est pas homogène entre les colonies (Kruskal-Wallis chi-squared = 16.692, df = 4, p-value = 0.002219) (Figure S1). Le test post-hoc de Dunn nous indique qu'après correction pour test multiple, l'indice de condition corporelle dans la colonie de Lessac est significativement plus élevé que dans les colonies d'Allonne (p = 0.0039), Annepont (p = 0.0075), Sainte-Gemme (p = 0.0091) et Xaintray (p = 0.0053).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Au cours de cette thèse je me suis intéressée à l'apport de concepts d'écologie évolutive et d'approches moléculaires pour la conservation d'une espèce de chauve-souris (*Rhinolophus ferrumequinum*) dans l'ancienne région de Poitou-Charentes (Ouest de la France) où cette espèce avait été classée comme Vulnérable en 2016 suite à l'observation d'une diminution de 30% des effectifs régionaux entre 2005 et 2015. Face à cette situation, l'objectif de ce travail, initié au travers de collaborations entre partenaires associatifs (PCN) et académiques (LBBE Lyon, CBGP Montpellier), était de décrire la biologie des populations du Grand rhinolophe et de comprendre l'influence du paysage sur le fonctionnement des colonies : le paysage est-il un facteur limitant les flux de gènes des populations ? Au travers du spectre des proies du Grand rhinolophe, peut-on identifier des paysages à conserver en priorité pour préserver les ressources clés de cette espèce ?

1. Bilan des principaux résultats obtenus

Dans un premier temps, grâce à l'utilisation de 17 marqueurs microsatellites, nous avons montré que les colonies de maternité françaises et la colonie de maternité du Pays Basque espagnol (Sud-Ouest des Pyrénées) sont très peu différenciées génétiquement et forment une grande population stable à forte diversité génétique. Nous avons détecté un faible patron d'isolement par la distance entre ces colonies (plus les colonies sont éloignées géographiquement, plus elles sont différenciées génétiquement). Ces résultats, ainsi que la présence de forts coefficient d'apparentement entre individus de colonies très éloignées, soulignent une grande capacité du Grand rhinolophe à se déplacer malgré des caractéristiques biologiques et écologiques peu favorables à des déplacements sur de longues distances (espèce lucifuge, faible distance d'écholocation, dépendance de linéaires paysagers).

Cependant la situation n'est pas homogène dans toute la population puisque nous avons montré que la colonie de Montreuil-sur-Mer dans le Nord de la France (Pas-de-Calais) a une plus faible diversité génétique et une plus grande différenciation génétique avec les autres colonies, ce qui rend cette sous-population plus vulnérable à l'extinction. En l'absence de toute barrière physique évidente expliquant ces caractéristiques, nos résultats suggèrent que d'autres facteurs, tels qu'un habitat plus défavorable, pourraient limiter les flux de gènes.

Dans un deuxième temps nous avons développé une approche d'étude du régime alimentaire qui minimise le dérangement des individus tout en évitant le risque de contaminations et d'assignation à la mauvaise espèce de chauve-souris. Cette approche permet ainsi une identification simultanée de l'espèce de chauve-souris et ses proies - sans toutefois pénaliser l'amplification des proies par une sur-amplification du prédateur – à partir d'échantillons de guano. Cette approche est faiblement invasive, en particulier comparée au prélèvement de fèces lors des captures. Nos résultats ont montré que le choix du/des couple(s) d'amorces optimales varie selon le type d'échantillonnage et la qualité de l'ADN (Figure 44) et repose sur un compromis entre la maximisation de la détection des proies, l'identification du prédateur et les contraintes logistiques: combiner plusieurs couples d'amorces augmente le nombre de proies détectées mais augmente également le bruit dans les données (taxons mal amplifiés, résultats peu répétables), ainsi que le coût et le temps de laboratoire et d'analyses.

Enfin, nous avons appliqué une stratégie optimisée de metabarcoding sur les guanos de Grand rhinolophe pour étudier la plasticité du régime alimentaire de cette espèce en fonction des sites géographiques et tout au long de la saison de maternité. Le Grand rhinolophe se nourrit de proies beaucoup plus diverses (terrestre, aquatique, …) qu'attendu d'après la littérature, mais la majorité de celles-ci sont peu occurrentes. Les patrons de variation sont fortement liés

à la typologie des paysages entourant les colonies. Les espèces les plus fréquemment détectées sont notamment associées à la présence de haies et de prairies permanentes, et quelques-unes aux milieux boisés. Ces éléments du paysage sont donc prioritairement à conserver pour non seulement assurer un maintien de la connectivité entre colonies et zones de chasse, mais également pour préserver les ressources clés du Grand rhinolophe. En l'absence de données sur la disponibilité et la rentabilité des proies présentes dans l'environnement, nous n'avons toutefois pas pu différencier avec certitude le comportement sélectif et/ou opportuniste du Grand rhinolophe au cours de la saison de maternité. Cependant, nos résultats suggèrent une plasticité des stratégies de régime alimentaire selon la qualité du paysage environnant, la phénologie des proies, et les besoins énergétiques et contraintes de vol du Grand rhinolophe.

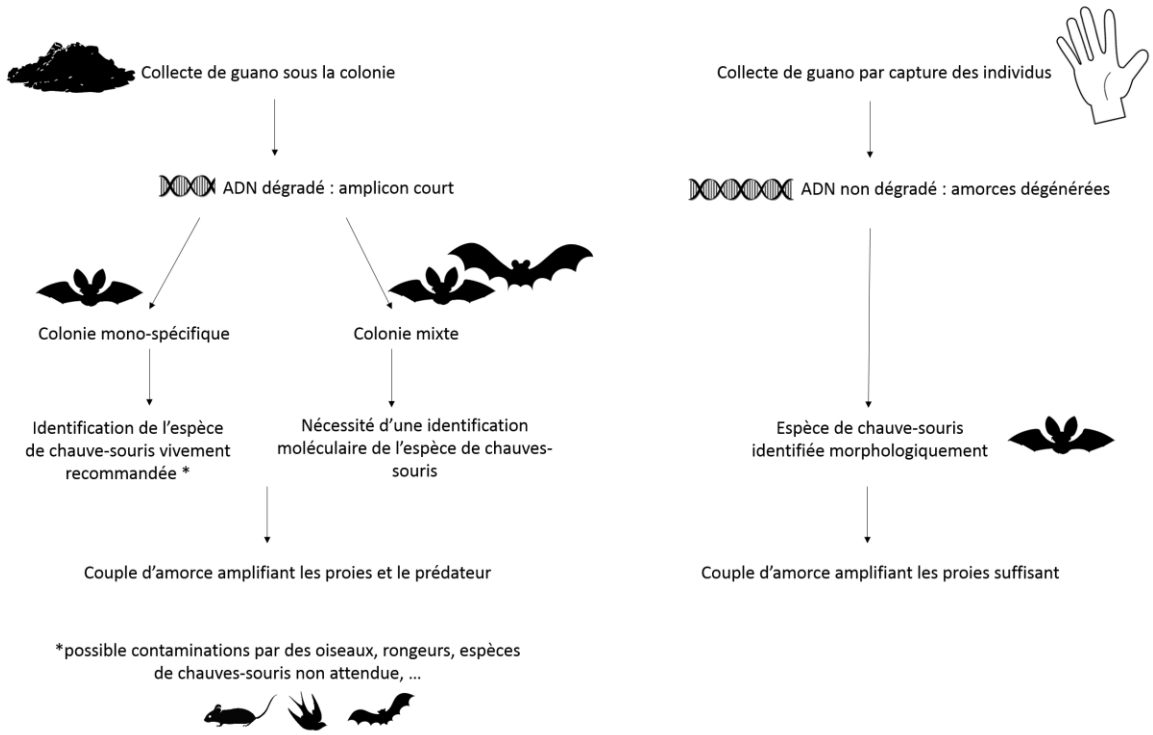


Figure 44. Guide de choix du couple d'amorces pour des analyses de régime alimentaire de chauve-souris insectivores.

2. La génétique des populations en biologie de la conservation : une approche nécessaire mais pas suffisante

Lors de cette thèse nous avons utilisé des méthodes indirectes de génétique des populations pour délimiter les unités de gestion et caractériser les processus démographiques qui régissent le fonctionnement et l'évolution des colonies de Grand rhinolophe, dans l'Ouest de la France et en limites de distribution.

2.1. Les limites de la génétique des populations pour comprendre le fonctionnement des populations

2.1.a. Limites liées aux marqueurs microsatellites

Les microsatellites ont longtemps été les marqueurs les plus utilisés pour décrire la variabilité génétique des populations du fait de leur fort polymorphisme, de leur coût financier relativement bas et de leur relative simplicité d'analyses (DeFaveri et al. 2013). Dans notre étude, avec seulement 17 marqueurs microsatellites, notre puissance de détection d'évènements démographiques récent était cependant limitée pour détecter les signatures de changements démographiques faibles (ex : ratio taille population actuelle /ancestrale = 10) et récents (ex : 10 générations) dans les populations de Grand rhinolophe (Leblois et al. 2014). Une cinquantaine de marqueurs microsatellites permettrait de réduire ce biais et d'obtenir des inférences plus précises de la taille efficace de la population, de l'ancienneté et de l'intensité du changement démographique (Leblois et al. 2014). L'avènement des approches de génomique permet aujourd'hui de dépasser les limites liées au faible nombre de marqueurs. Le séquençage des génomes de chiroptères permet de détecter une très

importante quantité de marqueurs microsatellites pour lesquels il est ensuite possible de définir des protocoles de génotypage. Une initiative visant à séquencer les génomes de la quasi-totalité des espèces de chauves-souris vivantes a récemment vu le jour (*Bat1K Project* ; Teeling et al. 2018). Le génome du Grand rhinolophe étant déjà disponible (GenomeArk – Vertebrate Genomes Project), nous avons développé une trentaine de nouveaux marqueurs microsatellites dans le cadre du programme sur le Grand rhinolophe qui permettront de gagner en puissance et précision pour nos futures inférences démographiques.

Une autre possibilité de développements de marqueurs moléculaires à partir des génomes séquencés de chiroptères concerne les polymorphismes de simple base (SNPs ; mutation d'un nucléotide à une position donnée). Avec l'avènement des NGS il est désormais possible de séquencer et génotyper simultanément plusieurs milliers de SNPs répartis le long du génome (Davey et al. 2011). Des études de simulations et empiriques suggèrent que des milliers de SNP sont plus efficaces que des dizaines de microsatellites pour révéler la structure génétique, particulièrement en cas d'admixture (Haasl et Payseur 2011; Vendrami et al. 2017). Rašić et al. (2014) ont par exemple montré qu'environ 18 000 SNP permettent une bien meilleure résolution dans la détection de structure génétique sur trois continents différents et des apparentements à fine échelle du moustique *Aedes aegypti* qu'avec huit microsatellites. A l'aide de 13 000 SNPs, Zhao et al. (2013) ont pu fournir un aperçu continu de l'histoire évolutive et de la structure génétique d'une population de pandas en Chine, et montrer que les perturbations anthropiques récentes sont probablement une des principales raisons du statut d'espèce en danger du panda. Les SNP sont donc des marqueurs attrayants, d'autant plus qu'ils permettent de combiner des données spatiales et temporelles issues de plusieurs laboratoires ou séquenceurs (revue dans Helyar et al. 2011). Bien que de nombreuses études aient montré que les SNPs puissent être plus performants et précis que les microsatellites en

terme d'inférences démographiques ou de description de la variabilité génétique (Liu et al. 2005; Muñoz et al. 2017), les résultats ne changent pas toujours drastiquement les interprétations et les conclusions préalablement obtenues avec les marqueurs microsatellites (McMahon, Teeling, et Höglund 2014; Lemopoulos et al. 2019). Il existe toutefois plusieurs limites associées à l'utilisation des SNPs : i) la nécessité d'un ADN d'excellente qualité (McMahon, Teeling, et Höglund 2014; Russello et al. 2015), ii) le biais lié aux SNPs évoluant sous sélection et le biais d'identification des SNPs (polymorphismes découverts à partir d'un échantillon réduit d'individus pas forcément représentatifs des populations ; selon la taille de l'échantillon seuls les allèles à forte fréquence pourront être découverts) qui biaisent les estimations de structure génétique et d'inférence démographiques (Albrechtsen, Nielsen, et Nielsen 2010; Kuhner et al. 2000; Luikart et al. 2003), iii) l'énorme quantité de données générées qui nécessite une expertise en bio-informatique et le développement d'algorithmes permettant d'automatiser leur gestion (McCormack et al. 2013). Le coût financier peut également être un problème, bien qu'il puisse être compensé par un nombre plus réduit d'individus analysés ou un mélange d'individus (McMahon, Teeling, et Höglund 2014; Helyar et al. 2011).

2.1.b. Difficultés d'estimation de la taille des populations et des mouvements individuels

Au-delà de ces questions techniques, une autre limite de la génétique des populations est que les paramètres estimés par cette approche indirecte (taille efficace, flux de gènes) ne sont pas identiques ou simplement reliés aux paramètres estimés par les approches directes de suivis individuels, et requis par les gestionnaires (taille des populations, mouvements d'individus).

Pour les gestionnaires par exemple, un paramètre démographique très important est la taille de la population, c'est-à-dire le nombre d'individus adultes qui la compose (N_c). Or il n'est pas possible d'estimer directement N_c avec des données génétiques. Il est pourtant possible d'inférer la taille efficace de la population (N_e ; correspondant au nombre d'individus participant à la reproduction) à condition de connaître le taux de mutation de l'espèce. Or cette donnée est très rarement connue, et elle ne l'est actuellement pas pour le Grand rhinolophe. L'estimation de N_e est donc biaisée. Dans notre cas si l'on considère un taux de mutation $\mu = 1.10^{-3}$ (moyenne géométrique des taux de mutations multiples signalés chez d'autres mammifères) - comme utilisé pour la chauve-souris rousse (*Lasiurus borealis*) (Munster 2015) - alors on obtient une taille de population effective comprise entre 1150 et 1727 individus participant à la reproduction. Divers facteurs peuvent mener à un N_e plus faible que le N_c déterminé chez les chauves-souris, comme la variation du succès de reproduction entre individus, les générations chevauchantes, les fluctuations de taille de la population (Vonhof et Russell 2015). Des tentatives ont été faites pour transformer les estimations de N_e en N_c et pour les mammifères, le rapport moyen N_e / N_c est de 0,34 (Frankham, 1995). Si nous appliquons ce rapport moyen (0,34) à nos estimations ponctuelles de N_e, nous obtenons des estimations de N_c comprises entre 3282 à 5079 individus adultes. Ces chiffres sont bien inférieurs aux estimations réalisées en période estivale en France – 47 600 individus (adultes et juvéniles ; Coordination Chiroptères Nationale SFEPM - Vincent, 2014). Il existe un certain nombre de problèmes méthodologiques qui ne permettent pas d'avoir confiance dans cette estimation (Vonhof et Russell 2015; Luikart et al. 2010). Tout d'abord nous ne savons pas comment ce ratio moyen des mammifères peut varier face aux fait que : 1) l'estimation de N_e par approche de coalescence est biaisée par le taux de mutation et donc toute inexactitude dans l'estimation du taux de mutation est amplifiée dans le calcul ultérieur de N_e ($N_e = \Theta/4\mu$),

2) la majorité des estimations proviennent d'organismes dont le cycle de vie est très différent de celui des chauves-souris, et nous ne savons pas dans quelle mesure le ratio N_e / N_c pour les chauves-souris peut varier de la moyenne globale. A ce jour, il est donc nécessaire de poursuivre les estimations de taille de population N_c par les méthodes directes de comptage. Il pourrait également être intéressant de collecter les données de N_e et N_c pour un grand nombre de colonies de chiroptères européens, afin d'étudier les variations du ratio N_e / N_c entre espèces et entre colonies d'une même espèce. Une telle étude permettrait de mieux estimer la gamme de valeurs possibles du ratio N_e / N_c mais également d'analyser les facteurs qui influencent ces variations (traits d'histoire de vie, phylogénie, …).

De façon similaire, les flux de gènes ne renseignent pas directement sur le mouvement net d'individus entre différents sites. Ils correspondent aux mouvements d'individus qui se sont reproduits avec succès hors de leur lieu de naissance. Ainsi, les données de génétique des populations ne permettent pas toujours de déterminer précisément les processus sous-jacents aux patrons de structure génétique détectés. En effet, plusieurs processus démographiques peuvent parfois mener à un même patron (Russell, Medellín, et Mccracken 2005). Ainsi, l'absence de structuration génétique de la population Franco-Basque de Grand rhinolophe pourrait être liée à la dispersion à grande distance des individus adultes, à de la dispersion natale (mouvement des juvéniles au cours de leur première année, de leur colonie de naissance à une autre) et / ou aux mouvements d'adultes d'une colonie de maternité à l'autre entre deux événements de reproduction consécutifs.

Une méthode alternative pour évaluer la dispersion sans capturer directement les individus est de travailler à partir du guano collecté sous les colonies et d'établir des suivis

longitudinaux. La méthode génétique non invasive de « capture /recapture » correspond alors à la détection des génotypes individuels dans le guano, que l'on collecte une première fois avant la naissance des juvéniles pour n'échantillonner que des individus adultes, et une seconde fois après les naissances pendant plusieurs années pour (ré)échantillonner les adultes et les juvéniles (Jan et al. 2019). Ces données de génétique non-invasives permettent une distinction de l'âge (adulte, juvénile), des liens de parenté (adulte mère, non-mère, juvénile) et du sexe (femelle, mâle) des individus. Elles permettent également d'estimer la survie des individus et la taille des populations (Puechmaille et Petit 2007; Petit et Valiere 2006; Jan et al. 2019). Il serait intéressant d'appliquer cette approche non invasive de capture-recapture sur un échantillonnage à grande échelle du Grand rhinolophe et sur plusieurs années afin de déterminer l'influence relative des déplacements des juvéniles et des adultes sur la faible structure génétique observée dans l'Ouest de la France. Cependant, l'ADN contenu dans le guano est de moins bonne qualité que celui du patagium, ce qui entraine des erreurs de génotypage plus importantes et nécessite donc de nombreux réplicas de génotypage, augmentant de fait le coût et le travail de laboratoire (Boston et al. 2012). Ces coûts sont d'autant plus importants que le nombre de marqueurs est grand. Comme il est impossible de distinguer morphologiquement si les guanos proviennent du même individu, il faut collecter et analyser beaucoup d'échantillons pour être sûr d'avoir génotypé assez d'individus différents par colonie. Par exemple pour l'étude du Chapitre 1 nous avons traité environ 1000 individus (950 conservés pour les analyses) pour un coût de 3.98€/échantillon (de l'extraction au génotypage), ce qui reviendrait sur du guano à un coût de 11.94€/échantillons *a minima* en partant du principe que le multiplexage des 17 microsatellites est possible sur le guano et que trois réplicas par guano suffisent dans ce cas pour limiter les erreurs de génotypage.

Une autre stratégie plus applicable à nos données est donc de combiner les résultats de génétique des populations à des études de suivis individuels par capture-marquage-recapture des Grands rhinolophes.

2.2. Les suivis individuels, approches complémentaires et indispensables à la génétique des populations

Les suivis individuels permettent d'acquérir des données importantes sur la dispersion et la survie des individus (O'Shea, Ellison, et Stanley 2011; Hutterer et al. 2005). Un tel programme de capture-marquage-recapture (à l'aide de transpondeurs < 1.1mm et *m* = 0.115g) a été initié en 2015 en Poitou-Charentes puis dans les région voisines pour appréhender la dynamique des populations et comprendre le fonctionnement des colonies de Grand rhinolophe (ex : taux de survie, déplacements inter-saisonniers, fidélités aux sites). Les données préliminaires des 3777 individus marqués (2015-2018) montrent que les Grands rhinolophes (adultes et juvéniles confondus) parcourent des distances entre sites de maternité et d'hiver d'une moyenne de 41,3 km avec un maximum de 147 km. De plus, les taux de retour des juvéniles et des femelles de deux ans ou plus sur les colonies de mise bas sont élevés (entre 60% et 80% des femelles et 30 et 40% des mâles) (Rapport d'activité 2018-2019, Leuchtmann et al. 2019). Ceci suggère que la faible différenciation génétique observée entre les colonies de l'Ouest de la France et du Pays basque espagnol est probablement due à la dispersion à grande distance des individus et à la dispersion natale. Cependant, en l'absence de connaissances sur la localisation des sites de reproduction de cette espèce (où ont lieu les flux de gènes), il est difficile de conclure sur l'influence relative de ces deux processus démographiques. La plupart des espèces de chauves-souris insectivores se réunissent sur des sites à l'automne pour se

reproduire (sites de *swarming*) ce qui facilite la localisation et l'étude des individus à cette période-là. La combinaison de données génétiques (microsatellites) et comportementales (baguage et radiopistage) a par exemple pu être utilisée sur le Murin de Bechstein pour montrer que les flux de gènes se produisent principalement en dehors de l'habitat d'été, sur des sites de *swarming* (Kerth et Morf 2004; Kerth et Schaik 2012). Or ce comportement n'est pas connu chez le Grand rhinolophe et complique donc le suivi de la reproduction. Idéalement l'identification des sites de reproduction pourrait être effectuée à l'aide d'un émetteur actif, détectable par un système satellite qui retrace la localisation de l'animal sans qu'il soit nécessaire de le suivre activement (radiopistage) ou de le recapturer passivement (transpondeur) ou activement (baguage) (Holland et Wikelski 2009). Malheureusement ce type de suivi n'est pas possible sur des animaux aussi petits que le Grand rhinolophe mais cette espèce pourrait en revanche dans le futur bénéficier du développement du radiopistage automatique (Gottwald et al. 2019). Dans l'attente de la mise à disposition d'outils permettant de cibler les sites de reproduction, puisque des accouplements sont fréquemment observés pendant la période hivernale (M. Leuchtmann & O. Filippi-Codaccioni, com. pers.), on peut imaginer que l'absence de structure génétique à une si grande échelle provienne en partie de la distance parcourue entre gîtes d'été et gîtes d'hiver (distance maximale enregistrée à ce jour grâce aux données de transpondage : 147km).

2.3. Application à l'étude des colonies en limites d'aires de répartition

La combinaison d'approches génétique et non génétique serait particulièrement utile pour comprendre pourquoi les colonies en limite Nord d'aire de répartition du Grand rhinolophe sont plus isolées génétiquement et potentiellement plus vulnérables que celles en cœur d'aire

de répartition. D'une part il est nécessaire d'élargir l'échantillonnage à plus de colonies pour déterminer si le patron observé est localisé ou s'il est représentatif de la situation en limite Nord de l'aire de répartition. Pour cela des échantillons supplémentaires du Nord, Nord-Est de la France et de l'Allemagne seront analysés dans l'année à venir et une collaboration avec les pays limitrophes où la situation du Grand rhinolophe est critique (Luxembourg, Belgique ; Kervyn et al. 2009; Pir 2009) sera particulièrement pertinente. Les patrons génétiques observés dans notre étude suggèrent des mouvements restreints à une échelle locale qui défavorisent les flux de gènes entre individus de colonies éloignées. Ceci a également été observé chez le Petit rhinolophe : les capacités de dispersion limitées de cette espèce impliquent que la diversité génétique dépend de la connectivité entre populations, et notamment de l'abondance de l'espèce dans la région avoisinante (Jan 2017). Les populations les plus isolées de Petit rhinolophe sont donc particulièrement fragiles, et présentent des risques d'extinction élevés à long terme (Jan 2017). Il serait intéressant de marquer (transpondage) et de suivre les individus de Grand rhinolophe en limite Nord d'aire de répartition pour mieux comprendre les évènements de dispersion entre ces colonies *a priori* plus vulnérables et moins connectées que dans le cœur de la population. Des analyses complémentaires de la connectivité paysagère et des conditions environnementales permettront également de mieux comprendre ce qui limite ses capacités de déplacement dans les paysages en limite Nord de l'aire de répartition, tels que les conditions climatiques, la disponibilité et la qualité des ressources (ex : gîtes et aires de chasses) (Pinaud et al. 2018; Jan et al. 2019; Froidevaux et al. 2017).

3. Déclin, pression de sélection et génomique de l'adaptation pour la conservation

Ces colonies particulièrement isolées et génétiquement plus pauvres en limite d'aire de répartition du Grand rhinolophe (ex : colonies du Nord de la France) pourraient être cruciales pour les capacités de changements d'aire de répartition de l'espèce, par exemple en réponse au changement climatique (Gibson, Marel, et Starzomski 2009). Nos travaux, basés sur les marqueurs microsatellites, se sont uniquement intéressés à la diversité génétique neutre, c'est-à-dire non soumise à la force évolutive de la sélection.

L'étude de la sélection qui agit sur les colonies de la 'grande' population identifiée dans notre étude pourrait être compromise du fait des importants flux de gènes détectés au sein de cette population. En revanche, il pourrait être particulièrement intéressant d'analyser les pressions de sélection qui s'exercent sur les colonies les plus isolées en Nord d'aire de répartition. L'idéal serait d'effectuer un scan génomique pour chercher des gènes sous sélection dans l'ensemble du génome sans *a priori* (*genome wide scan)*, cependant cette méthode d'analyse requiert un génome de référence bien annoté pour pouvoir *in fine* déterminer la fonction des gènes détectés sous sélection. Or, l'assemblage et l'annotation du génome du Grand rhinolophe restent malheureusement encore de mauvaise qualité. Ces approches génomiques sans *a priori* ne sont donc pas envisagées à l'heure actuelle. Une alternative intéressante serait de se concentrer sur des gènes candidats codant pour des protéines liées à la réponse aux pressions majeures pouvant affecter les colonies de Grand rhinolophe. Il semble que le Grand rhinolophe soit particulièrement vulnérable aux polluants d'origine anthropique (ex : pesticides, métaux lourds) de par son régime alimentaire et ses habitats partagés (gîtes, zones de chasse) avec l'humain (Mathews et al. 2018). Des analyses

comparatives de concentrations d'éléments traces métalliques (ETM) contenus dans les poils de Grands rhinolophes ont été effectuées en 2017 sur dix colonies de maternité de Poitou-Charentes (R. Scheiffler, comm. pers.). Bien que certaines concentrations d'ETM au sein de certaines colonies soient beaucoup plus élevées (ex : environ 27 fois plus de Molybdène et six fois plus de Cadmium à Lessac qui est située dans un viaduc routier à fort trafic), les résultats montrent des concentrations très faibles pour chaque ETM testé par rapport à d'autres espèces de chiroptères (Annexe 6). Ces résultats semblent cohérents au regard de l'environnement peu urbanisé/industrialisé des colonies étudiées. Des analyses similaires pourraient être effectuées dans les colonies du Nord de la France et comparées avec celles des colonies de l'Ouest de la France afin de déterminer l'intérêt de chercher des patrons de sélection associés à la pollution par les métaux. En cas de pollution métallique forte, nous pourrions par exemple étudier les gènes MT-1 et MT-2 codant pour des enzymes appelées métallothionéines (MTs) impliquées dans la détoxification des polluants métalliques (Pikula et al. 2010; Roesijadi 1996).

Puisque les insecticides peuvent impacter la physiologie et la survie des chauves-souris (Bayat et al. 2014; Clark, LaVal, et Swineford 1978; Hooton et al. 2016) il serait pertinent d'évaluer l'impact des pressions liées à l'application de pesticides, et de rechercher des signatures de sélection sur les gènes codant pour le récepteur cellulaire Aryl hydrocarbone Receptor (AhR) qui régule des enzymes impliquées dans la détoxification de polluants organiques (cytochromes P450 ; Whitlock 1986), et qui est connu pour se lier à une variété de substances chimiques qui entraînent divers troubles de la reproduction et de la santé chez les vertébrés (ex : anomalies congénitales, neurotoxicité, létalité ; Noguerol et al. 2006; Takeuchi et al. 2008). Une analyse préliminaire des contaminations des Grands rhinolophes par les pesticides

n'est cependant à ce jour pas réalisable car ces analyses sont habituellement réalisées à partir des organes prélevés sur des individus morts (ex: tissus graisseux; Kannan et al. 2010) et nécessitent donc une mise au point préalable pour être effectuées sur du matériel biologique moins invasif tel que du guano.

Enfin, les pesticides peuvent fortement affecter le fonctionnement du système immunitaire des vertébrés (Galloway et Handy 2003). Or les chauves-souris sont de très importants réservoirs de pathogènes (Luis et al. 2013). Généralement asymptomatiques, elles peuvent toutefois subir de fortes mortalités associées à des virus, bactéries ou champignons (ex: *Lyssavirus* spp., *Borellia* spp., *Geomyces destructans*; Brook et Dobson 2015). La pression de sélection exercée par de tels pathogènes peut être extrêmement forte, comme reporté pour le champignon *Geomyces destructans* qui cause le syndrome du nez blanc entrainant des mortalités massives de plusieurs espèces de chauves-souris Nord-Américaines suite à son introduction depuis l'Europe (Langwig et al. 2017). A ce jour, nous ne disposons que de données d'ectoparasitisme sur les Grands rhinolophes capturés en Poitou-Charentes. Nous avons pu collecter des tiques et des diptères alaires lors des captures. Cependant, les prévalences de ces ectoparasites sont très faibles : sur 1072 Grands rhinolophes capturés en 2016, moins d'une trentaine d'individus seulement était infectée par des ectoparasites. Il est donc peu probable que ces derniers exercent une forte pression de sélection en Poitou-Charentes, mais il serait intéressant d'avoir de telles données sur les populations du Nord de la France, et pour d'autres pathogènes. L'application récente des méthodes de séquençage haut-débit à la description du pathobiome est une perspective possible pour mieux évaluer la pression parasitaire sur ces colonies de chauve-souris (Razzauti et al. 2015; Galan et al. 2016). En parallèle, nous pourrions étudier la variabilité génétique de gènes codant pour des molécules impliquées dans l'immunité, telles que le complexe majeur d'histocompatibilité

classe I et II, les récepteurs Toll-like ou les interférons (Baker, Schountz, et Wang 2013; Schad et Voigt 2016; Brook et Dobson 2015).

Enfin, la génétique adaptative est particulièrement intéressante pour les gestionnaires qui souhaitent renforcer des populations en déclin, par exemple pour minimiser le risque de dépression d'hybride (*outbreeding depression*) lors des renforcements de population (Funk et al. 2012; Allendorf, Hohenlohe, et Luikart 2010; McMahon, Teeling, et Höglund 2014). Au début des années 2000, une expérience de transfert de onze individus Grands rhinolophes dans des colonies relictuelles a été réalisée en Suisse, où cette espèce a subi un très fort déclin, afin de déterminer si cette approche pourrait accélérer l'expansion de la population et favoriser l'atténuation des symptômes typiques des petites populations (Weinberg, Bontadina, et Arlettaz 2009). Quel que soit l'âge et le sexe, l'ensemble des individus transférés à environ 18km sont immédiatement retournés dans leur colonie initiale ou sont morts, tandis que les deux individus transférés à plus de 148km ont été observés autour de leur nouvelle colonie pendant deux ans après leur transfert. Le fait que le transfert d'un des deux individus déplacés à longue distance ait abouti à une installation à moyen terme et même à une tentative de reproduction (mort de l'embryon) montre que les Grands rhinolophes sont capables de trouver des zones de chasse et des gîtes d'hibernation dans un environnement pratiquement totalement inconnu, et qu'ils sont acceptés par les colonies. Cependant, en raison du très faible effort d'échantillonnage de cette étude et en l'absence de connaissances à plus long terme des risques pour les individus transférés, ces résultats nécessitent confirmation avant d'envisager l'application de tels transferts d'individus dans des programmes de conservation. Il est notamment primordial de déterminer si l'installation est pérenne, d'évaluer la valeur sélective (survie, reproduction) des individus transférés, la valeur

sélective des individus issus de la reproduction entre les individus transférés et locaux, et d'analyser l'influence de facteurs génétiques dans le succès du transfert réalisé.

Parmi les déterminants importants de la valeur sélective des individus, le régime alimentaire peut avoir un rôle majeur, notamment car la quantité et la qualité des ressources ingérées affectent de nombreux traits d'histoire de vie tel que la croissance, la reproduction, l'immunité (Perrig et al. 2017; Yuan et al. 2018; Brodmann et al. 1997; Andersen, Færøvig, et Hessen 2007; Arnott, Brand, et Kos 1986; Pap et al. 2009). Or le régime alimentaire peut être fortement impacté par les pressions anthropiques, comme l'utilisation des pesticides qui va contaminer et réduire la quantité des arthropodes disponible pour les insectivores (Hallmann et al. 2017; Desneux, Decourtye, et Delpuech 2007). C'est donc un trait au cœur de l'adaptation qui implique des évolutions morphologiques (ex : nombre de papilles linguales, glande salivaire ; Abumandour et El-Bakary 2013; Phillips et al. 2014) ou métagénomique (ex : microbiome ; Phillips et al. 2017; Carrillo-Araujo et al. 2015). Avant de pouvoir étudier le régime alimentaire des chauves-souris insectivores et de potentielles adaptations en lien avec les pressions anthropiques il est donc important d'avoir une connaissance profonde du régime alimentaire.

4. Le régime alimentaire, un trait écologique complexe

4.1. Mieux décrire la plasticité du régime alimentaire

Le régime alimentaire est décrit par plusieurs aspects : la diversité alimentaire (nombre d'espèces de proies différentes consommées), la composition (identité des espèces de proies consommées) et la contribution de chaque proie au régime alimentaire (quantification) (Klare,

Kamler, et Macdonald 2011). La vision du régime alimentaire des chiroptères pourrait avoir été fortement limitée par les limites méthodologiques des approches morphologiques (Nielsen et al. 2018). Bien que les analyses moléculaires aient permis de mieux décrire la diversité et la composition du régime alimentaire de certaines espèces de chiroptère, elles restent contraintes par deux composantes majeures. Premièrement, l'identification des proies est encore fortement dépendante des bases de données de références, mais cette limite peut être atténuée par la construction d'une base de référence « maison » en amont de l'étude de metabarcoding (McClenaghan, Nol, et Kerr 2019; Sow et al. 2018). Deuxièmement, il est à ce jour encore impossible de quantifier le régime alimentaire (Alberdi et al. 2019; Elbrecht et Leese 2015; Piñol et al. 2015). Par exemple à cause des différences de digestibilité et de taille entre les proies qui font varier la quantité d'ADN de chacune des proies dans le guano. De plus ces différences de quantité d'ADN ne restent pas constantes au cours du processus de biologie moléculaire à cause des préférences d'amplification par les amorces (certaines proies amplifient beaucoup mieux que d'autres). Ainsi on ne peut pas établir une variation linéaire entre la quantité d'ADN initiale et le nombre final de séquences de chaque proie dans un échantillon (Alberdi et al. 2018; Alberdi, Aizpurua, et al. 2019). Pourtant la quantification des proies dans le régime alimentaire du Grand rhinolophe permettrait de mieux évaluer le comportement de sélectivité/opportunisme en reflétant le nombre, la biomasse ou le contenu énergétique associé aux proies ingérées.

De plus, de nombreuses études de régime alimentaire des chiroptères insectivores reposent sur une unique date ou année d'échantillonnage. Or les travaux réalisés sur la Sérotine brune (*Eptesicus fuscus*) ont démontré une très forte variation du régime alimentaire d'une année à l'autre (2008-2011) : les diptères qui représentaient la moitié des proies début 2008 se sont raréfiés tout au long de l'année, tandis que la tendance inverse s'est produite en 2011 (Clare,

Symondson, et Fenton 2014). Il est donc important de développer des recherches basées sur plusieurs échantillonnages au cours de l'année, pendant plusieurs années, pour avoir une image plus complète de la plasticité du régime alimentaire des chiroptères insectivores.

Si la composante temporelle du régime alimentaire est primordiale, il n'en faut pas moins négliger la composante spatiale (Clare et al. 2011). D'après Alberdi, Razgour, et al. (2019), la plasticité et la richesse du régime alimentaire influenceraient l'aire de répartition des espèces européennes de chiroptères. Afin de mieux comprendre la plasticité du régime alimentaire et les facteurs qui influencent cette dernière, il est donc primordial de réaliser des études à des échelles spatiales fine et large (ex : Europe, Aizpurua et al. 2018). Jan et al. (2019) ont notamment montré que le taux de croissance moyen plus élevé de la population de Petit rhinolophe en expansion au Nord de son aire de répartition résulterait d'une acquisition plus importante de ressources. Il serait donc très intéressant de réaliser les analyses de diversité, composition et plasticité du régime alimentaire dans les colonies de la limite Nord de l'aire de répartition du Grand rhinolophe étudiées dans cette thèse : ces colonies pourraient montrer une diversité et une plasticité de régime alimentaire réduites qui limitent la valeur sélective des individus.

4.2. Comparer la plasticité du régime alimentaire des chiroptères généralistes et spécialistes

Une alternative pour analyser la plasticité du régime alimentaire, ses déterminants et ses conséquences chez les espèces de chiroptères insectivores est de comparer des espèces sympatriques - c'est à dire qui partagent le même habitat - généralistes (supposés plastiques) *versus* spécialistes (supposés peu plastiques). Un bon modèle pour cela correspond au couple

Grand rhinolophe / Murin à oreilles échancrées. Ces deux espèces sont connues pour partager leur gîte de maternité (69% des colonies de maternité connues sont mixtes en Poitou-Charentes) et leurs zones de chasse préférentielles (Dietz, Pir, et Hillen 2013a). Le Grand rhinolophe est considéré comme généraliste tandis que le Murin à oreilles échancrées est considéré comme spécialiste. En effet, les analyses morphologiques indiquent que ce dernier se nourrit majoritairement d'araignées (Kervyn et al. 2012) et que ces dernières constituent jusqu'à 80% de son régime alimentaire (Goiti et al. 2011). Il serait donc intéressant de valider par des approches moléculaires de metabarcoding si les espèces supposées spécialistes comme *M. emarginatus* le sont réellement, et d'évaluer quelle est la gamme de leur niche trophique. Dans notre cas, la comparaison des deux espèces *R. ferrumequinum* et *M. emarginatus* est d'autant plus pertinente que leurs tendances démographiques sont très différentes en Poitou-Charentes : d'après les données de comptage de l'association Poitou-Charentes Nature, le Grand rhinolophe montre une très légère augmentation des effectifs depuis les années 90 (+18% des effectifs en 25 ans ; accroissement annuel moyen de 0.8% ± 0.29) tandis que le Murin à oreilles échancrées montre une très forte croissance démographique (+160% des effectifs en 25 ans ; accroissement annuel moyen de 5.2% ± 0.54) (Rapport d'activités 2019 - Phase 3/3 ; Leuchtmann et al. 2019). Nous avons donc réalisé une analyse moléculaire préliminaire du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées pour les colonies mixtes avec le Grand rhinolophe en Poitou-Charentes (Annexe 7). Nos résultats préliminaires montrent une très forte diversité de proies du Murin à oreilles échancrées (jusqu'à 14 ordres, presque 300 espèces) dont de très nombreuses proies peu occurrentes, ainsi qu'un fort degré de variabilité spatiale et saisonnière avec des diptères et des lépidoptères qui peuvent constituer presque 3/4 des occurrences de proies. Ces résultats sont parfaitement en accord avec l'étude récente de Vallejo et al. (2019) qui a réalisé des analyses

moléculaires du régime alimentaire de cette espèce dans plusieurs colonies au cours de la saison de maternité dans la péninsule ibérique. La différence observée avec les études précédentes basées sur la microscopie pourrait provenir d'une sous-représentation des restes de diptères dans les guanos, plus petits et moins chitinisés que les araignées et donc plus fortement dégradés que celles-ci.

La forte diversité observée par les analyses moléculaires du Grand rhinolophe et du Murin à oreilles échancrées suggère que la catégorisation des espèces de chiroptères insectivores en « spécialiste » *versus* « généraliste » reste délicate. Un fort niveau de plasticité du régime alimentaire est suggéré chez ces deux espèces de chauves-souris, avec des variabilités spatiales et temporelles importantes de la composition du régime alimentaire. Cependant, les patrons observés ne sont pas forcément congruents pour les deux espèces. Ainsi par exemple, la diversité des proies ingérées est plus importante à Annepont pour *M. emarginatus* tandis qu'elle y était plus faible pour *R. ferrumequinum*, mais un pic de diversité des proies ingérées est détecté en juillet à Annepont pour les deux espèces de chiroptères. La largeur de la niche trophique observée à un temps donné dépend de nombreux facteurs, dont la présence et la disponibilité des proies et la coexistence avec les autres espèces de chauves-souris (Lewanzik, Sundaramurthy, et Goerlitz 2019; Culina et Garroway 2019; Arrizabalaga-Escudero et al. 2018). Il serait donc pertinent de reproduire ces analyses comparatives de régime alimentaire sur plusieurs années pour valider les patrons observés entre colonies et au cours de la saison de maternité. (Mellanby et Gardiner 1939; Jonason, Franzén, et Ranius 2014; Holyoak, Jarosik, et Novák 1997). En parallèle, il sera important de mettre en place des suivis individuels également sur les Murins à oreilles échancrées, afin de caractériser leurs comportements et zones de chasse, et de relier ces caractéristiques avec les stratégies possibles d'opportunisme et de sélectivité de proies. A terme, l'analyse comparative du régime alimentaire de ces deux

espèces, mise en regard avec l'étude de la valeur sélective des individus et la santé des colonies, permettra de mieux comprendre l'influence de la plasticité du régime alimentaire sur la démographie observée de ces chiroptères en Poitou-Charentes.

4.3. Développer les approches (semi) expérimentales pour les études de régime alimentaire

De nombreuses études acoustiques ont montré que l'activité des chauves-souris et l'abondance des arthropodes sont influencées par les pratiques agricoles. Notamment il ressort de ces travaux que ces taxons sont plus abondants dans les systèmes d'agriculture biologique et/ou non intensifs qui préservent les éléments (semi)naturels du paysage tels que les haies (Olimpi et Philpott 2018; Wickramasinghe et al. 2003; 2004; Put, Mitchell, et Fahrig 2018; Barré et al. 2018). Il pourrait donc être intéressant de se placer dans des contextes de changements agricoles pour valider (semi) expérimentalement par des suivis longitudinaux l'effet de la pression anthropique sur la plasticité du régime alimentaire du Grand rhinolophe et la valeur sélective des individus. Dans le cas d'une transformation d'une culture conventionnelle vers l'agriculture biologique ou des pratiques agro-écologiques, nous nous attendons à une activité de chasse plus importante et un régime alimentaire plus diversifié si le comportement de chasse opportuniste prédomine, ou concentré sur des espèces de proies de meilleure qualité si l'environnement favorable induit un comportement de sélection forte des proies. Différentes situations anthropiques (changements de paysage et de pratiques agricoles) pourraient être mises à profit pour valider expérimentalement ces relations entre richesse des proies dans l'habitat, pourcentage d'habitats favorables et comportements de nutrition du Grand rhinolophe. Il serait alors intéressant, *in fine*, d'évaluer les effets de ces

comportements sur la valeur sélective des individus et d'affiner les conclusions sur l'importance de divers éléments paysagers pour la conservation de cette espèce.

Enfin, comme cela a déjà été montré chez plusieurs espèces de chiroptères insectivores (ex: Aizpurua et al. 2018; Baroja et al. 2019; Charbonnier et al. 2014), le Grand rhinolophe consomme de nombreuses espèces de ravageurs. Cette information forte pour encourager la préservation de cette espèce auprès des agriculteurs, n'est toutefois que partielle puisqu'elle ne révèle que la présence et non l'abondance de ces ravageurs dans le régime alimentaire (Weier et al. 2019). Du fait des biais associés à l'approche moléculaire, il est impossible de quantifier la pression de contrôle du Grand rhinolophe sur ces espèces dites nuisibles (nombre ou biomasse d'individus ingérés inconnus). Pour pallier à cela, il est possible d'avoir recours à des approches expérimentales et notamment d'exclusion de prédateurs : à l'aide de filets posés la nuit, on exclut les chauves-souris d'une zone et on regarde si la culture est plus ravagée qu'une culture dans laquelle les chauves-souris chassent (Maas et al. 2019). Maas, Clough, et Tscharntke (2013) ont par exemple montré que l'exclusion des oiseaux (jour) et des chauve-souris (nuit) augmente l'abondance des insectes herbivores, affecte négativement le développement des fruits et le rendement de la production de cacao (perte de 31%). Nous avons détecté dans notre jeu de données plusieurs ravageurs du pommier dans les guanos tels que *Malacosoma neustria* (38 occurrences), *Euproctis chrysorrhea* (29 occurrences), *Archips podana* (22 occurrences), *Pandemis heparana* (12 occurrences), *Hedya nubiferana* (sept occurrences) et *Zeuzara pyrina* (une occurrence). Dans le cas du Grand rhinolophe nous pourrions donc imaginer une étude pilote sur les vergers à proximité de la colonie d'Allonne pour évaluer la pression de contrôle exercée par ce chiroptère sur les ravageurs du pommier.

Nous nous attendons à ce qu'une exclusion du Grand rhinolophe entraîne de plus fort dégâts des vergers que dans un verger contrôle (sans exclusion). Si tel est le cas, le Grand rhinolophe effectuerait une pression de contrôle, si tel n'est pas le cas la présence de ces ravageurs dans les guanos témoignerait d'une ressource opportuniste. Une limite majeure réside dans le fait que cette expérimentation entraine une exclusion de toutes les espèces de chauves-souris et pas seulement du Grand rhinolophe. Un enregistrement acoustique des chauves-souris à proximité du verger devrait permettre d'identifier les espèces de chauves-souris chassant dans cette zone pour déterminer l'ampleur de ce biais (Jay et Ricard 2018).

5. Conclusion générale

Cette thèse a montré que d'un point de vue éco-évolutif, la population de Grand rhinolophe en France n'est pas menacée, de par sa grande taille et sa variabilité génétique élevée. Nos résultats ont montré qu'il est désormais nécessaire de réfléchir la conservation de cette espèce à grande échelle (nationale *a minima*) mais également qu'il est primordial de poursuivre les suivis individuels et locaux, notamment en bordure d'aire de répartition car les colonies pourraient y être plus à risque. Bien que le paysage ne semble pas limiter la dispersion de cette espèce, nous avons mis en évidence un fort effet de ce dernier sur son régime alimentaire ce qui nous a permis d'identifier des éléments clés du paysage à préserver (haie, prairies permanentes). Ce travail qui a réuni de nombreux partenaires aux compétences complémentaires - laboratoires de recherches, associations naturalistes et bénévoles d'amateurs à experts - illustre parfaitement le caractère multidisciplinaire de la biologie de la conservation et ouvre de nombreuses pistes de recherche et collaborations futures pour mieux comprendre les patrons observés. L'implication d'un plus large public, par exemple au

travers des sciences participatives, pourrait permettre de faire face aux défis logistiques posés par ces perspectives (notamment pour les échantillonnages tels que les piégeages d'insectes ou la collecte de guanos avec la formation adéquate auprès des experts).

Annexe 6. Résultats des analyses en éléments traces métalliques (ETM) dans les poils de Grand rhinolophe en Poitou-Charentes.

L'ensemble des figures et tableaux présentés dans cette annexe est directement issu du rapport d'activités - Phase 3/3 de Juin 2019 (Leuchtmann et al. 2019).

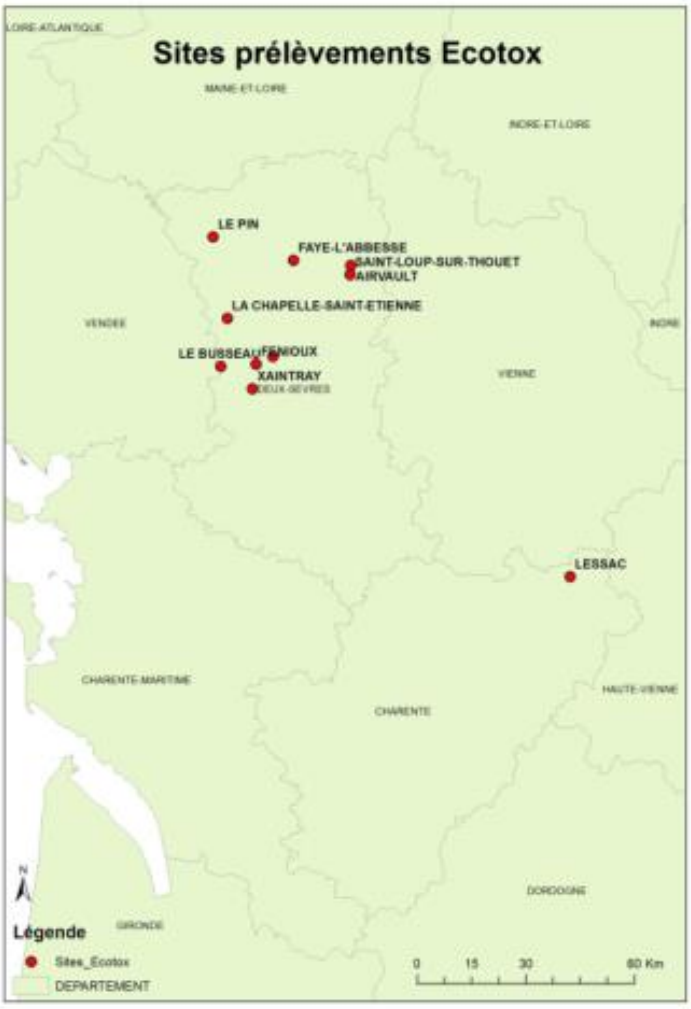


Figure S1. Localisation des 10 colonies dont les prélèvements de poils ont été étudiés pour l'étude écotoxicologique. La colonie notée par erreur en 2016 Saint-Loup-sur-Thouet correspond à la colonie de Saint-Loup-Lamairé.

Tableau S6. Concentration en Eléments Traces Métalliques (ETMs) dans les poils des Grands rhinolophes des 10 colonies échantillonnées.

Nom échantillon	Mn (µg/L)	Mn (µg/g)	Fe (µg/L)	Fe (µg/g)	Ni (µg/L)	Ni (µg/g)	Cu (µg/L)	Cu (µg/g)	Zn (µg/L)	Zn (µg/g)	Mo (µg/L)	Mo (µg/g)	Cd (µg/L)	Cd (µg/g)	Pb (µg/L)	Pb (µg/g)
2016 FENIOUX FR	0,502	0,436	35,44	30,76	0,067	0,058	7,77	6,75	95,77	83,13	0,805	0,699	0,005	0,005	1,99	1,72
2016 AIRVAULT	0,310	0,506	18,93	30,89	0,215	0,351	4,97	8,11	59,69	97,41	0,551	0,899	0,005	0,008	0,25	0,42
XAINTRAY	0,348	0,380	21,03	22,94	0,256	0,279	6,96	7,59	87,13	95,04	0,579	0,632	0,004	0,004	0,37	0,41
LE PIN	0,306	0,386	18,74	23,64	0,083	0,105	5,97	7,53	74,05	93,40	0,722	0,911	0,004	0,005	0,35	0,44
FAYE L'ABESSE	0,269	0,276	25,28	25,88	0,138	0,141	6,95	7,12	85,66	87,69	0,819	0,839	0,005	0,005	0,59	0,60
CHAPELLE ST ETIENNE	0,326	0,423	22,64	29,33	0,113	0,146	5,73	7,42	75,05	97,22	0,622	0,805	0,006	0,008	0,31	0,41
LE BUSSEAU	0,297	0,398	18,83	25,25	0,177	0,238	5,61	7,52	66,8	89,59	0,536	0,719	0,004	0,006	0,30	0,40
ST LOUP/THOUET	0,367	0,591	19,78	31,90	0,686	1,107	4,57	7,37	58,05	93,63	0,494	0,797	0,012	0,019	0,55	0,89
ALLONNE-FR	0,522	0,512	35,86	35,18	0,199	0,195	7,68	7,53	94,25	92,47	0,914	0,897	0,008	0,007	0,75	0,73
LESSAC	0,524	0,575	48,12	52,86	0,078	0,086	6,45	7,08	78,83	86,59	24,500	26,911	0,077	0,085	0,65	0,71
Moyenne		**0,448**		**30,86**		**0,27**		**7,40**		**91,62**		**3,41**		**0,015**		**0,67**
Ecart-type		*0,098*		*8,67*		*0,31*		*0,36*		*4,73*		*8,26*		*0,025*		*0,41*
Mediane		0,429		30,05		0,17		7,47		92,94		0,82		0,007		0,52

En orange = concentrations supérieures à celle des autres colonies.

Tableau S5. Comparaison des concentrations en Eléments Traces Métalliques (ETMs) dans les poils de chauves-souris dans la bibliographie avec notre étude.

Espèce	Cadmium (Cd)	Cuivre (Cu)	Manganèse (Mn)	Plomb (Pb)	Zinc (Zn)	Référence	Contexte
Rhinolophus ferrumequinum	0,015±0,025 0,007	7,4±0,4 7,5	0,45±0,10 0,43	0,67±0,41 0,52	92±5 93	**Présente étude**	
Myotis bechsteinii	0,21	31	34±22	5,14	103	Flache et al. 2015a	Allemagne, pop. stables, adultes, paysage diversifié (agric., urb., forest.)
M. daubentonii	0,02	70	23±17	4,26	129		
M. myotis	0,28	21	66±29	0,39	89		
Pipistrellus pipistrellus	0,81	36	27±36	34	383		
Nyctalus noctula	0,16	123	83,7	1,14	167	Flache et al. 2015b	Allemagne, Giessen (80000 hab.)
P. pipistrellus	0,25	17	Non mesuré	19	260	Hartmann 2000	Allemagne

Annexe 7. Analyse spatio-temporelle du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*).

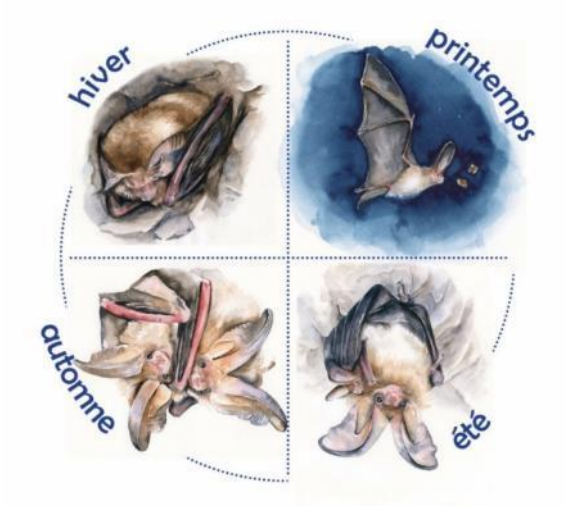
Ces analyses ont été réalisée par Marine Trillat pour son stage de master 2 IEGB (Montpellier) dans le cadre des Equipes de Recherche Junior 2018-2019 du LabEx ceMEB (soutien financier pour créer et gérer une petite équipe doctorant/stagiaire sur un axe de travail en lien avec le sujet de thèse). L'ensemble des éléments présentés dans cette Annexe est directement extrait de son rapport de stage.

INTRODUCTION

Les chauves-souris, uniques mammifères volants, comptent plus d'un millier d'espèces (Voigt et Kingston 2016). Elles représentent ainsi à elles seules plus d'1/5 des mammifères actuellement décrits. (Mickleburgh, Hutson, et Racey 2002; Hutson, Mickleburgh, et Racey 2001). Leur rôle est essentiel pour la biodiversité de nombreux écosystèmes : pollinisation, dispersion des graines en milieu néotropical (Voigt et Kingston 2016), suppression des ravageurs (Maine et Boyles 2015). Pour les espèces métropolitaines, le cycle biologique complexe est découpé en une première phase active et une deuxième d'hibernation, ce qui implique des changements d'habitats plusieurs fois par an. Ainsi, au cours des saisons elles fréquentent des gîtes d'hiver pour l'hibernation, les gîtes de transit, les gîtes d'été dits de « parturition » où se déroulent la mise-bas et l'élevage des jeunes mais aussi des zones de chasses associées à chaque gîte (Figure 2). Les préférences en termes d'habitats diffèrent selon les espèces et sont liées à leur cycle biologique, aux stratégies de chasse, de vol et à leurs besoins alimentaires (Arthur et Lemaire 2015). *M. emarginatus* et *R. ferrumequinum* sont deux espèces synanthropes qui partagent régulièrement les colonies de parturition, de transit et d'hibernation mais possèdent un régime alimentaire distinct. En effet, contrairement à la majorité des espèces européennes aux préférences de proies plus flexibles, le Murin à oreilles échancrées s'alimente principalement d'arachnides dit « orbitèles »[1] de la famille des Araneidae, qu'il prélève sur leurs toiles et de diptères du genre *Musca* (Prévost et Gailledrat 2011;Arthur et Lemaire 2015;Goiti et al. 2011 ; Beck 1995 ; Kervyn et al. 2012). Le Grand rhinolophe est plus généraliste et se nourrit principalement de lépidoptères et coléoptères qu'il chasse à l'affût (Jones 1990, Alberdi et al. 2019, Flanders et al. 2009). Les deux espèces

[1] Orbitèle : terme de zoologie qui regroupe les araignées qui tissent une toile verticale composée de cercles concentriques. (Toutes les araignées ne tissent pas de toiles)

ont un régime alimentaire si différent que leur niche écologique ne se chevauche pas, elles n'entrent donc pas en compétition sur leurs zones de chasse (Dietz, Pir, et Hillen 2013). En raison des statuts de protection dont elles bénéficient en France (Figure 3) et étant donné les surfaces importantes et habitats variés nécessaires à leur cycle biologique, les efforts de préservation des chauves-souris peuvent contribuer à la protection de nombreux autres cortèges d'espèces. Les chiroptères sont donc considérés comme des espèces « parapluie » (Tapiero 2017). La réalisation d'inventaires et de suivis écologiques sur un complexe d'espèces parapluie peut permettre de caractériser et délimiter des zones d'intérêts ou de protection, à moindres coûts. Se concentrer sur certaines espèces peut représenter un gain de temps en limitant l'effort d'échantillonnage et de suivi. Dans le cadre de diagnostic ou de gestion d'espaces naturels, les chiroptères présentent donc un intérêt grandissant (Fleishman, Murphy, et Brussard 2000 ; Roberge et Angelstam 2004).



- **Automne** : Transit vers les gîtes d'hiver et accouplements
- **Hivers :** Hibernation
- **Printemps** : Reconstitution des réserves, Transit printanier, début de gestation
- **Eté :** Mise bas et élevage des jeunes dans les colonies de

Figure 2 : Cycle de vie des chauves-souris. ©Blondeau Lysandre

Convention de Bonn

- 23/06/1979: Traité international sur la conservation des espèces migratrices appartenant à la faune sauvage
- L'annexe II contient la liste des espèces migratrices dont l'état de conservation est défavorable

Convention de Berne

- 19/09/1979: Traité international qui a pour but d'assurer la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe par une coopération entre les États entrée en vigueur le 1er juin 1982
- L'annexes: II : contient la liste des espèces de faune strictement protégées

Directive Européenne Habitat Faune Flore

- Mesure prise afin de promouvoir la protection et la gestion des espaces naturels à valeur patrimoniale que comportent ses États membres, dans le respect des exigences économiques, sociales et culturelles.
- **L'annexe II** fixe la liste des espèces (animales et végétales) d'intérêt communautaire dont la conservation nécessite la désignation de Zones Spéciales de Conservation. Leur habitat doit être protégé sur ces zones (que cet habitat soit d'intérêt communautaire ou non).
- **L'annexe IV** fixe la liste des espèces (animales et végétales) qui nécessitent une protection stricte sur l'ensemble du territoire européen. La plupart des espèces inscrites à cette annexe sont déjà protégées par la loi française

Accord Eurobat

- 4/12/1991: Cet accord protège toutes les espèces de chauves souris d'Europe. Les obligations pour les Etats signataires sont les suivantes : interdire la destruction, la détention et la capture de chauve souris , inventorier et protéger les sites les plus importants particulièrement les zones de chasse et s'efforcer de remplacer les pesticides et les produits chimiques de traitement du bois hautement toxiques par des substituts moins dangereux.

Lois Nationales

- **Loi de protection de la nature de 1976** : Toutes les espèces de chauves-souris présentes en France sont protégées.
- **Arrêté ministériel du 23 Avril 2007** (Modifié le 15/09/2012) : Sont interdits sur tout le territoire métropolitain et en tout temps : la destruction, la mutilation, la capture ou l'enlèvement, la perturbation intentionnelle des chauves-souris dans le milieu naturel, le transport, la naturalisation, le colportage, la mise en vente, la vente ou l'achat, l'utilisation commerciale ou non des chiroptères. Sur les parties du territoire métropolitain où l'espèce est présente, ainsi que dans l'aire de déplacement naturel des noyaux de populations existants, sont interdits la destruction, l'altération ou la dégradation des sites de reproduction et des aires de repos des animaux.

Listes rouges IUCN

- La liste rouge de l'UICN (Union internationale pour la conservation de la nature ; en anglais IUCN2 Red List), créée en 1964, constitue l'inventaire mondial le plus complet de l'état de conservation global des espèces végétales et animales. Elle se présente sous la forme d'une base de données en ligne régulièrement actualisée, exposant la situation de plus de 96 900 espèces (version 20183) sur les 1,8 million d'espèces connues.

Figure 3 : Récapitulatif des conventions et lois protégeant les chauves-souris en France, au niveau international, européen et national. Précisions supplémentaires sur les annexes concernant le Murin à oreilles échancrées ainsi que le Grand Rhinolophe. (Réalisé par Marine Trillat Mars 2019)

Pourtant, les populations de chiroptères sont aujourd'hui menacées. Leur cycle biologique particulier induit un faible taux de renouvellement des populations et les rend particulièrement sensibles à certaines perturbations liées directement ou indirectement à l'anthropisation des milieux (MacArthur et Wilson 1967 ; Arthur et Lemaire 2015). Or selon l'IPBES[2], les trois-quarts de l'environnement terrestre ont été significativement modifiés par l'action humaine (Díaz et al. 2019). La figure 4 met en lumière les principales menaces à l'origine des déclins d'effectifs pour les chauves-souris françaises. Parmi celles-ci, l'aménagement du territoire et les pratiques agricoles jouent un rôle important. En effet l'étalement urbain réduit le territoire de chasse des espèces lucifuges et de milieux forestiers (Jung et Threlfall 2016). L'augmentation de la distance gîte / zone de chasse liée à la pollution lumineuse impacte la condition physique et le succès reproducteur de ces animaux (Azam et al. 2018 ; Azam et al. 2015). Par exemple, la sortie de gîte des colonies maternelles de *M. emarginatus* est retardée par les éclairages artificiels. Or une période de chasse écourtée pour les mères allaitantes ralentit la prise de masse des juvéniles et peut impacter la survie des jeunes et de la mère durant l'hibernation. (Boldogh, Dobrosi, et Samu 2007).

Le développement des axes routiers est également une menace : il fragmente les habitats et corridors et induit un risque de mortalité élevé par collision (Fensome et Mathews 2016). Les axes routiers peuvent aussi créer des nuisances sonores qui, en se superposant aux émissions d'ultrasons de certaines espèces, compliquent leurs chasses et réduisent leur taux de proies capturées (Jones 2008). L'intensification des pratiques agricoles exerce également une pression importante sur les populations de chiroptères. Les « linéaires » comme les taillis et les haies, bordures typiques des bocages, se font de plus en plus rares. Pour les chiroptères,

[2] IPBES : Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services

ces linéaires représentent des connexions essentielles à leurs déplacements dans le paysage, en les aidant à mieux se repérer dans l'espace et en créant des repères entre le gîte et les zones de chasse (Mickleburgh, Hutson, et Racey 2002). L'utilisation massive de pesticides liée à l'intensification des pratiques agricoles impacte aussi la valeur sélective des chauves-souris insectivores, notamment en réduisant le nombre de proies disponibles (Park 2015).

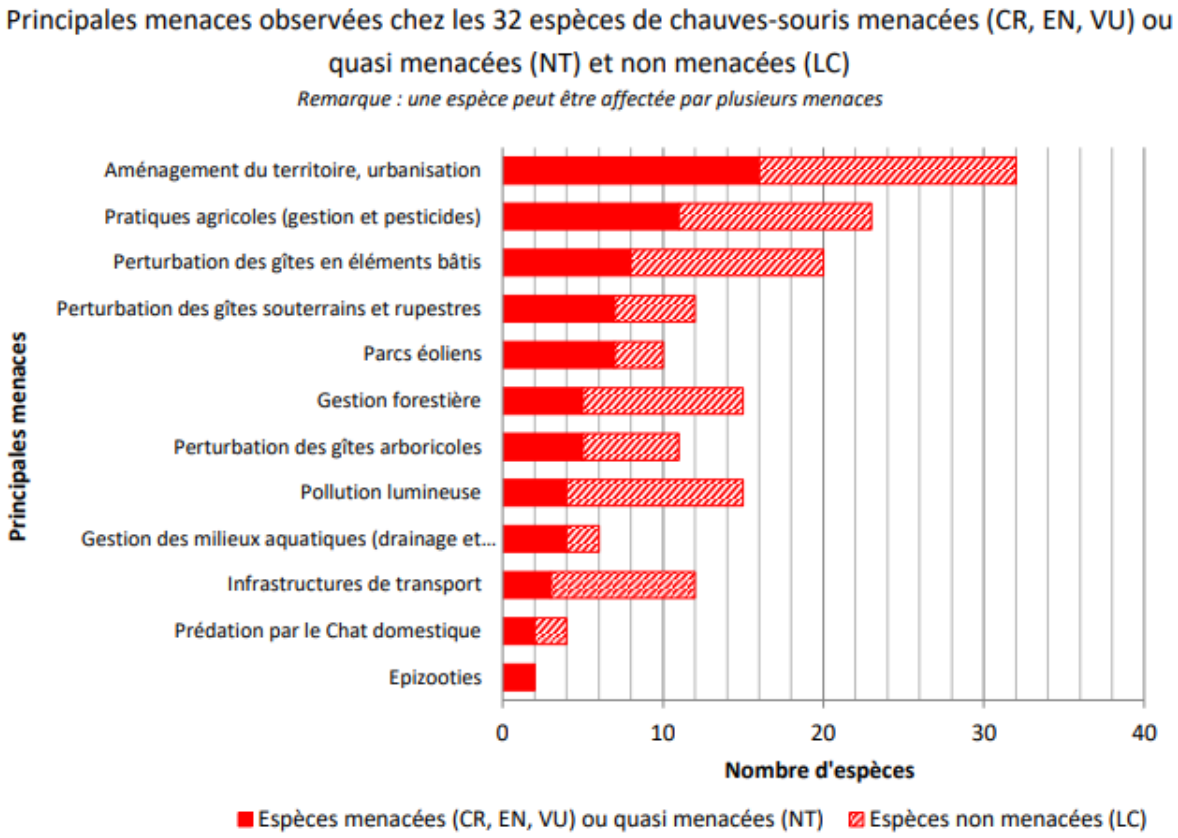


Figure 45 : Principales menaces observées chez les chauves-souris en France d'après le rapport d'évaluation des listes rouges françaises (MNHN et al. 2018)

Dans le monde, 185 espèces de chauves-souris sont considérées menacées et catégorisées soit en danger critique d'extinction « CR », en danger « EN » ou vulnérables « VU » (Figure 5 ; IUCN Red List 2018). A l'échelle française, environ la moitié des espèces de chiroptères sont classées dans la catégorie « menacée » ou « quasi menacée » (Figure 6; IUCN France et al. 2017). Poursuivre les actions de conservation est donc un enjeu prioritaire. Dans certains cas, les mesures réglementaires européennes ont permis d'améliorer la situation de certaines espèces de chiroptères, comme le Rhinolophe euryale (*Rhinolophus euryale*) et le Grand Rhinolophe *R. ferrumequinum*. En effet, entre 2009 et 2017, leur statut est passé de « espèce quasi menacée » (NT) à « préoccupation mineure (LC) », statut pour lequel le risque de disparition en France métropolitaine est faible (MNHN et al. 2018 ; IUCN France et al. 2017). Ces deux espèces DH2[3] sont dîtes « d'intérêt communautaire » et « espèces prioritaires » pour le plan national d'actions en faveur des chiroptères (2016-2025). Par définition une espèce d'intérêt communautaire nécessite la désignation de zones spéciales de conservation (ZSC)[4] qui dans ce cas ont permis le rétablissement des populations grâce à la protection des gîtes et un meilleur suivi des colonies.

Malheureusement, les données concernant les chiroptères (biologie, démographie des populations) restent encore aujourd'hui lacunaires. A l'échelle mondiale, 18% des espèces de chiroptères sont classées dans la catégorie de l'IUCN[5] « données insuffisantes » (Figure 5), catégorie pour laquelle la communauté scientifique ne dispose pas d'assez de données pour

[3] DH2 : espèces inscrites à l'annexe 2 de la DHFF (Directive Habitat-Faune-Flore) Directive 92/43/CEE du Conseil, du 21 mai 1992, concernant la conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvages (JO L 206 du 22.7.1992, p. 7-50)

[4] Une ZSC est un site d'importance communautaire désigné par les pays de l'UE où sont appliquées les mesures de conservation nécessaires au maintien ou au rétablissement, dans un état de conservation favorable, des habitats naturels et/ou des populations des espèces pour lesquels le site est désigné

[5] IUCN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature : Principale organisation non gouvernementale mondiale consacrée à la conservation de la nature

évaluer le risque d'extinction en fonction de la distribution et/ou de l'état des populations concernées (IUCN Red List 2017; IUCN Red List 2018). Cependant il est communément admis chez les chiroptérologues que le manque d'informations sur la biologie des chiroptères et notamment sur la dynamique de leurs populations, peut biaiser les prises de décisions dans le cadre de l'aménagement du territoire. Les tendances démographiques des populations ne sont toujours pas connues pour 22 espèces sur les 35 vivant sur le territoire national (IUCN France et al. 2017). Le risque d'extinction d'une espèce de chiroptère doit également prendre en compte plusieurs facteurs démographiques complexes comme la taille de l'aire de répartition, la structure génétique des populations et l'aptitude à la dispersion (Boyles et Storm 2007).

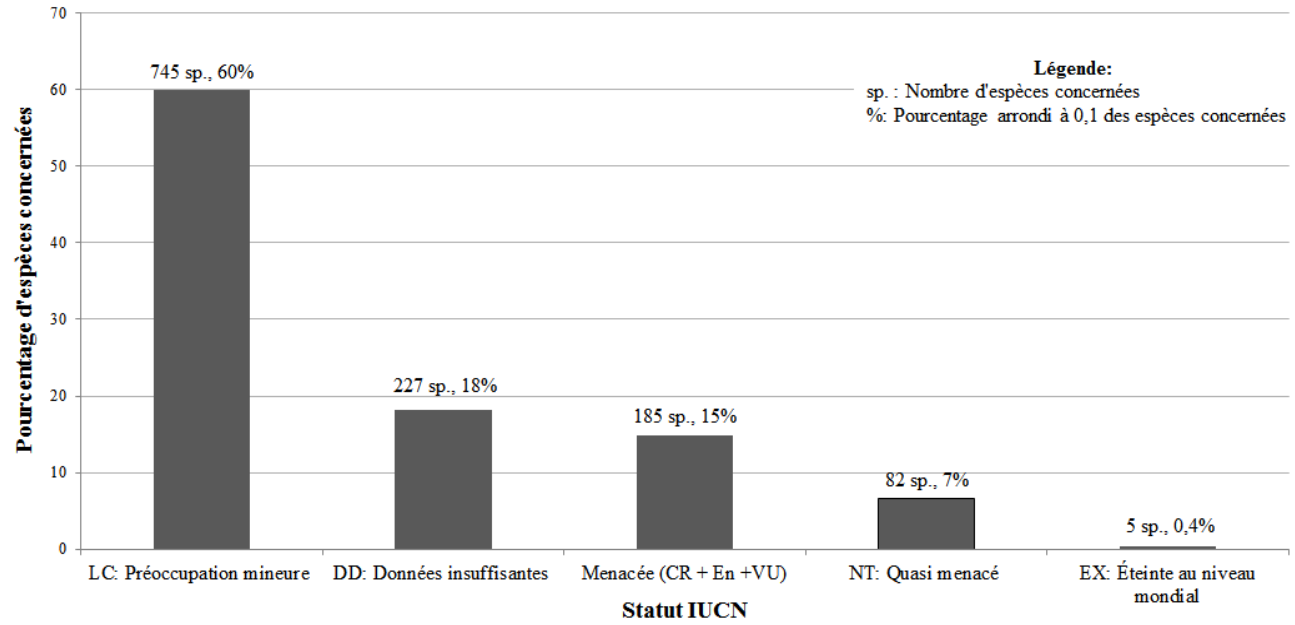


Figure 5 : Statut des espèces de chiroptères à l'échelle mondiale d'après les données de la liste rouge de l'IUCN version 2018-2. Sp= espèce. Réalisé par M.Trillat , Mars 2019.

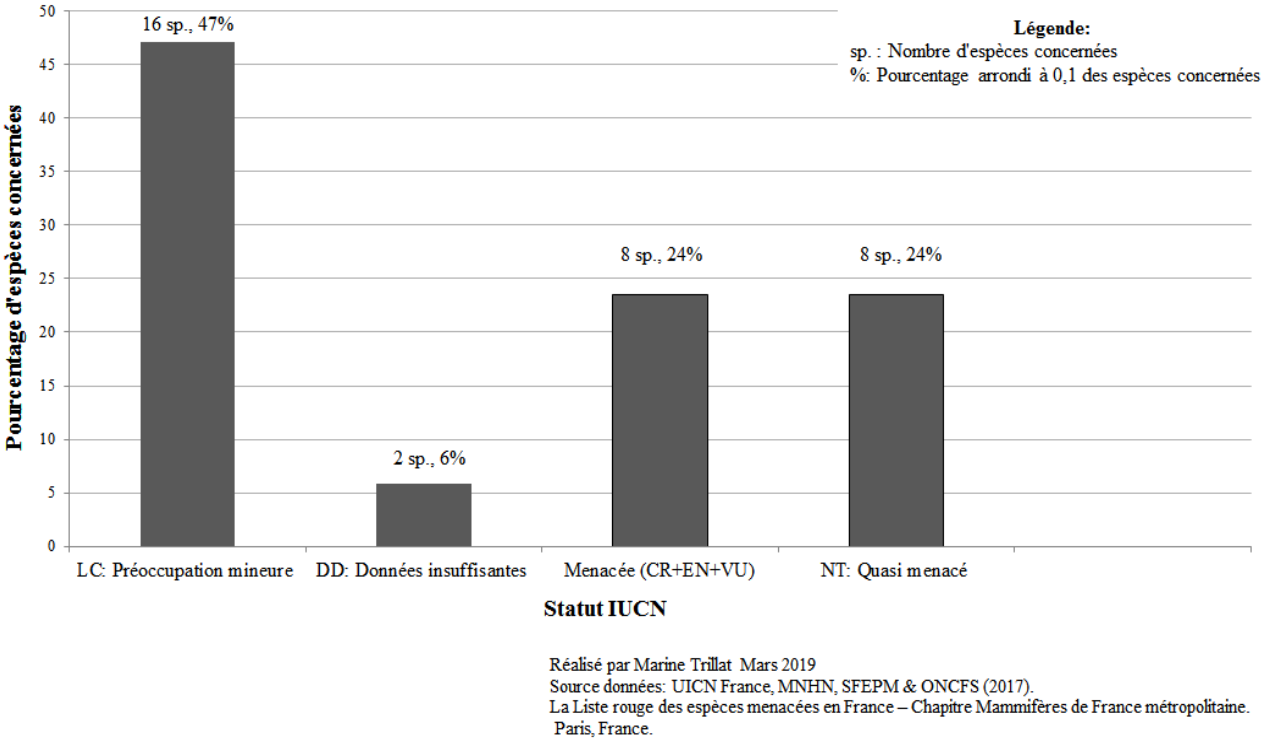


Figure 6 : Statut des espèces de chiroptères à l'échelle nationale d'après les données de la liste rouge de l'IUCN France 2017. Sp= espèce. Réalisé par M.Trillat, Mars 2019.

Connaître le régime alimentaire d'une espèce et son implication dans les réseaux trophiques est également fondamental dans un objectif de conservation et de gestion. L'étude du régime alimentaire permet d'identifier les ressources environnementales clés pour la conception de stratégies de conservation fiables (Valentini, Pompanon, et Taberlet 2009). Les chauves-souris insectivores présentent d'importants besoins énergétiques journaliers pour voler, s'occuper de leur progéniture et stocker en un court laps de temps assez de réserves graisseuses en vue de l'hibernation : en captivité elles consomment jusqu'à 25% de leurs masses corporelles en insectes par nuit. Et ces besoins sont probablement plus élevés en conditions naturelles, en particulier durant la période de lactation (Kunz et al. 2011; Schalk et Brigham 1995; Bontadina et al. 2008). Les différences de régime alimentaire entre les espèces, en particulier le niveau de spécialisation alimentaire, peuvent donc être liées au risque d'extinction. Les espèces « généralistes » peuvent être moins sensibles que les « spécialistes » à la diminution des proies disponibles (Sierro et Arlettaz 1997) car elles montrent une plus grande plasticité du régime alimentaire en fonction des émergences d'insectes et des proies disponibles. Caractériser le régime alimentaire des chiroptères, en particulier le niveau de spécialisation alimentaire, permet donc de mieux estimer les menaces qui pèsent sur ces espèces et leur risque d'extinction.

Le sujet de cette étude s'inscrit dans ce contexte de liens potentiels entre biologie de la conservation des chiroptères et régime alimentaire. Il concerne la caractérisation du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées, *M. emarginatus*, une espèce insectivore qui se nourrit principalement de diptères (*Musca sp*.) et d'arachnides qu'elle prélève sur leurs toiles. Les principales études ont été menées en Europe de l'Est et montrent que la chasse se déroule généralement dans une zone située entre 200 m et 2 km du gîte de parturition (Krull et al. 1991). Cependant *M. emarginatus* peut également parcourir de plus longues distances

(jusqu'à 10 km) pour chasser à proximité d'étables riches en *Musca sp.* plutôt que dans les zones de pâturage avoisinantes ou les forêts où les proies sont moins abondantes (Bontadina et al. 2008). De plus récentes études montrent que les Vespertilionidae, dont *M. emarginatus* fait partie, ont un risque d'extinction plus élevé par leur régime alimentaire spécialisé (Boyles et Storm 2007).

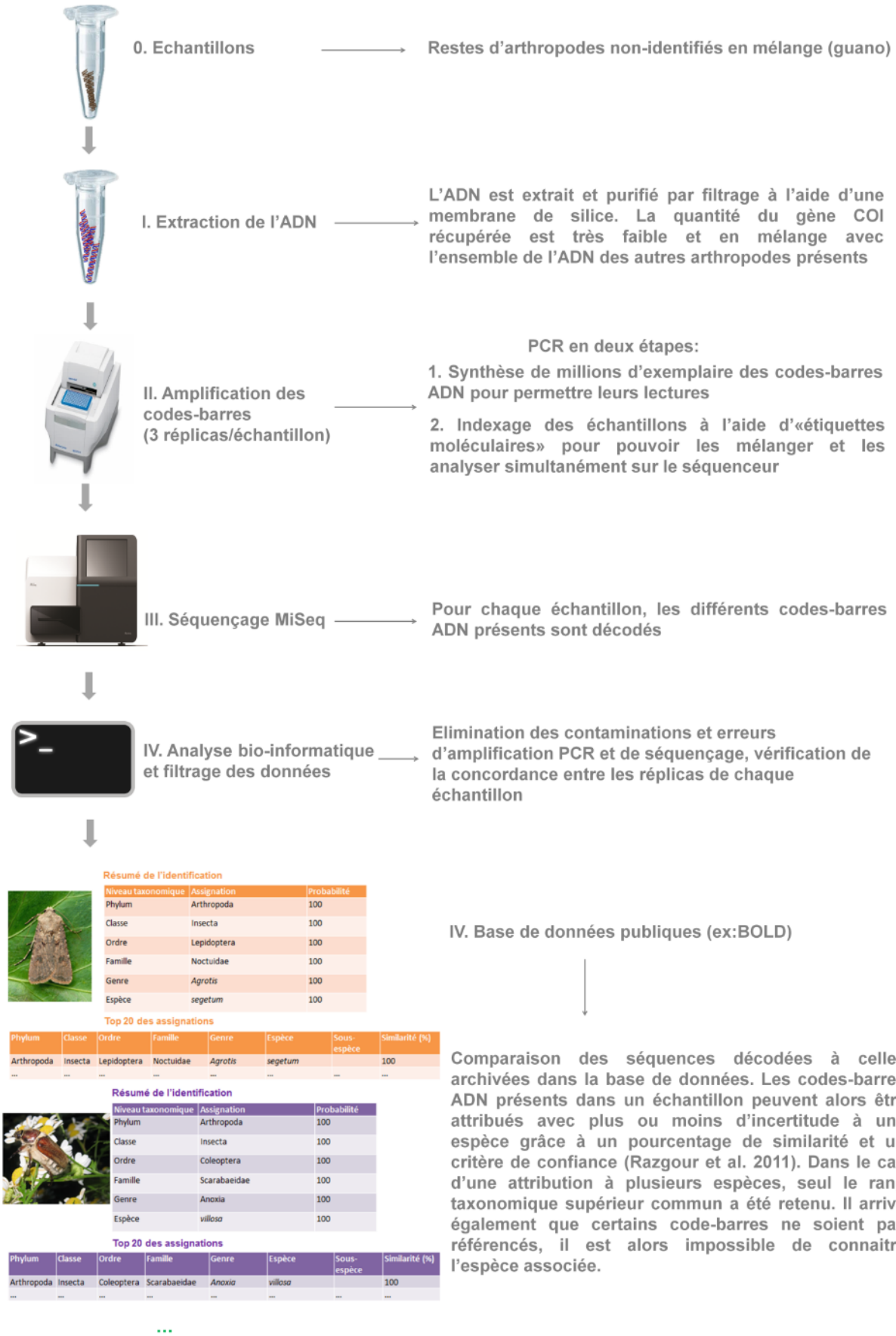


Figure 7 : Principales étapes de l'approche metabarcoding permettant l'identification des chiroptères et des arthropodes (d'après Tournayre, 2018)

L'ensemble des données disponibles sur le régime alimentaire de cette espèce de chiroptère provient d'analyses microscopiques des fragments d'arthropodes retrouvés dans le guano. Pour cette technique, il s'agit de comparer visuellement les restes d'arthropodes identifiables (élytres, tarses, …) avec des références entomologiques sous loupe binoculaire (Prévost et Gailledrat 2011; Arthur et Lemaire 2015; Goiti et al. 2011 ; Beck 1995). Cependant cette technique n'est pas exhaustive. En effet, les tissus mous digérés peuvent ne laisser aucune trace identifiable dans le guano. De plus, cette technique est très chronophage, ce qui limite le nombre d'échantillons qui peuvent être analysés, et sa réalisation nécessite une expertise entomologique confirmée. Enfin, cette technique manque de résolution puisque les taxons sont généralement identifiés à l'ordre uniquement.

Dans ce contexte, nous proposons de développer une méthode moléculaire de metabarcoding (Taberlet et al. 2012) qui permette de décrire plus précisément et pour des centaines d'échantillons le régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées, puis d'appliquer cette méthode pour décrire la variabilité spatiale et temporelle du régime alimentaire. Le metabarcoding est une technique de taxonomie moléculaire basée sur le séquençage à haut débit de courts fragments d'ADN cible (dans notre cas 178 pb) et l'existence de bases de données de séquences de références. Appliquée à des prélèvements environnementaux, cette technique permet d'identifier des espèces en mélange dans un échantillon, sans *a priori* sur la composition de ce dernier (voir Figure 7). Nous appliquerons cette méthode pour répondre à deux objectifs principaux.

Le premier objectif est de décrire la composition du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées en analysant le guano récolté dans sept colonies de parturition mixtes *M.*

emarginatus / R. ferrumequinum qui ont été suivies mensuellement de Mai à Septembre 2018 en Poitou Charentes (voir Figure 8,9).

Le second objectif est d'analyser la diversité et la variabilité spatiale et temporelle du régime alimentaire au cours de cette période, pour les sept colonies suivies. Une flexibilité alimentaire de l'espèce peut être suspectée durant les périodes de lactation, un passage très énergivore pour les femelles. De plus, le régime alimentaire pourrait être influencé par l'émergence d'insectes sur de courtes périodes.

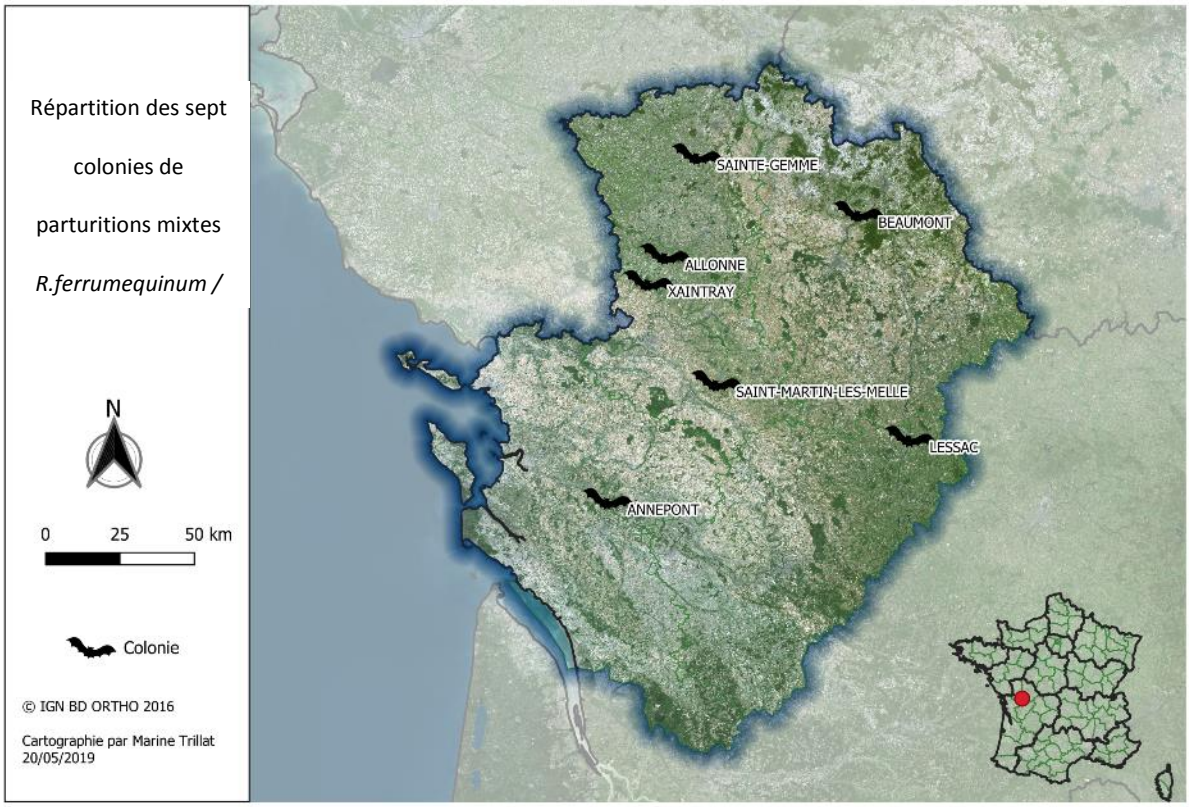


Figure 8 : Répartition des 7 colonies mixtes *M. emarginatus/ R.ferrumequinum*.dont le guano a été analysé dans cette étude



Figure 9 : L'ensemble des guanos a été récolté préalablement à mon stage par les membres des associations naturalistes de Poitou-Charentes. Une plaque de 96 guanos a été remplie pour chaque colonie et chaque date échantillonnée. A gauche, collecte de guanos. A droite, les plaques ou sont stocké les guanos avant les extractions d'ADN. © Jérémy Dechartre

MATERIELS ET METHODES

1. Analyses moléculaires et traitement bio-informatique des données de séquençage

1.a. Analyses moléculaires et séquençage du gène CO1 par metabarcoding

- Extraction des ADN présents dans les guanos

Nous avons extrait l'ADN contenu dans les 1995 guanos collectés dans les sept colonies de *M. emarginatus* entre juin et aout 2018. Le protocole d'extraction de l'ADN de fèces est réalisé avec un kit NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Pour chaque plaque contenant les 96 échantillons collectés, nous remplaçons un échantillon par un contrôle négatif d'extraction, c'est-à-dire un puit de la plaque où tous les produits sont ajoutés excepté l'ADN. Ce contrôle négatif nous permettra d'estimer la contamination de nos échantillons et de vérifier qu'aucun acide nucléique contaminant n'a été introduit par erreur dans les réactifs ou dans les échantillons pendant les manipulations. Ce contrôle étant traité comme les autres échantillons jusqu'au séquençage, il nous permettra également de vérifier qu'il n'y a pas eu d'erreur de manipulations comme un décalage des échantillons durant l'ensemble des étapes moléculaires et bioinformatiques.

- Amplification et séquençage des ADN

Le protocole de préparation des échantillons pour le séquençage repose sur une PCR en deux étapes décrite dans (Galan et al. 2018). La première PCR permet d'amplifier un fragment cible sur le gène mitochondrial CO1 (Cytochrome oxidase subunit 1). Le gène CO1 est présent en de nombreuses copies par cellule, ce qui facilite son amplification PCR à partir d'ADN dégradé. Très conservé au sein d'une même espèce il varie entre espèces différentes

(Hebert et al. 2003) et permet l'identification jusqu'à l'espèce par séquençage en comparant les séquences d'ADN à des bases de données publiques comme BOLD (Barcode Of Life Database). Pour cette étude, la sélection du couple d'amorces qui permet de cibler le fragment d'ADN a été réalisé sur la base de différents critères, évalués dans trois situations : i) *in silico* sur des séquences de références, ii) *in vivo* sur des communautés artificielles de composition connue et iii) sur les guanos (Tournayre et al. Soumis). Parmi les douze couples d'amorces testés, nous avons opté pour le couple fwh1 car il avait la plus forte capacité à amplifier simultanément un large spectre de proies et l'espèce prédatrice, et il offrait la meilleure résolution taxonomique pour l'identification des proies (Vamos, Elbrecht, et Leese 2017). Sur une plaque PCR pour chaque run, nous avons également ajouté un échantillon d'ADN de rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*). Ce contrôle positif nous permet post séquençage de quantifier les erreurs optiques du séquenceur, en théorie nous ne devons pas retrouver de rat de Gambie sur les plaques PCR ou nous ne l'avons pas amplifié. La deuxième PCR permet d'ajouter des index de multiplexage permettant de marquer chaque échantillon de manière unique avant de les mélanger en vue du passage sur séquenceur. Le mélange comprenant l'ensemble des échantillons amplifiés et tripliqués à séquencer (environ 475 guanos par run) a été purifié par excision sur gel d'agarose et dosé par PCR quantitative (qPCR) pour être normalisé à 4nM. Il a ensuite été séquencé sur une ligne de séquenceur MiSeq (Illumina) en paired-end (2 x 251pb) par la plateforme GenSeq à Montpellier. Au vu du nombre d'échantillons important (*n*=1890 guanos tripliqués soit 5670 échantillon plus les contrôles négatifs et positifs), quatre runs de séquençage indépendant ont été réalisés. Suite à un problème technique (résultats d'une plaque obtenus tardivement), nous avons dû réaliser l'ensemble des analyses suivantes en duplicat et non en triplicat.

1.b. Analyses bio-informatiques des données de séquençage

- Préparation des données de séquençage

J'ai tout d'abord utilisé un script écrit par M.P Chapuis et L. Benoît (CIRAD, CBGP) pour traiter les données brutes issues du séquençage afin d'assembler les reads et retirer les amorces de séquençage (Sow et al. 2019). J'ai ensuite utilisé le pipeline FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution, Escudié et al. 2018) pour générer, à partir des séquences Illumina, une table d'abondance de reads dans laquelle chaque réplica PCR d'échantillon apparaît en colonne et chaque séquence affiliée à un taxa est présentée en ligne. Chaque cellule contient la quantité de reads obtenus. Brièvement, le pipeline FROGS permet de (i) filtrer les séquences selon leur longueur (+/- 20pb de la taille attendue), (ii) de regrouper en OTU (*Operational Taxonomic Unit*) les variants de séquences différent de seulement une base (iii) de supprimer les chimères (Les chimères sont des gènes composés de différents fragments d'ADN provenant de fragments ADN différents générés de façon artefactuelle au moment de la PCR à l'aide de VSEARCH (Edgar et al. 2011; Rognes et al. 2016).

- Dechimérisation

L'objectif est de nettoyer plus finement nos données en éliminant les chimères qui n'ont pas été détectées avec FROGS. Pour cela j'ai utilisé le script R écrit par S. Piry (INRA, CBGP) et L. Benoît utilisant l'outil du programme *dada2* (Callahan et al. 2016) appelé *iBimeraDeNovo*. Cette étape peut enlever jusqu'à 35% de variants chimériques résiduels (M. Galan, communication personnelle).

- Filtrage des données

Enfin j'ai filtré la table d'abondance déchimérisée et fusionné les réplicas à l'aide d'un script R créé par M.P Chapuis et L. Benoît. Trois étapes de filtres de la table d'abondance ont été réalisées : Threshold Cross-contamination (T_{CC}) : Basé sur le nombre maximum de séquences observées dans un contrôle négatif, ce seuil permet de nettoyer les données pour les contaminations liées à l'extraction d'ADN et à la PCR. Tout d'abord, j'ai utilisé les nombres de reads observés dans les contrôles négatifs pour établir les seuils de détection de positivité pour un OTU. Un échantillon est considéré comme négatif pour un OTU si le nombre de reads pour cet OTU est inférieur à la valeur seuil (nombre de reads maximum observé pour cet OTU dans un contrôle négatif). Threshold False-Assignment (T_{FA}): Ce filtre est basé sur les erreurs de mauvaises assignations de séquences liées au processus optique de séquençage. Une faible proportion de séquences (0.2%) peut être assignée à de mauvais échantillons à cause d'erreurs de lectures des index. Notre contrôle positif (rat de Gambie) nous permet de mesurer la quantité maximale de séquences retrouvées pour cette espèce dans un échantillon de guano, et ainsi d'établir la fréquence maximum de mauvaise assignation d'un OTU pour un échantillon. Ex : si on observe 4 reads de rats géants au maximum dans un échantillon de guano, et que le nombre total de séquences de rats géants est de 20,000 reads dans le run, alors, la fréquence est de 4/20,000=0,0002. *Tfa* est alors calculé pour chaque OTU en multipliant le nombre de reads total de cet OTU par 0.0002. Seuls les échantillons présentant un nombre de reads au-dessus des seuils pour l'ensemble des réplicas techniques sont validés. Les autres résultats positifs non-répétables entre nos réplicas sont éliminés. Les échantillons présentant des nombres de reads trop faibles (<1000) ont également été éliminés (=échecs de PCR ou séquençage). Les quatres run de séquençage sont traités de manière indépendante pour les filtres *Tcc* et *Tfa*. Pour notre table d'abondance finale, nous fusionnons les duplicats séquencés de nos guanos en additionnant les reads de chaque séquence.

1.c. Assignation des échantillons à l'espèce de chauve-souris et tri préliminaire des proies

J'ai ensuite déterminé à quelle espèce de chauve-souris chaque échantillon de guano appartenait. Pour éliminer les échantillons trop fortement contaminés (détection de plusieurs chiroptères), j'ai fixé un seuil de contamination arbitraire : le guano devait contenir moins de 1% de reads de l'espèce minoritaire pour être considéré fiable. J'ai ensuite travaillé sur les données de *M. emarginatus* uniquement. Pour l'identification des proies, nous n'avons retenu que les reads avec un pourcentage d'identité > 97% et une couverture > 90% par rapport à la séquence la plus proche de la base de données BOLD. Avec un script R que j'ai développé, j'ai assigné une « affiliation taxonomique finale » (nommée taxa dans la suite du rapport) en fonction d'un niveau de confiance établi d'après Galan et al. 2018 (voir Tableau 1). Par la suite, j'ai vérifié manuellement si les taxons retenus ont bien été décrits en France (Vérification sur la base de données INPN, Fauna Europea, vérification par un entomologiste). Cela a permis d'identifier un des erreurs d'affiliation liées à des erreurs dans la base de données. Les taxons appartenant à des ordres que je considère comme des contaminations environnementales (Psocodea, Trombidiformes, Mesostigmata, Sarcoptiformes, Anostraca, Diplostraca, Entomobryomorpha, Isopoda, Branchiopoda, Chilopoda, Nematoda, Rotifera) n'ont pas été retenus dans le jeu de données.

2. Analyses du régime alimentaire de *M. emarginatus*

Toutes les analyses décrites ci-dessous ont été réalisées avec R v1.1.456 (Schäler, Thaller, et Hinrichs 2018). Afin d'éliminer la variation du succès d'amplification (nombre de reads) entre les guanos, nous avons transformé les données du tableau d'abondance en proportions relatives pour chaque guano.

2.a. Analyse de la fiabilité des données

Nous avons vérifié que notre effort de séquençage (nombre de reads par guano) était suffisant pour décrire la diversité de proies contenues dans les guanos étudiés. Nous avons pour cela utilisé la fonction *depth.cov* du programme HillDiv (Alberdi et Gilbert 2019).Nous avons réalisé des courbes d'accumulation sur les données par colonie et date. Elles permettent de tester si notre échantillonnage (nombre de guanos par colonie) est suffisant pour décrire la diversité du régime alimentaire de *M. emarginatus*. Mille tirages aléatoires de guanos ont été réalisés sans remise dans le jeu de donnée colonie-date, et le nombre de taxon dans chaque tirage est noté. Ces courbes ont été faites pour chaque rang taxonomique avec un script et sont représentées avec le package *ggplot2* (Wickham 2011) et la fonction *geom_violin().*

2.b. Description générale du régime alimentaire de M. emarginatus

Nous avons représenté l'ensemble des proies détectées avec une représentation hiérarchique de Krona qui tient compte de la taxonomie et de la fréquence des taxons dans le jeu de données (Ondov, Bergman, et Phillippy 2011). La répartition des taxons selon la colonie et la date d'échantillonnage est représentée par des histogrammes cumulés

réalisés avec *ggplot2* (Wickham 2011). Différents rangs taxonomiques sont considérés : ordre, famille, genre, espèce.

Niveau de confiance	Paramètres : blast perc-identity	Affiliation finale de la séquence
1a	>99%	Espèce
1b	>98%	Espèce
2	>98% et espèce multi-affiliée	Genre
3	>98% genre et espèce multi-affilié	Famille
4	>97% Famille, genre, espèce multi-affilié	Ordre

Tableau 1 : Tableau de confiance utilisé pour évaluer la confiance accordée à une assignation taxonomique. Affiliation finale de la séquence en fonction des paramètres.

2.c. Analyses statistiques de la variabilité du régime alimentaire

Toutes ces analyses de diversité ont été réalisées à plusieurs rangs taxonomiques : l'ordre, la famille et le genre. Le rang de l'espèce n'a pas été considéré car l'indice de confiance était faible pour de nombreux taxons.

- Analyse de la diversité alpha

Nous avons tout d'abord estimé la diversité alpha, c'est-à-dire la richesse spécifique, du régime alimentaire de *M. emarginatus*, pour les trois dates et trois colonies échantillonnées. Nous avons estimé les indices de Hill avec le programme *HillDiv.1.2.3.* (Alberdi et Gilbert 2019) car ils permettent de tester l'impact des taxons rares sur la diversité estimée, en faisant varier la valeur du paramètre *q* entre 0 (tous les taxons ont le même poids) et 5 (les taxons peu occurrents ont moins de poids).Nous avons ensuite testé avec les fonctions *div.test* et *div.test.plot* de *HillDiv* si la date ou la colonie d'échantillonnage impactaient significativement la diversité alpha, en appliquant un test non-paramétrique de Kruskall-Wallis (seuil de significativité fixé à 0.006 après correction de Bonferroni pour les tests

multiples, soit seuil de significativité alpha 5% /(nombre de rang taxonomique* nombre de paramètres *q* testés) : 0.05/3*3). Des tests *a posteriori* de Tukey ont été réalisés pour identifier les paires de colonies ou de dates dont la diversité alpha est significativement différente. Pour ces tests post-hoc, nous avons fixé le seuil de significativité à 0.05/28 paires testées = 1.780 x 10^{-3}.

- Analyse de la diversité beta

Nous avons ensuite estimé la diversité beta, qui représente la différence de composition du régime alimentaire de *M. emarginatus* entre les dates et colonies échantillonnées. Nous avons utilisé les indices de Hill en faisant varier *q* de 0 à 5, dans le programme HillDiv. Ensuite, nous avons réalisé des analyses par permutation (perMANOVA) avec le package *vegan* (Oksanen et al. 2019) et la fonction *adonis* (Analysis of variance using distance matrices) pour analyser la significativité des facteurs colonies (site) et date sur la diversité beta. La matrice de dissimilarité entre échantillons, a été estimée avec la méthode de Bray-Curtis qui prend en compte l'abondance des taxons. Enfin, nous avons réalisé une analyse multivariée non métrique (NMDS) avec la fonction *metaMDS* du package *vegan* pour visualiser les différences de composition entre colonies et dates d'échantillonnage, et identifier les taxons expliquant ces dissimilarités.

		Allonne (ALL)	Annepont (ANN)	Beaumont (BEA)	Lessac (LES)	Sainte-Gemme (SGE)	Xaintray (XAI)	Saint-martin-les-melles (SMM)
Juin	Nombre total de guanos séquencés (juin)	**95**	**95**	**95**	**95**	**95**	**95**	**95**
	R. ferrumequinum	72	58	87	37	53	53	0
	M. emarginatus	0	30	5	0	28	3	94
	Contamination	0	4	0	4	1	0	1
	Autres espèces	0	0	0	29	0	0	0
	Echec d'amplification	23	3	3	25	13	39	0
Juillet	Nombre total de guanos séquencés (juillet)	**95**	**88**	**95**	**93**	**95**	**95**	**95**
	R.ferrumequinum	84	22	83	81	56	83	1
	M. emarginatus	0	61	4	3	30	7	94
	Contamination	0	1	2	2	5	0	0
	Autres espèces	0	0	1	1	0	0	0
	Echec d'amplification	11	4	5	6	4	5	0
Août	Nombre total de guanos séquencés (août)	**95**	**94**	**95**	**95**	**95**	**95**	
	R.ferrumequinum	92	32	90	85	74	92	
	M. emarginatus	0	58	0	0	10	0	
	Contamination	0	1	0	1	7	1	
	Autres espèces	0	0	3	0	0	0	
	Echec d'amplification	3	3	2	9	4	2	

Tableau 2 : Nombre de guanos séquencés par colonie de parturition et date d'échantillonnage, et résultats de l'identification du prédateur pour chaque guano. Pour la suite des analyses, nous travaillerons sur les colonies pour lesquelles nous avons suffisamment de guanos correspondant à M. emarginatus, c 'est-à-dire Annepont (ANN), Sainte-Gemme (SGE) et Saint-Martin les Melles (SMM). Malheureusement, les résultats de séquençage pour l'échantillonnage d'août de la colonie SMM ont été obtenus tardivement et n'ont pu être analysés, c'est pourquoi il n'y a pas d'informations dans le tableau.

RESULTATS

1. Analyse des données de séquençage

Nous avons pu identifier l'espèce du prédateur (ici : chiroptère) par metabarcoding pour chaque guano. Parmi les prédateurs, nous avons détecté *M. emarginatus* mais également *R. ferrumequinum.* Cependant nous avons aussi identifié des guanos d'autres espèces que celles que nous ciblions : *Myotis myotis* (31 guanos) et *Eptesicus sp.* (1 guano) et d'autres prédateurs en tant que contamination environnementale comme *Hirundo rustica, Glis Glis.* Nous avons trouvé une forte variabilité de la proportion de guanos de *M. emarginatus* par date et par colonie. Sur les 1995 guanos séquencés, 427 proviennent de *M. emarginatus.* Pour certaines colonies, le nombre de guanos de *M. emarginatus* est bien trop faible voire nul (ex Allonne, Beaumont, Tableau 2) pour être inclus dans les analyses statistiques. C'est pourquoi seules trois colonies ont étés sélectionnées pour la suite de cette étude : Annepont, Sainte-Gemme et Saint-Martin-les-Melles. Ce jeu de données représente un total de 386 guanos (Tableau 2). Les résultats de séquençage des échantillons du mois d'août pour Saint-Martin-les-Melles (SMM) ont été obtenus trop tard pour que je puisse les incorporer à cette étude.

2. Analyses du régime alimentaire de *M. emarginatus*

2.a. Analyse de la qualité des données

Nous avons estimé la diversité attendue dans chaque guano à partir des nombres de Hill et du nombre de reads obtenus. Pour tous les échantillons, il n'y a pas de différence significative entre la diversité attendue et la diversité observée, quelques soit le rang taxonomique considéré (ordre, famille, genre). Le nombre de reads par guano est donc

suffisant pour tous les guanos retenus pour décrire les proies qu'ils contiennent. Nous avons réalisé les courbes d'accumulation par colonie-date, pour les rangs taxonomiques de l'ordre, de la famille et du genre, afin de voir si le nombre de guano échantillonné est suffisant pour décrire la richesse en proies. Nous obtenons deux types de profils. Dans le cas d'un faible nombre d'échantillons (n entre 10 et 28 pour l'ordre par exemple), la courbe d'accumulation ne s'infléchit pas, nous n'atteignons pas le plateau. Notre nombre de guano ne permet pas de décrire la diversité de proies potentielles du régime alimentaire de *M. emarginatus* dans ces cas-là (ex de Sainte-Gemme –SGE- août, Figure 10a). Dans d'autres cas, le nombre de guanos est suffisant pour atteindre le plateau (n supérieur à 28 au rang de l'ordre et la famille, ex de SMM en juillet, Figure 10b). Globalement pour la suite des analyses statistiques, le nombre de guano de *M. emarginatus* par colonie-date est satisfaisant pour décrire le régime alimentaire de *M. emarginatus* aux rangs taxonomiques de l'ordre et de la famille, mais pas du genre ou de l'espèce.

2.b. Description générale du régime alimentaire de *M. emarginatus*

Nous détectons dans le guano de *M. emarginatus* une grande diversité taxonomique de proies d'Arthropodes, avec 258 espèces, 229 genres, 102 familles, 12 ordres et 2 classes identifiées (Figure 11). Les ordres majoritairement détectés sont Araneae, Diptera, Lepidoptera et Coleoptera.

Cette diversité taxonomique peut se retrouver au sein d'un guano puisque chaque guano de *M. emarginatus* peut contenir entre une et 15 espèces d'arthropodes. Les espèces les plus occurrentes sont : *Araneus diadematus* (Araneae), *Nuctenea umbratica* (Araneae), *Araneus angulatus* (Araneae), *Cyclosa conica* (Araneae), *Zilla diodia* (Araneae), *Noctua pronuba*

(Lepidoptera), *Metellina merianae* (Araneae), *Musca domestica* (Diptera), *Metellina segmentata* (Araneae), *Parasteatoda tepidariorum* (Araneae) et *Stomoxys calcitrans* (Diptera).

Nous avons regardé la relation entre la fréquence des taxons dans le jeu de données et leur succès d'amplification en termes de nombre de reads. Nous observons trois types de patrons. D'une part, les taxons les plus fréquemment détectés dans notre jeu de données sont également les plus abondants en termes de reads. Au rang taxonomique de l'ordre cela concerne les Araneae et Diptera, et dans une moindre mesure, les Coleotera et Lepidoptera. D'autre part, beaucoup de taxons présentent une faible occurrence ainsi que peu de reads (au rang taxonomique de l'ordre : Blatteodea, Odonata). De rares taxons sont très peu présents dans le jeu de données mais très bien amplifiés. Au rang taxonomique de l'ordre, un seul ordre (Trichoptera) présente une occurrence très basse (occurrence=1, soit détecté dans un seul guano) et un nombre de reads très grand, le plus élevé de l'ensemble des ordres détectés (Figure 12). Ces résultats sont conservés aux autres rangs taxonomiques.

Enfin, nous observons une forte variabilité de la diversité et de la composition taxonomique du régime alimentaire de *M. emarginatus* entre les colonies et les dates d'échantillonnage (Figure 13). Ceci confirme la nécessité de réaliser des analyses de diversité alpha et beta.

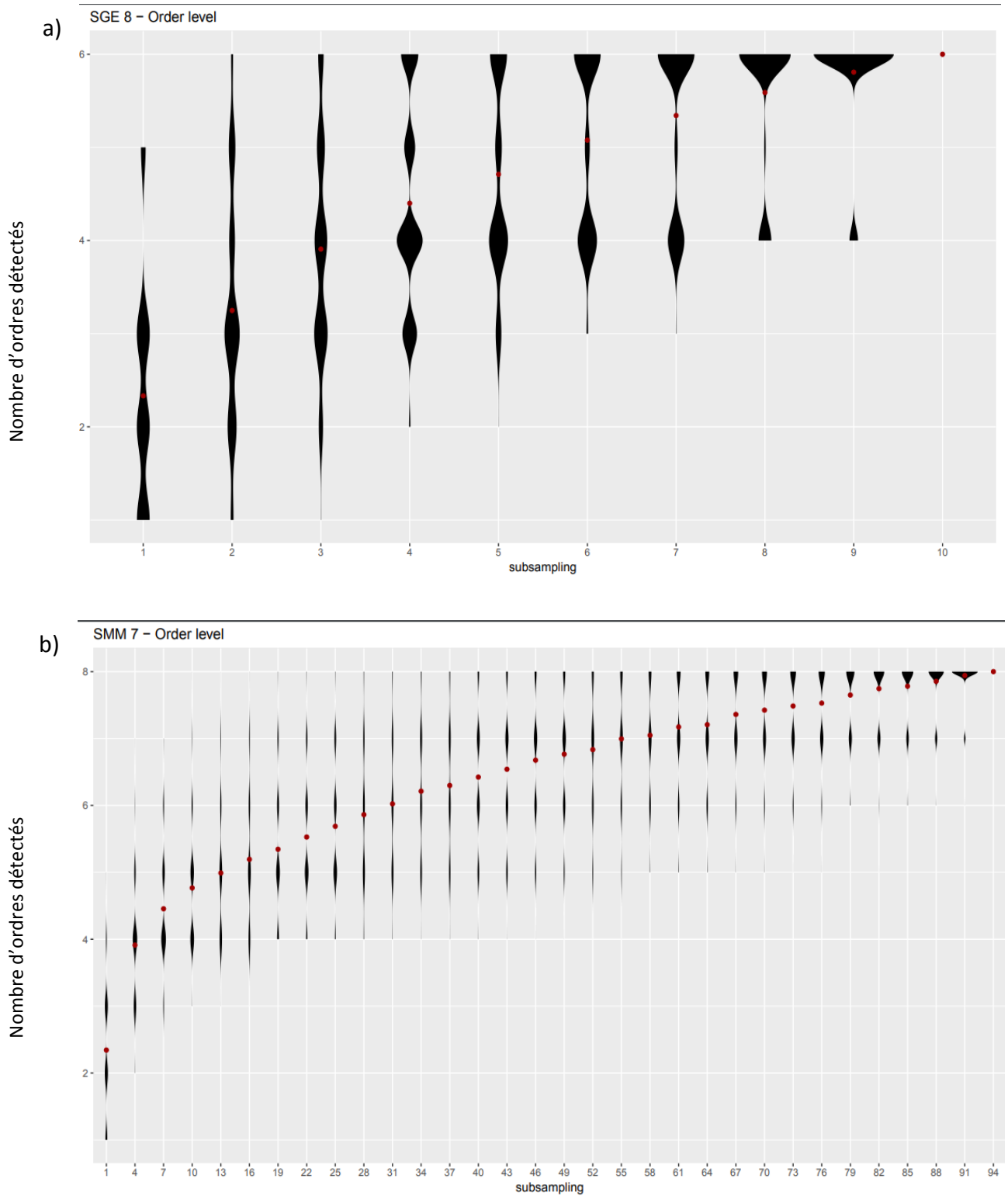


Figure 10 : Courbes d'accumulation représentant les ordres de proies détectés dans le régime alimentaire de *M. emarginatus* par rééchantillonnage aléatoire de guano dans le jeu de données. La figure a) correspond à la colonie de parturition de Sainte-Gemme (SGE), échantillons du mois d'août, n=10 guanos. La figure b) correspond à la colonie de parturition de Saint-Martin-les-Melles (SMM), échantillons du mois de Juillet, n=94 guanos. La largeur du 'violin plot' indique la densité de probabilité que le sous-échantillon contienne le nombre d'ordres affiché en ordonnée. Le point rouge correspond à la moyenne du nombre de taxons issus des tirages.

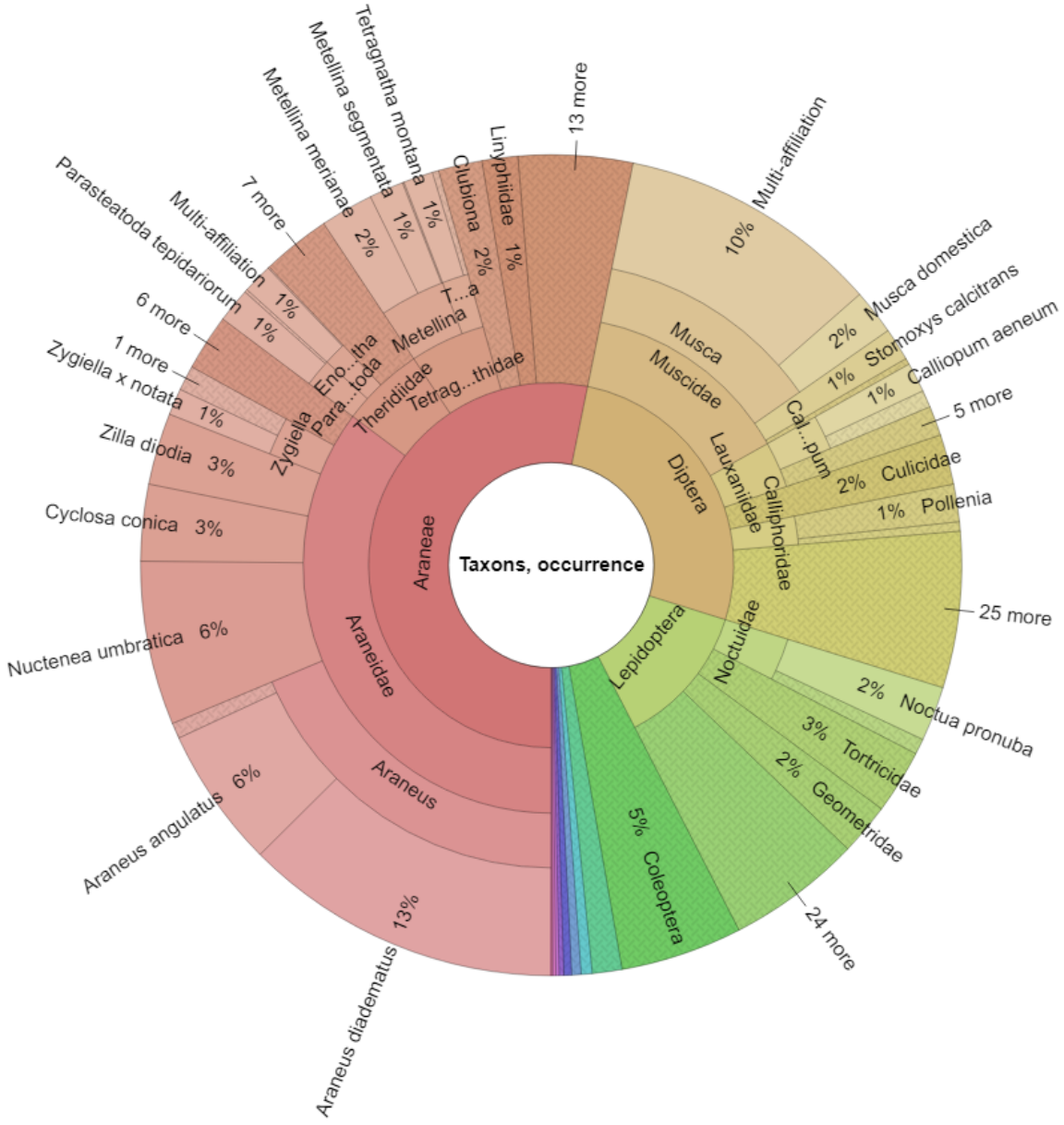


Figure 11 : Représentation hiérarchique de la diversité taxonomique d'arthropodes contenue dans les guanos de *M. emarginatus,* toutes colonies et dates d'échantillonnage confondues. Les différents cercles représentent les rangs taxonomiques (de l'espèce vers l'extérieur à la classe au centre). La largeur attribuée à chaque taxon est proportionnelle au pourcentage d'occurrences détectées. Les espèces dont l'occurrence est >3% sont illustrées d'une image. Cette figure montre la grande diversité taxonomique des proies consommées par *M. emarginatus*, et l'importance de quelques espèces majeures dont *Araneus diadematus*, *Araneus angulatus*, *Tortrix virdana*, *Tipula* sp., *Musca* sp., *Serica brunnea*.

2.c. Analyses statistiques de la variabilité du régime alimentaire

Pour ces analyses, nous avons considéré trois rangs taxonomiques : ordre, famille et genre. Les analyses au rang taxonomique de l'espèce sont écartées car certains groupes très occurrents (ex *Tipula*, *Musca*) sont souvent affiliés avec confiance au genre et non à l'espèce.

- Analyse de la diversité alpha

Nous avons tout d'abord estimé la diversité alpha des proies détectées, c'est-à-dire la richesse spécifique du régime alimentaire de *M. emarginatus*, pour les trois dates et colonies échantillonnées, avec les indices de Hill. Le seuil de significativité est fixé à 0.006 (correction de Bonferroni).

Rang taxonomique : Ordre

La diversité alpha ne varie pas de manière significative entre colonies et dates, lorsque l'on considère le rang taxonomique à l'ordre, quel que soit le poids donné aux taxons rares (*pour q=0 : p = 0.018, pour q=2 (équivalent à l'inverse de l'indice de Simpson): p = 0.024, pour q=5 : p = 0.027* , Figure 14a)

Rang taxonomique : Famille

La diversité alpha varie de manière significative entre colonies et dates pour le rang taxonomique de la famille pour les trois valeurs de *q* testées (*pour q=0 : p = 3.024e10^{-11}, pour q=2 : p = 3.783e10^{-11}, pour q=5 : p = 5.150e10^{-11}* ; Figure 14b).

Rang taxonomique : Genre

La diversité alpha varie également de manière significative quand on se place au rang taxonomique du genre pour les trois valeurs de *q* testées (*pour q=0 : p= 2.760e10^{-10}, pour q=2 : p=2.544e10^{-9}, pour q=5 : p= 2.456e10$^{-9,}$* Figure 14b).

Les tests *a posteriori* de Tukey ont été appliqués pour les rangs taxonomiques de la famille et du genre. Si on considère les familles, ces tests ont permis d'identifier neuf paires de colonies-dates dont les diversités alpha sont significativement différentes à la famille, quelques soit la valeur du paramètre *q* considéré (Figure 14a). Six d'entre elles incluent la colonie Annepont. Ces paires incluent des différences entre les trois colonies (ex Annepont / SMM) et entre les trois dates (ex Juin/ Juillet). Les plus fortes diversités sont observées en juillet à Annepont, et les plus faibles sont observées entre Annepont et Sainte-Gemme en juin (Figure 14a).

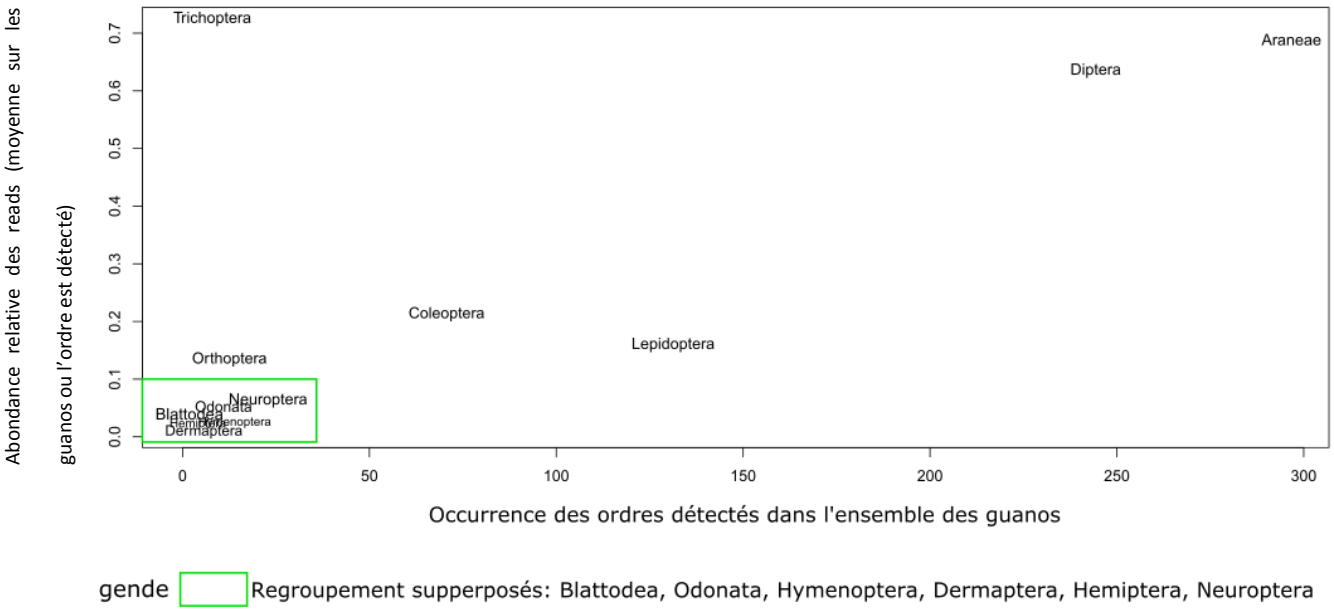


Figure 12 : Représentation de la relation entre l'occurrence des ordres détectés dans l'ensemble des guanos séquencés de *M. emarginatus*, toutes colonies et dates confondues, et la moyenne de l'abondance relative des reads correspondant à chacun de ces ordres, en considérant uniquement les guanos où l'ordre considéré est détecté. Cette figure montre que le régime alimentaire de *M. emarginatus* se caractérise par quelques ordres très fréquents et très bien amplifiés (forte abondance relative des reads dans les guanos), notamment les Araneae et les Diptera (ainsi que les Coleoptera et Lepidoptera), et de nombreux ordres très rarement détectés et très peu amplifiés, tels que les Dermaptera et Odonata.

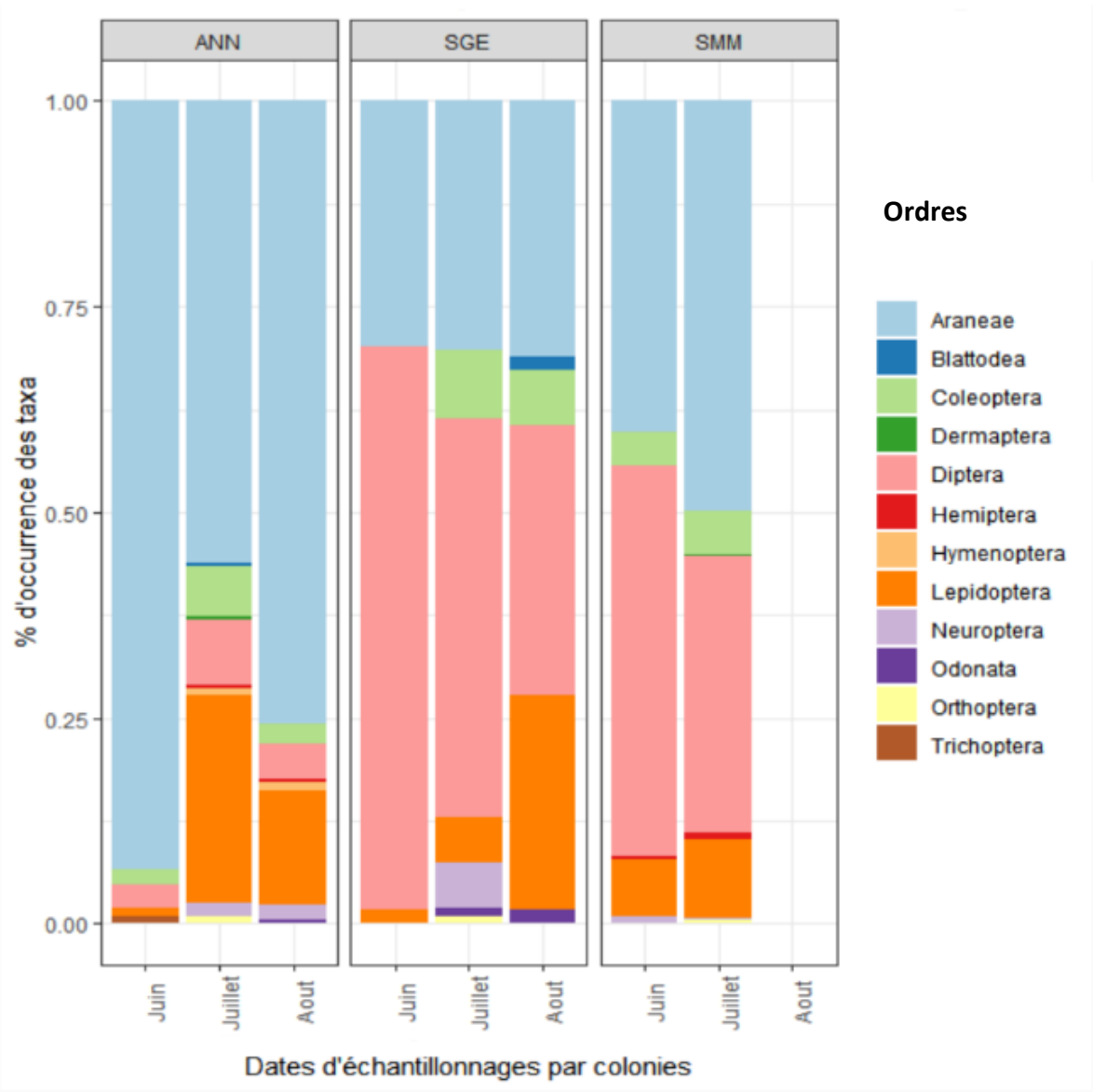


Figure 13 : Pourcentages d'occurrence des ordres détectés par date de récolte des échantillons et par colonie. ANN-Juin : n=30 ; ANN-Juillet : n=56, ANN-Août :n=55, SGE-Juin : n=25, SGE-Juillet : n=30, SGE-Aout : n=10, SMM-Juin : n=86, SMM-Juillet : n=94. ANN : Colonie d'Annepont, SGE : Colonie de Sainte-Gemme et SMM : Colonie de Saint-Martin-les-Melles. Cette figure montre la forte variabilité spatio-temporelle du régime alimentaire de *M. emarginatus*, même au rang taxonomique de l'ordre. Visuellement, Annepont se détache des deux autres colonies par un pourcentage d'occurrence majoritaire d'Araneae et un très grand nombre d'ordres de proies, en juillet.

Lorsque les tests de Tuckey sont réalisés au rang taxonomique du genre les mêmes paires qu'a la famille sont significatives à q0 avec l'ajout cependant d'une dixième paire significative : ANN 6 et SGE6. (Figure14b)

Contrairement aux tests à la famille, nous obtenons quelques différences lorsque nous faisons varier q. En effet, à q2 et q5, la paire ANN6 et ANN7 également significativement différentes.

- Estimation de l'indice de diversité beta

La diversité beta a été estimée avec les indices de Hill selon différents paramètres de *q* (0, de 2 ou 5) donnant un poids variable aux taxons peu fréquents dans notre jeu de donnée.

La valeur estimée de la diversité beta est très forte et avoisine la valeur maximale de 1 pour q=0, pour les trois rangs taxonomiques étudiés : ordre (β=0.893), famille (β=0.978), genre (β=0.986).

Ces estimations diminuent très rapidement quand q augmente, avoisinant la valeur minimale de 0 dès q=2 (équivalent de l'indice de Simpson) pour les trois rangs taxonomiques : ordre (β=0.005), famille (β=0.006), genre (β=0.006).

Pour q=5 (les taxons fréquents sont sur-pondérés) les estimations de diversité beta sont encore plus faibles : ordre (β=5.646e-09), famille (β=3.724e-09), genre (β=3.40e-09).

- Analyse de la significativité de la dissimilarité entre groupes (date, colonie)

Les matrices de dissimilarité ont étés calculées avec la méthode de Bray-Curtis qui tient compte de l'occurrence des taxons. Nous observons un effet significatif (p < 0.001) de la colonie et de la date d'échantillonnage, ainsi que de l'interaction entre ces deux facteurs (colonies*date de l'échantillonnage) sur cette matrice de dissimilarité de la composition en

proies. Ceci est valable pour les trois rangs taxonomiques considérés (voir Annexe 1 pour le détail des résultats des PermAnova).

3. Visualisation des différences de composition entre colonies et dates d'échantillonnages

Nous avons réalisé une méthode d'ordination, l'analyse multivariée non métrique (NMDS) basée sur la méthode de Bray-Curtis, pour décrire les différences de composition du régime alimentaire entre dates et colonies d'échantillonnage dans un nombre de dimensions réduit. Cette méthode utilise comme point de départ une matrice de distance entre les groupes (date ou colonie), puis un algorithme itératif est appliqué pour trouver une configuration qui représente le mieux la distance entre les colonies. C'est pourquoi cette analyse peut ne pas converger, ce que nous avons observé pour notre étude, au rang taxonomique du Genre pour tout groupe (date, colonie) considérés. Seule l'analyse réalisée pour le rang taxonomique de l'ordre a convergé et peut être représentée avec une bonne confiance (stress=0.051, ce qui indique une excellente représentation). Voir Figure 15 et 16.

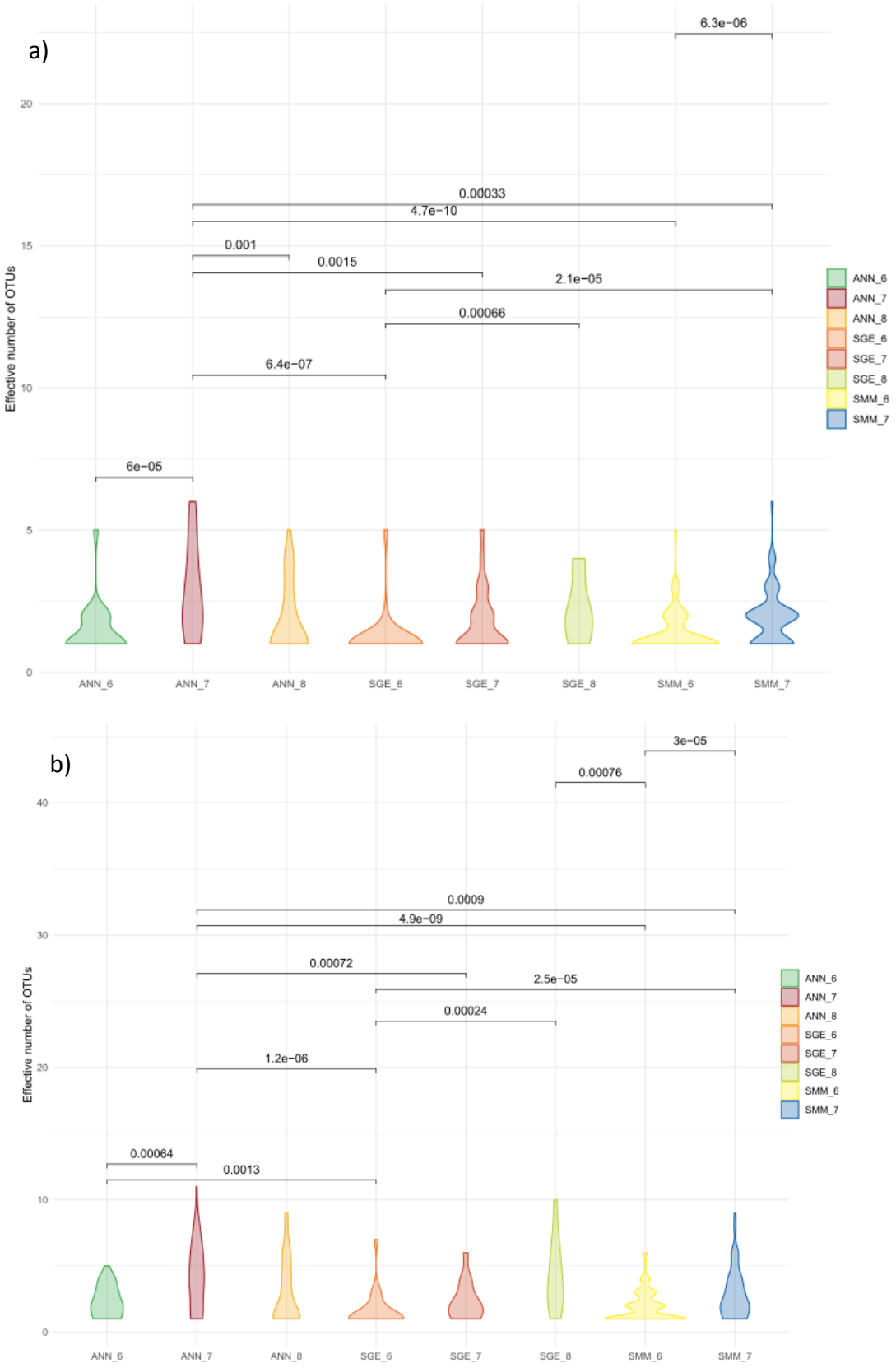


Figure 14: Variation de la diversité alpha en fonction de la date et de la colonie échantillonnées, estimée pour q=0 au niveau taxonomique a) Famille, b) Genre. Les barres horizontales indiquent les paires de colonie-date dont la diversité alpha sont significativement différentes. Ces figures montrent qu'il faut descendre au niveau taxonomique de la famille pour voir des différences de diversité alpha entre nos colonies et dates d'échantillonnage. Elles montrent également que la colonie d'Annepont a les plus fortes diversités alpha et est souvent impliquée dans les paires ayant des diversité alpha différentes.

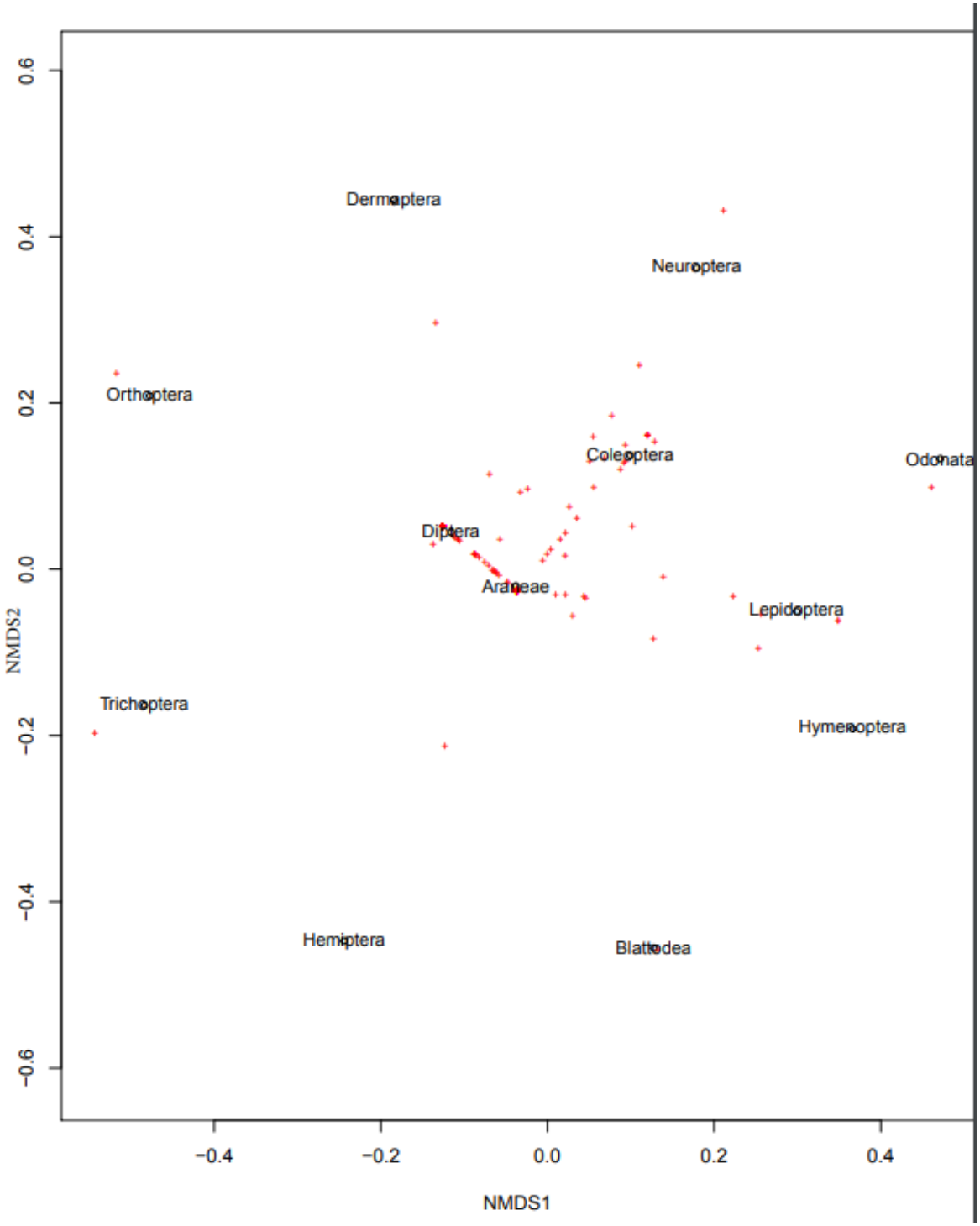
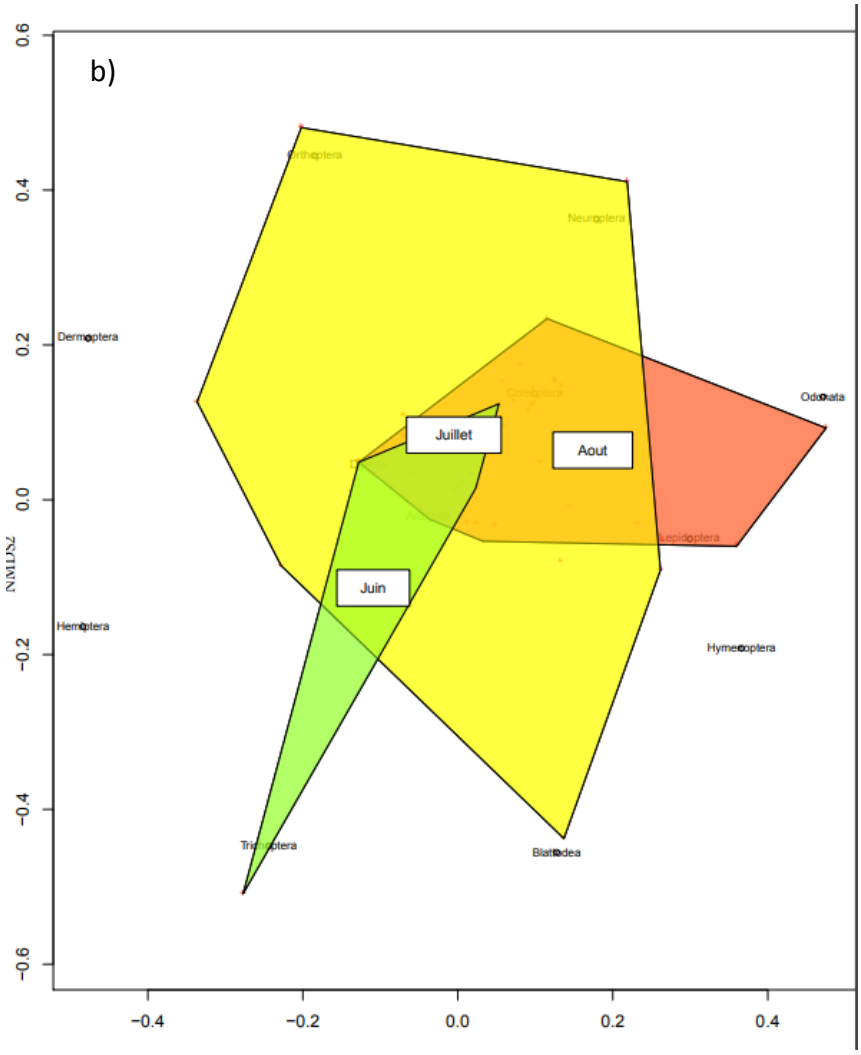


Figure 15: Résultats de la méthode d'ordination (NMDS pour non metric multidimensionnal scaling) appliquée avec la distance de dissimilarité de Bray-Curtis pour deux dimensions. Seule l'analyse réalisée pour le rang taxonomique de l'ordre a convergé et peut être représentée avec une bonne confiance (stress=0.051). La figures illustre a) la position des proies (au rang taxonomique de l'ordre) sur les deux axes de la NMDS, et la représentation du positionnement des individus.



c)

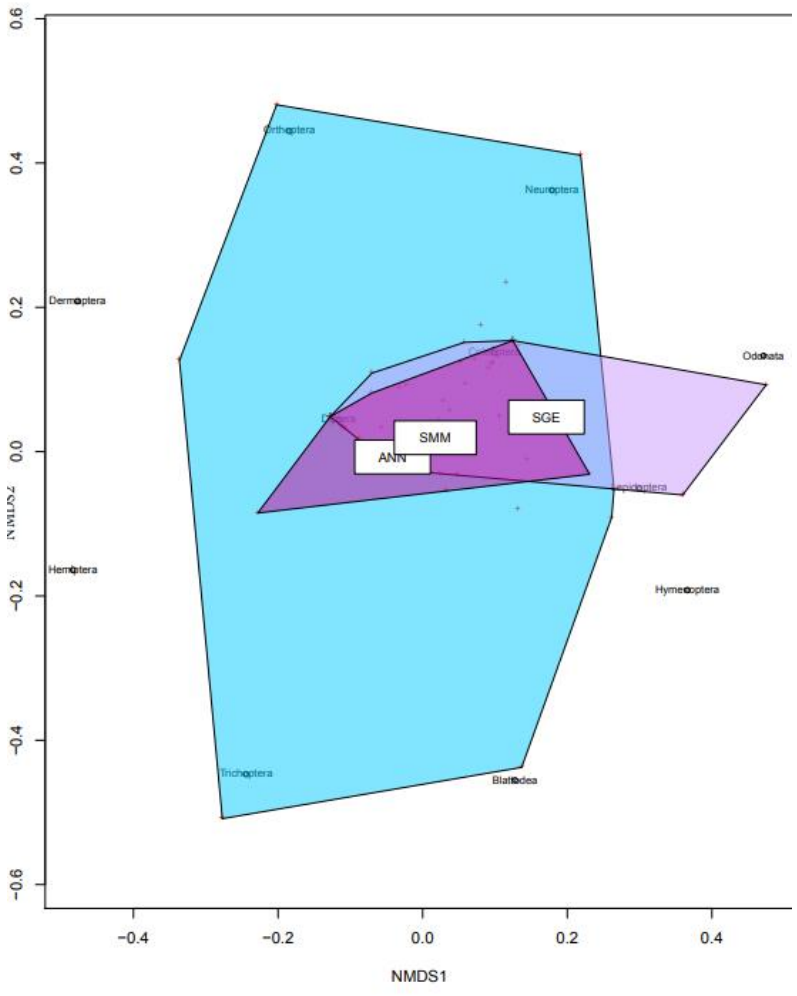


Figure 16 Résultats de la méthode d'ordination (NMDS pour non metric multidimensionnal scaling) appliquée avec la distance de dissimilarité de Bray-Curtis pour deux dimensions. Seule l'analyse réalisée pour le rang taxonomique de l'ordre a convergé et peut être représentée avec une bonne confiance (stress=0.051). Les figures illustrent b) NMDS par date d'échantillonnage et c) par colonie de parturition.

Ces figures montrent la grande dispersion des données de régime alimentaire de M. emarginatus en juillet et à Annepont, comparativement à juin et août, et aux colonies de Saint-Martin les Melles et Sainte-Gemme.

DISCUSSION

1. Le metabarcoding, un outil adapté pour décrire le régime alimentaire de *M. emarginatus* ?

1.a. Avantages du metabarcoding

Le metabarcoding nous a permis de traiter un grand nombre d'échantillon en parallèle. Dans cette étude, nous avons pu séquencer et analyser la composition en proies de 1995 guanos en quelques mois. Ceci aurait été impossible avec des analyses morphologiques des pièces dures d'arthropodes contenues dans les guanos. Pour exemple, moins de 40 guanos de *M. emarginatus* et *R. ferrumequinum* avaient été analysés morphologiquement lors d'un stage de M2 (Alizée Raymond, 2011).

Un autre avantage de la méthode de metabarcoding environnemental est de permettre de préciser au rang taxonomique du genre voire de l'espèce les proies consommées. C'est une connaissance bien plus précise que celle obtenue avec les analyses morphologiques, qui identifie les proies au rang taxonomique de l'ordre (Kervyn et al. 2012).

Enfin, le protocole de metabarcoding utilisé, développé à partir de Galan et al. (2018) nous a permis dans cette étude d'identifier à quelle espèce de vertébré correspondait chaque guano séquencé. Pour répondre à nos objectifs scientifiques, identifier le prédateur s'est avéré essentiel (Forin-Wiart et al. 2018) : les colonies de parturition suivies contiennent plusieurs espèces de chauves-souris et attribuer à tort sur des critères de forme un guano à une espèce créerait une diversité artificielle dans la composition du régime alimentaire qui biaiserait les résultats (Biffi et al. 2017). De plus, dans cette étude, nous avons obtenu une part non négligeable de guanos contaminés (deux espèces de vertébrés possibles) et d'ADN

correspondant même à des oiseaux. Ce protocole nous permet donc de travailler uniquement sur les guanos clairement identifiés et correspondant à l'espèce étudiée.

1.b. Limites du metabarcoding

Malgré la puissance du metabarcoding pour décrire la diversité en proies, cette méthode n'est pas exempte de limitations et de biais méthodologiques potentiels de la collecte des échantillons jusqu'à l'analyse des résultats (voir annexe 2, tableau résumant les biais principaux de notre étude). Tout d'abord, les résultats obtenus ne représentent qu'une fraction de ce que *M. emarginatus* consomme. En effet, l'identification des séquences d'ADN de proies détectées dépend de la qualité et de l'exhaustivité des bases de données publiques utilisées. Dans cette étude, une partie non négligeable des séquences obtenues ne trouve pas de correspondance dans les bases de données et ne sont donc pas assignées à des taxons.

Ensuite, les biais d'amplification entre taxons nous permettent uniquement une analyse qualitative de chaque guano en termes de présence/absence de proies par guano. Nous ne pouvons avoir une quantification absolue des différentes proies consommées par un individu. L'individualisation des guanos permet néanmoins d'avoir des résultats semi-quantitatif.

Enfin, nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'amplifier des restes de repas de proies-prédateurs comme les araignées qui sont fortement présentes dans le régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées, et de les attribuer à tort à *M. emarginatus.* Nous avons par exemple conservé avec doutes des Orthoptères dans notre jeu de données. Extrapoler les proies préférentielles de *M. emarginatus* pourrait ainsi être biaisé par les restes de proies communes avec les Araignées.

2. Quel effort d'échantillonnage pour une description rigoureuse du régime alimentaire ?

2.a. Le problème des colonies mixtes

Malgré un effort d'échantillonnage et de séquençage important de 1995 guanos provenant de sept colonies de parturition mixtes Murin à oreilles échancrées / Grand rhinolophe, nous n'avons identifié que 386 guanos appartenant à *M. emarginatus*, soit moins de 20%. Pour certaines colonies, aucuns guanos de *M. emarginatus* n'a été avéré quelque-soit la date d'échantillonnage. Les sites pour les colonies de parturitions peuvent changer d'année en année, les femelles de cette espèce peuvent également rejoindre plus tardivement les colonies en lien avec les conditions météorologiques et leur cycle d'hibernation plus long que *R. ferrumequinum*. Il est donc important de connaître la dynamique des colonies et de travailler sur des colonies suivies par des naturalistes. Mais malgré cette connaissance, il n'est pas possible d'identifier morphologiquement les guanos, nous devons donc analyser un grand nombre d'échantillons pour arriver à détecter l'espèce étudiée. Limiter les contaminations est un aspect important dans ce type d'études. Ainsi il pourrait être intéressant de tester si certaines mesures limitent les contaminations environnementales des guanos, comme surélever les assiettes permettant de les récolter. Comparer nos résultats avec ceux obtenus pour des colonies mono-espèces pourrait également nous permettre d'écarter les contaminations entre guanos d'espèces différentes.

2.b. Le problème de la diversité des proies dans le régime alimentaire

Nos résultats ont révélé un très grand nombre de taxons de proies (ou proies secondaires) dans le régime alimentaire de *M. emarginatus*. Les courbes d'accumulation

réalisées ne montrent pas de réel plateau, même pour les sites présentant 94 guanos, quelque-soit le rang taxonomique considéré. Le nombre de guanos nécessaire à l'identification exhaustive des proies de *M. emarginatus* semble donc très élevé (infini au rang de l'espèce). Il nous faudra donc être prudent sur l'analyse écologique de nos résultats. Cependant, cette affirmation peut être nuancée car de nombreux taxons ne sont détectés qu'une seule fois parmi l'ensemble des 386 guanos analysés. La collecte d'échantillons supplémentaires serait nécessaire pour mieux décrire la diversité de proies dans chaque colonie pour chaque date d'échantillonnage. Mais l'aspect logistique et financier dans ce type d'étude est toujours contraignant et à prendre en compte. En effet, les colonies de parturition sont en majorité chez des particuliers et le dérangement des chauves-souris est un problème à limiter. Il est donc délicat de retourner fréquemment dans ces colonies. Enfin, ces analyses moléculaires sont relativement coûteuses et doivent être réfléchies parcimonieusement étant donné les budgets de la recherche et des associations naturalistes.

3. Le régime alimentaire de *M. emarginatus* : diversité et variabilité

3.a. Diversité taxonomique

Nos résultats ont révélé une diversité taxonomique très grande avec 258 espèces correspondant à 229 genres identifiées. Cette diversité s'observe à l'échelle du guano, qui peut contenir jusqu'à 15 espèces de proies. Nos résultats indiquent que quatre ordres taxonomiques sont majoritaires en occurrence : Araneae, Diptera, Lepidoptera, Coleoptera. Parmi ces quatre ordres, un nombre réduit de genres contribue à leurs occurrences : *Araneus* pour les Araneae ; *Musca* et *Tipula* pour les Diptera. Concernant les Coleoptera et les Lepidoptera, nous n'observons pas de genre clairement dominant. Nos résultats sont donc en

accord avec la littérature où *M. emarginatus* présente un spectre de proies relativement spécialisé (araignées orbitèles, diptères *Musca* et Lépidoptères, Coléoptères et Neuroptères, d'après Prévost et Gailledrat 2011; Arthur et Lemaire 2015;Goiti et al. 2011 ; Beck 1995 ; Kervyn et al. 2012). Notre analyse permet de détecter les proies consommées de manière plus opportuniste, ce qui élargit le spectre du régime alimentaire connu de *M. emarginatus.* Cette description pourrait également être améliorées car les émergences ponctuelles d'insectes peuvent être difficiles à détecter et pourtant peuvent représenter une portion non négligeable du régime alimentaire de l'espèce.

3.b. Diversité locale et variabilité spatio-temporelle

La comparaison des diversités alpha entre colonies et dates d'échantillonnage suggère que la richesse spécifique du régime alimentaire de *M. emarginatus* peut varier dans l'espace et le temps, pas au niveau des ordres mais si l'on considère des rangs taxonomiques inférieurs. Les Murins à oreilles échancrées de la colonie d'Annepont, en Charentes-Maritime, semblent avoir la plus forte diversité taxonomique de régime alimentaire. La diversité des proies consommées semble globalement plus forte et en juillet, potentiellement suite à des émergences d'insectes. Des suivis entomologiques pourraient permettre de tester cette possibilité.

L'analyse de la diversité beta montre que la composition et/ou la variance du régime alimentaire de *M. emarginatus* peut varier dans l'espace et le temps. Au rang taxonomique de l'ordre, la composition du régime alimentaire de *M. emarginatus* entre dates et colonies est assez homogène (Diptera, Coleoptera, Araneae). La variance et la composition du régime alimentaire semblent être liées à des ordres plus faiblement représentés (Lepidoptera

pour Sainte-Gemme) ou très rares qui créent de la stochasticité environnementale (ex Odonata pour Sainte-Gemme ; Trichoptera pour Annepont).

Le protocole d'échantillonnage ne nous permet pas de tester les facteurs qui pourraient expliquer cette différence de diversité et de composition du régime alimentaire de *M. emarginatus* entre colonies et dates d'échantillonnage. Les résultats exploratoires obtenus dans cette étude et les limites du metabarcoding identifiées vont permettre de mieux définir avec les associations naturalistes les questions écologiques et les protocoles d'échantillonnage en lien avec l'analyse du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées.

CONCLUSION

Cette étude exploratoire permet de valider la faisabilité et l'intérêt de l'approche moléculaire du metabarcoding pour l'étude du régime alimentaire des chauves-souris insectivores. Cette méthodologie est appliquée en parallèle pour l'analyse du régime alimentaire du Grand rhinolophe, dans ces mêmes colonies de parturition. Les résultats biologiques obtenus seront intégrés au projet de thèse d'Orianne Tournayre, afin de comparer la diversité et la variabilité du régime alimentaire de deux espèces de chauve-souris partageant les mêmes colonies de parturition.

Le projet de thèse dans lequel s'intègre mon stage fait partie du programme « Grand Rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique des populations ». Ce projet multi-acteurs regroupe des naturalistes et des chercheurs de différentes disciplines et différents laboratoires depuis 2016. Les partenariats chercheurs / naturalistes présentent de nombreux avantages : ils permettent de mutualiser les moyens financiers (ex : ce partenariat a permis le financement de la thèse d'Orianne par le

LabEX ceMEB) mais surtout d'échanger de multiples connaissances. Les partenaires associatifs apportent leurs connaissances du terrain, leur expertise naturaliste mais aussi un cadre réglementaire avec les réseaux d'acteurs locaux, départementaux, nationaux. Les chercheurs apportent leur expertise scientifique et leurs outils technologiques, parfois de pointe. La mutualisation de ces connaissances garantit la qualité des projets menés, et le transfert des connaissances vers les décideurs. Mon équipe d'accueil au CBGP dépend de l'INRA. Travailler avec des partenaires associatifs leur permet d'ancrer les recherches menées autour de questions sociétales liées à la conservation de la biodiversité. Les résultats exploratoires obtenus dans cette étude et les limites du metabarcoding identifiées vont permettre de mieux définir avec les associations naturalistes les questions écologiques concernant la diversité et la variabilité du régime alimentaire du Murin à oreilles échancrées.

Améliorer les connaissances biologiques de cette espèce peut avoir des répercussions dans le cadre de l'aménagement du territoire ou de la conservation de cette espèce. Par exemple, réaliser un état des lieux de la disponibilité en proies pour les colonies de parturition pourrait s'avérer un complément intéressant pour identifier les sites favorables à l'espèce. Il s'agirait d'établir une stratégie de conservation 'win-win' pour la protection du prédateur et de ses proies. Ces données ouvrent également sur de nouvelles questions relatives à l'état de santé des colonies et des individus. Les différences de régime alimentaire peuvent affecter la valeur sélective, directement (impact sur l'immunité, la croissance, la survie, la reproduction…) ou indirectement via des expositions contrastées aux polluants par exemple. Mis en parallèle, le régime alimentaire et la condition corporelle des individus pourraient peut-être permettre d'expliquer certaines tendances démographiques observées, et ouvrir la voie à une meilleure compréhension des dynamiques de population actuelles.

BIBLIOGRAPHIE ET WEBOGRAPHIE DU RAPPORT DE STAGE

Alberdi, Antton, et M. Thomas P. Gilbert. 2019. « Hilldiv: An R Package for the Integral Analysis of Diversity Based on Hill Numbers ». *BioRxiv*, février, 545665. https://doi.org/10.1101/545665.

Alberdi, Antton, Orly Razgour, Ostaizka Aizpurua, Roberto Novella-Fernandez, Joxerra Aihartza, Ivana Budinski, Inazio Garin, et al. 2019. « Diet Diversification Shapes Broad-Scale Distribution Patterns in European Bats ». *BioRxiv*, juillet, 704759. https://doi.org/10.1101/704759.

Arthur, Laurent, et Michèle Lemaire. 2015. *Les Chauves-souris de France, Belgique, Luxembourg et Suisse.* Deuxième Edition. Mèze, France: MNHN & Biotope.

Azam, Clémentine, Christian Kerbiriou, Arthur Vernet, Jean-François Julien, Yves Bas, Laura Plichard, Julie Maratrat, et Isabelle Le Viol. 2015. « Is Part-Night Lighting an Effective Measure to Limit the Impacts of Artificial Lighting on Bats? » *Global Change Biology* 21 (12): 4333‑41. https://doi.org/10.1111/gcb.13036.

Azam, Clémentine, Isabelle Le Viol, Yves Bas, Georges Zissis, Arthur Vernet, Jean-François Julien, et Christian Kerbiriou. 2018. « Evidence for Distance and Illuminance Thresholds in the Effects of Artificial Lighting on Bat Activity ». *Landscape and Urban Planning* 175 (juillet): 123‑35. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2018.02.011.

Beck, Andres. 1995. « Fecal Analyses of European Bat Species ». *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/284762006_Fecal_analyses_of_European_bat_species.

Biffi, Marjorie, François Gillet, Pascal Laffaille, Fanny Colas, Stéphane Aulagnier, Frédéric Blanc, Maxime Galan, et al. 2017. « Novel Insights into the Diet of the Pyrenean Desman (Galemys Pyrenaicus) Using next-Generation Sequencing Molecular Analyses ». *Journal of Mammalogy* 98 (5): 1497‑1507. https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx070.

Boldogh, Sándor, Dénes Dobrosi, et Péter Samu. 2007. « The Effects of the Illumination of Buildings on House-Dwelling Bats and Its Conservation Consequences ». *Acta Chiropterologica* 9 (2): 527‑34. https://doi.org/10.3161/1733-5329(2007)9[527:TEOTIO]2.0.CO;2.

Bontadina, Fabio, Sebastian F. Schmied, Andres Beck, et Raphaël Arlettaz. 2008. « Changes in Prey Abundance Unlikely to Explain the Demography of a Critically Endangered Central European Bat ». *Journal of Applied Ecology* 45 (2): 641‑48. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01417.x.

Boyles, Justin G., et Jonathan J. Storm. 2007. « The Perils of Picky Eating: Dietary Breadth Is Related to Extinction Risk in Insectivorous Bats ». Édité par Will Cresswell. *PLoS ONE* 2 (7): e672. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000672.

Callahan, Benjamin J, Paul J McMurdie, Michael J Rosen, Andrew W Han, Amy Jo A Johnson, et Susan P Holmes. 2016. « DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data ». *Nature Methods* 13 (mai): 581.

Díaz, Sandra, Josef Settele, Eduardo Brondízio, Hien T Ngo, Maximilien Guèze, John Agard, Almut Arneth, et al. 2019. « Summary for Policymakers of the Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services – Unedited Advance Version », mai, 39.

Dietz, Markus, Jacques B. Pir, et Jessica Hillen. 2013. « Does the Survival of Greater Horseshoe Bats and Geoffroy's Bats in Western Europe Depend on Traditional Cultural

Landscapes? » *Biodiversity and Conservation* 22 (13‑14): 3007‑25. https://doi.org/10.1007/s10531-013-0567-4.

Edgar, Robert C., Brian J. Haas, Jose C. Clemente, Christopher Quince, et Rob Knight. 2011. « UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection ». *Bioinformatics* 27 (16): 2194‑2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381.

Escudié, Frédéric, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Katia Vidal, Sarah Maman, Guillermina Hernandez-Raquet, Sylvie Combes, et Géraldine Pascal. 2018. « FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution ». *Bioinformatics* 34 (8): 1287‑94. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791.

Fensome, Amy Grace, et Fiona Mathews. 2016. « Roads and Bats: A Meta-Analysis and Review of the Evidence on Vehicle Collisions and Barrier Effects ». *Mammal Review* 46 (4): 311‑23. https://doi.org/10.1111/mam.12072.

Flanders, Jon, Gareth Jones, Petr Benda, Christian Dietz, Shuyi Zhang, Gang Li, Mozafar Sharifi, et Stephen J. Rossiter. 2009. « Phylogeography of the Greater Horseshoe Bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: Contrasting Results from Mitochondrial and Microsatellite Data ». *Molecular Ecology* 18 (2): 306‑18. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04021.x.

Fleishman, Erica, Dennis D. Murphy, et Peter F. Brussard. 2000. « A NEW METHOD FOR SELECTION OF UMBRELLA SPECIES FOR CONSERVATION PLANNING ». *Ecological Applications* 10 (2): 569‑79. https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0569:ANMFSO]2.0.CO;2.

Forin-Wiart, Marie-Amélie, Marie-Lazarine Poulle, Sylvain Piry, Jean-François Cosson, Claire Larose, et Maxime Galan. 2018. « Evaluating Metabarcoding to Analyse Diet Composition of Species Foraging in Anthropogenic Landscapes Using Ion Torrent and Illumina Sequencing ». *Scientific Reports* 8 (1): 1‑12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34430-7.

Galan, Maxime, Jean-Baptiste Pons, Orianne Tournayre, Éric Pierre, Maxime Leuchtmann, Dominique Pontier, et Nathalie Charbonnel. 2018. « Metabarcoding for the Parallel Identification of Several Hundred Predators and Their Prey: Application to Bat Species Diet Analysis ». *Molecular Ecology Resources* 18 (3): 474‑89. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749.

Goiti, Urtzi, Joxerra Aihartza, Maider Guiu, Egoitz Salsamendi, David Almenar, Maria Napal, et Inazio Garin. 2011. « Geoffroy's bat, *Myotis emarginatus*, preys preferentially on spiders in multistratified dense habitats: a study of foraging bats in the Mediterranean ». *Folia Zoologica* 60 (1): 17‑24. https://doi.org/10.25225/fozo.v60.i1.a3.2011.

Hebert, Paul D. N., Alina Cywinska, Shelley L. Ball, et Jeremy R. deWaard. 2003. « Biological Identifications through DNA Barcodes ». *Proceedings. Biological Sciences* 270 (1512): 313‑21. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218.

Hutson, Anthony Michael., Simon P. Mickleburgh, et Paul A. Racey. 2001. *Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan*. IUCN. Gland, Switzerland, Cambridge, UK.

IUCN France, MNHN, SFEPM, et ONCFS. 2017. « La Liste rouge des espèces menacées en France, Mammifères de France métropolitaine: Synthèse des changements de catégories entre 2009 et 2017 ». Paris, France: UICN France, MNHN, SFEPM & ONCFS. https://uicn.fr/wp-content/uploads/2017/11/synthese-changements-categories-liste-rouge-mammiferes-de-france-metropolitaine.pdf.

IUCN Red List. 2017. « IUCN Red List Version 2017-1: : Numbers of Threatened Species by Major Groups of Organisms (1996–2017) ». Table 1. https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics.

———. 2018. « IUCN Red List Version 2018-2: Table 4a Category Summary for All Animal Classes and Orders ». Table 4a. https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics.

Jones, Gareth. 1990. « Prey Selection by the Greater Horseshoe Bat (*Rhinolophus ferrumequinum*): Optimal Foraging by Echolocation? » *Journal of Animal Ecology* 59 (2): 587‑602. https://doi.org/10.2307/4882.

———. 2008. « Sensory Ecology: Noise Annoys Foraging Bats ». *Current Biology: CB* 18 (23): R1098-1100. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.005.

Jung, Kirsten, et Caragh G. Threlfall. 2016. « Urbanisation and Its Effects on Bats—A Global Meta-Analysis ». In *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*, édité par Christian C. Voigt et Tigga Kingston, 13‑33. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_2.

Kervyn, Thierry, Marie-Céline Godin, Rudy Jocqué, Patrick Grootaert, et Roland Libois. 2012. « Web-Building Spiders and Blood-Feeding Flies as Prey of the Notch-Eared Bat (*Myotis emarginatus*) », 9.

Krull, D., A. Schumm, W. Metzner, et G. Neuweiler. 1991. « Foraging Areas and Foraging Behavior in the Notch-Eared Bat, *Myotis emarginatus* (Vespertilionidae) ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 28 (4): 247‑53. https://doi.org/10.1007/BF00175097.

Kunz, Thomas H., Elizabeth Braun de Torrez, Dana Bauer, Tatyana Lobova, et Theodore H. Fleming. 2011. « Ecosystem Services Provided by Bats ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223 (1): 1‑38. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x.

MacArthur, Robert H., et Edward O. Wilson. 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press.

Maine, Josiah J., et Justin G. Boyles. 2015. « Bats Initiate Vital Agroecological Interactions in Corn ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (40): 12438‑43. https://doi.org/10.1073/pnas.1505413112.

Mickleburgh, Simon P., Anthony M. Hutson, et Paul A. Racey. 2002. « A Review of the Global Conservation Status of Bats ». *Oryx* 36 (1): 18‑34. https://doi.org/10.1017/S0030605302000054.

MNHN, SFEPM, ONCFS, et IUCN France. 2018. « Liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Mammifères de France métropolitaine. Paris, France. Rapport d'évaluation. » Rapport d'évaluation - Fiches techniques sur les espèces évaluées. MNHN, UICN France, SFEPM & ONCFS. https://uicn.fr/wp-content/uploads/2019/02/rapport-evaluation-liste-rouge-mammiferes-de-france-metropolitaine.pdf.

Oksanen, Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, et al. 2019. *vegan: Community Ecology Package* (version 2.5-5). https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

Ondov, BD, NH Bergman, et AM Phillippy. 2011. « Interactive metagenomic visualization in a Web browser. - PubMed - NCBI ». 2011. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961884.

Park, Kirsty J. 2015. « Mitigating the impacts of agriculture on biodiversity: bats and their potential role as bioindicators ». *Mammalian Biology*, Special Issue: Bats as Bioindicators, 80 (3): 191‑204. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2014.10.004.

Poitou-Charentes Nature. 2018. « Liste rouge des Mammifères du Poitou-Charentes - Chapitre Mammifères. Fontaine-le-Comte. »

Prévost, Olivier, et Miguel Gailledrat. 2011. *Atlas des mammifères sauvages du Poitou-Charentes (1985-2008)*. Cahiers techniques. Poitou-Charentes Nature.

Roberge, Jean-Michel, et Per Angelstam. 2004. « Usefulness of the Umbrella Species Concept as a Conservation Tool ». *Conservation Biology* 18 (1): 76‑85. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00450.x.

Rognes, Torbjørn, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, et Frédéric Mahé. 2016. « VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics ». *PeerJ* 4 (octobre): e2584. https://doi.org/10.7717/peerj.2584.

Schäler, Jonas, Georg Thaller, et Dirk Hinrichs. 2018. « R Core Team (2018): R A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. - References - Scientific Research Publishing ». 2018. https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2342186.

Sierro, Antoine, et Raphaël Arlettaz. 1997. « Barbastelle bats (Barbastella spp.) specialize in the predation of moths: implications for foraging tactics and conservation ». *Acta Oecologica* 18 (2): 91‑106. https://doi.org/10.1016/S1146-609X(97)80067-7.

Sow, Ahmadou, Thierry Brévault, Laure Benoit, Marie-Pierre Chapuis, Maxime Galan, Armelle Coeur D'acier, Gérard Delvare, Mbacké Sembène, et Julien Haran. 2019. « Deciphering Host-Parasitoid Interactions and Parasitism Rates of Crop Pests Using DNA Metabarcoding ». *Scientific Reports* 9 (1): 3646. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40243-z.

Taberlet, Pierre, Eric Coissac, François Pompanon, Christian Brochmann, et Eske Willerslev. 2012. « Towards Next-Generation Biodiversity Assessment Using DNA Metabarcoding ». *Molecular Ecology* 21 (8): 2045‑50. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x.

Tapiero, A. 2017. « Plan National d'Actions en faveur des Chiroptères 2016-2025 ». Rapport du MEDDE. Fédération des CEN & MEDDE.

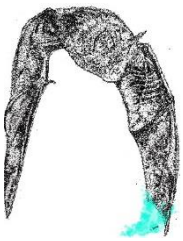
Valentini, Alice, François Pompanon, et Pierre Taberlet. 2009. « DNA Barcoding for Ecologists ». *Trends in Ecology & Evolution* 24 (2): 110‑17. https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011.

Vamos, Ecaterina, Vasco Elbrecht, et Florian Leese. 2017. « Short COI Markers for Freshwater Macroinvertebrate Metabarcoding ». *Metabarcoding and Metagenomics* 1 (septembre): e14625. https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625.

Voigt, Christian, et Tigga Kingston. 2016. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. SpringerOpen.

Warren, Martin S., et Nigel A. D. Bourn. 2011. « Ten Challenges for 2010 and beyond to Conserve Lepidoptera in Europe ». *Journal of Insect Conservation* 15 (1): 321‑26. https://doi.org/10.1007/s10841-010-9356-5.

Wickham, Hadley. 2011. « Ggplot2 ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 3 (2): 180‑85. https://doi.org/10.1002/wics.147.



BIBLIOGRAPHIE

Abumandour, Mohamed M. A., et Raafat M. A. El-Bakary. 2013. « Morphological and Scanning Electron Microscopic Studies of the Tongue of the Egyptian Fruit Bat (*Rousettus Aegyptiacus*) and Their Lingual Adaptation for Its Feeding Habits ». *Veterinary Research Communications* 37 (3): 229-38. https://doi.org/10.1007/s11259-013-9567-9.

Adams, J.R, Vucetich Leah M., Hedrick Philip W., Peterson Rolf O., et Vucetich John A. 2011. « Genomic sweep and potential genetic rescue during limiting environmental conditions in an isolated wolf population ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1723): 3336-44. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0261.

Agosta, Salvatore J., David Morton, et Kellie M. Kuhn. 2003. « Feeding Ecology of the Bat *Eptesicus Fuscus*: 'Preferred' Prey Abundance as One Factor Influencing Prey Selection and Diet Breadth ». *Journal of Zoology* 260 (2): 169-77. https://doi.org/10.1017/S0952836903003601.

Ahmim, M., et A. Moali. 2013. « The diet of four species of horseshoe bat (Chiroptera: Rhinolophidae) in a mountainous region of Algeria: evidence for gleaning. » *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 24 (2): 174-76.

Aizpurua, Ostaizka, Ivana Budinski, Panagiotis Georgiakakis, Shyam Gopalakrishnan, Carlos Ibañez, Vanessa Mata, Hugo Rebelo, et al. 2018. « Agriculture Shapes the Trophic Niche of a Bat Preying on Multiple Pest Arthropods across Europe: Evidence from DNA Metabarcoding ». *Molecular Ecology* 27 (3): 815-25. https://doi.org/10.1111/mec.14474.

Alberdi, A., et M.T.P. Gilbert. 2019. « hilldiv: an R package for the integral analysis of diversity based on Hill numbers. » *bioRxiv*, n° 545665.

Alberdi, Antton, Ostaizka Aizpurua, Kristine Bohmann, Shyam Gopalakrishnan, Christina Lynggaard, Martin Nielsen, et Marcus Thomas Pius Gilbert. 2019. « Promises and Pitfalls of Using High-Throughput Sequencing for Diet Analysis ». *Molecular Ecology Resources* 0 (0). https://doi.org/10.1111/1755-0998.12960.

Alberdi, Antton, Ostaizka Aizpurua, M. Thomas P. Gilbert, et Kristine Bohmann. 2018. « Scrutinizing Key Steps for Reliable Metabarcoding of Environmental Samples ». *Methods in Ecology and Evolution* 9 (1): 134-47. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849.

Alberdi, Antton, Inazio Garin, Ostaizka Aizpurua, et Joxerra Aihartza. 2012. « The Foraging Ecology of the Mountain Long-Eared Bat *Plecotus Macrobullaris* Revealed with DNA Mini-Barcodes ». *Plos One* 7 (4): e35692. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035692.

Alberdi, Antton, Orly Razgour, Ostaizka Aizpurua, Roberto Novella-Fernandez, Joxerra Aihartza, Ivana Budinski, Inazio Garin, et al. 2019. « Diet Diversification Shapes Broad-Scale Distribution Patterns in European Bats ». *BioRxiv*, juillet, 704759. https://doi.org/10.1101/704759.

Albrechtsen, Anders, Finn Cilius Nielsen, et Rasmus Nielsen. 2010. « Ascertainment Biases in SNP Chips Affect Measures of Population Divergence ». *Molecular Biology and Evolution* 27 (11): 2534-47. https://doi.org/10.1093/molbev/msq148.

Aldasoro, Miren, Inazio Garin, Nerea Vallejo, Unai Baroja, Aitor Arrizabalaga-Escudero, Urtzi Goiti, et Joxerra Aihartza. 2019. « Gaining Ecological Insight on Dietary Allocation

among Horseshoe Bats through Molecular Primer Combination ». *PLOS ONE* 14 (7): e0220081. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220081.

Allendorf, Fred W. 2017. « Genetics and the Conservation of Natural Populations: Allozymes to Genomes ». *Molecular Ecology* 26 (2): 420-30. https://doi.org/10.1111/mec.13948.

Allendorf, Fred W., Paul A. Hohenlohe, et Gordon Luikart. 2010. « Genomics and the Future of Conservation Genetics ». *Nature Reviews Genetics* 11 (10): 697-709. https://doi.org/10.1038/nrg2844.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, et D. J. Lipman. 1990. « Basic Local Alignment Search Tool ». *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-10. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Ancillotto, Leonardo, Alessandra Tomassini, et Danilo Russo. 2016. « The Fancy City Life: Kuhl's Pipistrelle, *Pipistrellus Kuhlii*, Benefits from Urbanisation ». *Wildlife Research* 42 (7): 598-606. https://doi.org/10.1071/WR15003.

Andersen, Tom, Per J. Færøvig, et Dag O. Hessen. 2007. « Growth Rate versus Biomass Accumulation: Different Roles of Food Quality and Quantity for Consumers ». *Limnology and Oceanography* 52 (5): 2128-34. https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.2128.

Andriollo, Tommy, François Gillet, Johan R. Michaux, et Manuel Ruedi. 2019. « The Menu Varies with Metabarcoding Practices: A Case Study with the Bat *Plecotus Auritus* ». *PLOS ONE* 14 (7): e0219135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219135.

Andújar, Carmelo, Paula Arribas, Douglas W. Yu, Alfried P. Vogler, et Brent C. Emerson. 2018. « Why the COI Barcode Should Be the Community DNA Metabarcode for the Metazoa ». *Molecular Ecology* 27 (20): 3968-75. https://doi.org/10.1111/mec.14844.

Arlettaz, Raphaël, Saskia Godat, et Harry Meyer. 2000. « Competition for food by expanding pipistrelle bat populations (*Pipistrellus pipistrellus*) might contribute to the decline of lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) ». *Biological Conservation* 93 (1): 55-60. https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00112-3.

Arlettaz, Raphaël, Michael Schaub, Jérôme Fournier, Thomas S. Reichlin, Antoine Sierro, James E. M. Watson, et Veronika Braunisch. 2010. « From Publications to Public Actions: When Conservation Biologists Bridge the Gap between Research and Implementation ». *BioScience* 60 (10): 835-42. https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.10.10.

Arnott, G. H., G. W. Brand, et L. C. Kos. 1986. « Effects of Food Quality and Quantity on the Survival, Development, and Egg Production of Gladioferens Pectinatus (Brady) (Copepoda : Calanoida) ». *Marine and Freshwater Research* 37 (4): 467-73. https://doi.org/10.1071/mf9860467.

Arrizabalaga-Escudero, Aitor, Elizabeth L. Clare, Egoitz Salsamendi, Antton Alberdi, Inazio Garin, Joxerra Aihartza, et Urtzi Goiti. 2018. « Assessing Niche Partitioning of Co-Occurring Sibling Bat Species by DNA Metabarcoding ». *Molecular Ecology* 27 (5): 1273-83. https://doi.org/10.1111/mec.14508.

Arrizabalaga-Escudero, Aitor, Inazio Garin, Juan Luis García-Mudarra, Antton Alberdi, Joxerra Aihartza, et Urtzi Goiti. 2015. « Trophic requirements beyond foraging habitats: The importance of prey source habitats in bat conservation ». *Biological Conservation* 191 (novembre): 512-19. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.07.043.

Arrizabalaga-Escudero, Aitor, Thomas Merckx, Gonzalo García-Baquero, Niklas Wahlberg, Ostaizka Aizpurua, Inazio Garin, Urtzi Goiti, et Joxerra Aihartza. 2019. « Trait-Based Functional Dietary Analysis Provides a Better Insight into the Foraging Ecology of

Bats ». *Journal of Animal Ecology* 88 (10): 1587-1600. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13055.

Ashrafi, S., F. Bontadina, A. Kiefer, I. Pavlinic, et R. Arlettaz. 2010. « Multiple Morphological Characters Needed for Field Identification of Cryptic Long-Eared Bat Species around the Swiss Alps ». *Journal of Zoology* 281 (4): 241-48. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00697.x.

Atkins, Zak S., Nick Clemann, Mellesa Schroder, David G. Chapple, Naomi E. Davis, Wayne A. Robinson, John Wainer, et Kylie A. Robert. 2018. « Consistent Temporal Variation in the Diet of an Endangered Alpine Lizard across Two South-Eastern Australian Sky-Islands ». *Austral Ecology* 43 (3): 339-51. https://doi.org/10.1111/aec.12572.

Avise, John C., Stephen P. Hubbell, et Francisco J. Ayala. 2008. « In the Light of Evolution II: Biodiversity and Extinction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (Supplement 1): 11453-57. https://doi.org/10.1073/pnas.0802504105.

Baker, M. L., T. Schountz, et L.-F. Wang. 2013. « Antiviral Immune Responses of Bats: A Review ». *Zoonoses and Public Health* 60 (1): 104-16. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x.

Barclay, Robert M.R, Joel Ulmer, Cameron J.A MacKenzie, Megan S Thompson, Leif Olson, Julianne McCool, Elvie Cropley, et Graeme Poll. 2004. « Variation in the reproductive rate of bats ». *Canadian Journal of Zoology* 82 (5): 688-93. https://doi.org/10.1139/z04-057.

Barlow, K. E., P. A. Briggs, K. A. Haysom, A. M. Hutson, N. L. Lechiara, P. A. Racey, A. L. Walsh, et S. D. Langton. 2015. « Citizen science reveals trends in bat populations: The National Bat Monitoring Programme in Great Britain ». *Biological Conservation* 182 (février): 14-26. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.022.

Baroja, Unai, Inazio Garin, Joxerra Aihartza, Aitor Arrizabalaga-Escudero, Nerea Vallejo, Miren Aldasoro, et Urtzi Goiti. 2019. « Pest Consumption in a Vineyard System by the Lesser Horseshoe Bat (*Rhinolophus Hipposideros*) ». *PloS One* 14 (7): e0219265. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219265.

Barré, Kévin, Isabelle Le Viol, Romain Julliard, François Chiron, et Christian Kerbiriou. 2018. « Tillage and Herbicide Reduction Mitigate the Gap between Conventional and Organic Farming Effects on Foraging Activity of Insectivorous Bats ». *Ecology and Evolution* 8 (3): 1496-1506. https://doi.org/10.1002/ece3.3688.

Battersby, J. 2005. « UK mammals: species status and population trends. » JNCC/Tracking Mammals Partnership.

Bayat, Sara, Fritz Geiser, Paul Kristiansen, et Susan C. Wilson. 2014. « Organic contaminants in bats: Trends and new issues ». *Environment International* 63 (février): 40-52. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.10.009.

Beaucournu, J. -C. 1962. « Observations sur le baguage des chiroptères: résultats et dangers ». *Mammalia* 26 (4): 539–565. https://doi.org/10.1515/mamm-1962-0411.

Beissinger, Steven R., et M. Ian Westphal. 1998. « On the Use of Demographic Models of Population Viability in Endangered Species Management ». *The Journal of Wildlife Management* 62 (3): 821-41. https://doi.org/10.2307/3802534.

Belkhir, K, P Borsa, L Chikhi, N Raufaste, et François Bonhomme. 2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Montpellier (France): Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II.

Benjamini, Yoav, et Yosef Hochberg. 1995. « Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing ». *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57: 289-300.

Bennett, Andrew F. 1999. *Linkages in the Landscape: The Role of Corridors and Connectivity in Wildlife Conservation*. IUCN.

Benson, Dennis A., Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, et David L. Wheeler. 2008. « GenBank ». *Nucleic Acids Research* 36 (Database issue): D25-30. https://doi.org/10.1093/nar/gkm929.

Benson, John F., Jeffrey A. Hostetler, David P. Onorato, Warren E. Johnson, Melody E. Roelke, Stephen J. O'Brien, Deborah Jansen, et Madan K. Oli. 2011. « Intentional Genetic Introgression Influences Survival of Adults and Subadults in a Small, Inbred Felid Population ». *Journal of Animal Ecology* 80 (5): 958-67. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01809.x.

Berthier, Pierre, Laurent Excoffier, et Manuel Ruedi. 2006. « Recurrent replacement of mtDNA and cryptic hybridization between two sibling bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii* ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1605): 3101-23. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3680.

Biffi, Marjorie, François Gillet, Pascal Laffaille, Fanny Colas, Stéphane Aulagnier, Frédéric Blanc, Maxime Galan, et al. 2017. « Novel Insights into the Diet of the Pyrenean Desman (*Galemys Pyrenaicus*) Using next-Generation Sequencing Molecular Analyses ». *Journal of Mammalogy* 98 (5): 1497-1507. https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx070.

Billington, G., et M.D. Rawlinson. 2006. *A review of horseshoe bats flight lines and feeding areas.* Countryside Council for Wales.

Bohmann, Kristine, Alice Evans, M. Thomas P. Gilbert, Gary R. Carvalho, Simon Creer, Michael Knapp, Douglas W. Yu, et Mark de Bruyn. 2014. « Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring ». *Trends in Ecology & Evolution* 29 (6): 358-67. https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003.

Bohmann, Kristine, Shyam Gopalakrishnan, Martin Nielsen, Luisa dos Santos Bay Nielsen, Gareth Jones, Daniel G. Streicker, et M. Thomas P. Gilbert. 2018. « Using DNA Metabarcoding for Simultaneous Inference of Common Vampire Bat Diet and Population Structure ». *Molecular Ecology Resources* 18 (5): 1050-63. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12891.

Bohmann, Kristine, Ara Monadjem, Christina Lehmkuhl Noer, Morten Rasmussen, Matt R. K. Zeale, Elizabeth Clare, Gareth Jones, Eske Willerslev, et M. Thomas P. Gilbert. 2011. « Molecular Diet Analysis of Two African Free-Tailed Bats (Molossidae) Using High Throughput Sequencing ». *PLOS ONE* 6 (6): e21441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021441.

Boireau, J. 2007. « Etude des terrains de chasse d'une colonie de reproduction de Grands rhinolophe *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774) en basse-Bretagne (France) ».

Boldogh, Sandor, Denes Dobrosi, et Peter Samu. 2007. « The Effects of the Illumination of Buildings on House-Dwelling Bats and Its Conservation Consequences ». *Acta Chiropterologica* 9 (2): 527-34. https://doi.org/10.3161/1733-5329(2007)9[527:TEOTIO]2.0.CO;2.

Boston, Emma S. M., Sébastien J. Puechmaille, David D. Scott, Daniel J. Buckley, Mathieu G. Lundy, Ian W. Montgomery, Paulo A. Prodöhl, et Emma C. Teeling. 2012. « Empirical

assessment of non-invasive population genetics in bats: comparison of DNA quality from faecal and tissue samples ». *Acta Chiropterologica* 14 (1): 45-52. https://doi.org/10.3161/150811012X654259.

Boughey, Katherine L., Iain R. Lake, Karen A. Haysom, et Paul M. Dolman. 2011. « Improving the biodiversity benefits of hedgerows: How physical characteristics and the proximity of foraging habitat affect the use of linear features by bats ». *Biological Conservation* 144 (6): 1790-98. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.02.017.

Bourne, S., et E. Hamilton-Smith. 2007. « *Miniopterus schreibersii bassanii* and climate change. » *Australasian Bat Society Newsletter* 28: 67-69.

Bowler, Diana E., Henning Heldbjerg, Anthony D. Fox, Maaike de Jong, et Katrin Böhning-Gaese. 2019. « Long-Term Declines of European Insectivorous Bird Populations and Potential Causes ». *Conservation Biology* 33 (5): 1120-30. https://doi.org/10.1111/cobi.13307.

Bowman, Jeff, Janet E. Greenhorn, Robby R. Marrotte, Michelle M. McKay, Kimberley Y. Morris, Melanie B. Prentice, et Morgan Wehtje. 2016. « On Applications of Landscape Genetics ». *Conservation Genetics* 17 (4): 753-60. https://doi.org/10.1007/s10592-016-0834-5.

Boyles, Justin G., et Jonathan J. Storm. 2007. « The Perils of Picky Eating: Dietary Breadth Is Related to Extinction Risk in Insectivorous Bats ». *PLOS ONE* 2 (7): e672. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000672.

Brandon-Mong, Guo Jie, Han Ming Gan, Kong-wah Sing, Lee Shin, Phaik Eem Lim, et John Wilson. 2015. « DNA metabarcoding of insects and allies: An evaluation of primers and pipelines ». *Bulletin of entomological research* 105 (septembre): 1-11. https://doi.org/10.1017/S0007485315000681.

Braukmann, Thomas W. A., Natalia V. Ivanova, Sean W. J. Prosser, Vasco Elbrecht, Dirk Steinke, Sujeevan Ratnasingham, Jeremy R. de Waard, Jayme E. Sones, Evgeny V. Zakharov, et Paul D. N. Hebert. 2019. « Metabarcoding a Diverse Arthropod Mock Community ». *Molecular Ecology Resources* 19 (3): 711-27. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13008.

Bretagnolle, Vincent, Pablo Inchausti, Jean-François Seguin, et Jean-Claude Thibault. 2004. « Evaluation of the extinction risk and of conservation alternatives for a very small insular population: the bearded vulture *Gypaetus barbatus* in Corsica ». *Biological Conservation* 120 (1): 19-30. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.01.023.

Bretagnolle, Vincent, Alexandre Villers, Leopold Denonfoux, Thomas Cornulier, Pablo Inchausti, et Isabelle Badenhausser. 2011. « Rapid Recovery of a Depleted Population of Little Bustards *Tetrax Tetrax* Following Provision of Alfalfa through an Agri-Environment Scheme ». *Ibis* 153 (1): 4-13. https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2010.01092.x.

Britt, Meghan, Sarah E. Haworth, Justin B. Johnson, Daria Martchenko, et Aaron B. A. Shafer. 2018. « The importance of non-academic coauthors in bridging the conservation genetics gap ». *Biological Conservation* 218 (février): 118-23. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.12.019.

Brodersen, Jakob, et Ole Seehausen. 2014. « Why Evolutionary Biologists Should Get Seriously Involved in Ecological Monitoring and Applied Biodiversity Assessment Programs ». *Evolutionary Applications* 7 (9): 968-83. https://doi.org/10.1111/eva.12215.

Brodmann, Paul A., H.-U. Reyer, Kurt Bollmann, Alex R. Schläpfer, et Claudia M. Rauter. 1997. « The importance of food quantity and quality for reproductive performance in alpine

water pipits (*Anthus spinoletta*) ». *Oecologia* 109: 200-208. https://doi.org/10.1007/s004420050074.

Brook, Cara E., et Andrew P. Dobson. 2015. « Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens ». *Trends in Microbiology* 23 (3): 172-80. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004.

Brooker, R. M., P. L. Munday, S. J. Brandl, et G. P. Jones. 2014. « Local Extinction of a Coral Reef Fish Explained by Inflexible Prey Choice ». *Coral Reefs* 33 (4): 891-96. https://doi.org/10.1007/s00338-014-1197-3.

Brown, D. S., R. Burger, N. Cole, D. Vencatasamy, E. L. Clare, A. Montazam, et W. O. C. Symondson. 2014. « Dietary Competition between the Alien Asian Musk Shrew (*Suncus Murinus*) and a Re-Introduced Population of Telfair's Skink (Leiolopisma Telfairii) ». *Molecular Ecology* 23 (15): 3695-3705. https://doi.org/10.1111/mec.12445.

Butchart, Stuart H. M., Matt Walpole, Ben Collen, Arco van Strien, Jörn P. W. Scharlemann, Rosamunde E. A. Almond, Jonathan E. M. Baillie, et al. 2010. « Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines ». *Science* 328 (5982): 1164-68. https://doi.org/10.1126/science.1187512.

Caizergues, A. 2005. « Les apports de l'outil moléculaire dans les problématiques de gestion de la faune sauvage ». *Faune sauvage*, n° 265: 6-21.

Callahan, Benjamin J, Paul J McMurdie, Michael J Rosen, Andrew W Han, Amy Jo A Johnson, et Susan P Holmes. 2016. « DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data ». *Nature Methods* 13 (mai): 581.

Callicott, J. Baird. 1990. « Whither Conservation Ethics? » *Conservation Biology* 4 (1): 15-20. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1990.tb00261.x.

Canadell, J.G., C. Le Quéré, M.R Raupach, C.B. Field, E.T. Buitenhuis, P. Ciais, T.J. Conway, N.P. Gillett, R.A. Houghton, et G. Marland. 2007. « Contributions to accelerating atmospheric CO2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks ». *Proceedings of the national academy of sciences* 104 (47): 18866-70.

Careddu, Giulio, Maria Letizia Costantini, Edoardo Calizza, Pasquale Carlino, Flavia Bentivoglio, Lucia Orlandi, et Loreto Rossi. 2015. « Effects of terrestrial input on macrobenthic food webs of coastal sea are detected by stable isotope analysis in Gaeta Gulf ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 154 (mars): 158-68. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.01.013.

Caro, T., J Darwin, T Forrester, C. Ledoux-Bloom, et C. Wells. 2012. « Conservation in the Anthropocene. » *Conservation Biology* 26 (1): 185-88.

Carrillo-Araujo, Mario, Neslihan Taş, Rocio J. Alcántara-Hernández, Osiris Gaona, Jorge E. Schondube, Rodrigo A. Medellín, Janet K. Jansson, et Luisa I. Falcón. 2015. « Phyllostomid Bat Microbiome Composition Is Associated to Host Phylogeny and Feeding Strategies ». *Frontiers in Microbiology* 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00447.

Castro, Marcia Caldas de, et Burton H. Singer. 2006. « Controlling the False Discovery Rate: A New Application to Account for Multiple and Dependent Tests in Local Statistics of Spatial Association ». *Geographical Analysis* 38 (2): 180-208. https://doi.org/10.1111/j.0016-7363.2006.00682.x.

Caubère, B., P. Gaucher, et J.F. Julien. 1984. « Un record mondial de longévité in Natura pour un Chiroptère insectivore ? » *Revue d'Ecologie (Terre Vie)*, n° 39: 351-53.

Ceballos, Gerardo, Paul R. Ehrlich, Anthony D. Barnosky, Andrés García, Robert M. Pringle, et Todd M. Palmer. 2015. « Accelerated Modern Human–Induced Species Losses: Entering the Sixth Mass Extinction ». *Science Advances* 1 (5): e1400253. https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253.

Charbonnier, Yohan, Luc Barbaro, Amandine Theillout, et Hervé Jactel. 2014. « Numerical and Functional Responses of Forest Bats to a Major Insect Pest in Pine Plantations ». *PLOS ONE* 9 (10): e109488. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109488.

Christie, Mark R., et L. Lacey Knowles. 2015. « Habitat Corridors Facilitate Genetic Resilience Irrespective of Species Dispersal Abilities or Population Sizes ». *Evolutionary Applications* 8 (5): 454-63. https://doi.org/10.1111/eva.12255.

Clare, E. L., B. R. Barber, B. W. Sweeney, P. D. N. Hebert, et M. B. Fenton. 2011. « Eating Local: Influences of Habitat on the Diet of Little Brown Bats (*Myotis Lucifugus*) ». *Molecular Ecology* 20 (8): 1772-80. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05040.x.

Clare, E.L. 2014. « Molecular Detection of Trophic Interactions: Emerging Trends, Distinct Advantages, Significant Considerations and Conservation Applications ». *Evolutionary Applications* 7 (9): 1144-57. https://doi.org/10.1111/eva.12225.

Clare, E.L., Erin E. Fraser, Heather E. Braid, M. Brock Fenton, et Paul D. N. Hebert. 2009. « Species on the Menu of a Generalist Predator, the Eastern Red Bat (*Lasiurus Borealis*): Using a Molecular Approach to Detect Arthropod Prey ». *Molecular Ecology* 18 (11): 2532-42. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04184.x.

Clare, E.L., William O. C. Symondson, Hugh Broders, Francois Fabianek, Erin E. Fraser, Alistair MacKenzie, Andrew Boughen, et al. 2014. « The Diet of *Myotis Lucifugus* across Canada: Assessing Foraging Quality and Diet Variability ». *Molecular Ecology* 23 (15): 3618-32. https://doi.org/10.1111/mec.12542.

Clare, E.L., W.O. C. Symondson, et M.B. Fenton. 2014. « An Inordinate Fondness for Beetles? Variation in Seasonal Dietary Preferences of Night-Roosting Big Brown Bats (*Eptesicus Fuscus*) ». *Molecular Ecology* 23 (15): 3633-47. https://doi.org/10.1111/mec.12519.

Clark, D. R., R. K. LaVal, et D. M. Swineford. 1978. « Dieldrin-Induced Mortality in an Endangered Species, the Gray Bat (*Myotis Grisescens*) ». *Science* 199 (4335): 1357-59. https://doi.org/10.1126/science.564550.

Clarke, Laurence J., Julien Soubrier, Laura S. Weyrich, et Alan Cooper. 2014. « Environmental Metabarcodes for Insects: In Silico PCR Reveals Potential for Taxonomic Bias ». *Molecular Ecology Resources* 14 (6): 1160-70. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12265.

Clout, Mick N., Graeme P. Elliott, et Bruce C. Robertson. 2002. « Effects of supplementary feeding on the offspring sex ratio of kakapo: a dilemma for the conservation of a polygynous parrot ». *Biological Conservation* 107 (1): 13-18. https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00267-1.

Cook, Carly N., et Carla M. Sgrò. 2019. « Conservation Practitioners' Understanding of How to Manage Evolutionary Processes ». *Conservation Biology* 33 (5): 993-1001. https://doi.org/10.1111/cobi.13306.

Cooper, N.W., T.W. Sherry, et P.P. Marra. 2015. « Experimental reduction of winter food decreases body condition and delays migration in a long-distance migratory bird ». *Ecology* 97 (5): 1933-42.

Corse, Emmanuel, Emese Meglécz, Gaït Archambaud, Morgane Ardisson, Jean-François Martin, Christelle Tougard, Rémi Chappaz, et Vincent Dubut. 2017. « A From-Benchtop-to-Desktop Workflow for Validating HTS Data and for Taxonomic

Identification in Diet Metabarcoding Studies ». *Molecular Ecology Resources* 17 (6): e146-59. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12703.

Corse, Emmanuel, Christelle Tougard, Gaït Archambaud-Suard, Jean-François Agnèse, Françoise D. Messu Mandeng, Charles F. Bilong Bilong, David Duneau, et al. 2019. « One-Locus-Several-Primers: A Strategy to Improve the Taxonomic and Haplotypic Coverage in Diet Metabarcoding Studies ». *Ecology and Evolution* 9 (8): 4603-20. https://doi.org/10.1002/ece3.5063.

Culina, Antica, et Colin J. Garroway. 2019. « Bats Use Social Information within and across Species ». *Journal of Animal Ecology* 88 (10): 1444-46. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13093.

Cunningham, Andrew A. 1996. « Disease Risks of Wildlife Translocations ». *Conservation Biology* 10 (2): 349-53. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10020349.x.

Cuthbert, Richard, Peter G. Ryan, John Cooper, et Geoff Hilton. 2003. « Demography and Population Trends of the Atlantic Yellow-Nosed Albatross ». *The Condor* 105 (3): 439-52. https://doi.org/10.1650/7209.

Davey, John W., Paul A. Hohenlohe, Paul D. Etter, Jason Q. Boone, Julian M. Catchen, et Mark L. Blaxter. 2011. « Genome-Wide Genetic Marker Discovery and Genotyping Using next-Generation Sequencing ». *Nature Reviews Genetics* 12 (7): 499-510. https://doi.org/10.1038/nrg3012.

Dawson, Deborah A., Stephen J. Rossiter, Gareth Jones, et Christopher G. Faulkes. 2004. « Microsatellite Loci for the Greater Horseshoe Bat, *Rhinolophus Ferrumequinum* (Rhinolophidae, Chiroptera) and Their Cross-Utility in 17 Other Bat Species ». *Molecular Ecology Notes* 4 (1): 96-100. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00580.x.

Deagle, Bruce E., J. Paige Eveson, et Simon N. Jarman. 2006. « Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces ». *Frontiers in Zoology* 3 (1): 11. https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-11.

Deagle, Bruce E., Simon N. Jarman, Eric Coissac, François Pompanon, et Pierre Taberlet. 2014. « DNA Metabarcoding and the Cytochrome c Oxidase Subunit I Marker: Not a Perfect Match ». *Biology Letters* 10 (9): 20140562. https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562.

DeFaveri, Jacquelin, Heidi Viitaniemi, Erica Leder, et Juha Merilä. 2013. « Characterizing Genic and Nongenic Molecular Markers: Comparison of Microsatellites and SNPs ». *Molecular Ecology Resources* 13 (3): 377-92. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12071.

Deiner, Kristy, Holly M. Bik, Elvira Mächler, Mathew Seymour, Anaïs Lacoursière-Roussel, Florian Altermatt, Simon Creer, et al. 2017. « Environmental DNA Metabarcoding: Transforming How We Survey Animal and Plant Communities ». *Molecular Ecology* 26 (21): 5872-95. https://doi.org/10.1111/mec.14350.

Dejean, Tony, Alice Valentini, Christian Miquel, Pierre Taberlet, Eva Bellemain, et Claude Miaud. 2012. « Improved Detection of an Alien Invasive Species through Environmental DNA Barcoding: The Example of the American Bullfrog *Lithobates Catesbeianus* ». *Journal of Applied Ecology* 49 (4): 953-59. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x.

Desneux, Nicolas, Axel Decourtye, et Jean-Marie Delpuech. 2007. « The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods ». *Annual Review of Entomology* 52 (1): 81-106. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440.

Dietz, Christian, et Andreas Kiefer. 2016. *Bats of Britain and Europe*. Bloomsbury Publishing.

Dietz, Markus, Jacques B. Pir, et Jessica Hillen. 2013a. « Does the Survival of Greater Horseshoe Bats and Geoffroy's Bats in Western Europe Depend on Traditional Cultural Landscapes? » *Biodiversity and Conservation* 22 (13-14): 3007-25. https://doi.org/10.1007/s10531-013-0567-4.

———. 2013b. « Does the Survival of Greater Horseshoe Bats and Geoffroy's Bats in Western Europe Depend on Traditional Cultural Landscapes? » *Biodiversity and Conservation* 22 (13-14): 3007-25. https://doi.org/10.1007/s10531-013-0567-4.

Dirzo, Rodolfo, et Peter H. Raven. 2003. « Global State of Biodiversity and Loss ». *Annual Review of Environment and Resources* 28 (1): 137-67. https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.050302.105532.

Durant, Joël M., Dag Ø Hjermann, Geir Ottersen, et Nils Chr Stenseth. 2007. « Climate and the Match or Mismatch between Predator Requirements and Resource Availability ». *Climate Research* 33 (3): 271-83. https://doi.org/10.3354/cr033271.

Dussex, N., et B. C. Robertson. 2018. « Contemporary effective population size and predicted maintenance of genetic diversity in the endangered kea (*Nestor notabilis*) ». *New Zealand Journal of Zoology* 45 (1): 13-28. https://doi.org/10.1080/03014223.2017.1325381.

Eckert, C. G., K. E. Samis, et S. C. Lougheed. 2008. « Genetic Variation across Species' Geographical Ranges: The Central–Marginal Hypothesis and Beyond ». *Molecular Ecology* 17 (5): 1170-88. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x.

Edgar, Robert C., Brian J. Haas, Jose C. Clemente, Christopher Quince, et Rob Knight. 2011. « UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection ». *Bioinformatics* 27 (16): 2194-2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381.

Edmands, Suzanne. 2007. « Between a Rock and a Hard Place: Evaluating the Relative Risks of Inbreeding and Outbreeding for Conservation and Management ». *Molecular Ecology* 16 (3): 463-75. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x.

Eiler, Alexander, Anders Löfgren, Olle Hjerne, Sara Nordén, et Peter Saetre. 2018. « Environmental DNA (EDNA) Detects the Pool Frog (*Pelophylax Lessonae*) at Times When Traditional Monitoring Methods Are Insensitive ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-9. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23740-5.

Elbrecht, V, TW Braukmann, NV Ivanova, SW Prosser, M Hajibabaei, M Wright, EV Zakharov, PD Hebert, et D Steinke. 2019. « Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. » *PeerJ Preprints* 7:e27801v1. https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27801v1.

Elbrecht, Vasco, et Florian Leese. 2015. « Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol ». *PLOS ONE* 10 (7): e0130324. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324.

———. 2016. « PrimerMiner: An r Package for Development and in Silico Validation of DNA Metabarcoding Primers ». *Methods in Ecology and Evolution* 8 (5): 622-26. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12687.

———. 2017. « Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment ». *Frontiers in Environmental Science* 5. https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00011.

Elbrecht, Vasco, et Dirk Steinke. 2019. « Scaling up DNA Metabarcoding for Freshwater Macrozoobenthos Monitoring ». *Freshwater Biology* 64 (2): 380-87. https://doi.org/10.1111/fwb.13220.

Elbrecht, Vasco, Pierre Taberlet, Tony Dejean, Alice Valentini, Philippe Usseglio-Polatera, Jean-Nicolas Beisel, Eric Coissac, Frederic Boyer, et Florian Leese. 2016. « Testing the Potential of a Ribosomal 16S Marker for DNA Metabarcoding of Insects ». *PeerJ* 4 (avril): e1966. https://doi.org/10.7717/peerj.1966.

Emde, Gerhard von der, et Dieter Menne. 1989. « Discrimination of Insect Wingbeat-Frequencies by the Bat *Rhinolophus Ferrumequinum* ». *Journal of Comparative Physiology A* 164 (5): 663-71. https://doi.org/10.1007/BF00614509.

Emlen, J. Merritt. 1966. « The Role of Time and Energy in Food Preference ». *The American Naturalist* 100 (916): 611-17. https://doi.org/10.1086/282455.

Epp, Laura S., Sanne Boessenkool, Eva P. Bellemain, James Haile, Alfonso Esposito, Tiayyba Riaz, Christer Erséus, et al. 2012. « New Environmental Metabarcodes for Analysing Soil DNA: Potential for Studying Past and Present Ecosystems ». *Molecular Ecology* 21 (8): 1821-33. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x.

Escudié, Frédéric, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Katia Vidal, Sarah Maman, Guillermina Hernandez-Raquet, Sylvie Combes, et Géraldine Pascal. 2018. « FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution ». *Bioinformatics* 34 (8): 1287-94. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791.

Esnaola, Amaiur, Aitor Arrizabalaga-Escudero, Jorge González-Esteban, Arturo Elosegi, et Joxerra Aihartza. 2018. « Determining Diet from Faeces: Selection of Metabarcoding Primers for the Insectivore Pyrenean Desman (*Galemys Pyrenaicus*) ». *PLOS ONE* 13 (12): e0208986. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208986.

Estoup, Arnaud, Virginie Ravigné, Ruth Hufbauer, Renaud Vitalis, Mathieu Gautier, et Benoit Facon. 2016. « Is There a Genetic Paradox of Biological Invasion? » *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 47 (1): 51-72. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032116.

Fancourt, Bronwyn A., Clare E. Hawkins, et Stewart C. Nicol. 2019. « Mechanisms of Climate-Change-Induced Species Decline: Spatial, Temporal and Long-Term Variation in the Diet of an Endangered Marsupial Carnivore, the Eastern Quoll ». *Wildlife Research* 45 (8): 737-50. https://doi.org/10.1071/WR18063.

FAO. 2016. « Situation des forêts du monde 2016. Forêts et agriculture: défis et possibilités concernant l'utilisation des terres. Rome. »

Fenton, M. Brock, et Nancy B. Simmons. 2015. *Bats: A World of Science and Mystery*. University of Chicago Press.

Ficetola, Gentile Francesco, Eric Coissac, Stéphanie Zundel, Tiayyba Riaz, Wasim Shehzad, Julien Bessière, Pierre Taberlet, et François Pompanon. 2010. « An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes ». *BMC Genomics* 11 (1): 434. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-434.

Filippi-Codaccioni, Ondine, Marie-Pauline Beugin, Damien M. de Vienne, Elodie Portanier, David Fouchet, Cecile Kaerle, Lina Muselet, et al. 2018. « Coexistence of two sympatric cryptic bat species in French Guiana: insights from genetic, acoustic and ecological data ». *BMC Evolutionary Biology* 18 (1): 175. https://doi.org/10.1186/s12862-018-1289-8.

Flanders, Jon, et Gareth Jones. 2009. « Roost Use, Ranging Behavior, and Diet of Greater Horseshoe Bats (*Rhinolophus Ferrumequinum*) Using a Transitional Roost ». *Journal of Mammalogy* 90 (4): 888-96.

Flanders, Jon, Gareth Jones, Petr Benda, Christian Dietz, Shuyi Zhang, Gang Li, Mozafar Sharifi, et Stephen J. Rossiter. 2009. « Phylogeography of the Greater Horseshoe Bat,

Rhinolophus Ferrumequinum: Contrasting Results from Mitochondrial and Microsatellite Data ». *Molecular Ecology* 18 (2): 306-18. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04021.x.

Fleming, Theodore H., et J. Nathaniel Holland. 2018. « Nectar Bat-Plant Interactions in North American Deserts ». *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 29 (1): 33-39. https://doi.org/10.4404/hystrix-00036-2017.

Foley, Jonathan A., Ruth DeFries, Gregory P. Asner, Carol Barford, Gordon Bonan, Stephen R. Carpenter, F. Stuart Chapin, et al. 2005. « Global Consequences of Land Use ». *Science* 309 (5734): 570-74. https://doi.org/10.1126/science.1111772.

Foley, Nicole M., Graham M. Hughes, Zixia Huang, Michael Clarke, David Jebb, Conor V. Whelan, Eric J. Petit, et al. 2018. « Growing Old, yet Staying Young: The Role of Telomeres in Bats' Exceptional Longevity ». *Science Advances* 4 (2): eaao0926. https://doi.org/10.1126/sciadv.aao0926.

Forin-Wiart, Marie-Amélie, Maxime Galan, Sylvain Piry, Jean-François Cosson, Claire Larose, et Marie-Lazarine Poulle. 2018. « Evaluating Metabarcoding to Analyse Diet Composition of Species Foraging in Anthropogenic Landscapes Using Ion Torrent and Illumina Sequencing ». *BioRxiv*, avril, 295758. https://doi.org/10.1101/295758.

Forman, Richard T. T., et Jacques Baudry. 1984. « Hedgerows and Hedgerow Networks in Landscape Ecology ». *Environmental Management* 8 (6): 495-510. https://doi.org/10.1007/BF01871575.

Frankham, Richard. 1996. « Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife ». *Conservation Biology* 10 (6): 1500-1508. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10061500.x.

———. 2005. « Genetics and extinction ». *Biological Conservation* 126 (2): 131-40. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002.

Frankham, Richard, Jonathan D. Ballou, Mark D. B. Eldridge, Robert C. Lacy, Katherine Ralls, Michele R. Dudash, et Charles B. Fenster. 2011. « Predicting the Probability of Outbreeding Depression ». *Conservation Biology* 25 (3): 465-75. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x.

Frankham, Richard, Jonathan D. Ballou, Katherine Ralls, Mark Eldridge, Michele R. Dudash, Charles B. Fenster, Robert C. Lacy, et Paul Sunnucks. 2017. *Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations*. Oxford University Press.

Frick, Winifred F., Tigga Kingston, et Jon Flanders. 2019. « A Review of the Major Threats and Challenges to Global Bat Conservation ». *Annals of the New York Academy of Sciences*, avril. https://doi.org/10.1111/nyas.14045.

Froidevaux, Jérémy S. P., Katherine L. Boughey, Kate E. Barlow, et Gareth Jones. 2017. « Factors Driving Population Recovery of the Greater Horseshoe Bat (*Rhinolophus Ferrumequinum*) in the UK: Implications for Conservation ». *Biodiversity and Conservation*, février, 1-21. https://doi.org/10.1007/s10531-017-1320-1.

Froidevaux, Jérémy S. P., Moth Broyles, et Gareth Jones. 2019. « Moth responses to sympathetic hedgerow management in temperate farmland ». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 270-271 (février): 55-64. https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.10.008.

Funk, W. Chris, John K. McKay, Paul A. Hohenlohe, et Fred W. Allendorf. 2012. « Harnessing genomics for delineating conservation units ». *Trends in Ecology & Evolution* 27 (9): 489-96. https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.012.

Galan, Maxime, Jean-Baptiste Pons, Orianne Tournayre, Éric Pierre, Maxime Leuchtmann, Dominique Pontier, et Nathalie Charbonnel. 2018. « Metabarcoding for the Parallel Identification of Several Hundred Predators and Their Prey: Application to Bat Species Diet Analysis ». *Molecular Ecology Resources* 18 (3): 474-89. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749.

Galan, Maxime, Maria Razzauti, Emilie Bard, Maria Bernard, Carine Brouat, Nathalie Charbonnel, Alexandre Dehne-Garcia, et al. 2016. « 16S RRNA Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife ». *MSystems* 1 (4): e00032-16. https://doi.org/10.1128/mSystems.00032-16.

Galloway, James N., William H. Schlesinger, Hiram Levy, Anthony Michaels, et Jerald L. Schnoor. 1995. « Nitrogen Fixation: Anthropogenic Enhancement-Environmental Response ». *Global Biogeochemical Cycles* 9 (2): 235-52. https://doi.org/10.1029/95GB00158.

Galloway, Tamara, et Richard Handy. 2003. « Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides ». *Ecotoxicology* 12 (1): 345-63. https://doi.org/10.1023/A:1022579416322.

Garant, Dany, Samantha E. Forde, et Andrew P. Hendry. 2007. « The Multifarious Effects of Dispersal and Gene Flow on Contemporary Adaptation ». *Functional Ecology* 21 (3): 434-43. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01228.x.

Garner, Alisse, Janet L. Rachlow, et Jason F. Hicks. 2005. « Patterns of Genetic Diversity and Its Loss in Mammalian Populations ». *Conservation Biology* 19 (4): 1215-21. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00105.x.

Gibson, Sachiko Y., Ryan C. Van Der Marel, et Brian M. Starzomski. 2009. « Climate Change and Conservation of Leading-Edge Peripheral Populations ». *Conservation Biology* 23 (6): 1369-73. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01375.x.

Gilbert-Norton, Lynne, Ryan Wilson, John R. Stevens, et Karen H. Beard. 2010. « A Meta-Analytic Review of Corridor Effectiveness ». *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology* 24 (3): 660-68. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01450.x.

Gillet, François, Marie-Laure Tiouchichine, Maxime Galan, Frédéric Blanc, Mélanie Némoz, Stéphane Aulagnier, et Johan R. Michaux. 2015. « A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces ». *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 80 (6): 505-9. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.08.002.

Gilpin, M. E., et M.E. Soulé. 1986. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.*

Goiti, Urtzi, Joxerra Aihartza, Maider Guiu, Egoitz Salsamendi, David Almenar, Maria Napal, et Inazio Garin. 2011. « Geoffroy's Bat, *Myotis Emarginatus*, Preys Preferentially on Spiders in Multistratified Dense Habitats: A Study of Foraging Bats in the Mediterranean ». *Folia Zoologica* 60 (1): 17-24.

Gonzalez Andrew, Ronce Ophélie, Ferriere Regis, et Hochberg Michael E. 2013. « Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1610): 20120404. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0404.

González, Luis Mariano, Antoni Margalida, Roberto Sánchez, et Javier Oria. 2006. « Supplementary feeding as an effective tool for improving breeding success in the Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) ». *Biological Conservation* 129 (4): 477-86. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.11.014.

Goszczyński, Jacek, Bogumiła Jedrzejewska, et Włodzimierz Jedrzejewski. 2000. « Diet Composition of Badgers (*Meles Meles*) in a Pristine Forest and Rural Habitats of Poland Compared to Other European Populations ». *Journal of Zoology* 250 (4): 495-505. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb00792.x.

Gottwald, Jannis, Ralf Zeidler, Nicolas Friess, Marvin Ludwig, Christoph Reudenbach, et Thomas Nauss. 2019. « Introduction of an automatic and open-source radio-tracking system for small animals ». *Methods in Ecology and Evolution* 0 (0). https://doi.org/10.1111/2041-210X.13294.

Goudet, Jerome. 1995. « Fstat (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics ». *Journal of Heredity* 86: 485-86.

Granquist, Sandra M., Rodrigo Esparza-Salas, Erlingur Hauksson, Olle Karlsson, et Anders Angerbjörn. 2018. « Fish Consumption of Harbour Seals (*Phoca Vitulina*) in North Western Iceland Assessed by DNA Metabarcoding and Morphological Analysis ». *Polar Biology* 41 (11): 2199-2210. https://doi.org/10.1007/s00300-018-2354-x.

Gunnell, Gregg F., et Nancy B. Simmons. 2012. *Evolutionary History of Bats: Fossils, Molecules and Morphology*. Cambridge University Press.

Haasl, R. J., et B. A. Payseur. 2011. « Multi-Locus Inference of Population Structure: A Comparison between Single Nucleotide Polymorphisms and Microsatellites ». *Heredity* 106 (1): 158-71. https://doi.org/10.1038/hdy.2010.21.

Hajibabaei, Mehrdad, M. Alex Smith, Daniel H. Janzen, Josephine J. Rodriguez, James B. Whitfield, et Paul D. N. Hebert. 2006. « A Minimalist Barcode Can Identify a Specimen Whose DNA Is Degraded ». *Molecular Ecology Notes* 6 (4): 959-64. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x.

Hallmann, Caspar A., Martin Sorg, Eelke Jongejans, Henk Siepel, Nick Hofland, Heinz Schwan, Werner Stenmans, et al. 2017. « More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas ». *PLOS ONE* 12 (10): e0185809. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809.

Harcourt, A. H., S. A. Coppeto, et S. A. Parks. 2002. « Rarity, Specialization and Extinction in Primates ». *Journal of Biogeography* 29 (4): 445-56. https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00685.x.

Hauksson, Erlingur. 2010. « Monitoring Trends in the Abundance of Harbour Seals (*Phoca Vitulina*) in Icelandic Waters ». *NAMMCO Scientific Publications* 8 (septembre): 227-44. https://doi.org/10.7557/3.2687.

Hayes, Courtney R., Mark Gumbert, John O. Whitaker, Charles L. Elliott, et Luke E. Dodd. 2019. « Spatial and Temporal Variation in the Diet of the Eastern Red Bat in Kentucky ». *Journal of the Kentucky Academy of Science* 79 (1): 12-17. https://doi.org/10.3101/1098-7096-79.1.12.

Hebert, Paul D. N., Alina Cywinska, Shelley L. Ball, et Jeremy R. deWaard. 2003. « Biological Identifications through DNA Barcodes ». *Proceedings. Biological Sciences* 270 (1512): 313-21. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218.

Helversen, O. von, K.-G. Heller, F. Mayer, A. Nemeth, M. Volleth, et P. Gombkötö. 2001. « Cryptic Mammalian Species: A New Species of Whiskered Bat (Myotis Alcathoe n. Sp.) in Europe ». *Naturwissenschaften* 88 (5): 217-23. https://doi.org/10.1007/s001140100225.

Helyar, S. J., J. Hemmer-Hansen, D. Bekkevold, M. I. Taylor, R. Ogden, M. T. Limborg, A. Cariani, et al. 2011. « Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new

opportunities and challenges ». *Molecular Ecology Resources* 11 (s1): 123-36. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02943.x.

Holland, Jeff, et Lenore Fahrig. 2000. « Effect of woody borders on insect density and diversity in crop fields: a landscape-scale analysis ». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 78 (2): 115-22. https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00123-1.

Holland, Richard A., et Martin Wikelski. 2009. « Studying the Migratory Behavior of Individual Bats: Current Techniques and Future Directions ». *Journal of Mammalogy* 90 (6): 1324-29. https://doi.org/10.1644/09-MAMM-S-086R2.1.

Holyoak, M., V. Jarosik, et I. Novák. 1997. « Weather-Induced Changes in Moth Activity Bias Measurement of Long-Term Population Dynamics from Light Trap Samples ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83 (3): 329-35. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00188.x.

Hooton, L. A., Y. A. Dzal, N. Veselka, et M. B. Fenton. 2016. « Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Impact on Bat Activity and Foraging Behaviour along the Upper Hudson River, New York ». *Canadian Journal of Zoology* 94 (3): 217-23. https://doi.org/10.1139/cjz-2015-0162.

Hoste, Hervé, Frank Jackson, Spiridoula Athanasiadou, Stig. M. Thamsborg, et Simone O. Hoskin. 2006. « The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants ». *Trends in Parasitology* 22 (6): 253-61. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.004.

Huis, A. Van, G. Woldewahid, K. Toleubayev, et W. Van Der Werf. 2008. « Relationships between Food Quality and Fitness in the Desert Locust, *Schistocerca Gregaria*, and Its Distribution over Habitats on the Red Sea Coastal Plain of Sudan ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 127 (2): 144-56. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00682.x.

Humphrey, Stephen R., Andreas R. Richter, et James B. Cope. 1977. « Summer Habitat and Ecology of the Endangered Indiana Bat, Myotis sodalis ». *Journal of Mammalogy* 58 (3): 334-46. https://doi.org/10.2307/1379332.

Hurt, Carla, Bernard Kuhajda, Alexis Harman, Natalie Ellis, et Mary Nalan. 2017. « Genetic Diversity and Population Structure in the Barrens Topminnow (*Fundulus Julisia*): Implications for Conservation and Management of a Critically Endangered Species ». *Conservation Genetics* 18 (6): 1347-58. https://doi.org/10.1007/s10592-017-0984-0.

Hutterer, R., T. Ivanova, C. Meyers-Cords, et L. Rodrigues. 2005. « Bat migrations in Europe: a review of banding data and literature. Bundesamt für Naturschutz, Bonn. »

Innis, Michael A., David H. Gelfand, John J. Sninsky, et Thomas J. White. 2012. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.

IUCN. 2019. « The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. http://www.iucnredlist.org. Downloaded on 21 March 2019. »

Jan, P-L. 2017. « Etude non invasive de la dynamique et de la génétique des populations chez unechauve-souris forestière: impact de la qualité de l'habitat et de la connectivité. » Ecologie, Environnement., Agrocampus Ouest.

Jan, P.-L., L. Lehnen, A.-L. Besnard, G. Kerth, M. Biedermann, W. Schorcht, E. J. Petit, P. Le Gouar, et S. J. Puechmaille. 2019. « Range expansion is associated with increased survival and fecundity in a long-lived bat species ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286 (1906): 20190384. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0384.

Jay, Michel, et Jean-Michel Ricard. 2018. « Les chauves-souris en vergers de pommier: Synthèse des travaux d'écologie acoustique (2014-2017) ». 346. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL).

Johnsen, Kaja, Rudy Boonstra, Stan Boutin, Olivier Devineau, Charles J. Krebs, et Harry P. Andreassen. 2017. « Surviving Winter: Food, but Not Habitat Structure, Prevents Crashes in Cyclic Vole Populations ». *Ecology and Evolution* 7 (1): 115-24. https://doi.org/10.1002/ece3.2635.

Johnson, Christopher N., Andrew Balmford, Barry W. Brook, Jessie C. Buettel, Mauro Galetti, Lei Guangchun, et Janet M. Wilmshurst. 2017. « Biodiversity Losses and Conservation Responses in the Anthropocene ». *Science* 356 (6335): 270-75. https://doi.org/10.1126/science.aam9317.

Johnson, Warren E., David P. Onorato, Melody E. Roelke, E. Darrell Land, Mark Cunningham, Robert C. Belden, Roy McBride, et al. 2010. « Genetic Restoration of the Florida Panther ». *Science* 329 (5999): 1641-45. https://doi.org/10.1126/science.1192891.

Jombart, Thibaut. 2008. « Adegenet: A R Package for the Multivariate Analysis of Genetic Markers ». *Bioinformatics* 24 (11): 1403-5. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129.

Jonason, Dennis, Markus Franzén, et Thomas Ranius. 2014. « Surveying Moths Using Light Traps: Effects of Weather and Time of Year ». *PLOS ONE* 9 (3): e92453. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092453.

Jones, G. 1990. « Prey Selection by the Greater Horseshoe Bat (*Rhinolophus ferrumequinum*): Optimal Foraging by Echolocation? » *Journal of Animal Ecology* 59 (2): 587-602. https://doi.org/10.2307/4882.

Jones, Gareth, et Jeremy M. V. Rayner. 1989. « Foraging Behavior and Echolocation of Wild Horseshoe Bats *Rhinolophus Ferrumequinum* and *R. Hipposideros* (Chiroptera, Rhinolophidae) ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 25 (3): 183-91. https://doi.org/10.1007/BF00302917.

Jones, Kate E., Andy Purvis, et John L. Gittleman. 2003. « Biological Correlates of Extinction Risk in Bats. » *The American Naturalist* 161 (4): 601-14. https://doi.org/10.1086/368289.

Jong, Yde de, Melina Verbeek, Verner Michelsen, Per de Place Bjørn, Wouter Los, Fedor Steeman, Nicolas Bailly, et al. 2014. « Fauna Europaea – All European Animal Species on the Web ». *Biodiversity Data Journal* 2 (septembre): e4034. https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e4034.

Jusino, Michelle A., Mark T. Banik, Jonathan M. Palmer, Amy K. Wray, Lei Xiao, Emma Pelton, Jesse R. Barber, et al. 2018. « An Improved Method for Utilizing High-throughput Amplicon Sequencing to Determine the Diets of Insectivorous Animals ». *Molecular Ecology Resources*, octobre. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12951.

Kalinowski, S.T., A.P. Wagner, et M.L. Taper. 2006. « Ml-Relate: A Computer Program for Maximum Likelihood Estimation of Relatedness and Relationship ». *Molecular Ecology Notes* 6 (2): 576-79. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x.

Kannan, Kurunthachalam, Se Hun Yun, Robert J. Rudd, et Melissa Behr. 2010. « High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA ». *Chemosphere* 80 (6): 613-18. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.060.

Kartzinel, Tyler R., et Robert M. Pringle. 2015. « Molecular Detection of Invertebrate Prey in Vertebrate Diets: Trophic Ecology of Caribbean Island Lizards ». *Molecular Ecology Resources* 15 (4): 903-14. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12366.

Katoh, Kazutaka, Kazuharu Misawa, Kei-ichi Kuma, et Takashi Miyata. 2002. « MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform ». *Nucleic Acids Research* 30 (14): 3059-66. https://doi.org/10.1093/nar/gkf436.

Kearney, M. 2006. « Habitat, Environment and Niche: What Are We Modelling? » *Oikos* 115 (1): 186-91. https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14908.x.

Kearse, Matthew, Richard Moir, Amy Wilson, Steven Stones-Havas, Matthew Cheung, Shane Sturrock, Simon Buxton, et al. 2012. « Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data ». *Bioinformatics* 28 (12): 1647-49. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199.

Keller, Lukas F., et Donald M. Waller. 2002. « Inbreeding effects in wild populations ». *Trends in Ecology & Evolution* 17 (5): 230-41. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8.

Kerbiriou, C., J.F. Julien, Y. Bas, J. Marmet, I. Le Viol, R. Lorrilliere, C. Azam, A. Gasc, et G. Lois. 2015. « Vigie-Chiro : 9 ans de suivi des tendances des espèces communes ». *Symbioses*, n° 34 & 35.

Kerth, G., et L. Morf. 2004. « Behavioural and Genetic Data Suggest That Bechstein's Bats Predominantly Mate Outside the Breeding Habitat ». *Ethology* 110 (12): 987-99. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2004.01040.x.

Kerth, G., et J. Van Schaik. 2012. « Causes and Consequences of Living in Closed Societies: Lessons from a Long-Term Socio-Genetic Study on Bechstein's Bats ». *Molecular Ecology* 21 (3): 633-46. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05233.x.

Kervyn, T., M.C. Godin, R. Jocqué, P. Grootaert, et R. Libois. 2012. « Web-Building Spiders and Blood-Feeding Flies as Prey of the Notch-Eared Bat (*Myotis Emarginatus*) ». *Belgian Journal of Zoology* 142 (1). https://orbi.uliege.be/handle/2268/124356.

Kervyn, T., S. Lamotte, P. Nyssen, et J. Verschuren. 2009. « Major decline of bat abundance and diversity during the last 50 years in southern Belgium. » *Belgian Journal of Zoology* 139: 124-32.

Kinnison, Michael T., et Nelson G. Hairston. 2007. « Eco-Evolutionary Conservation Biology: Contemporary Evolution and the Dynamics of Persistence ». *Functional Ecology* 21 (3): 444-54. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01278.x.

Klare, Unn, Jan F. Kamler, et David W. Macdonald. 2011. « A Comparison and Critique of Different Scat-Analysis Methods for Determining Carnivore Diet ». *Mammal Review* 41 (4): 294-312. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00183.x.

Koselj, K., H-U. Schnitzler, et B. M. Siemers. 2011. « Horseshoe bats make adaptive prey-selection decisions, informed by echo cues ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1721): 3034-41. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2793.

Kruskal, J. B. 1964. « Multidimensional Scaling by Optimizing Goodness of Fit to a Nonmetric Hypothesis ». *Psychometrika* 29 (1): 1-27. https://doi.org/10.1007/BF02289565.

Kuhner, Mary K., Peter Beerli, Jon Yamato, et Joseph Felsenstein. 2000. « Usefulness of Single Nucleotide Polymorphism Data for Estimating Population Parameters ». *Genetics* 156 (1): 439-47.

Kunz, T. H., J. O. Whitaker, et M. D. Wadanoli. 1995. « Dietary Energetics of the Insectivorous Mexican Free-Tailed Bat (*Tadarida Brasiliensis*) during Pregnancy and Lactation ». *Oecologia* 101 (4): 407-15. https://doi.org/10.1007/BF00329419.

Kunz, Thomas H. 1974. « Feeding Ecology of a Temperate Insectivorous Bat (*Myotis Velifer*) ». *Ecology* 55 (4): 693-711. https://doi.org/10.2307/1934408.

Kunz, Thomas H., Elizabeth Braun de Torrez, Dana Bauer, Tatyana Lobova, et Theodore H. Fleming. 2011. « Ecosystem Services Provided by Bats ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223 (1): 1-38. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x.

Kurta, Allen, Gary P. Bell, Kenneth A. Nagy, et Thomas H. Kunz. 1989. « Energetics of Pregnancy and Lactation in Freeranging Little Brown Bats (*Myotis lucifugus*) ». *Physiological Zoology* 62 (3): 804-18. https://doi.org/10.1086/physzool.62.3.30157928.

Kurta, Allen, et John O. Whitaker. 1998. « Diet of the Endangered Indiana Bat (*Myotis sodalis*) on the Northern Edge of Its Range ». *The American Midland Naturalist* 140 (2): 280-86. https://doi.org/10.1674/0003-0031(1998)140[0280:DOTEIB]2.0.CO;2.

Lande, Russell. 1998. « Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation ». *Population Ecology* 40 (3): 259-69. https://doi.org/10.1007/BF02763457.

Langwig, Kate E., Joseph R. Hoyt, Katy L. Parise, Winifred F. Frick, Jeffrey T. Foster, et A. Marm Kilpatrick. 2017. « Resistance in persisting bat populations after white-nose syndrome invasion ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1712): 20160044. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0044.

Lankau, Richard, Peter Søgaard Jørgensen, David J. Harris, et Andrew Sih. 2011. « Incorporating Evolutionary Principles into Environmental Management and Policy ». *Evolutionary Applications* 4 (2): 315-25. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00171.x.

Lashof, Daniel A., et Dilip R. Ahuja. 1990. « Relative Contributions of Greenhouse Gas Emissions to Global Warming ». *Nature* 344 (6266): 529. https://doi.org/10.1038/344529a0.

Lê, S., J. Josse, et F. Husson. 2008. « FactoMineR: an R package for multivariate analysis. » *Journal of statistical software* 25 (1): 1-18.

Leblois, Raphaël, Pierre Pudlo, Joseph Néron, François Bertaux, Champak Reddy Beeravolu, Renaud Vitalis, et François Rousset. 2014. « Maximum-Likelihood Inference of Population Size Contractions from Microsatellite Data ». *Molecular Biology and Evolution* 31 (10): 2805-23. https://doi.org/10.1093/molbev/msu212.

Lefort, M. C., R. H. Cruickshank, K. Descovich, N. J. Adams, A. Barun, A. Emami-Khoyi, J. Ridden, et al. 2019. « Blood, Sweat and Tears: A Review of Non-Invasive DNA Sampling ». *BioRxiv*, septembre, 385120. https://doi.org/10.1101/385120.

Lemopoulos, Alexandre, Jenni M. Prokkola, Silva Uusi-Heikkilä, Anti Vasemägi, Ari Huusko, Pekka Hyvärinen, Marja-Liisa Koljonen, Jarmo Koskiniemi, et Anssi Vainikka. 2019. « Comparing RADseq and Microsatellites for Estimating Genetic Diversity and Relatedness — Implications for Brown Trout Conservation ». *Ecology and Evolution* 9 (4): 2106-20. https://doi.org/10.1002/ece3.4905.

Lettink, M., et D.P. Armstrong. 2003. « An introduction to using mark-recapture analysis for monitoring threatened species. », n° 28: 5-32.

Leuchtmann, M., O. Filippi-Codaccioni, O. Tournayre, D. Pinaud, et S. Jacquet. 2019. « Grand rhinolophe et trame verte bocagère : Etude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique de la population – Rapport d'activités, phase 3/3. » Poitou-Charentes Nature.

Levin, Eran, Yoram Yom-Tov, et Anat Barnea. 2009. « Frequent Summer Nuptial Flights of Ants Provide a Primary Food Source for Bats ». *Naturwissenschaften* 96 (4): 477-83. https://doi.org/10.1007/s00114-008-0496-3.

Lewanzik, Daniel, Arun K. Sundaramurthy, et Holger R. Goerlitz. 2019. « Insectivorous bats integrate social information about species identity, conspecific activity and prey abundance to estimate cost–benefit ratio of interactions ». *Journal of Animal Ecology* 88 (10): 1462-73. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12989.

Lewis, T. 1969. « The Distribution of Flying Insects Near a Low Hedgerow ». *Journal of Applied Ecology* 6 (3): 443-52. https://doi.org/10.2307/2401510.

Liu, Nianjun, Liang Chen, Shuang Wang, Cheongeun Oh, et Hongyu Zhao. 2005. « Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure ». *BMC Genetics* 6 (1): S26. https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-S1-S26.

Loïs, G., J.F. Julien, et L. Dewulf. 2017. « Liste rouge régionale des chauves-souris d'Île-de-France. » *Pantin : Natureparif*, 152.

Lugg, William H., Josh Griffiths, Anthony R. van Rooyen, Andrew R. Weeks, et Reid Tingley. 2018. « Optimal Survey Designs for Environmental DNA Sampling ». *Methods in Ecology and Evolution* 9 (4): 1049-59. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12951.

Luikart, Gordon, Phillip R. England, David Tallmon, Steve Jordan, et Pierre Taberlet. 2003. « The Power and Promise of Population Genomics: From Genotyping to Genome Typing ». *Nature Reviews Genetics* 4 (12): 981-94. https://doi.org/10.1038/nrg1226.

Luikart, Gordon, Nils Ryman, David A. Tallmon, Michael K. Schwartz, et Fred W. Allendorf. 2010. « Estimation of Census and Effective Population Sizes: The Increasing Usefulness of DNA-Based Approaches ». *Conservation Genetics* 11 (2): 355-73. https://doi.org/10.1007/s10592-010-0050-7.

Luis, Angela D., David T. S. Hayman, Thomas J. O'Shea, Paul M. Cryan, Amy T. Gilbert, Juliet R. C. Pulliam, James N. Mills, et al. 2013. « A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? » *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280 (1756): 20122753. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753.

Maas, Bea, Yann Clough, et Teja Tscharntke. 2013. « Bats and Birds Increase Crop Yield in Tropical Agroforestry Landscapes ». *Ecology Letters* 16 (12): 1480-87. https://doi.org/10.1111/ele.12194.

Maas, Bea, Sacha Heath, Ingo Grass, Camila Cassano, Alice Classen, Deborah Faria, Pierre Gras, et al. 2019. « Experimental field exclosure of birds and bats in agricultural systems — Methodological insights, potential improvements, and cost-benefit trade-offs ». *Basic and Applied Ecology* 35 (mars): 1-12. https://doi.org/10.1016/j.baae.2018.12.002.

Mace, Richard D., et John S. Waller. 1998. « Demography and Population Trend of Grizzly Bears in the Swan Mountains, Montana ». *Conservation Biology* 12 (5): 1005-16.

Magoč, Tanja, et Steven L. Salzberg. 2011. « FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies ». *Bioinformatics* 27 (21): 2957-63. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507.

Mahé, Frédéric, Torbjørn Rognes, Christopher Quince, Colomban de Vargas, et Micah Dunthorn. 2014. « Swarm: Robust and Fast Clustering Method for Amplicon-Based Studies ». *PeerJ* 2 (septembre): e593. https://doi.org/10.7717/peerj.593.

Maisels, Fiona, Samantha Strindberg, Stephen Blake, George Wittemyer, John Hart, Elizabeth A. Williamson, Rostand Aba'a, et al. 2013. « Devastating Decline of Forest Elephants in Central Africa ». *PLOS ONE* 8 (3): e59469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059469.

Mann, Francisco Sánchez-Bayo, Paul J. van den Brink, Reinier M. 2011. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Francisco Sanchez-Bayo.

Marini, Giovanni, Giorgio Guzzetta, Frederic Baldacchino, Daniele Arnoldi, Fabrizio Montarsi, Gioia Capelli, Annapaola Rizzoli, Stefano Merler, et Roberto Rosà. 2017. « The effect of interspecific competition on the temporal dynamics of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* ». *Parasites & Vectors* 10 (1): 102. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2041-8.

Marini, Lorenzo, Bjørn Økland, Anna Maria Jönsson, Barbara Bentz, Allan Carroll, Beat Forster, Jean-Claude Grégoire, et al. 2017. « Climate Drivers of Bark Beetle Outbreak Dynamics in Norway Spruce Forests ». *Ecography* 40 (12): 1426-35. https://doi.org/10.1111/ecog.02769.

Marquina, Daniel, Anders F. Andersson, et Fredrik Ronquist. 2019. « New Mitochondrial Primers for Metabarcoding of Insects, Designed and Evaluated Using in Silico Methods ». *Molecular Ecology Resources* 19 (1): 90-104. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12942.

Marquina, Daniel, Rodrigo Esparza-Salas, Tomas Roslin, et Fredrik Ronquist. 2019. « Establishing Insect Community Composition Using Metabarcoding of Soil Samples, and Preservative Ethanol and Homogenate from Malaise Trap Catches: Surprising Inconsistencies between Methods ». *BioRxiv*, avril, 597302. https://doi.org/10.1101/597302.

Martin, Jean-François. 2019. *Creating error-proof indexes for high throughput sequencing*. Zenodo. https://doi.org/10.5281/zenodo.3350207.

Martin, Marcel. 2011. « Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads ». *EMBnet.Journal* 17 (1): 10-12. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200.

Maslo, Brooke, Rafael Valentin, Karen Leu, Kathleen Kerwin, George C. Hamilton, Amanda Bevan, Nina H. Fefferman, et Dina M. Fonseca. 2017a. « Chirosurveillance: The Use of Native Bats to Detect Invasive Agricultural Pests ». *PloS One* 12 (3): e0173321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173321.

———. 2017b. « Chirosurveillance: The Use of Native Bats to Detect Invasive Agricultural Pests ». *PLOS ONE* 12 (3): e0173321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173321.

Mata, Vanessa A., Francisco Amorim, Martin F. V. Corley, Gary F. McCracken, Hugo Rebelo, et Pedro Beja. 2016. « Female Dietary Bias towards Large Migratory Moths in the European Free-Tailed Bat (*Tadarida Teniotis*) ». *Biology Letters* 12 (3): 20150988. https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0988.

Mata, Vanessa A., Hugo Rebelo, Francisco Amorim, Gary F. McCracken, Simon Jarman, et Pedro Beja. 2018. « How Much Is Enough? Effects of Technical and Biological Replication on Metabarcoding Dietary Analysis ». *Molecular Ecology* 28 (2): 165-75. https://doi.org/10.1111/mec.14779.

Mathews, F, LM Kubasiewicz, J Gurnell, CA Harrower, RA McDonald, et RF Shore. 2018. « A Review of the Population and Conservation Status of British Mammals. A report by the Mammal Society under contract to Natural England, Natural Resources Wales and Scottish Natural Heritage.Natural England, Peterborough. ISBN 978-1-78354-494-3. »

McClenaghan, Beverly, Erica Nol, et Kevin C. R. Kerr. 2019. « DNA Metabarcoding Reveals the Broad and Flexible Diet of a Declining Aerial Insectivore ». *The Auk* 136 (1). https://doi.org/10.1093/auk/uky003.

McCormack, John E., Sarah M. Hird, Amanda J. Zellmer, Bryan C. Carstens, et Robb T. Brumfield. 2013. « Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics ». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Morris Goodman Memorial Symposium, 66 (2): 526-38. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.007.

McMahon, Barry J., Emma C. Teeling, et Jacob Höglund. 2014. « How and Why Should We Implement Genomics into Conservation? » *Evolutionary Applications* 7 (9): 999-1007. https://doi.org/10.1111/eva.12193.

Mech, Stephen G., et James G. Hallett. 2001. « Evaluating the Effectiveness of Corridors: A Genetic Approach ». *Conservation Biology* 15 (2): 467-74. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015002467.x.

Mellanby, Kenneth, et John Stanley Gardiner. 1939. « Low temperature and insect activity ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 127 (849): 473-87. https://doi.org/10.1098/rspb.1939.0035.

Mesléard, François, Stéphanie Garnero, Nicolas Beck, et Élisabeth Rosecchi. 2005. « Uselessness and indirect negative effects of an insecticide on rice field invertebrates ». *Comptes Rendus Biologies* 328 (10): 955-62. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2005.09.003.

Millenium Ecosystem Assessment. 2005. « Ecosystems and Human Well-being: Synthesis.Island Press, Washington, DC ».

Mora, Camilo, Derek P. Tittensor, Sina Adl, Alastair G. B. Simpson, et Boris Worm. 2011. « How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? » *PLOS Biology* 9 (8): e1001127. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127.

Mulwa, Ronald K., Eike Lena Neuschulz, Katrin Böhning-Gaese, et Matthias Schleuning. 2013. « Seasonal Fluctuations of Resource Abundance and Avian Feeding Guilds across Forest–Farmland Boundaries in Tropical Africa ». *Oikos* 122 (4): 524-32. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2012.20640.x.

Muñoz, Irene, Dora Henriques, Laura Jara, J. Spencer Johnston, Julio Chávez-Galarza, Pilar De La Rúa, et M. Alice Pinto. 2017. « SNPs Selected by Information Content Outperform Randomly Selected Microsatellite Loci for Delineating Genetic Identification and Introgression in the Endangered Dark European Honeybee (*Apis Mellifera Mellifera*) ». *Molecular Ecology Resources* 17 (4): 783-95. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12637.

Munshi-South, Jason, et Gerald S. Wilkinson. 2010. « Bats and birds: Exceptional longevity despite high metabolic rates ». *Ageing Research Reviews*, Thermodynamics and Ageing, 9 (1): 12-19. https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.07.006.

Munster, S.K. 2015. « Evaluating accuracy and bias in genetic monitoring under scenarios of population decline. MS Theses. » Grand Valley State University.

Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003. « Inventaire National du Patrimoine Naturel, Site web : https://inpn.mnhn.fr. »

Newbold, Tim, Lawrence N. Hudson, Samantha L. L. Hill, Sara Contu, Igor Lysenko, Rebecca A. Senior, Luca Börger, et al. 2015. « Global Effects of Land Use on Local Terrestrial Biodiversity ». *Nature* 520 (7545): 45-50. https://doi.org/10.1038/nature14324.

Newson, Mendes, et Crick. 2009. « Indicators of the impact of climate change on migratory species ». 2009. http://www.int-res.com/articles/esr2009/7/n007p101.pdf.

Nichols, Ruth V., Christopher Vollmers, Lee A. Newsom, Yue Wang, Peter D. Heintzman, McKenna Leighton, Richard E. Green, et Beth Shapiro. 2018. « Minimizing Polymerase

Biases in Metabarcoding ». *Molecular Ecology Resources* 18 (5): 927-39. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12895.

Nielsen, Jens M., Elizabeth L. Clare, Brian Hayden, Michael T. Brett, et Pavel Kratina. 2018. « Diet Tracing in Ecology: Method Comparison and Selection ». *Methods in Ecology and Evolution* 9 (2): 278-91. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12869.

Noguerol, Tania-Noelia, Susanna Boronat, Marta Casado, Demetrio Raldúa, Damià Barceló, et Benjamin Piña. 2006. « Evaluating the Interactions of Vertebrate Receptors with Persistent Pollutants and Antifouling Pesticides Using Recombinant Yeast Assays ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (6): 1012-19. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0476-4.

Oehm, Johannes, Anita Juen, Karin Nagiller, Sigrid Neuhauser, et Michael Traugott. 2011. « Molecular Scatology: How to Improve Prey DNA Detection Success in Avian Faeces? » *Molecular Ecology Resources* 11 (4): 620-28. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03001.x.

Oksanen, Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, et al. 2019. *vegan: Community Ecology Package* (version 2.5-5). https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

Olimpi, Elissa M., et Stacy M. Philpott. 2018. « Agroecological farming practices promote bats ». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 265 (octobre): 282-91. https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.06.008.

Olivieri, Isabelle, Jeanne Tonnabel, Ophélie Ronce, et Agnès Mignot. 2016. « Why Evolution Matters for Species Conservation: Perspectives from Three Case Studies of Plant Metapopulations ». *Evolutionary Applications* 9 (1): 196-211. https://doi.org/10.1111/eva.12336.

Ondov, BD, NH Bergman, et AM Phillippy. 2011. « Interactive metagenomic visualization in a Web browser. - PubMed - NCBI ». 2011. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961884.

Ortega, Jorge, Diana D. Moreno-Santillán, et Veronica Zamora-Gutierrez. 2016. « Acoustic Ecology of European Bats: Species Identification, Study of Their Habitats and Foraging Behavior ». *Journal of Mammalogy* 97 (6): 1784-85. https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw142.

O'Shea, Thomas J., Michael A. Bogan, et Laura E. Ellison. 2003. « Monitoring Trends in Bat Populations of the United States and Territories: Status of the Science and Recommendations for the Future ». *USGS Staff -- Published Research*, janvier. https://digitalcommons.unl.edu/usgsstaffpub/35.

O'Shea, Thomas J., Laura E. Ellison, et Thomas R. Stanley. 2011. « Adult Survival and Population Growth Rate in Colorado Big Brown Bats (*Eptesicus Fuscus*) ». *Journal of Mammalogy* 92 (2): 433-43. https://doi.org/10.1644/10-MAMM-A-162.1.

Owens, Randall W., et Dawn E. Dittman. 2003. « Shifts in the Diets of Slimy Sculpin (*Cottus cognatus*) and Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in Lake Ontario Following the Collapse of the Burrowing Amphipod Diporeia ». *Aquatic Ecosystem Health & Management* 6 (3): 311-23. https://doi.org/10.1080/14634980301487.

Pap, Péter László, Csongor István Vágási, Gábor Árpád Czirják, Adriana Titilincu, Adela Pintea, et Zoltán Barta. 2009. « Carotenoids Modulate the Effect of Coccidian Infection on the Condition and Immune Response in Moulting House Sparrows ». *Journal of Experimental Biology* 212 (20): 3228-35. https://doi.org/10.1242/jeb.031948.

Pelletier, F., P. Garant, et A.P. Hendry. 2009. « Eco-evolutionary dynamics ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1523): 1483-89. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0027.

Pereira, Henrique Miguel, Laetitia Marie Navarro, et Inês Santos Martins. 2012. « Global Biodiversity Change: The Bad, the Good, and the Unknown ». *Annual Review of Environment and Resources* 37 (1): 25-50. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-042911-093511.

Perrig, Marco, Martin U. Grüebler, Herbert Keil, et Beat Naef-Daenzer. 2017. « Post-Fledging Survival of Little Owls *Athene Noctua* in Relation to Nestling Food Supply ». *Ibis* 159 (3): 532-40. https://doi.org/10.1111/ibi.12477.

Petit, Eric, et Nathaniel Valiere. 2006. « Estimating Population Size with Noninvasive Capture-Mark-Recapture Data ». *Conservation Biology* 20 (4): 1062-73. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00417.x.

Phillips, Caleb D., John Hanson, Jeremy E. Wilkinson, Lawrence Koenig, Eric Rees, Paul Webala, et Tigga Kingston. 2017. « Microbiome Structural and Functional Interactions across Host Dietary Niche Space ». *Integrative and Comparative Biology* 57 (4): 743-55. https://doi.org/10.1093/icb/icx011.

Phillips, Carleton J., Caleb D. Phillips, Jeremy Goecks, Enrique P. Lessa, Cibele G. Sotero-Caio, Bernard Tandler, Michael R. Gannon, et Robert J. Baker. 2014. « Dietary and Flight Energetic Adaptations in a Salivary Gland Transcriptome of an Insectivorous Bat ». *PLOS ONE* 9 (1): e83512. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083512.

Pierson, Jennifer C., David J. Coates, J. Gerard B. Oostermeijer, Steven R. Beissinger, Jason G. Bragg, Paul Sunnucks, Nathan H. Schumaker, et Andrew G. Young. 2016. « Genetic Factors in Threatened Species Recovery Plans on Three Continents ». *Frontiers in Ecology and the Environment* 14 (8): 433-40. https://doi.org/10.1002/fee.1323.

Pikula, Jiri, Jan Zukal, Vojtech Adam, Hana Bandouchova, Miroslava Beklova, Pavlina Hajkova, Jana Horakova, Rene Kizek, et Lucie Valentikova. 2010. « Heavy Metals and Metallothionein in Vespertilionid Bats Foraging over Aquatic Habitats in the Czech Republic ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (3): 501-6. https://doi.org/10.1002/etc.80.

Pinaud, David, Fabien Claireau, Maxime Leuchtmann, et Christian Kerbiriou. 2018. « Modelling Landscape Connectivity for Greater Horseshoe Bat Using an Empirical Quantification of Resistance ». *Journal of Applied Ecology* 0 (0). https://doi.org/10.1111/1365-2664.13228.

Piñol J., Mir G., Gomez-Polo P., et Agustí N. 2015. « Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods ». *Molecular Ecology Resources* 15 (4): 819-30. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355.

Piñol, J., G. Mir, P. Gomez-Polo, et N. Agustí. 2015. « Universal and Blocking Primer Mismatches Limit the Use of High-Throughput DNA Sequencing for the Quantitative Metabarcoding of Arthropods ». *Molecular Ecology Resources* 15 (4): 819-30. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355.

Pir, J. 2009. « Plan national pour la protection de la nature (PNPN). Plan d'Action Espèces Grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrequinum*) ».

Piry, Sylvain, Marie-Pierre Chapuis, Bertrand Gauffre, Julien Papaïx, Astrid Cruaud, et Karine Berthier. 2016. « Mapping Averaged Pairwise Information (MAPI): A New Exploratory

Tool to Uncover Spatial Structure ». *Methods in Ecology and Evolution* 7 (12): 1463-75. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12616.

Podlutsky, Andrej J., Alexander M. Khritankov, Nikolai D. Ovodov, et Steven N. Austad. 2005. « A New Field Record for Bat Longevity ». *The Journals of Gerontology: Series A* 60 (11): 1366-68. https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1366.

Pompanon, Francois, Bruce E. Deagle, William O. C. Symondson, David S. Brown, Simon N. Jarman, et Pierre Taberlet. 2012. « Who Is Eating What: Diet Assessment Using next Generation Sequencing ». *Molecular Ecology* 21 (8): 1931-50. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x.

Pratchett, M. S., S. K. Wilson, et A. H. Baird. 2006. « Declines in the Abundance of Chaetodon Butterflyfishes Following Extensive Coral Depletion ». *Journal of Fish Biology* 69 (5): 1269-80. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01161.x.

Pritchard, J. K., M. Stephens, et P. Donnelly. 2000. « Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data ». *Genetics* 155 (2): 945-59.

Puechmaille, Sebastien J., et Eric J. Petit. 2007. « Empirical Evaluation of Non-Invasive Capture-Mark-Recapture Estimation of Population Size Based on a Single Sampling Session ». *Journal of Applied Ecology* 44 (4): 843-52. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01321.x.

Puechmaille, Sebastien, Gregory Mathy, et Eric Petit. 2005. « Characterization of 14 Polymorphic Microsatellite Loci for the Lesser Horseshoe Bat, *Rhinolophus Hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera) ». *Molecular Ecology Notes* 5 (4): 941-44. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01123.x.

Purvis, Andy, John L. Gittleman, Guy Cowlishaw, et Georgina M. Mace. 2000. « Predicting Extinction Risk in Declining Species ». *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267 (1456): 1947-52. https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1234.

Put, Julia E., Greg W. Mitchell, et Lenore Fahrig. 2018. « Higher bat and prey abundance at organic than conventional soybean fields ». *Biological Conservation* 226 (octobre): 177-85. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.06.021.

QGIS Development Team. 2019. *QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. http://qgis.osgeo.org*.

Ralls, Katherine, Ballou Jonathan D., Dudash Michele R., Eldridge Mark D. B., Fenster Charles B., Lacy Robert C., Sunnucks Paul, et Frankham Richard. 2017. « Call for a Paradigm Shift in the Genetic Management of Fragmented Populations ». *Conservation Letters* 11 (2): e12412. https://doi.org/10.1111/conl.12412.

Ransome, R. D. 1971. « The Effect of Ambient Temperature on the Arousal Frequency of the Hibernating Greater Horseshoe Bat, *Rhinolophus Fermmequinum*, in Relation to Site Selection and the Hibernation State ». *Journal of Zoology* 164 (3): 353-71. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1971.tb01323.x.

Ransome, R. D., et T. P. McOwat. 1994. « Birth Timing and Population Changes in Greater Horseshoe Bat Colonies (*Rhinolophus Ferrumequinum*) Are Synchronized by Climatic Temperature ». *Zoological Journal of the Linnean Society* 112 (3): 337-51. https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1994.tb00324.x.

Ransome, Roger D. 1996. « The management of feeding areas for greater horseshoe bats », 1996, English Nature édition.

Rašić, Gordana, Igor Filipović, Andrew R. Weeks, et Ary A. Hoffmann. 2014. « Genome-wide SNPs lead to strong signals of geographic structure and relatedness patterns in the

major arbovirus vector, Aedes aegypti ». *BMC Genomics* 15 (1): 275. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-275.

Raup, David M., et J. John Sepkoski. 1982. « Mass Extinctions in the Marine Fossil Record ». *Science* 215 (4539): 1501-3. https://doi.org/10.1126/science.215.4539.1501.

Razgour, Orly, Elizabeth L. Clare, Matt R. K. Zeale, Julia Hanmer, Ida Bærholm Schnell, Morten Rasmussen, Thomas P. Gilbert, et Gareth Jones. 2011. « High-Throughput Sequencing Offers Insight into Mechanisms of Resource Partitioning in Cryptic Bat Species ». *Ecology and Evolution* 1 (4): 556-70. https://doi.org/10.1002/ece3.49.

Razgour, Orly, Brenna Forester, John B. Taggart, Michaël Bekaert, Javier Juste, Carlos Ibáñez, Sébastien J. Puechmaille, Roberto Novella-Fernandez, Antton Alberdi, et Stéphanie Manel. 2019. « Considering Adaptive Genetic Variation in Climate Change Vulnerability Assessment Reduces Species Range Loss Projections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (21): 10418-23. https://doi.org/10.1073/pnas.1820663116.

Razzauti, Maria, Maxime Galan, Maria Bernard, Sarah Maman, Christophe Klopp, Nathalie Charbonnel, Muriel Vayssier-Taussat, Marc Eloit, et Jean-François Cosson. 2015. « A Comparison between Transcriptome Sequencing and 16S Metagenomics for Detection of Bacterial Pathogens in Wildlife ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (8): e0003929. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003929.

Roesijadi, G. 1996. « Metallothionein and its role in toxic metal regulation ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113 (2): 117-23. https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02077-2.

Rognes, Torbjørn, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, et Frédéric Mahé. 2016. « VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics ». *PeerJ* 4 (octobre): e2584. https://doi.org/10.7717/peerj.2584.

Rolseth, Scott L., Catherine E. Koehler, et Robert M. R. Barclay. 1994. « Differences in the Diets of Juvenile and Adult Hoary Bats, *Lasiurus Cinereus* ». *Journal of Mammalogy* 75 (2): 394-98. https://doi.org/10.2307/1382558.

Rossiter, S. J., T. M. Burland, G. Jones, et E. M. Barratt. 1999. « Characterization of Microsatellite Loci in the Greater Horseshoe Bat *Rhinolophus Ferrumequinum* ». *Molecular Ecology* 8 (11): 1959-60. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00778-2.x.

Rossiter, S. J., G. Jones, R. D. Ransome, et E. M. Barrattt. 2000. « Genetic Variation and Population Structure in the Endangered Greater Horseshoe Bat *Rhinolophus Ferrumequinum* ». *Molecular Ecology* 9 (8): 1131-35. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00982.x.

Rossiter, Stephen J., Petr Benda, Christian Dietz, Shuyi Zhang, et Gareth Jones. 2007. « Rangewide Phylogeography in the Greater Horseshoe Bat Inferred from Microsatellites: Implications for Population History, Taxonomy and Conservation ». *Molecular Ecology* 16 (22): 4699-4714. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03546.x.

Rousset, François. 1997. « Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from F-Statistics Under Isolation by Distance ». *Genetics* 145 (4): 1219-28.

Rousset, Francois. 2008. « GENEPOP ' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux ». *Molecular ecology resources* 8 (janvier): 103-6. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.

Rowse, E. G., D. Lewanzik, E. L. Stone, S. Harris, et G. Jones. 2016. « Dark Matters: The Effects of Artificial Lighting on Bats ». In *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a*

Changing World, édité par Christian C. Voigt et Tigga Kingston, 187-213. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_7.

R. Taylor, Helen, Nicolas Dussex, et Yolanda van Heezik. 2017. « Bridging the conservation genetics gap by identifying barriers to implementation for conservation practitioners ». *Global Ecology and Conservation* 10 (avril): 231-42. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2017.04.001.

Russell, A. L., R. A. Medellín, et G. F. Mccracken. 2005. « Genetic Variation and Migration in the Mexican Free-Tailed Bat (*Tadarida Brasiliensis Mexicana*) ». *Molecular Ecology* 14 (7): 2207-22. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02552.x.

Russello, Michael A., Matthew D. Waterhouse, Paul D. Etter, et Eric A. Johnson. 2015. « From Promise to Practice: Pairing Non-Invasive Sampling with Genomics in Conservation ». *PeerJ* 3 (juillet): e1106. https://doi.org/10.7717/peerj.1106.

Russo, Danilo, et Gareth Jones. 2015. « Bats as Bioindicators: An Introduction ». *Mammalian Biology* 3 (80): 157-58. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.03.005.

Rydell, Jens, Guenther Natuschke, Alex Theiler, et Peter E. Zingg. 1996. « Food Habits of the Barbastelle Bat *Barbastella Barbastellus* ». *Ecography* 19 (1): 62-66. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1996.tb00155.x.

Rytkönen, Seppo, Eero J. Vesterinen, Coen Westerduin, Tiina Leviäkangas, Emma Vatka, Marko Mutanen, Panu Välimäki, Markku Hukkanen, Marko Suokas, et Markku Orell. 2019. « From Feces to Data: A Metabarcoding Method for Analyzing Consumed and Available Prey in a Bird-Insect Food Web ». *Ecology and Evolution* 9 (1): 631-39. https://doi.org/10.1002/ece3.4787.

Safi, Kamran, et Gerald Kerth. 2004. « A Comparative Analysis of Specialization and Extinction Risk in Temperate-Zone Bats ». *Conservation Biology* 18 (5): 1293-1303. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00155.x.

Saint Girons, M-C. 1973. « Les Mammifères de France et du Benelux. Doin, Paris. »

Salsamendi, E., I. Garin, D. Almenar, U. Goiti, M. Napal, et J. Aihartza. 2008. « Diet and Prey Selection in Mehelyi's Horseshoe Bat *Rhinolophus Mehelyi* (Chiroptera, Rhinolophidae) in the South-Western Iberian Peninsula ». *Acta Chiropterologica* 10 (2): 279-86. https://doi.org/info:doi/10.3161/150811008X414854.

Sanderson, Eric W., Malanding Jaiteh, Marc A. Levy, Kent H. Redford, Antoinette V. Wannebo, et Gillian Woolmer. 2002. « The Human Footprint and the Last of the WildThe Human Footprint Is a Global Map of Human Influence on the Land Surface, Which Suggests That Human Beings Are Stewards of Nature, Whether We like It or Not ». *BioScience* 52 (10): 891-904. https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0891:THFATL]2.0.CO;2.

Santamaría, Luis, et Pablo F. Méndez. 2012. « Evolution in Biodiversity Policy – Current Gaps and Future Needs ». *Evolutionary Applications* 5 (2): 202-18. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00229.x.

Schad, Julia, et Christian C. Voigt. 2016. « Adaptive Evolution of Virus-Sensing Toll-like Receptor 8 in Bats ». *Immunogenetics* 68 (10): 783-95. https://doi.org/10.1007/s00251-016-0940-z.

Serrano-Davies, Eva, et Juan José Sanz. 2017. « Habitat structure modulates nestling diet composition and fitness of Blue Tits *Cyanistes caeruleus* in the Mediterranean region ». *Bird Study* 64 (3): 295-305. https://doi.org/10.1080/00063657.2017.1357678.

Shehzad, Wasim, Tiayyba Riaz, Muhammad A. Nawaz, Christian Miquel, Carole Poillot, Safdar A. Shah, François Pompanon, Eric Coissac, et Pierre Taberlet. 2012. « Carnivore Diet

Analysis Based on Next-Generation Sequencing: Application to the Leopard Cat (*Prionailurus Bengalensis*) in Pakistan ». *Molecular Ecology* 21 (8): 1951-65. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x.

Sherwin, Hayley A., W. Ian Montgomery, et Mathieu G. Lundy. 2013. « The Impact and Implications of Climate Change for Bats ». *Mammal Review* 43 (3): 171-82. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2012.00214.x.

Sierro, Antoine, et Raphaël Arlettaz. 1997. « Barbastelle bats (*Barbastella spp.*) specialize in the predation of moths: implications for foraging tactics and conservation - ScienceDirect ». http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1146609X97800677?via%3Dihub.

Sluiter, J. W., P. F. van Heerdt, et M. Gruet. 2009. « Paramètres de population chez le Grand rhinolophe fer-à-cheval (*Rhinolophus ferrumequinum,* Schreber), estimés par la méthode des reprises après baguages. » *Mammalia* 35 (2): 254–272. https://doi.org/10.1515/mamm.1971.35.2.254.

Sordello, R., G. Conruyt-Rogeon, F. Merlet, X. Houard, et J. Touroult. 2013. « Synthèses bibliographiques sur les traits de vie de 39 espèces proposées pour la cohérence nationale de la Trame verte et bleue relatifs à leurs déplacements et besoins de continuité écologique. Muséum national d'histoire naturelle (MNHN)-Service du Patrimoine naturel et Office pour les insectes et leur environnement (Opie). » 20.

Sordello, Romain. 2017. « Pollution lumineuse et trame verte et bleue : vers une trame noire en France ? » *Territoire en mouvement Revue de géographie et aménagement. Territory in movement Journal of geography and planning*, n° 35 (novembre). https://doi.org/10.4000/tem.4381.

Sorensen, Marjorie C., J. Mark Hipfner, T. Kurt Kyser, et D. Ryan Norris. 2009. « Carry-over Effects in a Pacific Seabird: Stable Isotope Evidence That Pre-Breeding Diet Quality Influences Reproductive Success ». *Journal of Animal Ecology* 78 (2): 460-67. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01492.x.

Soulé, Michael E. 1985. « What Is Conservation Biology? » *BioScience* 35 (11): 727-34. https://doi.org/10.2307/1310054.

Sousa, Lara Loureiro de, Sofia Marques Silva, et Raquel Xavier. 2019. « DNA Metabarcoding in Diet Studies: Unveiling Ecological Aspects in Aquatic and Terrestrial Ecosystems ». *Environmental DNA* 0 (0). https://doi.org/10.1002/edn3.27.

Sow, Ahmadou, Thierry Brévault, Laure Benoit, Marie-Pierre Chapuis, Maxime Galan, Armelle Coeur D'acier, Gérard Delvare, Mbacké Sembène, et Julien Haran. 2019. « Deciphering Host-Parasitoid Interactions and Parasitism Rates of Crop Pests Using DNA Metabarcoding ». *Scientific Reports* 9 (1): 3646. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40243-z.

Sow, Ahmadou, Thierry Brévault, Gérard Delvare, Julien Haran, Laure Benoit, Armelle Cœur d'Acier, Maxime Galan, Cheikh Thiaw, Valérie Soti, et Mbacké Sembène. 2018. « DNA sequencing to help identify crop pests and their natural enemies in agro-ecosystems: The case of the millet head miner *Heliocheilus albipunctella* (Lepidoptera: Noctuidae) in sub-Saharan Africa ». *Biological Control* 121 (juin): 199-207. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.007.

Speakman, John R., et Angela Rowland. 1999. « Preparing for inactivity: How insectivorous bats deposit a fat store for hibernation ». *Proceedings of the Nutrition Society* 58 (1): 123-31. https://doi.org/10.1079/PNS19990017.

Stadhouders, Ralph, Suzan D. Pas, Jeer Anber, Jolanda Voermans, Ted H. M. Mes, et Martin Schutten. 2010. « The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay ». *The Journal of Molecular Diagnostics* 12 (1): 109-17. https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035.

Steffen, Will, Regina Angelina Sanderson, Peter D. Tyson, Jill Jäger, Pamela A. Matson, Berrien Moore III, Frank Oldfield, et al. 2006. *Global Change and the Earth System: A Planet Under Pressure*. Springer Science & Business Media.

Stephens, Jeffrey P., Keith A. Berven, et Scott D. Tiegs. 2013. « Anthropogenic Changes to Leaf Litter Input Affect the Fitness of a Larval Amphibian ». *Freshwater Biology* 58 (8): 1631-46. https://doi.org/10.1111/fwb.12155.

Stockwell, Craig A., Andrew P. Hendry, et Michael T. Kinnison. 2003. « Contemporary evolution meets conservation biology ». *Trends in Ecology & Evolution* 18 (2): 94-101. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00044-7.

Strong, L., R. Wall, A. Woolford, et D. Djeddour. 1996. « The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonisation of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses ». *Veterinary Parasitology* 62 (3): 253-66. https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00890-X.

Taberlet, Pierre, Eric Coissac, Mehrdad Hajibabaei, et Loren H. Rieseberg. 2012. « Environmental DNA ». *Molecular Ecology* 21 (8): 1789-93. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x.

Takeuchi, Shinji, Mitsuru Iida, Hisatoshi Yabushita, Tadashi Matsuda, et Hiroyuki Kojima. 2008. « In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron ». *Chemosphere* 74 (1): 155-65. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.015.

Taylor, Iain R., et Mike C. Schultz. 2008. « Breeding Season Diets of Egrets in Southeast Australia: Implications for Future Population Viability ». *Waterbirds* 31 (4): 593-601. https://doi.org/10.1675/1524-4695-31.4.593.

Teeling, Emma C., Sonja C. Vernes, Liliana M. Dávalos, David A. Ray, M. Thomas P. Gilbert, et Eugene and Myers. 2018. « Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species ». *Annual Review of Animal Biosciences* 6 (1): 23-46. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022811.

Tilman, David, Michael Clark, David R. Williams, Kaitlin Kimmel, Stephen Polasky, et Craig Packer. 2017. « Future Threats to Biodiversity and Pathways to Their Prevention ». *Nature* 546 (7656): 73-81. https://doi.org/10.1038/nature22900.

Townsend, Andrea K., Evan G. Cooch, T. Scott Sillett, Nicholas L. Rodenhouse, Richard T. Holmes, et Michael S. Webster. 2016. « The Interacting Effects of Food, Spring Temperature, and Global Climate Cycles on Population Dynamics of a Migratory Songbird ». *Global Change Biology* 22 (2): 544-55. https://doi.org/10.1111/gcb.13053.

Trumble, J., et C. Butler. 2009. « Climate Change Will Exacerbate California's Insect Pest Problems ». *California Agriculture* 63 (2): 73-78.

Tsuji, Yamato, Takehiko Y. Ito, et Yayoi Kaneko. 2019. « Variation in the Diets of Japanese Martens *Martes Melampus* ». *Mammal Review* 49 (2): 121-28. https://doi.org/10.1111/mam.12147.

Turkalo, Andrea K., Peter H. Wrege, et George Wittemyer. 2017. « Slow Intrinsic Growth Rate in Forest Elephants Indicates Recovery from Poaching Will Require Decades ». *Journal*

of Applied Ecology, 153-59. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12764@10.1111/(ISSN)1365-2664.WILDLIFE_MANAGEMENT.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2019. « World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423). »

Vallejo, Nerea, Joxerra Aihartza, Urtzi Goiti, Aitor Arrizabalaga-Escudero, Carles Flaquer, Xavi Puig, Miren Aldasoro, Unai Baroja, et Inazio Garin. 2019. « The Diet of the Notch-Eared Bat (*Myotis Emarginatus*) across the Iberian Peninsula Analysed by Amplicon Metabarcoding ». *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, juin. https://doi.org/10.4404/hystrix-00189-2019.

Vamos, Ecaterina, Vasco Elbrecht, et Florian Leese. 2017. « Short COI Markers for Freshwater Macroinvertebrate Metabarcoding ». *Metabarcoding and Metagenomics* 1 (septembre): e14625. https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625.

Van den Bussche, Ronald A., Dana N. Lee, Megan E. Judkins, Jenny E. Dyer, Denise M. Thompson, Richard C. Stark, William L. Puckette, et Brian Fuller. 2016. « Molecular Dietary Analysis of the Endangered Ozark Big-Eared Bat (*Corynorhinus Townsendii Ingens*) ». *Acta Chiropterologica* 18 (1): 181-91. https://doi.org/10.3161/15081109ACC2016.18.1.008.

Vanni, Michael J., et Winfried Lampert. 1992. « Food Quality Effects on Life History Traits and Fitness in the Generalist Herbivore Daphnia ». *Oecologia* 92 (1): 48-57. https://doi.org/10.1007/BF00317261.

Vass, E., et A. J. Nappi. 1998. « The Effects of Dietary Yeast on the Cellular Immune Response of Drosophila melanogaster against the Larval Parasitoid, *Leptopilina boulardi* ». *The Journal of Parasitology* 84 (4): 870-72. https://doi.org/10.2307/3284609.

Vendrami, David L. J., Luca Telesca, Hannah Weigand, Martina Weiss, Katie Fawcett, Katrin Lehman, M. S. Clark, et al. 2017. « RAD sequencing resolves fine-scale population structure in a benthic invertebrate: implications for understanding phenotypic plasticity ». *Royal Society Open Science* 4 (2): 160548. https://doi.org/10.1098/rsos.160548.

Verboom, B, et K Spoelstra. 1999. « Effects of food abundance and wind on the use of tree lines by an insectivorous bat, *Pipistrellus pipistrellus* ». *Canadian Journal of Zoology* 77 (9): 1393-1401. https://doi.org/10.1139/z99-116.

Vesterinen, Eero J., Anna I. E. Puisto, Anna S. Blomberg, et Thomas M. Lilley. 2018. « Table for Five, Please: Dietary Partitioning in Boreal Bats ». *Ecology and Evolution* 8 (22): 10914-37. https://doi.org/10.1002/ece3.4559.

Vesterinen, Eero J., Lasse Ruokolainen, Niklas Wahlberg, Carlos Peña, Tomas Roslin, Veronika N. Laine, Ville Vasko, Ilari E. Sääksjärvi, Kai Norrdahl, et Thomas M. Lilley. 2016. « What you need is what you eat? Prey selection by the bat *Myotis daubentonii* ». *Molecular Ecology* 25 (7): 1581-94. https://doi.org/10.1111/mec.13564.

Vesterinen, Eero, Thomas Lilley, Veronika Laine, et Niklas Wahlberg. 2013. « Next Generation Sequencing of Fecal DNA Reveals the Dietary Diversity of the Widespread Insectivorous Predator Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland ». *PloS one* 8 (novembre): e82168. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082168.

Vestheim, Hege, et Simon N. Jarman. 2008. « Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs ». *Frontiers in Zoology* 5 (1): 12. https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-12.

Vincent, Stéphane, et Bat Group SFEPM. 2014. « Chiroptères de l'annexe II de la Directive Habitats-Faune-Flore. Synthèse actualisée des populations en France – Bilan 2014 ». SFEPM.

Voigt, Christian C., et Tigga Kingston. 2016. « Bats in the Anthropocene ». In *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*, édité par Christian C. Voigt et Tigga Kingston, 1-9. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_1.

Vonhof, M., et A.L. Russell. 2015. « Genetic approaches to understanding the population-level impact of wind energy development on migratory bats: a case study of the eastern red bat (*Lasiurus borealis*) ». *PeerJ PrePrints* 3: e788v1.

Vonhof, Maarten J., Curtis Strobeck, et M. Brock Fenton. 2008. « Genetic Variation and Population Structure in Big Brown Bats (*Eptesicus Fuscus*): Is Female Dispersal Important? » *Journal of Mammalogy* 89 (6): 1411-20. https://doi.org/10.1644/08-MAMM-S-062.1.

Wang, J., W. Gao, L. Wang, W. Metzner, J. Ma, et J. Feng. 2010. « Seasonal variation in prey abundance influences habitat use by greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) in a temperate deciduous forest ». *Canadian Journal of Zoology* 88 (3): 315-23. https://doi.org/10.1139/Z10-005.

Waples, Robin S., et Oscar Gaggiotti. 2006. « INVITED REVIEW: What Is a Population? An Empirical Evaluation of Some Genetic Methods for Identifying the Number of Gene Pools and Their Degree of Connectivity ». *Molecular Ecology* 15 (6): 1419-39. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x.

Ware, Roselyn Lydia, Benjamin Garrod, Hannah Macdonald, et Robin G. Allaby. 2019. « Guano Morphology Reveals Ecological Information in British Bats ». *BioRxiv*, août, 728824. https://doi.org/10.1101/728824.

Warren, Martin, et Nigel Bourn. 2011. « Ten challenges for 2010 and beyond to conserve Lepidoptera in Europe ». *Journal of Insect Conservation* 15 (avril): 321-26. https://doi.org/10.1007/s10841-010-9356-5.

Weier, Sina M., Yoshan Moodley, Mischa F. Fraser, Valerie M. G. Linden, Ingo Grass, Teja Tscharntke, et Peter J. Taylor. 2019. « Insect pest consumption by bats in macadamia orchards established by molecular diet analyses ». *Global Ecology and Conservation* 18 (avril): e00626. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00626.

Weinberg, Irene C., Fabio Bontadina, et Raphaël Arlettaz. 2009. « Translocation as a conservation tool to supplement relict bat colonies: a pioneer study with endangered horseshoe bats ». *Endangered Species Research* 8 (1-2): 41-48. https://doi.org/10.3354/esr00196.

Weir, B. S., et C. Clark Cockerham. 1984. « Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure ». *Evolution* 38 (6): 1358-70. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x.

Welbergen Justin A, Klose Stefan M, Markus Nicola, et Eby Peggy. 2008. « Climate change and the effects of temperature extremes on Australian flying-foxes ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275 (1633): 419-25. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1385.

Weller, Theodore J., Kevin T. Castle, Felix Liechti, Cris D. Hein, Michael R. Schirmacher, et Paul M. Cryan. 2016. « First Direct Evidence of Long-Distance Seasonal Movements and Hibernation in a Migratory Bat ». *Scientific Reports* 6 (octobre): 34585. https://doi.org/10.1038/srep34585.

Whiteley, Andrew R., Sarah W. Fitzpatrick, W. Chris Funk, et David A. Tallmon. 2015. « Genetic rescue to the rescue ». *Trends in Ecology & Evolution* 30 (1): 42-49. https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.009.

Whitlock, J P. 1986. « The Regulation of Cytochrome P-450 Gene Expression ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 26 (1): 333-69. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.26.040186.002001.

Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.*

Wickramasinghe, Liat P., Stephen Harris, Gareth Jones, et Nancy Vaughan Jennings. 2004. « Abundance and Species Richness of Nocturnal Insects on Organic and Conventional Farms: Effects of Agricultural Intensification on Bat Foraging ». *Conservation Biology* 18 (5): 1283-92. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00152.x.

Wickramasinghe, Liat P., Stephen Harris, Gareth Jones, et Nancy Vaughan. 2003. « Bat Activity and Species Richness on Organic and Conventional Farms: Impact of Agricultural Intensification ». *Journal of Applied Ecology* 40 (6): 984-93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2003.00856.x.

Wilkinson, Gerald S., et Jason M. South. 2002. « Life History, Ecology and Longevity in Bats ». *Aging Cell* 1 (2): 124-31. https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00020.x.

Williams, P. 2005. « Does specialization explain rarity and decline among British bumblebees? A response to Goulson et al. » *Biological Conservation* 122 (1): 33-43. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.06.019.

Williams, P.H., M.B. Araújo, et P. Rasmont. 2007. « Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth? » *Biological Conservation* 138 (3): 493-505. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.06.001.

Wright, Patrick G. R., Fiona Mathews, Henry Schofield, Colin Morris, Joe Burrage, Adam Smith, Emma L. Dempster, et Patrick B. Hamilton. 2018. « Application of a Novel Molecular Method to Age Free-Living Wild Bechstein's Bats ». *Molecular Ecology Resources* 18 (6): 1374-80. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12925.

Yazid, Nor Nadhirah Ahmad, Sri Handayani Gunawan, Azuan Roslan, Mohamed Nor Zalipah, et Mohd Tajuddin Abdullah. 2019. « Note on Pollen and Seeds Dispersed by Pteropodid Bats in Kenyir Forest Area, Terengganu ». In *Greater Kenyir Landscapes: Social Development and Environmental Sustainability: From Ridge to Reef*, édité par Mohd Tajuddin Abdullah, Aqilah Mohammad, Mohamed Nor Zalipah, et Muhamad Safiih Lola, 171-79. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92264-5_16.

Yuan, Xiao-Chen, Shan He, Xu-Fang Liang, Xiaonian Luo, Aixuan Li, et Yi Zhou. 2018. « Food Conditions and Water Salinity Affect Survival and Growth of Golden Mandarin Fish, *Siniperca sherzeri*, Larvae through Transcriptional Regulation of Growth and Lipometabolic Genes ». *Journal of the World Aquaculture Society* 49 (3): 590-600. https://doi.org/10.1111/jwas.12450.

Zalewski, Andrzej. 2005. « Geographical and Seasonal Variation in Food Habits and Prey Size of European Pine Martens ». In *Martens and Fishers (Martes) in Human-Altered Environments: An International Perspective*, édité par Daniel J. Harrison, Angela K. Fuller, et Gilbert Proulx, 77-98. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-22691-5_3.

Zarzoso-Lacoste, Diane, Pierre-Loup Jan, Lisa Lehnen, Thomas Girard, Anne-Laure Besnard, Sebastien J. Puechmaille, et Eric J. Petit. 2018. « Combining Noninvasive Genetics and a New Mammalian Sex-Linked Marker Provides New Tools to Investigate Population

Size, Structure and Individual Behaviour: An Application to Bats ». *Molecular Ecology Resources* 18 (2): 217-28. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12727.

Zarzoso-Lacoste, Diane, Pierre-Loup Jan, Lisa Lehnen, Thomas Girard, Anne-Laure Besnard, Sebastien J. Puechmaille, et Eric J. Petit. 2018. « Combining Noninvasive Genetics and a New Mammalian Sex-Linked Marker Provides New Tools to Investigate Population Size, Structure and Individual Behaviour: An Application to Bats ». *Molecular Ecology Resources* 18 (2): 217-28. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12727.

Zeale, Matt R. K., Roger K. Butlin, Gary L. A. Barker, David C. Lees, et Gareth Jones. 2011. « Taxon-Specific PCR for DNA Barcoding Arthropod Prey in Bat Faeces ». *Molecular Ecology Resources* 11 (2): 236-44. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02920.x.

Zenboudji, Saliha, Marc Cheylan, Véronique Arnal, Albert Bertolero, Raphael Leblois, Guillelme Astruc, Giorgio Bertorelle, et al. 2016. « Conservation of the endangered Mediterranean tortoise *Testudo hermanni hermanni*: The contribution of population genetics and historical demography ». *Biological Conservation* 195 (mars): 279-91. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.01.007.

Zhao, Shancen, Pingping Zheng, Shanshan Dong, Xiangjiang Zhan, Qi Wu, Xiaosen Guo, Yibo Hu, et al. 2013. « Whole-Genome Sequencing of Giant Pandas Provides Insights into Demographic History and Local Adaptation ». *Nature Genetics* 45 (1): 67-71. https://doi.org/10.1038/ng.2494.

Résumé: Le Grand rhinolophe est une espèce de chauve-souris insectivore qui entretient une proximité étroite avec l'être humain, notamment par le choix de ses gîtes dans des bâtis et de ses zones de chasses. En 2016, cette espèce de chauve-souris a été listée comme Vulnérable sur la liste rouge régionale de l'ex région Poitou-Charentes suite à l'observation d'un déclin depuis une dizaine d'années. Face à cette situation, l'objectif de cette thèse est de décrire la biologie des populations du Grand rhinolophe et de comprendre l'influence du paysage sur le fonctionnement de celles-ci. Plus précisément, il s'agit i) d'analyser si le paysage est un facteur pouvant limiter les flux de gènes entre populations, ii) d'identifier d'éventuelles populations vulnérables, et iii) de déterminer, à partir du spectre des proies du Grand rhinolophe, les paysages à conserver en priorité pour préserver les ressources clés de cette espèce. Dans un premier temps, l'approche de génétique des populations a permis de montrer l'existence d'une grande population stable à forte diversité génétique en France et jusqu'au Sud-Ouest des Pyrénées (Espagne). Nous avons observé un faible patron d'isolement par la distance entre ces colonies et de forts coefficient d'apparentement entre individus très éloignés, ce qui souligne la capacité du Grand rhinolophe à se déplacer sur de grandes distances. Cependant les colonies au Nord de l'aire de répartition ont montré une plus faible diversité génétique et une plus grande différenciation génétique avec les autres colonies, ce qui suggère qu'elles sont plus vulnérables à l'extinction. Dans un deuxième temps, nous avons développé une approche moléculaire d'étude du régime alimentaire à partir de guanos permettant une identification simultanée de l'espèce de chauve-souris et de ses proies - sans pénaliser l'amplification de l'ADN des proies par une suramplification de l'ADN du prédateur – à partir d'échantillons de guano. Notre analyse multicritère comparative de 12 couples d'amorces a permis de déterminer le protocole optimal pour étudier le régime alimentaire de chauves-souris insectivores selon le type d'échantillonnage, le type de colonie étudiée et les contraintes logistiques. Enfin, notre suivi de sept colonies tout au long de la saison de maternité a permis de montrer que le Grand rhinolophe se nourrit de proies beaucoup plus diverses qu'attendu d'après la littérature, mais que la majorité de celles-ci sont peu occurrentes. Les analyses de diversité révèlent une forte plasticité des stratégies de régime alimentaire selon la qualité du paysage environnant, la phénologie des proies, et les besoins énergétiques du Grand rhinolophe. Les espèces de proies les plus fréquemment détectées sont notamment associées à la présence de haies et de prairies permanentes, et quelques-unes aux milieux boisés. Ces éléments du paysage sont donc prioritairement à conserver pour non seulement assurer un maintien de la connectivité entre colonies et zones de chasse, mais également pour préserver les ressources clés du Grand rhinolophe. En conclusion, cette thèse a permis de délimiter des unités de conservation adaptées qui prennent en compte les processus génétiques. Bien que le paysage ne semble pas limiter la dispersion pour la reproduction chez cette espèce, certains éléments paysagers affectent fortement le régime alimentaire du Grand rhinolophe et doivent donc être pris en compte dans les stratégies de conservation.

Mots-clés : biologie de la conservation, génétique des populations, metabarcoding, *Rhinolophus ferrumequinum*

Abstract: The greater horseshoe bat is an insectivorous bat species that lives in close proximity to humans, including roosting sites and foraging areas. In 2016, this bat species was listed as Vulnerable on the regional red list of the former Poitou-Charentes region following the observation of a decline in the last ten years. In this context, the aim of this thesis is to describe the biology of the greater horseshoe bat populations and to understand the influence of landscape on their functioning. Specifically, it aims at i) testing whether landscape can limit gene flow between populations, ii) identifying potential vulnerable populations, and iii) determining, from the prey spectrum of the greater horseshoe bat, the landscape features that need to be preserved as a priority. First, the population genetic approach showed the existence of a large stable population with high genetic diversity from France to the south-west of the Pyrenees (Spain). We detected a weak pattern of isolation by distance between these colonies and we found strong coefficients of relatedness between very distant individuals. It points out the great ability of the greater horseshoe bat to disperse at long distances. However, the colonies located at the north of its range showed lower genetic diversity and greater genetic differentiation with the other colonies, suggesting that these northern colonies are more vulnerable to extinction. Then, we developed a molecular approach to study bat diet from guanos. It enables the simultaneous identification of the bat species and its prey - without penalizing the amplification of the prey DNA by an over-amplification of the predator DNA using guano samples. The resulting comparative multi-criteria analysis of the dozens of primer sets tested now provides a general guideline to determine the optimal protocol for studying the diet of insectivorous bats according to the type of sampling, the type of colony studied and logistical constraints. Finally, our survey of seven colonies throughout the maternity season showed that the greater horseshoe bat feeds on much more diverse prey than expected from the literature, but that the majority of the prey is poorly occurrent. Diversity analyses revealed a high plasticity of diet strategies, that seems to depend on the quality of landscape surrounding the colonies, the phenology of the prey, and the energetic needs of the greater horseshoe bat. The most commonly detected prey were associated with the presence of permanent hedgerows and grasslands, and others with woodlands. The landscape features are therefore of main importance, not only to maintain connectivity between colonies and foraging areas, but also to preserve the key resources of the greater horseshoe bat. In conclusion, this thesis made it possible to define suitable conservation units that take into account genetic processes. Although the landscape did not appear to limit breeding dispersal in this species, some landscape features seem strongly affect the diet of the greater horseshoe bat and should be considered in future design of conservation strategies.

Key-words: conservation biology, population genetics, metabarcoding, *Rhinolophus ferrumequinum*