

---

## Mémoire

**Auteur :** Delaunay, Eléa

**Promoteur(s) :** Magain, Nicolas; Michaux, Johan

**Faculté :** Faculté des Sciences

**Diplôme :** Master en biologie des organismes et écologie, à finalité spécialisée en biologie de la conservation : biodiversité et gestion

**Année académique :** 2021-2022

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/15930>

---

*Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**Quelle est la composition du régime alimentaire d'une espèce de chauves-souris insectivore tempérée (*Myotis emarginatus*) au cours de la période de mise bas et d'élevage des jeunes en Wallonie ?**



Mémoire présenté par **DELAUNAY Eléa**

En vue de l'obtention du grade de master en Biologie des Organismes et Écologie à finalité spécialisée Biologie de la Conservation : Biodiversité et Gestion

Laboratoire de génétique de la conservation

Promoteur : Dr. Johan MICHAUX

Co-promoteur : Dr. Nicolas MAGAIN

Encadrante : Chloé VESCERA

Année académique 2021-2022

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur MICHAUX de m'avoir acceptée au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir permis de faire un mémoire sur un sujet très intéressant, aux côtés de personnes solaires. Merci pour ses conseils et ses corrections.

Un grand merci également à Chloé VESCERA, qui m'a encadrée tout au long de mon travail. Elle a été auprès de moi de la première à la dernière étape, toujours avec le sourire et jamais à court d'encouragements. Merci de m'avoir amenée sur le terrain l'été dernier et de m'avoir appris ce qu'est le travail en laboratoire.

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire, avec qui j'ai eu la chance de travailler quelques mois et qui n'a pas hésité à m'aider lorsque j'en avais besoin.

Je remercie l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées sur le terrain l'an dernier et qui ont partagé avec moi leur amour et leurs connaissances à propos des chauves-souris.

Merci à mes amis avec qui j'ai partagé des moments de joie mais aussi des moments de stress tout au long de ces trois dernières années. Une attention particulière à Amélie qui a toujours su être à l'écoute et a eu les mots justes à chaque étape de mon travail.

Merci à Antoine qui n'a jamais peur de dire à qui veut l'entendre qu'il est fier de moi et qu'il est mon meilleur supporter.

Je remercie également ma famille et plus particulièrement mes parents qui ont été d'un grand soutien tout au long de mes études et qui m'ont toujours encouragée à faire ce que je voulais. Ils m'ont inculqué que la réussite se trouve dans l'épanouissement. Merci pour leurs relectures et leurs conseils toujours avisés.

## Résumé

Le murin à oreilles échanquées (*Myotis emarginatus*) est une espèce de chauves-souris que l'on retrouve sur le territoire wallon. Tout comme les autres chiroptères européens, il s'agit d'une espèce insectivore. Néanmoins, certaines interrogations se posent à propos des variations de son régime alimentaire au cours des saisons et selon l'environnement dans lequel elle se trouve. En effet, jusqu'à maintenant, peu d'études traitant de ce sujet ont été réalisées en climat tempéré.

L'objectif de cette étude a été d'apporter des connaissances supplémentaires quant à la variation de la composition des proies selon le mois et le lieu où la colonie s'est implantée (type de bâtiment et ouverture du milieu dans un rayon de 10km autour des colonies). Grâce aux informations fournies dans la littérature, 3 hypothèses ont été émises. La première concerne la variation du régime alimentaire au cours des 3 passages dans différentes colonies (variation temporelle), la seconde et troisième se focalisent sur le type de proies consommées selon le milieu où s'est implantée la colonie (variation spatiale). Nous avons pour prédiction que, lorsque les individus sont à proximité des étables, ils se nourrissent essentiellement de diptères tandis que leur régime alimentaire est composé d'une majorité d'araignées quand ils sont proches de forêts.

Pour répondre à ces hypothèses, une récolte de matière fécales a eu lieu entre la fin du mois de mai et mi-août 2021, dans 6 colonies wallonnes différentes. Cette période correspond à la saison de mise bas et d'élevage des juvéniles chez les chauves-souris européennes. Trois passages dans chaque colonie ont été effectués au cours de cette période. Ensuite, une approche génétique, le métabarcoding, a permis d'amplifier et de séquencer l'ADN présent dans nos échantillons. Pour cela, deux paires d'amorces, permettant l'amplification du gène d'intérêt COI, ont été choisies. Cette étude réalise ainsi une comparaison entre elles pour appuyer l'importance de leur complémentarité.

Ce travail a ainsi pu identifier 192 taxa présents dans les matières fécales récoltées. L'hypothèse 1 a pu être vérifiée puisque les lépidoptères et les araignées sont plus fréquents en session 1 et les coléoptères en sessions 1 et 2. En revanche, bien que des tendances visuelles semblaient corroborer les hypothèses 2 et 3, elles ont été rejetées puisqu'aucune confirmation statistique n'a pu être fournie. En outre, au-delà des objectifs initiaux et grâce à la biologie et phénologie des arthropodes, cette étude a apporté des connaissances supplémentaires sur les zones de chasses et types de proies ingérées par *M. emarginatus*. En effet, certaines proies ne sont pas au stade imago au cours de cette période. C'est notamment le cas pour des lépidoptères, indiquant que *M. emarginatus* chasse aussi des chenilles. De plus, des insectes nuisibles ont été identifiés, soulignant ainsi l'importance des prédateurs insectivores dans les milieux agricoles. Des arthropodes plus rares ou peu connus en Wallonie étaient également présents dans les échantillons, permettant de prouver leur présence dans cette région.

## Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	1
a) <i>Généralités sur les Chiroptères</i> .....	2
b) <i>Techniques de chasses des chauves-souris européennes</i> .....	2
c) <i>Cycle annuel des chauves-souris européennes</i> .....	3
d) <i>Menaces et protection</i> .....	4
<b>1. Présentation de l'espèce</b> .....	5
a) <i>Le murin à oreilles échancrées (Myotis emarginatus)</i> .....	5
b) <i>Etudes sur le régime alimentaire</i> .....	6
<b>2. Présentation de l'étude</b> .....	8
a) <i>Intérêt du mémoire</i> .....	8
b) <i>Objectifs et hypothèses</i> .....	8
<b>II. Matériel et Méthodes</b> .....	10
<b>i. Matériel</b> .....	10
<b>1. Récolte du matériel biologique, le guano</b> .....	10
<b>ii. Méthodes</b> .....	12
<b>1. Metabarcoding</b> .....	12
<b>2. Laboratoire</b> .....	13
a) <i>Extraction d'ADN</i> .....	13
b) <i>Préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit</i> .....	13
i. <i>Première amplification par PCR avec des amorces spécifiques du gène d'intérêt</i> ..	13
ii. <i>Vérification de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose</i> .....	16
iii. <i>Première purification</i> .....	16
iv. <i>Seconde amplification par PCR : fixation des index sur chaque échantillon</i> .....	16
v. <i>Seconde purification</i> .....	18
vi. <i>Quantification de l'ADN des échantillons</i> .....	18
vii. <i>Dilution et pooling</i> .....	19
<b>3. Séquençage et bio-informatique</b> .....	19
a) <i>Séquençage</i> .....	19
b) <i>Analyses bio-informatiques</i> .....	19
c) <i>Base de données BOLD</i> .....	20
<b>4. Traitement des fichiers</b> .....	20
a) <i>Filtrage par pourcentage de reads, pourcentage de similarité, suppression des séquences redondantes et assignation taxonomique selon la méthode de Razgour</i> .....	20
b) <i>Filtrage par contrôles</i> .....	21

c) Superficie des forêts et des terres agricoles .....	21
<b>5. Analyses statistiques .....</b>	<b>22</b>
<b>III. Résultats .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Filtrage des données .....</b>	<b>23</b>
a) Filtrages préliminaires.....	23
b) Filtrages des données « chordés ».....	24
i. Détection des échantillons de <i>Myotis emarginatus</i> .....	24
ii. Nombre d'échantillons de <i>Myotis emarginatus</i> par session .....	25
c) Filtrage des données « non-chordés ».....	25
i. Filtrage par pourcentage de reads, pourcentage de similarité, suppression des séquences redondantes .....	25
ii. Filtrage par contrôles .....	26
iii. Nombre d'échantillons restants par colonie après l'application des filtres, pour chaque couple de primers.....	27
<b>2. Impact du type de milieu sur le régime alimentaire .....</b>	<b>28</b>
a) Milieu forestier : Recouvrement dans les zones de chasse.....	28
b) Milieu agricole : Pression en bovins et présence de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	28
<b>3. Analyses de diversité des arthropodes.....</b>	<b>30</b>
a) Description des ordres d'arthropodes identifiés.....	30
b) Diversité alpha.....	32
i. Diversité des colonies de reproduction .....	32
ii. Diversité des sessions d'échantillonnage .....	33
iii. Indice de biodiversité alpha.....	35
c) Diversité bêta.....	35
<b>4. Comparaison des primers.....</b>	<b>37</b>
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Intérêt de l'étude .....</b>	<b>39</b>
<b>2. Intérêt de l'utilisation de plusieurs primers.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Impact des méthodes choisies sur nos résultats .....</b>	<b>41</b>
<b>4. Identification des proies .....</b>	<b>41</b>
a) Comparaison d'études .....	41
b) Taxa peu observés en Wallonie.....	41
c) Les ravageurs.....	42
<b>5. Diversité alpha.....</b>	<b>43</b>
a) Les colonies.....	43
b) Habitat des arthropodes .....	44

c) <i>Les sessions</i> .....	44
d) <i>Indice de biodiversité : Shannon</i> .....	45
<b>6. Diversité bêta</b> .....	<b>46</b>
a) <i>Indice de biodiversité : Morisita-Horn</i> .....	46
b) <i>Analyse en composante principale</i> .....	46
<b>7. Comparaison avec l'étude de Kervyn et al. 2012</b> .....	<b>47</b>
<b>8. Réponses aux hypothèses</b> .....	<b>48</b>
<b>9. Ouvertures vers des plans de gestion de l'espèce</b> .....	<b>48</b>
<b>V. Conclusion</b> .....	<b>50</b>
<b>VI. Bibliographie</b> .....	<b>51</b>
<b>VII. Annexes</b> .....	<b>60</b>

## Liste des figures

Page de présentation - Photographie d'un murin à oreilles échancrées (Quentin SMITS)	
Figure 1 : Mode de vie des chauves-souris européennes (LPO).....	3
Figure 2 : Aire de répartition du murin à oreilles échancrées (MNHN) .....	5
Figure 3 : Localisation des colonies de murins à oreilles échancrées (Myotis emarginatus) en Wallonie (Biodiversité Wallonie).....	6
Figure 4 : Sites de récolte du guano dans des colonies de Myotis emarginatus, Belgique....	10
Figure 5 : Colonie mixte de à Freÿr Cercle rouge = Myotis emarginatus ; Cercle bleu = Rhinolophus ferrumequinum, dont certains portant un jeune sur le ventre (Quentin Smits) ..	11
Figure 6 : Etapes de metabarcoding dans le cadre d'un prélèvement environnemental (Nature Metrics) .....	13
Figure 7 : Schéma de la construction des bibliothèques grâce à l'approche "two-step PCR" .....	14
Figure 8 : Schéma de la construction des bibliothèques grâce à l'approche "two-step PCR". PCR 2 : Ajout des tags pour identifier chaque échantillon. Adapté de Galan et al. (2017) .....	17
Figure 9 : Régions agricoles en Wallonie (Portail de l'agriculture Wallonne - SPW).....	29
Figure 10 : Nombre de taxa présents dans nos échantillons, pour chaque ordre d'arthropodes .....	31
Figure 11 : Barplot des ordres d'arthropodes présents dans chaque colonie.....	32
Figure 12 : Barplot des ordres d'arthropodes présents dans chaque session de chaque colonie .....	34
Figure 13 : Biplot - Analyse en composante principale des sessions sur les ordres arthropodes principaux du régime alimentaire de Myotis emarginatus (taxa présent chez plus de 10 individus).....	36
Figure 14 : Diagramme de Venn montrant le nombre de taxa distincts ou identiques identifiés par les 2 paires de primers.....	37
Figure 15 : Annexe 1 - Photographie de grands rhinolophes, Freÿr (Quentin Smits).....	60
Figure 16 : Annexe 2 - Etapes de la préparation à l'extraction et de l'extraction d'ADN( Snow Leopard Preservation Project).....	61
Figure 17 : Annexe 2 - Photographie de l'intérieur du QIACube.....	62
Figure 18 : Annexe 3 - Fichier CSV reçu après le séquençage .....	64
Figure 19 : Annexe 5 - Biplot - Analyse en composante principale des lieux sur les ordres arthropodes principaux du régime alimentaire de Myotis emarginatus (taxa présent chez plus de 10 individus).....	70

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Type de bâtiment Nombre d'échantillons de murin à oreilles échancrées par session d'échantillonnage et localité .....	12
Tableau 2 : Amorces utilisées pour la PCR 1 (Zeale et al., 2011 ; Galan et al., 2017) .....	15
Tableau 3 : Etapes de la PCR, optimisées d'après le guide d'utilisation KAPA BIOSYSTEMS .....	15
Tableau 4 : Etapes de la PCR 2.....	17
Tableau 5 : Composition et concentration de chaque puits des standards de tailles permettant de tracer la droite d'étalonnage.....	18
Tableau 6 : Nombre d'échantillons séquencés avec succès pour chaque primers .....	23



Tableau 7 : Nombre d'échantillons de murins à oreilles échancrées identifiés après filtrage	24
Tableau 8 : Extrait du fichier Excel reçu suite au séquençage, représentant les 3 taxa chordés les plus abondants dans l'échantillon O3-19	24
Tableau 9 : Nombre d'échantillons séquencés avec succès par les deux couples d'amorces (Galan et Zeale), pour chaque lieu de prélèvement et chaque session d'échantillonnage	25
Tableau 10 : Nombre de séquences classées selon la notation de Razgour pour chaque amorce	26
Tableau 11 : Nombre d'échantillons par colonie et pour chaque paire de primers après filtrage	27
Tableau 12 : Bâtiment d'implantation de la colonie et pourcentage de recouvrement forestier dans les zones de chasse de <i>Myotis emarginatus</i>	28
Tableau 13 : Identification de <i>Bos taurus</i> dans les échantillons	28
Tableau 14 : Comparaison entre la présence de <i>Stomoxys calcitrans</i> dans nos échantillons et l'importance du bétail, dans une même région agricole (excepté Orval, 3 échantillons)	30
Tableau 15 : Indice de Shannon sur les colonies	35
Tableau 16 : Indice de Shannon sur les sessions	35
Tableau 17 : Indice de Morisita-Horn entre les colonies	36
Tableau 18 : Indice de Morisita-Horn entre les sessions	36
Tableau 19 : Score de chaque variable sur les composantes principales 1 et 2 de l'ACP, valeur propre et variance expliquée	37
Tableau 20 : Liste des espèces retrouvées pour les deux primers	38
Tableau 21 : Nombre de taxa identifiés pour chaque ordre d'arthropodes et chaque paire de primers	39

## Liste des abréviations

COI = Cytochrome c oxydase sous-unité I  
ME = Murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*)  
NGS = Next Generation Sequencing (= séquençage à haut débit)  
Pico = Réactif picogreen  
Rf = Grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*)  
Tris = tris(hydroxyméthyl) aminométhane

## I. Introduction

En Wallonie, les terres agricoles représentent plus de 40% du territoire. Alors que nous avons pu observer un abandon de certaines exploitations au cours de ces vingt dernières années, d'autres ont, quant à elles, augmenté en termes de superficie, avec une intensification des productions, devenue possible avec la mécanisation (Utilisation de l'espace agricole, 2020). En effet, l'accroissement de la population humaine a nécessité une adaptation rapide des techniques agricoles pour que les rendements augmentent au même rythme. Cette intensification reste d'actualité et risque de se maintenir dans le futur puisqu'une stabilisation de la population humaine ne semble pas être la tendance attendue pour les années à venir (Pison, 2019). Allant de pair avec l'emploi de machines plus performantes pour accroître les rendements, l'arrivée de pesticides (fongicides, herbicides, insecticides, nématocides, ...) pour lutter contre les indésirables des récoltes s'est mise en place (Aubertot et al., 2005). En effet, à l'échelle mondiale, on considère que plus de 40% des récoltes sont attaquées par divers nuisibles, provoquant de lourdes pertes alimentaires et économiques (Les services écosystémiques en Wallonie, s.d.). Seulement, le problème qui se pose avec l'emploi de ces produits phytosanitaires réside dans les effets indésirables qu'ils provoquent puisqu'en plus d'avoir un impact avéré sur la santé humaine, ils sont tout aussi néfastes pour l'environnement (Barouki, 2013). Leurs actions sont multiples étant donné qu'ils peuvent s'infiltrer dans les sols, être emportés dans l'eau par ruissellement et se volatiliser dans l'air (Alix et al., 2005). Cela signifie que des incidences défavorables touchent aussi des espèces non ciblées (van der Werf, 1997). Dans le cadre des insecticides par exemple, certaines espèces insectivores se nourrissant de ravageurs se retrouvent dans des aires de chasse perturbées, avec un nombre de proies devenu plus limité. De nombreuses études actuelles pointent du doigt ces pratiques qui sont en partie responsables du déclin des populations d'oiseaux des milieux ouverts en Europe (Hallmann et al., 2014 ; Bowler et al., 2019). Parmi les victimes indirectes, nous pouvons également citer les chauves-souris européennes, dont le régime alimentaire se compose principalement d'insectes. En plus du déclin des populations de proies, il est avéré que certains pesticides peuvent affecter leur technique de chasse, en les empêchant de s'orienter correctement suite à une exposition prolongée à certaines toxines (Wu et al., 2020). De plus, certains produits comme ceux contenant des composés organochlorés, dont l'utilisation est devenue plus restreinte suite aux conséquences néfastes qu'ils peuvent engendrer (bioaccumulation et persistance dans l'environnement) (Aligon et al., 2010), ont un impact négatif bien connu sur les chauves-souris de tous les âges (Nabet, 2005). Ces composés, solubles dans les graisses, peuvent se propager dans tout l'organisme et ainsi causer divers dérèglements comme une perturbation endocrinienne, des problèmes dans le stockage des graisses, un déclin du succès reproducteur voire la mort de l'individu (Nabet, 2005 ; Carravieri et Scheifler, 2012). C'est pourquoi certaines études préconisent de ne pas utiliser de pesticides lors de la période de lactation de ces mammifères puisque des toxines peuvent se transmettre facilement de la mère au jeune voire de la mère au fœtus en période prénatale, entraînant la mise-bas d'individus mort-nés ou trop fragiles pour pouvoir survivre ou se reproduire (Puig-Monserrat et al., 2020 ; Carravieri et Scheifler, 2012). A contrario, l'abandon des terres agricoles semble être tout aussi néfaste puisque la plupart des espèces de chauves-souris se nourrissent en partie dans un milieu ouvert ou semi-ouvert (Ancillotto et al., 2017).

Suite aux effets indésirables des pesticides, une alternative a vu le jour il y a quelques décennies : la lutte biologique. Celle-ci consiste en la réduction du nombre de nuisibles grâce

à l'introduction d'espèces non indigènes, généralement prédatrices des ravageurs, dans le milieu d'intérêt (Jourdeuil et al., 1991). Encore une fois, la démarche consistant à introduire des espèces peut parfois dégénérer, laissant le champ libre à ces espèces exotiques d'envahir leur nouvel habitat, au détriment d'espèces indigènes (Hautier, 2003). C'est pourquoi le meilleur compromis pour la nature semble être l'inaction, en laissant la chaîne alimentaire jouer son rôle avec des espèces prédatrices indigènes. Une seconde option serait de retourner à des pratiques agropastorales traditionnelles, avec des petits troupeaux de bétail permettant de ne pas modifier le paysage de façon drastique et d'attirer certains insectes pouvant être mangés par leur prédateurs naturels (Ancillotto et al., 2017). A l'heure actuelle, nous n'avons que peu d'informations sur le rôle que pourraient avoir les chauves-souris dans la lutte biologique, en région Wallonne. L'objectif de ce mémoire sera d'obtenir de nouvelles données au niveau régional sur cet intérêt en agronomie, grâce à l'étude du régime alimentaire d'une espèce de chauves-souris autochtone à nos régions, le murin à oreilles échanquées (*Myotis emarginatus*).

### a) Généralités sur les Chiroptères

Le murin à oreilles échanquées est une espèce que l'on retrouve principalement en Europe. Tout comme le reste des chauves-souris, elle appartient à l'ordre des Chiroptères. Ce dernier, décrit dès 1779, est placé dans la classe des mammifères. Au sein de cette classe, ce sont les seuls qui ont la particularité de voler et c'est le second clade le plus représenté après les rongeurs en termes d'espèces. En effet, on décompte environ 1400 espèces de chauves-souris à travers le monde (Keck et al., 2021). Parmi elles, 24 ont été observées en Wallonie. Les deux grandes familles présentes dans cette région sont les Rhinolophidea et les Vespertilionidea. Malgré une grande diversité des tailles sur le globe, dont le record est détenu par le renard volant (*Acerodon jubatus*) pouvant atteindre 1,70 mètre d'envergure, les chauves-souris wallonnes ne dépassent généralement pas les 50 cm en vol (Kirsch et al., 2002 ; Kervyn et al., 2022).

Grâce à la diversité de cet ordre, une longue liste peut être établie quant aux services écosystémiques rendus par les chauves-souris : la pollinisation et la dispersion des graines par les espèces frugivores, l'attraction touristique, notamment avec des visites en grottes, et l'augmentation de la fertilité des sols et l'apport de nutriments grâce au guano (Kasso et Balakrishnan, 2013). Elles servent également de modèles pour des recherches dans des domaines variés : en bioacoustique pour comprendre l'utilisation de leur sonar, en médecine et virologie puisqu'elles ont permis le développement de traitements en médecine humaine et en aéronautique grâce à leur capacité de vol (Keck et al., 2021). Enfin, elles sont utilisées comme des espèces bio-indicatrices dans certains milieux. Cela signifie que leur sensibilité face aux perturbations environnementales permet de traduire la qualité d'un milieu. On peut déduire que ce dernier est en bonne santé si l'espèce y est présente et abondante. Dans le cas des chauves-souris, elles sont de bonnes indicatrices concernant les changements climatiques et plus particulièrement la variation des températures, la disponibilité en eau ou encore la présence de contaminants dans l'environnement (Russo et al., 2021).

### b) Techniques de chasses des chauves-souris européennes

Malgré la vaste gamme de régimes alimentaires au sein de cet ordre, l'ensemble des espèces retrouvées en Europe est insectivore. Pour attraper leurs proies, la plupart des espèces utilisent l'écholocation. C'est une technique consistant à émettre des ultrasons par la

bouche ou les narines, sons qui vont rencontrer un obstacle avant de revenir à l'émetteur (Plecotus, s.d.). Cela permet d'informer le chasseur de la présence d'une proie, de sa taille, de la direction et de la distance qui la sépare de celui-ci (Chauves-souris du Canada, s.d.). Cependant, ce n'est pas la seule technique employée chez les Chiroptères puisque les oreillards (*Plecotus sp.*), par exemple, peuvent chasser à l'ouïe à l'aide de leurs grandes oreilles (Kervyn et al. 2020). Les individus sont également capables de chasser grâce à leur vue (Plecotus, s.d.).

### c) Cycle annuel des chauves-souris européennes

Dans nos régions, ces individus nocturnes ont un mode de vie variable selon les saisons (figure 1).

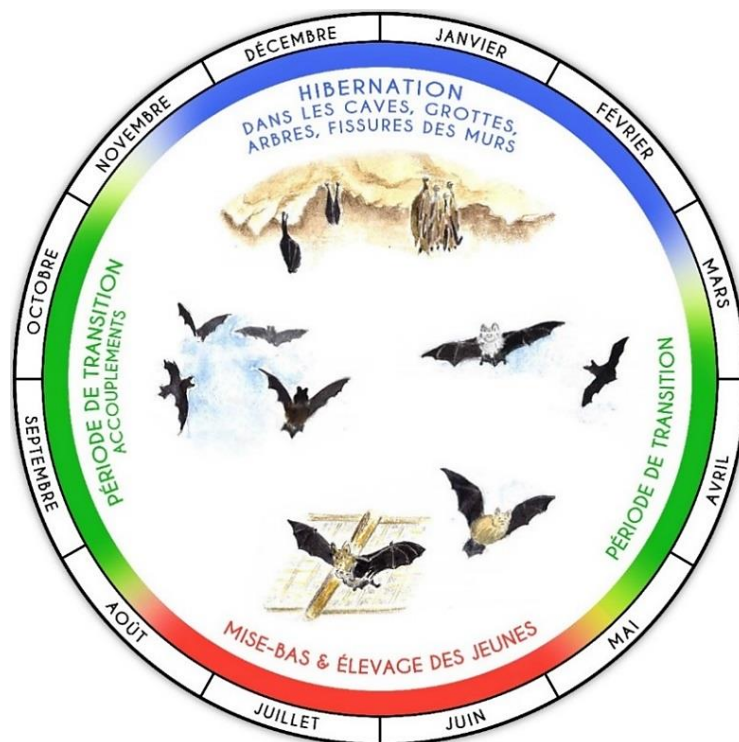


Figure 1 : Mode de vie des chauves-souris européennes (LPO)

En effet, dès le printemps, les chauves-souris sortent d'hibernation et vont quitter leur gîte d'hiver pour récupérer de l'énergie en chassant (figure 1 : période de transition de mars à mai, vert). Au début de l'été, les femelles se réunissent en colonies dans des gîtes d'été, afin de mettre bas et de s'occuper de leurs jeunes. Les types de gîtes sont variables d'une espèce à l'autre puisqu'il peut s'agir de grottes, d'arbres ou encore de constructions humaines (figure 1 : mise-bas & élevage des jeunes, rouge). Avant la fin de la saison, certains jeunes deviennent indépendants et quittent la colonie. Les adultes vont, de leur côté, entrer en période de swarming, terme emprunté à l'anglais qui signifie "essaimage" (figure 1 : accouplements, vert). Cela signifie que mâles et femelles vont se rejoindre pour s'accoupler avant le retour de l'hiver, saison qui leur demande d'hiberner puisque la nourriture se fait rare. Dans certaines situations, les jeunes restent auprès de leur mère et se rendent sur le site de swarming. Cela pourrait être une forme d'apprentissage pour les années futures (Chauves-souris du Canada, s.d.). Ce lieu de rassemblement est important pour ces espèces puisqu'il peut également faire office de gîte d'hiver quelques mois plus tard (van Schaik et al., 2015). Suite à l'accouplement, la femelle

va bloquer et conserver les spermatozoïdes dans son appareil génital pour qu'ils ne rentrent en contact avec l'ovule qu'à la sortie d'hibernation, au printemps suivant. C'est ce que l'on appelle l'ovulation différée. Cela permet de donner naissance à un jeune à la période la plus propice pour qu'il survive tout en protégeant la femelle d'une potentielle mort suite à une utilisation intensive d'énergie lors de son hibernation (van Vyve, 2021). Lors de la période la plus froide de l'année (figure 1 : hibernation, bleu), le choix de s'installer dans des cavités permet aux individus de s'offrir une protection puisque les températures y restent plus ou moins stables toute l'année et de jour comme de nuit (Natagora, s.d.). D'autres chauves-souris préfèrent, quant à elles, utiliser cette énergie en migrant plus au Sud pour ne pas à avoir à affronter ces températures basses. C'est le cas, par exemple, de la noctule commune (*Nyctalus noctula*) et de la pipistrelle de Nathusius (*Pipistrellus nathusii* ; Natagora, s.d.).

#### d) Menaces et protection

Malgré leurs bénéfices, à l'heure actuelle, de nombreuses populations de chiroptères sont en déclin partout dans le monde. La Wallonie ne fait pas exception puisqu'une comparaison de recensements de 1939 à 1952 et de 1995 à 2008 a permis de remarquer un déclin marqué chez plusieurs espèces comme le grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*), le petit rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) et la barbastelle commune (*Barbastella barbastellus*) sur le territoire (Kervyn et al., 2009). Parmi les principales menaces pesant sur ces espèces, on retrouve la diminution de leurs gîtes, l'augmentation de l'utilisation des pesticides en agriculture et les préjugés qui persistent sur elles (Eurobats, s.d.). En effet, malgré les apports positifs que rendent les chauves-souris aux êtres humains, ces derniers ont de nombreux avis négatifs sur elles. Parmi les idées reçues qui sont exprimées le plus fréquemment, on peut retrouver la comparaison aux vampires qui fait référence aux trois espèces hématophages, appartenant toutes à la famille des Phyllostomidae, présentes uniquement en Amérique du Sud, à savoir *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* et *Diphylla ecaudata* (Keck et al., 2021).

Afin de remédier à ces jugements négatifs et au déclin de certaines populations, des actions de protection et de sensibilisation sont menées et de nombreuses espèces ont obtenu un statut de protection grâce à diverses lois. En effet, au sein de l'Union européenne, l'entière des espèces est protégée grâce à l'Annexe II de la « Convention de Berne relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe », convention internationale de 1979 et à l'annexe II de la « Convention sur la conservation des espèces migratrices », plus connue sous le nom de « Convention de Bonn », datant de la même année. En Wallonie, l'Annexe IIa du « Décret relatif à la conservation des sites Natura 2000 ainsi que de la faune et de la flore sauvages » de 2001, issu des directives européennes 79/409/CEE « Oiseaux » et 92/43/CEE « Faune-Flore-Habitats », de 1992 protège également les chauves-souris. Il offre un statut de protection plus strict aux chauves-souris puisqu'il comprend l'interdiction de capturer, de perturber et de tuer des individus. Il est également fait mention d'une protection de leur habitat, incluant leurs différents gîtes et terrains de chasse (Plecotus, s.d. ; Kervyn et al., 2022).

En plus de ces lois, des Asbl comme Natagora, et plus particulièrement son pôle de protection des chauves-souris, Plecotus, ont mis en place une série d'actions pour la protection des chauves-souris. Ils réalisent notamment des suivis, inventaires et actions de protection

pour les Chiroptères (Plecotus, s.d.). De plus, quelques interventions concrètes ont vu le jour dans la région grâce à des partenariats entre différents acteurs de la conservation.

## 1. Présentation de l'espèce

### a) Le murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*)

Dans le cadre de ce mémoire, l'intérêt se porte sur une espèce en particulier : le murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*). Tout comme les autres murins, il appartient à la famille des Vespertilionidés. À l'âge adulte, les individus pèsent entre 7 et 15 grammes et ont une envergure qui peut atteindre les 245 mm. Leur aire de répartition s'étend dans tout le bassin méditerranéen en s'étirant, à l'est, jusqu'en Iran. La latitude nord la plus haute est située en Belgique (figure 2).

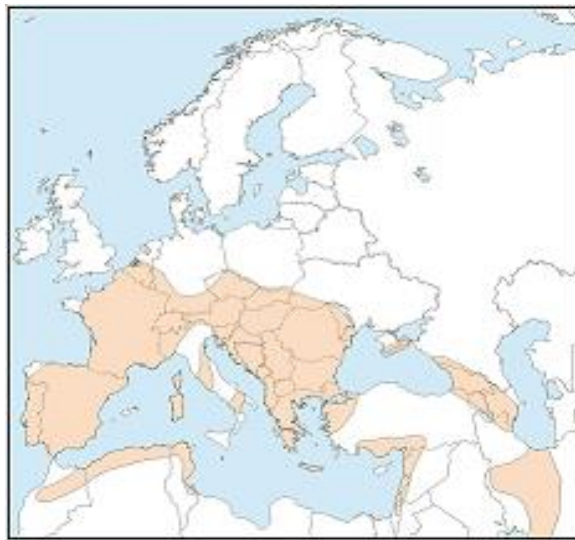


Figure 2 : Aire de répartition du murin à oreilles échancrées (MNHN)

C'est une espèce dont les colonies rassemblent généralement entre 50 et 600 femelles et jeunes mais il n'est pas rare de retrouver des groupes avec un nombre d'individus encore plus élevé. On peut les observer dans les combles de constructions humaines ou dans des cavités aux latitudes plus basses, parfois accompagnés de grands rhinolophes (*Rhinolophus ferrumequinum* ; Annexe 1). Les murins à oreilles échancrées mâles semblent quant à eux solitaires (Frantz et al., 2022). Cette espèce se nourrit principalement d'araignées, d'opilions, de diptères, de lépidoptères, de névroptères, d'hémiptères et de coléoptères (Bensettiti et Gaudillat, 2004). Les individus chassent dans des milieux variés tels que des étables, des forêts, des vergers ou encore des jardins, situés à 10km maximum de son gîte. Leur technique de chasse appelée « glanage du feuillage » leur permet d'ingérer des proies qui ne sont pas en mouvement (Kervyn et al., 2022). Les araignées peuvent être prélevées directement sur leur toile et les insectes lorsqu'ils sont posés. Cette espèce a ses gîtes d'hiver (les grottes naturelles et cavités artificielles telles que d'anciennes carrières souterraines, tunnels, caves, anciens fours à chaux, ...) et d'été (principalement des combles ou des étables) peu distants l'un de l'autre (Bensettiti et Gaudillat, 2004).

Tout comme les autres chauves-souris de l'Union Européenne, cette espèce a un statut de protection strict repris dans les différentes annexes des conventions et décrets entrées en vigueur en Wallonie entre 1979 et 2001 (Kervyn et al., 2022 ; Eurobats, s.d.). Elle apparaît

dans la liste rouge de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) en « LC = Least Concern = Préoccupation mineure » au niveau mondial mais en « NT = Near Threatened = Quasi menacée » en Wallonie (Smits & van Vyve, 2021).

Actuellement, les principales menaces qui pèsent sur *Myotis emarginatus* sont la fragmentation de son habitat et l'intensification de l'agriculture (Eurobats, s.d. ; Kervyn et al., 2022). Cette fragmentation a entraîné un déclin des populations en Wallonie entre 1960 et 1990 puisque la Belgique est l'un des pays européens dont la scission du paysage est la plus marquée (Frantz et al., 2022). En regardant la figure 3 ci-dessous, on remarque que le nombre de colonies connu a tout de même augmenté entre 1930 et 2019 dans la région. En revanche, ce sont des observations à prendre avec parcimonie. En effet, celles-ci peuvent s'expliquer par des modifications qui ont eu lieu dans les recensements au cours du temps : ils ne sont pas forcément effectués tous les ans, de nombreux volontaires non scientifiques rejoignent l'équipe chaque année et de plus en plus d'endroits sont accessibles et inspectés, ce qui peut aller de pair avec l'augmentation du nombre de populations. (Nyssen et al., 2017).

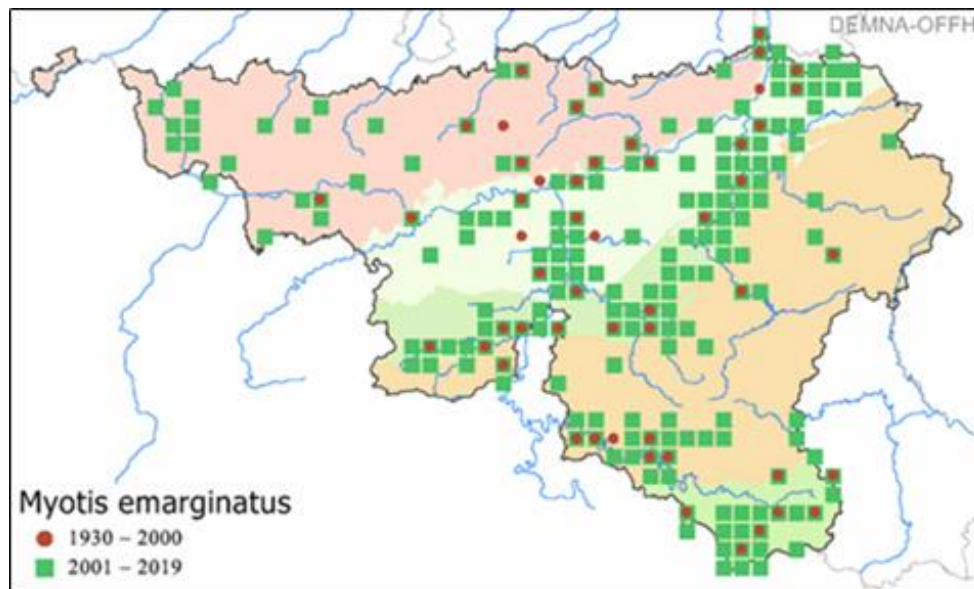


Figure 3 : Localisation des colonies de murins à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) en Wallonie (Biodiversité Wallonie)

En définitive, à l'heure actuelle, peu d'informations sont connues dans notre région à propos de la tendance que semblent suivre les populations. En effet, elles sont parfois considérées comme « stables » (Kervyn et al., 2022), parfois plus alarmistes puisque l'on décrit un déclin qui persiste depuis 50 ans (Plecotus, s.d.). Cependant, l'espèce est passée de "En danger" en Wallonie en 2007 à "Quasi menacée" en 2021 ce qui semble être plutôt encourageant. Cette modification est due à des recensements (hivernaux et en colonies), des captures et à des données acoustiques ponctuelles effectués pour cette espèce (Smits & van Vyve, 2021).

#### b) *Etudes sur le régime alimentaire*

Si le choix s'est porté sur *M. emarginatus*, c'est pour l'intérêt que l'on porte à son double régime alimentaire qui semble s'être établi en parallèle avec le développement de terres agricoles, et plus particulièrement avec la construction de fermes. Cela signifie que l'Homme aurait pu influencer le régime alimentaire de certains individus au cours du temps. En effet,

d'après une étude réalisée en Belgique (Kervyn et al., 2012), il semblerait qu'une dualité existe dans leur régime alimentaire, qui différerait selon la localisation du gîte d'été. D'un côté, les colonies s'établissant à proximité des forêts apparaissent se nourrir essentiellement d'araignées et, de l'autre, les colonies proches des étables se nourriraient plus de diptères des genres *Musca* et *Stomoxys*, et plus particulièrement, les espèces *Musca autumnalis* et *Stomoxys calcitrans* que l'on retrouve aisément dans les étables, au contact du bétail (Kervyn et al., 2012 ; Steck et Brinkmann, 2006). Ces deux espèces sont en partie connues pour être des vecteurs de pathogènes chez les bovins. Parmi ces pathogènes, on retrouve la bactérie *Besnoitia besnoiti*, provoquant la besnoitiose bovine qui peut, entre autres, provoquer une diminution de la production laitière (Sharif, 2018).

Actuellement, plusieurs études effectuées dans le bassin méditerranéen et dans le Sud de l'Allemagne mettent en évidence la présence d'un important pourcentage de ces diptères dans la composition du guano analysé chez *Myotis emarginatus* (Steck et Brinkmann, 2006 ; Vallejo et al., 2019). Cependant, ce n'est pas le seul ordre fréquemment rencontré puisqu'une comparaison de 5 études effectuées en Europe (Steck et Brinkmann, 2006 ; Goiti et al., 2011 ; Kervyn et al., 2012 ; Vallejo et al., 2019 ; Alberdi et al., 2020) a mis en évidence des présences de diptères, lépidoptères, araignées, coléoptères et névroptères. Dans l'étude réalisée par Kervyn et al. (2012), seule étude menée en Wallonie, les 3 ordres prédominants sont les diptères, les lépidoptères et les araignées. L'ensemble de ces ordres est cohérent avec le régime alimentaire de l'espèce tel que synthétisé dans le tome 7 des "Cahiers d'Habitats Natura 2000", traitant des espèces animales (Bensettiti et Gaudillat, 2004).

De par leur mode de vie insectivore, les chauves-souris européennes apportent de nombreux bénéfices à l'Homme et plus particulièrement dans le domaine de l'agriculture puisqu'elles se nourrissent en partie de ravageurs des récoltes (Aizpurua & Alberdi, 2020). En effet, une série d'études réalisées sur le régime alimentaire des chauves-souris insectivores ont su établir, grâce à la récolte de guano, l'identité et la proportion des proies ingérées, comprenant notamment de nombreuses d'espèces ravageuses.

Parmi les ravageurs régulièrement consommés par ces mammifères en Europe, on retrouve plusieurs espèces de lépidoptères nocturnes, des diptères comme le moucheron asiatique (*Drosophila suzukii*), des coléoptères dont *Lissorhoptrus oryzophilus* et des hyménoptères (Andriollo et al., 2021 ; Montauban et al., 2021 ; Puig-Monserrat et al., 2020). Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées dans d'autres parties de l'Europe, sous des climats méditerranéens. Il existe actuellement peu de résultats analogues sous des climats plus tempérés (tels qu'en Wallonie) en Europe, à l'exception d'une étude récente, de 2021, sur les ravageurs dans les vergers wallons. Ce travail a permis de découvrir que, dans notre région, la pipistrelle commune (*Pipistrellus pipistrellus*) joue un rôle majeur sur le déclin des populations de *Drosophila suzukii* (Dekeukeleire et al., 2021). Cette dernière est une espèce originaire du Sud-Est de l'Asie qui a été introduite en 2008 en Europe, au travers du commerce international effectué par les Hommes. Ce diptère s'est rapidement étendu sur tout l'Ouest du continent européen. Les larves de *D. suzukii* se nourrissent de la chair des fruits, induisant une diminution des rendements dans les vergers, ce qui engendre un problème économique important au niveau européen (Cini et al., 2012).



## 2. Présentation de l'étude

### a) Intérêt du mémoire

L'intérêt de ce mémoire est porté sur la variation du régime alimentaire des colonies de *Myotis emarginatus* en se focalisant sur l'ADN retrouvé dans du guano grâce à la technique du metabarcoding, méthode privilégiée actuellement lors d'études sur le régime alimentaire (Andriollo et al., 2018, Vallejo et al., 2019 ; cf. II. Matériel et Méthodes). Cette recherche va nous permettre d'étudier la composition du régime alimentaire des individus et de la comparer entre les localités et au cours de la période de formation des colonies. L'ensemble de ces observations nous mène à la problématique suivante :

**« Quelle est la composition du régime alimentaire d'une espèce de chauves-souris insectivore tempérée (*Myotis emarginatus*) au cours de la période de mise bas et d'élevage des jeunes en Wallonie ? »**

Lors de la recherche dans la littérature, un seul article sur le régime alimentaire de *Myotis emarginatus* a été rédigé en Wallonie (Kervyn et al., 2012). Comme mentionné dans le point 1.b) de l'introduction, les autres études européennes sur le régime alimentaire du ME ont été effectuées sous un climat méditerranéen. Cependant, cette étude de 2012 n'a intégré qu'un nombre restreint de sites et n'a été basée que sur une identification morphologique des proies dans le guano, rendant ces identifications peu précises. En comparaison de l'étude effectuée par Kervyn et al (2012), notre étude sera effectuée sur deux fois plus de colonies de reproduction, distribuées sur une aire géographique plus vaste. Les outils génétiques utilisés dans notre mémoire apporteront également une information beaucoup plus précise, par rapport aux approches précédemment effectuées.

Notre étude pourrait ainsi constituer un point de référence pour cette même région, étant donné le lieu, l'espèce cible, l'emploi de la génétique et les colonies choisies (figure 6, page 9).

### b) Objectifs et hypothèses

Le **premier objectif** (I) de cette étude est de réaliser une analyse poussée de la composition du régime alimentaire de *Myotis emarginatus*, grâce à l'emploi du metabarcoding sur des échantillons de guano, afin d'évaluer si le type de proies ingérées par ce mammifère diffère au cours de la période de mise bas et d'élevage des jeunes (trois dates de prélèvement estivales). Cela nous permet d'émettre cette première hypothèse :

Hypothèse I1 = La composition du régime alimentaire du murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) diffère au cours de la période de mise bas et d'élevage des jeunes.

Ensuite, en lien avec la localisation géographique des colonies de reproduction, et sur base des mêmes échantillons, le **second objectif** (II) de ce mémoire sera de vérifier s'il existe une variation en termes d'alimentation selon l'environnement des individus. Grâce à la littérature disponible, nous avons connaissance que la composition du guano pourrait différer selon le recouvrement forestier et l'utilisation d'étables comme zones de chasse de notre espèce d'intérêt (cf. l'étude de Kervyn et al., 2012).

L'ensemble de ces informations permet de formuler les hypothèses suivantes :

Hypothèse II1 = Les colonies de murins à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) à proximité d'étables ou de bâtiments avec du bétail se nourrissent essentiellement de diptères.

La vérification de la chasse dans des infrastructures agricoles sera réalisée grâce à l'identification de traces d'ADN appartenant au bétail dans le guano des murins à oreilles échancrées. En effet, les murins à oreilles échancrées, en se nourrissant de diptères piquant ou se nourrissant sur les bovins, porteront ces traces d'ADN de *Bos taurus*. Ces chauves-souris joueraient dès lors un rôle dans la réduction de la population de ces insectes.

Hypothèse II2 = Les colonies de murins à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) établies à proximité des forêts se nourrissent essentiellement d'araignées.

Finalement, un **troisième objectif** (III), purement méthodologique, visera à comparer deux paires d'amorces (ciblant deux régions du gène d'intérêt), souvent utilisées dans le cadre d'études sur le régime alimentaire des chauves-souris. Cette comparaison permettra de confirmer ou non l'intérêt d'une telle stratégie pour une étude précise du régime alimentaire d'une espèce de mammifère.

## II. Matériel et Méthodes

### i. Matériel

#### 1. Récolte du matériel biologique, le guano

La récolte du matériel biologique a été réalisée de fin mai à mi-août 2021. Elle a porté sur 6 colonies de reproduction wallonnes de *Myotis emarginatus*. Parmi elles, 3 sont des colonies simples, où l'on ne retrouve que le murin à oreilles échancrées : Rochefort, Aubel et Aulne. Les 3 autres colonies sont mixtes puisqu'une espèce supplémentaire est présente, à savoir le grand rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*). Celles-ci se situent à Orval, Freÿr et Durbuy (figure 4). Elles ont été choisies par rapport au nombre d'individus présents (connu grâce à des recensements annuels menés par Plecotus), leur localisation (le but étant d'avoir des colonies espacées pour travailler à l'échelle de la Wallonie) et l'accessibilité au gîte. Chaque colonie a été visitée 3 fois, à environ 4 semaines d'intervalles. Ces 3 visites seront reprises sous le terme de "Session 1, 2 et 3" dans le reste de ce manuscrit. De plus, la colonie de Rochefort a fait l'objet d'un article scientifique similaire il y a 10 ans (Kervyn et al., 2012). Ceci permettra de réaliser une comparaison entre les échantillons/protocoles passés et actuels.

Emplacements des colonies de murins à oreilles échancrées prospectées en Wallonie, 2021

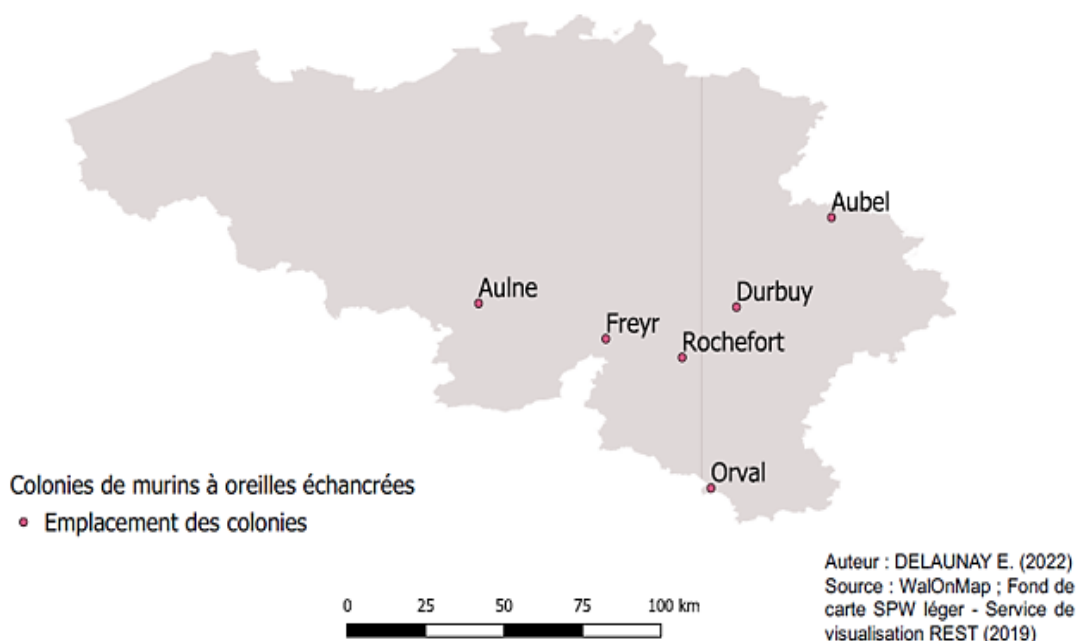


Figure 4 : Sites de récolte du guano dans des colonies de *Myotis emarginatus*, Belgique

Dans les colonies de reproduction, entre 2 et 4 caisses transparentes, de 2 tailles différentes (57 x 79 cm et 28 x 39 cm), ont été installées au sol de chaque bâtiment afin de récolter du guano (tableau 1). Ces caisses ont été posées 1h avant le coucher du soleil et récupérées 2h après le lever du soleil le jour suivant. Ces horaires ont été choisis afin de minimiser le dérangement des chiroptères en pleine journée, durant leur période de repos et

de maximiser la qualité de l'ADN dans le guano en le récoltant le plus rapidement possible. Le nombre et la disposition des caisses dépendant fortement de l'agencement de chaque gîte, nous n'en ferons pas le détail ici. Dans les colonies mixtes (*Myotis emarginatus* et *Rhinolophus ferrumequinum*, figure 5), l'appartenance du guano à la bonne espèce a été déterminée par séquençage du fragment du gène Cytochrome c oxydase sous-unité I (COI), comme proposé par Galan et al. (2017), permettant à la fois la détection des proies ingérées et l'identification de l'espèce de chauve-souris échantillonnée.

Dans ces caisses, des papiers buvards de 5x5 cm ont également été disposés. Deux fragments de ces buvards ont été récoltés et analysés de manière similaire aux échantillons de guano, afin de servir de contrôles négatifs d'échantillonnage. Cette stratégie permet d'évaluer la présence d'éventuelles contaminations environnementales.

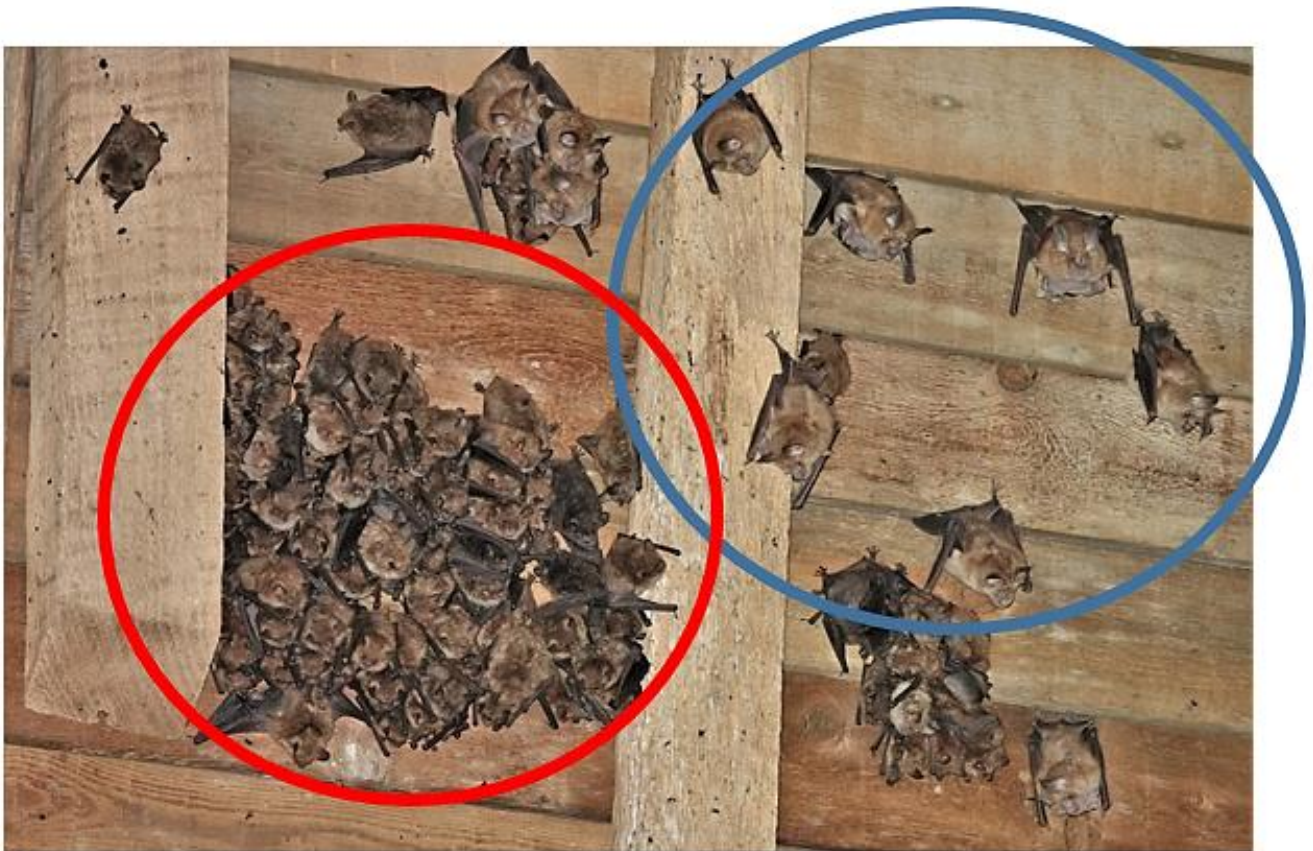


Figure 5 : Colonie mixte de à Freÿr Cercle rouge = *Myotis emarginatus* ; Cercle bleu = *Rhinolophus ferrumequinum*, dont certains portant un jeune sur le ventre (Quentin Smits)

Chaque échantillon de guano a été récolté grâce à des pinces stériles à usage unique et conservé individuellement dans 1 mL d'éthanol pur, technique privilégiée lors de capture en terrain (Ando et al., 2020). Suite à cette récolte, 292 échantillons ont été analysés en laboratoire et 200 ont été identifiés, grâce au séquençage, comme appartenant au murin à oreilles échançrées (tableau 1).

Lieu	Type de bâtiment colonie	Session	Échantillons analysés
Aubel	Ferme	1	13
		2	12
		3	12
Aulne	Abbaye	1	12
		2	13
		3	12
Durbuy	Eglise	1	7
		2	8
		3	5
Freÿr	Château	1	22
		2	18
		3	26
Orval	Abbaye	1	0
		2	1
		3	3
Rochefort	Maison	1	12
		2	13
		3	11

Tableau 1 : Type de bâtiment Nombre d'échantillons de murin à oreilles échancrées par session d'échantillonnage et localité

Entre 11 et 13 échantillons de guano ont été récoltés par session pour les 3 colonies exclusivement composées de murins à oreilles échancrées. Un nombre plus variable d'échantillons a été analysé pour les 3 colonies mixtes puisque certains échantillons appartenaient au grand rhinolophe (cf. Résultats ; 1.b) i. Détection des échantillons de *Myotis emarginatus*).

## ii. Méthodes

### 1. Metabarcoding

Au cours des étapes du metabarcoding (figure 6), les fragments d'intérêt, une fois identifiés par des amorces spécifiques, sont amplifiés par PCR. Ils sont ensuite séquencés avant d'être confrontés à des bases de données pour déterminer à quelle espèce ils appartiennent (Aizpurua et al., 2018). Il s'agit d'une méthode non invasive puisqu'il ne faut pas nécessairement réaliser de captures pour récupérer les matières fécales des individus.

La méthode du metabarcoding est particulièrement adaptée dans le cadre de notre recherche car elle permet d'identifier des fragments d'ADN présents, même en d'infimes quantités, dans le guano d'un individu. Les deux barcodes employés ici (décrits dans la section 2.b) i. Première amplification par PCR avec des amorces spécifiques du gène d'intérêt) sont tous deux des fragments du gène mitochondrial Cytochrome c oxydase sous-unité I (COI), couramment utilisé dans le cadre d'études sur le régime alimentaire puisqu'il comporte différents avantages. Ce gène comporte une grande variabilité interspécifique mais une faible variabilité intraspécifique, permettant une discrimination et une identification taxonomique

précise des proies, grâce au design d'amorces dites « universelles » fonctionnant sur un grand nombre d'espèces (Warot, 2018 ; Hebert et al., 2003). De plus, l'un des deux barcodes employés (issu de Galan et al. 2017) permet à la fois la détection des proies ingérées et l'identification de l'espèce de chauve-souris échantillonnée, en ciblant les taxa eucaryotes de chordés et de non-chordés. Cet avantage est particulièrement utile afin d'associer le guano récolté à l'espèce auquel il appartient dans les colonies mixtes (*Myotis emarginatus* et *Rhinolophus ferrumequinum*, figure 5).

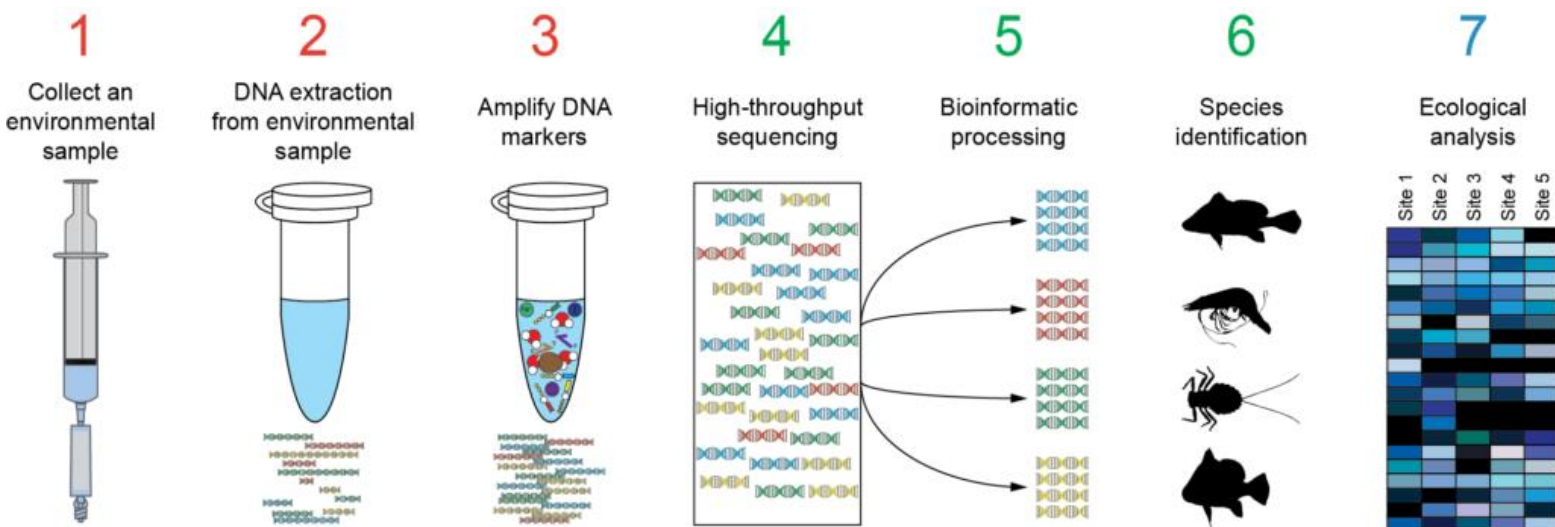


Figure 6 : Étapes de metabarcoding dans le cadre d'un prélèvement environnemental (Nature Metrics)

## 2. Laboratoire

### a) Extraction d'ADN

L'objectif de cette manipulation est d'extraire l'ADN de nos échantillons, le guano. L'ensemble du protocole est basé sur le guide d'utilisation "QIAamp® Fast DNA - Stool Mini Handbook" de février 2020 (voir les détails en Annexe 2).

### b) Préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit

#### i. Première amplification par PCR avec des amorces spécifiques du gène d'intérêt

La première étape consiste à amplifier le fragment d'intérêt. Pour cela les amorces (des deux sens : reverse et forward) sont mises en solution. Ce sont elles qui permettent cette amplification. Elles sont représentées en vert/jaune/bleu la figure 7 ci-dessous. Ces amorces sont composées de 3 parties : (1) la partie qui va se fixer sur l'ADN, dont la séquence est détaillée tableau 2 et en bleu sur la figure 8, (2) un espace d'hétérogénéité. Ce dernier est une modification apportée auxdites séquences par ajout de maximum 5 bases, afin d'augmenter leur hétérogénéité et d'avoir ainsi des amplicons divers et de bonne qualité (Fadrosh et al., 2014). (3) La partie verte sert quant à elle, à fixer les index ajoutés en PCR 2.

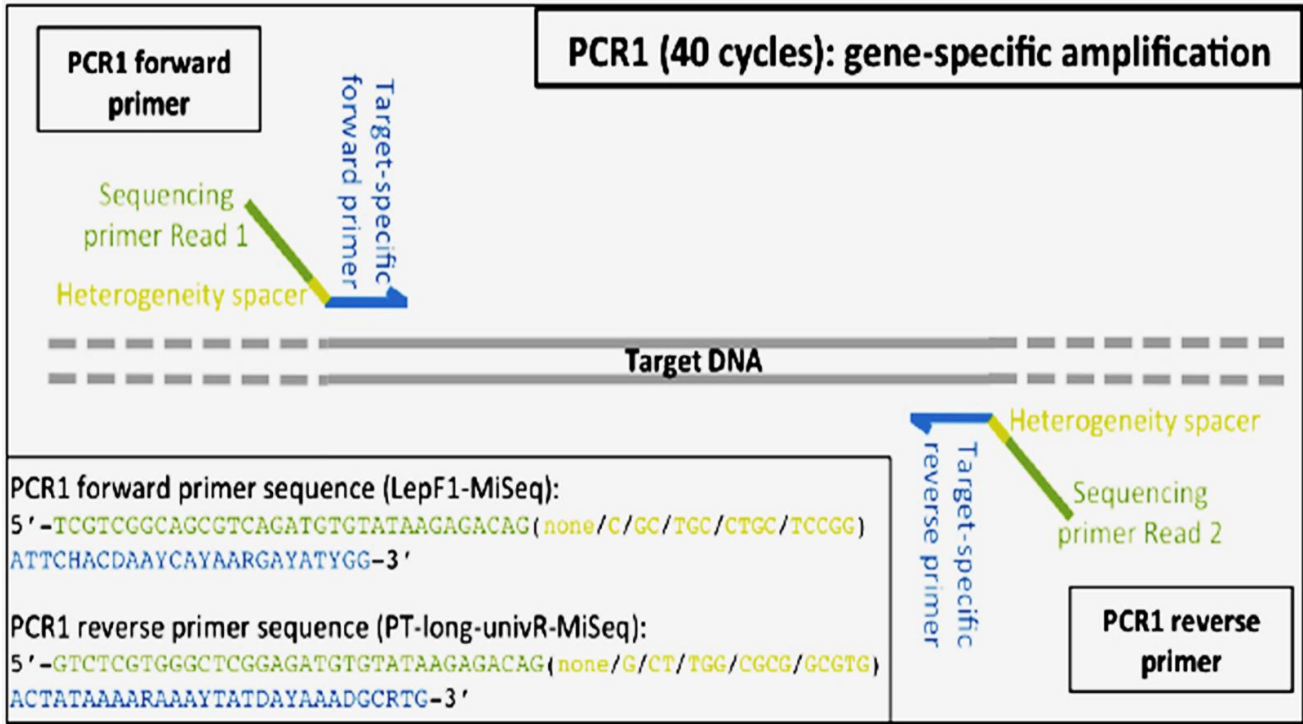


Figure 7 : Schéma de la construction des bibliothèques grâce à l'approche "two-step PCR".  
 PCR1 : ajout des primers spécifiques du fragment d'intérêt. Adapté de Galan et al. (2017)

Le choix des primers (mot emprunté de l'anglais signifiant « amorce ») s'est basé sur différentes études effectuées sur *Myotis emarginatus*. L'objectif est d'avoir des amorces détectant aussi bien l'espèce de chauves-souris qui a produit le guano que les proies retrouvées dans ce même guano, et ce au plus haut niveau taxonomique possible (Tournayre et al., 2020). Un autre aspect important a été considéré, à savoir que les séquences d'ADN obtenues puissent être comparées à celles existant dans les bases de données. C'est pourquoi, notre choix s'est tourné vers deux paires de primers se complétant pour ces critères. L'utilisation de deux paires d'amorces différentes, utilisées pour amplifier l'ADN lors de la PCR 1 va permettre de vérifier les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles en comparant leurs résultats. Les récentes études ont en effet montré que des différences de régime alimentaire étaient observées en fonction du type d'amorce utilisé. Un régime alimentaire plus exhaustif est ainsi obtenu en combinant les résultats obtenus avec des paires d'amorces différentes (Tournayre et al., 2020).

Nous avons choisi la paire ZBJ-ArtF1 et ZBJ-ArtR2c (Zeale et al., 2011) très utilisée dans les études de régime alimentaire de chauves-souris, ce qui permettra de confronter nos résultats à une large gamme de séquences présentes dans les bases de données. Cependant, le principal inconvénient de ce couple de primer est la mauvaise détection des espèces de chauves-souris (Tournayre et al., 2020). De plus, ce couple d'amorces est non dégénéré (c'est à dire dont toutes les positions correspondent aux 4 bases d'ADN : A, T, C et G ; Tableau 2) et apparaît biaisé envers certains taxa, en l'occurrence, les lépidoptères et les diptères (Clarke et al., 2014). Cela signifie qu'ils vont plus aisément identifier ces ordres au détriment des autres.

Nous avons ainsi décidé d'utiliser un couple de primers complémentaire, LepF1-MiSeq et EPT-long-univR-MiSeq, amorces qui sont hautement dégénérées (c'est à dire dont

certaines positions peuvent correspondre à plusieurs bases ; Tableau 2 ; Galan et al., 2017). Ces primers ciblent ainsi une large diversité d'espèces, notamment des chauves-souris. Cependant, les bases de données sont moins riches concernant le fragment du gène COI, amplifié par ces amorces. Cela peut potentiellement diminuer le pouvoir de résolution pour certains groupes d'invertébrés.

Pour la suite de la rédaction, les amorces ZBJ-ArtF1 et ZBJ-ArtR2c seront appelées "Zeale" et les amorces LepF1-MiSeq et EPT-long-univR-MiSeq seront nommées "Galan".

Nom	Séquence de l'amorce	Direction
ZBJ-ArtF1	5'- AGATATTGGAACWTTATATTTTATTTTTGG -3'	Forward
ZBJ-ArtR2c	5'- WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC -3'	Reverse
LepF1-MiSeq	5'- ATTCHACDAAYCAYAARGAYATYGG -3'	Forward
EPT-long-univR-MiSeq	5'- ACTATAAARAARATYATDAYRAADGCRTG -3'	Reverse

Tableau 2 : Amorces utilisées pour la PCR 1 (Zeale et al., 2011 ; Galan et al., 2017)

Le mix de la PCR 1 a été réalisé dans un volume total de 25 µL par échantillon. Il a été réalisé par l'homogénéisation des composants suivants dans un tube de 10 mL, par ordre décroissant de volumes : l'eau, le buffer (KAPA HiFi Buffer®), les amorces (diluées à 10µM), les dNTPs et la Taq polymérase. Dans notre cas, cette Taq est la KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase®, commercialisée par Roche, utile pour le séquençage NGS (Next Generation Sequencing). Ensuite, dans des plaques 96 puits de PCR, nous avons réparti dans chaque puits 21 µL du mix auquel ont été ajoutés 4µL d'ADN, à l'exception d'un puits ne contenant pas d'échantillon car il servait de blanc négatif, témoin dans lequel aucun ADN n'a été ajouté.

Chaque plaque a alors été chargée dans une machine PCR suivant le programme décrit dans le Tableau 3, préalablement optimisé pour nos échantillons.

Manipulation	Température	Durée
<b>Chauffer l'appareil</b>	112 °C	/
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C	3 minutes
<b>Début des 38 cycles</b>		
<b>Dénaturation</b>	98°C	30 secondes
<b>Hybridation (amorces Galan)</b>	45°C	45 secondes
<b>Hybridation (amorces Zeale)</b>	52 °C	30 secondes
<b>Elongation initiale</b>	72°C	30 secondes
<b>Fin des 38 cycles</b>		
<b>Elongation finale</b>	72°C	2 minutes
<b>Préservation de l'échantillon</b>	10°C	Infini

Tableau 3 : Etapes de la PCR, optimisées d'après le guide d'utilisation KAPA BIOSYSTEMS



## *ii. Vérification de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose*

Afin de vérifier nos fragments d'ADN suite à la PCR, des gels d'agarose à 1% ont été réalisés. Il est nécessaire de les faire en mélangeant de l'agarose, du TAE et du Midori, un agent intercalant qui se fixe aux brins d'ADN et qui révèle un signal lumineux lorsqu'il est soumis à de la lumière UV.

Ainsi, une fois la PCR achevée, les échantillons sont placés dans le gel d'agarose, lui-même placé dans une cuve contenant du TAE. Il doit être complètement immergé pour que le flux électrique fasse migrer l'ADN par la suite. Afin de pouvoir observer les futures bandes sur le gel et d'alourdir les produits PCR pour qu'ils se déposent au fond des puits, nous les avons mélangés au préalable à une solution tampon de couleur verte (5X Green GoTaq® Reaction Buffer ; 2µL buffer + 4 µL produit PCR). Dans le premier puits, l'échelle de taille (ou *ladder*), est chargée puisque ce produit contient une solution d'ADN standard de tailles échelonnées toutes les 100 paires de bases, afin de pouvoir évaluer la taille de nos échantillons. La machine fonctionne à 100 Volt pendant 30 minutes puis le gel est sorti et mis dans une autre machine, l'iBright™ FL1000 Imaging System, qui émet de la lumière UV afin de visualiser la migration des bandes d'ADN. Cela permet de mettre en évidence les bandes d'amplification pour vérifier le bon fonctionnement de la PCR. Pour cela, il faut une bande nette visible pour notre gène et non des bandes parasites, moins brillantes, qui sont des co-produits ou des dimères de primers, indésirables dans notre manipulation.

Il est à noter que nous avons uniquement eu recours à ces électrophorèses afin de vérifier la qualité des produits PCR lors de la phase d'optimisation du protocole de laboratoire.

## *iii. Première purification*

La purification 1 est une technique visant à générer un échantillon pur d'ADN (détails en annexe 2). Cette méthode implique la fixation de l'ADN, chargé négativement, à des billes métalliques à l'aide d'un aimant et le retrait du liquide dans lequel il était conservé jusqu'alors. L'éthanol a été utilisé pour rincer les puits, pour qu'il ne reste que l'ADN. Enfin, le tampon, du Tris dilué (49 mL d'eau pure pour 1 mL de Tris) a été ajouté dans chaque puits. C'est dans celui-ci que l'ADN a finalement été conservé. A la fin de la purification, nous avons transféré 25 µL d'échantillon purifié sur une nouvelle plaque PCR. Cette dernière doit être refermée avec de l'aluminium (spécifique pour les plaques 96 puits) et conservée au congélateur.

Toutes les étapes d'attente réalisées pendant la purification correspondent au temps que va mettre l'ADN soit à se fixer aux billes, soit à s'en détacher.

## *iv. Seconde amplification par PCR : fixation des index sur chaque échantillon*

Le mix de la PCR 2 a été réalisé dans un volume total de 15 µL par échantillon et à l'aide des mêmes solutions que pour la PCR 1, hormis les amorces. Une fois le mix réalisé, nous avons transféré 10.5 µL de celui-ci dans chaque puits, sur une plaque PCR 96 puits. Ensuite, les différentes combinaisons de tags (= index) ont été ajoutées dans chaque puits (1,5 µL par tag), pour que chaque échantillon ait son propre code permettant de l'identifier. Dans le cas présent, les index utilisés sont les Nextera XT (Illumina), qui appartiennent à deux grands groupes : les « i5 » et les « i7 » (Illumina 2021). A nouveau, les amorces utilisées sont composées de 3 parties : (1) les index à proprement parler, représentés en rouge sur la figure

8. (2) des adaptateurs (orange ; figure 8) qui seront utiles au moment du séquençage puisqu'ils permettent la fixation à la flow cell (lame de verre qui comporte des sites spécifiques, des oligonucléotides, complémentaires de ces adaptateurs ; Piro, 2020). (3) Enfin, la partie verte sur la figure 8 est une suite de nucléotides, complémentaire à l'extrémité verte de l'amorce (figure 7). Une fois sur la flow cell, ce sont les amorces qui vont initier le séquençage des fragments d'ADN.

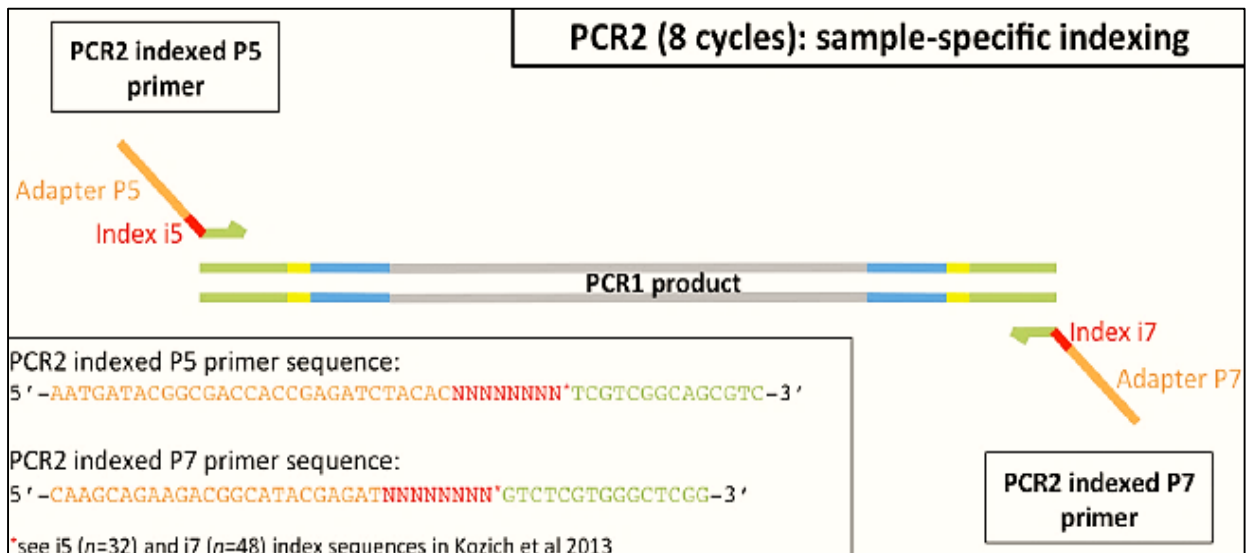


Figure 8 : Schéma de la construction des bibliothèques grâce à l'approche "two-step PCR". PCR 2 : Ajout des tags pour identifier chaque échantillon. Adapté de Galan et al. (2017)

La plaque a ensuite été refermée à l'aide d'une feuille d'aluminium avant d'être mise à la centrifugeuse à 2000 rpm tout comme la plaque préparée lors de purification 1. Ensuite, 1.5 µL de chaque échantillon d'ADN purifié a été transféré dans les puits de la plaque PCR 2. Enfin, la seconde PCR a été mise en marche, en mettant nos échantillons dans le thermocycleur avec le programme suivant (Tableau 4).

Manipulation	Température	Durée
<b>Chauffer l'appareil</b>	112 °C	/
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C	3 minutes
<b>Début des 8 cycles</b>		
<b>Dénaturation</b>	95°C	30 secondes
<b>Hybridation</b>	55°C	30 secondes
<b>Elongation initiale</b>	72°C	30 secondes
<b>Fin des 8 cycles</b>		
<b>Elongation finale</b>	72°C	5 minutes
<b>Préservation de l'échantillon</b>	10°C	Infini

Tableau 4 : Etapes de la PCR 2

#### v. *Seconde purification*

La purification 2 s'est déroulée suivant le même protocole que la purification 1, avec l'ADN issu de la PCR 2 réalisée précédemment. Le volume d'ADN amplifié initial étant de 15  $\mu\text{L}$ , le volume de billes a été modifié en conséquence. Au final, 15  $\mu\text{L}$  d'ADN purifié ont été transférés sur une nouvelle plaque 96 puits.

#### vi. *Quantification de l'ADN des échantillons*

La quantification est une étape qui peut se réaliser avant et/ou après l'étape de PCR. Dans notre cas, elle a été réalisée après, afin de vérifier s'il y a eu amplification d'ADN.

Nous avons réalisé une quantification au Picogreen (informations complémentaires en annexe 2). C'est un agent fluorescent, se liant entre deux brins d'ADN pour les faire fluorescer à une certaine longueur d'onde, selon leur absorbance. Notre protocole se basait sur celui d'Invitrogen "Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent and Kit" (ThermoFischer, 2022). Après dilution du tampon TE (concentration 20x à 1x), il a fallu réaliser des standards d'ADN (données extrêmes). Ces standards ont permis de tracer des droites d'étalonnage : la moitié des concentrations étaient en « high range » (HR), c'est-à-dire en hautes concentrations et l'autre moitié, en « low range » (LR), donc à concentrations faibles. Pour les réaliser, nous avons dilué 50 fois du standard (Concentration initiale = 100ng/ $\mu\text{l}$ ) dans du TE, nous donnant une solution avec une concentration forte (2ng/ $\mu\text{l}$ ). Puis, une partie de cette solution a été diluée 40 fois, permettant d'obtenir une solution à faible concentration (0.05ng/ $\mu\text{l}$ ) (tableau 5 ; ThermoFischer, 2022).

	Composition puits	Quantité ADN	Concentration ADN
HR 1	100 $\mu\text{l}$ de 2ng/ $\mu\text{l}$ + 100 $\mu\text{l}$ de picogreen	200ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	1000ng/ml
HR 2	10 $\mu\text{l}$ de 2ng/ $\mu\text{l}$ + 90 $\mu\text{l}$ de TE + 100 $\mu\text{l}$ de pico	20ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	100ng/ml
HR 3	1 $\mu\text{l}$ de 2ng/ $\mu\text{l}$ + 99 $\mu\text{l}$ de TE + 100 $\mu\text{l}$ de pico	2ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	10ng/ml
HR 4	0,5 $\mu\text{l}$ de 2ng/ $\mu\text{l}$ + 99,5 $\mu\text{l}$ de TE + 100 $\mu\text{l}$ de pico	1ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	5ng/ml
LR 1	100 $\mu\text{l}$ de 0,05ng/ $\mu\text{l}$ + 100 $\mu\text{l}$ de pico	5ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	25ng/ml
LR 2	10 $\mu\text{l}$ de 0,05ng/ $\mu\text{l}$ + 100 $\mu\text{l}$ de pico	0,5ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	2,5ng/ml
LR 3	1 $\mu\text{l}$ de 0,05ng/ $\mu\text{l}$ + 100 $\mu\text{l}$ de pico	0,05ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	0,25ng/ml
LR 4	0,5 $\mu\text{l}$ de 0,05ng/ $\mu\text{l}$ + 100 $\mu\text{l}$ de pico	0,025ng dans Vtotal de 200 $\mu\text{l}$	0,125ng/ml

Tableau 5 : Composition et concentration de chaque puits des standards de tailles permettant de tracer la droite d'étalonnage

Lorsque les puits étaient remplis, il restait à ajouter 100 $\mu\text{L}$  de l'élément fluorescent, le Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent (Picogreen) dans chaque puits. Avant d'insérer la plaque dans la machine, un passage de 5 min dans le noir total était nécessaire. En effet, le Picogreen doit être conservé dans l'obscurité pour ne pas être activé avant le calcul des concentrations, auquel cas nous aurions généré des résultats moins précis. Enfin, suite à la lecture de la plaque par la machine, nous obtenions un fichier CSV avec les valeurs d'absorbance pour chacun des puits. Celles-ci étaient alors converties en concentration grâce aux droites étalons réalisées (low et high range).

Pour finir la préparation de nos échantillons pour le séquençage NGS, il est nécessaire de passer par plusieurs étapes : la dilution et le pooling.

#### *vii. Dilution et pooling*

La dilution et le pooling sont les deux dernières grandes étapes avant de pouvoir envoyer ses échantillons au séquençage. Lors du séquençage, il est nécessaire que tous nos échantillons aient la même concentration, afin qu'ils soient sujets à la même profondeur de séquençage. La dilution s'est réalisée avec du Tris dilué 50X (1mL de tris dans 49 mL d'eau pure). Nous avons dilué les échantillons générés par les primers de Galan à 5 ng/μL, et ceux issus des primers de Zeale à 3 ng/μL. Ces concentrations ont été sélectionnées selon 2 principes : (1) maximiser la concentration et (2) s'assurer qu'une majorité des échantillons ait au moins une concentration équivalente à la concentration fixée. Une fois dilués, il ne restait plus qu'à transférer tous nos échantillons dans un seul eppendorf safe-lock, par couple de primers. Ce mélange ne pose aucun problème puisque chaque échantillon a été marqué par une combinaison unique de tags (figure 8), qui permettra d'assimiler chaque séquence à son échantillon d'origine lors des étapes suivantes. Ces deux tubes Eppendorf ont finalement été envoyés à la plateforme de séquençage.

### **3. Séquençage et bio-informatique**

#### *a) Séquençage*

Suite au séquençage NGS effectué au GIGA (plateforme de séquençage de l'ULiège), les fichiers fastqc reçus s'ouvrent avec le programme FastQC et permettent une vérification de la qualité de chaque échantillon (forward et reverse).

#### *b) Analyses bio-informatiques*

Les analyses bio-informatiques ont été effectuées sur le cluster informatique de l'ULiège, grâce à l'invite de commande MobaXterm. L'ensemble des manipulations a été réalisé à l'aide d'un script fait sur mesure, basé sur l'article d'André et al. (2017), utilisé au laboratoire de génétique de conservation de l'Université de Liège (GeCoLab). Ce script a fait appel à différents logiciels installés sur le cluster. Les logiciels utilisés étaient les suivants :

- Usearch Fastq\_mergepairs (Edgar, 2010) = fusionne les brins forward et reverse appariés en une séquence (la séquence consensus) ;
- Cutadapt (Martin, 2011) = permet la suppression des primers ainsi que les bases situées en amont du brin forward et en aval du brin reverse ;
- Usearch Fastq\_filter = filtre les reads en supprimant les brins trop courts (<115 bases) et trop longs (>150 bases) ; filtre les reads selon leur qualité. Il faut que plus de 90% des bases aient une qualité supérieure à 30 (Q=30, p = 90) ;

Ensuite, l'emploi de FastX Collapser (boîte à outils FASTX, [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) a permis de rassembler les séquences analogues (déréplication) en leur attribuant le nombre de reads propre à chacune d'entre elles (conservation du nombre de séquences).

Enfin, Swarm v.3 a regroupé les séquences en plusieurs groupes, selon la ressemblance de leurs amplicons (utilisation d'un seuil « d » où  $d = 1$ ) (Mahé et al., 2021). C'est une étape aussi appelée « clustering », formant des unités taxonomiques opérationnelles = OTUs.

Une fois les séquences filtrées et dérépliquées, celles-ci ont été confrontées aux bases de données disponibles. Pour cela, il a été nécessaire d'utiliser la commande `usearch_local` (USEARCH v. 11) permettant d'effectuer cette comparaison.

#### *c) Base de données BOLD*

Dans notre étude, nous avons utilisé la base de données BOLD. L'avantage principal de cette base de données très consultée est sa mise à jour régulière par les utilisateurs. En revanche, les principaux inconvénients sont (1) l'encodage de différentes manières d'un taxon, ce qui a tendance à gonfler les résultats pour une seule séquence et (2) la mise à jour perpétuelle sur les amorces les plus utilisées, obligeant les utilisateurs à suivre ces choix et délaisser des amorces qui pourraient parfois être plus adéquates pour leur étude (O'Rourke et al., 2020). Finalement, la mise à jour régulière de cette base peut également conférer un inconvénient puisqu'une même étude aura des résultats différents d'une année à l'autre. Cela rend ainsi la comparaison entre les articles plus difficile.

C'est au cours de cette étape que le choix de nos primers devient important puisque si la séquence a bien été amplifiée mais qu'elle n'est présente dans aucune base de données, elle devient non identifiable et donc inutile pour la suite de nos résultats.

## **4. Traitement des fichiers**

#### *a) Filtrage par pourcentage de reads, pourcentage de similarité, suppression des séquences redondantes et assignation taxonomique selon la méthode de Razgour*

A la réception de notre fichier CSV, obtenu grâce à l'utilisation du cluster en bio-informatique (Annexe 3), les fichiers comportent 7 colonnes mais deux retiennent notre attention pour la suite : le pourcentage de reads de chaque séquence au sein de l'échantillon après filtrage (colonne 4) et le pourcentage de similarité entre la séquence de notre échantillon et la séquence qui lui est assignée par la base de données (colonne 7).

L'utilisation du logiciel RStudio a été requise afin d'effectuer un premier filtrage des données sur ces deux colonnes. Cela permet de retirer les assignations taxonomiques les plus incertaines et les résultats dont le nombre de reads était tellement infime qu'il s'agissait probablement d'un faux positif obtenu par contamination ou mauvaise assignation.

Les limites imposées n'ont pas été les mêmes pour les chordés et les non chordés puisque l'utilité des deux fichiers était différente.

Pour les chordés, les limites choisies sont celles qui donnaient les meilleurs résultats en termes d'identification des espèces de chauves-souris. Il s'agit d'au minimum 1% de reads au sein de l'échantillon et 90% de similarité entre notre séquence et la base. Les seuils appliqués sur les données des non-chordés sont différents par rapport aux chordés puisque l'on ne recherche plus l'identité de l'individu ayant produit des matières fécales mais une

composition de proies consommées, avec un nombre de reads plus faible. Après avoir testé plusieurs seuils, ceux-ci ont été retenus :

- Pourcentage de reads au sein de l'échantillon supérieur à 0.2%
- Similarité entre la séquence et la base de données supérieure à 98%

L'optimisation du pourcentage de reads au sein de l'échantillon a été réalisée manuellement, de manière à minimiser le nombre de taxa hautement improbables, c'est-à-dire ceux dont l'aire de répartition se situait en dehors de l'Europe.

Une fois que les filtres ont été appliqués et que les lignes en double ont été supprimées, nous avons réalisé une vérification manuelle sur Excel.

Lors de cette vérification, les fichiers chordés ont permis de confirmer que les échantillons retenus appartenaient bien à notre espèce d'intérêt (le murin à oreilles échancrées). Les fichiers non chordés ont nécessité une vérification plus approfondie puisque pour une même séquence, la base de données pouvait donner plusieurs identifications. Le retrait de ces multiples identifications s'est basé sur un système de code chiffré, développé dans l'article de Razgour et al. (2011). Cependant, certains ajustements ont été nécessaires pour que ce classement soit applicable aux données ci-présentes :

1a : Une seule espèce ou un seul genre ou une seule famille a une correspondance > 98% → espèce/genre/famille gardé(e) (conservation systématique du rang taxonomique le plus élevé)

1b : Plusieurs espèces du même genre ont une correspondance > 98% → genre gardé

2 : Plusieurs espèces de différents genres ou plusieurs genres ou plusieurs familles ont une correspondance > 98% mais un seul résultat est présent sur le territoire étudié → on conserve toujours le résultat au rang taxonomique le plus élevé

3 : Plusieurs genres d'une même famille ont une correspondance > 98% → famille gardée

4 : Présence de doublons dans les résultats : encodage de plusieurs façons différentes ou taxonomie ancienne → un seul exemplaire gardé s'il s'agit d'une espèce, d'un genre ou d'une famille

Enfin, lorsqu'une séquence a été identifiée comme appartenant à plusieurs taxa de même rang ou qu'aucun résultat n'était précis jusqu'à la famille ou qu'aucun taxon ne se retrouvait dans (ou proche de) la zone d'étude, l'ensemble de ces résultats ont été considérés comme "non-assignés".

### *b) Filtrage par contrôles*

Quand chaque séquence était assignée à un seul taxon, les contrôles négatifs placés tout au long des manipulations ont été utilisés pour contrôler les résultats obtenus. Au cours de cette étude, 31 contrôles négatifs d'extraction (un par extraction), 7 contrôles négatifs de PCR 1 (1 ou 2 par plaque) et 36 contrôles négatifs d'échantillonnage (papiers buvards ; 2 par lieu et par session, soit 6 par colonie) pour un total de 74 contrôles.

### *c) Superficie des forêts et des terres agricoles*

En parallèle avec nos résultats génétiques, et grâce à l'utilisation de l'outil en ligne « Map Developers », des cercles de rayon de 10 km autour de chaque colonie ont été tracés. Cette distance a été sélectionnée car elle représente la distance moyenne maximale entre les

gîtes d'été et les territoires de chasse des murins à oreilles échancrées (Bensettiti et Gaudillat, 2004). Ensuite, des polygones sur les forêts ont été tracés pour connaître la surface forestière au sein de chaque zone de chasse. Cette approche a servi de base lors de l'analyse de nos résultats pour discuter du taux d'araignées en fonction du pourcentage de recouvrement forestier autour des colonies. De plus, un rappel du descriptif de chaque bâtiment où se sont implantées les colonies est également nécessaire puisque ce facteur peut avoir une importance quant aux espèces retrouvées dans le guano.

Enfin, les informations concernant les productions agricoles de chaque région agricole ont été utiles pour comparer ces superficies agricoles utilisées (SAU) par les bovins (bovins laitiers et viandeux pour chaque région agricole) avec le lieu d'implantation de nos colonies (Etat de l'environnement wallon, 2022). Cela a permis d'effectuer une comparaison de l'environnement avec la présence de *Stomoxys calcitrans*, un diptère qui est régulièrement au contact du bétail.

## 5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel RStudio version 4.2.1. Le seuil de significativité de la p-valeur a été fixé à 0.05.

Dans le but de vérifier l'utilité des filtres dans l'étude, un t-test pairé a été effectué entre les moyennes avant et après filtrage. De plus, une corrélation de Pearson a permis d'analyser la corrélation entre la présence de *S. calcitrans* dans les échantillons et la pression du bétail dans les différentes régions agricoles.

Afin d'évaluer l'impact des sessions et des lieux d'échantillonnage sur la composition du régime alimentaire des ME, nous avons généré des modèles linéaires mixtes généralisés avec effet aléatoire (GLMM) et une distribution binomiale, à l'aide la fonction `glmer` implémenté dans le package *lme4*. Le premier set de modèles avait pour variable explicative la session (3 catégories), et pour variable aléatoire le lieu (6 modalités). Le second set de modèles avait pour variable explicative le lieu (6 catégories), et pour variable aléatoire la session (3 modalités). Pour chaque set de modèles, l'impact de ces variables a été testé sur la présence/absence de chacun des 13 ordres d'arthropodes dans le régime alimentaire des 137 individus étudiés au total (variable dépendante). Au final, 26 modèles ont donc été testés. Afin d'évaluer la significativité de la variable explicative catégorielle testée, un test Anova (implémenté dans le package *car*) a été réalisé sur chaque modèle. Finalement, des tests post-hoc de Tukey, permettant de comparer les colonies et les sessions 2 à 2 quand les anovas donnaient des résultats significatifs, ont été calculés. Ces tests ont déterminé quels étaient les sites et les sessions statistiquement différent(e)s pour chaque ordre d'arthropodes. Pour réaliser les modèles visant à évaluer l'impact du lieu, les colonies de Durbuy et Orval ont été retirées au vu du peu d'échantillons restants (respectivement 9 et 3).

De plus, pour pouvoir étudier l'abondance de chaque espèce dans les colonies et pour chaque primers, une uniformisation du nombre de reads pour l'ensemble de ces espèces a été nécessaire avant de calculer les indices de biodiversité. Cela signifie que le nombre de reads doit être similaire pour tous les échantillons (même profondeur de séquençage), afin d'éviter un biais envers les échantillons sur-/sous-représentés en termes de reads. Après avoir effectué une normalisation sur l'ensemble des résultats, de nouvelles analyses ont été réalisées en prenant séparément les amorces pour pouvoir comparer les valeurs entre elles.

Contrairement à la raréfaction qui aurait impliqué la suppression des informations, la normalisation CSS est une méthode performante pour faire des analyses statistiques sans perte de données. En effet, cette normalisation est appelée « cumulative sum scaling ». Cette méthode est plus « douce » que les autres puisqu'elle écrase moins les données mais permet tout de même de les mettre à la même échelle pour pouvoir les analyser (Paulson et al., 2013). Cette normalisation a été réalisée avec la librairie *metagenomeSeq*.

La librairie *vegan* a permis de calculer les indices de biodiversité alpha (Shannon) et bêta (Morisita-Horn) à l'aide d'une matrice d'abondance (tableaux 15 à 18). En effet, pour calculer une bonne diversité, il faut prendre en compte à la fois la présence/absence mais aussi l'abondance relative d'une espèce à un endroit donné. Des milieux avec plus d'espèces mais avec des variations trop importantes entre chacune ont un moins bon indice qu'un milieu avec moins d'espèces mais avec des abondances plus similaires.

Enfin, les librairies *ade4*, *FactoMineR* et *factoextra* ont servi à réaliser les représentations graphiques de la composante en analyse principale (ACP ; figure 13 et annexe 5). Ces ACP ont été réalisées sur le set de données de présence/absence de chacun des 5 ordres d'arthropodes principaux (plus de 10 taxa identifiés), dans le régime alimentaire des 137 individus étudiés au total. Seules les composantes principales dont les valeurs propres étaient supérieures à 1 ont été conservées (critère de Kaiser). Pour effectuer ces figures, le choix s'est tourné vers un biplot sur lequel figurent les variables (sessions = 3, figure 13 ; lieux = 6, annexe 5) et les individus (nombre d'échantillons = 137).

### III. Résultats

#### 1. Filtrage des données

##### a) Filtrages préliminaires

A la réception du fichier CSV, une page de statistiques est présente en plus des données sur les chordés et non-chordés. Elle donne le nombre global de reads bruts (avant filtrage bio-informatique, voir « Matériel et Méthodes » 3.b) Analyses bio-informatiques) et filtrés sur tous les échantillons et avec chaque primers. En moyenne, Zeale a généré 164550 reads bruts et 154502 reads filtrés à la réception des fichiers (soit 93.9 % des reads). Galan a quant à lui généré en moyenne 165382 reads bruts et 144974 reads filtrés (87.7%).

L'étude des fichiers chordés a permis de voir que, parmi les 292 échantillons envoyés au séquençage (en dehors des 74 contrôles), la totalité a passé les différents filtres (bio-informatique) avec les primers de Galan, contre 283 pour Zeale. En effet, 3 échantillons de Durbuy (en session 2), 4 de Freÿr (en session 3) et 2 de Rochefort (en session 2) n'apparaissent pas pour la seconde paire d'amorces (tableau 6).

Primers	Aubel	Aulne	Durbuy	Freÿr	Orval	Rochefort	Total
Galan	37	37	33	89	60	36	<b>292</b>
Zeale	37	37	30	85	60	34	<b>283</b>

Tableau 6 : Nombre d'échantillons séquencés avec succès pour chaque primers



b) Filtrages des données « chordés »

i. Détection des échantillons de *Myotis emarginatus*

Lorsque ces fichiers ont été analysés dans RStudio, nous avons uniquement conservé les séquences de *Myotis emarginatus* dont le pourcentage de reads au sein de l'échantillon était supérieur à 1% et dont le pourcentage de similarité entre notre séquence et celle de la base de données était supérieur ou égal à 90% (voir « Matériel et Méthodes » 4.a)).

Primers	Aubel	Aulne	Durbuy	Freÿr	Orval	Rochefort	Total
Galan	37	37	20	66	5 (-1)	36	<b>201 (-1)</b>

Tableau 7 : Nombre d'échantillons de murins à oreilles échancrées identifiés après filtrage

En comparant les deux derniers tableaux (6 et 7), nous avons eu la confirmation que 3 colonies ne comprennent que notre espèce d'intérêt puisque l'ensemble des échantillons ont été identifiés comme étant *Myotis emarginatus*. Il s'agit d'Aubel, Aulne et Rochefort. Les 3 autres colonies sont mixtes puisque le nombre d'échantillons a été réduit après l'application des filtres (tableau 7). Après vérification, ces autres échantillons appartiennent à au grand rhinolophe. Il s'agit des colonies de Durbuy, Freÿr et Orval où l'on retrouve effectivement du Rf dans diverses proportions. En effet, à Durbuy, 13 des 33 échantillons appartiennent à cette espèce (39.40%), 23 des 89 échantillons (25.84%) à Freÿr et 56 des 60 échantillons (93.33%) à Orval.

Le second tableau (7), ne comprend que les amorces de Galan car les amorces de Zeale ne permettaient pas de repérer l'espèce de chauves-souris (car ces amorces ont été conçues pour amplifier des non-chordés).

Finalement, 201 échantillons ont été identifiés comme étant du murin à oreilles échancrées. Cependant, en vérifiant manuellement les résultats du fichier CSV, un échantillon d'Orval ne doit pas figurer dans notre tableau et la présence de *Myotis emarginatus* dans cette échantillon relève probablement ici d'un cas de contamination sur le lieu de récolte (tableau 8).

Nom de l'échantillon	Numéro de la séquence	Nombre de reads	Pourcentage de reads	Identification	Pourcentage de similarité
O3-19	1	22910	75.88	Grand rhinolophe	100
O3-19	2	4722	15.64	Didelphimorphe	87.1
O3-19	3	614	2.03	Murin à oreilles échancrées	100

Tableau 8 : Extrait du fichier Excel reçu suite au séquençage, représentant les 3 taxa chordés les plus abondants dans l'échantillon O3-19

Si cet échantillon a pu passer outre les filtres, c'est parce que le pourcentage de reads et de similarité entre les séquences et la base de données sont supérieurs aux limites imposées dans RStudio (> 1% et > 90%, cf. « Matériel et Méthodes » 4.a)). C'est finalement le nombre de reads présents dans l'échantillon qui justifie son appartenance au grand rhinolophe et non au murin à oreilles échancrées. En effet, on peut remarquer sur le tableau 8 que le grand rhinolophe est caractérisé par 22910 reads contre 614 pour le murin à oreilles échancrées. Pour poursuivre l'étude, l'échantillon O3-19 a donc été supprimé manuellement.

Cela signifie que sur nos 292 échantillons initiaux, 200 appartiennent à notre espèce d'intérêt.

ii. *Nombre d'échantillons de Myotis emarginatus par session*

Le tableau 9 ci-dessous, repris de « Récolte du matériel biologique, le guano » (cf. Matériel et Méthodes), permet de connaître à la fois le nombre d'échantillons de murins à oreilles échanquées par session d'échantillonnage et dans chaque lieu, ainsi que le nombre d'échantillons obtenus avec chaque amorce.

Lieu	Session	Échantillons Galan	Échantillons Zeale
Aubel	1	13	13
	2	12	12
	3	12	12
Aulne	1	12	12
	2	13	13
	3	12	12
Durbuy	1	7	7
	2	8 (- 3)	5
	3	5	5
Freÿr	1	22	22
	2	18	18
	3	26 (-4)	22
Orval	1	0	0
	2	1	1
	3	3	3
Rochefort	1	12	12
	2	13 (-2)	11
	3	11	11

Tableau 9 : Nombre d'échantillons séquencés avec succès par les deux couples d'amorces (Galan et Zeale), pour chaque lieu de prélèvement et chaque session d'échantillonnage  
Les sessions pour lesquelles certains échantillons n'ont pas pu être séquencés par Zeale sont indiquées en rouge.

On sait à présent que les 9 échantillons non séquencés avec Zeale (tableaux 6 et 9) sont des matières fécales de notre espèce d'intérêt. Les échantillons présents uniquement chez Galan (identifiés en rouge entre parenthèses dans le tableau 9) ont été supprimés afin de conserver une équité au moment de l'analyse et de la comparaison des amorces.

Au final, ce sont donc 191 échantillons qui ont été gardés pour les deux paires de primers.

c) *Filtrage des données « non-chordés »*

i. *Filtrage par pourcentage de reads, pourcentage de similarité, suppression des séquences redondantes*

Comme mentionné dans le premier paragraphe de la partie « Séquençage et bio-informatique » (3.a) du « Matériel et Méthodes », les fichiers fastqc permettent de vérifier la qualité de nos échantillons suite au séquençage. Afin de ne conserver que le guano de bonne

qualité, une vérification de chaque séquence (forward et reverse) a été effectuée. Cela a entraîné la suppression de 2 échantillons pour les deux paires d'amorces.

Sur les 189 échantillons de ME qui ont été gardés pour les deux paires de primers, de nouveaux filtres ont été appliqués pour le fichier des non chordés. Pour rappel, les séquences ont été conservées si elles représentaient au minimum 0.2% de reads au sein de l'échantillon et possédaient 98% de similarité avec la séquence issue de la base de données.

La seconde étape a été de réduire les résultats à un taxon par séquence quand celle-ci pouvait, selon la base de données BOLD, avoir plusieurs identifications possibles. Pour cela, un système de classification en 5 catégories a été mis en place (Razgour et al., 2011 ; cf « Matériel et Méthodes » ; 4.a)). Les résultats finaux obtenus pour chaque primer sont donnés au tableau 10 :

Notation Razgour modifiée	Galan	Zeale
1a	115	121
1b	12	14
2	91	48
3	8	5
4	6	24

Tableau 10 : Nombre de séquences classées selon la notation de Razgour pour chaque amorce

Le tableau 11 indique que, dans la majorité des cas, les identifications multiples étaient dues à des identifications correspondant à des rangs taxonomiques différents (cf. 4.a), code 1a page 20). Cette réduction à une identification par séquence a permis de conserver plus de noms d'espèces ou de genres.

Grâce à l'assignation des séquences à un code (1a à 4), nous avons obtenu 578 résultats différents pour Galan et 523 pour Zeale. En revanche, 116 séquences n'ont pas pu être conservées pour Galan puisque la base de données nous proposait plusieurs taxa de familles différentes. Cela signifie que 16.7% de séquences sont considérées comme non-assignées pour ce couple d'amorces. Pour Zeale, seules 8 séquences n'ont pas été identifiées, ce qui ne représente que 1.5% de non-assignation.

## ii. Filtrage par contrôles

Lors du filtrage des contrôles négatifs de laboratoire avec les primers de Galan (blancs d'extraction et de PCR), 38 taxa différents étaient présents dans ces blancs. Ils contenaient entre 5 et 7376 reads. Le score le plus élevé, détenu par *Mycetophilidae*, est un résultat exceptionnel puisque le second taxon avec le plus de reads est *Toxocaridae* avec 229. Avec Zeale, ce sont 17 taxa, contenant entre 5 et 20889 reads qui figuraient dans les contrôles négatifs. A nouveau, le taxon le plus présent, *Cricotopus*, était largement en tête puisque *Cecidomyiinae*, le suivant, incluait 1975 reads.

Pour finir avec ces filtres, les fichiers obtenus sur les non-chordés, s'élèvent à 378 individus différents au sein de 111 échantillons pour Galan (soit 58.1 % des échantillons initiaux) et 401 répartis dans 114 échantillons pour Zeale (59.7%).

iii. *Nombre d'échantillons restants par colonie après l'application des filtres, pour chaque couple de primers*

Avant de passer aux analyses de diversité des proies, il est intéressant de voir ce que nos premiers fichiers traités peuvent offrir comme informations.

Le tableau 11 permet de voir combien d'échantillons persistent au sein de chaque colonie, c'est-à-dire ceux qui contiennent encore un ou plusieurs arthropode(s) après le passage des divers filtres. Orval et Freÿr conservent ainsi plus d'échantillons pour Zeale tandis que les 4 autres colonies sont plus représentées chez Galan. Autrement dit, les contrôles ont engendré la suppression de plus d'échantillons à Aubel, Aulne, Durbuy et Rochefort avec Zeale et ont supprimé plus d'échantillons de Freÿr et d'Orval avec Galan. En regardant les données exactes, nous pouvons voir que les différences d'échantillons entre primers sont inférieures ou égales à 6 sauf pour Freÿr où il existe un écart de 8 échantillons (tableau 11).

Localité	Galan	Zeale	Différence
Aubel	15	14	1
Aulne	22	28	6
Durbuy	5	7	2
Freÿr	51	43	8
Orval	3	1	2
Rochefort	15	21	6

Tableau 11 : Nombre d'échantillons par colonie et pour chaque paire de primers après filtrage

Pour l'ensemble des variables, à savoir le nombre d'échantillons avant filtres, le nombre après filtres pour Galan et le nombre après filtres pour Zeale, une comparaison de la moyenne pondérée du nombre d'échantillons de murins à oreilles échancrées avant et après filtres a été réalisée. A l'aide de t.test païré, on obtient des différences significatives pour les deux primers. En effet, la p-valeur s'élève à 4.681e-05 pour Galan et à 5.369e-04 pour Zeale. En revanche, les moyennes après filtres entre les primers ne sont pas significativement différentes (p-valeur = 0.807).

En reprenant nos fichiers non-chordés et en les comparant dans leur ensemble sans se soucier du nombre d'échantillons et des colonies, on remarque que **137 échantillons** des 192 échantillons initiaux sont conservés. Parmi eux :

- Galan conserve 111 échantillons de fèces, composés de 378 proies, où l'on retrouve 115 taxa dont 99 espèces (86,1%) et 16 (13,9%) autres présentant un rang taxonomique plus élevé.
- Zeale conserve 114 échantillons de fèces, contenant 401 proies correspondant à 116 taxa différents dont 91 espèces (78,4%) et 25 (21,6%) données avec une résolution taxonomique moindre.

## 2. Impact du type de milieu sur le régime alimentaire

### a) Milieu forestier : Recouvrement dans les zones de chasse

Lieu	Type de bâtiment colonie	Pourcentage de recouvrement forestier
<b>Aubel</b>	Ferme	6.3
<b>Aulne</b>	Abbaye	17.77
<b>Durbuy</b>	Eglise	38.3
<b>Freÿr</b>	Château	37.33
<b>Orval</b>	Abbaye	26.5
<b>Rochefort</b>	Maison	44.02

Tableau 12 : Bâtiment d'implantation de la colonie et pourcentage de recouvrement forestier dans les zones de chasse de *Myotis emarginatus*

L'analyse de la superficie des forêts a montré que la zone de Rochefort est la plus boisée avec 44.02%, suivie de Durbuy (38.3%) puis de Freÿr (37.33%). A contrario, Aubel est la moins boisée avec 6.3%. Cette dernière zone correspond par ailleurs à la seule colonie implantée dans une ferme. Les autres lieux n'accueillent pas de bétail puisqu'il s'agit de monuments et d'une propriété privée.

### b) Milieu agricole : Pression en bovins et présence de *Stomoxys calcitrans*

À la réception des fichiers chordés, une première analyse sur la présence de bétail a été réalisée pour les amorces de Galan puisque ceux de Zeale ne permettent pas une identification des chordés. Parmi les divers résultats obtenus, l'intérêt s'est porté sur *Bos taurus*, bovin retrouvé en Wallonie et revenant 141 fois et dans l'ensemble des localités (entre 25 et 100% des échantillons dans la colonie ; tableau 13).

Cependant, 3 autres identifications de cette espèce sont présentes dans des blancs. Il s'agit de deux contrôles de terrain : un à Rochefort en session 2 (0.728% de reads dans le contrôle soit 65 reads) et un à Aubel en session 1 (2.457%, 30 reads) ainsi que d'un blanc d'extraction à Orval en session 3 (6.590%, 46 reads).

Pour les présences sur les contrôles de terrain, étant donné le peu de reads, cela peut signifier que le papier buvard a été en contact avec un animal qui avait été lui-même en contact avec un bovin auparavant. De plus, le blanc d'extraction a pu être contaminé lors de la manipulation, malgré les précautions prises afin de travailler de la manière la plus stérile possible.

Localité	Pourcentage d'échantillons	Pourcentage de reads	Pourcentage de match
Aubel	67.57	0.005 à 0.162	100
Aulne	59.46	0.004 à 0.756	100
Durbuy	25	0.002 à 0.371	99.2 à 100
Freÿr	45.45	0.001 à 1.216	91.3 à 100
Orval	100	0.003 à 0.649	91.3 à 100
Rochefort	41.67	0.002 à 0.317	95.8 à 100

Tableau 13 : Identification de *Bos taurus* dans les échantillons

En regardant le tableau 13 ci-dessus, on voit que les pourcentages de reads peuvent varier entre 0.001% et 1.216% au sein d'un échantillon. Il est normal que ces valeurs soient basses puisque la présence de cette espèce est dû à l'ingestion de son sang par un insecte lui-même ingéré par les chauves-souris. Par conséquent, la quantité d'ADN récupérée dans les échantillons devient infime. La colonne « Pourcentage de match » correspond au pourcentage de similarité entre notre séquence et la base de données. Seulement 10 d'entre elles sont inférieures à 98% de similarité, ce qui signifie que les identifications sont confirmées bien que la quantité d'ADN ne soit pas toujours importante.

Suite à l'analyse du tableau 13, nous apprenant que de l'ADN de bovin a été retrouvé dans toutes les colonies, une comparaison est nécessaire avec les résultats concernant la présence des mouches piqueuses de bétail. Dans notre cas, cela inclut uniquement l'espèce *Stomoxys calcitrans*. En effet, l'ADN de bovin peut se retrouver dans les matières fécales de *Myotis emarginatus* après que ce dernier ait ingéré une mouche qui a piqué du bétail. Sur les 109 échantillons comportant de l'ADN de bétail, 84 contiennent aussi de l'ADN de *Stomoxys calcitrans*. Ce qui signifie que dans 77% des cas, on retrouve les deux espèces dans un même échantillon.

Un autre fait développé est la présence de *Stomoxys calcitrans* selon la région agricole dans laquelle nous nous trouvons. En effet, jusqu'à maintenant, un calcul de la surface forestière a été réalisé. En revanche, pour cette espèce, ce sont les terres agricoles et plus particulièrement la présence de bovins, qui sont à prendre en considération.

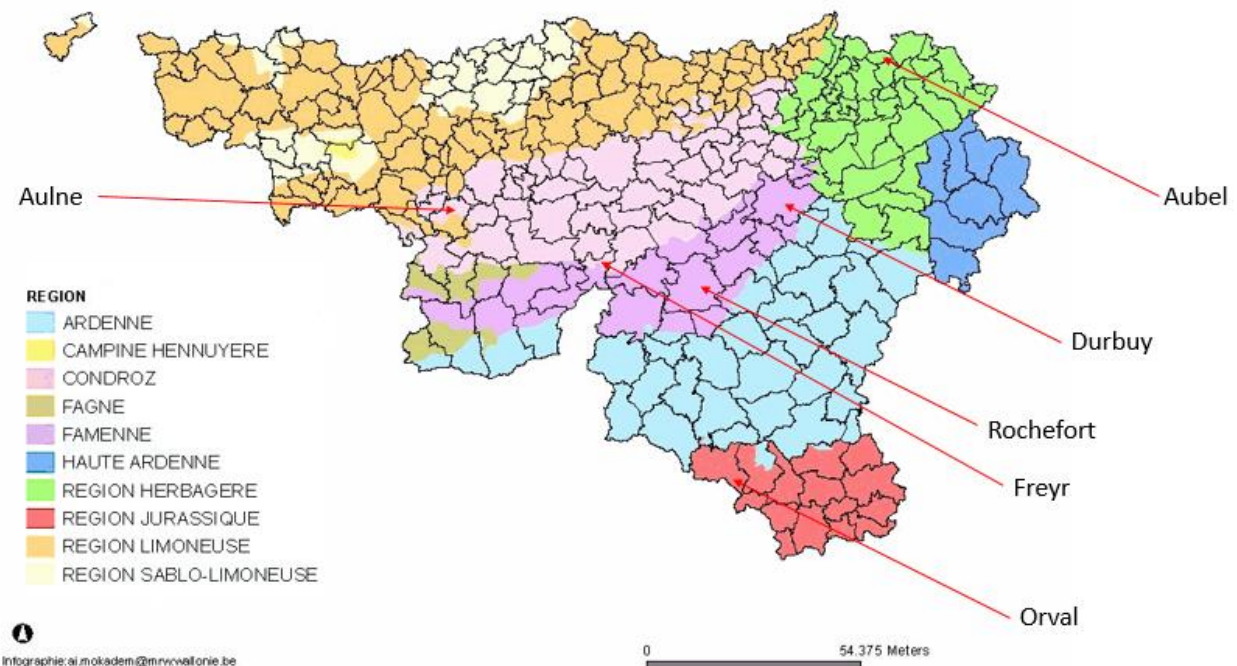


Figure 9 : Régions agricoles en Wallonie (Portail de l'agriculture Wallonne - SPW)

D'après les informations obtenues sur les productions agricoles en Wallonie (Etat de l'environnement wallon, 2022) et la figure 9 ci-dessus, on remarque qu'Aubel est situé en région herbagère, Aulne et Freyr sont dans le Condroz et Rochefort et Durbuy sont en Famenne. Orval, dont peu d'échantillons sont conservés, est dans la région Jurassique.

Ainsi, le recouplement des données nous donne le tableau suivant :

Colonie	Aubel	Aulne	Durbuy	Freÿr	Rochefort
Région agricole	Herbagère	Condroz	Famenne	Condroz	Famenne
Présence de <i>S. calcitrans</i> dans les échantillons (en %)	60	37	20	41	17
Nombre moyen de bovins dans les principaux cheptels (laitier et viandeux)	407	157	120	157	120

Tableau 14 : Comparaison entre la présence de *Stomoxys calcitrans* dans nos échantillons et l'importance du bétail, dans une même région agricole (excepté Orval, 3 échantillons)

Grâce au tableau 14 ci-dessus, nous avons la confirmation que la région agricole la plus densément peuplée de bovins est la région herbagère, où l'on retrouve le plus de *S. calcitrans*. A contrario, la Famenne est la moins dense en bovins et c'est également dans cette région que l'on retrouve le moins notre diptère d'intérêt. Lorsque l'on calcule la corrélation de Pearson entre le pourcentage de *S. calcitrans* dans les échantillons et la pression du bétail, la p-valeur s'élève à 0.047. Cela signifie qu'il y a une corrélation significative entre les 2 variables.

### 3. Analyses de diversité des arthropodes

L'ensemble des analyses de ce point va s'effectuer sur les 137 échantillons conservés suite à l'application de tous les filtres sur les données.

#### a) Description des ordres d'arthropodes identifiés

Une étude complète de tous les arthropodes a permis de voir quels sont les ordres les plus présents dans le guano du murin à oreilles échancrées. En plus de cela, nous savons à présent, grâce à ces résultats, que 192 taxa sont présents dans nos échantillons.

De plus, grâce à la figure 10 page suivante, nous pouvons remarquer que 2 classes d'arthropodes sont représentées : les Insectes et les Arachnides. A un rang taxonomique inférieur, les ordres des diptères, les lépidoptères et les araignées sont les plus ingérés par *Myotis emarginatus*. À eux seuls, ils représentent 139 taxa différents soit 72.4% des proies identifiées dans cette étude. Ces proportions laissent ainsi 53 autres taxa, soit 27.6 %, partagés entre les 9 ordres suivants : coléoptères, hyménoptères, hémiptères, éphéméroptères, trombidiformes, psocodae, mésostigmates, trichoptères et névroptères.

## Différents ordres d'arthropodes présents dans les échantillons

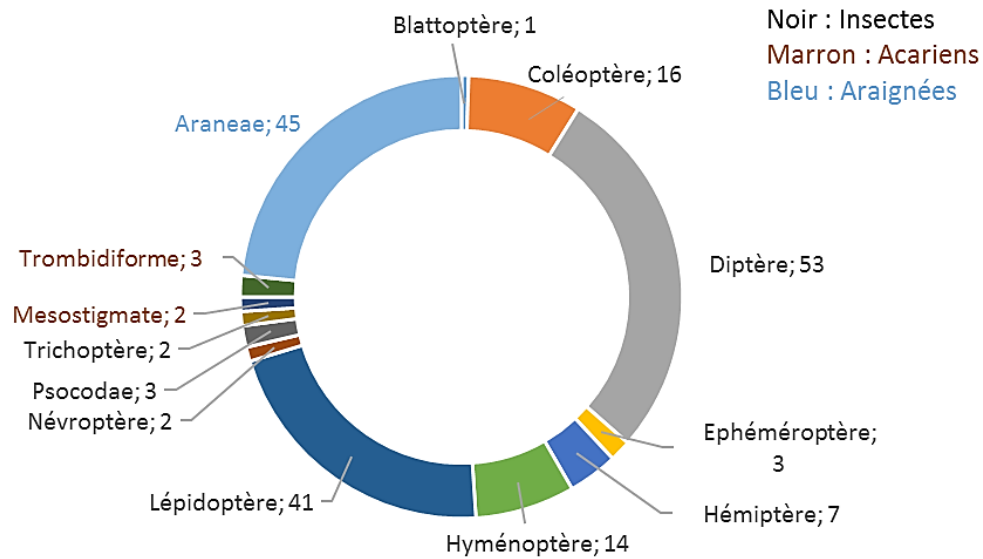


Figure 10 : Nombre de taxa présents dans nos échantillons, pour chaque ordre d'arthropodes

Une étude plus approfondie de chaque ordre est présentée en annexe 4, décrivant toutes les espèces d'arthropodes ainsi que le(s) échantillon(s) dans le(s)quel(s) elles apparaissent. Quelques ordres et espèces d'intérêt vont tout de même être décrits à la suite.

Tout d'abord, les diptères présentent le plus de taxa puisque ce nombre s'élève à 53. Au sein de ces résultats, on dénombre 36 espèces différentes. Les autres assignations sont soit des genres (14 uniquement présents chez Zeale), soit des familles (3 dont 1 uniquement chez Galan et 2 chez Zeale).

Ensuite, les araignées représentent le second ordre le plus fréquemment observé. Il contient 45 taxa différents. Parmi les résultats, 4 sont des genres tandis que les 41 autres ont été identifiés jusqu'à l'espèce. Les 4 genres sont *Enoplognatha* et *Zygiella*, ainsi que *Metellina* et *Tetragnatha* dont l'assignation taxonomique a pu aller jusqu'à l'espèce dans certains cas : *M. merianae*, *M. segmentata*, *T. montana* et *T. obtusa*.

Bien qu'un tri ait été effectué grâce à l'ensemble des filtres, 7 espèces persistantes ne semblent pas avoir été recensées jusqu'à maintenant en Belgique. Cela représente 3.6% des taxa. Il s'agit de *Bombus gerstaeckeri* (hyménoptère, 1 échantillon), *Euura imperfecta* (hyménoptère, 1 individu), *Cnemacantha muscarian* (diptère, 1 individu), *Fannia sociella* (diptère, 3 individus), *Microtendipes brevitarsis* (diptère, 1 individu), *Perilissus albitarsis* (diptère, 1 individu) et *Rheocricotopus robacki* (diptère, 1 individu). Ces espèces restent néanmoins observables en Europe.

Parmi nos résultats, une attention particulière se porte également sur les espèces considérées comme étant des ravageurs des récoltes. C'est pourquoi, après avoir investigué l'écologie de chacune d'entre elles, 8 (4.2% des taxa) ont été identifiées comme provoquant des dégâts sur différents types de plantes. Il s'agit de :



- *Brassicogethes aeneus* (coléoptère) dont un seul individu a été identifié par Zeale, en session 1 à Aulne ;
- *Stomoxys calcitrans* (diptère) est représenté par 43 individus, tous identifiés par Galan. 9 à Aubel (les 3 sessions), 9 à Aulne (sessions 2 et 3), 1 à Durbuy (session 3), 19 à Freÿr (les 3 sessions), 2 à Orval (sessions 2 et 3) et 3 à Rochefort (session 3) ;
- *Adelges cooleyi* (hémiptère), un individu présent à Rochefort en session 1 (Zeale) ;
- *Cacopsylla melanoneura* (hémiptère), identifiée une fois, en session 1 à Aubel (Zeale) ;
- *Korscheltellus lupulina* (lépidoptère), retrouvé à une reprise en session 1 à Freÿr (Galan) ;
- *Mamestra brassicae* (lépidoptère), dont un individu présent en session 1 à Aubel (Galan) ;
- *Plutella xylostella* (lépidoptère), a été identifié une fois par les deux couples d'amorces en session 3 de Rochefort ;
- *Pyralis farinalis* (lépidoptère) présent une fois en session 2 d'Aulne (Zeale).

## b) Diversité alpha

### i. Diversité des colonies de reproduction

Cette analyse consiste dans un premier temps à calculer le pourcentage de présence de chaque ordre d'arthropodes au sein de chaque colonie, puis dans chaque session au sein de ces mêmes colonies. Dans notre cas, l'accent est mis sur les quatre groupes les plus représentés, à savoir les araignées (bleu clair ; figures 11 et 12), les diptères (jaune), les lépidoptères (rose) et les coléoptères (orange). A cela, un modèle linéaire mixte généralisé avec effet aléatoire a été ajouté afin de consolider de manière statistique les résultats visuels offerts par les barplots (figures 11 et 12).

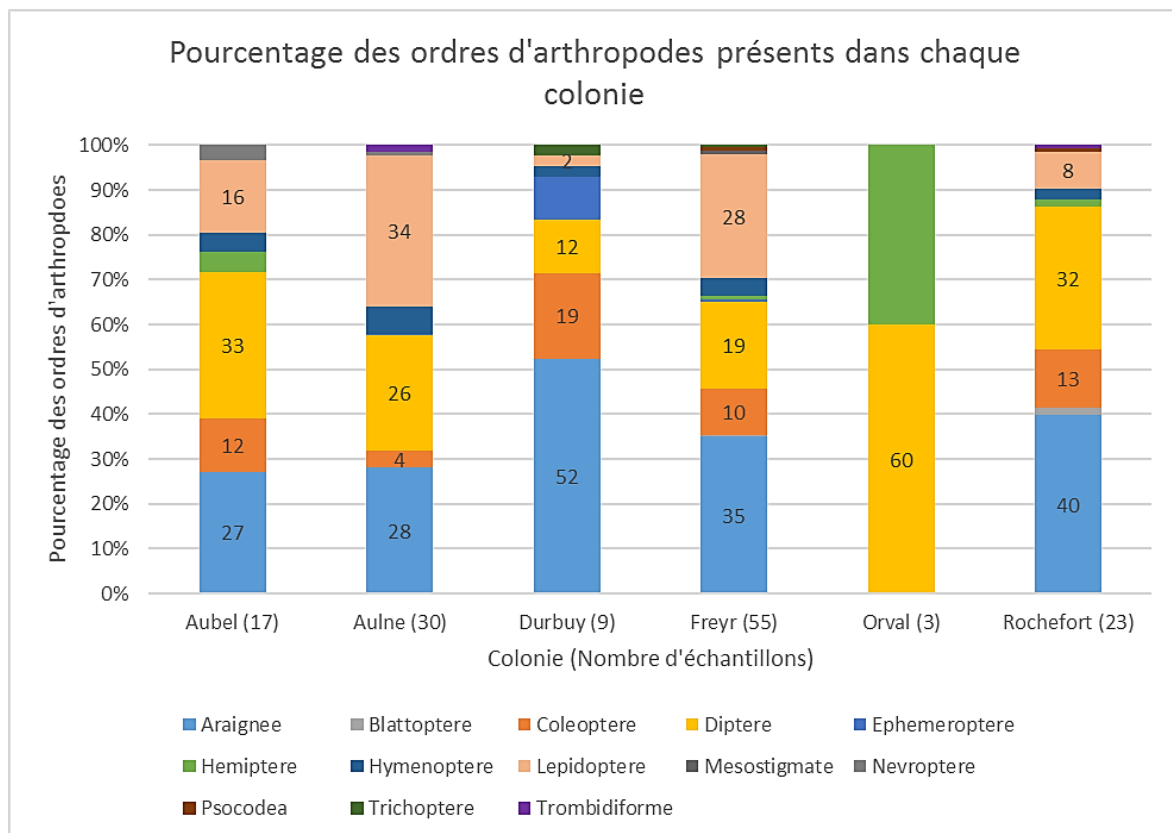


Figure 11 : Barplot des ordres d'arthropodes présents dans chaque colonie  
Les nombres indiqués sur les barres du graphique correspondent aux pourcentages représentés par les 4 ordres d'arthropodes prédominants.

Cette figure montre quel est le pourcentage de chaque ordre dans chaque colonie, en fusionnant les résultats issus des 2 paires d'amorces.

Les araignées, en bleu, représentent plus de 50% des proies ingérées dans la colonie de Durbuy. Rochefort, la commune la plus boisée, est en seconde place avec 40% des proies indentifiées comme étant des araignées. Freÿr est la dernière colonie dont l'ordre le plus présent est celui des araignées, avec 35%. Dans les colonies d'Aubel et Aulne, elles représentent respectivement 27% (second clade après les diptères) et 28% (second clade après les lépidoptères). Globalement, l'analyse glmer donne un résultat non significatif pour cet ordre (Anova du glmer,  $p = 0.273$ ), reflétant qu'il n'existe aucune différence concernant la proportion d'araignées ingérées, entre les colonies.

Les diptères, au même titre que les araignées, sont des proies importantes pour les ME. En effet, ils sont présents dans les 6 colonies et figurent toujours parmi les 3 ordres les plus ingérés. Quelques variations sont tout de même notables puisqu'outre Orval, dont la fréquence s'élève à 60% au sein des 3 échantillons conservés, c'est à Aubel que la fréquence est la plus haute avec 33%. Cette valeur atteint 32% à Rochefort, ce qui les place après les araignées. À Aulne (26%) et Freÿr (19%), ce clade se situe après les araignées et les lépidoptères tandis qu'à Durbuy (12%), ils suivent les araignées et les coléoptères. L'analyse statistique indique qu'aucune différence significative n'est confirmée pour cet ordre, entre les lieux (Anova du glmer,  $p = 0.117$ ).

Les lépidoptères représentent un tiers (32%) des proies à Aulne et environ un quart (28%) des proies à Freÿr. À Aubel, 16% des proies consommées sont des lépidoptères. Dans ces trois colonies, ils figurent au sein des 3 ordres les plus fréquents dans les échantillons. À contrario, à Durbuy et à Rochefort, ils sont moins élevés que les coléoptères dont les valeurs s'élèvent à 19% et 13% (coléoptères) face à 2% et 8% (lépidoptères).

Au sein de ces deux derniers ordres, les modélisations indiquent que des différences significatives existent entre les lieux (Anova du glmer coléoptère,  $p = 0.012$  et lépidoptère,  $p = 0.005$ ). Pour les coléoptères, ces résultats significatifs sont visibles entre Rochefort et Aubel (test post hoc de Tukey,  $p = 0.024$ ), Rochefort et Aulne (test post hoc de Tukey,  $p = 0.023$ ) ainsi que Rochefort et Freÿr (test post hoc de Tukey,  $p = 0.031$ ). C'est à Rochefort que l'on retrouve systématiquement le plus de coléoptères. Pour les lépidoptères, ces différences s'observent entre Aulne et Aubel (test post hoc de Tukey,  $p = 0.008$ ), Freÿr et Aubel (test post hoc de Tukey,  $p = 0.008$ ), Rochefort et Aulne (test post hoc de Tukey,  $p = 0.012$ ) et Rochefort et Freÿr (test post hoc de Tukey,  $p = 0.013$ ) où Aulne et Freÿr ont plus d'individus que les autres colonies.

## *ii. Diversité des sessions d'échantillonnage*

Tout comme pour la figure précédente, l'analyse se base principalement sur les 4 ordres les plus ingérés par les murins à oreilles échanrées, à savoir les araignées, les diptères, les lépidoptères et les coléoptères. Cependant, la figure 12, accompagnée des tests statistiques, nous apprennent quel type de proie est mangée tout au long de la période de récolte du guano.

## Pourcentage des ordres d'arthropodes présents pour chaque session et chaque colonie

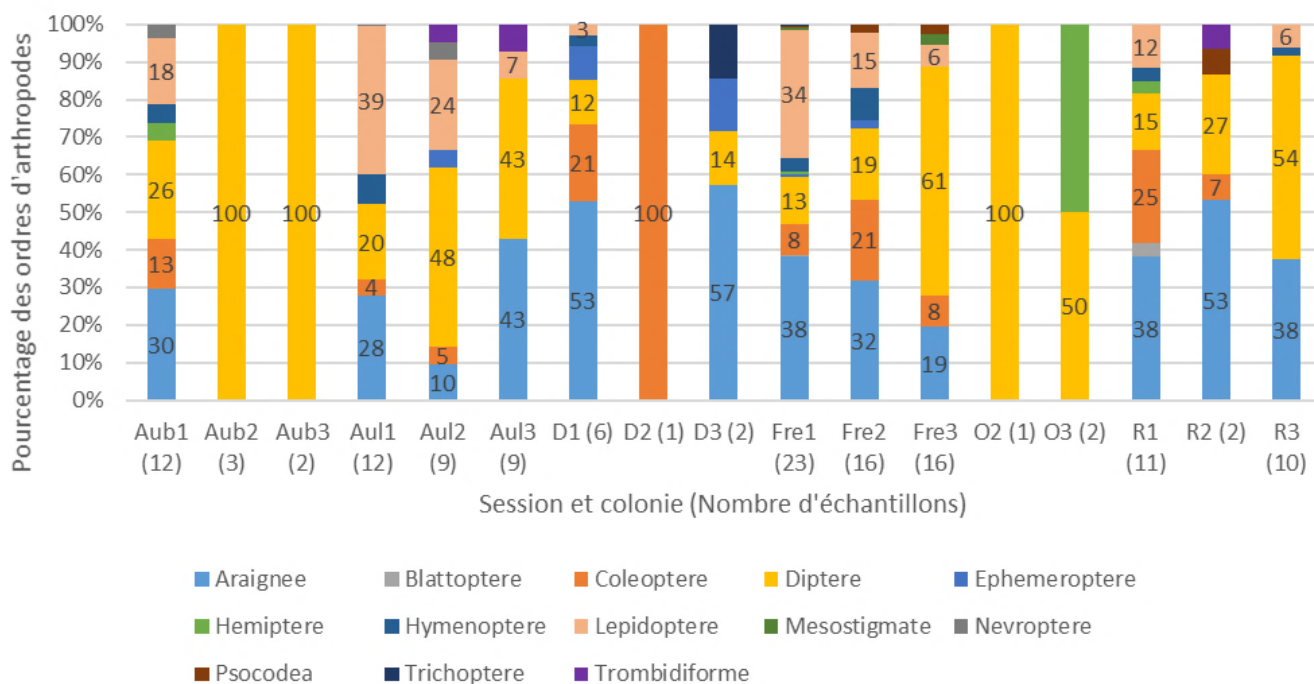


Figure 12 : Barplot des ordres d'arthropodes présents dans chaque session de chaque colonie. Les nombres indiqués sur les barres du graphique correspondent aux pourcentages représentés par les 4 ordres d'arthropodes prédominants.

Globalement, cette figure semble indiquer que les diptères (jaune) sont plus fréquents lors du troisième passage, effectué entre fin-juillet et mi-août. Les deux colonies qui ne suivent pas cette tendance sont Aulne (48% au second passage, en juillet contre 43% en session 3) et Orval dont le seul échantillon en session 2 ne contient que des diptères et les 2 échantillons de session 3 contiennent autant de diptères que d'hémiptères. À l'aide des modélisations statistiques, on remarque une tendance à avoir plus de diptères en session 3 qu'en session 1 mais ce résultat n'est pas significatif (test post-hoc Tukey,  $p = 0.057$ ).

Les lépidoptères semblent, quant à eux, être systématiquement plus élevés lors du premier passage, commençant fin-mai et s'étendant tout au long du mois de juin. Les valeurs de cette session varient entre 3% (Durbuy) et 39% (Aulne). Bien que ce chiffre ne soit pas élevé à Durbuy, cela reste la valeur la plus haute des trois passages puisqu'aucun lépidoptère ne figurait dans les matières fécales de ME en sessions 2 et 3. Cette observation, à propos d'un taux plus haut en session 1, est confirmée puisqu'il existe une différence significative entre la session 1 et 2 ainsi qu'entre la session 1 et 3 dont la p-valeur du test post-hoc Tukey s'élève dans les deux cas à  $1 \times 10^{-4}$ .

Les araignées appartiennent à un ordre qui, visuellement, ne semble pas être consommé de manière privilégiée durant l'une ou l'autre session puisque la fréquence de ces proies varie d'une colonie à l'autre. En effet, elles sont les plus fréquentes en session 1 pour Aubel et Freÿr, en session 2 à Rochefort et en session 3 à Aulne et Durbuy. En revanche, elles sont totalement absentes à Orval. Cependant, en réalisant des statistiques, on remarque qu'elles sont significativement plus fréquentes en session 1 puisqu'au même titre que les

lépidoptères, la p-valeur du test post-hoc Tukey est à  $1 \cdot 10^{-4}$  entre la session 1 et les deux autres sessions.

Enfin, les coléoptères sont absents en session 3 de toutes les colonies sauf à Freÿr où ils représentent 8% des proies. Cependant, leur présence en sessions 1 et 2 est variable d'une colonie à l'autre. Cette observation est confirmée puisqu'il existe une différence significative entre la session 1 et 3 (test post hoc de Tukey,  $p = 0.001$ ) ainsi qu'entre la session 2 et 3 (test post hoc de Tukey,  $p = 0.007$ ) où la fréquence de cet ordre en session 3 est systématiquement plus faible.

### iii. Indice de biodiversité alpha

Pour les amorces de Galan, le nombre de reads est compris entre 46 (Aul3-17, *Acalitus* sp.) à 168821 (Fre3-3, *Serica brunnea*). Après normalisation CSS, cet écart varie entre 0.4 et 10.3 pour ces mêmes échantillons. Pour les amorces de Zeale, le nombre de reads est compris entre 5 (Aul2-1, *Baetis fuscatus*) et 315631 (R1-23, *Lagria atripes*). Après normalisation CSS, cet écart varie entre 0.02 et 10.1 pour ces mêmes échantillons. Cette réduction des écarts va ainsi permettre de comparer des abondances entre les différents échantillons.

Pour le calcul de la diversité alpha, l'indice de Shannon donne les valeurs suivantes pour les colonies.

Aubel	Aulne	Durbuy	Freÿr	Orval	Rochefort
1.605	1.508	1.401	1.581	0.666	1.603

Tableau 15 : Indice de Shannon sur les colonies

Pour rappel, avec l'indice de Shannon c'est le chiffre le plus élevé qui indique une meilleure biodiversité. Grâce à cet indice de biodiversité, nous pouvons voir que pour l'ensemble des résultats, c'est la colonie d'Aubel qui est la plus riche en termes de proies.

Un indice de diversité alpha (Shannon) a également été calculé entre les sessions, toute colonie confondue, afin de voir quel est le passage le plus riche en proies.

Session 1	Session 2	Session 3
1.640	1.682	1.179

Tableau 16 : Indice de Shannon sur les sessions

Dans le tableau 16, l'indice de Shannon est au plus bas au niveau de la session 3 mais semble indiquer une meilleure richesse spécifique en session 2.

### c) Diversité bêta

#### i. Indice de biodiversité bêta

La normalisation a également permis de réaliser les indices de biodiversité bêta. Pour cette partie, c'est l'indice de Morisita-Horn qui a été utilisé. Il se base sur l'abondance et non sur la présence/absence, tout comme précédemment avec l'indice de Shannon.

Dans un premier temps, les indices de similarité ont été calculés entre les colonies.

	Aubel	Aulne	Durbuy	Freÿr	Orval
Aulne	0.112				
Durbuy	0.311	0.362			
Freÿr	0.104	0.039	0.174		
Orval	0.310	0.565	0.847	0.635	
Rochefort	0.042	0.155	0.134	0.071	0.467

Tableau 17 : Indice de Morisita-Horn entre les colonies

Les colonies d'Aulne et de Freÿr sont globalement les moins similaires en termes de proies ingérées, alors que Durbuy et Orval semble accueillir des individus dont le régime alimentaire est le plus similaire.

Le même indice a été calculé pour les différentes sessions :

	Session 1	Session 2
Session 2	0.122	
Session 3	0.347	0.170

Tableau 18 : Indice de Morisita-Horn entre les sessions

Le tableau 18 indique que les sessions 1 et 3 sont les plus proches en termes de biodiversité tandis que les sessions 1 et 2 sont les plus éloignées.

### ii. L'analyse en composante principale

Cette dernière analyse a permis d'avoir la confirmation visuelle des analyses statistiques (glmer) faites précédemment les sessions (figure des lieux en annexe 5).

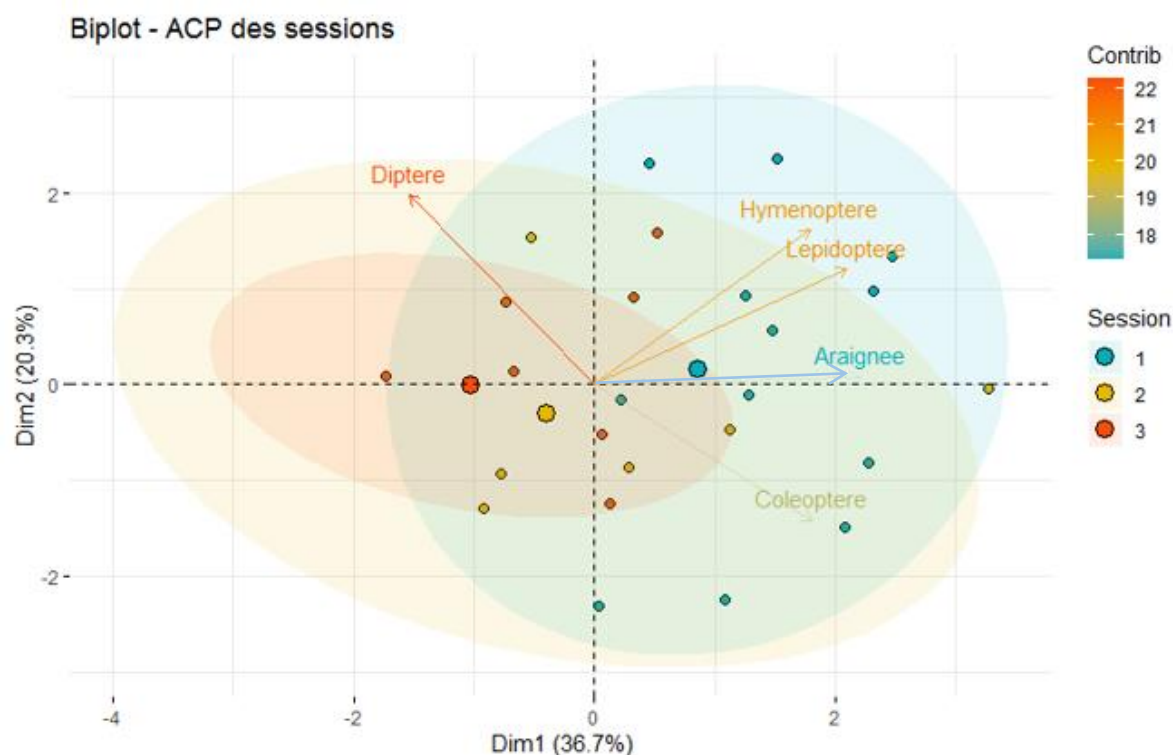


Figure 13 : Biplot - Analyse en composante principale des sessions sur les ordres arthropodes principaux du régime alimentaire de *Myotis emarginatus* (taxa présent chez plus de 10 individus). Certains individus se chevauchent, raison pour laquelle les 137 individus n'apparaissent pas sur le graphique.

	PC1	PC2
<b>Araignée</b>	0.7023755	0.02531175
<b>Coléoptère</b>	0.5751498	- 0.45339404
<b>Diptère</b>	- 0.4889206	0.62912775
<b>Hyménoptère</b>	0.5705971	0.51493764
<b>Lépidoptère</b>	0.6673497	0.38474988
<b>Valeur propre</b>	1.83	1.01
<b>Pourcentage de variance expliquée</b>	36.68	20.30

Tableau 19 : Score de chaque variable sur les composantes principales 1 et 2 de l'ACP, valeur propre et variance expliquée

Sur la figure 13 et le tableau 19, nous avons extrait 2 composantes principales (CP) expliquant 56,99% de la variance, la CP1 prenant part à 36,7% et la CP2 comptant pour 20,3% de cette variance. Nous pouvons remarquer que plusieurs groupes se sont formés en fonction des sessions (figure 13). Ces groupes sont définis par le tracé des ellipses de concentration équivalent à 95%. On remarque que l'araignée est l'ordre expliquant le moins les dimensions contrairement aux diptères qui ont un fort impact.

La corrélation entre les variables initiales et les scores obtenus grâce à l'ACP est représentée par les 5 flèches correspondant aux 5 ordres d'arthropodes principaux. Nous pouvons observer que les araignées sont positivement corrélées avec la CP1. Les 4 autres ordres d'arthropodes présentent quant à eux des corrélations aussi bien avec la CP1 que la CP2, dans des directions cependant opposées : hyménoptères et lépidoptères sont positivement corrélés avec les 2 CP, les coléoptères sont positivement corrélés avec la CP1 et négativement avec la CP2, et les diptères suivent une direction tout à fait opposée aux coléoptères. Quant à la répartition des 137 individus selon leurs scores pour les 2 CP, nous pouvons observer que les ellipses (correspondant à chaque session d'échantillonnage) se chevauchent partiellement. Nous pouvons également voir que l'ellipse de la session 1 s'étire à 90° par rapport aux ellipses des sessions 2 et 3.

#### 4. Comparaison des primers

Afin de réaliser une comparaison rigoureuse des deux couples de primers, le nombre d'échantillons retenus doit être semblable de part et d'autre. C'est pourquoi, seuls les échantillons communs entre Galan et Zeale ont été conservés pour cette partie. Cela représente 88 échantillons au total, soit 12 échantillons de guano issus d'Aubel, 20 d'Aulne, 3 de Durbuy, 39 de Freÿr, 1 d'Orval et 13 de Rochefort.

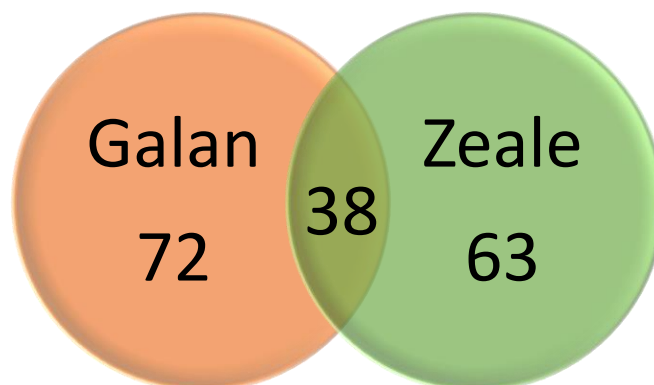


Figure 14 : Diagramme de Venn montrant le nombre de taxa distincts ou identiques identifiés par les 2 paires de primers

<i>Anyphaena accentuata</i>	<i>Limonia nubeculosa</i>
<i>Araneus angulatus</i>	<i>Macrocera</i>
<i>Austrolimnophila ochracea</i>	<i>Metellina segmentata</i>
<i>Cantharis pellucida</i>	<i>Neurigona quadrifasciata</i>
<i>Cidaphus alarius</i>	<i>Nuctenea umbratica</i>
<i>Clubiona comta</i>	<i>Operophtera brumata</i>
<i>Clubiona pallidula</i>	<i>Ophion minutus</i>
<i>Cyclosa conica</i>	<i>Ophion ventricosus</i>
<i>Cyzenis albicans</i>	<i>Perilissus albitarsus</i>
<i>Ditula angustiorana</i>	<i>Philodromus collinus</i>
<i>Elateridae</i>	<i>Phytocoris</i>
<i>Enicospilus ramidulus</i>	<i>Plutella xylostella</i>
<i>Episinus maculipes</i>	<i>Pseudatemelia flavifrontella</i>
<i>Fannia canicularis</i>	<i>Rhagio scolopaceus</i>
<i>Gibbaranea gibbosa</i>	<i>Serica brunnea</i>
<i>Hemerobius lutescens</i>	<i>Serratella ignita</i>
<i>Lagria atripes</i>	<i>Tipula lunata</i>
<i>Lagria hirta</i>	<i>Xysticus lanio</i>
<i>Larinioides sclopetarius</i>	<i>Zilla diodia</i>

Tableau 20 : Liste des espèces retrouvées pour les deux primers

La figure 14 ci-dessus permet de voir quel est le nombre de taxa similaires entre les primers et ceux propres à chacun. On remarque que 38 d'entre eux sont présents à la fois chez Galan et chez Zeale, ce qui correspond respectivement à 34.5% et 37.6% de leurs résultats. Le tableau 20, quant à lui, est la liste détaillée de ces taxa communs. Parmi eux, on retrouve 13 espèces d'arachnides (araignées et acariens ; violet) et 25 espèces, genres et familles d'hexapodes (noir).

Une étude taxonomique de chaque résultat, reprise de la figure 10 est visible en détail dans l'annexe 4. Elle a permis de réaliser le tableau ci-dessous qui compare les ordres identifiés par chaque paire de primers, au sein des 88 échantillons communs :

Ordres	Taxa Galan	Taxa Zeale
<b>Insectes</b>		
<b>Blattoptère</b>	0	1
<b>Coléoptère</b>	7	11
<b>Diptère</b>	18	38
<b>Ephéméroptère</b>	1	2
<b>Hémiptère</b>	3	4
<b>Hyménoptère</b>	8	10
<b>Lépidoptère</b>	31	9
<b>Névroptère</b>	1	2
<b>Psocodae</b>	0	3
<b>Trichoptère</b>	0	1
<b>Arachnides - Acariens</b>		
<b>Mesostigmate</b>	2	0
<b>Trombidiformes</b>	3	0

Arachnides - Araignées		
Araneae	36	20

Tableau 21 : Nombre de taxa identifiés pour chaque ordre d'arthropodes et chaque paire de primers

Pour un même nombre d'échantillons, nous pouvons voir qu'à première vue, en comparant les deux colonnes du tableau 21, Galan identifie plus de lépidoptères, de mésostigmates, de trombidiformes et d'araignées que Zeale. De façon générale, les arachnides semblent avoir été identifiées plus fréquemment avec les amorces de Galan tandis que pour les insectes, excepté les lépidoptères, c'est Zeale qui donne la plus grande diversité.

## IV. Discussion

Au cours de cette étude, l'objectif principal était de réaliser une analyse exploratoire du régime alimentaire de *Myotis emarginatus*, en Wallonie. Grâce aux informations fournies dans la littérature, nous avons défini quelles étaient les lacunes scientifiques actuelles, ce qui nous a permis de définir des objectifs précis. Ainsi, nous avons évalué comment le régime alimentaire des ME variait d'un point de vue temporel mais également géographique. De plus, nous nous sommes intéressés à l'impact d'un milieu agricole sur la tendance des ME à chasser en étables, comportement déjà avéré dans des études antérieures en Europe (Kervyn et al., 2012 ; Steck et Brinkmann, 2006). Pour répondre à ces objectifs, 191 matières fécales de ME, venant de 6 colonies différentes, ont été analysées grâce à des techniques génétiques de pointe. La récolte, effectuée à 3 reprises par colonie, a permis d'identifier les variations des proies entre les lieux mais aussi entre les mois. Au total, 192 taxa appartenant à la classe des arthropodes, ont été identifiés. Parmi ceux-ci, nous retrouvons des espèces causant des dommages, notamment en agriculture. Ces résultats prouvent l'utilité des chauves-souris en tant qu'alliées de l'agriculture mais également pour leur importance en tant que régulatrices des populations d'arthropodes, de par l'étude précise de leur régime alimentaire.

### 1. Intérêt de l'étude

Le principal aspect novateur de cette étude est sa réalisation dans une zone géographique située au Nord de l'aire de répartition du murin à oreilles échancrées, dans laquelle le régime alimentaire de cette espèce a été très peu investigué. En effet, seul Kervyn et al. (2012) s'était intéressé à cette thématique jusqu'à présent. Cependant, l'utilisation d'un binoculaire pour reconnaître visuellement les proies n'avait pas apporté la précision que nous pouvons avoir à l'heure actuelle avec l'emploi du métabarcoding.

L'autre innovation vis-à-vis de Kervyn et al. (2012) est le nombre de colonies étudiées sur une zone plus étendue (6 colonies au lieu de 3) et avec des paysages différents. De plus, une attention particulière s'est portée sur l'écologie des ordres d'arthropodes les plus présents dans les matières fécales. En effet, l'écologie de ces proies est intéressante à prendre en compte puisque selon leur stade de développement et les milieux dans lesquels on les retrouve, nous pouvons en apprendre plus sur les zones de chasses du ME.

Une limite que nous avons essayé de pallier malgré le temps imposé est le nombre de réplicas. En effet, l'idéal aurait été d'en faire afin de confirmer la présence de certains taxa



présentant en faible nombre de reads. Cependant, notre choix a été de privilégier l'emploi de deux couples de primers à la place de répliques qui fournissent des informations plus limitées lorsque l'on doit choisir entre ces deux alternatives (Elbrecht et al., 2019). Ce choix a permis d'obtenir des résultats plus complets et reflétant au mieux le régime alimentaire des murins à oreilles échanquées. De plus, la comparaison de ces primers permettra également d'aider de futures études dans leur choix, dans le cas où elles favoriseraient l'utilisation d'un seul couple d'amorces.

## 2. Intérêt de l'utilisation de plusieurs primers

De façon générale, la complémentarité des deux couples de primers s'avère démontrée pour une étude fine et la plus exhaustive possible du régime alimentaire des chauves-souris. En effet, grâce au graphique de Venn (figure 14), on remarque que seulement 38 espèces de proies communes ont été retrouvées entre les deux couples de primers lors de la comparaison des 88 échantillons en commun. Cela prouve que chaque couple de primers a un grand nombre de spécificités qui lui est propre. L'utilisation d'au moins deux paires d'amorces semble donc indispensable pour réaliser ce type d'étude.

Alors que notre étude portait sur 292 échantillons de guano, 9 d'entre eux n'ont pas été séquencés avec les primers de Zeale. Ces échantillons ayant été correctement amplifiés avec les primers de Galan, cette différence ne provient pas de l'échantillon de guano initial. Alors que parmi ces 9 échantillons, certains contenaient une faible concentration en ADN (cf. « Matériel et Méthodes » 2. b) vi. Quantification de l'ADN des échantillons), d'autres n'étaient pas confrontés à cette situation. L'absence de séquences brutes démultiplexées issues de ces échantillons manquants indique que la source d'erreur pourrait provenir de l'indexage de ces échantillons. En effet, si les échantillons n'ont pas été correctement identifiés grâce à des tags, par exemple à cause d'une erreur de pipetage, aucune séquence ne peut leur être associée lors du démultiplexage.

De plus, la comparaison des résultats obtenus avec les primers de Galan et de Zeale pour les fichiers non-chordés ne semble pas aller systématiquement dans le sens attendu. En effet, dans l'article de Clarke et al. de 2014, il est mentionné que les primers de Zeale sont majoritairement utilisés dans les analyses de régime alimentaire de chauves-souris européennes, ce qui a gonflé les bases de données vers les lépidoptères et les diptères, principales proies de ces prédateurs. Or, nos résultats démontrent que les primers de Galan ont identifié plus de taxa au sein des lépidoptères, ce qui prouve à nouveau tout l'intérêt de combiner plusieurs couples d'amorces. En revanche, les taxa de diptères sont effectivement identifiés en plus grand nombre par les primers de Zeale.

À propos des résultats obtenus avec les lépidoptères, une hypothèse peut être émise. En effet, l'augmentation de l'utilisation de certains primers pourrait permettre une meilleure reconnaissance de ceux-ci pour l'ordre des lépidoptères. Que cette hypothèse soit avérée ou non, il faut être conscient que les données fournies par les amorces varient dans le temps puisque des bases de données comme BOLD sont constamment mises à jour. Étant donné que rien n'est figé, l'utilisation de plusieurs amorces avec des avantages et inconvénients différents peut, une fois de plus, se révéler utile dans une étude.

### 3. Impact des méthodes choisies sur nos résultats

Après avoir filtré les données non-chordés pour les deux paires d'amorces utilisées, nous pouvons voir que Galan conserve 58.1 % de ses échantillons et Zeale, 59.7%. Cela signifie que plus de 40% n'ont pas pu passer les filtres dans les deux cas, c'est-à-dire qu'à la sortie de séquençage, trop d'informations considérées comme étant des contaminations ou des faux positifs persistent dans nos données. En retirant autant de données, les filtres ont prouvé leur efficacité, signifiant que les résultats restants ne comportent que peu voire aucune erreur. De plus, les résultats des t-tests pairés avant/après filtrage sont significatifs. Cela confirme que ces étapes de soumission à des seuils, de déréplication des séquences au sein d'un échantillon et d'intégration des divers contrôles, sont importantes avant d'analyser ses données.

### 4. Identification des proies

Comme il a été souligné dans l'article d'Andriollo et al. (2021), la diversité des proies retrouvées dans le guano des chauves-souris permet de réaliser un bon inventaire de l'entomofaune nocturne de la région. En effet, ces études sur le régime alimentaire des chauves-souris sont l'occasion de (re)découvrir des espèces que l'on croyait absentes ou disparues du territoire. Elles permettent également d'en savoir plus sur les milieux de chasse et les types de proies ingérées grâce à l'écologie et la phénologie de ces dernières.

#### a) Comparaison d'études

Lors de recherches dans la littérature, les 5 ordres de proies les plus consommées en Europe par le murin à oreilles échancrées sont les diptères, les araignées, les lépidoptères, les coléoptères et les névroptères (Steck et Brinkmann, 2006 ; Goiti et al., 2011 ; Kervyn et al., 2012 ; Vallejo et al., 2019 ; Alberdi et al., 2020). En observant la figure 10, ces résultats semblent correspondre puisque les 4 groupes les plus fréquents dans notre étude sont les diptères (53 taxa) puis les araignées (45), les lépidoptères (41) et les coléoptères (16).

En revanche, Kervyn et al. (2012) étant la seule étude de régime alimentaire de murins à oreilles échancrées en Wallonie, les comparaisons de nos résultats ne se feront qu'avec cet article. En effet, les autres recherches s'étendant dans des régions situées plus au Sud, dans le bassin méditerranéen ou dans le Sud de l'Allemagne, ne permettent pas de faire office de comparaison puisque les arthropodes retrouvés ne sont pas les mêmes entre ces zones géographiques.

#### b) Taxa peu observés en Wallonie

En s'intéressant aux résultats de notre étude, on remarque que des taxa ayant passé les filtres mais dont aucun individu n'a, à priori, été recensé en Belgique, persistent. Il s'agit de *Bombus gerstaeckeri*, *Euura imperfecta*, *Cnemacantha muscarian*, *Fannia sociella*, *Microtendipes brevitaris*, *Perilissus albitarsis*, et *Rheocricotopus robacki*. Comme il a été mentionné dans les résultats, ce sont des espèces européennes. De plus, la totalité de ces résultats indiquent une similarité de séquence à plus de 99% avec la base de données. Bien qu'elles ne soient pas connues en Wallonie à l'heure actuelle, ces espèces ne peuvent donc pas être considérées comme des erreurs de séquençage. Il est en effet possible de les voir se déplacer dans cette zone géographique puisque ce sont des espèces qui ont été recensées

dans des pays voisins (France, Pays-Bas et Allemagne), à l'exception de *Bombus gerstaeckeri* qui semble être plus fréquente au Sud de l'Allemagne, en Autriche et Hongrie. Cette observation n'est tout de même pas impossible puisqu'avec les changements climatiques, et plus particulièrement le réchauffement, les individus peuvent migrer vers le Nord de l'Europe pour rester dans leur gradient de températures optimales (Gaudin, 2007).

En plus de ces espèces qui ne semblent pas avoir été identifiées en Wallonie jusqu'à maintenant (absentes sur les plateformes suivantes pour le territoire belge : Observations.be et GBIF = Global Biodiversity Information Facility), d'autres sont, quant à elles, bien présentes mais en faible abondance. Bien qu'il faille être précautionneux avec la plateforme de recensement Observations.be, elle reste utile pour se donner une idée de l'abondance de certaines espèces dans notre région.

Chez les diptères, ce sont les espèces *Nephrotoma scalaris* et *Tipula truncorum* qui sont considérées comme respectivement « très rare » et « rare » dans notre région, d'après les données d'Observations.be qui recense sur sa plateforme respectivement 3 et 11 observations. Cependant, elles restent fréquentes à l'échelle du monde et ne figurent pas dans la liste rouge de l'IUCN.

D'après le catalogue des lépidoptères de Belgique, proposé par « Flemish Entomological Society » et développé par la plateforme de biodiversité belge (Flemish Entomological Society, 2022) on remarque que deux espèces au sein de cet ordre sont peu fréquentes sur le territoire Wallon. Il s'agit de deux papillons nocturnes : *Argyresthia fundella* et *Carpatolechia decorella* (respectivement 16 et 21 observations en Belgique encodées sur le portail Observation.be) que l'on retrouve cependant aisément en Europe.

Notre étude permet ainsi de montrer que certains taxa que l'on croit absents dans notre région sont en réalité toujours présents, mais persistent au sein de petites populations isolées et/ou en faible abondance à travers le territoire.

### c) *Les ravageurs*

Les 185 autres taxa ont quant à eux déjà été recensés en Belgique. Cependant, certains retiennent notre attention et plus particulièrement des espèces connues comme étant à l'origine de divers dégâts sur la faune et la flore. Parmi eux, le coléoptère, *Brassicogethes aeneus*, communément appelé « Mèligèthe du colza » a été identifié dans notre étude. Il s'agit d'un ravageur de brassicacées dont les principales dégradations sont causées sur le colza (Daniel & Messerli, 2014). *Stomoxys calcitrans* est un diptère déjà mentionné à plusieurs reprises qui pique le bétail et peut ainsi transmettre plusieurs maladies (Sharif, 2018). *Adelges cooleyi* est un hémiptère également appelé « puceron à galles ». Il doit parasiter des épicéas et douglas pour effectuer son cycle de vie (Ahern et al., 2009). *Cacopsylla melanoneura*, est un hémiptère connu pour être vecteur de phytoplasmes, des bactéries provoquant des maladies chez de nombreux arbres dont les pommiers (INRAE, 2021). *Korscheltellus lupulina*, est un lépidoptère friand de laitues. *Mamestra brassicae* est un lépidoptère faisant des ravages chez les crucifères voire sur certaines solanacées (INRAE, 2014). *Plutella xylostella* est un lépidoptère communément appelé « La Teigne du chou » puisqu'il s'attaque également aux crucifères (INRAE, 2018). Enfin, *Pyralis farinalis* est un lépidoptère dont les larves provoquent de nombreux dégâts étant donné qu'elles se nourrissent de céréales (Commission canadienne des grains, 2019).

Bien que ces espèces ne représentent que 4.2% des taxa identifiés dans cette étude, les résultats prouvent que les ME, voire d'autres espèces de chauves-souris européennes, jouent un rôle dans la lutte contre les ravageurs en agriculture. Ainsi, l'application de pesticides peut leur nuire à cause d'une réduction du nombre de proies ou de la mise en contact avec des toxines (Andriollo et al. 2021).

## 5. Diversité alpha

### a) *Les colonies*

Dans la commune d'Aubel, les taxa les plus fréquents sont les diptères bien qu'ils ne soient pas significativement plus élevés qu'ailleurs. Lorsque l'on regarde l'annexe 4 qui recense l'ensemble des espèces, nous remarquons que 14 des 53 diptères y sont présents (26.4 % de diptères). Parmi ces espèces, on retrouve *Stomoxys calcitrans*, identifié par Galan, connu comme étant une mouche d'étable qui pique le bétail. Bien que sa présence soit la plus élevée (9 individus) dans les deux communes dont la couverture forestière était la plus faible, Aubel et Aulne, c'est une espèce que l'on retrouve dans les 6 colonies. La corrélation de Pearson confirme que plus on retrouve de bovins dans une région agricole, plus l'abondance de *S. calcitrans* dans les échantillons est élevée. Le fait que l'on retrouve de l'ADN de bovins à 141 reprises, dans 109 de nos échantillons, prouve que les chauves-souris sont des prédateurs de ces diptères qui parasitent les bovins.

En revanche, *Musca autumnalis*, espèce d'intérêt quand l'on s'intéresse aux mouches vivant au contact du bétail, n'a pas été conservée suite à l'application des filtres. La méthode de classement de Razgour étant peut-être trop restrictive au niveau des taxa ne pouvant pas être identifiés jusqu'à la famille a provoqué une perte d'informations quant aux diptères présents dans le guano.

Concernant les lépidoptères, l'ensemble des résultats prouve que ce ne sont pas ces taxa qui sont aisément identifiés par les amorces de Zeale. En revanche, les barplots (figures 11 et 12) et les analyses statistiques donnent des informations à propos des colonies où ils semblent plus abondants : Aulne et Freÿr. Contrairement aux diptères et araignées où l'on cherchait un lien entre leur présence et le nombre d'étables ou le pourcentage de forêts, les lépidoptères sont quant à eux plutôt liés à la disponibilité en nourriture. Beaucoup de papillons sont liés à une plante hôte et c'est la présence de cette flore qui va induire la présence des butineurs (Curtis et al., 2015).

Les araignées représentent au minimum un quart des individus ingérés pour l'ensemble des communes sauf Orval (avec seulement 3 échantillons). Cela indiquerait que peu importe l'emplacement des colonies, c'est un taxon qui est important dans le régime alimentaire des murins à oreilles échancrées. Il faut ainsi être prudent avec les résultats. En effet, au même titre qu'avec la prédation existant entre les chiroptères, *Stomoxys calcitrans* et le bétail, il est possible de retrouver le même cas de figure avec les araignées. Ces dernières se nourrissant d'insectes, il est possible de retrouver l'ADN de leurs proies et non l'ADN des proies directes des chauves-souris, dans le guano de ces dernières. Cependant, il est très peu probable que cela soit possible dans le cadre de ce mémoire puisque l'application des filtres a permis de limiter voire de faire disparaître cette contrainte, l'ADN de la proie d'une araignée n'étant présent qu'en infime quantité dans les échantillons (Mata et al., 2021).

## b) Habitat des arthropodes

Jusqu'à présent, une comparaison des ordres entre chaque colonie a été effectuée puisque nos hypothèses se basaient essentiellement sur la présence des diptères et des araignées en fonction de la surface forestière. Cependant, il est également intéressant de connaître l'habitat principal de chacune de ces proies pour en savoir plus sur les zones de chasses des ME. Au sein de ce recensement, on y découvre des espèces forestières, de milieux ouverts et d'autres retrouvées fréquemment dans des milieux anthropisés.

Dans la colonie d'Aubel (6.3% de forêt) on retrouve effectivement peu d'arthropodes vivant dans les bois à l'exception par exemple du genre *Agriopis* (lépidoptère) qui compte des individus en session 1. Néanmoins, on identifie essentiellement des espèces de milieux ouverts et de milieux anthropisés comme les maisons ou les étables : *Drosophila funebris*, *Stomoxys calcitrans*, *Fannia canicularis*, *Musca domestica* et *Muscina stabulans*.

À Aulne, dont la surface forestière dans un rayon de 10km autour de la colonie s'élève à 17.77%, les arthropodes ont des milieux de vie plus mixtes puisque l'on retrouve aussi bien des individus de milieux ouverts et semi-ouverts (*Cantharis pellucida*, coléoptère ; *Autographa gamma*, lépidoptère) que boisés (*Nephrotoma scalaris* et *Phaonia subventa*, deux diptères).

Dans les 3 colonies les plus boisées, à savoir Freÿr (37.33%), Durbuy (38.3%) et Rochefort (44.02%), ce sont essentiellement des espèces forestières que l'on identifie pour chacun des ordres.

Enfin, quelques espèces d'arthropodes vivant proches des plans d'eau ont été recensées parmi nos échantillons. Il s'agit de *Microtendipes pedellus* (diptère ; échantillons Fre1, R3), *Larinioides sclopetarius* (araignée ; échantillons Aub1, Aul3, Fre2) et *Tetragnatha montana* (araignée ; échantillons Aul1, Fre1, Fre2, R1, R2). Ces résultats semblent cohérents avec les zones de chasse de ME qui peuvent aussi se situer en zones humides (Kervyn et al., 2022) et que des cours d'eau se trouvaient à proximité de tous ces sites (Meuse et Lesse à Freÿr, Lomme et divers étangs à Rochefort, Sambre et divers étangs à Aulne, La Bel à Aubel).

## c) Les sessions

Les diptères sont principalement ingérés en session 3 mais ne sont pas pour autant significativement plus fréquents que lors des autres passages. En session 3, on y retrouve notamment 20 des 53 taxa de diptères identifiés avec nos deux paires de primers. En s'intéressant à nouveau à *Stomoxys calcitrans*, on remarque sa présence lors des 3 sessions d'Aubel et Freÿr, des sessions 2 et 3 d'Aulne et Orval et de la session 3 pour Durbuy et Rochefort. Au cours de la période de récolte (fin mai à mi-août), les diptères sont essentiellement au stade imago, c'est-à-dire qu'il est possible que leurs prédateurs n'aient mangé que des proies au stade adulte et non des larves.

Les lépidoptères sont principalement présents en session 1 (confirmation statistique) où 30 des 41 espèces sont représentées par au moins un individu. Lors de la période de récolte, les espèces sont à des stades de développement différents. Beaucoup sont des imagos mais une partie d'entre elles sont à d'autres stades durant cette saison (Flemish Entomological Society, 2022). C'est par exemple le cas des 3 espèces du genre *Agriopis* qui ont été recensés : *A. aurantiaria*, *A. leucophaearia* et *A. marginaria*. En effet, les adultes sont

visibles soit plus tard dans l'année (*A. aurantiaria*), soit plus tôt (*A. leucophaearia* et *A. marginaria*). Ainsi, il est probable que les ME se nourrissent des chenilles de ces espèces. Cette observation est également applicable pour d'autres espèces dont le stade imago commence plus tard dans l'année : *Colotois pennaria*, *Cymatophorina diluta* (imago à partir de fin juillet mais l'identification date de juin), *Erannis defoliaria*, *Operophtera brumata*. En revanche, d'autres espèces voient leur stade imago prendre fin avant le début des captures. Il s'agit d'*Apocheima hispidaria*, *Phigalia pilosaria*, *Polyploca ridens* et *Tortricodes alternella*. Ces périodes peuvent chevaucher deux années donc il est possible que ce stade qui arrive « plus tôt » dans l'année commence en réalité entre novembre et décembre mais s'étire jusque mars voire mai. Enfin, deux espèces du genre *Orthosia* ont été identifiées lors de la première session : *O. cerasi* et *O. cruda*. Si l'on en croit leur phénologie, cette période est la fin de la saison des adultes.

Les araignées sont présentes en grand nombre au cours de tous les passages mais une tendance significative s'est marquée pour la session 1. Il est possible que ce résultat, tout comme pour les lépidoptères, soit dû à la météo de juillet 2021 où des fortes pluies sont tombées en Wallonie, ce qui a pu provoquer une réduction de ces arthropodes lors des passages 2 et 3.

Les coléoptères sont majoritairement présents au cours des sessions 1 et 2 (confirmation statistique). Durant ces périodes, 15 des 16 espèces sont présentes (hormis *Serica brunnea*). Il semblerait, tout comme pour les diptères, que l'ensemble des individus ingérés soient des imagos puisque chacun d'entre eux a été identifié lors d'une période où les imagos de ces espèces sont les plus observés en Wallonie (Observations.be).

#### d) *Indice de biodiversité : Shannon*

Quand l'on compare les colonies, l'indice de biodiversité de Shannon indique qu'Aubel, située en région herbagère, est la localité avec le plus de richesse spécifique. À contrario, Orval est celle avec la diversité la moins importante. Bien qu'ayant fait une normalisation pour remettre les colonies au même niveau, si l'on fait abstraction d'Orval et de Durbuy comme pour les modèles linéaires mixtes généralisés, c'est finalement Aulne, dans le Condroz, qui a la diversité la plus faible.

La commune d'Aubel est située dans une région bocagère avec de nombreuses exploitations laitières (SPW, 2022). La plantation de ces haies permet (1) aux chauves-souris de se déplacer plus facilement (cf. Projet Life prairies bocagères - Natagora, 2020) ; (2) d'offrir un milieu de vie attractif pour certains arthropodes. De plus, cette diversité des milieux, à savoir les grandes étendues ouvertes, le réseau de haies, la présence de bâtiments (fermes et habitations) avec une faible densité de population et quelques milieux fermés permet d'avoir une multitude de zones propices pour la chasse de ces chauves-souris, avec une diversité d'arthropodes plus importante qu'une zone essentiellement forestière ou avec des champs séparés par des barbelés (Kervyn et al., 2022). Cette région est d'ailleurs très attractive pour les ME, qui forment un grand nombre de colonies dans cette région bocagère.

Aulne est dans le Condroz, dans une zone peu boisée (17.77% de forêts dans un rayon de 10km autour de la colonie). 48.9% de cette région est consacrée à l'agriculture (contre 43.9% en région herbagère ; SPW, 2022). Lorsque l'on trace un cercle de 10km de rayon autour de l'abbaye d'Aulne, nous pouvons remarquer que le cercle intègre la moitié de la ville

de Charleroi, ce qui implique une densité de population bien plus importante que dans les autres colonies qui ne sont pas à proximité de grandes villes. La différence paysagère entre Aubel et Aulne pourrait ainsi expliquer la différence de biodiversité retrouvée entre les deux colonies.

Au niveau des sessions, c'est la seconde qui est la plus riche, c'est-à-dire celle focalisée sur le mois de juillet et la troisième, la plus pauvre, à savoir le mois d'août. En observant l'annexe 4, nous pouvons remarquer qu'en comptant le nombre d'espèces par session, les sessions 2 et 3 ont environ 50 espèces alors que la session 1 en dénombre presque 150. Cela signifie qu'au niveau du nombre d'espèces, la session 1 domine largement mais étant donné que l'abondance est également prise en compte, ce n'est pas ce passage qui a obtenu le meilleur indice. Bien que le nombre d'espèces diminue en session 2, un certain équilibre se forme, lui donnant un indice plus élevé que pour le premier passage.

## 6. Diversité bêta

### a) *Indice de biodiversité : Morisita-Horn*

D'après les résultats de l'indice de biodiversité bêta, ce sont les communes d'Aulne (Condroz) et Rochefort (Famenne) qui sont les plus proches lorsque l'on fait abstraction d'Orval et Durbuy (qui sont à l'origine les deux colonies les plus proches). En revanche, ce sont Aulne et Freÿr, les deux colonies situées dans le Condroz, qui sont les plus éloignées en termes de biodiversité. Cela signifie que même si les deux colonies se retrouvent dans la même région agricole, les différences locales sont tellement éloignées que cela fait différer les résultats. En effet, Aulne est dans une zone peu boisée près d'une grande ville et proche de la région limoneuse tandis que Freÿr est boisée à 37.33%, n'est pas proche d'une ville aussi imposante et est à la limite de la Famenne. En revanche, Rochefort avec 44.02% de bois est également dans une région anthropisée bien qu'il n'y ait pas de grande ville comme à Aulne, proche de Charleroi.

Ce sont les sessions 2 et 3 qui ont la diversité la plus éloignée. En revanche, ce sont les sessions 1 et 3 qui sont les plus proches. Cela est probablement dû à la météo de juillet 2021 (fortes pluies), isolant ainsi le second passage des 2 autres.

### b) *Analyse en composante principale*

Cette analyse a permis de confirmer qu'il existe effectivement quelques différences entre les sessions dû à une présence/absence variable des individus appartenant à 5 ordres : araignée, coléoptère, diptère, hyménoptère et lépidoptère.

Confrontés à la répartition des 137 individus selon leur score et colorés selon leur session d'échantillonnage, ces résultats sont conformes aux tendances énoncées plus haut. En effet, la session 1 est expliquée principalement par la présence d'hyménoptères et lépidoptères. C'est en effet lors de cette session que les lépidoptères se sont démarqués statistiquement par rapport aux autres sessions. Les coléoptères étaient quant à eux plus présents en sessions 1 et 2, ce qui est confirmé par ce graphique où l'ordre va à l'encontre de l'ellipse représentant la session 3. Les diptères vont dans le sens des ellipses des sessions 2 et 3 comme l'avait souligné l'analyse visuelle du barplot (figure 12).

## 7. Comparaison avec l'étude de Kervyn et al. 2012

Bien que plusieurs études aient été effectuées en Europe, c'est la seule qui puisse servir de comparaison puisque les différences géographiques des autres études peuvent engendrer des différences dans les résultats.

Comme mentionné précédemment, une étude en 2012 de Kervyn et al. a été effectuée en Wallonie sur le régime alimentaire du murin à oreilles échanquées. La récolte de cette étude s'est déroulée d'avril à octobre 1999 tandis que la nôtre s'est effectuée de fin mai à mi-août 2021. La période étant différente, il est possible de trouver quelques différences entre les études qui ne sont pas nécessairement liées aux années de récolte et aux techniques employées mais plutôt à cette durée d'échantillonnage. En revanche, les 3 ordres les plus représentés aussi bien dans ce mémoire que dans l'étude de Kervyn sont les diptères, les lépidoptères et les araignées. Cela signifie qu'en 20 ans, les mêmes ordres sont retrouvés dans les matières fécales de *Myotis emarginatus*. Étant donné que l'étude s'intéressait principalement aux diptères des étables à savoir *Musca autumnalis* et *Stomoxys calcitrans*, seules ces deux espèces ont été identifiées. Les autres taxa n'ont été identifiés qu'au niveau de la famille. Ceci ne permet malheureusement pas une comparaison poussée des espèces entre les deux études. Cependant, notre étude a permis de montrer que *Stomoxys calcitrans* est fortement représenté puisque 43 individus ont été identifiés dans nos échantillons (soit 11.4% des proies globales). Dans l'étude de Kervyn cette espèce représentait 24.5% des proies globales.

La comparaison de notre étude avec celle de Kervyn est particulièrement intéressante pour le site de Rochefort. En effet, celui-ci est le seul commun à nos deux études. L'étude précédente avait été effectuée à Rochefort, Bolland et Guirsch, les deux derniers lieux étant proches de milieux ouverts comme des pâtures.

Notre hypothèse de base tendait à suggérer que, pour cette localité dont le boisement est important autour de la colonie, les proies majoritaires seraient ainsi identifiées comme des arachnides. Visuellement, elles représentent 40% des proies ingérées à Rochefort, toutes sessions confondues. Lorsque l'on regarde l'étude de Kervyn, ce sont en effet les araignées qui étaient les plus présentes dans le guano des individus la colonie de Rochefort. Ils ont dénombré 29.4% des proies ingérées par les chauves-souris de cette localité. Bien qu'il soit admis dans les deux études que les araignées appartiennent à l'ordre le plus fréquemment rencontré dans le guano de ME, aucun résultat significatif appuyant ces données n'a pu être fourni.

Un autre point abordé au cours de ces deux études est l'ingestion de chenilles par ME. En effet, pour Rochefort, l'article Kervyn identifie 7.7% de papillons et 5.9% de chenilles parmi l'ensemble des proies. Dans notre étude ci-présente, toujours à Rochefort, les seules espèces dont l'imago est absent à la période d'échantillonnage sont : *Agriopis leucophaearia* et *Apocheima hispidaria*, (1.6% des proies). Les 7 autres espèces identifiées dans cette colonie étaient au stade adulte au moment de la récolte (6.5% des proies). Cette différence entre les deux études peut s'expliquer avec la période d'échantillonnage qui a commencé dès avril pour Kervyn et al. (2012), une période avec un nombre plus élevé de chenilles.



## 8. Réponses aux hypothèses

À présent, nous pouvons répondre clairement à nos hypothèses, émises lors de l'introduction.

**Hypothèse I1 = La composition du régime alimentaire du murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) diffère au cours de la période de mise bas et d'élevage des jeunes.**

Nous observons des résultats significatifs entre les sessions chez les trois ordres suivants : coléoptères, araignées et lépidoptères. De plus, selon les passages, nous avons remarqué que les chauves-souris mangeaient à certaines périodes les chenilles et non les papillons au stade adulte. Cela montre que selon les périodes et probablement la disponibilité en nourriture, ME va modifier la composition de son régime alimentaire en privilégiant un ordre qu'il rencontre plus fréquemment.

**Hypothèse II1 = Les colonies de murins à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) à proximité d'étables ou de bâtiments avec du bétail se nourrissent essentiellement de diptères.**

Bien que les résultats nous indiquent qu'à Aubel, colonie implantée en ferme, la fréquence des diptères s'élève à 33% dans le guano, les analyses statistiques indiquent que ce n'est pas significativement différent d'ailleurs. En effet, c'est un ordre très fréquent en Wallonie, ce qui signifie que n'importe quelle colonie a un accès presque illimité à ces arthropodes. En revanche, la présence plus importante de *Stomoxys calcitrans*, diptère d'étable, à Aubel prouve l'importance que peuvent avoir ces prédateurs dans les fermes, devenant ainsi des alliés non négligeables dans le monde de l'agriculture.

**Hypothèse II2 = Les colonies de murins à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) établies à proximité des forêts se nourrissent essentiellement d'araignées.**

Une fois de plus, la colonie de Rochefort ne s'est statistiquement pas démarquée des autres colonies en termes de quantité d'araignées ingérées. Visuellement, les pourcentages sont en effet élevés (40%) mais n'apportent pas de différences significatives dans les résultats. Ainsi, nous ne pouvons pas confirmer cette hypothèse avec nos données.

Grâce à cette étude, nous avons pu confirmer notre hypothèse concernant la variation du régime alimentaire de ME dans le temps mais nos hypothèses focalisées sur la géographie n'ont pas pu l'être. En revanche, les deux autres ordres les plus fréquents dans nos échantillons sur lesquels aucune hypothèse n'a été émise, à savoir les coléoptères et les lépidoptères ont prouvé que statistiquement parlant, ils sont plus fréquents dans certaines colonies. En effet, les coléoptères sont plus fréquents à Rochefort tandis que les lépidoptères le sont plus à Aulne et à Freÿr traduisant une variation spatiale pour ces ordres.

## 9. Ouvertures vers des plans de gestion de l'espèce

Suite aux résultats de cette étude, nous pouvons remarquer que ME ne va pas chasser systématiquement dans le bâtiment dans lequel la colonie est implantée puisque par exemple, des mouches d'étables se retrouvent dans le guano d'individus venant des 6 communes alors

que seule la colonie d'Aubel est située dans une ferme. Ce résultat était attendu dans le sens où les colonies sont implantées dans des gîtes offrant les meilleures conditions pour la mise-bas et l'élevage des jeunes, critère crucial pour la survie et la pérennité de l'espèce. La sélection des sites de chasse est quant à elle plus flexible et les ME peuvent ainsi chasser dans des milieux bien distincts, à savoir des milieux aussi bien ouverts que fermés, qui ne sont pas spécialement à proximité du gîte (Kervyn et al., 2022).

Bien qu'il ne soit pas recommandé de faire des captures lors de la période de lactation pour ne pas perturber les mères et les jeunes, il serait intéressant d'organiser des captures et de la télémétrie à la fin de cette période (fin août), avant le début de la période de swarming (reproduction). Cela permettrait d'obtenir des précisions à propos des chemins qui sont empruntés par les individus ainsi que la distance jusqu'à laquelle ils vont pour se nourrir. En fonction des résultats obtenus, il serait alors intéressant d'aménager leurs territoires de chasse. Cela inclurait aussi bien les couloirs de vol que la zone dans laquelle ils sont pour chasser. En effet, il est possible que certains individus volent au niveau de route éclairées ou près de zones trop ouvertes pour pouvoir se nourrir plus loin. Ainsi une diminution de la luminosité ou l'aménagement de haies pourraient être les bienvenus pour diminuer les risques de perturbations lors de leurs déplacements.

De plus, d'après nos résultats, beaucoup d'individus semblent aller dans ou à proximité d'étables. Il serait donc utile de recenser ces bâtiments pour savoir le type d'étable et le mode de fonctionnement de celle-ci (temps de luminosité par exemple) et ainsi appliquer ces critères pour un maximum de fermes, afin d'augmenter les terrains de chasses des chauves-souris et potentiellement diminuer la présence de diptères néfastes pour le bétail dans ces milieux.

Enfin, la présence de ravageurs des récoltes dans nos échantillons prouve l'efficacité des chauves-souris dans la lutte contre ces insectes. A l'avenir, une prise en compte de ces prédateurs en agriculture pourrait être intéressante en réduisant les pulvérisations de pesticides et en faisant des aménagements pour les chiroptères en bordure de champs (exemple, Mesures Agro Environnementales) afin de les attirer dans ces zones propices à la chasse.

## V. Conclusion

Cette étude avait pour objectif principal d'en savoir d'avantage sur la variation temporelle et spatiale du régime alimentaire du murin à oreilles échanquées dans notre région, tout au long de la période de mise-bas et d'élevage des juvéniles. Pour estimer ces variations, une récolte de matières fécales dans 6 colonies wallonne s'est déroulée entre fin mai et mi-août 2021, à 3 reprises. Ensuite, les échantillons ont été analysés en laboratoire à l'aide du métabarcoding et du séquençage à haut débit.

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer une variation temporelle dans le régime alimentaire de ME. En revanche, la variation spatiale, prenant en compte les diptères et les araignées dans le guano, selon les types de milieux situés aux alentours des colonies, n'a pu être confirmée dans cette étude. En effet, aucun résultat significatif n'a été observé quant au fait que nous retrouvons plus de diptères dans des colonies proches des fermes et plus de d'araignées dans les colonies proches des forêts, comme mentionné dans la littérature.

La liste détaillée des arthropodes ingérés ainsi que leur écologie ont permis d'offrir des informations plus larges à propos des zones de chasses de leur prédateur. En effet, bien que ME soit connu pour avoir des milieux de chasse très différents, nous avons eu l'occasion d'en avoir la confirmation avec la présence de proies vivant aussi bien dans les milieux fermés, ouverts, semi-ouverts, anthropisés et proches de cours d'eau ou d'eaux stagnantes.

De plus, parmi ces proies, des espèces peu fréquentes voire pas encore observées en Wallonie ont été recensées dans cette étude. Ces observations peuvent donner espoir sur le fait que certaines populations que l'on croyait disparues sont encore présentes sur le territoire. Elles montrent aussi que certaines espèces sont maintenant établies ou de passage en Wallonie alors qu'aucun recensement n'avait été effectué jusqu'à ce jour. C'est par exemple le cas de *Bombus gerstaeckeri*, généralement retrouvé vers l'Autriche et qui pourrait remonter aujourd'hui dans des latitudes situées plus au Nord à causes des changements climatiques.

Enfin, des ravageurs de récoltes et des diptères connus pour induire des maladies au bétail après l'avoir piqué ont été identifiés dans nos échantillons. Cela prouve que les chauves-souris jouent un rôle essentiel en agriculture en luttant contre ces insectes. Ces résultats doivent être pris en compte dans le milieu agricole pour les années futures puisque les pesticides sont néfastes pour ces prédateurs, alors que ces derniers pourraient au contraire être utilisés comme alliés, en tant que régulateurs des populations de diptères. Un intérêt particulier s'est porté sur *Stomoxys calcitrans*, un diptère piquant le bétail, pouvant ainsi leur transmettre certains pathogènes. Bien qu'une seule des colonies étudiées était implantée dans une ferme (Aubel), ce diptère a répondu présent, bien que chez moins d'individus, dans les cinq autres colonies également. Cela souligne l'omniprésence de cet insecte ainsi que le rôle que jouent les chauves-souris en s'en nourrissant, qu'elles soient implantées dans des bâtiments agricoles ou non.

## VI. Bibliographie

André, A., Mouton, A., Millien, V., Michaux, J. (2017). Liver microbiome of *Peromyscus leucopus*, a key reservoir host species for emerging infectious diseases in North America. *Infect Genet Evol.* 2017 Aug;52:10-18. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.011. PMID: 28412525.

Ahern, R.G., Hawthorne, D.J., & Raupp, M.J. (2009). Phylogeography of a specialist insect, *Adelges cooleyi*: historical and contemporary processes shape the distribution of population genetic variation. *Molecular Ecology* (2009) 18, 343–356. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04034.x

Aizpurua, O., & Alberdi, A. (2020). Mapping the pressure of natural predators on pest arthropods. *Authorea*. DOI: 10.22541/au.158981075.53963117

Aizpurua, O., Budinski, I., Georgiakakis, P., Gopalakrishnan, S., Ibañez, C., Mata, V., Rebelo, H., Russo, D., Szodoray-Parádi, F., Zhelyazkova, V., Zrnčić, V., Gilbert, M.T.P., Alberdi, A. (2018). Agriculture shapes the trophic niche of a bat preying on multiple pest arthropods across Europe: Evidence from DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* ; 27(3):815-825. Doi : 10.1111/mec.14474

Alberdi, A., Razgour, O., Aizpurua, O., Novella-Fernandez, R., Aihartza, J., Budinski, I., Garin, I., Ibañez, C., Izagirre, E., Rebelo, H., Russo, D., Vlaschenko, A., Zhelyazkova, V., Zrnčić V., & Gilbert, M.T.P. (2020). DNA metabarcoding and spatial modelling link diet diversification with distribution homogeneity in European bats. *Nat Commun* 11, 1154. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14961-2>

Aligon, D., Bonneau, J., Garcia, J., Gomez, D., & Le Goff, D. (2010). Projet d'estimation des risques sanitaires : Estimation des expositions de la population générale aux insecticides : les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthrinoïdes. [https://documentation.ehesp.fr/memoires/2010/persan\\_igs/insecticides.pdf](https://documentation.ehesp.fr/memoires/2010/persan_igs/insecticides.pdf)

Alix, A., Barriuso, E., Bedos, C., Bonicelli, B., Caquet, T., Dubus, I., Gascuel, C., Gril, J-J., & Voltz, M. (2005). Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et CEMAGREF.

Ancillotto, L., Ariano, A., Nardone, V., Budinski, I., Rydell, J., & Russo, D. (2017). Effects of free-ranging cattle and landscape complexity on bat foraging: Implications for bat conservation and livestock management, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 241, Pages 54-61, ISSN 0167-8809, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.001>

Ando, H., Mukai, H., Komura, T., Dewi, T., Ando, M., & Isagi Y. (2020). Methodological trends and perspectives of animal dietary studies by noninvasive fecal DNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4), 391-406. <https://doi.org/10.1002/edn3.117>

Andriollo, T., Gillet, F., Michaux, J. R., & Ruedi, M. (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>

Andriollo, T., Michaux, J. R., & Ruedi, M. (2021). Food for everyone : Differential feeding habits of cryptic bat species inferred from DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 30(18), 4584-4600. <https://doi.org/10.1111/mec.16073>

Aubertot J.N., J.M. Barbier, A. Carpentier, J.J. Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, I. Savini, M. Voltz (éditeurs), (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique collective, synthèse du rapport, INRA et Cemagref (France), 64 p. <https://www.inrae.fr/sites/default/files/pdf/synthese-expertise-68-pages.pdf>

Barouki, R. (2013). Environnement et santé : les leçons des pesticides. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 235–236. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013293001>

Bensettiti, F. & Gaudillat, V. (2004). Cahiers d'habitats Natura 2000. Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 7. Espèces animales. La Documentation française. 353 pp. <https://inpn.mnhn.fr/docs/cahab/fiches/1321.pdf>

Bowler, D.E., Heldbjerg, H., Fox, A.D., de Jong, M., Bohning-Gaese, K. (2019). Long-term declines of European insectivorous bird populations and potential causes. *Conservation Biology*, Vol. 33, Issue 5, 1120-1130. <https://doi.org/10.1111/cobi.13307>

Carravieri, A., & Scheifler, R. (2005). Effets des substances chimiques sur les Chiroptères : état des connaissances - Rapport bibliographique. [https://plan-actions-chiropteres.fr/sites/default/files/fichiers/effets\\_substanceschimiques\\_chiropteres\\_umrchrono-environnement\\_univfc\\_2012.pdf](https://plan-actions-chiropteres.fr/sites/default/files/fichiers/effets_substanceschimiques_chiropteres_umrchrono-environnement_univfc_2012.pdf)

Chauves-souris du Canada (s.d.). Chauves-souris aux abris. Consulté le 01/03/2022 sur <https://chauve-souris.ca/>

Cini, A., Ioriatti, C., & Anfora, G. (2012). A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *BULLETIN OF INSECTOLOGY*, 65 (1): 149-160. handle: <http://hdl.handle.net/10449/21029>

Clare, E. L., Symondson, W. O. C., Broders, H., Fabianek, F., Fraser, E. E., MacKenzie, A., Boughen, A., Hamilton, R., Willis, C. K. R., Martinez-Nuñez, F., Menzies, A. K., Norquay, K. J. O., Brigham, M., Poissant, J., Rintoul, J., Barclay, R. M. R., & Reimer, J. P. (2014). The diet of *Myotis lucifugus* across Canada : Assessing foraging quality and diet variability. *Molecular Ecology*, 23(15), 3618-3632. <https://doi.org/10.1111/mec.12542>

Clarke, L.J., Soubrier, J., Weyrich, L.S. & Cooper, A. (2014). Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. *Mol. Ecol. Resour.* **14**, 1160–1170 (2014). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12265>

Commission canadienne des grains. (2019). Pyrale de la farine. Consulté le 10/08/2022 sur <https://www.grainscanada.gc.ca/fr/qualite-grains/gestion/identification-insectes/insectes-ravageurs-secondaires/pyrale-farine.html?wbdisable=true>

Curtis, R. J., Brereton, T. M., Dennis, R. L. H., Carbone, C., & Isaac, N. J. B. (2015). Butterfly abundance is determined by food availability and is mediated by species traits. *Journal of Applied Ecology*, 52(6), 1676–1684. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12523>

Daniel, C. & Messerli, N. (2014). Fiche technique – Méléigèthe du colza. Institut de recherche de l'agriculture biologique (FiBL). Consulté le 10/08/2022 sur <https://www.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1484-meligethe-du-colza.pdf>

Dekeukeleire, D., Janssen, R., Delbroek, R., Raymaekers, S., Batsleer, F., Belien, T., & Vesterinen, E.J. (2021). First molecular evidence of an invasive agricultural pest, *Drosophila suzukii*, in the diet of a common bat, *Pipistrellus pipistrellus*, in Belgian orchards. *Journal of Bat Research & Conservation*. DOI: 10.14709/BarbJ.13.1.2020.18

Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

Elbrecht, V., Braukmann, T.W.A., Ivanova, N.V., Prosser, S.W.J., Hajibabaei, M., Wright, M., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N., Steinke, D. (2019). Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ* 7:e7745 <https://doi.org/10.7717/peerj.7745>

Etat de l'environnement wallon (2022). Tendances de la production animale : secteur animal. Consulté le 19/08/2022 sur <http://etat.environnement.wallonie.be/contents/indicatorsheets/AGRI%203.html>

Eurobats (s.d.). *Myotis emarginatus*. Consulté le 16/02/2022 sur <https://www.eurobats.org/>

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. doi:10.1186/2049-2618-2-6

Flemish Entomological Society (2022). Catalogue of the Lepidoptera of Belgium. Consulté le 22/08/2022 sur <https://projects.biodiversity.be/lepidoptera/>

Frantz, A.C., Viglino, A., Wilwert, E., Cruz, A-P., Wittische, J., Weigand, A. M., Buijk, J., Nyssen, P., Dekeukeleire, D., Dekker, JJA., Horsburgh, G.J., Schneider, S., Lang, M., Caniglia, R., Galaverni, M., Schleimer, A., Bücs, S-L., & Pir, J.B. (2022). Conservation by trans-border cooperation: population genetic structure and diversity of geoffroy's bat (*Myotis emarginatus*) at its north-western european range edge. *Biodivers Conserv.* <https://doi.org/10.1007/s10531-022-02371-3>

Galan, M., Pons, J.-B., Tournayre, O., Pierre, E., Leuchtman, M., Pontier, D. & Charbonnel, N. (2017). Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their preys: application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, 18, 474–489. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749>

Gaudin, S. (2007). Prise en compte des changements climatiques dans la distribution et l'évolution des êtres vivants. Conférence donnée à la cité des Sciences. Consulté le 10/08/2022 sur [http://www.sylvaingaudin.fr/PDF/Sesnr22-Changement\\_climatique.pdf](http://www.sylvaingaudin.fr/PDF/Sesnr22-Changement_climatique.pdf)

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. <https://doi.org/10.25225/fozo.v60.i1.a3.2011>

Gonsalves, L., Bicknell, B., Law, B., Webb, C., & Monamy, V. (2013). Mosquito Consumption by Insectivorous Bats: Does Size Matter? *PLoS ONE* 8(10): e77183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077183>

Hallmann, C., Foppen, R., van Turnhout, C. et al. Le déclin des oiseaux insectivores est associé à des concentrations élevées de néonicotinoïdes. *Nature* 511, 341–343 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13531>

Hautier, L. (2003). Impacts sur l'entomofaune indigène d'une coccinelle exotique utilisée en lutte biologique. TFE. Université Libre de Bruxelles, IGEAT. [https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/addpages/andrey\\_ukrainsky\\_library/references\\_files/hautier03.pdf](https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/addpages/andrey_ukrainsky_library/references_files/hautier03.pdf)

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270, 313-321.

INRAE - Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (2014). *Mamestra brassicae* (Noctuelle du chou). Consulté le 10/08/2022 sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19280/Biocontrol-Mamestra-brassicae-Noctuelle-du-chou>

INRAE - Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (2021). *Plutella xylostella*, Caractéristiques du ravageur et de ses dégâts. Consulté le 10/08/2022 sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/16678/Hypp-encyclopedie-en-protection-des-plantes-Caracteristiques-du-ravageur-et-de-ses-degats>

INRAE - Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (2021). Prolifération du pommier : Biologie, épidémiologie. Consulté le 10/08/2022 sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/21919/Pomme-Biologie-epidemiologie>

Jourdheuil, P., Grison, P., Fraval, A. (1991) La lutte biologique : un aperçu historique. *COURRIER DE LA CELLULE ENVIRONNEMENT INRA*, INRA, 15 (15), pp.37-60. hal-01207929

Kasso, M., & Balakrishnan, M. (2013). Ecological and economic importance of bats (Order Chiroptera). *International Scholarly Research Notices*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/187415>

Keck, F., & Morvan, A. (2021). Chauves-souris. Rencontres aux frontières entre les espèces. Livre édité par le CNRS Edition.

Kervyn, T., Godin, M. C., Jocqué, R., Grootaert, P., & Libois, R. (2012). Web-building spiders and blood-feeding flies as prey of the notch-eared bat (*Myotis emarginatus*). *Belgian Journal of Zoology*, 142(1), 59–67. <http://hdl.handle.net/2268/124356>

Kervyn, T., Lamotte, S., Nyssen, P. & Verschuren, J. (2009). Major decline of bat abundance and diversity during the last 50 years in southern Belgium. *Belg. J. Zool.*, 139 (2) : 124-132. [https://www.researchgate.net/publication/270577787\\_Major\\_decline\\_of\\_bat\\_abundance\\_and\\_diversity\\_during\\_the\\_last\\_50\\_years\\_in\\_southern\\_Belgium](https://www.researchgate.net/publication/270577787_Major_decline_of_bat_abundance_and_diversity_during_the_last_50_years_in_southern_Belgium)

Kervyn, T., Nyssen, P., Lamotte, S., & Gathoye, J-L. (2022). Murin à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*). Biodiversité Wallonie . <http://biodiversite.wallonie.be/fr/myotis-emarginatus.html?IDD=50333765&IDC=325>

Kervyn, T., Nyssen, P., Lamotte, S., Gathoye, J-L. & Smits, Q. (2020). Oreillard gris (*Plecotus austriacus*). La biodiversité en Wallonie. <http://biodiversite.wallonie.be/fr/plecotus-austriacus.html?IDD=50333777&IDC=325>

Kirsch, R.A., Tupinier, Y., Beuneux, G., & Rainho, A. (2002). Contributions à l'inventaire chiroptérologique de la Nouvelle-Calédonie : Chiroptera Pacifica, Missions 2000 & 2001, Rapport final et recommandations. SFEPM, Groupe Chiroptères Outre-Mer. [https://www.researchgate.net/profile/Ana-Rainho-2/publication/291347560\\_Contributions\\_a\\_l'inventaire\\_chiropterologique\\_de\\_la\\_Nouvelle-Caledonie\\_Chiroptera\\_Pacifica\\_Missions\\_2000\\_2001\\_RAPPORT\\_FINAL\\_et\\_Recommandations/links/56a1658408ae984c4498e4f6/Contributions-a-l'inventaire-chiropterologique-de-la-Nouvelle-Caledonie-Chiroptera-Pacifica-Missions-2000-2001-RAPPORT-FINAL-et-Recommandations.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ana-Rainho-2/publication/291347560_Contributions_a_l'inventaire_chiropterologique_de_la_Nouvelle-Caledonie_Chiroptera_Pacifica_Missions_2000_2001_RAPPORT_FINAL_et_Recommandations/links/56a1658408ae984c4498e4f6/Contributions-a-l'inventaire-chiropterologique-de-la-Nouvelle-Caledonie-Chiroptera-Pacifica-Missions-2000-2001-RAPPORT-FINAL-et-Recommandations.pdf)

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., & Meyer, A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS*. 86 (16) 6196-6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>

Illumina (2021). Nextera DNA Indexes. Consulté le 28/07/2022 sur <https://support-docs.illumina.com/SHARE/AdapterSeq/Content/SHARE/AdapterSeq/Nextera/DNAIndexesNXT.htm>

La biodiversité en Wallonie (s.d.). Actions. Consulté le 16/02/2022 sur <http://biodiversite.wallonie.be/fr/actions.html?IDC=3980>

Les services écosystémiques en Wallonie (s.d.). Contrôle biologique. Consulté le 06/04/2022 sur <https://services-ecosystemiques.wallonie.be/fr/controle-biologique.html?IDC=5911&IDD=3980>

Mahé, F., Czech, L., Stamatakis, A., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., & Rognes, T. (2022). Swarm v3: Towards tera-scale amplicon clustering. *Bioinformatics*, 38(1), 267-269. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab493>

Map Developers, [https://www.mapdevelopers.com/area\\_finder.php](https://www.mapdevelopers.com/area_finder.php).



Marcel, M. (2011). "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads" EMBnet.journal, [S.l.], v. 17, n. 1, p. pp. 10-12. ISSN 2226-6089. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Maslo, B., Mau, R. L., Kerwin, K., McDonough, R., McHale, E., & Foster, J. T. (2022). Bats provide a critical ecosystem service by consuming a large diversity of agricultural pest insects. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 324, 107722. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107722>

Mata, V.A., Da Silva, L.P., Verissima, J., Horta, P., Raposeira, H., McCracken, G.F., Rebelo, H. & Beja P. (2021). Combining DNA metabarcoding and ecological networks to inform conservation biocontrol by small vertebrate predators. *Ecological Applications*, 31(8), 2021, e02457. 10.1002/eap.2457

Montauban, C., Mas, M., Wangensteen, O. S., Sarto i Monteys, V., Fornós, D. G., Mola, X. F., & López-Baucells, A. (2021). Bats as natural samplers: First record of the invasive pest rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus* in the Iberian Peninsula. *Crop Protection*, 141, 105427. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105427>

Nabet, F. (2005). Les chauves-souris de Chartreuse : biologie et mesures de protection. Thèse présentée à l'école vétérinaire de Lyon. [http://www2.vetagro-sup.fr/bib/fondoc/th\\_sout/th\\_pdf/2005lyon132.pdf](http://www2.vetagro-sup.fr/bib/fondoc/th_sout/th_pdf/2005lyon132.pdf)

Natagora (s.d.). Brochure : petit voyage parmi nos chauves-souris. Consulté le 10/02/2022 sur [https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole\\_Plecotus/biblio/Brochure\\_Nos-chauves-souris\\_BR\\_1\\_.pdf](https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole_Plecotus/biblio/Brochure_Nos-chauves-souris_BR_1_.pdf)

Natagora (2020). LE PROJET LIFE PRAIRIES BOCAGERES : Bilan de 8 années d'actions en faveur de la biodiversité des prairies de Fagne-Famenne. [https://www.lifeprairiesbocageres.eu/fileadmin/Life/Prairies\\_bocageres/laymans\\_report\\_FINAL\\_BQ.pdf](https://www.lifeprairiesbocageres.eu/fileadmin/Life/Prairies_bocageres/laymans_report_FINAL_BQ.pdf)

Nerlove, M. (1994). Le développement de l'agriculture, la croissance de la population et l'environnement. *L'Actualité économique*, 70(4), 359–382. <https://doi.org/10.7202/602155ar>

Nyssen, P., San Martin, G., Smits, Q., Boers, K., Van der Wijden, B., Willems, W., Gyselngs, R. & De Bruyn L. (2017). Suivi des populations de chauves-souris en Belgique grâce aux recensements hivernaux. Colloque belge chauves-souris. [https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole\\_Plecotus/biblio/inventaires\\_chiro\\_hivernal.pdf](https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole_Plecotus/biblio/inventaires_chiro_hivernal.pdf)

Oswald, N. (2021). Ethanol Precipitation of DNA and RNA: How it Works. BiteSizeBio. Consulté le 19/04/2022 sur <https://bitesizebio.com/253/the-basics-how-ethanol-precipitation-of-dna-and-rna-works/>

O'Rourke, D. R., Bokulich, N. A., Jusino, M. A., MacManes, M. D., & Foster, J. T. (2020). A total crapshoot? Evaluating bioinformatic decisions in animal diet metabarcoding analyses. *Ecology and Evolution*, 10(18), 9721–9739. <https://doi.org/10.1002/ece3.6594>

Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M. (2013). Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods*. 2013 Dec;10(12):1200-2. doi: 10.1038/nmeth.2658.

Piro, R.S. (2020). Epigenetics of the Immune System. Volume 16 in *Translational Epigenetics*. Chapter 7 - Sequencing technologies for epigenetics: From basics to applications. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817964-2.00007-1>. Book edited by Dieter Kabelitz and Jaydeep Bhat.

Pison, G. (2019). Atlas de la population mondiale. Croissance démographique, vieillissement et migrations : trois grands défis pour l'humanité.

Plecotus (s.d.). Consulté le 16/02/2022 sur <https://plecotus.natagora.be/>

Puig-Montserrat, X., Flaquer, C., Gómez-Aguilera, N., Burgas, A., Mas, M., Tuneu-Corral, C., Marquès, E., & Lopez-Baucells, A. (2020). Bats actively prey on mosquitoes and other deleterious insects in rice paddies: Potential impact on human health and agriculture. *Pest Management Science*, 76. <https://doi.org/10.1002/ps.5925>

QIAGEN (2010). QIAamp® Fast DNA - Stool Mini Handbook. For fast purification of genomic DNA from stool samples. Consulté le 17/02/2022 sur <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-fast-dna-stool-mini-kit/>

Razgour, O., Clare, E.L., Zeale, M.R., Hanmer, J., Schnell, I.B., Rasmussen, M., Gilbert, T.P., & Jones, G. (2021). High-throughput sequencing offers insight into mechanisms of resource partitioning in cryptic bat species. *Ecol Evol*. 2011 Dec;1(4):556-70. <https://doi.org/10.1002/ece3.49>

Russo, D., Salinas-Ramos, V.B, Cistrone, L., Smeraldo, S., Bosso, L., & Ancillotto, L. (2021). Do we need to use bats as bioindicators? July 2021. *Biology* 10(8):693. DOI: 10.3390/biology10080693

Sharif, S., (2018). Thèse : *Stomoxys calcitrans* : évaluation du rôle dans la transmission de *Besnoitia besnoiti* et nouveaux moyens de contrôle. [https://oatao.univ-toulouse.fr/25205/1/Sharif\\_shukri.pdf](https://oatao.univ-toulouse.fr/25205/1/Sharif_shukri.pdf)

Smits, Q., & van Vyve, C., (2021). Mise à jour de la liste rouge des chauves-souris en Wallonie. L'écho des Rhinos, n°111, page 18. [https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole\\_Plecotus/Echos\\_des\\_rhinos/EDR111.pdf](https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole_Plecotus/Echos_des_rhinos/EDR111.pdf)

SPW (2022). Wallonie agriculture : Régions agricoles de Wallonie. Consulté le 22/08/2022 sur [https://etat-agriculture.wallonie.be/contents/indicator sheets/EAW-A\\_I\\_d\\_2.html](https://etat-agriculture.wallonie.be/contents/indicator sheets/EAW-A_I_d_2.html)

Steck, C. E., & Brinkmann, R. (2006). The trophic niche of the Geoffroy's bat (*Myotis emarginatus*) in south-western Germany. *Acta Chiropterologica*, 8(2), 445–450. <https://doi.org/10.3161/150811006779398573>

Tell, L.A., Foley, J., Needham, M.L., & Walker, R.L. (2003). Comparison of four rapid DNA extraction techniques for conventional polymerase chain reaction testing of three *Mycobacterium* spp. that affect birds. *Avian Dis.* 2003 Oct-Dec;47(4):1486-90. doi: 10.1637/7070. PMID: 14709001.

ThermoFisher (2022). Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent and Kit. Consulté le 12/04/2022 sur <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp07581.pdf>

Tournayre, O., Leuchtman, M., Filippi-Codaccioni, O., Trillat, M., Piry, S., Pontier, D., Charbonnel, N., & Galan, M. (2020). In silico and empirical evaluation of twelve metabarcoding primer sets for insectivorous diet analyses. *Ecology and evolution*, 10(13), 6310–6332. <https://doi.org/10.1002/ece3.6362>

Utilisation de l'espace agricole. (2020). Etat de l'environnement wallon <http://etat.environnement.wallonie.be/contents/indicatorsheets/AGRI%201.html#>

Vallejo, N., Aihartza, J., Goiti, U., Arrizabalaga-Escudero, A., Flaquer, C., Puig, X., Aldasoro, M., Baroja, U., & Garin, I. (2019). The diet of the notch-eared bat (*Myotis emarginatus*) across the Iberian Peninsula analysed by amplicon metabarcoding. *Hystrix*, 30(1), 59-64. Scopus. <https://doi.org/10.4404/hystrix-00189-2019>

Vamos E, Elbrecht V, Leese F (2017) Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1: e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>

van der Werf, H.M.G. (1997) Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, Paris : Institut national de la recherche agronomique. Délégation permanente à l'environnement, 31 (31), pp.5-22. hal-01204849

van Schaik J, Janssen R, Bosch T, Haarsma A-J, Dekker JJA, Kranstauber B (2015) Bats Swarm Where They Hibernate: Compositional Similarity between Autumn Swarming and Winter Hibernation Assemblages at Five Underground Sites. *PLoS ONE* 10(7): e0130850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130850>

van Vyve, C. (2021). La spermathèque des chauves-souris. *L'écho des Rhino*, n°110, page 17. [https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole\\_Plecotus/Echos\\_des\\_rhinos/EDR-110.pdf](https://plecotus.natagora.be/fileadmin/Pole_Plecotus/Echos_des_rhinos/EDR-110.pdf)

Vandeventer, P. E., Weigel, K. M., Salazar, J., Erwin, B., Irvine, B., Doebler, R., Nadim, A., Cangelosi, G. A., & Niemz, A. (2011). Mechanical Disruption of Lysis-Resistant Bacterial Cells by Use of a Miniature, Low-Power, Disposable Device. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.02171-10>

Warot, S.F. (2018). Caractérisation moléculaire et isolements reproducteurs chez des auxiliaires de lutte biologique. *Biologie animale*. hal-03236272 <https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-03236272>

Wu, C.-H., Lin, C.-L., Wang, S.-E., & Lu, C.-W. (2020). Effects of imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, on the echolocation system of insectivorous bats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.010>

Zeale, M. R. K., Butlin, R. K., Barker, G. L. A., Lees, D. C., & Jones, G. (2011). Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources*, 11, 236–244. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02920.x>

## VII. Annexes

Annexe 1 : Grands rhinolophes.....	60
Annexe 2 : Détails supplémentaires des étapes effectuées en laboratoire.....	61
Annexe 3 : Fichier reçu suite aux analyses bio-informatiques .....	64
Annexe 4 : Taxa identifiés par la base de donnée BOLD sur les primers de Galan et de Zeale .....	65
Annexe 5 : Biplot - ACP lieux.....	70

Annexe 1 : Grands rhinolophes



Figure 15 : Annexe 1 - Photographie de grands rhinolophes, Freÿr (Quentin Smits)

### Extraction d'ADN

Tout d'abord (Figure 16 ; 1), les échantillons, conservés dans des tubes Eppendorf de 2mL contenant 1 mL d'éthanol, ont été sortis du congélateur, puis mis dans la centrifugeuse 30 secondes à vitesse maximale (14 800 rpm) pour que l'ensemble de contenu se retrouve au fond de l'Eppendorf. A l'aide de micropipettes, l'éthanol a été retiré des tubes en 2 fois, afin d'enlever le plus grand volume possible de cet agent conservateur qui pourrait interférer avec l'extraction de l'ADN. Malgré cela, l'éthanol est privilégié à l'eau pour la conservation de nos échantillons puisque l'ADN est insoluble dans l'éthanol. De plus, cet alcool a une constante diélectrique plus faible que l'eau, ce qui permet à l'ADN de précipiter (Oswald, 2021). Chaque échantillon a été recentrifugé 3 minutes à 6000 rpm entre ces deux étapes. Une fois les tubes vidés de leur éthanol, les échantillons de guano ont été transférés dans des tubes de 2 mL contenant 400 mg de billes de zircon-silice. Ces tubes ont préalablement été manuellement remplis avec 200 mg de billes de 0.1 mm et 200 mg de 0.5 mm, à l'aide d'une balance analytique, puis placés sous rayonnements ultraviolets pendant 30 minutes pour éliminer toute contamination par des acides nucléiques. Le guano a alors été ajouté à ces tubes à l'aide d'une pince métallique, désinfectée entre chaque échantillon (plongée dans de l'éthanol pur, passée dans une flamme puis dans de l'eau pure).

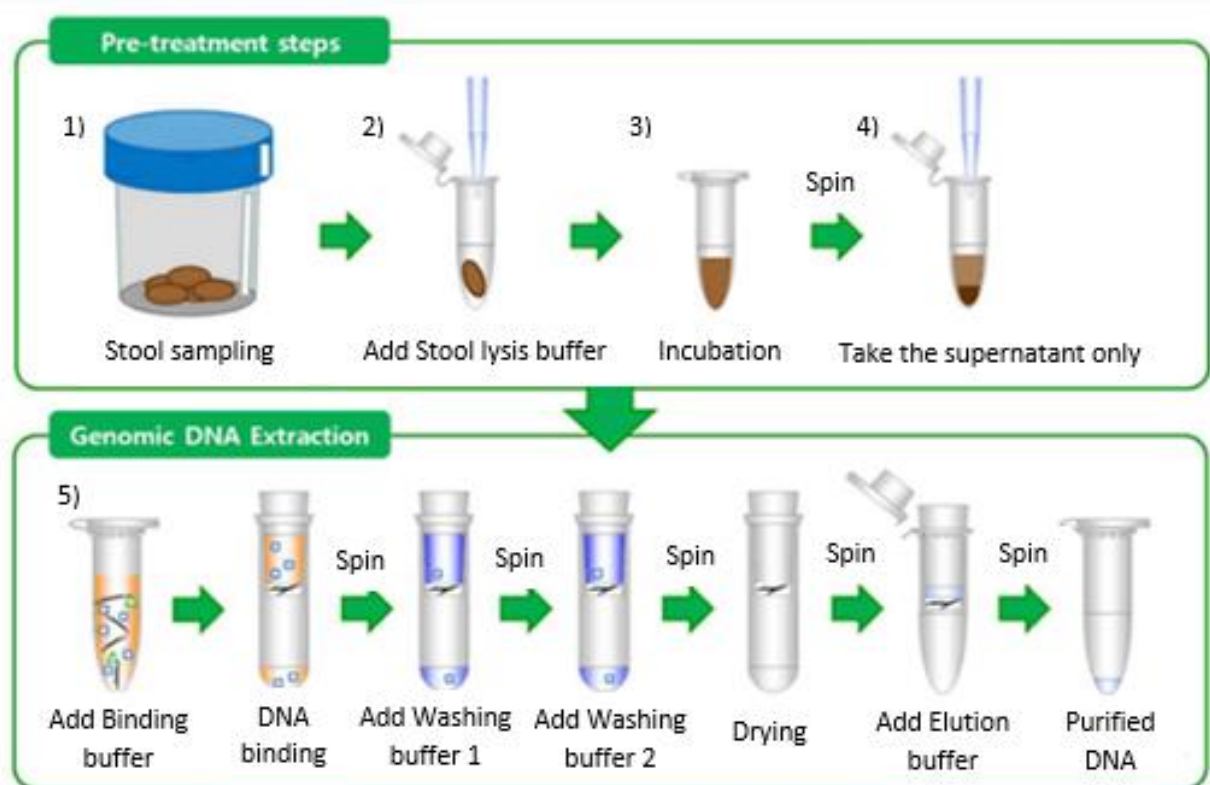


Figure 16 : Annexe 2 - Etapes de la préparation à l'extraction et de l'extraction d'ADN( Snow Leopard Preservation Project)

Lorsque les tubes contiennent les billes et l'échantillon (Figure 16 ; 2), 1 mL d'Inhibitex<sup>®</sup>, préalablement chauffé pour être homogène, a été ajouté. Ce produit permet d'inhiber tous les agents inhibiteurs de PCR comme, par exemple, l'urée dans notre cas. Ensuite, les tubes ont été vortexés afin d'effectuer un premier mélange. Les tubes ont été transférés dans un TissueLyserII (QIAGEN, 2010), pour être agités pendant 3 min à 30 Hz. De cette agitation découlent de multiples chocs des billes sur la paroi des bactéries et levures, libérant ainsi leur

ADN. C'est une technique plus efficace que les chocs thermiques, par exemple (Tell et al., 2003), pour lyser les parois des bactéries gram positives. La combinaison de deux types de tailles de billes permet d'augmenter l'efficacité de la lyse en ciblant des micro-organismes de différentes tailles (Vandevanter et al., 2011). Suite à cela, (Figure 16 ; 3), les tubes ont été placés dans un incubateur à 95°C pendant 5 min, puis vortexés 30 secondes. La centrifugation qui suit (Figure 9 ; 4) a duré une minute et a permis de séparer le surnageant des résidus solides restants. Dans de nouveaux eppendorfs de 2 mL, 200 µL de surnageant de chaque échantillon ont été transférés. Les eppendorfs ont finalement été centrifugés 15 secondes pour éliminer les potentielles gouttelettes restantes sur les parois du tube. Les étapes suivantes (digestion des protéines, fixation de l'ADN à la membrane des colonnes, lavage des colonnes et élution) ont été automatisées dans un QIAcube (Figure 17 ; 5 et figure 16), suivant une version modifiée du protocole QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit - Isolation of DNA from stool for pathogen detection. Pour préparer cette dernière étape, tous les éléments nécessaires à l'extraction ont été disposés dans le QIAcube: les eppendorfs contenant les échantillons (le surnageant, figure 17 ; 4), les solutions tampons (5 buffers : AL, éthanol, AW1, AW2 et ATE, visibles figure 17 ; 5), la protéinase K (figure 17 ; 2), des tips de 1000 µL et de 200 µL (figure 17 ; 3), un nouvel eppendorf de 1,5 mL qui sera le réceptacle de fin pour notre échantillon et une colonne qui sert à retenir l'ADN à l'aide d'une membrane en silice, ces deux derniers éléments étant disposés dans un adaptateur spécifique pour le rotor (figure 17 ; 1). La protéinase K, l'AL et l'éthanol interviennent dans la lyse des enzymes, AW1 et AW2 lavent la membrane de la colonne pour retirer l'excédent (tout ce qui n'est pas de l'ADN) et l'ATE permet de décrocher l'ADN de la membrane et de le conserver dans l'eppendorf final. En parallèle à ces manipulations, nous avons ajouté un blanc lors de chaque batch d'extraction, qui fait office de témoin (contrôle négatif). En effet, toutes les étapes auront été appliquées à ce tube si ce n'est l'ajout de guano, ce qui permet de quantifier d'éventuelles contaminations.

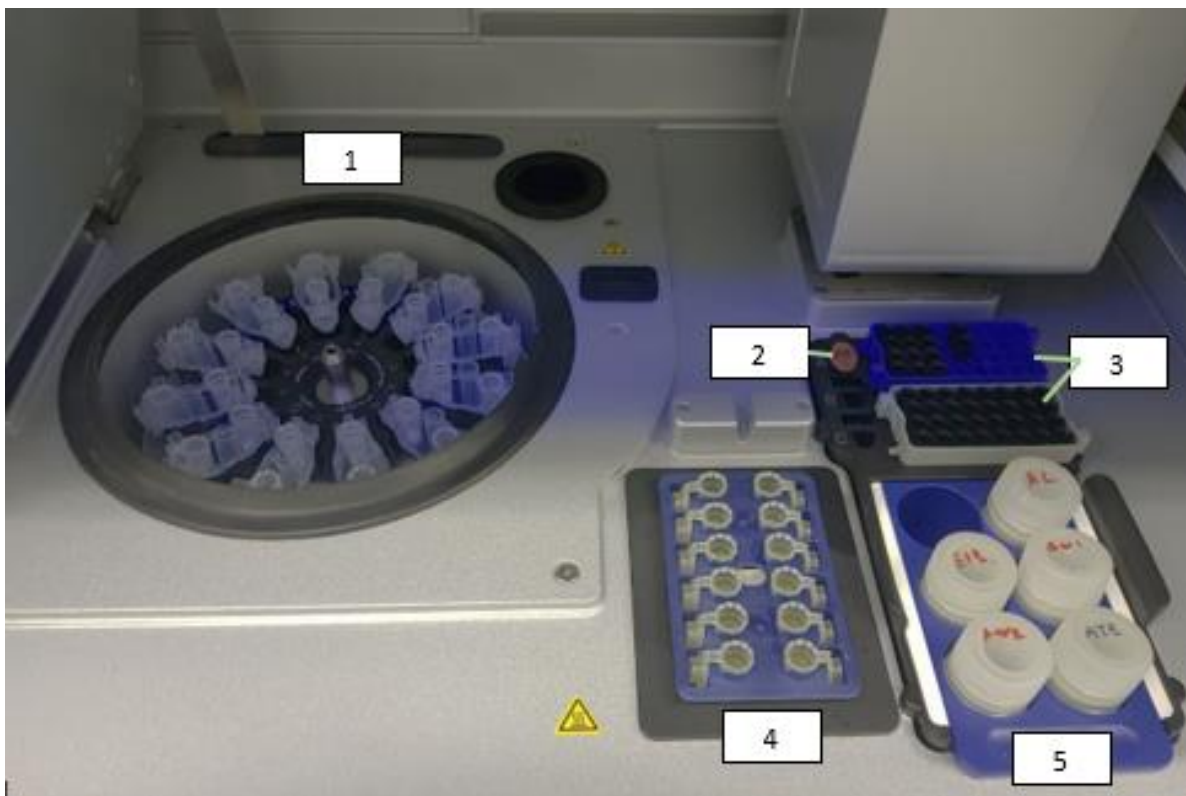


Figure 17 : Annexe 2 - Photographie de l'intérieur du QIAcube

La modification apportée par rapport au protocole de base concerne le volume d'élution, que nous avons fixé à 90 µL d'ATE au lieu de 200 µL comme recommandé par le protocole initial, et cela afin de maximiser la détection de pathogènes et de fragments d'ADN au départ de faibles volumes, le guano de *Myotis emarginatus* étant bien en deçà des minima

recommandés : ~20 mg au lieu de 200 mg. Outre cette modification personnelle, plusieurs modifications sont apportées au protocole initial via sa version "Pathogen detection", et concernent toutes une réduction du volume des solutions ajoutées : 15 µL de protéinase K, 200 µL de tampon AL et 200 µL d'éthanol pur contre, respectivement, 25, 600 et 600 µL.

Enfin, il faut souligner le fait que chaque étape implique la désinfection scrupuleuse de la table et du matériel de travail avant et après manipulation à l'aide de la Javel (diluée à 30%) ou de produits adéquats pour les machines. Il faut également désinfecter les gants en nitrile entre chaque échantillon. De plus, la majorité de l'extraction du guano s'effectue dans une pièce dédiée aux échantillons comportant peu d'ADN, dont le risque de contamination est faible. Il est donc obligatoire de porter une blouse et des sur-chaussures.

### **Purification 1**

La purification 1 commence par une centrifugation de nos plaques d'échantillons à 2000 rpm et un passage au vortex des billes métalliques, placées à température ambiante 2h avant la manipulation. Ces billes sont ensuite ajoutées aux puits d'une plaque adaptée à la purification, à l'aide d'une micropipette. Nous avons rajouté 20 µL de billes (0,8 µL par µL d'échantillon lorsque l'échantillon fait plus de 100 paires de bases), ainsi que 25µL d'échantillon dans chaque puits. Après 5 minutes, la plaque est posée sur une base aimantée, pour que les billes soient attirées par l'aimant, devenant ainsi polarisées et permettant la fixation de l'ADN, globalement chargé négativement. Cela nous permet de retirer la totalité du liquide sans perdre l'ADN. S'en sont suivies deux étapes identiques de rinçage, à l'aide d'éthanol 80% :140 µL ont été ajoutés par puits et retirés après une minute. Ces rinçages permettent de conserver uniquement notre ADN fixé aux billes. Ensuite, une fois les billes sèches, la plaque a été retirée de l'aimant. Nous avons ajouté 27.5 µL de Tris dilué (49 mL d'eau pure pour 1 mL de Tris) dans chaque puits avant de poser à nouveau la plaque sur l'aimant. Après 2 minutes, nous avons transféré 25 µL d'échantillon purifié sur une nouvelle plaque PCR. Enfin, la plaque doit être refermée avec de l'aluminium (spécifique pour les plaques 96 puits) et conservée au frais (au congélateur si l'amplification par PCR n'est faite que le lendemain, sinon au réfrigérateur).

### **Picogreen**

Pour le préparer, il a été nécessaire de le diluer 200 fois dans du TE (ThermoFischer, 2022). Ensuite, 100 µL de ce « mix Picogreen » a été ajouté dans chaque puits. Ce mix devait être ajouté colonne par colonne, à intervalle de 30 secondes, qui est le temps de lecture de la machine. Cela permettait à chaque puits d'incuber sur une durée équivalente. Avant d'insérer la plaque dans la machine, un passage de 5 min dans le noir total était nécessaire. En effet, le Picogreen doit être conservé dans l'obscurité pour ne pas être activé avant le calcul des concentrations, auquel cas nous aurions généré des résultats moins précis.



### Annexe 3 : Fichier reçu suite aux analyses bio-informatiques

A la réception de notre fichier CSV, obtenu grâce à l'utilisation du cluster en bioinformatique, les 4 premiers fichiers contiennent les colonnes suivantes :

- Nom de l'échantillon. Exemple = Aub1-1-Z\_S1099\_L003 ; LieuN°session-N°échantillon-Primer\_InformationsSéquençage
- Numéro de la séquence au sein de l'échantillon.
- Nombre de reads de la séquence dans l'échantillon.
- Le pourcentage de reads d'une séquence au sein de l'échantillon après filtrage.
- Identification du taxon.
- Pourcentage de distance entre les résidus
- Pourcentage de similarité entre la séquence et les informations dans la base de données.
- Séquence
- Nombre total de reads dans l'échantillon avant filtrage
- Nombre total de reads dans l'échantillon après filtrage
- Le pourcentage de reads d'une séquence au sein de l'échantillon avant filtrage.

Le fichier « stats » est quant à lui un résumé du nombre de reads avant et après filtrage pour chaque échantillon ainsi que le pourcentage de reads restants après les filtres.

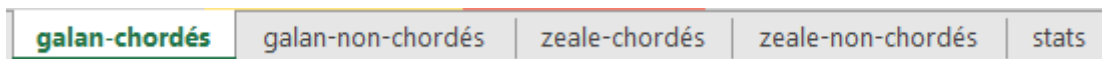


Figure 18 : Annexe 3 - Fichier CSV reçu après le séquençage

Annexe 4 : Taxa identifiés par la base de donnée BOLD sur les primers de Galan et de Zeale

Classe et ordre	Taxon identifié	Session et amorce
Insectes		
	Blattoptère	
Coléoptère	<i>Ectobius</i>	Z-Fre1 Z-R1
	<i>Athous subfuscus</i>	G-Fre1
	<i>Athous vittatus</i>	G-D2
	<i>Brassicogethes aeneus</i>	Z-Aul1
	<i>Cantharis cryptica</i>	Z-D1
	<i>Cantharis nigricans</i>	Z-Aub1
	<i>Cantharis pellucida</i>	G-Aul1
		Z-Aul1
	<i>Elateridae</i>	G-Aul1 G-Fre1
		Z-Aul1 Z-Fre1
	<i>Elodes</i>	G-Aub1
	<i>Lagria atripes</i>	G-Aub1 G-Aul1 G-Fre1 G-R1
		Z-Aub1 Z-Aul1 Z-D1 Z-Fre1 Z-R1
	<i>Lagria hirta</i>	G-Fre2
		Z-Aul2 Z-Fre2 Z-R2
	<i>Lamprohiza splendidula</i>	Z-Fre2
	<i>Litargus connexus</i>	Z-D1
	<i>Magdalis flavicornis</i>	Z-R1
	<i>Polydrusus formosus</i>	Z-Fre1
	<i>Polydrusus pallidus</i>	Z-R1
	<i>Serica brunnea</i>	G-Fre3
		Z-Fre3
Diptère	<i>Aphidoletes</i>	Z-Fre1
	<i>Atrichopogon</i>	Z-Fre1
	<i>Austrolimnophila ochracea</i>	G-Aul1
		Z-Aul1
	<i>Bactromyia aurulenta</i>	Z-Aub2
	<i>Bryophaenocladus</i>	Z-Aul3 Z-R3
	<i>Cnemacantha muscaria</i>	Z-Aul1
	<i>Conchapelopia</i>	Z-R1
	<i>Cricotopus</i>	Z-Aub3
	<i>Culex</i>	Z-Aub3 Z-Fre3 Z-R2 Z-R3
	<i>Cyzenis albicans</i>	G-Aul1
		Z-Aul1 Z-Aul2 Z-Fre1
	<i>Dioctria linearis</i>	Z-R2
	<i>Drosophila funebris</i>	Z-Aub1 Z-Aul3
	<i>Empis tessellata</i>	G-Aul1
	<i>Fannia canicularis</i>	G-Aub1 G-Aul2 G-Fre3
		Z-Aub1 Z-Aul2 Z-Aul3 Z-Fre1 Z-Fre3 Z-R3
	<i>Fannia sociella</i>	Z-Aul1 Z-Fre1
	<i>Forcipomyia</i>	Z-R1
	<i>Lauxaniidae</i>	G-Fre1
	<i>Limonia nubeculosa</i>	G-Fre1 G-Fre3 G-R3
		Z-Aub1 Z-Aul3 Z-Fre1 Z-Fre3 Z-R2 Z-R3
	<i>Macrocera</i>	G-Aul1
		Z-Aul1
	<i>Meliscaeva auricollis</i>	Z-Fre1
	<i>Microtendipes brevitarsis</i>	Z-O3
	<i>Microtendipes pedellus</i>	Z-Fre1 Z-R3
	<i>Musca domestica</i>	G-Fre3
		Z-Aub1 Z-Fre2

	<i>Muscidae</i>	Z-R2
	<i>Muscina stabulans</i>	Z-Aub1 Z-Aub3 Z-Aul1
	<i>Nephrotoma scalaris</i>	G-Aul1
	<i>Neurigona quadrifasciata</i>	G-Fre1
		Z-Fre1 Z-R1
	<i>Phaonia subventa</i>	Z-Aul2
	<i>Phorocera obscura</i>	G-R1
	<i>Pollenia pediculata</i>	Z-Aub1
	<i>Pseudolyciella pallidiventris</i>	G-Aul1
	<i>Psychoda albipennis</i>	Z-R3
	<i>Psychoda gemina</i>	Z-Fre3
	<i>Rhagio scolopaceus</i>	G-Aul1
		Z-Aul1
	<i>Rheocricotopus robacki</i>	Z-R3
	<i>Rhopalomyia</i>	Z-D1
	<i>Scaeva pyrastris</i>	G-Aub
	<i>Scathophaga stercoraria</i>	G-Aul3
	<i>Smittia</i>	Z-R3
	<i>Sphaeroceridae</i>	Z-R3
	<i>Stomoxys calcitrans</i>	G-Aub1 G-Aub2 G-Aub3 G-Aul2 G-Aul3 G-D3
		G-Fre1 G-Fre2 G-Fre3 G-O2 G-O3 G-R3
	<i>Sylvicola cinctus</i>	Z-Aub1
	<i>Synorthocladus semivirens</i>	Z-R3
	<i>Syrphus vitripennis</i>	Z-R3
	<i>Tachinidae</i>	Z-Aul1
	<i>Thaumatomyia</i>	Z-R3
	<i>Tipula</i>	Z-Aul1 Z-Fre1
	<i>Tipula fascipennis</i>	Z-D1
	<i>Tipula lunata</i>	G-Aul1 G-Fre1
		Z-Aub1 Z-Aul1 Z-D1 Z-Fre1 Z-R1
	<i>Tipula pseudovariipennis</i>	Z-D1 Z-Fre1
	<i>Tipula scripta</i>	Z-Aub1
	<i>Tipula truncorum</i>	Z-Aul1
	<i>Xanthogramma</i>	Z-Fre2
Ephéméroptère	<i>Baetis fuscatus</i>	Z-Aul2 Z-D3
	<i>Heptagenia sulphurea</i>	Z-Fre2
	<i>Serratella ignita</i>	G-D1
		Z-D1 Z-Fre1
Hémiptère	<i>Adelges cooleyi</i>	Z-R1
	<i>Cacopsylla melanoneura</i>	Z-Aub1
	<i>Palomena prasina</i>	Z-R1
	<i>Phytocoris</i>	G-O3
		Z-O3
	<i>Pinalitus cervinus</i>	Z-Fre1
	<i>Psallus betuleti</i>	G-Aub1
	<i>Rhabdomiris striatellus</i>	G-Aub1 G-Fre1
Hyménoptère	<i>Astiphromma splenium</i>	Z-Aul1
	<i>Bombus gerstaeckeri</i>	Z-Fre2
	<i>Cidaphus alarius</i>	G-Fre1
		Z-Fre1 Z-R1
	<i>Enicospilus ramidulus</i>	G-Fre2
		Z-Fre2
	<i>Euura imperfecta</i>	Z-Aub1
	<i>Hyposoter clausus</i>	Z-Aub1 Z-Aul1 Z-Fre1
	<i>Netelia</i>	G-R3

Lépidoptère	<i>Ophion</i>	G-Aul1 G-Fre1 G-R1
	<i>Ophion costatus</i>	Z-Fre1
	<i>Ophion minutus</i>	G-Aub1 G-Aul1 G-Fre1 Z-Aub1 Z-Aul1
	<i>Ophion ventricosus</i>	G-Aul1 G-Fre1 Z-Aul1 G-Fre1 Z-Aul1
	<i>Ophioninae</i>	G-Fre1
	<i>Perilissus albitarsus</i>	Z-Aul1
	<i>Zelee albiditarsus</i>	G-D1
	<i>Acrobasis repandana</i>	G-Fre1
	<i>Agriopis aurantiaria</i>	G-Aul1 G-Fre1
	<i>Agriopis leucophaearia</i>	G-Aub1 G-Aul1 G-Fre1 G-R1
	<i>Agriopis marginaria</i>	G-Aub1 G-Aul1 G-D1 G-Fre1
	<i>Apocheima hispidaria</i>	G-Aub1 G-Fre1 G-R1
	<i>Apoda limacodes</i>	Z-R1
	<i>Archips podana</i>	G-Aul2
	<i>Argyresthia fundella</i>	Z-Fre1
	<i>Autographa gamma</i>	G-Aul3
	<i>Camptogramma bilineata</i>	G-Aul3
	<i>Carpatolechia decorella</i>	G-R1
	<i>Cnephasia</i>	G-Fre2
	<i>Cnephasia incertana</i>	G-Aub1
	<i>Colotois pennaria</i>	G-Aul1
	<i>Cosmia trapezina</i>	G-Aul1
	<i>Cymatophorina diluta</i>	G-Aul1
	<i>Ditula angustiorana</i>	G-Aul1 Z-Aul1 Z-Fre1
	<i>Erannis defoliaria</i>	G-Aul1
	<i>Eupithecia</i>	Z-R1
	<i>Korscheltellus lupulina</i>	Z-Fre1
	<i>Mamestra brassicae</i>	G-Aub1
	<i>Nematopogon robertella</i>	Z-Aub1 Z-Fre1
	<i>Noctua pronuba</i>	G-Fre3
	<i>Operophtera brumata</i>	G-Aub1 G-Aul1 G-Fre1 Z-Aub1 Z-Aul1 Z-Fre1 Z-Fre2
	<i>Orthosia cerasi</i>	G-Aub1 G-Fre1
	<i>Orthosia cruda</i>	G-Aul1 G-Fre1
	<i>Parornix anglicella</i>	G-R3
	<i>Phigalia pilosaria</i>	G-Aul1 G-Fre1
	<i>Phyllonorycter harrisella</i>	Z-Fre3
	<i>Plutella xylostella</i>	G-R3 Z-R3
	<i>Polyploca ridens</i>	G-Fre1
	<i>Prays</i>	G-Fre2
	<i>Pseudatemelia flavifrontella</i>	G-Fre1 Z-Aub1 Z-Fre1
	<i>Pyralis farinalis</i>	Z-Aul2
	<i>Schreckensteinia festaliella</i>	Z-Aul2
	<i>Taleporia tubulosa</i>	Z-Aul2 Z-R1
	<i>Tortricodes alternella</i>	G-Aul1
	<i>Tortrix viridana</i>	G-Aul1 G-Fre1
	<i>Ypsolopha parenthesella</i>	G-Fre1 G-R1
	<i>Ypsolopha ustella</i>	G-Aul1 G-Fre1
<i>Zeiraphera isertana</i>	G-Aul1 G-Fre1 G-Fre2	

Névroptère	<i>Hemerobius</i> <i>Hemerobius lutescens</i>	Z-Aul1 Z-Aul2 G-Aub1 Z-Aub1 Z-Fre2 Z-Fre3 Z-R2 Z-Fre1 Z-D3 Z-Fre1
Psocoptère	<i>Loensia pearmani</i> <i>Psocodea</i> <i>Valenzuela flavidus</i>	
Trichoptère	<i>Athripsodes albifrons</i> <i>Polycentropus</i>	
Arachnides - Acariens Mesostigmate	<i>Halolaelapidae</i> <i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	G-Aub1 G-Fre1 G-Fre3
Trombidiformes	<i>Acalitus sp.</i> <i>Pygmephoridae</i> <i>Tydeidae</i>	G-Aul3 G-Aul2 G-Aul3 G-R2
Arachnides - Araignées Araneae	<i>Anelosimus vittatus</i> <i>Anyphaena accentuata</i>  <i>Araneus angulatus</i>  <i>Araneus diadematus</i> <i>Araneus sturmi</i> <i>Araneus triguttatus</i> <i>Araniella opisthographa</i> <i>Araniella cucurbitina</i> <i>Clubiona brevipes</i> <i>Clubiona comta</i>  <i>Clubiona corticalis</i> <i>Clubiona pallidula</i>  <i>Cyclosa conica</i>  <i>Diaea dorsata</i> <i>Dipoena melanogaster</i> <i>Enoplognatha</i> <i>Episinus maculipes</i>  <i>Gibbaranea gibbosa</i>  <i>Hyptiotes paradoxus</i> <i>Larinioides patagiatus</i> <i>Larinioides sclopetarius</i>  <i>Lathys humilis</i> <i>Metellina</i> <i>Metellina merianae</i> <i>Metellina segmentata</i>  <i>Nuctenea umbratica</i>  <i>Parasteatoda lunata</i> <i>Parasteatoda tepidariorum</i>	G-Aul1 G-Aub1 G-Aul1 G-D1 G-Fre1 Z-Aub1 Z-Aul1 Z-Aul3 Z-D1 Z-Fre1 Z-R1 G-Aul1 G-Aul3 G-Fre1 G-Fre2 G-R3 Z-Fre2 Z-R3 G-Aul3 G-R3 G-Aub1 G-Aub1 G-Aul1 G-D1 G-Aub1 G-Aub1 G-Fre1 G-Fre1 Z-Aul1 Z-D1 Z-Fre1 Z-Fre2 Z-Fre1 G-Aub1 G-Fre1 Z-Fre1 G-Aul1 G-Aul2 G-Fre1 G-R1 Z-Aul1 Z-Fre1 G-R1 G-Fre1 G-Fre1 G-Fre1 G-Fre2 G-Fre3 G-R3 Z-Fre2 Z-Fre3 Z-R2 Z-R3 G-Aub1 G-Aul1 G-Fre1 Z-Aub1 Z-Aul1 Z-D3 Z-Fre1 Z-Fre3 Z-R1 Z-R2 Z-R3 G-D1 G-R1 Z-Aub1 Z-Aul3 Z-D1 Z-D3 Z-R1 G-Aub1 G-Aul3 G-Fre2 Z-Aub1 Z-Aul3 Z-Fre2 G-Fre1 Z-R3 G-Fre G-Aul3 Z-Aul2 Z-Aul3 Z-Fre3 Z-R2 G-Aub1 G-Aul1 G-D1 G-Fre1 G-Fre2 G-R1 G-R2 G-R3 Z-Aul1 Z-D1 Z-Fre1 Z-Fre2 Z-R1 Z-R2 Z-R3 G-Fre1 Z-Aub1

	<i>Philodromus collinus</i>	G-D1 G-R3 Z-D1 Z-R3
	<i>Philodromus dispar</i>	Z-Fre1 Z-Fre3
	<i>Philodromus praedatus</i>	G-Fre1
	<i>Platnickina tinctoria</i>	G-Fre
	<i>Steatoda bipunctata</i>	G-Aub
	<i>Tegenaria domestica</i>	G-R3
	<i>Tegenaria ferruginea</i>	G-Aub1
	<i>Tenuiphantes tenuis</i>	Z-Fre2
	<i>Tetragnatha</i>	Z-D1 Z-D3
	<i>Tetragnatha montana</i>	G-Aul1 G-Fre1 G-Fre2 G-R1 G-R2
	<i>Tetragnatha obtusa</i>	G-Fre1
	<i>Theridion pinastri</i>	G-Fre1
	<i>Theridion varians</i>	G-Fre1
	<i>Trematocephalus cristatus</i>	G-Fre1
	<i>Xysticus lanio</i>	G-Aub1 G-Aul1 G-Fre1 Z-Aub1 Z-Fre1
	<i>Zilla diodia</i>	G-Aul1 G-Fre1 Z-Aul1 Z-D1 Z-D3 Z-Fre1 Z-Fre2 Z-R1 Z-R2 Z-R3
	<i>Zygiella</i>	Z-Aub1 Z-Aul3

## Annexe 5 : Biplot - ACP lieux

### PCA - Biplot

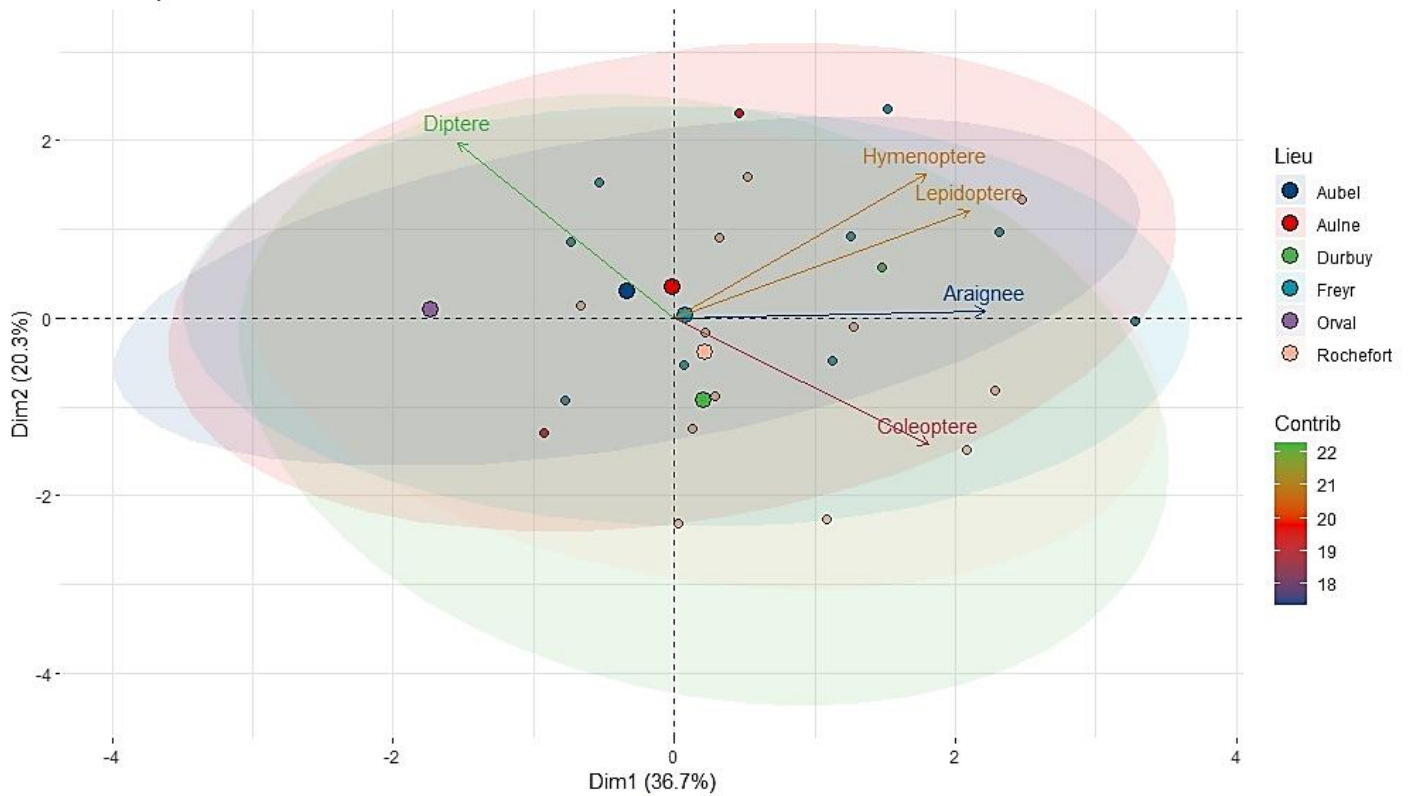


Figure 19 : Annexe 5 - Biplot - Analyse en composante principale des lieux sur les ordres arthropodes principaux du régime alimentaire de *Myotis emarginatus* (taxa présent chez plus de 10 individus)