

Qui mange quoi ?

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

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

Cet article est extrait d'une publication réalisée dans le cadre du programme ECO-FECT (Ecoevolutionary Dynamics of Infectious Diseases; Université de Lyon, France): GALAN, M., PONS, J.-B., TOURNAYRE, O., PIERRE, É., LEUCHTMANN, M., PONTIER, D., CHARBONNEL, N. 2018. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources* 18: 474-489.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749>

Résumé

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



Grand rhinolophe © Maxime LEUCHTMANN

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

Introduction

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

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

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

Le code-barres ADN généralement utilisé chez les animaux est une portion d'ADN mitochondrial de 658 paires de base (pb) provenant d'un gène appelé cytochrome oxydase 1 (COI). La séquence de ce gène a la particularité de varier beaucoup entre espèces mais pas ou peu au sein d'une espèce (HEBERT *et al.*, 2003). Cependant, l'ADN contenu dans des échantillons environnementaux tel que le guano est souvent dégradé en courtes séquences ce qui rend difficile voire impossible de

déchiffrer la totalité de la séquence de 658pb du COI. Pour ce type d'échantillon, on se contente de séquencer un fragment court (< à 200pb) qui doit idéalement conserver un pouvoir de discrimination à l'espèce et pour des organismes très différents (insectes, poissons, mammifères, etc.) : on parle alors d'un « minibarcode ADN universel ».

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

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

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

Matériels et Méthodes

Validation par l'utilisation de communautés artificielles

Nous avons testé la capacité de notre méthode de metabarcoding à identifier différents ordres d'arthropodes en réalisant des mélanges d'insectes ('communautés artificielles'), identifiés au préalable par des entomologistes, pour simuler des repas de chauve-souris. Deux communautés artificielles contenant des insectes d'ordres diversifiés (Orthoptères, Lépidoptères, Coléoptères, Hémiptères, Dermaptères, Neuroptères et Diptères) ont été analysées. La première (communauté artificielle 1) est composée de douze espèces présentes en France et la seconde (communauté artificielle 2) de sept espèces étrangères. Chaque insecte a été séquençé individuellement et en mélange (ADN de chaque insecte mélangé en proportion égale).

Le protocole utilisé est composé de cinq étapes principales (Fig. 1) : extraction de l'ADN, amplification du code-barres par PCR (Polymerase Chain Reaction) en triple réplicats indépendants, séquençage, analyse bio-informatique et comparaison des séquences à celles archivées dans les bases de données telles que BOLD (Barcode Of Life Database : <http://www.boldsystems.org/>).

[boldsystems.org/](http://www.boldsystems.org/)). Pour les communautés artificielles, une sixième étape est ajoutée (comparaison des identifications moléculaires à celles des entomologistes). La comparaison du séquençage individuel et en mélange permet de mesurer d'éventuels biais de détection de certaines espèces pour les mélanges. Ce test permet de vérifier (1) la sensibilité de la méthode (« détecte-t-on tous les insectes ? ») et (2) sa résolution (« identifie-t-on à l'espèce ou à un rang taxonomique moins précis ? »).

Application de la méthode à des échantillons de guano

Récolte des échantillons

Les chauves-souris ont été capturées dans 18 sites de Poitou-Charentes entre juin et septembre 2015 (Fig. 2).

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

Analyses moléculaire et bio-informatique

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



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

Analyses écologiques de la variabilité du régime alimentaire

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

Application de la méthode

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

Résultats et discussion

Validation par l'utilisation de communautés artificielles

Sensibilité de détection

Pour les deux communautés artificielles analysées, nous retrouvons des codes-barres ADN appartenant à l'ensemble des 19 espèces d'insectes incluses (communautés artificielles 1 et 2), que ce soit en séquençage individuel ou en mélange (Fig. 4). De manière surprenante,

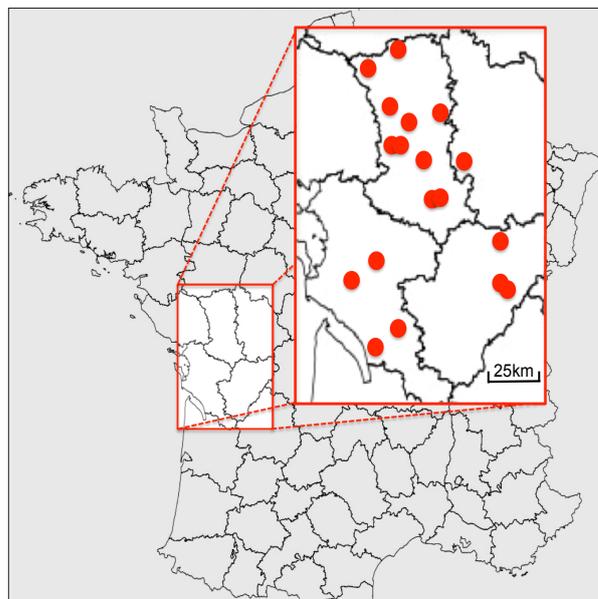


Fig. 2.

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



Fig. 3.

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

un vingtième taxon a été détecté alors qu'il n'avait pas été introduit volontairement. Il s'agit de *Triarthria setipennis*, un diptère parasitoïde (organisme qui se nourrit et se développe sur ou à l'intérieur d'un organisme hôte) qui était présent dans l'échantillon de forficule *Forficula lesnei*. Ces résultats indiquent une bonne sensibilité de la méthode et donc sa capacité à reconstruire des interactions à plusieurs niveaux trophiques : il est non seulement possible d'identifier des proies directes mais également indirectes de prédation secondaire ou de parasitisme.

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

approche ne permet pas de quantifier la biomasse ou le nombre d'individus d'une même espèce de proie retrouvé dans un guano.

Résolution taxonomique

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

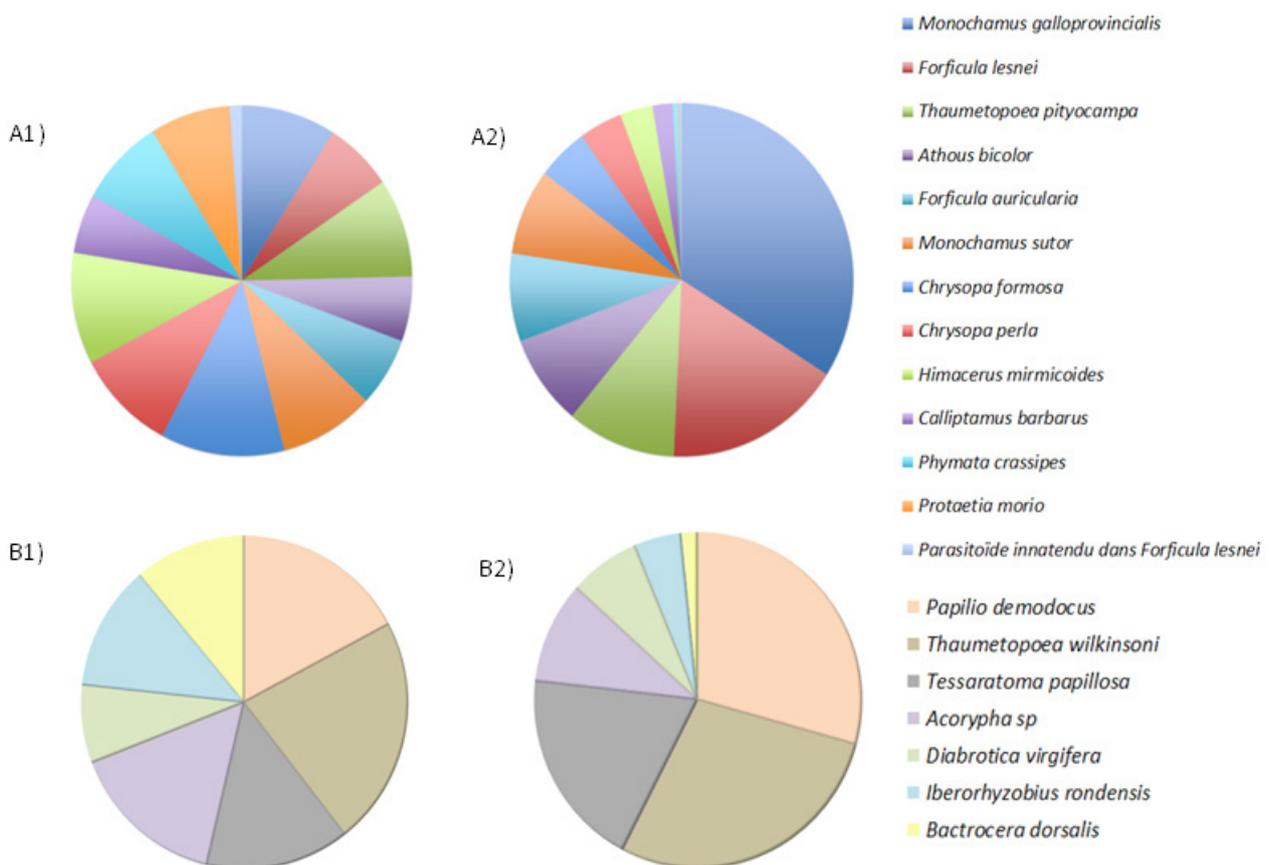


Fig. 4.

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

proches et donc présentant des codes-barres ADN identiques. Il peut également s'agir d'erreurs possibles dans la base de données de référence. Ces problèmes peuvent ainsi empêcher l'identification de certains taxons à l'espèce.

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

Analyse des échantillons de guano

Identification des espèces de chauves-souris

L'identification moléculaire des chiroptères est parfaitement concordante avec l'identification morphologique faite sur le terrain pour 238 des 336 échantillons (70.8 %). Pour 72 échantillons (21.5 %), l'identification n'a pas pu être confirmée entre réplicats techniques à cause d'échecs d'amplification PCR. Ces échecs d'amplification peuvent être dus à la mauvaise conservation des échantillons qui ont été laissés à température ambiante dans des tubes hermétiques pendant plusieurs mois. Cela a entraîné une forte dégradation de l'ADN par la prolifération de micro-organismes, rendant certains

codes-barres ADN impossibles à amplifier par PCR. Pour 17 échantillons (5.1 %), un mélange de deux espèces de chauves-souris est obtenu, et pour 9 échantillons (2.7 %), l'identification moléculaire est complètement différente de celle obtenue sur le terrain. Dans ces deux derniers cas, le protocole d'échantillonnage pourrait être mis en cause. En effet, les sacs en tissus sont utilisés pour plusieurs captures successives, pouvant entraîner la contamination du guano entre plusieurs espèces ou l'oubli du guano dans le sac qui par erreur entraîne son attribution à la capture suivante.

En termes de résolution taxonomique, nous avons vérifié que le code-barres ADN est résolutif pour 31 des 35 espèces de chauves-souris présentes en France. Deux paires d'espèces ne sont pas différenciables par leur ADN mitochondrial : le Grand murin *Myotis myotis* et le Petit murin *Myotis blythii* d'une part, la Sérotine commune *Eptesicus serotinus* et la Sérotine de Nilsson *Eptesicus nilsonii* d'autre part. Pour ces cas particuliers, seul l'ADN nucléaire pourrait permettre une identification à l'espèce, mais ce type d'ADN est plus difficile à caractériser à partir de guano. La connaissance biogéographique de la répartition de ces deux paires d'espèces peut également permettre de valider l'espèce présente pour le site de collecte des guanos. Par exemple, la Sérotine de Nilsson n'est pas présente dans l'Ouest de la France, donc on peut en déduire que les échantillons de notre étude correspondent à la Sérotine Commune.

Ces résultats montrent que nous sommes capables d'identifier la plupart des chauves-souris à l'espèce à partir de leur guano, ce qui permettra de mettre en place des études de régime alimentaire qui ne nécessitent pas la capture des individus (pour une analyse à l'échelle

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

Identification des proies

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

Analyses écologiques de la variabilité du régime alimentaire

Nos résultats confirment la forte diversité des régimes alimentaires parmi les chiroptères insectivores (**Fig. 5**) : certaines espèces, comme la Pipistrelle commune

Pipistrellus pipistrellus, ont un régime alimentaire varié, tandis que d'autres ont un régime alimentaire spécialisé sur certains types de proies comme le Minioptère de Schreibers *Miniopterus schreibersii* qui se nourrit principalement de lépidoptères.

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

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

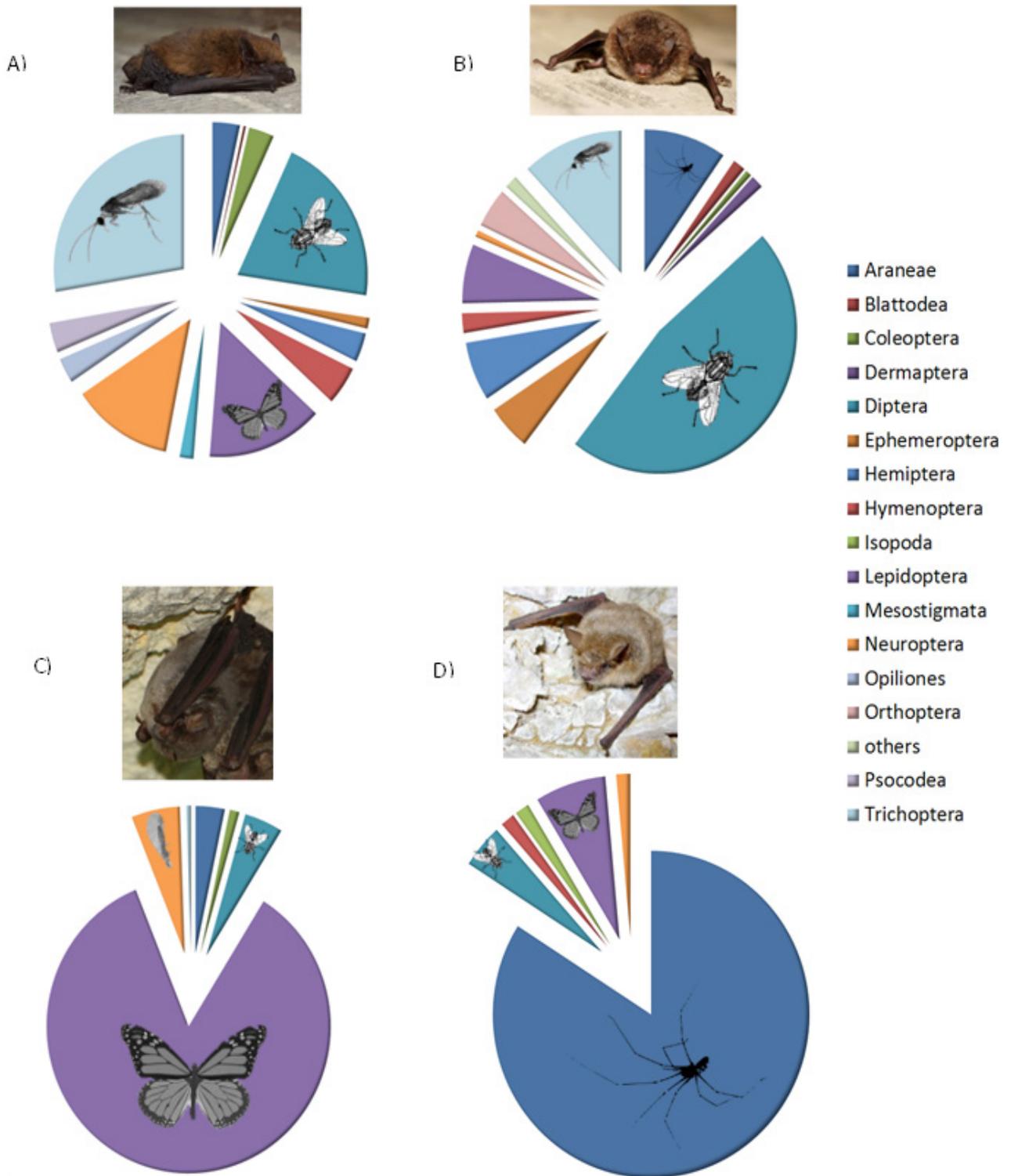


Fig. 5.

Occurrence d'espèces de proies dans les fèces pour A) la Pipistrelle commune (N=23), B) le Murin de Daubenton (N=29), C) le Minoptère de Schreibers (N=27) et D) le Murin à oreilles échancrées (N=17).

Photos chiroptères : A & B par Gilles San Martin - CC By SA; C par Maxime Leuchtman et D par Karol Tabarelli - CC By SA.

Tableau 1 A. Diversité de proies identifiées par metabarcoding dans huit échantillons de guano de Petit rhinolophe.

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

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

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

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

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

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

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

Applications

Parmi les 290 taxa d'arthropodes identifiés à l'espèce, 61 sont considérés comme des ravageurs dont certains pouvant causer des dommages importants (la noctuelle de la tomate *Helicoverpa armigera*, la drosophile à ailes tachetées *Drosophila*

suzukii et la processionnaire du pin *Thaumetopoea pityocampa*) ou comme espèce d'importance en santé vétérinaire et humaine (les moustiques vecteurs du paludisme *Anopheles claviger* ou de la fièvre du Nil Occidental *Culex pipiens*, la mouche piquante *Stomoxys calcitrans* inféodée au bétail et qui peut transmettre la maladie du charbon).

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



Grand murin © Maxime LEUCHTMANN

Conclusion

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

contextes de biologie de la conservation, mais également dans des contextes agronomique et de santé publique (chiro-surveillance). Cette méthode peut également être facilement adaptée à d'autres organismes insectivores.

Pour citer cet article :

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

ISSN 2607-0510

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

Remerciements

Ce travail est issu de la thèse d'Orianne Tournayre financée par le LabEx CeMEB et co-encadrée par N. Charbonnel et D. Pontier. Le monitoring des chauves-souris sur le terrain est réalisé dans le cadre du LabEx ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) de l'Université de Lyon et du projet Feder "Grand Rhinolophe et trame verte bocagère : étude des facteurs environnementaux influant sur la dynamique des populations" porté par Poitou-Charentes Nature. Nous remercions tous nos collaborateurs des associations naturalistes qui nous ont aidés à organiser et réaliser cet échantillonnage : Matthieu Dorfiac (Charente Nature), Anthony Le Guen (Deux-Sèvres Nature Environnement), Virginie Barret et Philippe Jourde (LPO France), Sébastien Roué (Groupe Chiroptères Aquitaine) et tous les nombreux bénévoles qui ont contribué au terrain. Nous

remercions également Jean-Claude Streito, Guenaëlle Genson, Antoine Foucard, Laure Benoit, Carole Kerdelhué et Laure Sauné, pour nous avoir donné de l'ADN d'insectes permettant de constituer les communautés artificielles. Un grand merci à Emese Meglec, Vincent Dubut et Emmanuel Corse pour les discussions constructives et les échanges sur les analyses de metabarcoding.

Les données de séquençage obtenues dans cette étude ont en partie été produites grâce aux installations de l'ISEM (Institut des Sciences de l'Évolution-Montpellier) et du LabEx Centre Méditerranéen Environnement Biodiversité (LabEx CeMEB). Les analyses ont été réalisées sur la plateforme de calcul CBGP HPC grâce à Alexandre Dehne-Garcia. Ce travail a été financé par le LabEx ECOFECT et un financement interne du CBGP.

ALBERDI, A., AIZPURUA, O., GILBERT, M.T.P., BOHMANN, K., 2018. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods Ecol Evol* 9, 134–147. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>

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

GALAN, M., PONS, J.-B., TOURNAYRE, O., PIERRE, É., LEUCHTMANN, M., PONTIER, D., CHARBONNEL, N., 2018. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources* 18: 474–489. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12749>

GOITI, U., AIHARTZA, J., GUIU, M., SALSAMENDI, E., ALMENAR, D., NAPAL, M., GARIN, I., 2011. Geoffroy's bat, *Myotis emarginatus*, preys preferentially on spiders in multistratified dense habitats: a study of foraging bats in the Mediterranean. *Folia Zoologica* 60, 17–24.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

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

MASLO, B., VALENTIN, R., LEU, K., KERWIN,

K., HAMILTON, G.C., BEVAN, A., FEFFERMAN, N.H., FONSECA, D.M., 2017. Chirosurveillance: The use of native bats to detect invasive agricultural pests. *PLoS ONE* 12, e0173321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173321>

PIÑOL J., MIR G., GOMEZ-POLO P., AGUSTÍ N., 2015. Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources* 15, 819–830. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355>

POMPANON, F., DEAGLE, B.E., SYMONDSON, W.O.C., BROWN, D.S., JARMAN, S.N., TABERLET, P., 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21, 1931–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>

SHEHZAD, W., RIAZ, T., NAWAZ, M.A., MIQUEL, C., POILLOT, C., SHAH, S.A., POMPANON, F., COISSAC, E., TABERLET, P., 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Molecular Ecology* 21, 1951–1965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x>

TABERLET, P., COISSAC, E., HAJIBABAEI, M., RIESEBERG, L.H., 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>

VESTERINEN, E., LILLEY, T., LAINE, V., WAHLBERG, N., 2013. Next Generation Sequencing of Fecal DNA Reveals the Dietary Diversity of the Widespread Insectivorous Predator Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in Southwestern Finland. *PLoS one* 8, e82168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082168>