



# CHIROPTÈRES EN MÉDITERRANÉE



## **ACTION A3-2013 : SYNTHÈSE FINALE DU MODE D'UTILISATION DU RÉSEAU DE GÎTES PAR LES CHIROPTÈRES**

SEPTEMBRE 2013



Aix-Marseille  
université



# **TABLE DES MATIÈRES**

<b>CONTEXTE.....</b>	<b>3</b>
<b>RESPONSABLES ET PARTENAIRES.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>3</b>
Hypothèses.....	3
<b>ÉTUDE GÉNÉTIQUE DU GRAND RHINOLOPHE.....</b>	<b>4</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>4</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>6</b>
Échantillonnage et extraction d'ADN.....	6
Amplification.....	9
Analyses.....	10
<b>Résultats.....</b>	<b>11</b>
Bilan des manipulations.....	11
Approche Phylogéographique .....	11
Approche micro-évolutive.....	14
<b>Discussion.....</b>	<b>15</b>
Manipulations d'ADN issu du guano.....	15
Différenciation génétique des populations.....	16
Approche micro-évolutive : relations locales.....	16
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>17</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>19</b>
<b>FICHE DE SYNTHÈSE DE L'ACTION.....</b>	<b>21</b>
<b>Objectif initial.....</b>	<b>21</b>
<b>Résultats acquis.....</b>	<b>21</b>
<b>Perspectives de gestion et applications.....</b>	<b>21</b>

Caroline COSTEDOAT [caroline.costedoat@imbe.fr](mailto:caroline.costedoat@imbe.fr), Aix-Marseille Université, UMR IMBE 7263

Rémy GRENIER [grenieremi@gmail.com](mailto:grenieremi@gmail.com), Aix-Marseille Université, UMR IMBE 7263

Vincent DUBUT [vincent.dubut@imbe.fr](mailto:vincent.dubut@imbe.fr), Aix-Marseille Université, UMR IMBE 7263

Florence PETIT [florence\\_petit@ymail.com](mailto:florence_petit@ymail.com), Aix-Marseille Université, UMR IMBE 7263

Delphine QUEKENBORN [delphine.quekenborn@gcprovence.org](mailto:delphine.quekenborn@gcprovence.org), Groupe Chiroptères de Provence (GCP)

# Remerciements

Cette action visant à comprendre l'aptitude au déplacement d'une espèce de chauves-souris, elle a entraîné l'investissement de nombreux partenaires, au sein du programme LIFE + Chiro Med d'une part, mais aussi dans des secteurs bien plus lointains. Sans la mobilisation et l'intérêt de toutes ces personnes, nous n'aurions jamais pu constituer un tel échantillonnage et obtenir des résultats déjà encourageants.

Nous remercions donc particulièrement les partenaires du programme pour leur suivi méticuleux des protocoles et leur patience lors des récoltes de guano (certaines demandant plus de 100 crottes dans des tubes individuels en une soirée !!). Merci aux étudiants et bénévoles, nous ne répéterons jamais assez combien leur motivation et leur enthousiasme est une source d'inspiration ! Bonne continuation à vous, Elsa MARCHETTI, Christophe SERVANT, Marion VIGOT, Véronique HENOUX, Sophie HEUDE, Samuel PEREIRA-DIAS, Elsa FAUGERE, Typhaine ROUSTEAU, Elise PAREAU, Alizée RAYMOND, Lucie BERTIN. Nous ne pouvons malheureusement citer tous ceux qui ont touché un tube Eppendorf, mais soyez sûr que chacun de vos petits tubes a été un élément précieux confié aux centrifugeuses les plus expertes.

Merci aux partenaires chargés du suivi et des récoltes des sites :

Martin PICART – SMGG

Pauline CONSTANTIN - SMCG

Mélo die LIORET et Christelle GALINDO - PNRC

Fanny ALBALAT / Ophélie PLANCKAERT / Céline FAURE / Mathieu DROUSIE / Géraldine KAPFER / Emmanuel COSSON /  
Tanguy STOECKLE – GCP

Et enfin, nous adressons un grand remerciement à l'ensemble des chiroptérologues sollicités. Merci d'avoir répondu à nos appels, pour votre investissement, votre disponibilité et votre patiente participation à l'étude.

Denis VINCENT – LPO Aquitaine

Josselin BOIREAU – Groupe Mammalogique Breton

Greg Beuneux / Delphine RIST / Jean Yves COURTOIS – Groupe Chiroptères Corse

Catherine BRESSON – CPE Besançon

Thierry DISCA – Biotope

Fabien SANE – Association Lozérienne pour l'Etude et la Protection de l'Environnement (ALEPE)

Olivier VINET – ONF Lozère

Jean SEON / Gael KARCZEWSKI – PN Cévennes

Sophie BAREILLE / Frédéric NERI / Marie-Jo DUBOURG-SAVAGE – CREN Midi-Pyrénées – Groupe Chiroptères Midi-Pyrénées

Claude MILHAS - Groupe Chiroptères Midi-Pyrénées

Emilie BARTHE – CG 66

Vincent LECOQ – EKO-LOGIK

Roberto TOFFOLI - Consulenze Faunistiche, Italy

Dino SCARAVELLI – Université de Bologne, Italy

Jean-Christophe GATTUS – ONF 05

Mireille COULON – PN Écrins

Éric HUSTACHE – Communauté Communes Haut Büech

Émilie GENELOT – Communauté de communes du Guillestrois

Stéphane VINCENT / Robin LEYSCHER / Julien GIRARD-CLAUDON – LPO Rhône-Alpes

Et enfin un grand merci à toute l'équipe de l'UMR IMBE de l'université Aix-Marseille, pour leur curiosité envers l'étude et leur enthousiasme, et pour leurs analyses rapides et complètes. En particulier merci à Caroline COSTEDOAT, Rémy GRENIER, Vincent DUBUT et Florence PETIT.

## CONTEXTE

La conservation des Chiroptères s'applique localement par l'acquisition de connaissances sur leur écologie locale et la protection des éléments indispensables à l'accomplissement de leur cycle vital. Trois grands facteurs conditionnent particulièrement la présence de populations stables :

- la présence de gîtes favorables
- la présence de milieux naturels offrant abris et terrains de chasse
- la disponibilité en proies

L'action A3 du programme LIFE + Chiro Med s'inscrit dans une dynamique de compréhension de l'utilisation des gîtes par les chauves-souris, par une méthode d'investigation de la structure des populations : l'analyse génétique . Comprendre la nature et l'intensité des flux de population entre les gîtes, en période estivale d'un part mais aussi à une échelle plus large entre les saisons de reproduction et d'hibernation, permet de visualiser les besoins de cette population en gîtes pour assurer les diverses étapes de leur cycle vital.

Ce rapport présente une synthèse de l'étude réalisée par l'équipe « Evolution Génome Environnement » (EGE) du laboratoire IMBE (UMR 7263) de l'Université d'Aix-Marseille.

## RESPONSABLES ET PARTENAIRES

Au sein du programme, 3 partenaires ont participé à l'action A3 :

- le GCP pour les récoltes de guano, l'aide à l'élaboration des protocoles et la coordination technique
- l'IMBE pour la finalisation des protocoles, la réalisation des analyses génétiques, l'interprétation des résultats
- le PNRC pour l'acquisition du matériel, la coordination générale

## OBJECTIFS

L'action A3 a pour objectif la mise en évidence de l'utilisation par les Grand rhinolophes des gîtes connus ou nouvellement découverts pendant la période de réalisation du programme. La méthodologie employée est la comparaison des caractères génétiques des individus fréquentant ces différents gîtes. La caractérisation génétique est effectuée à partir de l'analyse de l'ADN issu du guano. Cette action cible une meilleure compréhension de l'utilisation de l'espace par cette espèce et des mouvements de population, notamment les liens entre les individus connus en reproduction et en hibernation. Les objectifs visés sont :

- **comprendre l'utilisation des gîtes sur les périodes estivales et hivernales** afin d'édicter des mesures de conservation adaptées à la biologie des chauves-souris sur l'ensemble du cycle
- **utiliser les connaissances acquises pour améliorer les recherches de gîtes** à partir d'un petit noyau de population connu, et de mettre ces gîtes en protection

## HYPOTHÈSES

La compréhension des mouvements de la population de Grand rhinolophes à partir de sa caractérisation génétique implique :

- qu'il existe une structuration génétique des populations locales
- que cette structuration génétique soit assez fine pour être décelée à l'échelle de la zone d'étude, c'est à dire le secteur Camargue-Alpilles-Gardon
- que la conservation du guano permette une extraction d'ADN efficace et utilisable

## INTRODUCTION

Le Grand Rhinolophe, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774) est une espèce de chauve-souris (Mammifère de l'ordre des Chiroptères et de la famille des Rhinolophidae) protégée par la convention de Berne (annexe II) ; par la directive Faune-Flore-Habitat (annexe II) et par la convention de Bonn (annexe II). Depuis le siècle dernier, un déclin important des populations du Grand Rhinolophe met cette espèce en danger dans la plupart des régions européennes. Ceci entraîne une isolation de nombreuses colonies de reproduction. A ce jour, la préoccupation est de protéger les sites de reproduction, d'hibernation, et les milieux de chasse (Rossiter *et al.* 2000).

Afin de mettre en évidence la diversité de cette espèce en fonction de sa répartition géographique, le Grand Rhinolophe a fait l'objet de plusieurs études dites de phylogéographie (Rossiter *et al.* 2007). La **phylogéographie** (Avice *et al.* 1987) est une discipline de la biologie des populations qui **met en relation la structure génétique et la distribution géographique**. Ces études ont pris en compte, en plus des facteurs génétiques, des facteurs écologiques et historiques permettant d'expliquer la répartition géographique des populations. Le dernier maximum glaciaire (23000-18000 BP) a entraîné une migration vers des zones refuges en Europe et en Asie. Pour estimer l'importance relative de ces refuges dans la variation génétique actuelle, des échantillons ont été collectés depuis différentes zones du Royaume-Uni au Japon et étudiés grâce aux marqueurs microsatellites (Rossiter *et al.* 2007). De plus, l'analyse de l'ADN mitochondrial en Europe du Sud-Est et en Turquie, a indiqué une zone de suture au centre de la Turquie résultant de l'expansion de populations à partir de multiples refuges lors de la déglaciation (Bilgin *et al.* 2009).

Pour compléter cette approche phylogéographique, des études moléculaires effectuées sur cette espèce ont aussi été utilisées pour déterminer le comportement reproducteur et le succès reproductif des mâles. Une analyse génétique d'une population basée sur sept marqueurs microsatellites a révélé un **système de reproduction polygynique (le mâle s'accouple avec plusieurs femelles)** avec une certaine fidélité d'accouplement sur plusieurs années (Rossiter *et al.* 2000). Dans le but de caractériser les modèles de reproduction et de succès reproductif dans les populations sauvages de *Rhinolophus ferrumequinum*, Dawson *et al.* (2004) ont isolé 14 loci microsatellites polymorphes de Grand Rhinolophe qu'ils ont également testés par cross-amplification sur 17 autres espèces de chauve-souris.

La recherche présentée dans le cadre de ce rapport s'inscrit dans le projet du programme LIFE + Chiromed qui porte sur trois zones géographiques : la Camargue, le Massif des Alpilles et les Gorges du Gardon sur la période 2010-2014. La région Provence Alpes Côte d'Azur est l'une des régions les plus riches par la diversité de ses paysages. Par conséquent, on retrouve dans cette région vingt neuf espèces de chauves-souris sur les trente cinq que compte l'Europe. La région montre donc un enjeu européen dans la conservation de ces Mammifères. Le Grand Rhinolophe et le Murin à oreilles échancrées (É. Geoffroy, 1806), espèces ciblées par le programme LIFE+, sont en déclin en raison de la spécificité de leurs exigences écologiques, de leur sensibilité au dérangement et du faible taux de renouvellement de leurs populations. Ce programme européen vise à assurer la conservation de ces espèces par la mise en place de différentes actions spécifiques.

L'étude génétique présentée dans le cadre de ce projet, a pour but d'étudier la diversité génétique des différentes populations de Grand Rhinolophes (*Rhinolophus ferrumequinum*) échantillonnées dans le cadre de l'action A3 (compréhension du mode d'utilisation du réseau de gîtes) et d'essayer d'établir des relations notamment entre les populations en reproduction et celles en hibernation.

En Camargue, la population reproductrice connue de Grand Rhinolophe (nombre de femelles avant mise bas) s'élève à 750 individus répartis dans sept gîtes. Il n'y a pas de site d'hibernation connu en Camargue (absence de cavités favorables). La population reproductrice camarguaise représente 75% des effectifs connus de la région Provence-Alpes-Côte-d'Azur et 24% de la population reproductrice méditerranéenne française. Ces proportions donnent une idée de l'importance de la population camarguaise, mais doivent être relativisés car les

connaissances sur les colonies évoluent sans cesse. La densité de la population de Grand Rhinolophe de Camargue est de 0,14 individus/km<sup>2</sup> soit 2,5 fois plus élevée que celle notée ailleurs en Europe.

Cette importante population du pourtour méditerranéen est aujourd'hui très menacée et justifie pleinement la mise en place d'un programme d'envergure pour sa conservation.

Deux questions principales découlent de ces constatations:

- En Camargue, une colonie signalée en 1938 a disparu depuis 1977 mais une nouvelle colonie de reproduction a été trouvée dans un niveau gîte en 2005. Depuis, d'autres colonies de reproduction ont été découvertes au niveau du delta Du Rhône et semblent se maintenir dans le temps. La première question posée est de **savoir d'où viennent les individus qui forment ces colonies de reproduction**. Pour cela une étude de phylogéographie sera envisagée.
- Dans un second temps on s'interroge sur **l'endroit où ces individus vont hiberner et former les colonies d'hibernation** en hiver avant de revenir dans les colonies de reproduction de Camargue en été. L'espèce est très fidèle aux gîtes de reproduction et d'hibernation en particulier les femelles, les mâles ayant un comportement plus erratique. Les femelles sont **philopatriques** (elles ont tendance à rester ou à revenir à l'endroit où elles sont nées). Elles forment de la mi-juin à juillet des colonies de maternité (ou reproduction) où elles donnent naissance à un seul jeune, alors que les mâles adultes sont principalement solitaires, abrités dans des gîtes divers tout au long de l'année (Ransome 1991 ; Rossiter *et al.* 2000). Le Grand Rhinolophe entre en hibernation de septembre/octobre à avril et forment des colonies d'hibernation. Cette période hivernale est un peu raccourcie dans les milieux méditerranéens plus cléments. Pour trouver potentiellement ces sites d'hibernation, une étude à l'échelle micro-évolutive à l'aide de marqueurs microsatellites est envisagée.

Il est particulièrement délicat d'étudier une espèce menacée ou en voie d'extinction car la manipulation des individus peut avoir un effet nocif sur les populations. Il est cependant indispensable de connaître la diversité génétique et les paramètres démographiques d'une espèce (et leurs évolutions au cours du temps) pour pouvoir définir la fragilité de chacune des populations qui la compose. **L'échantillonnage non-invasif** est une technique récente qui permet d'étudier les animaux sans affecter leur taux de survie puisqu'elle ne nécessite aucune manipulation des individus, tout en permettant leur identification. En effet, cette méthode consiste à travailler sur de l'ADN laissé derrière eux. C'est donc une méthode particulièrement adaptée pour les espèces menacées (Taberlet *et al.* 1997 ; Corse *et al.* 2010). Les échantillons utilisés sont le plus souvent des poils ou des fèces. Cette technique a été rendue réalisable grâce aux progrès de la biologie moléculaire et devient donc de plus en plus utilisée (Reed *et al.* 1997). Au vu du statut d'espèce menacée du Grand Rhinolophe il a été décidé de travailler à partir de guano (fèces). La difficulté supplémentaire de travailler à partir de ce genre de matrice réside dans le fait que l'ADN peut être dégradé par rapport à ce que l'on aurait obtenu sur du tissu frais. Cependant, cela permet de travailler de façon non-invasive sur des espèces d'intérêt patrimonial notamment. Il faut donc prendre en considération que l'ADN peut être fragmenté et donc plus court que si l'on travaillait sur tissu frais. Dans le cadre d'étude génétique de diversité, il convient donc de trouver le bon compromis entre amplification d'ADN et longueur de séquence amplifiée.

Pour cette étude, deux catégories de marqueurs ont été choisies. Le **polymorphisme de l'ADN mitochondrial** a été largement utilisé pour des analyses de diversité génétique. Ce génome présente en effet plusieurs avantages : il est haploïde, présente peu de recombinaison et retrace la lignée maternelle chez les Vertébrés (Breton *et al.* 2007). D'autre part, son taux de substitutions est supérieur à celui des séquences nucléaires (exceptés les microsatellites), donc la monophylie peut être atteinte plus rapidement, et le diagnostic de l'isolement reproductif peut être plus précoce (Brown *et al.* 1982, Barallon 2008). De part ces propriétés

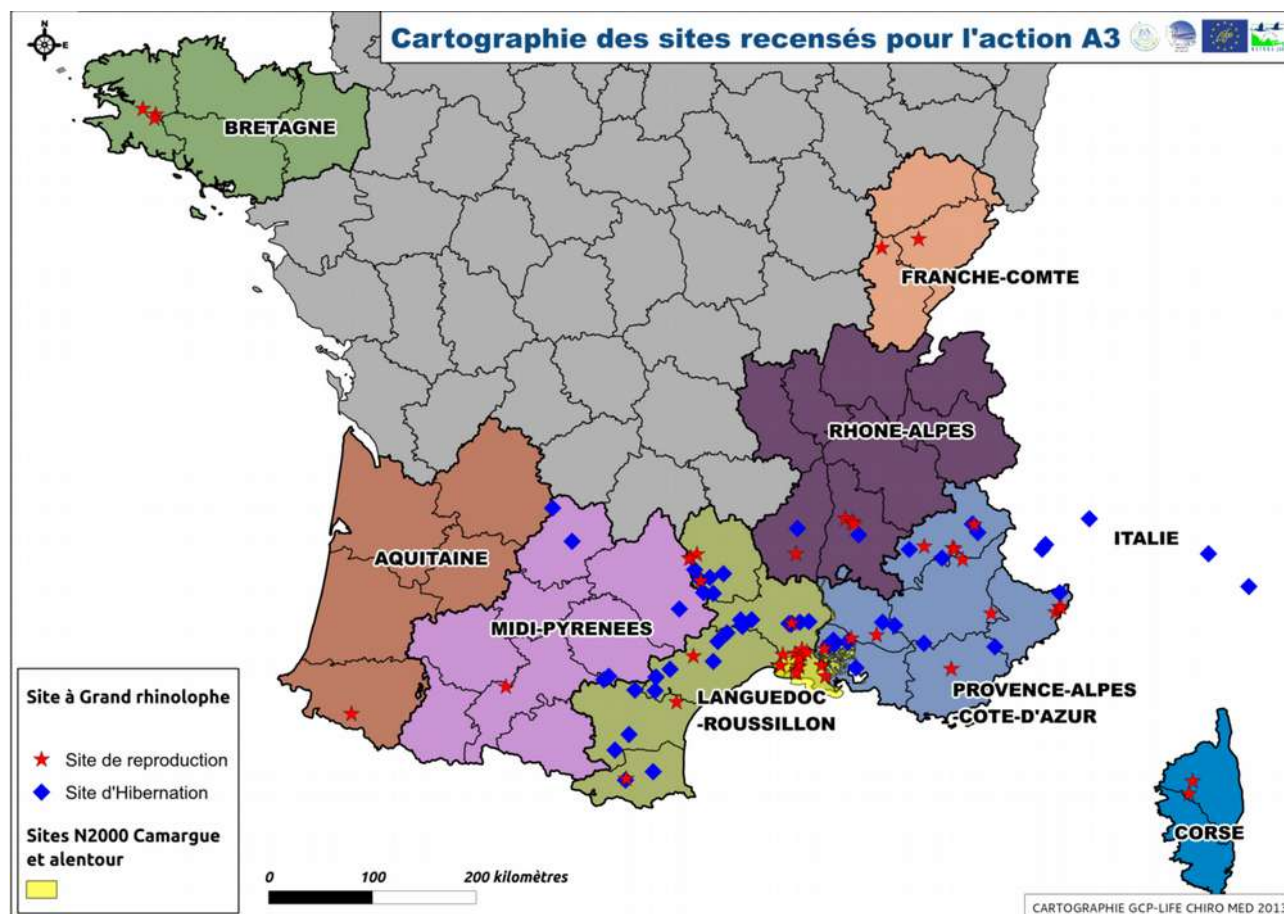
particulières le marqueur mitochondrial est adapté aux études de phylogéographie. Nous étudierons ce type de marqueur afin d'établir une cartographie nationale de la diversité génétique du Grand Rhinolophe. Les microsatellites consistent en une séquence d'ADN longue de quelques nucléotides répétée plusieurs fois (par exemple : CACACACACACA). Les microsatellites sont de plus en plus considérés comme des marqueurs de choix en génétique des populations. Ils sont trouvés en grand nombre et sont distribués de façon assez homogène à travers le génome. De façon générale, les microsatellites sont variables même dans les populations qui ont un faible polymorphisme (Estoup *et al.* 1995). Les variations des microsatellites sont notamment utilisées pour la comparaison du niveau de variation entre espèces (Paetkau et Strobeck 1994), afin de gagner en finesse dans le degré de structure des populations (Allen *et al.* 1995), distinguer des populations peu divergentes et mettre en évidence des flux de gènes (Suk et Neff 2009). De part ces propriétés des **marqueurs microsatellites ont été choisis pour affiner l'étude à plus petite échelle (micro-évolutive)** afin d'estimer les potentiels flux génétiques entre populations proches (les populations de Camargue en particulier).

**L'utilisation de marqueurs de nature différente permet l'acquisition d'informations complémentaires permettant de mieux appréhender les populations étudiées** (Boecklen et Howard 1997, Buggs 2007). Par la combinaison de ces deux types de marqueurs (mitochondrial et nucléaire), nous espérons notamment pouvoir relier les populations de reproduction camarguaises avec d'éventuelles populations d'hibernation.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### ÉCHANTILLONNAGE ET EXTRACTION D'ADN

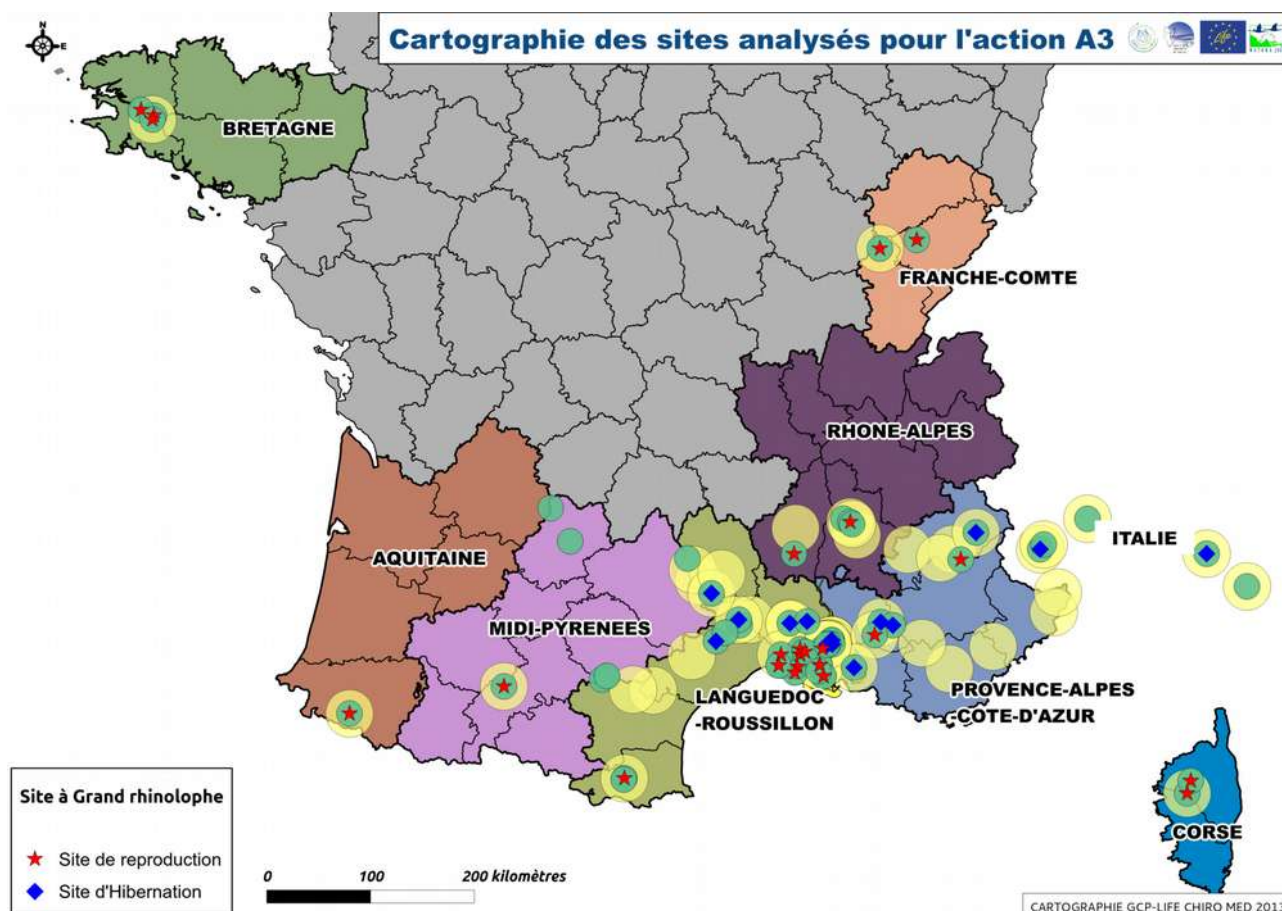
#### Échantillonnage



**Illustration 1: Ensemble des régions contactées pour un échantillonnage et répartition des sites à Grand rhinolophe disponibles (104 sites)**



L'échantillonnage du guano du Grand Rhinolophe a été effectué et supervisé par l'association Groupe Chiroptères Provence qui travaille en étroite collaboration avec l'équipe EGE dans ce programme. Les régions abritant des populations de Grand rhinolophe ont été contactées afin de recenser les sites possibles pour l'échantillonnage. Deux stratégies de recherche ont été appliquée simultanément : recenser des sites d'hibernation autour de la Camargue qui seront des sites d'accueil potentiels à tester, et constituer des groupes de reproduction extérieurs au pôle Camargue afin de mettre en évidence une structuration des populations, si elle existe, à une échelle fine. **Au total 104 sites ont été recensés, dont 56 pour l'hibernation et 46 pour la reproduction, et 2 pour le transit** (Illustration 1). Dans cet échantillonnage optimal, les contraintes de coût et de temps ont conduit à réaliser dans un premier temps un choix sur les sites les plus pertinents. La priorité a été donnée aux secteurs du pourtour de la Camargue et d'autres régions éloignées ont été incluses pour calibrer les analyses génétiques (voir détail encadré ci-dessous) : Bretagne, Franche-Comté, Corse et Italie (Illustration 2). Au regard des questions posées, **47 sites (17 en reproduction et 30 en hibernation) ont été classé prioritaires**. Parmi les sites échantillonnés, **41 sites (24 en reproduction, 15 en hibernation et 2 en transit) ont été analysés en fonction de la qualité et de la disponibilité des échantillons** (Illustration 2).



**Illustration 2: Sites analysés pour l'action A3. Les cercles jaunes représentent les sites prioritaires, les cercles verts représentent les échantillons reçus pour les analyses.**

Pour la récolte des guanos, des feuilles de papier journal ont été placées sous la colonie idéalement à plusieurs endroits, surtout si plusieurs sites d'accrochage sont utilisés et l'opération est répétée durant toute la saison d'occupation du site. A l'aide d'une baguette, ou d'une pince souple, chaque excrément (longueur maximale : 1cm) est mis individuellement dans un microtube de 1,5 mL (tube Eppendorf) avec une bille de silica gel ou dans de l'Ethanol à 90°.

### Détail méthodologique : hiérarchisation des sites

L'échantillonnage a été effectué en deux temps. Dans un premier temps au niveau des colonies de reproduction (printemps-été) et dans un deuxième temps au niveau des colonies d'hibernation (automne-hiver) où le guano est nettement moins représenté. Au niveau des sites prélevés nous avons fait un classement de priorité en fonction de la problématique phylogéographique et micro-évolutive (étude de diversité entre populations proches). Nous avons ainsi classé comme **sites prioritaires primaires des populations très éloignées de Camargue** (Italie, Corse, Bretagne, Jura...) afin de calibrer la diversité génétique au sein de cette espèce. Dans un second temps, nous avons choisi des populations « encerclant » les populations camarguaises dans un rayon de 100 km. Les sites secondaires correspondent à des populations échantillonnées en surplus autour des sites prioritaires primaires ou des sites potentiellement clés (pour d'autres espèces de chauve-souris) et qui nous permettraient d'affiner la recherche selon le temps et les résultats obtenus.

Parmi les populations pour lesquelles nous avons reçu le guano, nous avons dans un premier temps focalisé notre attention sur celles qui avaient été conservées en tubes Eppendorfs. Ensuite le choix s'est fait en fonction du nombre d'échantillons reçus par population et enfin du temps imparti pour réaliser l'étude (Table 1). Ainsi certaines populations n'ont pas pu être étudiées à ce jour (Table 2).

Cinq individus ont pu être analysés à partir de tissus « momifiés » et nous ont notamment permis de calibrer les marqueurs moléculaires pour l'étude sur guanos (Table 1). L'un de ces cadavres est issu d'un site non échantillonné pour le guano : la Tour du Valat.

Table 1: Ensemble des échantillons récoltés et utilisés pour l'extraction d'ADN, représentant 975 échantillons biologique au sein de 41 sites. En rouge les sites de Camargue

Colonie	Région	Dépt	Commune	Secteur géographique	Code station	Colonie	N extraction	N mtDNA	N mtDNA (712pb)	N mtDNA (712pb) apres identix	N microsat apres identix	N microsat apres identix	
Carrière Deschamps / G08	PACA	Alpes-de-haute-Provence / 04	ALPES		A3 LAU 04-11	R	30	30	29	28	21	20	
Carrière de Glanum / G08	PACA	Bouches du Rhône / 13	Saint-Remy de Prov	ALPILLES	A3 G08-11-1 / A3C	H	30	29	21	16	21	16	
Grotte du Blaireau	PACA	Bouches du Rhône / 13	Les Baux de Prov	ALPILLES	A3 G08 12	H	30	21	17	17	6	6	
Grotte de la Bergerie	PACA	Bouches du Rhône / 13	Les Baux de Prov	ALPILLES	A3 BAU13a 13-12	H	6	5	5	5			
					A3 BAU13b 13-12	H	6	4	1	1			
NOM COLONIE ??	Aquitaine	Pyrénées Atlantiques / 64	Eschebar	AQUITAINE	A3 ETC 64-11	R	30	29	22	21	8	7	
	Rhône Alpes	Ardèche / 07	nd	ARDECHE	A3 LAN 07-11	H	30	30	27	25	17	15	
Mines de la Mercurotte / Sau	PACA	Bouches du Rhône / 13	Saint-Chamas	BOUCHES DU RHONE	A3 CHA 13-12	H	30	12	8	8	1	1	
	Bretagne	Finistère / 29	Trevarez	BRETAGNE	A3 SAI 29-11	R	30	30	22	21	28	27	
	Bretagne	Finistère / 29		BRETAGNE	A3 GOU 29-11	R	30	30	21	18	20	17	
Kerzorn	Bretagne	Finistère / 29	Laz	BRETAGNE	A3 LAZ 29-11	R	30	30	28	28	6	6	
G01 / Figares	PACA	Bouches du Rhône / 13	Arlès	CAMARGUE	A3 G01-10-1 / A3C	R	60	47	45	44	40	39	
Mas de la Cure	PACA	Bouches du Rhône / 13	Saintes-Maries-de-la	CAMARGUE	A3 Am10-10-1 /	R	15	10	7	5	10	8	
Bunker 1 Forêt Icard	PACA	Bouches du Rhône / 13	Saintes-Maries-de-la	CAMARGUE	A3 Am11-11	R	15	13	11	11	6	6	
G03 / Tourtoulon	PACA	Bouches du Rhône / 13	Arlès	CAMARGUE	A3 G03-10-1 / A3C	R	30	29	23	17	29	23	
Mas de la Chartrouse	PACA	Bouches du Rhône / 13	Arlès	CAMARGUE	A3 G07-11-1 / A3C	R	30	23	21	21	3	3	
	PACA	Bouches du Rhône / 13	Beaujeu de Castres	CAMARGUE	A3 BEA 13-11	R	11	11	8	7	8	6	
Mas des boules (30)	Languedoc-Roussillon	Gard / 30	Aimargues	CAMARGUE	A3 BOU 30-11	R	20	19	16	13	17	14	
Remparts Aigues Mortes	Languedoc-Roussillon	Gard / 30	Aigues mortes	CAMARGUE	A3 G06-10(=A3 G	R	21	17	15	15	1	1	
	Corse			CORSE	A3 ASC 20-11	R	30	30	21	19	22	20	
Maison Frascaghlu	Corse	Haute-Corse	Albertacce	CORSE	A3 ALB 20-11	R	30	24	22	21	19	18	
Colonie de la Rivière / gîte 1	Rhône Alpes	Drôme / 26	Gigors et Lozeron	DROME	A3 GIG 26-11	R	16	16	16	16	10	10	
	PACA	Hautes-Alpes / 05		HAUTES-ALPES	A3 EYG 05-12	H	30	30	26	25	26	25	
Miniera della Scrava	Ligurie	Gènes	Ne	ITALIE	A3 SCR 12-12	?	30	30	28	26	25	23	
Grotta della Fornace	Piemont	Cuneo / 12020	Rossana	ITALIE	A3 FOR 12-12	H	30	7	7	7	2	2	
	Franche-Comte	Jura / 39		JURA	A3 BES 25-11	R	25	25	21	19	18	14	
Château d'Amange	Franche-Comte	Jura / 39	Amange	JURA	A3 AMA 39-11	R	25	21	19	17	17	15	
Grotte du Hibou	Languedoc-Roussillon	Lozère / 48	Meyrueis	LOZERE	A3 MEY 48-12	H	28	19	17	16	14	13	
Colonie d'Ambax	Midi Pyrénées	Haute Garonne	Ambax	MIDI-PYRENEES	A3 AMB 31-11	R	30	29	27	26	18	17	
Grotte des Camisards	Languedoc-Roussillon	Gard / 30	Sumène	PIEMONT CEVENNES	A3 SUM 30-12	H	15	15	14	13	5	4	
	Languedoc-Roussillon	Gard / 30		PIEMONT CEVENNES	A3 REM 30-11	H	3	2	2				
Aven de Vitalis	Languedoc-Roussillon	Hérault / 34	La-Vacquerie-et-Sain	PIEMONT CEVENNES	A3 VAC 34-12	H	30	12	11	11			
Fort Libéria	Languedoc-Roussillon	Pyrénées Orientales / 66	Villefranche de Confl	SE-LANGUEDOC-R	A3 VIL 66-12	R	30	30	25	20	23	18	
Carrières d'Ocre n°6	PACA	Vaucluse / 84	Villars	VAUCLUSE	A3 VIL 84-12	H	30	3	3	3			
Habitation de Massel	PACA	Vaucluse / 84	Buoux	VAUCLUSE	A3 BUO 84-11	R	30	28	27	26	22	21	
	PACA	Vaucluse / 84	Viens	VAUCLUSE	A3 VIE 84-12	H	4	3	1	0	3	1	
Complexe les Frères / G13	Languedoc-Roussillon	Gard / 30	Sie Anastasie		A3 STE 30-11	R / H	30	10	10	10	2	2	
	PACA	Bouches du Rhône / 13			A3 FON13-11	R	4						
Mine des Canonnettes	PACA	Bouches du Rhône / 13	Les Baux de Prov	ALPILLES	A3 BAU13a 13-12	H	7						
	PACA	Bouches du Rhône / 13	Furanne		A3 FUR 13-11	R	15						
Mas Loubes	Languedoc-Roussillon	Gard / 30			A3 LOU 30-11	R	5						
							<b>961</b>	<b>753</b>	<b>644</b>	<b>598</b>	<b>466</b>	<b>418</b>	
« momie »													
Rfè	dos	pont rouge Guillette	PACA	Hautes-Alpes / 05			3	1					
Rfè 1	peau alle et ventre	pont rouge Guillette	PACA	Hautes-Alpes / 05			5	2			2		
Rfè tdv	alle	Tour du Vallat	PACA	Bouches du Rhône / 13			3	1			1		
Rfè tdv1	alle	Tour du Vallat	PACA	Bouches du Rhône / 13			3	1			1		
Rfè Gul	alle	pont rouge Guillette	PACA	Hautes-Alpes / 05				1			1		
							<b>14</b>	<b>6</b>	<b>5</b>		<b>5</b>		
							<b>TOTAL</b>	<b>975</b>	<b>759</b>	<b>640</b>	<b>598</b>	<b>471</b>	<b>418</b>

Table 2: 15 sites récoltés mais non utilisés pour l'extraction en 2011-2012

Colonie	Région	Dépt	Commune	Secteur	R/Hib	Priorité	Code échantillon
Blockhaus Duroure (G02)	PACA	Bouches du Rhône / 13	Saintes Maries de la Mer	CAMARGUE	R	3	A3G02-11
Castellas	Midi Pyrénées	Tarn / 81	Dourgne	CAUSSES-PIÉMONT	Hib	3	A3SOU81-12
Grotte de Calel	Midi Pyrénées	Tarn / 81	Sorèze	CAUSSES-PIÉMONT	Hib	3	A3SOR81-12
Grotte du Castellas	Midi Pyrénées	Tarn / 81	Dourgne	CAUSSES-PIÉMONT	Hib	3	A3DOU81-12
Aven des Lauriers	Languedoc-Roussillon	Hérault / 34	Laroque	CEVENNES-PIÉMONT	Hib	3	A3LAR34-12
Moulin de Piquemol	Languedoc-Roussillon	Lozère / 48	Trélans	CEVENNES-PIÉMONT	R	3	A3TRE48-12
Tunnel de Madières (usine hydro)	Languedoc-Roussillon	Gard / 30	Rogues	CEVENNES-PIÉMONT	Hib	3	A3ROG30-12
Colonie d'Olivière	Rhône Alpes	Drôme / 26	La Baume Cornillane	DRÔME	R	3	A3BAU26-11
Colonie les Tuilières	Rhône Alpes	Drôme / 26	Suze	DRÔME	R	2	A3SUZ26-11
Grotte de la Carrière	Piémont	Cuneo / 12	Rossana	ITALIE-CUNEO	Hib	1	A3ROSit-12
Miniera di cascina Montiglione	Piémont	Cuneo / 12	Piobesi d'Alba	ITALIE-CUNEO	Hib	1	A3MONit-12
Cava Bissona	Ligurie	La Spezia / 19	Portovenere	ITALIE-LIGURIE	Hib	1	A3BISit-12
Grotte de la Devèze	Midi Pyrénées	Lot / 46	Caniac	LOT	Hib	3	A3CAN46-12
Grotte de la Forge	Midi Pyrénées	Lot / 46	Souillac	LOT	Hib	3	A3SOU46-12
Grotte de Fuilla	Languedoc-Roussillon	Pyrénées Orientales / 66	Fuilla	PYRÉNÉES	Hib	3	A3FUI66-12

## Extraction

Les premiers tests d'extraction d'ADN à partir de guanos réalisés avec le kit d'extraction « classique » utilisé au laboratoire (Gentra Puregene® Tissue Kit de QIAGEN) ont marché (cf. rapport intermédiaire). Cependant, nous avons décidé d'essayer d'améliorer la qualité de l'extraction pour optimiser la quantité et la qualité de l'ADN extrait. Nous avons pour cela testé le DNeasy® mericon food kit (Zaroso-Lacoste *et al.* 2012). Les résultats obtenus par ce dernier kit étant bien meilleur (extraction d'ADN sur certains échantillons qui n'avaient pas marché avec le kit précédent) nous avons gardé ce protocole d'extraction.

**Au total à partir des 41 sites, 975 guanos ont été extraits (Table 1) représentant 24 populations en reproduction (n=589 individus), 15 en hibernation (n=369 individus) et 2 en transit (n=17 individus).**

Les produits d'extraction ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000c® (ThermoScientific) notamment afin de pouvoir équilibrer les concentration d'ADN lors des phases d'amplification.

## AMPLIFICATION

En ce qui concerne l'approche phylogéographique, compte tenu des variations limitées observées sur certains marqueurs mitochondriaux à l'échelle de l'Europe sur les chauve-souris (Flanders *et al.* 2009), nous avons décidé de travailler à partir d'un fragment de la D-loop, connu pour évoluer plus vite et donc susceptible de nous donner plus d'information inter et intra-populations. Nous nous sommes basés sur de précédents travaux (Puechmaille *et al.* 2011 ; Puechmaille, unpublished) et nous avons testé des amorces d'amplification conçues pour le Grand Rhinolophe mais non testées encore sur du guano (cf. rapport intermédiaire). Puis nous avons optimisé le protocole d'amplification par le design de nouvelles amorces, et le séquençage dans les deux sens afin d'augmenter la longueur de la séquence et de valider les séquences obtenues (reproductibilité). Deux « couples » d'amorces différents ont été validés. Un premier couple (REM-DL-F1 : 5'-AATCGGAGGCCAACCTGT-3' Puechmaille unpublished data et mtDNA-F2-R : 5'-ATGGCCCTGAAGAAAGAACCAGATG-3' Puechmaille *et al.* 2011) permettant l'amplification d'un fragment de 712 pb de la D-loop et deux amorces internes (RhFer\_R1 : 5'-GGGATCCTTCTCGCAAG-3' Costedoat unpublished data et Thr-L16272B : 5'-TACCCYGGTCTTGTAACC-3' Mao *et al.* 2010) permettant le séquençage de la région d'intérêt dans les deux sens. Les amplifications sont réalisées avec un thermocycleur MasterCycler® (Eppendorf) selon les paramètres suivants : un cycle de 5 minutes à 95°C, 45 cycles de [1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C, 2 minute à 72°C] et un dernier cycle de 10 minutes à 72°C. Les amplifications obtenues ont été envoyées à la compagnie de biotechnologie Eurofins scientific® pour séquençage.

Concernant l'approche micro-évolutive, le but est de travailler à partir de marqueurs moléculaires très

informatifs (évolution rapide) permettant une approche plus fine de description des populations. Pour cela, nous avons testé 13 marqueurs microsatellites issus de la publication Dawson *et al.* (2004) mais non testé sur guano. Le but étant dans un premier temps de valider ces marqueurs sur les guanos et si possible de multiplexer les marqueurs afin de limiter le temps et le coût de manipulations. Deux kits contenant plusieurs paires d'amorces ont été optimisés afin de réaliser des amplifications en multiplex des 9 loci qui ont été validés en simplex sur tissus momifiés et sur guano : un kit « 56 » comprenant 7 loci et un kit « 65 » comprenant 2 loci.

Le volume réactionnel pour chaque guano (par puits) est de 10 µL, comprenant : le MasterMix Qiagen® (5 µl) contenant le tampon MgCl<sub>2</sub>, la Taq polymérase et la solution de dNTP, l'ADN dilué pour avoir une concentration finale entre 20 et 50 ng/µl (1 µL), le kit d'amorces « 56 » (0,11 µL) ou le kit d'amorces « 65 » (0,08 µL) et de l'eau complétant le volume.

Les amplifications sont réalisées avec un thermocycleur MasterCycler® (Eppendorf) selon les paramètres suivant : un cycle de 15 minutes à 95°C, 40 cycles de [30 secondes à 94°C, 1 minute et 30 secondes à 56°C pour le kit « 56 » ou 65°C pour le kit « 65 », 1 minute à 72°C] et un dernier cycle de 45 minutes à 60°C.

## ANALYSES

Les populations en hibernation peuvent rassembler des individus provenant de différentes colonies de reproduction et de ce fait seront considérées à part dans certaines analyses (voir détails plus loin).

### Approche par marqueur mitochondrial (phylogéographie)

Le logiciel SEQSCAPE® V2.5 (Applied Biosystem) a permis l'alignement et la correction de l'ensemble des séquences.

Pour les séquences d'ADNmt, la **diversité haplotypique** (Nei 1987) et la **diversité nucléotidique** (Tajima 1983, Nei 1987) ont été calculés pour chaque population à l'aide du logiciel ARLEQUIN V3.5 (Excoffier et Lischer 2010). La différenciation entre les populations a été testée grâce aux indices de fixation **F<sub>st</sub>** (Weir et Cockerham 1984), estimés grâce au logiciel ARLEQUIN 3.05 (Excoffier et Lischer 2010). Une valeur des **F<sub>st</sub>** est comprise entre 0 (elle peut aussi être légèrement négative ; dans les deux cas elle indique qu'il n'y a pas de différenciation) et 1 (différenciation totale). Une échelle à seuil est classiquement utilisée : 0,05 pour des populations peu différenciées, puis 0,15 pour des populations différenciées, et 0,25 pour des populations fortement différenciées. Enfin, l'algorithme de Templeton *et al.* (1992) a été utilisé pour estimer **le réseau de relations haplotypiques**. Cette méthode estime non seulement la topologie de l'arbre non-enraciné mais produit également une estimation de la plausibilité des liens entre les haplotypes dans l'arbre. Templeton *et al.* (1992), détaillent la procédure à suivre telle qu'elle est implémentée dans TCS (Clement *et al.* 2000).

### Approche par marqueurs microsatellites (micro-évolution):

Le logiciel GENEMAPPER® V3.7 (Chatterji et Patcher 2006) a été utilisé pour la correction de l'ensemble des génotypes obtenus.

Le logiciel Identix® (Belkir *et al.* 2002) a été utilisé afin d'établir **les relations entre les individus** d'une même population. En effet, nous ne savons pas si les guanos échantillonnés dans une population proviennent du même individu ou non. Cette information est capitale pour ne pas faussement interpréter les indices de diversité qui seront calculés par population. Ainsi, lorsque le score d'identité était >75% entre deux individus d'une même population nous avons systématiquement revérifié les génotypes microsatellites afin de confirmer ou non l'identité entre les individus sur la totalité des 9 marqueurs. Lorsque plusieurs individus présentaient le même profil microsatellite, nous avons vérifié les séquences mitochondriales. Lorsque plusieurs individus étaient caractérisés par une identité parfaite sur tous les marqueurs, nous n'avons gardé qu'un seul représentant dans nos analyses.

Les mesures de diversité génétique incluent les indices de différenciation (**F<sub>st</sub>**) et l'indice de **diversité**

**haplotypique. L'équilibre de Hardy-Weinberg** a été testé (différence entre hétérozygotie observée et attendue, qui rend compte d'un échange de gènes libre et sans contraintes au sein d'une population - Guo et Thompson 1992) ainsi que les **déséquilibres de liaison** entre paires de locus (si l'association des allèles à deux loci différents ne se fait pas de manière aléatoire, ces loci sont dits en "déséquilibre de liaison"). Le déséquilibre de liaison peut être la conséquence d'un contact récent entre populations, d'une sélection, d'une dérive génétique ou de mutations (Slatkin 1994, Cutter 2006). Ces paramètres ont été mesurés avec le logiciel ARLEQUIN V3.5 (Excoffier et Lischer 2010).

La différenciation a ensuite été testée au niveau des microsatellites à travers une Analyse Factorielle de Correspondance Multiple (AFCM) grâce au logiciel GENETIX (Belkir *et al.* 2004) et par une analyse bayésienne d'assignation implémentée par le logiciel STRUCTURE (Falush *et al.* 2003, 2007).

## RÉSULTATS

### BILAN DES MANIPULATIONS

De gros écarts de rendement d'extraction et d'amplification d'ADN ont été obtenus entre les populations (Table 1), ceci en lien avec la quantité et la qualité de l'ADN présent dans le guano. Certains guanos ont répondu positivement à l'amplification mais nous ne sommes pas arrivés à avoir un fragment total de 712 pb sur la D-loop, ils ont donc été retirés de l'analyse. Au total nous avons pu obtenir 649 séquences de D-loop de longueur attendue. De même, les individus qui avaient des données manquantes sur au moins un des marqueurs microsatellites ont été retirés de l'étude. **Ainsi, 471 guanos ont pu être génotypés sur l'ensemble des 9 loci microsatellites (Table 1).**

Nous avons ensuite comparé les génotypes des différents guanos appartenant à la même population afin de nous assurer qu'ils ne provenaient pas du même individu. Nous avons donc enlevé les guanos identiques pour ne garder qu'un seul représentant par profil génétique. **Ainsi, le jeu de données final s'élève à 598 guanos pour la D-loop et 418 sur les marqueurs microsatellites (Table 1).**

### APPROCHE PHYLOGÉOGRAPHIQUE

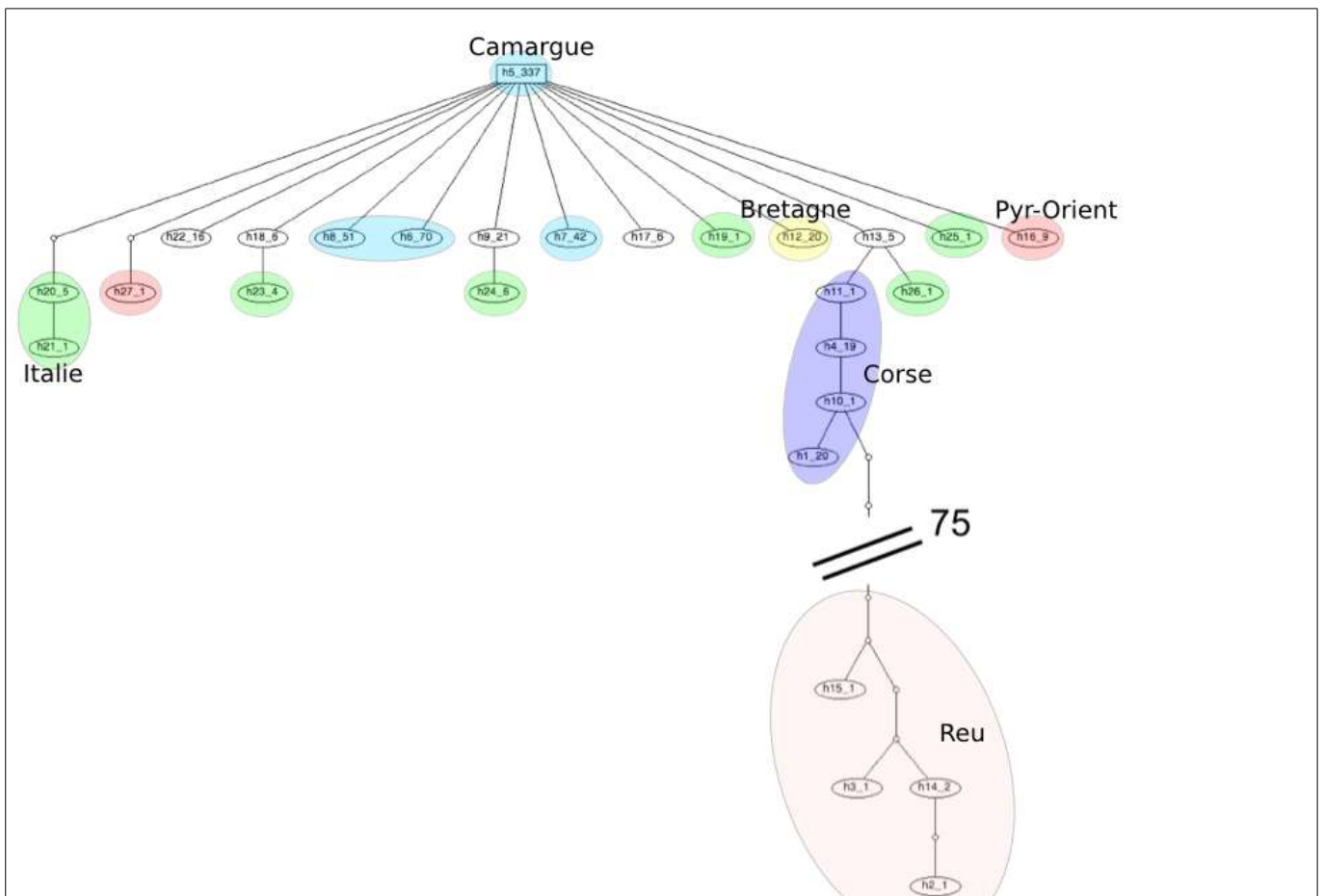
Nous avons identifié **27 haplotypes D-loop différents (Table 3)**. Parmi ces haplotypes, un haplotype est largement majoritaire (H5) avec 334 guanos présentant cette séquence (plus 3 séquences appartenant aux tissus momifiés). Seules les deux populations de Corse (ALB et ASC) ne présentent pas cet haplotype. Trois autres haplotypes sont présents dans la majorité des populations échantillonnées (H6, H7 et H8). Ces haplotypes présentent une seule mutation de différence avec l'haplotype « central » H5. De façon générale, le réseau d'haplotypes est assez simple avec peu de différences entre les haplotypes, excepté pour les haplotypes H2, H3, H14 et H15 qui sont à plus de 75 pas de différences avec les autres haplotypes. Cette différence s'explique par le fait que ces séquences correspondent à une autre espèce de Rhinolophe, *Rhinolophus euryale*. Elles ont été retrouvées dans une population de Corse (ALB) et une population du Gard (STE) (Table 3).

Table 3: Répartition des Haplotypes mitochondriaux (27)

Colonie	Dépt	Secteur géographique	Code station	Colonie	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27		
Carrière Deschamps / G08	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 G08-11	H		13	1	3	4																								
Carrière de Glanum / G08	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 G08-12	H		11	3	2	1																								
Grotte du Blateau	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 BAÜbia 13	H		5																											
Grotte de la Bergerie	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 BAÜber 13	H		1																											
NOM COLONIE ??	Ardeche / 07	ARDECHE	A3 LAN 07-11	H		17	3	6													1												
Mines de la Mercurotte / Sau	Bouches du Rhône / 13	BOUCHES DU RHONE	A3 CHA 13-12	H		6	2																										
	Hautes-Alpes / 05	HAUTES-ALPES	A3 EYG 05-12	H		12	13					1																					
Miniera della Scrava	Génes	ITALIE	A3 SCR 8-12	H		3							4																				
Grotta della Fornace	Cuneo / 12020	ITALIE	A3 FOR 8-12	H		2																1	1	2	1			4	6	1	1		
Grotte du Hibou	Lozère / 48	LOZERE	A3 MEY 48-12	H									4																				
Grotte des Camisards	Gard / 30	PIEMONT CEVENNES	A3 SUM 30-12	H		3	1			3	3										1												
	Gard / 30	PIEMONT CEVENNES	A3 REM 30-11	H		2																											
Aven de Vitalis	Hérault / 34	PIEMONT CEVENNES	A3 VAC 34-12	H		7	1	2	1																								
Carrières d'Ocre n°6	Vaucluse / 84	VAUCLUSE	A3 VIL 84-12	H		2				1																							
	Vaucluse / 84	VAUCLUSE	A3 VIE 84-12	H		1																											
	Alpes-de-haute-Provence	ALPES	A3 LAU 04-11	R						1	28																						
	Pyrénées Atlantiques / 64	AQUITAINE	A3 ETC 64-11	R		22																											
	Finistère / 29	BRETAGNE	A3 SAI 29-11	R		14									7	1																	
	Finistère / 29	BRETAGNE	A3 GOU 29-11	R		15									6																		
	Finistère / 29	BRETAGNE	A3 LAZ 29-11	R		21									7																		
Kezorn	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 GO1-10	R		18	1	8	18																								
G01 / Figares	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 Am10-10	R		3	1	2	1																								
Mas de la Cure	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 Am11-11	R		2		5	4																								
Bunker 1 Forêt Icard	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 GO3-10	R		18	1	2	2																								
G03 / Tourtoulon	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 GO7-11	R		5	10	5	1																								
Mas de la Chartreuse	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 BEA 13-11	R		3		3	2																								
Mas des boules (30)	Gard / 30	CAMARGUE	A3 BOU 30-11	R		10	1	1	4																								
Remparts Aigues Mortes	Gard / 30	CAMARGUE	A3 GO6-10	R		15																											
	Corse	CORSE	A3 ASC 20-11	R		1			18					1	1																		
Maison Frascaghiu	Haute-Corse	CORSE	A3 ALB 20-11	R		19	1	1	1																								
Colonie de la Rivière / gîte 1	Drôme / 26	DROME	A3 GIG 26-11	R		15				1																							
	Jura / 39	JURA	A3 BES 25-11	R		12							2									4	3										
Château d'Amange	Jura / 39	JURA	A3 AMA 39-11	R		12							7																				
Colonie d'Ambax	Haute Garonne	MIDI-PYRENEES	A3 AMS 31-11	R		27																											
Fort Libéria	Pyrénées Orientales / 66	SE-LANUEDOC-R	A3 VIL 66-12	R		15																											
Habitation de Massel	Vaucluse / 84	VAUCLUSE	A3 BUC 84-11	R		16	6	2	3																								
Complexe les Frères / G13	Gard / 30	PIEMONT CEVENNES	A3 STE 30-11	R / H		5		2																									
					20	1	1	19	334	69	42	50	21	1	1	20	5	2	1	9	6	6	1	5	1	16	4	6	1	1	1	1	644

Parmi les 23 haplotypes Grand Rhinolophe, certains sont spécifiques d'une région ou d'une population (Table 3) :

- Ainsi, les haplotypes H1, H4, H10 et H11 sont **spécifiques des populations Corses**. Ces haplotypes sont ceux les plus éloignés de l'haplotype majoritaire H5 (Illustration 3 et 4). La distribution et la fréquence de ces haplotypes nous permet de dire en plus que ces deux populations sont différentes entre elles.
- Les haplotypes H19, H20, H21, H23-H26 sont eux **spécifiques des populations Italiennes** bien qu'ils ne présentent que peu de différence génétique avec les autres haplotypes du réseau (Illustration 3 et 4). Comme pour les populations Corses la distribution des haplotypes nous permet de voir que les deux populations (SCR et FOR) sont différentes entre elles. Cependant, contrairement aux populations Corse nous voyons également que ces populations (surtout la population de SCR) partagent des haplotypes avec d'autres populations (H18 avec la population de BES du Jura, H13 avec la population SAI de Bretagne, H9 avec des populations des Hautes-Alpes (EYG), de Lozère (MEY), du Gard (SUM), du Jura (BES et AMA).
- L'haplotype H12 est **spécifique des populations Bretonne** (SAI, GOU, LAZ).
- Les haplotypes H16 et H27 sont **spécifiques de la population des Pyrénées Orientales** (VIL66)
- Les **populations camarguaises présentent toutes une diversité assez importante** avec 4 haplotypes représentés (H5-H8). Parmi ces populations seules les populations GO6-10, BEA et Am11 ne présentent pas l'haplotype H6, mais cela peut être effectif-dépendant.
- Les populations GO7-11 (Camargue, Bouche-du-Rhône) et LAU (Alpes de Hautes Provence) présentent des fréquences inversées pour les haplotypes H5 et H6 par rapport aux autres populations, à savoir que l'haplotype H5 n'est pas dans ces populations l'haplotype majoritaire.



**Illustration 3: Réseau d'haplotypes pour les populations analysés. Hx indique le nom de l'haplotype, \_xx indique le nombre de guano présentant cet haplotype. Un trait entre deux haplotypes indique une mutation (ou un pas), un rond vide indique une absence de l'haplotype dans le jeu de données. « 75 » indique le nombre de pas présents entre les deux parties du réseau. Chaque ellipse colorée correspond à un même secteur (Camargue, Corse, Italie, Bretagne, PO).**

**Le bas du réseau situé à 75 pas est constitué par une autre espèce : le Rhinolophe euryale.**

Les indices de diversité obtenus sur la D-loop tendent à nous montrer une diversité génétique (en terme de nombre d'haplotypes ainsi que de différences dans la composition de la séquence = diversité nucléotidique) plus importante pour les populations en hibernation qu'en reproduction, ce qui correspond aux résultats attendus (Table 4). Cependant **la diversité obtenue dans les populations en reproduction est relativement importante** (en terme de nombre d'haplotypes présents) notamment pour les populations camarguaises (Table 4). Les données de différenciation entre populations (Fst) confirment les résultats obtenus en indiquant des différences significatives et une différenciation supérieure à 0,25 entre populations de régions géographiques éloignées (par exemple la population des Alpes LAU se différencie grandement des autres populations) mais également une certaine structuration intra-région (avec par exemple peu de différenciation entre les populations camarguaises GO3-10 et GO6-10 mais une forte différenciation entre GO1-10 et GO7-11). On peut cependant tempérer ce résultat en raison des faibles effectifs des populations G06 (1 à deux individus) et G07 (5 individus maximum).

Table 4: Indices de diversité. H: Hibernation, R: Reproduction, région PACA en jaune et LR en bleu

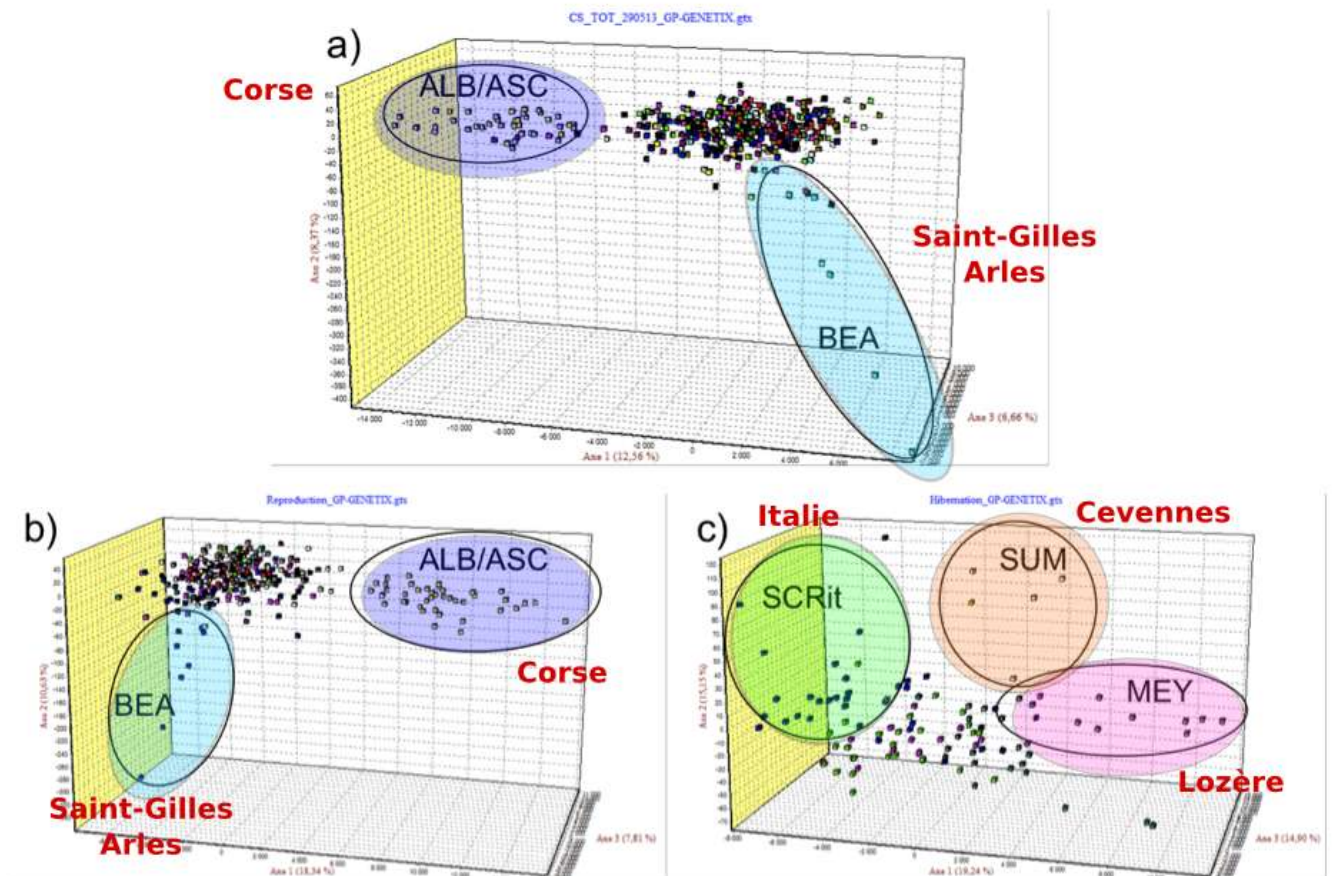
Colonie	Dépt	Secteur géographique	Code station	Colonie	Diversité haplotypique (Dloop)	Diversité nucléotidique (Dloop)	Diversité haplotypique (microsat.)	Nbre alleles moyen (microsat.)
Carrière Deschamps / G08	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 G08-11	H	0.5857 +/- 0.1026	0.000955 +/- 0.000848	0.735192 +/- 0.392651	7,556
Carrière de Glanum / G08	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 G08 12	H	0.5662 +/- 0.1228	0.000914 +/- 0.000834	0.777778 +/- 0.439622	5,222
Grotte du Blaireau	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 BAUBla 13	H	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000		
Grotte de la Bergerie	Bouches du Rhône / 13	ALPILLES	A3 BAuber 13	H	1.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000		
NOM COLONIE ??	Ardeche / 07	ARDECHE	A3 LAN 07-11	H	0.5613 +/- 0.0892	0.000901 +/- 0.000808	0.769604 +/- 0.413192	8,111
Mines de la Mercurotte / Saul	Bouches du Rhône / 13	BOUCHES DU RHONE	A3 CHA 13-12	H	0.4286 +/- 0.1687	0.000605 +/- 0.000690	0.555556 +/- 0.374771	1,586
	Hauts-Alpes / 05	HAUTES-ALPES	A3 EYG 05-12	H	0.5569 +/- 0.0435	0.000843 +/- 0.000775	0.761179 +/- 0.403743	8,000
Miniera della Scrava	Gênes	ITALIE	A3 SCR 8-12	H	0.8942 +/- 0.0257	0.003210 +/- 0.002023	0.754697 +/- 0.401291	8,889
Grotta della Fornace	Cuneo / 12020	ITALIE	A3 FOR 8-12	H	0.9048 +/- 0.1033	0.002825 +/- 0.002065	0.666667 +/- 0.468830	2,444
Grotte du Hibou	Lozère / 48	LOZERE	A3 MEY 48-12	H	0.3824 +/- 0.1132	0.001080 +/- 0.000931	0.758632 +/- 0.409929	6,333
Grotte des Camisards	Gard / 30	PIEMONT CEVENNES	A3 SUM 30-12	H	0.8571 +/- 0.0490	0.001937 +/- 0.001417	0.738095 +/- 0.439401	4,222
	Gard / 30	PIEMONT CEVENNES	A3 REM 30-11	H	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000		
Aven de Vitalis	Hérault / 34	PIEMONT CEVENNES	A3 VAC 34-12	H	0.6000 +/- 0.1539	0.000976 +/- 0.000901		
Carrières d'Ocre n°6	Vaucluse / 84	VAUCLUSE	A3 VIL 84-12	H	0.6667 +/- 0.3143	0.000942 +/- 0.001174		
	Vaucluse / 84	VAUCLUSE	A3 VIE 84-12	H	1.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000		
	Alpes-de-haute-Provence /04	ALPES	A3 LAU 04-11	R	0.0690 +/- 0.0632	0.000097 +/- 0.000227	0.770513 +/- 0.410242	8,111
		AQUITAINE	A3 ETC 64-11	R	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000	0.780220 +/- 0.435224	6,000
	Finistère / 29	BRETAGNE	A3 SAI 29-11	R	0.5152 +/- 0.0810	0.000770 +/- 0.000737	0.763413 +/- 0.404241	8,222
	Finistère / 29	BRETAGNE	A3 GOU 29-11	R	0.4286 +/- 0.0891	0.000605 +/- 0.000635	0.760349 +/- 0.407077	7,778
Kerzom	Finistère / 29	BRETAGNE	A3 LAZ 29-11	R	0.3889 +/- 0.0841	0.000549 +/- 0.000592	0.722222 +/- 0.410977	5,000
G01 / Figares	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 G01-10	R	0.6626 +/- 0.0327	0.001178 +/- 0.000950	0.747845 +/- 0.394573	10,222
Mas de la Cure	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 Am10-10	R	0.8095 +/- 0.1298	0.001480 +/- 0.001270	0.725926 +/- 0.403741	6,667
Bunker 1 Forêt Icard	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 Am11-11	R	0.6909 +/- 0.0861	0.001489 +/- 0.001203	0.747475 +/- 0.424000	5,000
G03 / Tourtoulou	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 G03-10	R	0.3874 +/- 0.1222	0.000592 +/- 0.000624	0.748470 +/- 0.398280	8,889
Mas de la Chartrouse	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 G07-11	R	0.4905 +/- 0.0656	0.001412 +/- 0.001106	0.740741 +/- 0.463439	3,667
	Bouches du Rhône / 13	CAMARGUE	A3 BEA 13-11	R	0.7500 +/- 0.0965	0.001362 +/- 0.001173	0.660562 +/- 0.374305	3,333
Mas des boules (30)	Gard / 30	CAMARGUE	A3 BUU 30-11	R	0.5750 +/- 0.1150	0.000918 +/- 0.000839	0.789536 +/- 0.423945	7,444
Remparts Aigues Mortes	Gard / 30	CAMARGUE	A3 G06-10	R	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000	0.777778 +/- 0.782905	1,778
	CORSE	CORSE	A3 ASC 20-11	R	0.2714 +/- 0.1242	0.000525 +/- 0.000583	0.609402 +/- 0.332020	6,222
Maison Frascaghiu	Haute-Corse	CORSE	A3 ALB 20-11	R	0.2597 +/- 0.1202	0.020226 +/- 0.010514	0.629277 +/- 0.342616	6,222
Colonie de la Rivière / gîte 1	Drôme / 26	DROME	A3 GIG 26-11	R	0.1250 +/- 0.1064	0.000177 +/- 0.000320	0.739181 +/- 0.405105	5,667
	Jura / 39	JURA	A3 BES 25-11	R	0.6381 +/- 0.0948	0.001076 +/- 0.000918	0.738683 +/- 0.399018	8,889
Château d'Amange	Jura / 39	JURA	A3 AMA 39-11	R	0.4912 +/- 0.0683	0.000694 +/- 0.000695	0.753001 +/- 0.405072	7,111
Colonie d'Ambax	Haute Garonne	MIDI-PYRENEES	A3 AMB 31-11	R	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000	0.722222 +/- 0.412865	8,222
Fort Libéria	Pyrénées Orientales / 06	SE-LANGUEDOC-R	A3 VIL 06-12	R	0.5300 +/- 0.0642	0.000904 +/- 0.000812	0.743563 +/- 0.398256	7,444
Habitation de Massel	Vaucluse / 84	VAUCLUSE	A3 BUO 84-11	R	0.6040 +/- 0.0850	0.000998 +/- 0.000863	0.767196 +/- 0.408158	8,778
Complexe les Frères / G13	Gard / 30	PIEMONT CEVENNES	A3 STE 30-11	R / H	0.7333 +/- 0.1199	0.054352 +/- 0.029247	0.796296 +/- 0.551391	3,000

## APPROCHE MICRO-ÉVOLUTIVE

De façon générale les populations échantillonnées présentent une diversité nucléaire importante au sein des différentes populations (Table 4) avec la totalité des loci microsatellites polymorphes (exceptées CHA et GO6-10 qui présentent respectivement 4 et 2 loci sur 9 monomorphes). L'AFM effectuée sur le jeu de données total ou sur le jeu de données des populations en reproduction (Illustration 4a et 4b), vont dans le même sens que l'analyse des Fst avec en particulier une différenciation des populations Corses (ASC et ALB) et de la population camarguaise BEA par rapport aux autres populations.

Ces résultats sont confirmés sur les analyses de STRUCTURE dans laquelle on observe une différenciation des populations Corses (ASC et ALB), des populations Bretonnes (SAI, GOU, LAZ) et de la population camarguaise BEA. Les autres populations camarguaises présentent quant à elles une diversité nucléaire très importante (Table 4). La différenciation de BEA reste néanmoins à confirmer car ce site accueille peu d'individus (5 au maximum) et est un gîte de transit en estive.





**Illustration 4: Analyse factorielle de correspondance multiple sur a) le jeu total de données, b) les populations en reproduction et c) les populations en hibernation**

De façon attendue, les populations en hibernation, qui rassemblent un mélange de plusieurs populations n'ayant pas forcément de liens de reproduction entre elles, sont majoritairement en déséquilibre de Hardy-Weinberg. Parmi les populations en reproduction certaines présentent également un déséquilibre de Hardy-Weinberg couplé à un phénomène plus ou moins important de déséquilibre de liaison entre les loci (comme par exemple les populations de BEA, BES). Ces résultats peuvent s'interpréter dans notre cas de deux façon, soit l'échantillonnage est trop petit et toute la diversité n'a pas été échantillonnée soit les populations font face à certaines forces évolutives qui favorisent ou au contraire limitent la présence de certaines catégories génétiques (comme les hétérozygotes) dans le jeu de données, ce qui est le signe de populations fragilisées. Il est fort probable que dans le cas de BEA, l'échantillon soit trop faible, car l'effectif semble inférieur à 10 individus. Concernant BES (Besançon), des investigations complémentaires seront nécessaire pour comprendre les phénomènes en présence.

En ce qui concerne les populations en hibernation, trois populations présentent des spécificités : MEY, SUM et SCRit (Illustration 4c).

## DISCUSSION

### MANIPULATIONS D'ADN ISSU DU GUANO

L'écart obtenu sur le nombre de séquences exploitables entre les populations indique dans un premier temps des conditionnements de guano très différents entre les populations. Ceci peut être dû à des environnements de vie des colonies très différents en terme d'humidité, de température ... Cela peut également dépendre du temps mis entre l'émission du guano et la récolte. Dans un deuxième temps nous avons mis en évidence de fort taux de contamination inter-individuels, rendant inexploitable l'information génétique des individus contaminés. Ces résultats nous incitent dans une démarche de prudence à demander une rigueur particulière sur le terrain. Nous

avons pu en effet faire une corrélation entre le nombre de contaminations et le fait que les guanos étaient stockés « en vrac » dans des tubes. **A l'inverse, les guanos individualisés dans des Eppendorfs présentaient beaucoup moins de problème de contamination.**

Cependant, il demeure possible de reprendre les analyses que nous avons effectuées en étant moins exigeants sur la longueur de la séquences et de ce fait rattraper des individus que nous avons été obligé de sortir de l'étude car la séquence obtenue ne répondait pas au critères de qualités et surtout de longueur.

Dans certaines populations la différence d'effectifs entre le nombre de guanos extraits et le nombre de guanos exploitables est liée au fait que les guanos présentaient des profils mitochondriaux et/ou microsattellites très différents laissant supposer la présence d'autres espèces. C'est le cas par exemple de la population STE (colonie mixte dans le Gard). Il serait intéressant d'essayer de caractériser ces profils pour les sites concernés afin de voir à quelle(s) autre(s) espèce(s) ils appartiennent et définir qui partage les lieux d'hibernation avec le Grand Rhinolophe.

### DIFFÉRENCIATION GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

Nous avons trouvé **une diversité non négligeable pour la majorité des populations et ce malgré des populations faiblement représentée en terme d'individus.** Les indices de diversité ainsi obtenus tendent à confirmer les résultats de Rossiter *et al.* (2000) avec des populations de Grand rhinolophes en Bretagne plus diversifiées que les populations Britanniques. Nos résultats montrent que **les populations camarguaises notamment, présentent une plus grande diversité encore, ce qui n'était pas connu jusqu'à présent.** De plus, au vu de la distribution des haplotypes mitochondriaux que nous avons identifiée, nous pouvons confirmer l'hypothèse formulée par Rossiter *et al.* (2007) selon laquelle les populations françaises seraient issues de populations refuges d'Italie.

Les différents résultats obtenus nous indiquent que **les populations de Corse sont très différentes des autres populations et ne semblent plus avoir de contact avec elles.** Elles présentent en effet une diversité propre et dérivée de la diversité obtenue notamment avec les populations Italiennes. Les populations Italiennes sont également différentes mais sont en relations avec les populations françaises avec lesquelles elles partagent des haplotypes. L'haplotype H13 est majoritairement présent en Italie, bien qu'une occurrence ait été trouvée en Bretagne (SAI). C'est à partir de cet haplotype que dérivent tous les haplotypes spécifiques de Corse (H1, H4, H10, H11) et d'Italie (H26). Ces résultats laissent entendre que **les populations de Corse dérivent des populations Italiennes mais que depuis des phénomènes de dérive génétique sont responsables de la différence génétique entre ces populations qui ne semblent plus être en contact.**

En ce qui concerne **les populations camarguaises, une surprenante diversité est globalement rencontrée.** Les différences entre populations se font majoritairement par des fréquences d'haplotypes qui sont différentes. Ainsi, parmi ces populations seules les populations GO6-10, BEA et Am11 ne présentent pas l'haplotype mitochondrial H6. Ceci peut être cependant également dû à un effectif de populations trop restreint et mérite d'autres études, les 3 sites présentant un effectif très réduit de Grand rhinolophes (moins de 10 individus).

Une telle diversité dans une population est un signe de population dynamique. Or, on observe au contraire une baisse des effectifs depuis les années 1990 dans les Alpilles où la population de Grand rhinolophes en hibernation a été divisée par 4. Il est donc intéressant à présent de savoir si l'explication vient d'un retard de lecture, c'est à dire que la diminution observée dans les Alpilles n'est pas encore visible dans l'ensemble du complexe Camargue, ou si les sites d'hibernation des Alpilles sont liés à un groupe reproducteur dans les Alpilles, inconnu jusqu'ici, et pas au complexe camarguais.

### APPROCHE MICRO-ÉVOLUTIVE : RELATIONS LOCALES

D'après les résultats préliminaires que nous venons d'obtenir nous pouvons émettre des hypothèses concernant

les relations entre populations. Ainsi, **nous pouvons supposer que la population de MEY (Lozère) n'est pas une colonie d'hibernation des populations de reproduction de Camargue et probablement EYG (Hautes-Alpes) non plus. Les populations GO8 (Bouches-du-Rhône) et VAC (Cévennes) semblent être de meilleures candidates** mais des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces hypothèses. **La colonie de reproduction GO1 (Saint-Gilles) est un peu particulière avec deux haplotypes équi-majoritaires (H5 et H8) et on ne retrouve pas ces proportions dans les colonies en hibernation que l'on a étudiées.** Même si les résultats obtenus sur la population de BEA sont à prendre avec précaution au vu du faible nombre d'échantillons et de son statut de site de transit, les profils microsatellites de cette population sont bien différents des autres populations du jeu de données. Une étude plus poussée serait à envisager pour expliquer ces résultats (recherche des colonies liées à BEA, calibration des profils mâles/femelles).

Les relations entre sites d'hibernation et colonies de reproduction devraient par ailleurs être assez visibles compte tenu du mode de dispersion particulier des Grand rhinolophes à l'approche de l'hiver. Ransome (2000) liste 3 types de sites d'hibernation :

- type 1 : regroupe des jeunes de 1 an et quelques immatures des deux sexes, éventuellement quelques mâles adultes
- type 2 : beaucoup d'individus de 2 à 3 ans en groupe, des adultes mâles. Les femelles sont dispersées dans les parties les plus profondes des cavités.
- type 3 : n'est pas uniquement un site d'hibernation. Ce type de cavité est occupé par un mâle territorial de la fin de l'été au début de l'hiver, et il accueille les femelles pour la copulation.

Les sites échantillonnés dans cette étude appartiennent aux types 1 et 2 certainement. Et si ces sites drainent plusieurs colonies de reproduction, les pools de gènes en reproduction ne sont apparemment pas ou peu éclatés en plusieurs sites d'hibernation. La nécessité de connaître la différence de profils génétiques entre mâles et femelles s'avère encore une fois importante.

Certaines populations présentent des indices de diversité contradictoires sur la D-loop (**ALB, Corse**) qui peuvent être le fruit d'un phénomène de **goulot étranglement des populations**, d'autres présentent des indices de faible diversité (**LAU, Alpes de Haute Provence et GIG, Drôme**) qui peuvent indiquer un **état particulièrement fragile de la population** (l'effectif est néanmoins à vérifier pour l'échantillon drômois). Ces indices mitochondriaux sont généralement liés à une diversité sur les marqueurs microsatellites moins importantes, ce qui tend à confirmer que des phénomènes démographiques de fragilisation plus ou moins importants sont en cours (ou se sont passés récemment). Ces résultats préliminaires soulignent donc la **nécessité de faire d'autres analyses**, en particulier car certaines de nos populations présentent des effectifs très faibles, **pour confirmer ces processus** et peut être déclencher la mise en place de plans de protection spécifique. **Les populations camarguaises présentent une diversité insoupçonnée qu'il sera intéressant de confirmer et de valoriser, et qui peut refléter des populations en expansion.** De plus, l'étude de populations « extérieures » nous a permis de mettre en évidence des populations bien différenciées tant sur l'ADN mitochondrial que sur les marqueurs nucléaires (exemples notamment avec les populations de Corse). Tous ces résultats sont à confirmer mais présagent d'ores et déjà la mise en place de considérations particulières pour ces populations afin de mieux établir leur statut.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En résumé, **les résultats obtenus à partir d'une matrice d'ADN très sensible sont très encourageants** et permettent de faire un premier bilan génétique sur des populations non étudiées à ce jour. Nous soulignons cependant le fait de l'importance de la conservation et de l'échantillonnage du guano afin d'optimiser les rendements d'extraction et diminuer au maximum les problèmes de contamination. **La conservation individuelle du guano en tube Eppendorf est préférable.**

De plus, étant donné les potentiels biais liés au fait que plusieurs excréments peuvent appartenir au même individu il apparaît crucial d'augmenter le jeu de données pour avoir une meilleure estimation de l'état populationnel. La matrice d'ADN utilisée implique de valider les résultats en testant leur reproductibilité (Puechmaile *et al.* 2007) afin de s'assurer de ne pas avoir des « faux positifs ».

Contrairement à ce qui était attendu l'ADN mitochondrial nous a permis de mettre en évidence des différences inter-populations, et ce à des échelles géographiques restreintes. À l'inverse, les marqueurs microsatellites que nous avons utilisés, bien qu'informatifs, ne sont pas des plus performants. En effet, les profils génotypiques sont assez difficiles à lire et la diversité obtenues et parfois difficile à interpréter (liés au fait que nous avons des motifs particuliers). Une recherche d'autres marqueurs microsatellites serait intéressante afin d'approfondir cette étude. D'autres analyses plus coûteuses en temps sont actuellement en cours afin d'affiner l'étude des relations entre populations notamment à partir des données microsatellites (présence d'allèles privés, d'allèles rares, flux entre colonies, identités ...).

Nos résultats tendent à mettre en évidence des populations de Grands Rhinolophes ayant des profils génétiques différents sur l'ensemble du territoire :

- **une différenciation des populations de Corse, de Bretagne et d'Italie**
- **une forte diversité des populations camarguaises**, ce qui signifierait que ce noyau est ancien
- un site en Arles (BEA) qui semble très différencié mais dont l'analyse reste à approfondir (faible effectif et site de transit)
- des populations des **Alpes de Haute Provence et de Drôme qui semblent fragilisées**
- des **sites d'hibernation** pour les populations estivales camarguaises orientés vers les **Bouches-du-Rhône (Alpilles) ou les Cévennes** plutôt que Lozère ou Hautes Alpes (à confirmer)

Ces informations montrent la complexité du fonctionnement des populations à une échelle large et impliquent la mise en place de protocoles d'études adaptés et des démarches de conservation spécifiques au contexte local. Et d'ores et déjà, la connaissance des profils génétiques des populations reproductrices camarguaises constitue une référence pour les suivis et prospections hivernaux futurs, et chaque guano récolté pourra être testé quand à l'accueil des colonies de Camargue.



# BIBLIOGRAPHIE

- Allen P.J., Amos W., Pomeroy P.P., Twiss S.D., 1995. Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecology*, 4 (6), 653-62.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C., 1987. Intraspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 459-522.
- Barallon R., 2008. Species determination by analysis of the cytochrome *b* gene. *Methods in Molecular Biology*, 98, 251-260.
- Belkhir, K.; V. Castric & F. Bonhomme. 2002. IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* 2(4): 611-614.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F, 2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome Populations Interactions, UMR 5000, CNRS, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bilgin R., Coraman E., Karatas A., Morales J-C., 2009. Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Chiroptera : Rhinolophidae) , in southeastern Europe and Anatolia, with a specific focus on whether the Sea of Marmara is a barrier to gene flow. *Acta Chiropterologica*, 11(1), 53-60.
- Boecklen W.J., Howard D.J. Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 1997. Vol. 78, n°8, p. 2611–2616.
- Breton S., Doucet Beaupré H., Stewart D.T., Hoeh W.R., Blier P.U., 2007. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA : isn't one enough ? *Trends in Genetics*, 23, 465-74.
- Brown J.L, Brown E.R., Brown S.D., Dow D.D., 1982. Helpers : effects of experimental removal on reproductive success. *Science*, 215,421-422.
- Buggs R.J.A. Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity*, 2007. Vol. 99, n°3, p. 301–312.
- Chapuis MP, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631 CrossRef, Medline.
- Chatterji S., Pachter L., 2006. Reference based annotation with GeneMapper. *Genome Biology*, 7, R29.
- Clément M., Posadu D., Crandall K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657-1660.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4): 2001-2014
- Corse E., Costedoat C., Chappaz R., Pech N., Martin J-F., Gilles A., 2010. A PCR-based method for diet analysis in freshwater organisms using 18S rDNA barcoding on faeces. *Molecular Ecology Resources*, 10, 96-108.
- Cutter A. D., 2006. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium in wild populations of the partial selfer *Caenorhabditis elegans*. Genetics Society of America, DOI: 10.1534/genetics.105.048207.
- Dawson D.A., Rossiter S.J., Jones G., Faulkes C.G., 2004. Microsatellite loci for the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Rhinolophidae, Chiroptera) and their crossutility in 17 other bat species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 96-100.
- Estoup A., Tailliez C., Cornuet J.M., Solignac M., 1995. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, 12 (6), 1074-1084.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611-2620
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 564-567
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003. Vol. 164, n°4, p. 1567–1587.
- Fitzpatrick BM. 2004. Rates of evolution of hybrid inviability in birds and mammals. *Evolution* 58(8): 1865-1870
- Flanders J, Jones G, Benda P et al. 2009 Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology*, 18, 306–318.
- Guo S, Thompson E., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Lecoq, V. (2006). Caractéristiques écologiques des rhinolophes (Chiroptera: Rhinolophidae) dans le Parc National des Cévennes et sa périphérie.
- Mao X, Zhang J, Zhang S, Rossiter SJ. 2010. Historical male-mediated introgression in horseshoe bats revealed by multilocus DNA sequence data. *Mol. Ecol.* 19(7): 1352-1366

- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 512 p.
- Paetkau D., Strobeck C., 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3 (5), 489-95.
- Puechmaille, S.J., Mathy, G. & Petit, E.J., 2007. Good DNA from bat droppings. *Acta Chiropterologica* 9(1): 269–276.
- Puechmaille S., Ar Guilh M., Piyapan P., Yokubol M., Khin Mie Mie, Bates P., Satasook C., Tin Nwe., Si Si Hla Bu, Mackie I, Petit E., Teeling E.C., 2011. The evolution of sensory divergence in the context of limited gene flow in the bumblebee bat. *Nature Communications*, 2, 573.
- Ransome R.D., 1991. Greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. In : *The Handbook of British Mammals*, 3rd edn ( eds Corbet GB, Harris S ), pp.88-94. Blackwell Publications, Oxford.
- Ransome, R. D., & Hutson, A. M. (2000). Action plan for the conservation of the greater horseshoe bat in Europe (*Rhinolophus ferrumequinum*) (No. 18-104). Council of Europe.
- Reed J.Z., Tollit D.J., Thompson P.M., Amos W., 1997. Molecular scatology : the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology*, 6, 225-234.
- Rossiter S.J, Jones G., Ransome R., Barratt E.M. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, 9, 1131–1135.
- Rossiter S.J., Jones G., Ransome R.D., Barratt E.M., 2000. Parentage, reproductive success and breeding behaviour in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *The Royal Society*, 267, 545-551.
- Rossiter S.J., Benda P., Dietz C., Zhang S., Jones G., 2007. Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites : implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology*, 16, 4699-4714.
- Slatkin M., 1994. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics*, 137, 331-336.
- Suk H.Y., Neff B.D., 2009. Microsatellite genetic differentiation among populations of the Trinidadian gruppy. *Heredity*, 102,425-434.
- Taberlet P., Camarra J.J., Griffin S., Uhres E., Hanotte O., Waits L.P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J., 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6, 869-876.
- Tajima F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437-460.
- Templeton A. R., Crandall K. A., Sing C. F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation, *Genetics*, 132 619-633.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Zarzoso-Lacoste D, Corse E, Vidal E. 2012. Improving PCR detection of prey in molecular diet studies: importance of group-specific primer set selection and extraction protocol performances *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/1755-0998.12029

# FIGHE DE SYNTHÈSE DE L'ACTION



## OBJECTIF INITIAL

Titre : Compréhension du mode d'utilisation du réseau de gîtes par les Chiroptères

- Quelle est la structuration génétique des populations de Grand rhinolophes de Camargue ?
- Peut-on mettre en évidence une différenciation génétique à l'échelle de la zone d'étude ?
- Peut-on mettre en relation des colonies de reproduction et des sites d'hibernation ?

## RÉSULTATS ACQUIS

- **différenciation des populations de Corse, de Bretagne et d'Italie**
- **une forte diversité des populations camarguaises**, ce qui signifierait une histoire ancienne, et la possibilité de continuer les investigations dans ce sens
- **des sites d'hibernation pour les populations estivales camarguaises orientés vers les Bouches-du-Rhône ou les Cévennes plutôt que Lozère ou Hautes Alpes (à confirmer)**
- **acquisition d'une référence génétique regroupant les grosses colonies reproductrices camarguaise**, qui servira de base à l'échantillonnage présent et futur des sites d'hibernation

## PERSPECTIVES DE GESTION ET APPLICATIONS

- **Analyses d'échantillons supplémentaires (hors LIFE)** pour augmenter la robustesse des résultats et éventuellement dans d'autres colonies, d'hibernation notamment
- caractérisation de l'état des populations afin de **cibler les mesures de protection**
- Analyses plus poussées dans **l'étude des relations entre populations sur le secteur d'étude**
- **l'ensemble de ces perspectives pourra être entrepris par les partenaires du LIFE Chiro Med** déjà investis sur l'étude, la première phase consistant en une recherche commune de financements