

Etude du régime alimentaire de la Grande noctule (*Nyctalus lasiopterus*) par métabarcoding

Johan MICHAUX*,**, Adrien ANDRÉ*, Marie-Jo DUBOURG-SAVAGE***

* GeCoLAB, Institut de Botanique (Bât.B22),
Université de Liège,
Quartier Vallée 1, Chemin de la vallée 4, 4000 Liège (Sart Tilman), Belgique.
*johan.michaux@uliege.be &
adrien.Andre@uliege.be*

**CIRAD, UMR ASTRE,
F-34398 Montpellier, France.

*** GCMP, CEN Occitanie,
75 voie du Toec, 31076 Toulouse.
chirosavage@gmail.com

Résumé. - Le régime alimentaire de la Grande noctule a été étudié par une analyse de métabarcoding à partir de 33 fèces collectées dans différentes régions de France. Les résultats ont montré la présence de plusieurs espèces de vertébrés dans le régime alimentaire de la Grande noctule, comme plusieurs espèces d'oiseaux mais également des chauves-souris. De nombreuses espèces d'insectes et d'araignées ont également été identifiées. Cette étude démontre que la Grande noctule présente un régime alimentaire riche et diversifié, de type assez opportuniste. Ces résultats doivent cependant être pris avec précaution et démontrent par ailleurs l'importance d'une grande prudence lors de l'échantillonnage afin d'éviter tout risque de contamination.

INTRODUCTION

La Grande noctule (*Nyctalus lasiopterus*) est la chauve-souris la moins connue de France, même si ces dernières années les contacts auditifs se sont multipliés. Cette espèce de plein ciel, difficile à capturer et gîtant dans les arbres, a été classée comme espèce prioritaire par le conseil scientifique d'EUROBATS puis dans le Plan National d'Actions pour les Chiroptères en France. Présente dans les Landes [FOUET & GONZALEZ 2008], sa reproduction fut avérée en 2012 dans le Massif Central, à la fois en Aveyron [DUBOURG-SAVAGE *et al.* 2012, 2013] et dans le Puy-de-Dôme [ALBESPY *et al.* 2013]. D'autres colonies de femelles furent découvertes en Ariège et en Ardèche tandis que les sites de mâles se multipliaient.

En Aveyron, une étude tous azimuts fut lancée pour approfondir l'écologie de l'espèce, d'abord par télémétrie pour découvrir les gîtes, puis les terrains de chasse, mais les femelles équipées disparaissaient systématiquement pendant deux à trois heures dans la même direction. L'année suivante une femelle équipée d'un VHF et d'un GPS fut suivie 12 nuits durant, avant de perdre son matériel dans un gîte connu [GACHES 2019].

Les résultats ont montré qu'une fois habituée à son fardeau elle partait chasser toutes les nuits dans les Gorges du Tarn et jusqu'à 100 km de ses gîtes. De nouvelles questions se posèrent alors : pourquoi va-t-elle si loin ? Recherche-t-elle une proie spécifique, par exemple, la Pyrale du buis ou la Processionnaire du pin ? Telles sont les questions qui nous ont conduits à lancer une étude du régime alimentaire de la Grande noctule.

Jusqu'alors l'identification des fragments de proies contenus dans le guano s'effectuait à la loupe binoculaire, technique utilisée par le Groupe Chiroptères Corse pour les fèces des mâles présents dans l'île [LUGON 2008]. Mais en Midi-Pyrénées, ayant pu faire analyser par métabarcoding quelques échantillons de guano, c'est cette technique que nous avons retenue pour la Grande noctule en partenariat avec l'Université de Liège.

OBJECTIFS ET MÉTHODES

Le but de l'étude a été d'identifier avec précision le régime alimentaire de la Grande noctule à partir de fragments d'ADN de proies contenus dans les fèces et selon une approche de métabarcoding. La technique

utilisée a été le séquençage (méthode à haut débit ou de nouvelle génération), d'un fragment du gène mitochondrial cytochrome oxydase 1 (CO1). L'ADN des échantillons a été extrait à l'aide du QIAamp fast DNA stool Mini Kit de Qiagen. L'ADN des proies contenues dans les fèces échantillonnées a permis l'amplification du fragment du gène CO1 à partir de primers mis au point au sein de notre laboratoire [GILLET *et al.* 2015]. Ce fragment d'ADN de 133 paires de bases a en effet fait ses preuves pour l'étude du régime alimentaire de nombreuses espèces de mammifères [ex. GILLET *et al.* 2015 ; BIFFI *et al.*, 2017 ; ANDRIOLLO *et al.*, 2019, 2021 ; SUBATRA *et al.*, 2020.]

Les séquences obtenues ont été traitées par un script bio-informatique développé au sein de notre laboratoire. En résumé, les séquences obtenues ont été comparées aux bases de données de référence globales (BOLD et GenBank) ainsi qu'à une base de données privée, établie par notre laboratoire. Ces approches complémentaires ont permis d'identifier avec précision les proies vertébrées et invertébrées ingérées par les Grandes noctules. Ces comparaisons ont été effectuées selon des approches d'alignement avec les séquences présentes dans les banques de données et informant sur le degré de similitude de celles-ci avec la séquence cible [ANDRÉ *et al.*, 2017]. Notre script bio-informatique a permis en outre d'effectuer, en amont des identifications taxonomiques, un filtrage et une exclusion des séquences artéfactuelles produites lors du séquençage à haut débit. Chaque espèce ou proie détectée a également été caractérisée par le nombre de reads (séquences) obtenus lors du séquençage, ainsi que par un pourcentage d'homologie avec les séquences de référence.

Trente-trois fèces ont été analysées parmi celles collectées dans différentes régions de France (Ariège, Aveyron, Cantal, Corse).

RÉSULTATS

Plusieurs espèces de vertébrés ont été identifiées, notamment des passereaux qui, pour la première fois en France, firent leur apparition sur la liste de proies de la Grande noctule (Tableau I) : Gobemouche noir (*Ficedula hypoleuca*) (nombre de séquences identifiant l'espèce :

Classes	
Oiseaux	<i>Phylloscopus trochilus</i>
	<i>Ficedula hypoleuca</i>
	<i>Erithacus rubecula</i>
Mammifères	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>
	<i>Eptesicus serotinus</i>
	<i>Eptesicus nilssonii</i>
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>
	<i>Myotis myotis</i>

Tableau I. - liste des espèces de vertébrés identifiées dans le régime alimentaire de la Grande noctule.

48 5000) ; Pouillot fitis (*Phylloscopus trochilus*) (nombre de séquences identifiant l'espèce : 48 660) ; Rougegorge (*Erithacus rubecula*), (nombre de séquences identifiant l'espèce : 7).

Parmi les mammifères, 5 espèces ont été identifiées, dont 4 sont régulièrement identifiées sur les sites concernés (Tableau I) : Grand murin (*Myotis myotis*) (nombre de séquences identifiant l'espèce : 1615) ; Pipistrelle commune (*Pipistrellus pipistrellus*) (nombre de séquences identifiant l'espèce 155) ; Pipistrelle pygmée (*Pipistrellus pygmaeus*) (nombre de séquences identifiant l'espèce 7) ; Sérotine commune (*Eptesicus serotinus*) (nombre de séquences identifiant l'espèce : 5).

Il est à noter que les identifications d'espèces présentant un nombre de séquences peu important (en dessous de 100 séquences) doivent être interprétées avec beaucoup de précautions car celles-ci pourraient provenir de contaminations effectuées sur le terrain (ex. gants ou matériel de terrain précédemment contaminés par d'autres espèces de chauves-souris).

Seule la Sérotine de Nilsson (*Eptesicus nilssonii*) (nombre de séquences identifiant l'espèce 5) n'est pas connue de Corse. Ce résultat pourrait s'expliquer par une pollution par des fragments de guano d'un individu erratique qui aurait partagé le même gîte que la Grande noctule. Cependant, ce résultat pourrait également s'expliquer par un problème de contamination lors des manipulations de terrain.

Les résultats de cette étude ont également démontré que la Grande noctule se nourrit également majoritairement de nombreuses espèces d'invertébrés (insectes et arachnides) comme les Orthoptères, Trichoptères, Coléoptères, Hyménoptères, Névroptères, Diptères, Ephéméroptères et Lépidoptères nocturnes (Tableau II).

DISCUSSION

Notre étude a montré que la Grande noctule présente un régime alimentaire extrêmement diversifié, de type opportuniste.

Cette étude montre que si l'essentiel de sa nourriture se compose de proies invertébrées (nombreuses espèces d'insectes, particulièrement papillons nocturnes), les proies vertébrées (oiseaux, chauves-souris) peuvent aussi être au menu de la Grande noctule à certaines périodes, notamment lors des migrations. Ces derniers résultats rejoignent ceux obtenus en Italie et Espagne depuis les années 2000 [DONDINI ET VERGARI, 2000 ; IBÁÑEZ *et al.* 2001].

Notre étude a notamment permis de mettre en évidence des espèces d'oiseaux inédites dans le régime alimentaire de la Grande noctule comme le Gobemouche noir (*Ficedula hypoleuca*). Par ailleurs, notre étude tend à montrer le rôle de prédateur de la Grande noctule pour d'autres espèces de chauves-souris, comme le Grand murin (*Myotis myotis*).

La prudence est cependant de mise pour certaines espèces proies caractérisées par peu de séquences d'ADN

Ordres	
Coleoptera	<i>Amphimallon solstitiale</i>
	<i>Carabus auratus</i>
	<i>Melolontha melolontha</i>
	<i>Nicrodes littoralis</i>
Diptera	<i>Musca domestica</i>
	<i>Paratrichocladius rufiventris</i>
	<i>Psychoda cinerea</i>
	<i>Simulium equinum</i>
Ephemeroptera	<i>Baetis fuscatus</i>
	<i>Ephemerella ignita</i>
	<i>Rhithrogena sp.</i>
Hymenoptera	<i>Lasius emarginatus</i>
Lepidoptera	<i>Agonopterix ciliella</i>
	<i>Agrotis infusa</i>
	<i>Apamea monoglypha</i>
	<i>Autographa gamma</i>
	<i>Cnephasia stephensiana</i>
	<i>Cosmia trapezina</i>
	<i>Helicoverpa armigera</i>
	<i>Helicoverpa hardwicki</i>
	<i>Heliothis peltigera</i>
	<i>Mesapamea secalis</i>
	<i>Mythimna albipuncta</i>
	<i>Noctua janthe</i>
	<i>Nomophila noctuella</i>
	<i>Timandra comae</i>
	<i>Triodia sylvina</i>
<i>Xestia dolosa</i>	
<i>Plodia interpunctella</i>	
<i>Spodoptera exigua</i>	
Neuroptera	<i>Neuroptera sp.</i>
Orthoptera	<i>Tettigonia viridissima</i>
Trichoptera	<i>Hydropsyche siltalai</i>
	<i>Limnephilus auricula</i>
	<i>Limnephilus lunatus</i>
	<i>Smicridea filicata</i>

Tableau II. - liste des espèces arthropodes identifiées dans le régime alimentaire de la Grande noctule.

et si le Rouge-gorge (*Erithacus rubecula*) était déjà connu comme proie, la taille des autres espèces telles que le Grand murin, la Sérotine commune et la Sérotine de Nilsson interpelle. Ces dernières espèces correspondent-elles réellement à des proies de la Grande noctule et le faible nombre de séquences les caractérisant pourrait-elle s'expliquer par le fait qu'elles auraient été capturées plus de 24 h avant la collecte de fèces, ne laissant ainsi que quelques traces d'ADN dans le tractus intestinal ? Ou bien un tel résultat pourrait-il s'expliquer par des problèmes de contamination lors de la collecte des fèces : pochon, gants, pinces contaminés voire par des fragments de guano d'autres espèces ayant fréquenté le gîte de la Grande noctule ? La Grande noctule peut en effet partager son gîte avec d'autres espèces de chauves-souris [IBÁÑEZ *et al.* 2004] mais à notre connaissance il n'a jamais été mentionné qu'elle pouvait dévorer d'autres Chiroptères !

CONCLUSION

L'analyse d'un échantillonnage plus important est nécessaire afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats. Cet échantillonnage plus important permettra par ailleurs de corréler les résultats obtenus à différents paramètres comme la saison, la région d'étude et les mouvements migratoires de la Grande noctule.

Les méthodes de séquençage à haut débit et de métabarcoding s'avèrent quoiqu'il en soit extrêmement puissantes pour identifier le régime alimentaire des chauves-souris et des mammifères en général. Ces informations sont extrêmement importantes pour améliorer nos connaissances concernant l'écologie et la conservation de ces espèces.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les naturalistes qui nous ont fourni des fèces pour cette étude : Alter Eco Environnement, Association des Naturalistes Ariégeois, Groupe Chiroptères Corse, ONF... et tous les groupes Chiroptères régionaux qui ont des Grandes noctules sont invités à se joindre à l'étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBESPY F., BEUCHER Y. ET DURAND H., 2013. - *Suivi de la Grande noctule, Nyctalus lasiopterus* [SCHREBER, 1780]. *Prospections 2013 visant à prouver la présence de gîtes de mise bas et à approfondir les connaissances sur la biologie de l'espèce, s.l.* EXEN & Chauve-Souris Auvergne.
- ANDRIOLLO T., GILLET F., MICHAUX J.R. & RUEDI M., 2019. - The menu varies with metabarcoding practices : A case study with the bat *Plecotus auritus*. *PLOS ONE* 14(7) : e0219135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219135>
- ANDRIOLLO T., MICHAUX J.R. & RUEDI M., 2021. - Food for everyone : differential feeding habits of cryptic bat species inferred from DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*

- 30(18) : 4584-4600. doi : 10.1111/mec.16073.
- BIFFI M., LAFAILLE P., JABIOL J., ANDRÉ A., GILLET F., LAMOTHE S., MICHAUX J.R. & BUISSON L., 2015. - Comparison of diet and prey selectivity of the Pyrenean desman and the Eurasian water shrew using next-generation sequencing methods. *Mammal Biology* 87 :176-184.
- BIFFI M., GILLET F., LAFAILLE P., COLAS F., AULAGNIER S., BLANC F., GALAN M., TIOUCHICHINE M.-L., NÉMOZ M., BUISSON L. & MICHAUX J.R., 2017. - Novel insights into the diet of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) using next-generation sequencing molecular analyses. *Journal of Mammalogy*, 98(5) :1497-1507.
- DUBOURG-SAVAGE M.-J., BEC J. & GACHES L., 2012. - Premières données de reproduction pour la Grande noctule (*Nyctalus lasiopterus*) en France. *Arvicola* Tome XX (2) : 37-40.
- DUBOURG-SAVAGE M.-J., BEC J. & GACHES L., 2013. - First roosts of *Nyctalus lasiopterus* breeding females in France. *Barbastella* 6(1) : 44-50.
- DONDINI G. & VERGARI S., 2000. - Carnivory in the greater noctule bat (*Nyctalus lasiopterus*) in Italy. *J. Zool. Lon.* 251 : 233-236.
- GILLET F., TIOUCHICHINE M.-L., GALAN M., BLANC F., NEMOZ M., AULAGNIER S., MICHAUX J.R., 2015. - A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. *Mammal Biology* 80(6) : 505-509.
- IBÁÑEZ, C., JUSTE J., GARCIA-MUDARRA J.L. & AGIRRE-MENDI P.T., 2001. - Bat predation on nocturnally migrating birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98 : 9700-9702, DOI 10.1073/pnas, 171140598.
- IBÁÑEZ C., GUILLEN A. & W. BOGDANOWICZ., 2004. - *Nyctalus lasiopterus* [SCHREBER, 1780] Riesenabendsegler. In : (Krapp, F., ed.) *Handbuch der Säugetiere Europas*. Vol. 4/ II. AULA-Verlag, Wiesbaden, Germany. pp. 695-716.
- LUGON A., 2008. - Analyse du régime alimentaire de *Nyctalus lasiopterus*, Rospa Sorba, Corse 2B. *L'Azuré*, rapport final pour le GCC, 8p + annexes.
- MICHAUX J., DYCK M., BOAG P., LOUGHEED S. & VAN VOEVERDEN DE GROOT P., 2021. - New Insights on Polar Bear (*Ursus maritimus*) Diet from Faeces based on Next-Generation Sequencing Technologies. *Arctic* 74 (1) : 57-99. <https://doi.org/1014430/arctic72239>
- SUBRATA S., SIREGAR S., ANDRÉ A. & MICHAUX J.R. 2021. - Identifying prey of the Javan mongoose (*Urva javanica*) in Java from fecal samples using next-generation sequencing. *Mammalian Biology*, 101 : 63-70. DOI 10.1007/s42991-020-00086-y

