

Tout sur la vie du Petit rhinolophe via l'acoustique

Sébastien J. PUECHMAILLE*

*Université de Montpellier,
Montpellier France &
Université de Greifswald,
Greifswald, Allemagne
sebastien.puechmaille@umontpellier.fr

Résumé. - Le sex-ratio des populations sont d'une grande importance écologique, mais il est difficile de les déterminer chez les espèces qui n'ont pas d'indices externes bien visibles à distance indiquant leur sexe. Le sexage acoustique est une possibilité si les vocalisations diffèrent entre les sexes, mais il est rendu difficile par le chevauchement des distributions des valeurs de vocalisations mâles et femelles chez de nombreuses espèces. Une méthode permettant d'inférer le sex-ratio malgré un tel chevauchement augmentera donc considérablement les informations pouvant être extraites des données acoustiques.

Pour répondre à cette demande, nous avons développé une nouvelle approche utilisant le calcul Bayésien approximatif (ABC) pour estimer le sex-ratio des populations à partir de données acoustiques. De plus, les paramètres caractérisant la distribution mâle et femelle des valeurs acoustiques (moyenne et écart-type) sont également estimés. Ces informations sont ensuite utilisées pour attribuer de manière probabiliste un sexe à chaque cri/enregistrement.

L'application de nos méthodes à des données simulées démontre que le sex-ratio et les caractéristiques des paramètres acoustiques des mâles et des femelles sont estimés de manière fiable par l'approche ABC. L'application de la méthode ABC à des jeux de données empiriques (cris d'écholocation enregistrés dans des colonies de Petits rhinolophes, *Rhinolophus hipposideros*) fournit des sex-ratios similaires à ceux obtenus par sexage moléculaire.

La méthodologie développée est non invasive, peu coûteuse et efficace en temps, permettant ainsi l'étude de nombreux sites et individus. Le script R est disponible gratuitement pour l'application facile de la méthode et nous discutons des extensions potentielles et des champs d'applications futurs

Mots clefs. - Petit rhinolophe, *Rhinolophus hipposideros*, sex-ratio, sexage acoustique, méthode ABC

INTRODUCTION

La proportion de mâles (abrégié 'PdM' par la suite) dans les populations animales est d'un grand intérêt, autant en écologie qu'en biologie de la conservation, car le sex-ratio influence les systèmes d'accouplement et la taille effective de la population, cette dernière étant cruciale pour le maintien de la diversité génétique [WEDEKIND, 2012]. Chez les espèces dont le sexe ne peut être facilement identifié visuellement parce qu'elles sont difficiles à observer, ou qu'elles ne présentent pas de dimorphisme sexuel secondaire facilement visible, d'autres moyens de déterminer la PdM sont nécessaires. Le sexage moléculaire peut offrir une alternative [MORINHA *et al.* 2012 ; ZARZOSO-LACOSTE *et al.*, 2017], mais il demande généralement beaucoup de temps et d'argent, et est souvent invasif en raison des difficultés liées aux échantillons collectés de manière non invasive, par exemple la nécessité de traiter des répliques de chaque échantillon et l'augmentation des coûts associée [ZARZOSO-LACOSTE *et al.*, 2017 ; BOSTON *et al.*, 2012].

Chez les espèces présentant un dimorphisme sexuel vocal, ces problèmes peuvent être contournés par le sexage acoustique. Au cours des dernières décennies, le monitoring acoustique passif est devenu un outil populaire pour collecter des informations sur la biodiversité [HARRIS *et al.*, 2016], les densités de population [MARQUES *et al.*, 2013 ; KLOEPPER *et al.*, 2016], les mouvements et le comportement des animaux [WREGE *et al.*, 2017], et la façon dont ces facteurs sont influencés par les activités anthropiques [LAILOLO P., 2010]. Outre l'identité de l'espèce [ZSEBŐK *et al.*, 2015 ; WALTERS *et al.*, 2012 ; ZAMORA-GUTIERREZ *et al.*, 2016], les données acoustiques peuvent coder des informations sur le sexe [AUBIN *et al.*, 2007 ; PUECHMAILLE *et al.*, 2014 ; SCHUCHMANN *et al.*, 2012 ; JONES *et al.*, 1992], l'identité individuelle [AUBIN *et al.*, 2007 ; PEAKE *et al.*, 1998], la taille du corps, l'âge et le groupe social [JONES *et al.*, 1992, FISCHER *et al.*, 2004 ; REBY *et al.*, 2003 ; CHARLTON *et al.*, 2009] ou l'origine géographique [MALULEKE *et al.*, 2017 ; LAIOLO *et al.*, 2001 ; PUECHMAILLE *et al.*, 2011]. L'identification du sexe basée sur les cris, par exemple, a été appliquée avec

succès à 25 des 69 espèces d'oiseaux étudiées ne présentant pas de dimorphisme sexuel externe [VOLODIN *et al.*, 2015]. Le sexage acoustique s'est cependant avéré moins fiable, voire impossible, pour de nombreuses espèces étudiées, en raison des degrés variables de chevauchement des caractéristiques acoustiques des mâles et des femelles. Un tel chevauchement, qui est couramment rencontré dans les groupes taxonomiques [VOLODIN *et al.*, 2015 ; FRANCIS *et al.*, 1998], limite fortement le champ d'application des données acoustiques. Par conséquent, de nouvelles approches sont nécessaires pour permettre le sexage acoustique et les inférences de sex-ratios malgré un tel chevauchement.

Pour étudier la possibilité de déduire le sex-ratio et de fournir des méthodes de sexage à partir de données acoustiques, nous utilisons le Petit rhinolophe, *Rhinolophus hipposideros* (*Rhip*), comme modèle biologique montrant un dimorphisme sexuel acoustique avec un chevauchement entre les sexes [JONES *et al.*, 1992]. Cette espèce figure dans les annexes II et IV de la directive européenne sur les habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore. La surveillance des populations est donc légalement obligatoire. Chez *Rhip*, le succès reproductif des colonies est généralement estimé en divisant le nombre de juvéniles par le nombre de femelles adultes. Ce dernier ne peut cependant pas être facilement déterminé à partir de comptages visuels des adultes de la colonie. Pour un suivi régulier, identifier le sex-ratio via la capture n'est pas adaptée en raison de l'effort important en temps requis et du stress de manipulation pour les chauves-souris. Les estimations actuelles du succès de reproduction supposent donc généralement que tous les adultes présents dans la colonie sont des femelles. On a cependant rapporté dans le passé la présence de mâles dans les colonies de reproduction de *Rhip* [ISSEL, 1950 ; GAISLER, 1963 ; BONTADINA *et al.*, 2002]. ZARZOSO-LACOSTE *et al.* [2017] ont en outre démontré que la PdM dans les colonies de maternité peut être importante et surtout, qu'elle diffère entre les colonies. Les estimations traditionnelles sont donc susceptibles de sous-estimer le nombre de descendants par femelle à un degré imprévisible et appellent donc à développer et tester des méthodes alternatives.

Les nombres importants de cris émis par les chauves-souris écholocatrices les rendent idéales pour un monitoring acoustique et pour développer des méthodes de sexage acoustique. Cependant, le sexage basé sur des paramètres simples tel que la fréquence des émissions n'a pas encore été possible, car ces paramètres acoustiques se chevauchent entre les sexes [JONES, 1992 ; JONES *et al.*, 2011 ; GILLAM *et al.*, 2016]. Par conséquent, une approche qui permettrait de déterminer rapidement et simplement le sex-ratio dans les populations sauvages, malgré ce chevauchement, serait très utile aux programmes de monitoring et aux études écologiques. Nous avons utilisé le calcul Bayésien approximatif (ABC) pour estimer les sex-ratios à partir de cris enregistrés passivement chez le Petit rhinolophe qui présente un dimorphisme sexuel vocal, où les plages de fréquences acoustiques des mâles et des femelles

se chevauchent. Cette approche novatrice permet en outre d'étudier les changements spatiaux ou temporels de sex-ratio, et l'attribution du sexe mâle ou femelle à l'individu émettant des cris. Nous avons également développé une approche plus simple qui ne prend en compte que les cris en dehors de la zone de chevauchement. La performance de ces méthodes est testée avec des données simulées. Nous validons en outre la fiabilité de la détermination du sex-ratio acoustique avec des données empiriques (cris d'écholocation enregistrés) provenant de quatre colonies de *Rhip* sexées moléculairement.

Les résultats présentés ici en français sont un résumé de ceux présentés dans l'article publié en anglais par Lehnen *et al.* [LEHNEN, 2018]. Toutes les méthodes sont mises en œuvre dans les scripts R disponibles gratuitement (Fichier S1, script R pour l'analyse ABC avec des données simulées : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199428.s005> ; fichier S2, script R pour l'analyse ABC avec des données empiriques : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199428.s006>). Les utilisateurs n'ont pas besoin d'avoir une expérience en programmation si leur système d'étude répond aux hypothèses de l'approche actuellement mise en œuvre, car les valeurs de priors sont la seule entrée requise.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Estimation du sex-ratio en excluant la zone de chevauchement (=méthode dite d'exclusion)

En analogie aux approches utilisées pour des espèces dont les plages de valeurs acoustiques ne se chevauchent pas, nous avons développé une première méthode pour déterminer les sex-ratios qui considère uniquement les cris qui peuvent être classés avec un degré important de confiance comme mâle ou femelle. La PdM est alors simplement calculée comme la proportion de cris de mâles dans l'ensemble des données non exclues. Les cris tombant dans la plage de chevauchement ont donc été exclus de cette méthode (méthode d'exclusion). Pour étudier les compromis entre les niveaux de confiance des estimations et les réductions de la taille de l'échantillon, nous avons testé la performance de cette méthode en utilisant différents seuils pour la zone d'exclusion. Pour des raisons de simplicité, nous avons toujours considéré que les mâles émettent des cris plus bas en fréquence que les femelles, de sorte que la zone d'exclusion englobe la queue droite de la distribution des appels des mâles et la queue gauche de la distribution des appels des femelles. Dans le cas le plus strict (zone d'exclusion la plus large), la limite inférieure de la zone d'exclusion a été fixée à la fréquence qui était inférieure à la fréquence de 99,9 % de tous les cris des femelles, et la limite supérieure à la fréquence qui était supérieure à la fréquence de 99,9 % des cris des mâles (Figure 1). Les approches moins drastiques ont utilisé des seuils de 99 et 95 %.

Cette méthode d'exclusion utilise des données distribuées normalement avec la moyenne du paramètre acoustique pour chaque sexe et le l'écart-type estimé par la

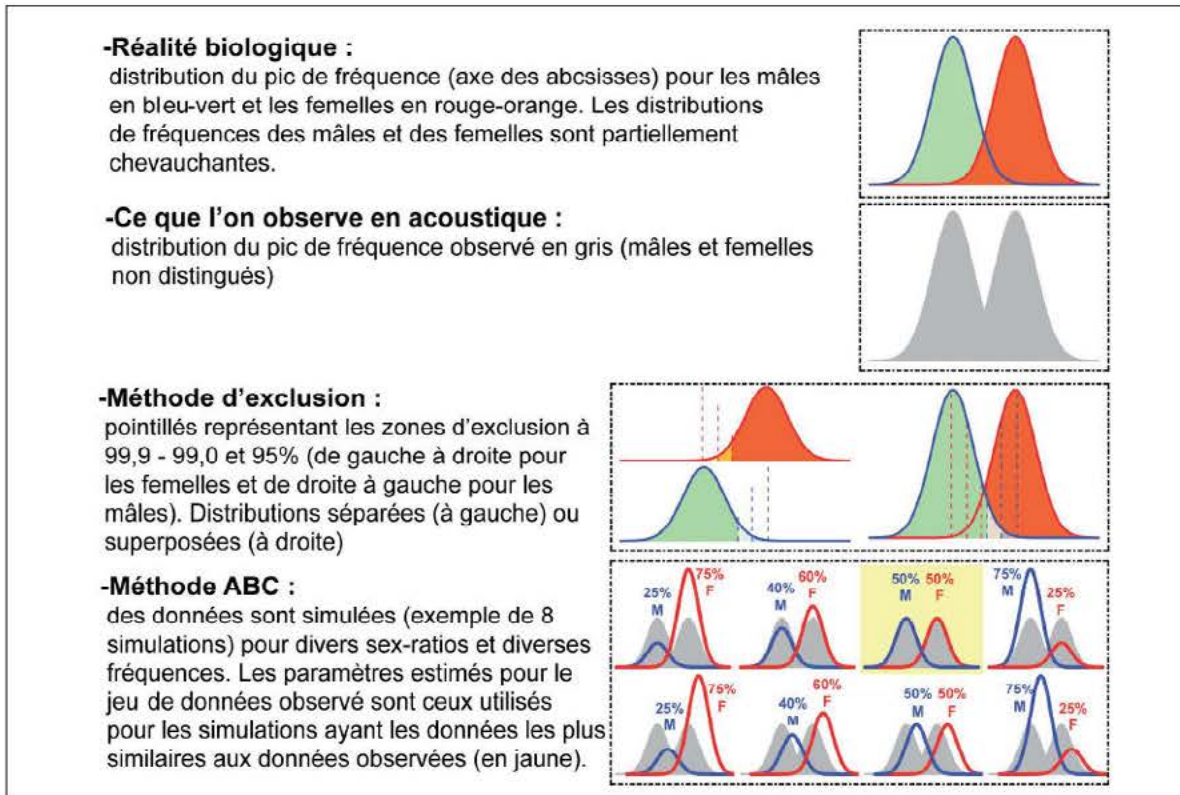


Figure 1. - Illustration des méthodes utilisées pour estimer la proportion de mâles à partir de données acoustiques.

L'axe des abscisses représente la variable acoustique d'intérêt (par exemple, le pic de fréquence) avec des distributions différentes, mais qui se chevauchent, chez les mâles (bleu-vert) et les femelles (rouge-orange) ; les deux sont représentées par une fonction de densité de probabilité. Dans l'exemple choisi (réalité biologique, il y a un sex-ratio équilibré).

méthode ABC (ci-dessous). La méthode d'exclusion peut également être appliquée sans utiliser la méthode ABC, mais la valeur de ces paramètres doit alors être fournie par l'utilisateur sur la base de sa connaissance préalable du système. Nous avons donc examiné comment l'exactitude (proximité de la valeur donnée par l'utilisateur par rapport à la valeur réelle) des valeurs des paramètres fournis à la méthode l'exclusion affectait l'estimation de la PdM. À cette fin, nous avons étudié l'effet d'une utilisation de valeurs moyennes de fréquence supérieures ou inférieures de 3 kHz à la valeur réelle (simulée). Les seuils de 95, 99 et 99,9 % ont été calculés comme expliqué ci-dessus sur la base des valeurs moyennes du pic de fréquences des mâles et des femelles fournies par l'utilisateur. Les calculs ont été effectués pour des proportions de mâles comprises entre 0 et 1 par paliers de 0,05.

Inférences du sex-ratio via la méthode ABC

La deuxième méthode que nous avons développée et utilisée est basée sur le framework ABC permettant de déduire les paramètres les plus probables pour une distribution observée en comparant des statistiques sommaires des données observées aux statistiques sommaires de jeux de données simulées (Figure 1). Dans notre cas, le principal paramètre étudié était la PdM pour un jeu de données

(ex. ensemble d'enregistrements acoustiques provenant de nombreux individus). Afin de généraliser notre approche et de prendre en compte une certaine incertitude dans les connaissances préalables des paramètres acoustiques pour les deux sexes, nous avons également estimé trois paramètres supplémentaires : la moyenne du pic de fréquence de chaque sexe séparément (deux paramètres) et l'écart-type (sd) du pic de fréquence de chaque sexe. Ce dernier a été supposé égal pour les deux sexes, et donc représenté par un seul paramètre, une hypothèse qui peut être relaxée. Sur la base d'observations de terrain pour les populations étudiées et des données publiées [JONES *et al.*, 1992 ; BARATAUD, 2012 ; DOOL *et al.*, 2016 ; WIMMER *et al.*, 2017], les paramètres suivants (avec une distribution uniforme) ont été utilisés : PdM : 0-1, pic de fréquence moyen des mâles : 104-107 (kHz), pic de fréquence moyen des femelles : 108-111 (kHz), sd du pic de fréquence : 0,8-1,2 kHz. Nous avons utilisé deux contraintes supplémentaires, à savoir que le pic de fréquence moyen des mâles devait être inférieur d'au moins 2,5 kHz, mais pas de plus de 5 kHz, au pic de fréquence moyen des femelles [DOOL *et al.*, 2016]. Les comparaisons entre les données observées et simulées ont utilisé les statistiques sommaires suivantes : a) médiane des pics de fréquence, b) moyenne des pics de fréquence, c) écart-

type des pics de fréquence (toutes indépendamment du sexe), d) distance de Kolmogorov-Smirnov entre les distributions observées et simulées des pics de fréquence.

Nous avons utilisé l'algorithme ABC de Monte-Carlo adaptatif de la population développé par LENORMAND *et al* [2013].

Jeux de données simulés

Les simulations utilisées dans la phase de test de l'algorithme ABC et pour effectuer les analyses ABC ont été implémentées via un script R personnalisé (fichiers S1 et S2). Pour une taille d'échantillon totale (ici, le nombre de cris) et une PdM donnée, nous avons calculé le nombre de points (cris) provenant des femelles et des mâles, respectivement, et simulé des données de pic de fréquence suivant une loi normale pour chaque sexe séparément. Nous avons supposé que le ratio entre les cris des mâles et des femelles était égal au ratio entre le nombre de mâles et le nombre de femelles. Les tailles d'échantillons utilisées étaient de 100, 500, 1000, 2500, 5000 et 10000 ; la PdM allait de 0 à 1 par incréments de 0,05, avec 100 répétitions par combinaison de paramètres. Le pic de fréquence moyen a été soit défini par l'utilisateur pour créer des jeux de données test, soit choisi automatiquement par l'algorithme ABC. Pour les jeux de données test, les valeurs de paramètres suivantes ont été utilisées : pic de fréquence moyen des mâles = 106 kHz, pic de fréquence moyen des femelles = 109 kHz, et sd du pic de fréquence = 1 pour chaque sexe. Lors de l'exécution de l'algorithme ABC, les priors ont été utilisés comme défini dans la section ci-dessus. La distribution normale a été utilisée car elle correspond bien à la distribution des pics de fréquence observée chez *Rhip* [DOOL *et al.*, 2016].

Performance des méthodes

La performance des différentes méthodes d'estimation de la PdM a été évaluée en calculant l'erreur quadratique moyenne (RMSE) :

$$RMSE = \sqrt{\sum_{k=1}^R (p_i - P)^2 / R}$$

où p_i est l'estimation de la proportion simulée (vraie) de mâles P pour l' i ème jeu de données ($i = 1, 2, \dots, R$). Un RMSE de zéro signifie un estimateur qui est identique à la vraie valeur. Plus l'estimation s'éloigne de la vraie valeur, plus le RMSE augmente.

Approche en deux étapes pour les petits jeux de données

Comme la précision des estimations obtenues avec la méthode ABC diminue avec la taille de l'échantillon (voir Résultats), une estimation précise du sex-ratio pourrait être mise à mal pour les petits jeux de données (c'est-à-dire un faible nombre de cris). Ceci s'applique aux études qui

s'intéressent aux changements temporels ou spatiaux de la PdM, par exemple sur un mois ou entre différentes parcelles d'habitat, nécessitant ainsi des estimations sur une base quotidienne ou pour des zones spatiales restreintes. En utilisant des données simulées, nous avons exploré l'utilisation d'une procédure ABC en deux étapes dans laquelle nous avons d'abord estimé les paramètres acoustiques pour chaque sexe (moyenne et sd) sur l'ensemble des données (par exemple pour un mois entier). Dans une deuxième étape, nous avons utilisé l'intervalle de densité maximale à 95 % de ces estimations comme nouveaux priors pour relancer la procédure ABC pour chaque sous-ensemble de ces données (par exemple, chaque jour séparément). Cette approche en deux étapes suppose que la moyenne des paramètres acoustiques spécifiques au sexe ne change pas dans l'espace au sein de l'ensemble de données considérées, c'est-à-dire que la moyenne et l'écart-type des pics de fréquences ne changent pas, par exemple, d'un jour à l'autre (temps) ou entre deux parcelles/zones de chasse (espace). Nous avons étudié les performances de la procédure en deux étapes à l'aide de jeux de données simulés imitant une augmentation de la PdM dans le temps par pas de 0,05 de 0 à 1 ($\Delta 21$ pas, chacun représentant une certaine période de temps). Le nombre de cris par période a été maintenu constant. Ainsi, les simulations ont été effectuées pour 25, 50 et 100 appels par période de sorte que le nombre total de cris par ensemble de données était de 525, 1050 et 2100, respectivement. Un total de 100 ensembles de données simulées a été utilisé par combinaison de paramètres.

INFÉRENCE DU SEXE POUR CHAQUE ENREGISTREMENT

Le framework ABC ne fournit pas d'informations sur le sexe de chaque point de données (ici, le cri). Néanmoins, les informations sur les paramètres acoustiques et la PdM fournis peuvent être utilisés par la suite pour assigner de manière probabiliste un sexe à chaque point de données. Pour ce faire, nous avons calculé le rapport de vraisemblance d'un cri provenant d'un mâle par rapport à une femelle comme la probabilité conditionnelle d'un cri provenant d'un mâle étant donné sa fréquence divisée par la probabilité conditionnelle d'un cri provenant d'une femelle étant donné sa fréquence. En suivant le théorème de Bayes, la probabilité conditionnelle d'observer un mâle étant donné son pic de fréquence peut être écrite comme suit :

$$- P(\text{Male} | \text{Fréq}) = P(\text{Fréq} | \text{Mâle}) \times P(\text{Mâle}) / P(\text{Fréq})$$

La probabilité conditionnelle d'observer une femelle étant donné son pic de fréquence peut être écrite comme suit :

$$- P(\text{Femelle} | \text{Fréq}) = P(\text{Fréq} | \text{Femelle}) \times P(\text{Femelle}) / P(\text{Fréq})$$

Le rapport de vraisemblance (LR) peut donc être réduit à :

$$- LR = P(\text{Fréq} | \text{Mâle}) \times P(\text{Mâle}) / P(\text{Fréq} | \text{Femelle}) \times P(\text{Femelle})$$

Les appels avec un rapport de vraisemblance >1 ou <1 ont été considérés comme provenant de mâles ou de femelles, respectivement.

En utilisant des jeux de données simulés, nous avons étudié la proportion de cris correctement attribués au bon sexe en utilisant cette approche probabiliste. Pour étudier la performance de l'approche avec des niveaux variables de chevauchement entre les distributions de cris des mâles et des femelles, des différences de 1, 2, 3, 4 et 5 kHz entre les moyennes du pic de fréquence des mâles et des femelles ont été considérées. Des échantillons de 25, 50, 100, 500 et 1000 cris ont été étudiés avec 1000 répétitions par combinaison de paramètres (225 000 jeux de données simulés).

Données empiriques

Les données empiriques (=observées) se composaient de cris d'écholocation de *Rhip* enregistrés dans quatre colonies de maternité en Thuringe (Allemagne). Le dispositif d'enregistrement automatique (détecteur Anabat SD2, Titley Scientific) a été placé à l'intérieur de chacun des quatre sites étudiés et dirigé vers l'entrée (à environ 3 m) pour enregistrer les chauves-souris entrant entre 1h00 et 6h00 du matin en utilisant un rapport de division de huit pour le zero-crossing. Nous avons utilisé le programme CFCread d'Anabat (Titley Scientific) pour diviser les données continues en enregistrements. Ces enregistrements ont ensuite été filtrés à l'aide du logiciel AnaLook version 4.2.n pour inclure uniquement les cris de *Rhip*. Par la suite, les cris dont la fréquence moyenne (Fmean) était inférieure à 100 kHz ont été supprimés car

ils se situaient en dehors de la plage de pic de fréquence pour les adultes. Ceci permettait également d'exclure les cris sociaux, qui ont une fréquence plus basse [ANDREWS *et al.*, 2016]. Fmean et sd ont été calculés pour chaque enregistrement. La moyenne de Fmean calculée sur tous les cris pour chaque enregistrement a été considérée comme représentative du paramètre acoustique (c'est-à-dire du pic de fréquence) de l'émetteur.

Sexage moléculaire

Le sexage moléculaire des colonies a été effectué de manière non invasive via l'analyse des fèces tel que détaillé dans ZARZOSO-LACOSTE *et al.* [2017].

RÉSULTATS

Estimation des paramètres acoustiques et des sex-ratios avec la méthode ABC

Les moyennes des pics de fréquence estimées pour les mâles et des femelles correspondaient aux valeurs simulées. Des estimations inexactes ont cependant été obtenues si un des deux sexes était absent du jeu de données (Figures 2 et 3). Plus l'échantillon était de taille importante, plus les estimations étaient précises et exactes (Figure 3). L'écart-type estimé des fréquences des cris était légèrement sous-estimé lorsqu'un seul sexe était présent dans le jeu de données (Figures 2 et 3). En général, il y avait un léger biais vers le haut dans l'estimation de l'écart-type, biais qui disparaissait avec l'augmentation de la taille de l'échantillon (Figure 3).

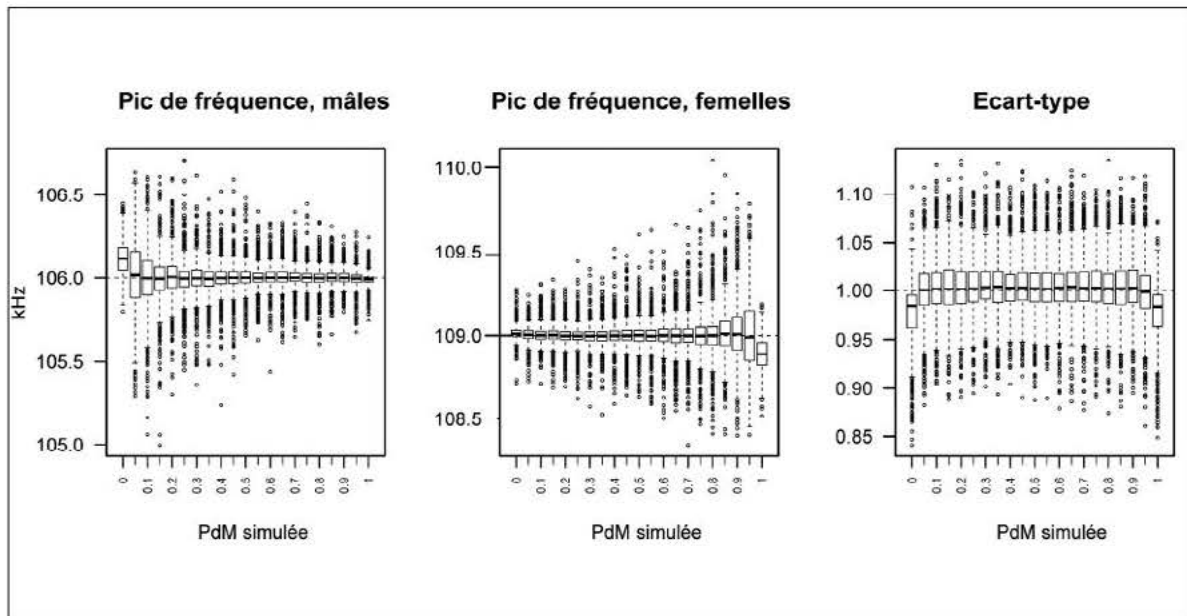


Figure 2. - Pic de fréquences moyen des mâles et des femelles et écart-type du pic de fréquence au sein de chaque sexe.

Le même écart-type pour les deux sexes, tel qu'estimé par la méthode ABC sur les jeux de données simulés (c'est-à-dire en incluant toutes les tailles d'échantillons testées : 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 ; avec 100 jeux de données simulés pour chacune des 126 combinaisons d'une proportion de mâles et d'une taille d'échantillon).

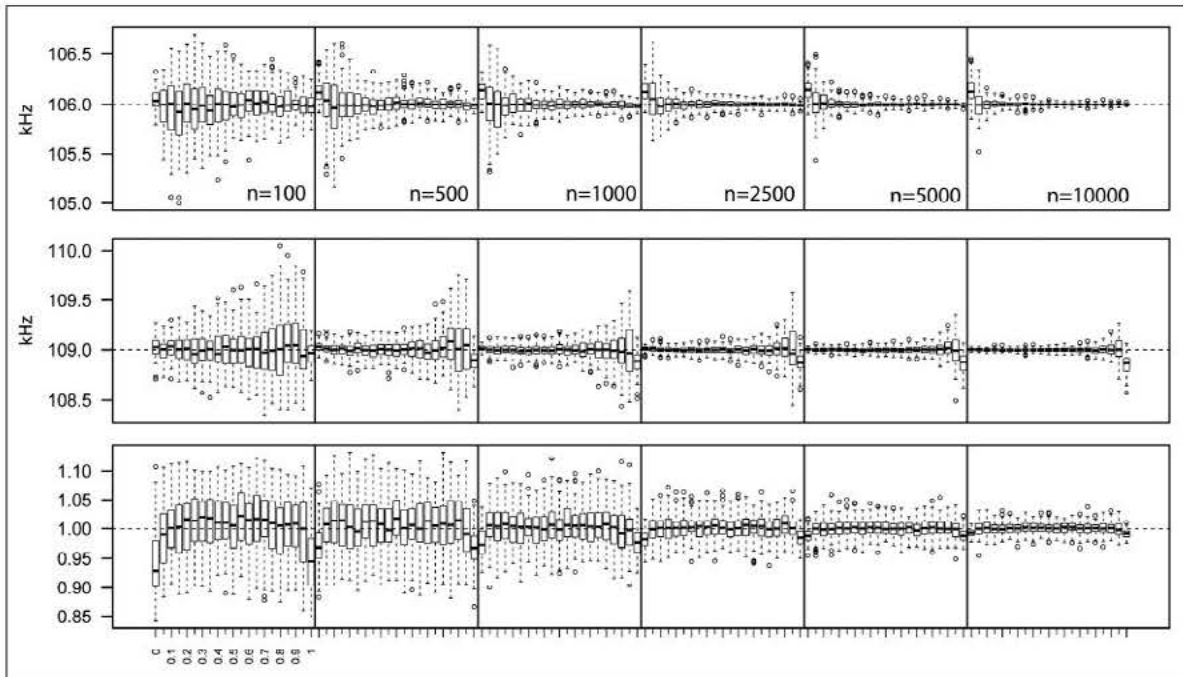


Figure 3. - Moyenne du pic de fréquence des mâles (en haut) et des femelles (au milieu) et écart-type au sein de chaque sexe (égal pour les mâles et les femelles) (en bas). Données estimées via la méthode ABC pour les mêmes jeux de données que dans la Figure 2, mais représentés ici séparément pour les six différentes tailles d'échantillon (représentées par des blocs).

Les valeurs des PdM estimées via la méthode ABC ont montré un haut degré de concordance avec les vraies valeurs issues des jeux de données simulés, quel que soit la taille d'échantillon (Figure 4). Plus l'échantillon était de taille importante, plus les estimations étaient exactes et surtout précises (Figures 4-5). La RMSE n'a pas dépassé 0,05 pour la taille d'échantillon la plus faible (100 cris), et est passée à moins de 0,02 lorsque le nombre de cris a été

porté à 500 (Figure 5). Des augmentations supplémentaires du nombre de cris ont entraîné des RMSE encore plus faibles pour toutes les tailles d'échantillons testées, mais au-delà de 5000 cris, l'amélioration devient marginale car le RMSE est très proche de zéro (Figure 5).

Pour les quatre colonies de *Rhip* échantillonnées (données empiriques), les moyennes des pics de fré-

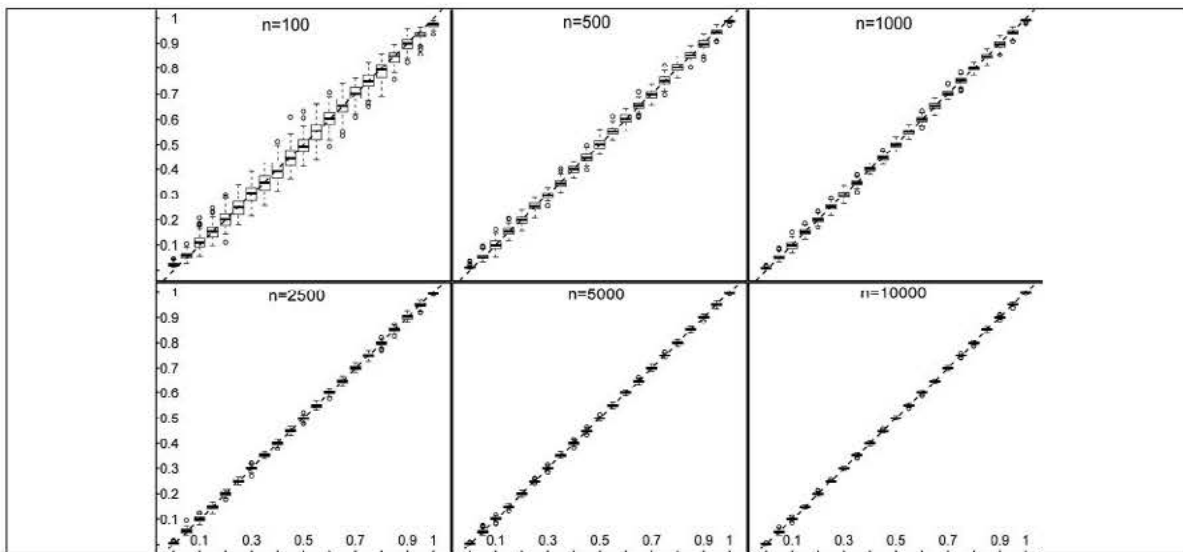


Figure 4. - Proportion de mâles estimée par la méthode ABC par rapport à la valeur simulée (vraie). Pour 100, 500, 1000, 2500, 5000, et 10000 cris (mêmes jeux de données que les Figures 2 et 3). La ligne pointillée représente une correspondance parfaite entre les valeurs simulées et estimées.

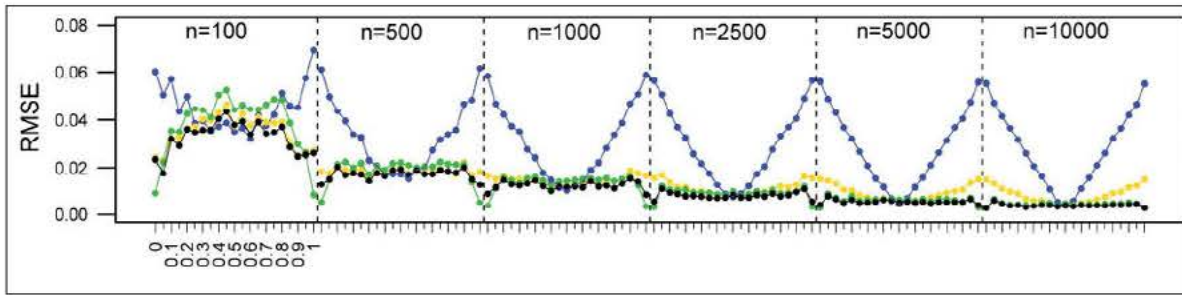


Figure 5. - Erreur quadratique moyenne (RMSE) pour différents sex-ratios estimés par la méthode d'exclusion en utilisant des seuils de 95% (bleu), 99% (jaune), et 99,9% (vert), et par l'approche ABC (noir).

Les blocs correspondent à des tailles d'échantillon différentes, comme indiqué. L'axe des abscisses représente la proportion simulée de mâles (de 0 à 1 par pas de 0,05 ; mêmes jeux de données que les Figures 2-4).

ID	Échantillons			Proportion de mâles			Estimation ABC du pic de fréquence moyen [kHz].	
	a)	b)	c)	Gen.	ABC, moyenne (HDI)	99.9	Mâles, moyenne (HDI)	Femelles, moyenne (HDI)
Thu22	144	138	78	0.22	0.21 (0.19-0.23)	0.19	105.9 (105.72 - 106.08)	109.1 (109.02 - 109.15)
Thu26	168	153	83	0.63	0.63 (0.57 - 0.69)	0.67	105.9 (105.78 - 106.09)	108.6 (108.39 - 108.86)
Thu47	40	38	19	0.32	0.37 (0.34 - 0.39)	0.34	105.5 (105.33 - 105.57)	108.8 (108.70 - 108.88)
Thu35	40	39	23	0.26	0.37 (0.32 - 0.41)	0.38	105.0 (104.73 - 105.27)	108.3 (108.14 - 108.56)

Tableau 1. - Proportion de mâles et fréquences de pics des colonies étudiées.

La proportion de mâles a été estimée avec les méthodes génétique (Gen.), acoustique ABC (ABC), et acoustique d'exclusion à 99,9 %. L'intervalle de plus haute densité (HDI) à 95 % est présenté pour les paramètres estimés par l'approche ABC. Les fréquences maximales ont été estimées avec l'approche ABC acoustique. a) le nombre de fèces génotypés b) nombre de fèces qui ont fourni des génotypes multilocus de qualité suffisante pour être inclus dans les calculs de sex-ratio. c) le nombre de génotypes multilocus uniques.

quences ont été estimées comme étant comprises entre 105,0 et 105,9 pour les mâles, et entre 108,3 et 109,1 pour les femelles (Tableau 1). Les estimations de PdM variaient entre 0,21 et 0,63 selon la colonie, différant de 0 à 0,11 de celle déterminée via les analyses de génétique non-invasive sur fèces.

Approche ABC en deux étapes

L'application d'une procédure ABC en deux étapes a amélioré la performance des estimations de la PdM par rapport à une approche où les paramètres acoustiques (moyenne et écart-type du pic de fréquences des mâles et des femelles) sont estimés séparément pour chaque sous-ensemble (Figure 6). Des RMSE inférieures à 0,04 ont

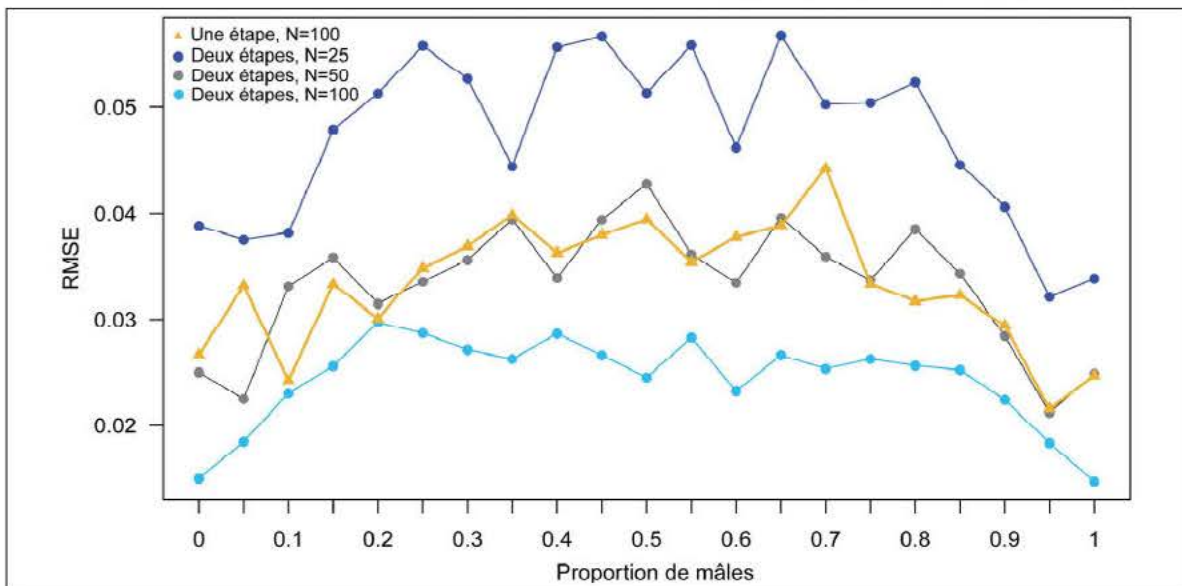


Figure 6. - Comparaison des RMSE obtenus avec la méthode ABC en une étape et en deux étapes

été obtenus pour des jeux de données de 50 cris, ce qui correspond à la performance de l'approche en une étape, mais avec une taille d'échantillon réduite de moitié.

En utilisant l'approche probabiliste, la proportion de cris attribués au bon sexe a été influencée par la différence

de moyenne des fréquences entre les sexes, le nombre de cris ainsi que la PdM (*Tableau II* ; *Figure 7*). Pour de faibles chevauchements de pic de fréquence entre les sexes (c'est-à-dire une différence de 4-5 kHz de la moyenne), la méthode a donné d'excellents résultats (>98 % de cris correctement assignés ; *Tableau II*). Lorsque le chevau-

Δ	Moyenne (sd) % correctement attribué					Moyenne (sd) % de chevauchement				
	N=25	N=50	N=100	N=500	N=1000	N=25	N=50	N=100	N=500	N=1000
5	99.5 (1.4)	99.5 (1.0)	99.5 (0.3)	99.5 (0.3)	99.5 (0.2)	0.2 (1.2)	0.3 (1.3)	0.5 (1.5)	1.7 (2.1)	2.6 (2.6)
4	98.1 (2.7)	98.2 (1.9)	98.1 (0.7)	98.1 (0.7)	98.1 (0.6)	1.7 (4.6)	2.7 (4.7)	4.4 (5.2)	11.0 (7.1)	15.0 (7.9)
3	94.5 (4.6)	94.6 (3.4)	94.7 (2.5)	94.6 (1.6)	94.6 (1.4)	9.3 (11.7)	13.8 (11.8)	20.0 (12.5)	36.8 (13.2)	45.0 (12.8)
2	87.7 (7.0)	87.7 (5.4)	87.7 (4.5)	87.7 (3.5)	87.7 (3.4)	30.4 (19.9)	40.5 (18.6)	51.0 (17.2)	71.7 (12.3)	78.7 (10.1)
1	78.1 (10.2)	78.1 (8.9)	78.1 (8.3)	78.1 (7.8)	78.1 (7.7)	61.0 (22.2)	72.7 (17.0)	81.2 (12.8)	93.1 (5.4)	95.6 (3.6)

Tableau II. Identification du sexe de chaque cri à partir de jeux de données simulés.

La différence entre la moyenne de fréquences simulées (Δ) des mâles et des femelles était comprise entre 1 et 5 kHz. Le nombre de cris par jeux de données variait de N=25 à N=1000. Les valeurs présentées correspondent au pourcentage (moyenne et écart-type [sd]) de cris assignés au bon sexe sur 9000 simulations (1000 simulations par proportion considérée de mâles allant de 0,1 à 0,9 par pas de 0,1). Le pourcentage de cris dans la zone de chevauchement entre les sexes est également présenté comme une mesure du chevauchement (moyenne et écart-type [sd]).

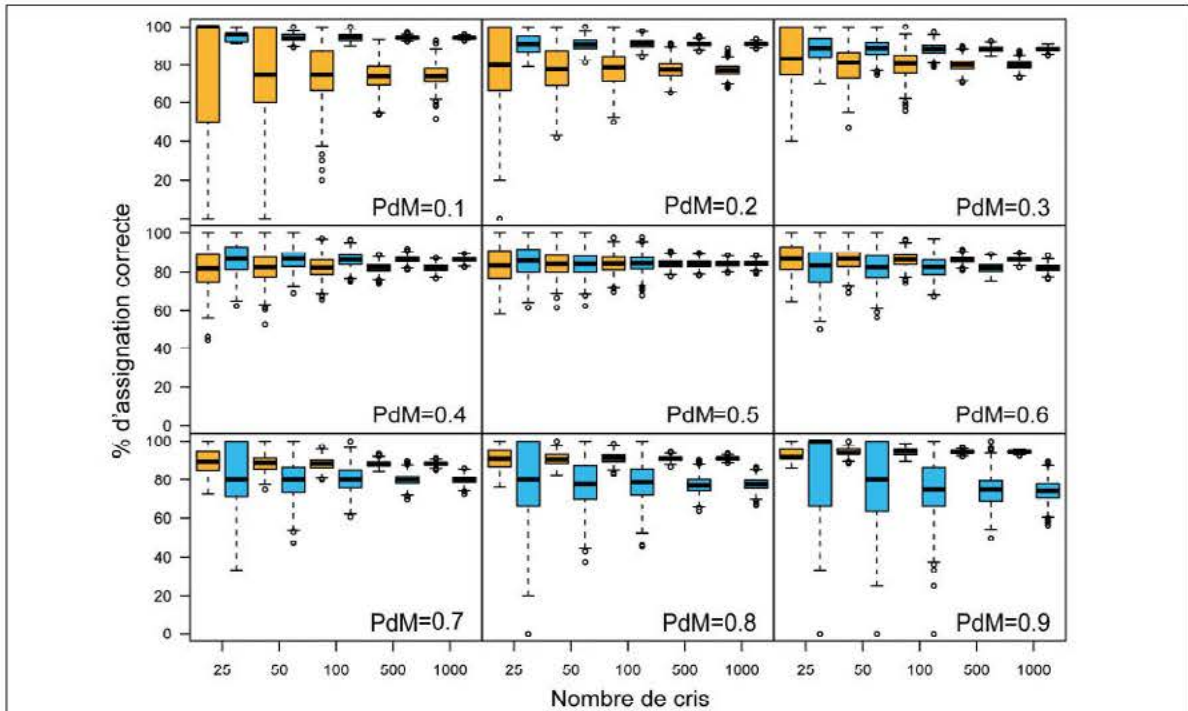


Figure 7. - Pourcentage de cris correctement identifiés comme mâle (jaune) ou femelle (bleu).

Dans cet exemple, les moyennes des pics de fréquences simulés pour les deux sexes différaient de 2 kHz et le nombre de cris par jeux de données variait de N=25 à N=1000. Les valeurs sont présentées pour 1000 jeux de données simulés pour chaque proportion de mâles étudiée (0,1 à 0,9 par pas de 0,1) et par nombre de cris.

chement augmente, la méthode fonctionne encore relativement bien, avec par exemple 78 % de cris correctement attribués lorsque la zone de chevauchement comprend 95 % des cris du jeu de données (différence de 1 kHz, N=1000 cris ; *Tableau II*). La variance entre les jeux de données, mais pas le nombre moyen d'assignations correctes, a diminué avec l'augmentation du nombre de cris. La PdM a affecté les résultats de deux manières : premièrement, le sexe le plus commun a eu une plus grande proportion d'assignations correctes (*Figure 7*) ; deuxièmement, la proportion globale d'assignations correctes a été plus élevée pour des sex-ratios plus déséquilibrés (*Figure 8*).

Estimation du sex-ratio par la méthode d'exclusion

Les sex-ratios estimés par la méthode d'exclusion varient dans leurs performances en fonction des seuils considérés pour la zone de chevauchement. L'approche à 99 % et surtout à 95 % ont donné d'aussi bons résultats que la méthode ABC pour les sex-ratios plutôt équilibrés, mais ont donné lieu à des RMSE plus élevés pour les sex-ratios déséquilibrés (*Figure 5*). Un seuil de 99,9 % a donné des RMSE similaires à ceux de l'approche ABC (*Figure 5*). Cependant, la méthode d'exclusion était très sensible à l'exactitude de l'information fournie au préalable, c'est-à-dire les moyennes des pics de fréquence supposées des mâles et des femelles (*Figure 9*). La sensibilité était multifactorielle et dépendait de la différence entre la moyenne réelle et supposée (fournie par l'utilisateur) du pic de fréquence, du signe de cette différence, et de la valeur de la PdM réelle.

La PdM estimée par la méthode d'exclusion à 99,9 % dans les quatre colonies de *Rhip* échantillonnées était comprise entre 0,19 et 0,67 selon la colonie. Ces estimations différaient des résultats obtenus via la méthode ABC de 0,01 à 0,04, et des sex-ratios génétiquement déterminés de 0,02 à 0,12 (*Tableau I*).

DISCUSSION

Nous avons développé et testé deux méthodes pour estimer le sex-ratio lorsque les paramètres acoustiques des signaux se chevauchent entre mâles et femelles. La nouvelle approche Bayésienne (ABC) permet d'estimer les moyennes des pics de fréquence des mâles et des femelles et leur écart-type ainsi que la proportion de mâles (PdM). Ces inférences peuvent ensuite être utilisées pour analyser séparément des sous-ensembles de données qui correspondent par exemple à certaines périodes d'intérêt et/ou pour attribuer de manière probabiliste un sexe à des points de données uniques (par exemple des cris/enregistrements). Enfin, les paramètres acoustiques estimés peuvent être utilisés pour définir la zone d'exclusion pour une seconde approche, plus simple, basée sur l'exclusion des cris de la zone de chevauchement.

Estimation des paramètres acoustiques par la méthode ABC

L'estimation de la moyenne du pic de fréquence des cris pour un sexe spécifique devient plus précise et exacte avec des tailles d'échantillons plus élevées et/ou une proportion plus importante de ce sexe (*Figures 2 et 3*).

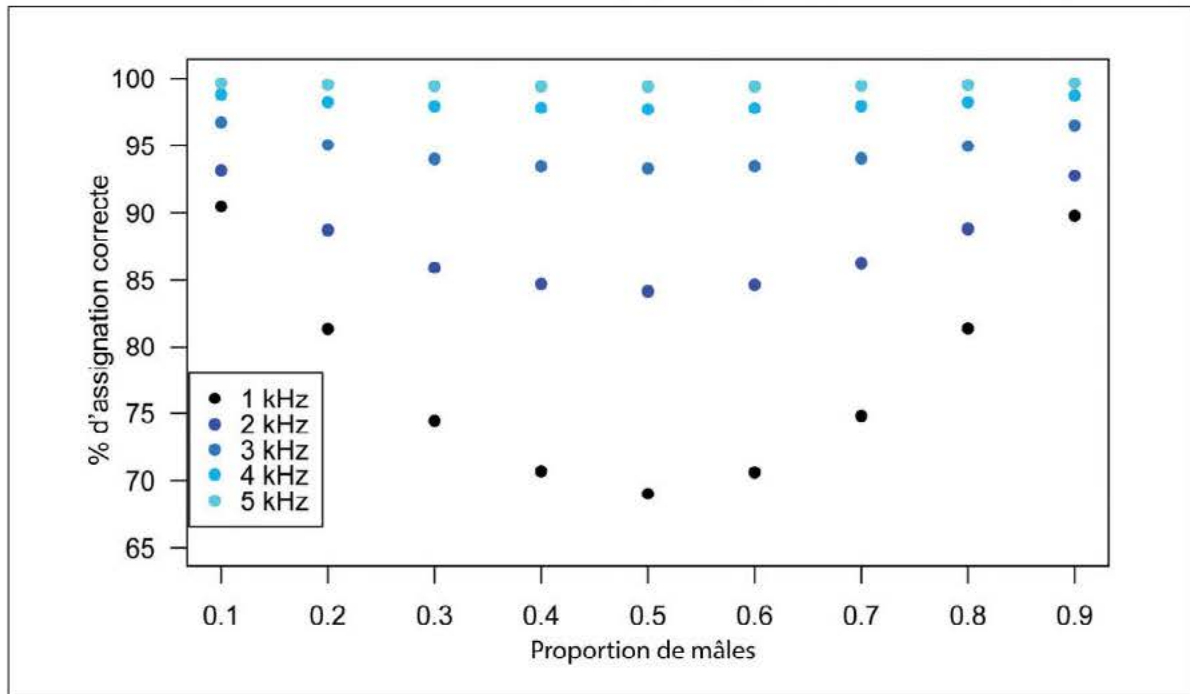


Figure 8. - Influence de la proportion de mâles sur le pourcentage global d'attribution correcte du sexe des cris lorsque les moyennes de pics de fréquences des mâles et des femelles diffèrent de 1-5 kHz. Les valeurs pour les différentes tailles d'échantillons (cf. Figure 7) et les sexes sont combinés.

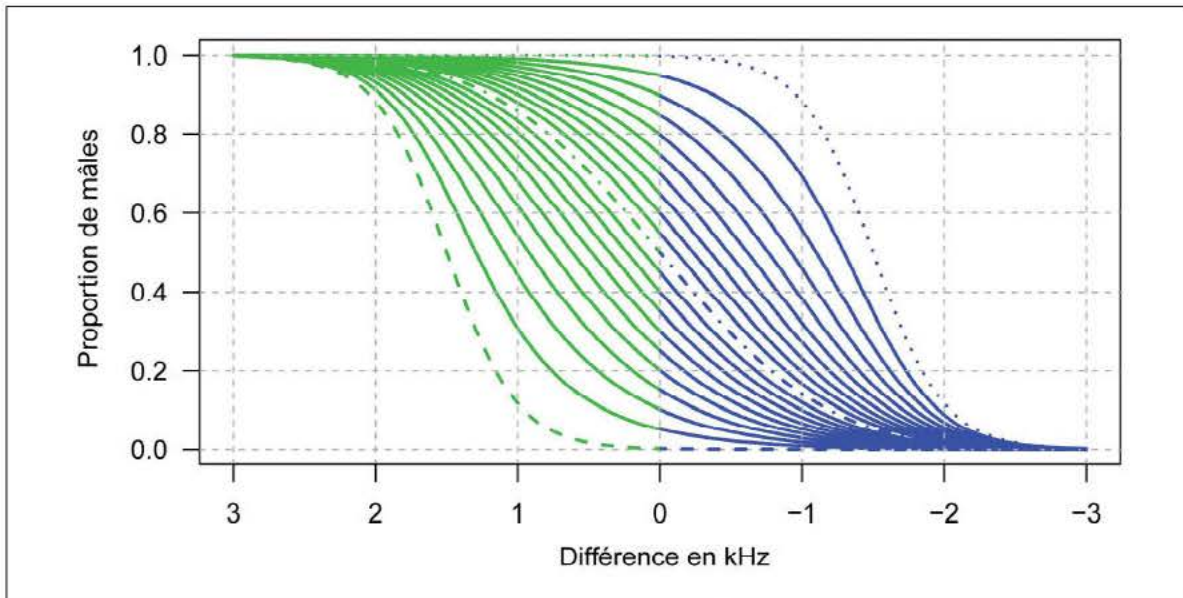


Figure 9. - Impact de l'exactitude des pics de fréquence supposés sur la performance de la méthode d'exclusion (seuil de 99,9%).

L'axe des abscisses montre la différence entre la moyenne du pic de fréquence supposé et réel des cris de mâles. Les lignes vertes représentent une surcristimation de la proportion de mâles, les lignes bleues une sous-estimation. Les lignes en tirets, tirets-points et pointillés, représentent les sex-ratios estimés pour différentes moyennes de pic de fréquence supposées des mâles lorsque la PdM simulée est de 0.5 ou 1. respectivement.

Cependant, en l'absence de mâles, les valeurs de la fréquence moyenne des cris des mâles sont systématiquement surestimées, car les cris de la queue gauche de la distribution des femelles sont traités comme des cris de mâles. Vice versa, les fréquences moyennes des femelles sont systématiquement sous-estimées en l'absence de femelles (Figure 2). Par conséquent, les estimations des paramètres des cris doivent être interprétées avec prudence lorsque les sex-ratios estimés sont très déséquilibrés (c'est-à-dire lorsque la proportion estimée d'un des sexes est inférieure à 0,05), en particulier pour les échantillons de faible taille (c'est-à-dire moins de 500 cris).

Notre méthode d'estimation des paramètres des cris a d'importantes applications au-delà de la détermination du sex-ratio. Elle pourrait par exemple bénéficier aux études qui s'intéressent à la variation géographique des paramètres des cris (ex. pic de fréquence moyen), qui a été observée chez divers taxons [PUECHMAILLE *et al.*, 2011 ; DOOL *et al.*, 2016 ; JIANG *et al.*, 2016 ; LÓPEZ-BAUCELLS *et al.*, 2017]. Notre méthode favorise la collecte rapide, relativement bon marché et non invasive d'une grande quantité de données, permettant ainsi de comparer les caractéristiques acoustiques sur de nombreux sites. Notre méthode pourrait également être utilisée pour étudier d'autres groupes biologiques que les sexes. Par exemple, chez certaines espèces, les caractéristiques acoustiques diffèrent en fonction du rang social [par exemple FISCHER *et al.*, 2004 ; LEONARD *et al.*, 1995], de l'âge ou de la taille du corps [par exemple PUECHMAILLE *et al.*, 2014 ; JONES *et al.*, 1992 ; REBY *et al.*, 2003 ; CHARLION *et al.*, 2009 ; COLLEYE *et al.*, 2009]. Les espèces cryptiques pourraient également être étudiées si elles diffèrent (au moins en

moyenne) pour certains paramètres acoustiques, ce qui est souvent le cas [JONES, 1997 ; KINGSTON *et al.*, 2001 ; BICKFORD *et al.*, 2007 ; ANGULO *et al.*, 2008 ; HUGHES *et al.*, 2010 ; HENRY *et al.*, 2014 ; ANCILLOTTO *et al.*, 2017]. Notre approche ABC peut être utilisée pour déterminer les valeurs qui sont caractéristiques des vocalisations de sous-groupes et pour estimer leur ratio d'abondance. Bien que la méthode ait été développée pour obtenir des ratios pour deux groupes, elle peut être étendue à trois groupes ou plus.

Estimation du sex-ratio

Nous confirmons la robustesse de la méthode ABC et, dans une certaine mesure, de la méthode d'exclusion pour l'estimation du sex-ratio à l'aide de jeux de données simulés et de taille variable. L'obtention d'un plus grand nombre de cris améliore clairement la précision et l'exactitude, mais dès 100 cris, les erreurs sont mineures pour l'approche Bayésienne (Figure 5). Pour les jeux de données simulés, la méthode d'exclusion à 99,9 % est légèrement moins précise que l'approche Bayésienne pour les échantillons de petite taille, mais elle est plus performante que les approches d'exclusion à 95 % et 99 % (Figure 5). La méthode d'exclusion est très simple, ce qui constitue un avantage (facilement applicable et très rapide). Cependant, les moyennes des pics de fréquence des mâles et des femelles (et leur écart-type) utilisés dans cette approche doivent être connus avec une très grande exactitude pour obtenir des PdMs fiables (Figure 9). Étant donné que les moyennes des pics de fréquence des mâles et des femelles sont rarement connues avec exactitude, nous recommandons fortement d'utiliser la méthode ABC.

Nous avons en outre testé les méthodes ABC et d'exclusion avec des données empiriques. Pour trois des quatre colonies de *Rhip*, la PdM déterminée à partir des cris enregistrés est presque égale au ratio obtenu par sexage moléculaire (Thu22, Thu26, Thu47 ; *Tableau 1*). Ces résultats montrent clairement que l'estimation fiable de la PdM à partir d'enregistrements acoustiques, démontrée par simulation, s'applique également à des jeux de données empiriques. Notre méthode peut donc être utilisée pour obtenir le sex-ratio et donc le nombre de femelles, fournissant ainsi des informations plus fiables pour calculer, à partir de données de suivi acoustique passif, le nombre de jeunes par femelle dans les colonies de *Rhip*. Une surestimation de la PdM via la méthode ABC par rapport au sexage moléculaire a été observée dans la colonie restante (Thu35 ; *Tableau 1*). Théoriquement, l'approche du sexage moléculaire pourrait souffrir d'un biais introduit par des probabilités d'échantillonnage différentes des mâles et des femelles, par exemple parce qu'ils préfèrent des sites d'accrochage différents ou en raison de différences dans la fidélité au gîte [ZARZOSO-LACOSTE, 2017]. En raison de la très bonne correspondance entre le sexage moléculaire et le sexage acoustique pour les trois autres colonies, nous soupçonnons plutôt une sous-représentation de certains individus dans les cris enregistrés. Le gîte en question possède deux entrées, mais une seule a fait l'objet d'un suivi acoustique. Par conséquent, si plus de femelles que de mâles préféreraient l'entrée non surveillée à celle où les enregistrements ont été effectués, leurs cris pourraient être absents ou moins fréquents dans les données, ce qui entraînerait une surestimation des mâles. Par conséquent, nous recommandons fortement de prendre en compte les différences de comportement individuelles ou spécifiques au sexe pour de futures études. Il est important de noter que notre méthode suppose une probabilité de détection acoustique similaire pour les individus appartenant à différents groupes d'intérêt. Si par exemple les mâles émettent des signaux plus forts ou à un rythme plus soutenu que les femelles, ils seront surreprésentés dans l'ensemble de données et leur proportion sera surestimée. Si de telles différences dans la probabilité de détection sont bien quantifiées pour l'espèce ou le contexte étudié, elles peuvent être corrigées lors de la simulation des jeux de données dans le cadre de la méthode ABC. Pour notre espèce cible, le Petit rhinolophe, les cris sont utilisés pour l'orientation et donc susceptibles d'être émis aussi souvent et à une intensité similaire par les individus des deux sexes. Néanmoins, pour une application de notre méthode à d'autres contextes ou espèces, les différences potentielles de probabilité de détection des signaux doivent être considérées et discutées.

Détermination du sex-ratio en deux étapes pour des sous-ensembles de données

Nous avons développé et testé une méthode pour suivre les changements de la PdM via une approche ABC en deux étapes. Avec cette méthode, les sex-ratios peuvent être estimés de manière assez fiable même pour un nombre

relativement faible de signaux acoustiques, par exemple pour de courtes périodes de temps comme des jours, ou de petites échelles spatiales comme des sites uniques de chasse/transit. Cela permet la détection de patterns temporels ou spatiaux dans la PdM, qui pourraient fournir des informations intéressantes sur la flexibilité de l'organisation sociale et les différences de comportement des mâles et des femelles dans l'utilisation de l'habitat [SAFI *et al.*, 2007] ou en fonction des saisons ou de l'heure de la nuit. La méthode pourrait être utilisée pour comparer les sex-ratios obtenus pour des groupes d'animaux migrants passant devant une station d'enregistrement à différentes périodes (temporelles) ou pour comparer les données collectées simultanément dans différentes stations (spatiales), par exemple. Les oiseaux migrants sont une cible particulièrement prometteuse pour une telle approche, car les signaux acoustiques, même ceux des volées, peuvent être utilisés pour la détermination du sexe chez certaines espèces [GRIFFITHS *et al.*, 2016]. En outre, les données acoustiques existantes provenant de programmes de surveillance [par exemple AZAM *et al.*, 2016] pourraient être utilisées pour tester la ségrégation temporelle/spatiale au sein de l'espèce (ou entre espèces, dans le cas d'espèces cryptiques) ou les préférences d'habitat. Comme pour l'estimation des paramètres acoustiques, cette méthode de résolution temporelle/spatiale peut également être appliquée à des groupes biologiques autres que le sexe. Pour assurer des estimations précises, le choix de l'échelle temporelle/spatiale dépendra (1) du nombre de cris qui peuvent être obtenus et, (2) du fait que les données doivent remplir les conditions d'utilisation de la méthode (c'est-à-dire la moyenne des paramètres acoustiques pour chaque groupe restant constante dans le temps/espace).

Déduire le sexe par enregistrement

Nous avons également établi une méthode qui assigne probabilistiquement un sexe à chaque signal acoustique en se basant sur les paramètres acoustiques et la PdM, tous deux inférés par la méthode ABC. Bien qu'elle ne soit pas exempte d'erreurs au niveau individuel, notre méthode constitue une bonne stratégie pour détecter des patterns globaux de comportement, spécifiques à un sexe, dont la résolution temporelle/spatiale dépasse de loin celle de la méthode Bayésienne en deux étapes. Comme l'assignation du sexe d'un signal acoustique est basée sur la probabilité globale que les signaux soient émis par un mâle ou une femelle au sein du groupe étudié, qui dépend à son tour du sex-ratio, la méthode ABC à deux étapes devrait être utilisée avant d'assigner un sexe à des signaux uniques pour confirmer l'homogénéité temporelle/spatiale de la composition des sexes, ou pour identifier les périodes de temps/échelles spatiales appropriées sur lesquelles la PdM est stable dans la population.

Considérations techniques pour les applications futures

Sur la base d'études antérieures sur les Petits rhinolophes retournant à leur gîte après la chasse, nous avons

choisi la disposition spatiale du dispositif d'enregistrement et la résolution temporelle des enregistrements de manière à limiter la probabilité que deux individus ou plus soient enregistrés simultanément. Bien que l'enregistrement simultané de plusieurs individus ne puisse être exclu, le bon accord entre les estimations ABC de la PdM et les estimations indépendantes via la génétique non-invasive suggère que ces occurrences ne sont pas problématiques dans notre jeu de données empirique. Ceci suggère que lorsque deux animaux ne sont pas susceptibles d'être enregistrés simultanément, on pourrait simplement utiliser la moyenne du pic de fréquence par enregistrement (comme cela a été fait dans notre étude). Une alternative serait de filtrer ces enregistrements ou éventuellement, on pourrait utiliser le pic de fréquence de chaque cri au lieu de la moyenne du pic de fréquence par enregistrement. Nous n'avons pas étudié cette stratégie dans notre jeu de données empirique car la prévalence des enregistrements avec un écart-type élevé (suggérant l'enregistrement simultané de plus d'un individu) était faible (données non montrées). Cependant, cette question devrait être étudiée dans d'autres organismes/situations où de tels enregistrements pourraient être courants, et surtout lorsque les paramètres acoustiques des cris de l'émetteur sont modifiés en présence d'autres individus [CVIKEL *et al.*, 2015 ; GÖTZE *et al.*, 2016].

Les chauves-souris ont été enregistrées lorsqu'elles entraient dans le gîte. Les chauves-souris qui sortaient n'ont pas été enregistrées afin d'éviter de multiples enregistrements par individu introduits par des individus qui entrent et sortent ou qui tournent autour de l'entrée. Les entrées de petite taille maximisent la probabilité que les individus s'approchent du dispositif d'enregistrement à partir d'angles similaires et à une vitesse similaire, ce qui entraîne un effet Doppler comparable sur tous les enregistrements. L'installation de l'appareil d'enregistrement dans un environnement plus ouvert (par exemple, dans des territoires de chasse ou sur des couloirs de transit) pourrait faire en sorte que les individus s'approchent sous des angles différents et que les enregistrements soient obtenus à partir d'animaux s'approchant ou s'éloignant du microphone, ce qui pourrait donner lieu à des jeux de données plus ambigus. Bien qu'il n'ait pas été testé ici, le choix d'un microphone à haute directionnalité pourrait limiter ce problème, mais au prix d'une diminution du nombre d'enregistrements recueillis. D'autres stratégies non mutuellement exclusives pourraient consister à utiliser la valeur minimale du pic de fréquence par enregistrement (au lieu de la moyenne), qui est susceptible de représenter les cris émis lorsque l'individu s'éloigne du microphone. Les jeux de données collectés dans différentes situations peuvent bénéficier de différentes étapes de prétraitement des données avant l'estimation du sex-ratio et nous encourageons les utilisateurs à explorer différentes options (cf. également le paragraphe ci-dessus). Le filtrage doit également être effectué lorsque différents types de signaux acoustiques (par exemple, écholocation versus cris sociaux) sont présents dans un jeu de don-

nées. En outre, dans sa forme actuelle, l'approche ABC développée est basée sur l'hypothèse que la probabilité de détection est égale pour les deux groupes dont le rapport doit être déduit. Cela mérite une attention particulière car le non-respect de cette hypothèse pourrait entraîner des biais.

CONCLUSIONS

Les méthodes développées ici permettront d'étudier plus en détail les questions écologiques relatives au comportement spécifique de groupes d'individus, à condition qu'il existe un di-/polymorphisme acoustique entre les groupes étudiés. Ceux-ci peuvent comprendre des individus qui diffèrent par un trait cryptique externe d'intérêt, par exemple le sexe, l'affiliation à une espèce, la cohorte d'âge, la taille ou la classe de poids, ou le rang social. Nous présentons une boîte à outils qui combine l'inférence des paramètres acoustiques et du sex-ratio via la méthode ABC avec des applications en aval. Ces dernières peuvent être utilisées pour détecter les changements dans la composition des groupes dans le temps et l'espace, ou pour attribuer des signaux acoustiques à l'un des groupes. Afin de permettre un large champ d'application, nous décrivons les conditions qui doivent être remplies pour utiliser notre approche dans d'autres systèmes d'étude et fournissons des suggestions sur la façon de surmonter certains défis qui peuvent se présenter. L'approche est basée sur des données acoustiques qui, chez de nombreuses espèces, peuvent être acquises plus facilement que des données morphologiques ou génétiques, offrant ainsi une approche non invasive, efficace en termes de temps et relativement peu coûteuse pour explorer les caractéristiques écologiques qui diffèrent entre les groupes d'animaux.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Lisa Lehnen, Wigbert Schorcht, Martin Biedermann, et Gerald Kerth, co-auteurs d'un article en anglais que nous avons publié en 2018 et qui m'a amplement servi de modèle pour ce présent article. Je tiens également à remercier Eric Petit, Anne-Laure Besnard et Pierre-Loup Jan pour leur aide sans relâche sur la partie analyses génétiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANCILLOTTO L, MORI E, SOZIO G, SOLANO E, BERTOLINO S, RUSSO D., 2017. - A novel approach to field identification of cryptic *Apodemus* wood mice : calls differ more than morphology. *Mam Rev.* 47 : 6-10. doi : 10.1111/mam.12076
- ANDREWS MM, HODNETT AM, ANDREWS PT., 2017. - Social activity of Lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) at nursery roosts and a hibernaculum in North Wales, U.K. *Acta Chiropt.* 19 : 161-174. doi : 10.3161/15081109ACC2017.19.1.013
- ANGULO A, REICHLER S., 2008. - Acoustic signals, species diag-

- nosis, and species concepts : the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Biol J Linn Soc.* 152 : 59-77. doi : 10.1111/j.1096-3642.2007.00338.x
- AUBIN T, MATHEVON N, STASZEWSKI V, BOULINIER T., 2007. - Acoustic communication in the Kittiwake *Rissa tridactyla* : potential cues for sexual and individual signatures in long calls. *Polar Biol.* 30 : 1027-1033. doi : 10.1007/s00300-007-0262-6
- AZAM C, LE VIOL I, JULIEN J-F, BAS Y, KERBIRIOU C., 2016. - Disentangling the relative effect of light pollution, impervious surfaces and intensive agriculture on bat activity with a national-scale monitoring program. *Landsc Ecol.* 31 : 2471-2483. doi : 10.1007/s10980-016-0417-3
- BARATAUD M., 2012. - *Ecologie acoustique des Chiroptères d'Europe. Identification des espèces, étude de leurs habitats et comportements de chasse.* Mèze & Paris : Coédition Biotope/MNHN.
- BICKFORD D, LOHMAN DJ, SODHI NS, NG PKL, MEIER R, WINKER K, ET AL., 2007. - Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol.* 2007;22 : 148-155. doi : 10.1016/j.tree.2006.11.004
- BONTADINA F, SCHOFIELD H, NAEF-DAENZER B., 2002. - Radio-tracking reveals that lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) forage in woodland. *J Zool.* 258 : 281-290.
- BOSTON ESM, PUECHMAILLE SJ, SCOTT DD, BUCKLEY DJ, LUNDY MG, MONTGOMERY WI, ET AL., 2012. - Empirical assessment of non-invasive population genetics in bats : comparison of DNA quality from faecal and tissue samples. *Acta Chiropt.* 14 : 45-52. doi : 10.3161/150811012X654259
- CHARLTON BD, ZHIHE Z, SNYDER RJ., 2009. - The information content of giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*, bleats : acoustic cues to sex, age and size. *Anim Behav.* 78 : 893-898. doi : 10.1016/j.anbehav.2009.06.029
- COLLEYE O, FREDERICH B, VANDEWALLE P, CASADEVALL M, PARMENTIER E., 2009. - Agonistic sounds in the skunk clownfish *Amphiprion akallopisos* : size-related variation in acoustic features. *J Fish Biol.* 75 : 908-916. doi : 10.1111/j.1095-8649.2009.02316.x
- CVIKEL N, LEVIN E, HURME E, BORISSOV I, BOONMAN A, AMICHAI E, ET AL., 2015. - On-board recordings reveal no jamming avoidance in wild bats. *Proceedings of the Royal Society B.* 282 : 20142274. doi : 10.1098/rspb.2014.2274
- DOOL SE, PUECHMAILLE SJ, KELLEHER C, MCANEY K, TEELING EC., 2016. - The effects of human-mediated habitat fragmentation on a sedentary woodland-associated species (*Rhinolophus hipposideros*) at its range margin. *Acta Chiropt.* 18 : 377-393. doi : 10.3161/15081109ACC2016.18.2.006
- FISCHER J, KITCHEN DM, SEYFARTH RM, CHENEY DL., 2004. - Baboon loud calls advertise male quality : acoustic features and their relation to rank, age, and exhaustion. *Behav Ecol Sociobiol.* 56 : 140-148. doi : 10.1007/s00265-003-0739-4
- FRANCIS CM, HABERSETZER J., 1998. - Interspecific and intraspecific variation in echolocation call frequency and morphology of horseshoe bats, *Rhinolophus* and *Hipposideros*. In : Kunz TH, Racey PA, editors. *Bat Biology and Conservation.* Washington : Smithsonian Institution Press; 1998. pp. 169-179.
- GAISLER J., 1963. - The ecology of lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros* Bechstein, 1800) in Czechoslovakia, part I. *Vest Ck Spol Zool.* 27 : 211-233.
- GILLAM E, FENTON MB., 2016. - Roles of Acoustic Social Communication in the Lives of Bats. In : Fenton MB, Grinnell AD, Popper AN, Fay RR, editors. *Bat Bioacoustics.* New York, NY : Springer New York; pp. 117-139.
- GÖTZE S, KOBLITZ JC, DENZINGER A, SCHNITZLER H-U., 2016. - No evidence for spectral jamming avoidance in echolocation behavior of foraging pipistrelle bats. *Scientific Reports.* 6 : 30978.
- GRIFFITHS ET, KEEN SC, LANZONE M, FARNSWORTH A., 2016. - Can nocturnal flight calls of the migrating songbird, American redstart, encode sexual dimorphism and individual identity? *PLOS ONE.* 11 : e0156578. doi : 10.1371/journal.pone.0156578
- HARRIS SA, SHEARS NT, RADFORD CA., 2016. - Ecoacoustic indices as proxies for biodiversity on temperate reefs. *Methods Ecol Evol.* 7 : 713-724. doi : 10.1111/2041-210X.12527
- HENRY CS, BROOKS SJ, JOHNSON JB, MOCHIZUKI A, DUELLI P., 2014. - A new cryptic species of the *Chrysoperla carnea* group (Neuroptera : *Chrysopidae*) from western Asia : parallel speciation without ecological adaptation. *Syst Entomol.* 39 : 380-393. doi : 10.1111/syen.12061
- HUGHES AC, SATASOOK C, BATES PJJ, SOISOOK P, SRITONGCHUAY T, JONES G, ET AL., 2010. - Echolocation call analysis and presence-only modelling as conservation monitoring tools for Rhinolophoid bats in Thailand. *Acta Chiropt.* 12 : 311-327. doi : 10.3161/150811010X537891
- ISSEL W., 1950. - Ökologische Untersuchungen an der Kleinen Hufeisennase (*Rhinolophus hipposideros* Bechstein) im mittleren Rheinland und unterem Altmühlthal. *Zool Jahrb Syst.* 79 : 71-86.
- JIANG T, WU H, FENG J., 2015. - Patterns and causes of geographic variation in bat echolocation pulses. *Integr Zool.* 10 : 241-256. doi : 10.1111/1749-4877.12129
- JONES G., 1997. - Acoustic signals and speciation : the roles of natural and sexual selection in the evolution of cryptic species. *Advances in the Study of Behavior.* 26 : 317-354.
- JONES G, GORDON T, NIGHTINDALE J., 1992. - Sex and age differences in the echolocation calls of the lesser horseshoe bat, *Rhinolophus hipposideros*. *Mammalia.* 56 : 189-193.
- JONES G, SIEMERS BM., 2011. - The communicative potential of bat echolocation pulses. *J Comp Physiol A.* 197 : 447-457. doi : 10.1007/s00359-010-0565-x
- KINGSTON T, LARA MC, JONES G, AKBAR Z, KUNZ TH, SCHNEIDER CJ., 2001. - Acoustic divergence in two cryptic *Hipposideros* species : a role for social selection? *Proc Biol Sci.* 268 : 1381. doi : 10.1098/rspb.2001.1630
- KLOEPPER LN, LINNENSCHMIDT M, BLOWERS Z, BRANSTETTER B, RALSTON J, SIMMONS JA., 2016. - Estimating colony sizes of emerging bats using acoustic recordings. *Royal Society Open Science* 2016;3 : 160022. doi : 10.1098/

- rsos.160022
- LAILOLO P, 2010. - The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation. *Biol Conserv.* 143 : 1635-1645. doi : 10.1016/j.biocon.2010.03.025
- LAILOLO P, ROLANDO A, DELESTRADE A, DE SANCTIS A., 2001. - Geographical variation in the calls of the choughs. *The Condor.* 103 : 287-297. doi : 10.1650/0010-5422(2001)103[0287:GVITCO]2.0.CO;2
- LEHNEN L, SCHORCHT W, KARST I, BIEDERMANN M, KERTH G, PUECHMAILLE SJ., 2018. - Using Approximate Bayesian Computation to infer sex ratios from acoustic data. *PLOS ONE.* 13 : e0199428. doi : 10.1371/journal.pone.0199428
- LENORMAND M, JABOT F, DEFFUANT G., 2013. - Adaptive approximate Bayesian computation for complex models. *Computational Statistics* 28 : 2777-2796. doi : 10.1007/s00180-013-0428-3
- LEONARD ML, HORN AG. Crowing in relation to status in roosters. *Anim Behav.* 1995;49 : 1283-1290. doi : 10.1006/anbe.1995.0160
- LÓPEZ-BAUCELLS A, TORRENT L, ROCHA R, PAVAN AC, BOBROWIEC PFD, MEYER CFJ., 2017. - Geographical variation in the high-duty cycle echolocation of the cryptic common mustached bat *Pteronotus cf. rubiginosus* (Mormoopidae). *Bioacoustics.* doi : 10.1080/09524622.2017.1357145
- MALULEKE T, JACOBS DS, WINKER H., 2017. - Environmental correlates of geographic divergence in a phenotypic trait : A case study using bat echolocation. *Ecol Evol.* 7 : 7347-7361. doi : 10.1002/ecc3.3251
- MARQUES TA, THOMAS L, MARTIN SW, MELLINGER DK, WARD JA, MORETTI DJ, ET AL., 2013. - Estimating animal population density using passive acoustics. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 88 : 287-309. doi : 10.1111/brv.12001
- MORINHA F, CABRAL JA, BASTOS E., 2012. - Molecular sexing of birds : a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology.* 2012;78 : 703-714. doi : 10.1016/j.theriogenology.04.015
- PEAKE TM, MCGREGOR PK, SMITH KW, TYLER G, GILBERT G, GREEN RE., 1998. - Individuality in Corncrake *Crex crex* vocalizations. *Ibis.* 140 : 120-127. doi : 10.1111/j.1474-919X.1998.tb04548.x
- PUECHMAILLE SJ, BORISSOV IM, ZSEBOK S, ALLEGRI B, HIZEM M, KUENZEL S, ET AL., 2014. - Female mate choice can drive the evolution of high frequency echolocation in bats : A case study with *Rhinolophus mehelyi*. *PLOS ONE.* 9 : e103452. doi : 10.1371/journal.pone.0103452
- PUECHMAILLE SJ, GOUILH MA, PIYAPAN P, YOKUBOL M, MIE KM, BATES PJ, ET AL., 2011. - The evolution of sensory divergence in the context of limited gene flow in the bumblebee bat. *Nat. Commun.* 2011;2 : 573. doi : 10.1038/ncomms1582
- REBY D, MCCOMB K., 2003. - Anatomical constraints generate honesty : acoustic cues to age and weight in the roars of red deer stags. *Anim Behav.* 65 : 519-530. doi : 10.1006/anbe.2003.2078
- SCHUCHMANN M, PUECHMAILLE S, MARTIN SIEMERS B., 2012. - Horseshoe bats recognise the sex of conspecifics from their echolocation calls. *Acta Chiropt.* 14 : 161-166. doi : 10.3161/150811012X654376
- SAFI K, KÖNIG B, KERTH G., 2007. - Sex differences in population genetics, home range size and habitat use of the parti-colored bat (*Vespertilio Murinus*, Linnaeus 1758) in Switzerland and their consequences for conservation. *Biol Conserv.* 137 : 28-36. doi : 10.1016/j.biocon.2007.01.011
- VOLODIN IA, VOLODINA EV, KLENOVA AV, MATROSOVA VA., 2015. - Gender identification using acoustic analysis in birds without external sexual dimorphism. *Avian Res.* 2015 ; 6 : 20. doi : 10.1186/S50657-015-0033-y
- WALTERS CL, FREEMAN R, COLLEN A, DIETZ C, BROCK FENTON M, JONES G, ET AL., 2012. - A continental-scale tool for acoustic identification of European bats. *J Appl Ecol.* 49 : 1064-1074. doi : 10.1111/j.1365-2664.2012.02182.x
- WEDERKIND C., 2012. - Managing population sex ratios in conservation practice : How and why? *Topics in Conservation Biology.* Rijeka, Croatia : InTech; 2012. pp. 81-96. Available : <http://www.intechopen.com/books/topics-in-conservation-biology/managing-population-sex-ratio-why-and-how>
- WIMMER, B, KUGELSCHAFTER, K., 2017. - Akustische Erfassung von Fledermäusen in unterirdischen Quartieren [Internet]. Disponible : http://www.fledermausrufe.de/Ortungs_Sozialrufe_unterirdischeQuartiere.pdf
- WREGE PH, ROWLAND ED, KEEN S, SHIU Y., 2017. - Acoustic monitoring for conservation in tropical forests : examples from forest elephants. *Methods Ecol Evol.* 8 : 1292-1301. doi : 10.1111/2041-210X.12730
- ZAMORA-GUTIERREZ V, LOPEZ-GONZALEZ C, MACSWINEY GONZALEZ MC, FENTON B, JONES G, KALKO EKV, ET AL., 2016. - Acoustic identification of Mexican bats based on taxonomic and ecological constraints on call design. *Methods Ecol Evol.* 7 : 1082-1091. doi : 10.1111/2041-210X.12556
- ZARZOSO-LACOSTE D, JAN P-L, LEHNEN L, GIRARD T, BESNARD A-L, PUECHMAILLE SJ, ET AL., 2017 - Combining noninvasive genetics and a new mammalian sex-linked marker provides new tools to investigate population size, structure and individual behaviour : an application to bats. *Mol Ecol Resour.* 2017; 18 : 217-228. doi : 10.1111/1755-0998.12727
- ZSEBŐK S, CZABÁN D, FARKAS J, SIEMERS BM, VON MERTEN S., 2015. - Acoustic species identification of shrews : Twittering calls for monitoring. *Ecol Inform.* 27 : 1-10. doi : 10.1016/j.ecoinf.2015.02.002