

U.M.R CNRS 6552 Ethologie-Ecologie-Evolution
Station Biologique de Paimpont

Master 1 B.O.P.E.

**Etude du recrutement sur 3 colonies de reproduction du Petit
rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) en Bretagne à l'aide de techniques
de génétiques non invasives.**

Maître de stage : Eric Petit
Tuteur : Luc Madec



<http://www.protectiondesoiseaux.be/coppermine/displayimage.php?album=3&pos=10>

Avril-Juin 2007
Soutenue le 20 juin 2007

Clotilde MAURICE

SOMMAIRE

Remerciements

Introduction ----- 1

I. Matériels et Méthodes----- 2

1. Modèle Biologique ----- 2

2. Collecte et stockage des échantillons----- 3

3. Extraction d'ADN et amplification par PCR ----- 3

4. Détermination du génotype----- 4

5. Détermination du sexe----- 5

6. Estimation du recrutement----- 6

a. Test de parenté ----- 6

b. Test d'assignement----- 6

II. Résultats----- 7

1. Echantillonnage ----- 7

2. Estimation du recrutement----- 9

a. Test de parenté ----- 9

b. Test d'assignement----- 11

III. Discussion ----- 12

1. Echantillonnage ----- 12

2. Estimation du recrutement----- 13

a. Mise en évidence de l'apparentement des individus ----- 13

b. Origine des immigrants ----- 15

Bibliographie ----- 16

Annexe1. Présentation de la structure d'accueil

Annexe2. Bilan personnel sur le stage

Annexe3. Protocole d'extraction d'ADN à partir de guano

Annexe4. Le coefficient r entre chaque individu du groupe de mère potentielle dans la colonie de St Thurial et Pluherlin et la catégorie familiale correspondante

Annexe5. Le coefficient r entre chaque individu du groupe de mère potentielle dans la colonie d'Epiniac et la catégorie familiale correspondante

Annexe6. Génotypes des mères potentielles avec un fort lien de parenté

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Nelly Ménard et Martine Hausberger de m'avoir accueilli au sein de l'UMR 6556 de la station biologie de Paimpont. Je remercie Eric Petit pour m'avoir accepté en stage à ses côtés et pour m'avoir orienté et guidé tout au long de son déroulement.

Je remercie Dominique Vallet pour son aide et ses explications durant les manipulations dans le laboratoire.

Je remercie Marion de Latude et Pierre Deleporte, qui a joué parfaitement le pénible de base, pour le temps consacré à la relecture de mon rapport et pour les corrections apportées.

Je tiens à remercier tous les stagiaires et les thésards de la station sans qui ce stage ne se serait pas aussi bien passé.

Merci à Karine Dillet qui a bien voulu me supporter durant les trajets du matin vers la station et pour rentrer sur Rennes ainsi que toute la journée 5 jours sur 7. Ca n'a pas du être facile pour elle. Encore merci à Marion de Latude pour ces conseils, sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci à Karim Ouattara et à Kamel Benallal, pour toutes les fois où je leur ai pris leur clé pour ouvrir le bureau et surtout sans eux les fêtes et les repas de midi à la station n'auraient pas été aussi drôles. Merci à Léon Ngoua, pour son accueil chaleureux à la station. Et enfin un grand merci à Jean-François Mboumba pour avoir apporté une ambiance festive le matin quand on n'a pas envie de travailler, le midi quand on n'a pas envie de travailler et enfin le soir quand on a fini de travailler.

Pour finir je remercie mes parents ont fait l'essentielle pour moi: me financer pendant ce stage.

Le projet, faisant partie du Contrat Nature "Petit Rhinolophe", a été financé par la région Bretagne ainsi que par les départements des Côtes d'Armor, de l'Ille-et-Vilaine et du Morbihan.

Introduction

Un des buts premiers de l'écologie est d'identifier le rôle des processus qui déterminent et régulent le nombre d'individus dans une population (Nisbet et Gurney, 1982). Les populations animales sont des entités dynamiques sujettes à des pertes et des gains d'individus (Loughry et Mc Donough, 2001). Leurs tailles sont influencées par des combinaisons de processus dépendants (Hugues, 1990). Jusqu'à récemment, la plupart des modèles de dynamique des populations étaient basés sur des systèmes fermés. On considérait que la production de juvéniles des adultes permettait à elle seule la croissance de la population locale (Hugues, 1990). Mais cette théorie seule ne suffit pas à expliquer la variation du nombre d'individus dans une population. Chez beaucoup d'espèces animales, les populations peuvent être considérées comme des systèmes ouverts, composés de sous-populations séparées qui sont reliées par la migration des juvéniles (Hugues, 1990). Les juvéniles peuvent toutefois rester dans les populations où ils sont nés. La notion de recrutement est employée pour la plupart des espèces animales pour désigner les jeunes restants au sein de leur population natale. Le taux de recrutement des juvéniles peut être influencé par un facteur dépendant de la densité : la mortalité des jeunes (Garrott, 2003 ; Aars, 2002).

Le Petit Rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) fait partie des espèces de chiroptères les plus menacées d'extinction en Europe. Il est classé comme vulnérable par l'UICN (Hutson *et al.*, 2001). Les petits rhinolophes vivent en colonie toute l'année sauf les mâles qui deviennent solitaires durant l'été (Gaisler, 1965 ; Gaisler, 1966). Il y a peu de travaux sur le recrutement d'individus chez les Chiroptères en particulier chez le Petit Rhinolophe. Il existe quelques travaux sur les rassemblements des femelles de certaines espèces de Chiroptères. Rossiter *et al.* (2002) ont montré que les femelles du Grand Rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*) se rassemblent en colonie d'individus très apparentés pour favoriser les comportements de coopérations. Kerth *et al.* (2002) ont démontré que c'était la même chose pour le Murin de Beichstein (*Myotis bechsteinii*) mais en plus les femelles sont philopatriques avec une forte tendance à la monogamie. Rodriguez (2006) a pu démontrer que la distance entre les colonies était un facteur déterminant dans le déplacement des petits rhinolophes. Plus la distance est grande, moins les individus vont se rendre dans une autre colonie. Les quelques travaux effectués sur la Pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*) peuvent suggérer des processus de recrutement envisageables chez le Petit Rhinolophe. Sendor et Simon (2003) nous montrent que la première année de survie des juvéniles est importante chez les Pipistrelles puisque c'est elle qui va déterminer le taux de recrutement.

Si le taux de mortalité des jeunes est élevé, le taux de recrutement va augmenter. L'effectif de la population chez les pipistrelles peut demeurer constant du fait des fluctuations du taux de recrutement.

Pour étudier le recrutement, il faut pouvoir estimer l'effectif des populations pour identifier les individus apparus l'année $n+1$ et les assigner à la colonie où ils ont été échantillonnés ou à une autre colonie. Pour estimer la taille des populations animales, la méthode de capture-marquage-recapture est la plus utilisée. Malheureusement, chez les Chiroptères les bagues endommagent les squelettes (Perry *et al.*, 1966) et certains individus arrivent à les enlever (Beer, 1955). Les données sont donc biaisées. Les chercheurs utilisent actuellement une méthode d'échantillonnage non-invasive qui permet d'éviter tout contact avec les individus. Cette méthode est très utilisée sur les espèces menacées puisqu'elle est sans influence sur le taux de survie des individus (Taberlet *et al.*, 1999). L'échantillonnage des fèces d'un individu peut être considéré comme l'équivalent de la méthode de capture-recapture (Prugh *et al.*, 2005). Elle va permettre d'établir la carte génétique de l'individu et d'estimer la taille de la population. Dans notre étude ainsi que dans les publications citées, les populations sont définies comme des groupes d'individus sociaux.

L'objectif de cette étude est d'estimer le recrutement chez le Petit Rhinolophe en recherchant si les femelles d'une année n reviennent dans la même colonie pendant l'année $n+1$. On utilise une méthode de génétique non-invasive qui consiste à extraire de l'ADN des fèces ou des poils laissés par les animaux (Taberlet *et al.*, 1999). Les échantillons sont ensuite génotypés puis sexés. À l'aide du logiciel Cervus (Kalinowski, 2007), on va estimer les liens de parenté entre les individus pour chaque colonie étudiée. Les individus immigrés (sans lien de parenté avec la population où ils ont été échantillonnés) vont être assignés à une population d'origine grâce au logiciel GeneClass2 (Piry *et al.*, 2002).

I. Matériels et Méthodes

1. Modèle biologique

Le Petit Rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*) est le plus petit représentant de la famille des *Rhinolophidae* en Europe (poids : 4-9 g ; envergure : 225-250 mm ; Schober, 1991). Au printemps, les femelles quittent les gîtes d'hiver pour rejoindre les colonies de reproduction, situées la plupart du temps à proximité. L'activité des mâles est mal connue, certains se joignent aux colonies de reproduction alors que d'autres demeurent solitaires (Gaisler, 1963a).

Toutes les femelles reproductrices ont rejoint leur colonie au mois de mai, et la mise bas se produit entre fin juin et début juillet (Gaisler, 1965; Gaisler, 1966). Les femelles forment des colonies de reproduction d'effectif variable (de 10 à des centaines d'adultes). Au sein d'une colonie, 20 à 60% des femelles donnent naissance à un seul jeune, le reste des femelles ne se reproduit pas. Le Petit Rhinolophe effectue des déplacements de 5 à 10 km (parfois jusqu'à 30 km) entre les gîtes d'été et les gîtes d'hiver (d'après le site web Natura 2000 (Mai 2007), les déplacements maximaux se font entre 146 et 153 km).

2. Collecte et stockage des échantillons

Les échantillons ont été récoltés sur le sol des colonies de mise-bas de 2003 à 2006 en collaboration avec des chiroptérologues de l'association Bretagne Vivante - SEPNEB. Fin mai, le sol des colonies est nettoyé pour pouvoir y installer du papier journal. Dix à quinze jours plus tard, le guano déposé sur le papier journal est ramassé. Les échantillons (crottes) sont déposés dans des tubes de 1.5ml avec un fragment de gel de silice (Sorbsil Chameleon C) pour absorber l'humidité. Les tubes sont laissés ouverts dans une pièce sèche. Il est important de conserver les échantillons au sec pour éviter la dégradation de l'ADN (Taberlet *et al.*, 1999). A partir de fin Mai, toutes les femelles des colonies sont présentes. En commençant la collecte plus tôt on risque de ne pas échantillonner toutes les femelles, et si on termine plus tard, il y a un risque d'échantillonner des jeunes. En même temps, un comptage visuel des individus a été effectué à chaque visite. Pour ne pas être limité par le nombre d'échantillons, le nombre de crottes récoltées par colonie et par an a égalé environ trois fois le nombre d'individus observés (Puechmaile et Petit, sous presse). Les échantillons ont été collectés dans 3 colonies différentes, situées dans des villages de Bretagne (Ille-et-Vilaine et Morbihan) : à Epiniac (N48°4822', W48°4822'), à Pluherlin (N47°9795', W3°0132') et à Saint-Thurial (N48°0302', W1°9296').

3. Extraction de l'ADN et amplification par PCR.

Les extractions de l'ADN présent dans les crottes ont été effectuées avec le DNA Stool Kit de Qiagen selon un protocole plus adapté que celui proposé avec le kit (Voir Annexe 3). Pour certaines séries d'extraction, des témoins blancs ont été inclus. Il s'agit de faire une manipulation d'extraction sans guano pour savoir si les produits utilisés pour l'extraction sont contaminés par de l'ADN. Les produits d'extraction sont placés dans des tubes à bouchon vissant numérotés les uns à la suite des autres.

Ils sont ensuite placés à -20°C afin de préserver la qualité de l'ADN extrait. Chaque échantillon doit être testé avec un marqueur afin de savoir si le produit d'extraction contient de l'ADN. Les extractions effectuées ont été testées avec un marqueur du chromosome X de 250pb (amorces ARAF 1r et ARAF 1f) (Helborg, 2003). L'ADN a été amplifié dans une réaction de 15 μl contenant : 1X de tampon de la Taq; 0,17mM de dNTP; 0,6 μM de chaque primer ; 0,4 unité de Taq polymérase (HotStart, Qiagen) et 1 μl d'ADN extrait. L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur PTC-100 (MJ Research) en utilisant les conditions suivantes: dénaturation initiale à 94°C pendant 15 minutes ; 50 cycles de 30 secondes à 95°C , 30 secondes à 58°C , et 30 secondes à 72°C ; extension finale à 72°C pendant 10 min. Les produits PCR sont placés sur un gel d'agarose à 2% en même temps qu'un marqueur de taille, permettant ainsi, en présence d'une bande, d'attribuer celle-ci à la présence d'ADN amplifié, et non à une éventuelle contamination. On laisse migrer environ pendant 40 minutes à 110V. Le gel est ensuite laissé pendant 15 minutes dans un bain de bromure d'éthidium puis révélé par une lumière ultraviolette.

4. Détermination du génotype

Les échantillons sont identifiés à l'aide de huit marqueurs microsatellites (C108, D102, D103, D111, D113, D119, D2, D9) amplifiés par une PCR multiplex suivant le protocole de Puechmaille *et al.* (2005). On a mélangé 1 μl d'extrait par échantillon et 7 μl du mélange contenant le Master mix (Multiplex, Qiagen) et les seize amorces correspondant aux huit marqueurs. Pour chaque marqueur, l'une des deux amorces est marquée par un fluorochrome pour permettre une analyse par le séquenceur. Les différents mélanges obtenus sont amplifiés dans un thermocycleur PTC-100 selon les conditions suivantes : 15 minutes à 95°C , 45 cycles à 94°C pendant 45 secondes, 56°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 1 minute et 1 heure à 72°C . Les rampes de températures sont réglées à $1,5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. La détermination des génotypes est réalisée grâce à un séquenceur : ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer 16 Capillary system (Applied Biosystems) et avec du 500 Liz (Applied Biosystems) comme marqueur de taille. Pour chaque échantillon, 1 μl de produit de PCR est dilué dans 3 μl d'eau ultra pure, puis 1 μl de ce mélange est prélevé et mélangé à 0,5 μl de 500Liz et à 8,5 μl de formamide. Les logiciels GeneScan et Genemapper sont utilisés pour lire les génotypes. Chaque échantillon est amplifié deux fois de manière indépendante. Un génotype consensus est élaboré par la suite pour chaque locus à partir des deux génotypes obtenus lors des deux amplifications.

Le processus est répété suivant la méthode utilisée par Puechmaille et Petit (sous presse) jusqu'à obtention d'un génotype consensus pour le maximum d'échantillons et de loci. Cette démarche permet dans un premier temps d'identifier les différents échantillons et dans un deuxième temps de déterminer quels échantillons correspondent aux fèces d'un individu. L'identification des échantillons correspondant à un même individu est réalisée à l'aide du logiciel GeneCap (Wilberg *et al.*, 2004) qui contient un algorithme permettant de comparer deux à deux tous les génotypes obtenus.

5. Détermination du sexe

Le sexe des individus est déterminé à partir des différents échantillons de guano selon le protocole établi par Scala (2006). Une amplification en duplex est réalisée sur les échantillons en y introduisant une paire d'amorces visant à amplifier une partie de séquence présente uniquement sur le chromosome X (ARAF) et une paire d'amorce visant à amplifier une séquence présente uniquement sur le chromosome Y (DBY8). L'ADN est amplifié dans une réaction de 15µl contenant : 1X de tampon de la Taq; 0,17mM de dNTP ; 2µM de DBY8 ; 1,2µM de cyt b à 50µM; 0,6 unités de polymérase Taq et 1µL d'ADN à tester. Ces préparations sont ensuite soumises à une amplification par PCR dont le programme est le suivant : une dénaturation initiale à 94°C pendant 15 minutes, 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 59°C, 30 secondes à 72°C et une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. De la même manière que pour les amplifications en simplex, un témoin négatif est introduit lors de chaque PCR, permettant ainsi de vérifier le succès de l'amplification du fragment de l'ARAF 1, ainsi qu'un témoin positif, c'est-à-dire issu d'un individu mâle, permettant de vérifier le succès d'amplification du DBY 8. Les produits de PCR ont ensuite été révélés sur gel d'agarose à 2% suivant le même protocole que pour les amplifications simplex. Lorsque deux bandes sont présentes sur le gel (selon Hellborg et Ellegren (2003) une bande à 250 pb correspond à l'amplification de l'ARAF et une bande à environ 200 pb correspond à l'amplification du DBY8), c'est un mâle. Si une seule bande est présente (à environ 250 pb), c'est une femelle. Deux échantillons sont testés pour chaque individu (les échantillons ayant été assignés à un individu après la phase de détermination du génotype). En cas de contradiction dans les résultats entre les deux échantillons, nous avons testé tous les échantillons assignés à cet individu.

6. Estimation du recrutement

Le but de l'analyse est de pouvoir estimer le recrutement dans les gîtes de reproduction du Petit Rhinolophe. On veut savoir si les jeunes reviennent dans les colonies où elles sont nées. Pour cela, des tests de parenté ont été effectués sur les individus de chaque colonie pour savoir si leurs génotypes sont proches et des tests d'assignement pour localiser l'origine des individus considérés comme immigrés dans une colonie.

a. Test de parenté

L'étude s'est effectuée uniquement sur le recrutement des femelles. Les mâles sont solitaires pendant la période de mise bas. Exceptionnellement ils peuvent être présents dans les colonies. Leurs venues dans les colonies de mise bas sont irrégulières et hasardeuses. Pour éviter de biaiser les résultats, ils sont retirés des effectifs des colonies. Le logiciel CERVUS (Kalinowski *et al.*, 2007) a permis de comparer les génotypes des individus par année selon la méthode d'exclusion totale (Jones, 2003). Les génotypes des individus échantillonnés uniquement en 2004 sont comparés aux génotypes des individus de 2003 selon l'hypothèse que les individus de 2003 sont «les mères» des individus de 2004. La méthode d'exclusion totale utilise les incompatibilités génotypiques qui existent entre les individus pour rejeter les hypothèses de liens parents-enfants. Le logiciel ne garde qu'un parent ou un groupe de parents possibles. Comme le logiciel prend en compte les erreurs dans la détermination du génotype, le taux d'erreurs sur les liens mères-filles proposés est diminué (Kalinowski, 2007). Les groupes d'individus proposés par Cervus comme « mère potentielle » est analysés par le logiciel Relatedness 5.0.8 (Goodnight et Queller, 1999) qui calcule le coefficient de consanguinité r entre les individus. r est la probabilité que deux allèles soient identiques par descendance (Blouin, 2003). Il y a trois catégories particulières de liens de parenté: la catégorie parent-enfant et frère-sœur (50% des allèles partagés sont identiques, $r=0,5$), la catégorie grand-parent/enfant et demi sœur ($r=0,25$) et la catégorie cousin/cousine et arrière grand-parent/arrière petit enfant ($r=0,125$) (Blouin, 2003).

b. Test d'assignement

Les individus n'ayant aucun lien de parenté avec la population où ils ont été échantillonnés ont été soumis à des tests d'assignement. Le but a été de trouver leur population d'origine parmi les dix-huit populations de Petit Rhinolophe échantillonnées en Bretagne. Le logiciel GENECLASS2 (Piry *et al.*, 2002) a permis de choisir ou d'exclure des populations comme étant l'origine de certains individus.

A partir de génotypes multilocus. GeneClass2 a effectué les calculs des fréquences alléliques de chaque locus pour la population supposée «d'origine» et les a comparé aux génotypes des individus immigrés selon une méthode Bayésienne de Rannala et Mountain (1997) (Cornuet *et al.*, 1999). Le logiciel nous a donné la probabilité d'observer le génotype d'un individu particulier dans la population testée (Cornuet *et al.*, 1999). On a ajouté une analyse par une méthode de ré-échantillonnage par chaîne de Markov / Monte Carlo (Cornuet *et al.*, 1999) qui permet de faire la différence entre les résidents (individus nés dans la population) qui ont un génotype susceptible d'indiquer une population d'origine autre que celle dans laquelle les individus ont été prélevés et les immigrés qui ont un génotype différent de celui de la population où ils ont été prélevés parce qu'ils sont nés dans une autre population (Paetkau *et al.*, 2004).

II. Résultats

1. Echantillonnage

Sur une cinquantaine de gîtes de mise bas connus en Bretagne, 18 d'entre eux ont été étudiés. L'étude du recrutement chez le Petit Rhinolophe a été faite sur 3 de ces colonies. Les données des 15 autres ont servi pour effectuer les tests d'assignement. Des échantillons de guano ont été récoltés de 2003 à 2006 chaque année dans les 3 colonies. L'extraction de l'ADN des échantillons de St Thurial 2006 a été faite, mais par manque de temps les génotypes n'ont pas été établis. Les génotypes de 2005 pour St Thurial ont été difficiles à obtenir. Il est possible que ceux-ci ne soient pas exacts. En vue de l'absence et de l'incertitude des génotypes de 2006 et de 2005, l'étude du recrutement sur cette colonie a été pratiquée uniquement sur les génotypes de 2003 et 2004. Pour les 2 autres colonies, il n'y a pas d'échantillons en 2005 et 2006. La colonie de Pluherlin s'est faite déplacer par le propriétaire du lieu où elle se trouvait. Quant à la colonie d'Epiniac, une chouette a été trouvée dans la colonie en 2005. Comme pour la colonie de St Thurial, l'étude du recrutement à Pluherlin et à Epiniac s'est faite sur les données de 2003 et 2004.

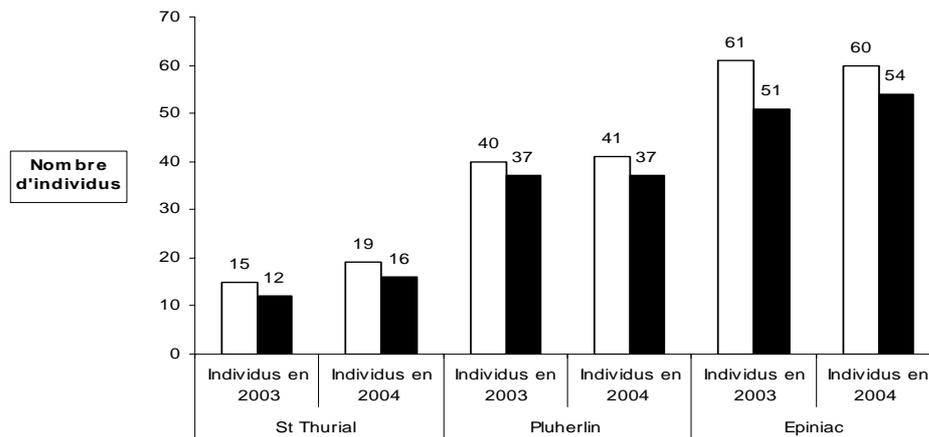


Figure 1 : L'estimation Bayésienne des populations représenté par les histogrammes blancs et l'effectif des femelles représentée par les histogrammes noirs dans les colonies de St Thurial, Pluherlin et Epiniac en 2003 et 2004.

Il y a deux effectifs par colonie et par année : l'effectif génotypé total de la colonie et le nombre de femelles présentes (Fig. 1). Grâce à la détermination du sexe effectuée en 2006 par Dominique Vallet et Bruno Scala, les individus mâles et femelles des trois populations ont été identifiés. Le recrutement est étudié dans des colonies de mise bas. Seules les femelles reviennent chaque année au printemps dans ces colonies ; les mâles se joignent parfois à elles mais en général ils restent solitaires (Gaisler, 1963a). Ils sont donc enlevés des effectifs des populations car ils risquent de biaiser les résultats sur le recrutement. On a utilisé uniquement les effectifs des femelles pour chaque colonie. 2 mâles ont été enlevés de la population de 2003 et 2 de celle de 2004 à Pluherlin, 2 en 2003 et 4 en 2004 à Epiniac, 7 en 2003 et 0 en 2004 à St Thurial.

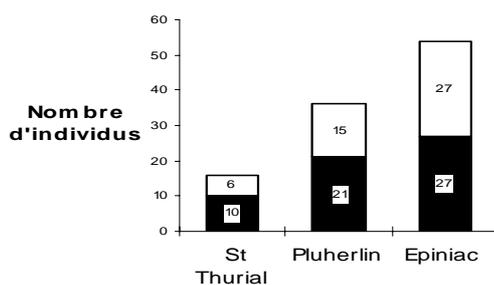


Figure 2 : Répartitions des individus dans les effectifs de St Thurial, Pluherlin et Epiniac en 2004. La partie noire des histogrammes représente le nombre d'individus déjà présents en 2003. La partie blanche des histogrammes représente le nombre d'individus apparus en 2004.

De 2003 à 2004, les effectifs des femelles dans chaque colonie sont presque identiques (Fig. 1). L'effectif de l'année 2004 de chaque population est composé d'un peu plus de la moitié des individus déjà typés en 2003 (Fig. 2). L'autre partie est composée de nouveaux individus non échantillonnés en 2003.

Ces individus peuvent provenir de la colonie où ils ont été échantillonnés, ou ils peuvent être assignés à une autre colonie. Un test de parenté est nécessaire pour déterminer leur origine.

2. Estimation du recrutement

a. Test de parenté

Après un test de parenté, une ou plusieurs mères potentielles ont été identifiées pour chaque nouvel individu en 2004 dans chaque colonie. En même temps, Cervus a proposé une femelle parmi les mères potentielles qui est la mère la plus probable. Le logiciel Relatedness 5.8.0 a indiqué les coefficients r de parenté entre les mères proposées. Avec r , on peut savoir le degré d'apparentement entre les individus (voir Annexe 6).

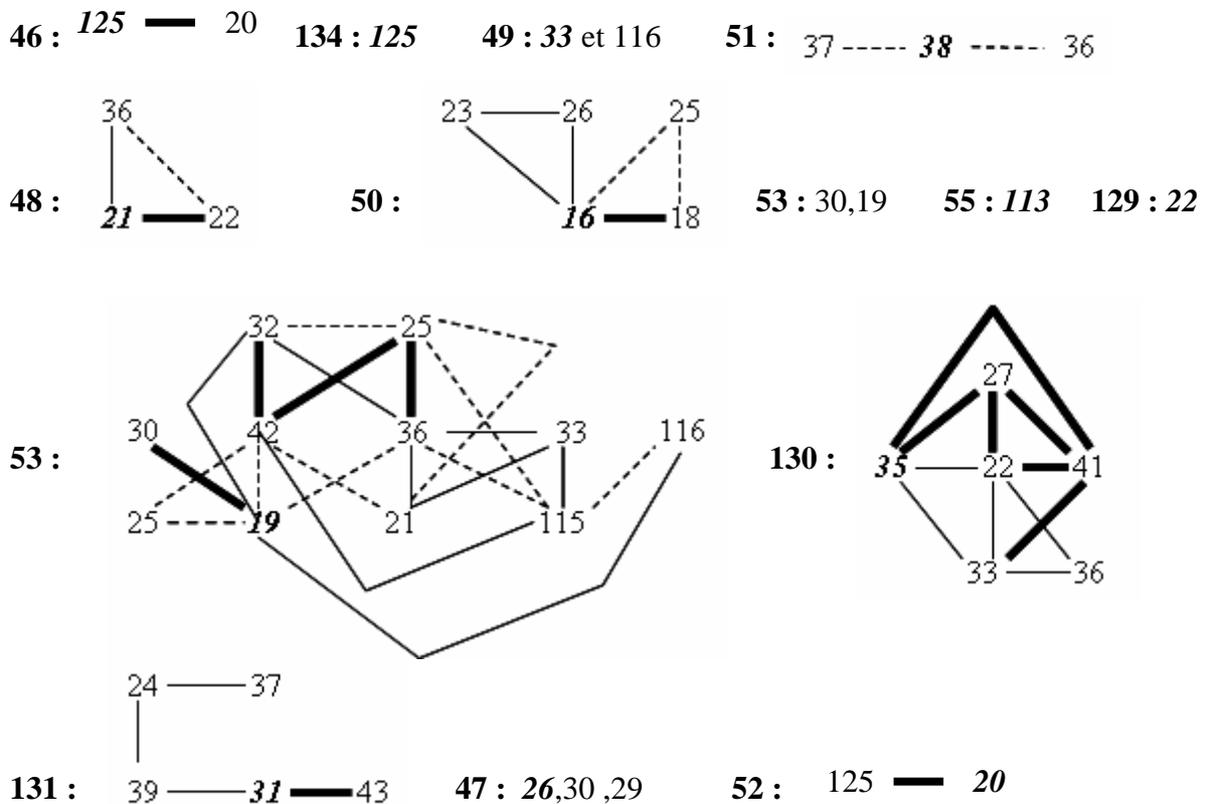


Figure 3 : Les mères potentielles au sein des individus de 2003 à Pluherlin ainsi que les liens de parenté qui les unissent pour chaque individu apparu dans la colonie en 2004. Les individus apparus sont **en gras** et la mère la plus probable est **en italique et en gras**. Les différents liens de parenté des mères potentielles sont: **—** sœurs / mères-filles ; **—** demi-sœurs / grand-mères-petites filles ; **- - - - -** cousines / arrière grand-mères-arrière petites filles.

Dans la colonie de Pluherlin, sur les 15 nouveaux individus en 2004, 14 ont une ou plusieurs mères potentielles au sein de la colonie. On observe que chez la plupart des individus, les mères potentielles sont apparentées entre elles, sauf pour les individus 47, 49 et 53.

Plusieurs individus de 2004 possèdent également la même mère ou ont des mères fortement apparentées.

117 : 5 118 : 119 : 7 et 122 2 : 122 3 : 7, 4 : 108

Figure 4 : Les mères potentielles au sein des individus de 2003 à St Thurial ainsi que les liens de parenté qui les unissent pour chaque individu apparu dans la colonie en 2004. Les individus apparus sont **en gras** et la mère la plus probable est **en italique et en gras**. Les différents liens de parenté des mères potentielles sont: **■** sœurs / mères-filles ; **—** demi-sœurs / grand-mères-petites filles ; **- - - -** cousines / arrière grand-mères-arrière petites filles.

Dans la colonie de St Thurial, sur sept individus nouveaux en 2004, six ont une ou plusieurs mères potentielles dans cette même colonie de St Thurial. Les individus 117 et 118 ont pour mère la femelle 5, les individus 119 et 3 ont pour mère la femelle 7.

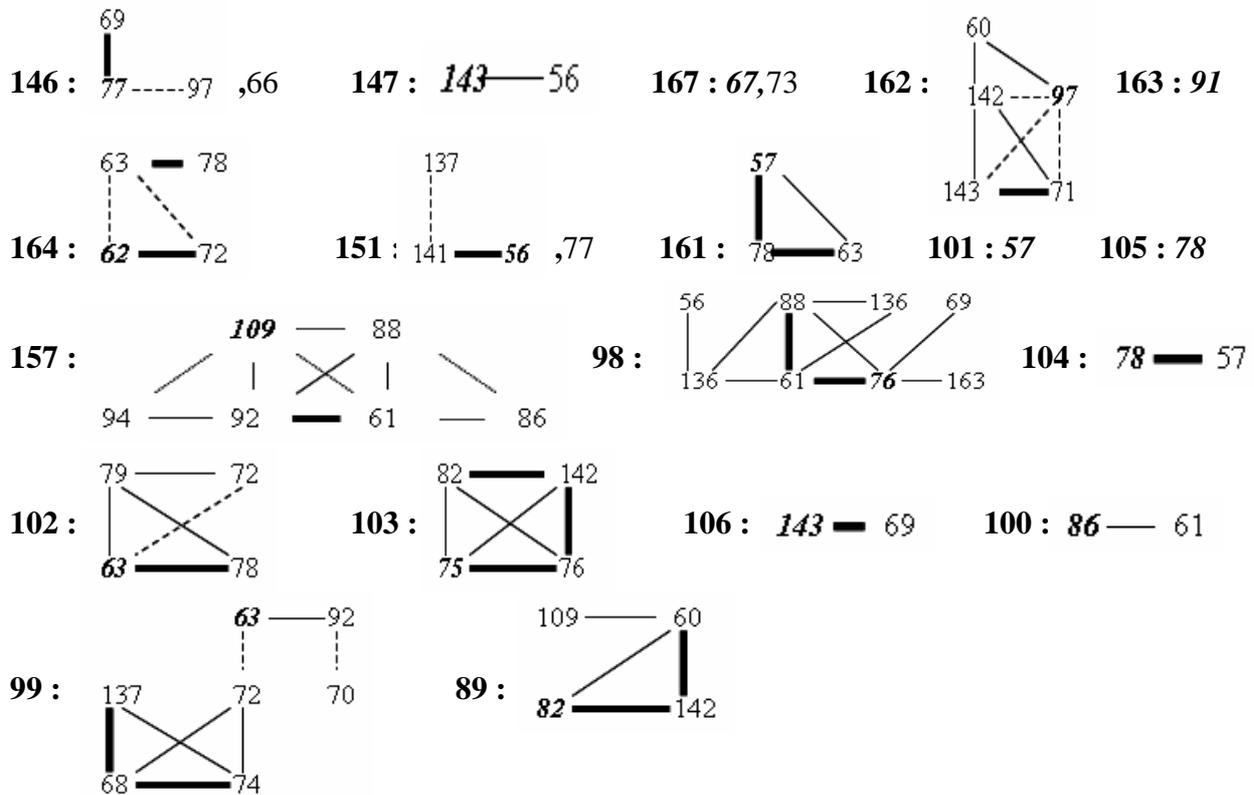


Figure 5 : Les mères potentielles au sein des individus de 2003 à Epiniac ainsi que les liens de parenté qui les unissent pour chaque individu apparu dans la colonie en 2004. Les individus apparus sont **en gras** et la mère la plus probable est **en italique et en gras**. Les différents liens de parenté des mères potentielles sont: **■** sœurs / mères-filles ; **—** demi-sœurs / grand-mères-petite filles ; **- - - -** cousines / arrière grand-mères-arrière petites filles.

Dans la colonie d'Epiniac, sur vingt-sept individus apparus en 2004, dix-neuf ont une ou plusieurs mères potentielles dans la colonie. Comme pour Pluherlin, les mères potentielles de chaque individu sont en général apparentées (sauf pour l'individu 165).

Plusieurs individus ont la même mère la plus probable : les individus 161 et 101 ont pour mère la femelle 57, les individus 105 et 104 ont pour mère la femelle 78, les individus 102 et 99 ont pour mère la femelle 63.

b. Test d'assignement

Pour la colonie de Pluherlin, un immigré est assigné avec une probabilité de 95% à la colonie des Nétumières ou à 94 % à celle de La Villeneuve Jacquelot (Tableau 1). Ce sont des colonies assez éloignées de celle de Pluherlin : la colonie des Nétumières se trouve distante de 152 km, et La Villeneuve Jacquelot de 99 km. Les deux probabilités sont trop proches pour que l'on puisse écarter l'une des deux colonies comme colonie d'origine.

Tableau 1 : Origine des immigrés de 2004 de la colonie de Pluherlin

Individus immigrés de 2004	135	
Nbre de loci utilisés sur 8 proposés	8	8
Vraisemblance	95%	94%
Colonie de provenance	Les Nétumières	La Villeneuve Jacquelot
Distance en km de Pluherlin	152	99

Pour la colonie d'Epiniac, sept immigrés parmi les individus apparus en 2004 sont assignés aux colonies du Haut Dibois située à 5 km d'Epiniac, de St Thurial à 73.6 km, des Nétumières à 73.6 km, de la Sageais à 4.7 km, de la Ballue à 16 km, et de Trémigon à 11.6 km (Tableau 2). Pour l'individu 158, GeneClass2 nous montre que les vraisemblances pour les deux colonies, Trémigon et La Sageais, sont très proches. Il n'est pas possible d'écarter une des deux solutions. Cinq immigrés proviennent des colonies proches d'Epiniac.

Tableau 2 : Origine des immigrés de 2004 de la colonie d'Epiniac

Individus immigrés de 2004	148	149	159	150	160	156	158	
Nbre de loci utilisés sur 8 proposés	6	6	6	7	6	7	6	6
Vraisemblance	96%	99%	98%	56%	98%	97%	90%	86%
Colonie de provenance	Le Haut Dibois	Le Haut Dibois	St Thurial	Les Nétumières	La Sageais	La Ballue	Trémigon	La Sageais
Distance en km d'Epiniac	5	5	73.6	73.6	4.7	16	11.6	4.7

Pour la colonie de St Thurial, un immigré est assigné à 59% à la colonie de la Sageais qui se trouve distante de 71 km (Tableau 3).

Tableau 3 : Origine des immigrés de 2004 de la colonie de St Thurial.

Individus immigrés en 2004	111
Nbre de loci utilisés sur 8 locus proposés	8
Vraisemblance	59%
Colonie de provenance	La Sageais
Distance en km de St Thurial	71

III. Discussion

1. Echantillonnage

Les effectifs des femelles sont très proches ou identiques d'une année sur l'autre (Fig. 1). Les populations sont supposées constantes, mais pour en être sûre il nous faudrait les effectifs des femelles sur plusieurs années. Epiniac et Pluherlin étant les deux plus grosses colonies, il est fort probable que leurs populations soient constantes, mais ce n'est pas vérifiable parce qu'il n'y a pas de d'échantillons en 2005 et 2006. Pour St Thurial, il est possible de vérifier si les effectifs des femelles de 2005 et 2006 sont identiques à ceux de 2003 et 2004 ou au contraire si les effectifs en 2005 et 2006 changent. Les colonies d'Epiniac et de Pluherlin sont les plus grosses colonies de Bretagne. Ces deux colonies sont probablement stables en vu de leurs effectifs importants. Sachant que la fluctuation du taux de recrutement influence la stabilité des effectifs dans les colonies de Pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*) (Sendor et Simon, 2003), les résultats obtenus montrent qu'il y aurait des similitudes sur la gestion des colonies entre la Pipistrelle et le Petit Rhinolophe. Le recrutement influencerait peut être la stabilité des effectifs des colonies du Petit Rhinolophe.

Ce qui est important dans l'échantillonnage de ces colonies, c'est l'identification des mâles. En effet, malgré le peu de mâles présents dans les colonies de mise bas en général, leur présence dans les données peut influencer les résultats, surtout quand ils sont nombreux. Comme on l'a vu dans la colonie de St Thurial (Fig. 1), on peut trouver jusqu'à 7 mâles dans une colonie, ce qui équivaut à un peu plus d'un quart de sa population. Utiliser les génotypes des mâles va biaiser le calcul des fréquences alléliques des colonies et donc fausser tous les résultats de parenté et d'assignement. Il est absolument nécessaire d'écartier les mâles des effectifs comme nous l'avons fait pour les colonies de Pluherlin, Epiniac et St Thurial. On obtient ainsi un effectif précis de la population, ce qui permet de suivre son évolution.

Pour les espèces protégées comme le Petit Rhinolophe, il est important de pouvoir déterminer le nombre exact des individus dans chaque colonie pour pouvoir mettre en place des plans d'action si les effectifs tendent à diminuer.

2. Estimation du recrutement

a. Mise en évidence de l'apparentement des individus

Les individus apparus en 2004 possèdent pratiquement tous une ou plusieurs mères au sein de la colonie où ils ont été échantillonnés. Beaucoup d'individus de 2004 ont plusieurs mères potentielles. En regardant de plus près les génotypes de celles-ci, on s'aperçoit que beaucoup d'entre elles ont un génotype semblable. Cela signifie qu'elles sont proches génétiquement. L'hypothèse d'un lien de parenté entre ces individus est émise. En effectuant un test de parenté entre ces femelles pour évaluer le coefficient de consanguinité r entre chacune des mères potentielles pour chaque individu dans chaque colonie, on s'aperçoit que l'hypothèse de liens de parenté entre les mères potentielles est vraie. Dans les groupes de mères potentielles, on trouve des sœurs, des demi-sœurs et des cousines (Fig. 1, 2 et 3), mais comme le Petit Rhinolophe a une espérance de vie très longue (environ 20 ans), les individus sont peut-être mères et filles, grand-mères et petites filles et arrière grand-mères et arrière petites filles. L'estimation de l'âge d'un Petit Rhinolophe adulte étant impossible, à ce stade on ne peut pas savoir si les individus ayant un $r=0.5$ sont sœurs ou mère et fille. Comme pour le Grand rhinolophe et le Murin de Bechstein, les femelles du Petit rhinolophe se rassembleraient entre individus très apparentés sans doute pour augmenter la coopération (Rossiter *et al.*, 2002) entre les femelles durant la période de présence dans la colonie.

Pour plusieurs individus apparus en 2004 le logiciel Cervus nous donne une mère probable identique, or la femelle du Petit Rhinolophe ne peut avoir qu'un jeune par an (Gaisler, 1963a). Ces individus sont peut-être des enfants nés des années précédentes ou des enfants d'immigrés. En regardant de plus près les génotypes, on observe que les individus ont tous un allèle en commun pour chaque locus commun aussi à la mère. Le nombre d'individus qui sont sœurs ou mères/filles trouvée au sein des groupes de mères potentielles dans les colonies d'Epiniac et de Pluherlin sont nombreux. Il est possible que ces individus aient non seulement la même mère mais aussi le même père. On obtient 14 paires de femelles sœurs (la même mère et le même père) dans la colonie de Pluherlin et 21 paires de femelles sœurs dans la colonie d'Epiniac (Fig. 3 et Fig. 4). La colonie de St Thurial ne contient que 2 femelles sœurs. C'est beaucoup moins de femelles que les deux autres. Les résultats sur cette colonie sont moins flagrants que sur les deux autres du en partie à son petit effectif.

On ne peut pas savoir exactement le nombre de sœurs dans les 14 et 21 paires de femelles ayant un r égal à ou proche de 0.5, mais en regardant les génotypes de ces femelles (annexe 6), la même chose est observée pour les femelles de 2004. La présence d'allèles identiques pour chaque locus pour plusieurs individus nous laisse à penser que ces individus sont des sœurs. Les femelles de Petit Rhinolophe se reproduiraient plusieurs fois avec le même mâle. D'après les travaux de Rossiter *et al.* (2005) sur le Grand Rhinolophe et ceux de Kerth *et al.* (2002) sur le Murin de Bechstein, les femelles favorisent les rassemblements des individus apparentés dans les colonies de reproduction malgré la présence d'immigrés occasionnels. Pendant la période d'accouplement de mi-août à novembre, la femelle va choisir son mâle et les individus vont se répartir en groupes provisoires. En général, les femelles choisissent le mâle qui leur assurera la meilleure progéniture. Le choix de la femelle est donc déterminant (Rossiter *et al.*, 2005). Pour le Grand Rhinolophe, Rossiter *et al.* (2005) ont montré que les femelles se reproduisaient plusieurs fois avec le même mâle et seulement certains d'entre eux se reproduisaient. Apparemment, les femelles se reproduisent avec plusieurs mâles avant de choisir un mâle auquel elles seront fidèles. Ce comportement mène à un apparentement considérablement plus élevé entre quelques membres de la colonie par rapport à un système polygame ou monogame typique (Rossiter *et al.*, 2005). Les femelles du Grand Rhinolophe et du Murin de Bechstein, sont philopatriques. Contrairement aux femelles, les mâles peuvent changer de territoire (Rossiter *et al.*, 2002 ; Kerth *et al.*, 2002). En restant fidèle à un mâle la femelle peut favoriser un individu performant ou un emplacement précis. Dans le cas où les femelles favorise l'emplacement, elles s'accoupleront avec le mâle dominant du territoire (Rossiter *et al.*, 2005). Si un mâle occupe plusieurs années le même territoire à la même époque, les femelles se reproduiront avec lui plusieurs années. Ceci pourrait expliquer le fait que les femelles restent un certain temps avec un mâle, puis en changent. Le Grand Rhinolophe étant une espèce extrêmement proche du Petit Rhinolophe, et en regard de nos résultats, cette explication serait tout à fait vraisemblable, mais pour en être vraiment certaine il faudrait échantillonner les mâles des colonies d'hibernation et faire des tests de parenté sur nos individus des colonies de reproduction des années 2003 et 2004.

L'importance des liens de parenté entre les individus d'une colonie serait à l'origine d'un recrutement élevé chez le Petit Rhinolophe. La fluctuation du taux de recrutement permettrait, peut être, une gestion de la taille des colonies. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait connaître le taux de mortalité des jeunes, des adultes, le taux de migrations et aussi le taux de recrutement par année et par colonie.

b. Origine des individus immigrés

Dans certains cas, différentes vraisemblances des colonies d'origine sont trop proches pour déterminer exactement l'origine de l'individu. C'est le cas pour l'individu 135 (Tableau 1) et l'individu 158 (Tableau 2). Pour l'individu 158, les deux colonies se trouvent à une distance très faible l'une de l'autre. Il est possible que les fréquences alléliques des colonies soient très proches. 5 des immigrés de la colonie d'Epiniac proviennent des colonies se trouvant à une distance inférieure à 20km d'Epiniac. Il parcourt en général des distances courtes, jusqu'à 30 km (Natura 2000, Mai 2007). On remarque que la colonie d'Epiniac est non seulement la plus nombreuse mais qu'elle contient le plus grand nombre d'immigrés. La distance entre les colonies est un facteur limitant pour les déplacements du Petit Rhinolophe (Rodriguez, 2006). Comme Epiniac se trouve à de faibles distances de 8 autres colonies, il est possible que les migrations soient plus nombreuses entre Epiniac et les 8 autres colonies. Comme pour l'immigré 158 (Tableau 1), l'immigré 159 provient d'une colonie éloignée. Le Petit Rhinolophe est capable de parcourir de grandes distances mais cela reste exceptionnel.

L'individu 150 a une vraisemblance de 56 avec la colonie Les Nétumières (Tableau 2) et l'individu 111 a une vraisemblance de 59 avec la colonie La Sageais. Ce sont les vraisemblances les plus élevées parmi les 18 proposés (une par colonie d'origine possible). Les vraisemblances étant très faibles (<90%), il est possible que la colonie d'origine de ces individus n'ait pas été localisée. Il faut aussi prendre en compte le fait que les mâles n'ont pas été séparés des femelles pour les tests d'assignement en dehors des colonies de Pluherlin, St Thurial et Epiniac. Il est possible que la présence de mâles dans les effectifs des 15 autres colonies fausse leurs fréquences alléliques et donc nos tests d'assignement. Pour être certaine que les tests soient justes, il faudrait identifier le sexe des individus des 15 colonies, retirer les mâles des effectifs des populations et faire les tests avec les nouveaux effectifs.

En pratiquant un test d'assignement pour tous les individus échantillonnés dans les colonies de Pluherlin, Epiniac et St Thurial, on remarque que certains individus de 2004 ayant une mère dans la colonie d'échantillonnage ne sont pas assignés à cette colonie mais à une autre. En considérant les mères de ces individus 2004, on constate qu'elles sont elles aussi assignées à une autre colonie. Les femelles immigrées des années précédentes restent dans la colonie d'une année à l'autre pour donner naissance à un jeune qui lui aussi va revenir dans cette colonie. Comme pour les individus immigrés de 2004, certaines femelles n'ont pas de vraisemblance d'origine qui permette un assignement. Il est probable que toutes les colonies de mise bas de la région ne soient pas connues.

Bibliographie

Aars, J. et Ims, R.A. (2002). Intrinsic and climatic determinants of population demography: the winter dynamics of tundra voles. *Ecol.*, **83**(12): 3449-3456.

Beer, J.R. (1955). Survival and movements of banded Big brown bats. *Journal of Mammalogy*, **36**: 242-248.

Blouin, M.S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **18**(10): 503-511.

Cornuet, J.-M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A. et Solignac, M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *The Genetics Society of America*, **153**: 1989-2000.

Gaisler, J. (1963a). The ecology of lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros* Bechstein, 1800) in Czechoslovakia, part I. *Vestnik Ceskoslovenske Spolencnosti Zoologicke*, **27**(3): 211-233.

Gaisler, J. (1965). The female sexual cycle and reproduction in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros hipposideros* BECHSTEIN, 1800). *Vestnik Ceskoslovenske Spolecnosti Zoologicke*, **29**(4): 336-352.

Gaisler, J. (1966). Reproduction in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros hipposideros* Bechstein, 1800). *Bijdr. Dierk.*, **36**: 45-64.

Garrott, R.A., Eberhardt, L.L., White, P.J. et Rotella, J. (2003). Climate-induced variation in rates of an unharvested large-herbivore population. *Can. Journ. Zool.*, **81**: 33-45.

Goodnight, K.F et Queller, D.C. (1999). Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, **8**:1231-1234.

Hellborg, L. et Ellegren, H. (2003). Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of mammalian male-specific DNA. *Molecular Ecology*, **12**: 283-291.

Hughes, T.P. (1990). Recruitment limitation, mortality, and population regulation in open systems: a case study. *Ecol.*, **71**(1): 12-20.

Hutson, A. M., Mickleburgh, S. P. et Racey, P. A. (2001). Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan. Gland, Switzerland and Cambridge, UK, IUCN.258.

Jones, A.G. et Arden, W.R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*. **12**: 2511-2523.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L. et Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, **16**: 1099-1006.

Kerth, G., Safi, K. et König, B. (2002). Mean colony relatedness is a poor predictor of colony structure and female philopatry in the communally breeding Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **52**: 203-210.

Loughry, W.J. et McDonough, C.M. (2001). Natal recruitment and adult retention in a population of nine-banded armadillos. *Acta Theriologica*, **46**(4): 393-406.

Natura 2000 (Mai 2007). Le petit Rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*). *Cahiers d'habitats*, **7**(1303) : 38-41. site web : <http://natura2000.environnement.gouv.fr/habitats/cahiers7.html>

Nisbet, R.M. et Gurney, W.S. (1982). Modelling fluctuating populations. John Wiley and Sons, London, England.

Paetkau, D., Slade, R., Burden, M. et Estoup, A. (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**: 55-65.

Peery, A.E. et Beckett, G. (1966). Skeletal damage as a result of band injury in bats. *Journal of Mammalogy*, **47** : 131-132.

Piry, S, Alapetite, A, Cornuet, J.-M., Paetkau, D, Baudouin, L. et Estoup, A. (2004). GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, **95**:536-539.

Puechmaille, S., Mathy, G. et Petit, E. (2005). Characterization of fourteen polymorphic microsatellite loci for the lesser horseshoe bat, *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera). *Molecular Ecology Notes*, **5**: 941-944 .

Puechmaille, S. et Petit, E. (sous presse). Empirical evaluation of non-invasive capture-mark-recapture estimate of population size based on a single sampling session. *Journal of Applied Ecology*.

Pruch, L.R., Ritland, C.E., Arthur, S.M. et Krebs, C.J. (2005). Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molec. Ecol.*, **14**: 1585-1596.

Rannala, B. et Mountain, J. L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 9197.

Rodriguez, A. (2006). Prise en compte de l'habitat dans l'analyse de la structure genetique des colonies de petit rhinolophe en Bretagne. Mémoire de recherche de Master 2. Université de Rennes1, **Rennes** : 35p.

Rossiter, S.J., Jones, G. et Ransome, R.D., Barratt, E.M. (2002). Relatedness structure and kin-biased foraging in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **51**: 510-518.

Rossiter, S.J., Ransome, R.D., Faulkes, C.G., Le Combe, S.C. et Jones, G. (2005). Mate fidelity and intra-lineage polygyny in greater horseshoe bats. *Nature*, **437**: 408-411.

Scala, B. (2006). Estimation du taux de survie à l'aide de données génétiques non_invasives chez le Petit rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*). Mémoire de recherche de Master 2. Université Paul Sabatier de Toulouse. 26p.

Sendor, T. et Simon, M. (2003). Population dynamics of the pipistrelle bat: effects of sex, age and winter weather on seasonal survival. *Journ. of Anim. Ecol.*, **72**: 308-320.

Schober, W. et Grimmberger, E. (1991). Guide des chauves-souris d'Europe. *Neuchâtel et Paris, Delachaux et Niestlé*. 221.

Taberlet, P. et Luikart, G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**: 41-55.

Wilberg, M.J. et Dreher, B.P. (2004). GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 783-785.

Annexe 1

Présentation de la structure d'accueil

Mon stage s'est déroulé dans l'unité mixte de recherche(U.M.R.6552) « éthologie, évolution et écologie » du Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) et de l'Université de Rennes 1. Il existe deux sites pour cette unité : le campus universitaire de Beaulieu et la station biologique de Paimpont. C'est dans la station biologique de Paimpont, qui se trouve à l'entrée de la forêt de Brocéliande, au sein de l'équipe 3, composée de Jean-Sébastien Pierre et d'Éric Petit qui fut mon maître de stage et dirigée par Nelly Ménard, que j'ai effectué mon stage. Les travaux de cette équipe sont surtout centrés sur la dynamique sociale et la dispersion des gènes c'est-à-dire l'importance des relations sociales intra et intergroupes sur la dispersion des individus et la dispersion des gènes. L'U.M.R. 6552 est divisé en 5 équipes.

La première équipe composée de Cécilia Houdelier, Sophie Lumineau et dirigée par Marie-Annick Richard, étudie l'influence des adultes sur le développement individuel. Le modèle principale des ces études est les Gallinacées. La deuxième équipe comprenant Stéphanie Barbu, Alban Lemasson et dirigée par Catherine Blois-Heulin travaille sur le fonctionnement des groupes centrée principalement sur les Primates humains et non Humains. La quatrième équipe est composée d'Hugo Cousillas, Isabelle George, Laurence Henry, Patrick Jego et est dirigée par Martine Hausberger. Leurs travaux se trouvent à l'interface des thématiques développées par les autres équipes. Le thème central est la relation entre vie sociale et communication en intégrant la dimension ontogénique, les aspects cognitifs, les fonctions et l'évolution. La cinquième équipe composée de Pierre Deleporte, Virginie Durier et dirigée par Colette Rivault, travaille essentiellement sur le grégarisme chez la blatte mais tous leurs travaux sont à la base des réflexions sur l'évolution des systèmes sociaux.

Au sein de la station biologique de Paimpont se trouve aussi une partie de l'UMR 6553 qui l'UMR Ecosystème Biodiversité Evolution (Ecobio). La station est équipée de chambres avec une cuisine commune pour accueillir les stagiaires de Master et les doctorants ainsi que des chercheurs, et d'un petit restaurant.

Pour plus de renseignement sur l'UMR 6552 consulter le site internet :

<http://www.umn6552.univ-rennes1.fr/Accueil.php>

Annexe 2

Ce stage a été un enrichissement pour ma formation. Il m'a permis d'acquérir des méthodes de recherches en laboratoire et des méthodes de rédaction. Mon orientation vers un Master 2 recherche en génétique des populations c'est confirmé au fur et à mesure du déroulement de mon stage. Eric Petit m'a laissé la liberté de m'organiser et de travailler comme je voulais tout en étant présent quand j'avais besoin de lui. J'ai pu mener mon sujet comme je voulais, ce qui fut très agréable.

L'ambiance studieuse mais à la fois très festive de la station biologie de Paimpont permet de se sentir à l'aise. Tous les stagiaires, thésards et chercheurs n'hésitent pas à vous aider si vous avez le moindre problème, c'est très rassurant. On a l'impression de faire partie d'une grande famille.

Ce stage a été extrêmement positif pour moi sous tous les rapports

Annexe 3 : protocole d'extraction d'ADN à partir de guano

Protocole d'extraction DNeasyStool Kit

Avant de commencer, faire chauffer l'étuve à 70°C.

Si le tampon ASL forme un précipité, le mettre à l'étuve à 70°C pour le dissoudre.

- Placer les crottes individuellement dans des tubes de 2 ml, ajouter 1.6ml de tampon ASL et écraser les crottes le plus finement possible à l'aide d'un cure-dent stérile.
- Vortexer 1 minute chaque échantillon (lyse et mise en solution de l'ADN)
- Ajouter une tablette d'INHIBITEX® dans chaque tube et vortexer pendant 1 minute (fixation des inhibiteurs de la PCR)
- Centrifuger les échantillons à 13200 rpm pendant 6 min (procéder par six échantillons à la fois car le culot se re-suspend facilement)
- Préparer 25 µl de protéinase k dans des tubes de 2 ml et numéroté les tubes
- Dès l'arrêt de la centrifugation, pipeter 600 µl de surnageant dans les tubes contenant la protéinase k
- Ajouter un volume de tampon AL (600 µl) (ne pas mettre le tampon AL à la protéinase k sinon cela ne sert à rien) et incubé 15 minutes à 70°C
- Ajouter un volume d'isopropanol glacé (600 µl) et mélanger les tubes pour homogénéiser la solution
- Numéroter des colonnes Qiamp
- Transférer par 650 µl les échantillons sur la colonne et centrifuger 1 min à 7200 rpm
- Répéter l'opération jusqu'à ce que toute la solution soit passée dans la colonne
- Ajouter 500 µl de tampon AW1 (1^{er} lavage) et centrifuger 1 min à 7200 rpm
- Ajouter 500 µl de tampon AW2 (2^{ème} lavage) et centrifuger 1 min à 7200 rpm
- Placer la colonne sur des tubes numérotés
- Eluer l'ADN dans 80 µl d'eau pure
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger 1 minute à 7200 rpm

Résumé :

Les populations animales sont des entités dynamiques influencées par le gain et la perte d'individus. Les jeunes nés au sein d'une population peuvent émigrer ou rester dans celle-ci. Le terme recrutement est employé pour désigner les individus qui restent dans la population où ils sont nés. Nous avons testé dans cette étude si les individus échantillonnés en 2003 étaient présents dans l'échantillonnage de 2004 dans 3 colonies de mise bas bretonne du Petit Rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*). Une identification et une comparaison des individus présents en 2003 et en 2004 ont été fait. Puis des tests de parenté ont été effectués entre les individus de 2003 et ceux apparus en 2004 selon une méthode d'exclusion totale dans chaque colonie. Le coefficient de consanguinité r a été calculé entre les individus de 2003 apparenté à ceux de 2004 pour chaque colonie. Les individus de 2004 n'ayant aucun lien de parenté avec la colonie où ils ont été échantillonnés sont associés à d'autres colonies par des tests d'assignement. Les résultats montrent que le recrutement est très fort chez le Petit rhinolophe puisque la plupart des individus présents en 2003 le sont en 2004. Les liens de parenté entre les individus au sein d'une colonie sont très forts. Ils indiquent une philopatrie des femelles avec un système de reproduction parfois polygame et parfois monogame.

Mots clés : *Rhinolophus hipposideros*, test de parenté, test d'assignement, coefficient de consanguinité r , méthode d'exclusion totale

Abstract :

Study of recruitment on 3 settlements of reproduction of lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) in Brittany using methods of noninvasive genetics.

The animal populations are dynamic entities influenced by the profit and the loss of individuals. The juveniles born within a population can emigrate or remain in this one. The recruitment term is employed to designate the individuals who remain in the population where they were born. We tested in this study if the individuals sampled into 2003 were present in the sampling of 2004 in 3 colonies of low Breton setting of lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*). An identification and a comparison of the individuals present in 2003 and 2004 were made. Then methods of kinship were carried out between the individuals of 2003 and those appeared in 2004 according to a process of exclusion in each colony. The Relatedness r was calculated between the individuals of 2003 related with those of 2004 for each colony. The individuals of 2004 not having any family tie with the colony where they were sampled are associated other colonies by genetic assignment methods. The results show that recruitment is very strong at lesser horseshoe bat since the majority of the individuals present in 2003 are it in 2004. The kinships between the individuals within a colony are very strong. They indicate to a philopatrie females with a sometimes polygamous system of reproduction and sometimes monogamist.

Key words: *Rhinolophus hipposideros*, kinship, genetic assignment methods, relatedness r , the process of exclusion

