

Annexe I

Méthode de marquage et de prélèvement de matériel biologique

I. Méthodologie de marquage

La capture s'effectue à l'aide de « harp-trap » (Fig.1, gauche) sur-mesure, positionnés au niveau des sorties principales empruntées habituellement par les chiroptères. Les autres issues possibles sont obturées provisoirement, le temps de la capture. Ces pièges sont constitués par une cage de fils de nylon tendus verticalement, qui est directement relié à un entonnoir de plastique rigide qui se prolonge par une manche de plastique souple débouchant dans une caisse aux parois de tissus (Fig.1, gauche). Les animaux sont maintenus en caisse d'une vingtaine d'individus ce qui limite le stress, leur permet d'assurer une meilleure thermorégulation (évitant les torpeurs par hypothermie), jusqu'au tri à partir duquel ils sont disposés dans des sacs individuels.



Fig.1 Capture et marquage. Gauche: Système de « harp-trap » utilisés pour la capture en sortie de gîte de reproduction. Droite: Injection sous-cutanée d'un transpondeur.

Le marquage s'effectue à l'aide de transpondeurs ID100 FXD-A (Trovan©) de 0.09gr (2.2 x 11mm), soit 0.36% du poids moyen d'un Grand Murin, i.e. dans le respect des recommandations en la matière (<5% du poids du corps). Avant injection, une tonte au ciseau est effectuée à l'endroit de l'injection, le transpondeur est injecté, via une aiguille stérile pré-chargée (Fig.1, droite), sous la peau du dos, puis la plaie d'injection est suturée à l'aide de colle chirurgicale (Vetbond©).

II. Prélèvement biologiques

Trois types de prélèvements sont effectués sur les grands murins : des biopsies (punch de 3mm), des micro-prélèvements de sang et des micro-prélèvements de salive. Les biopsies bilatérales de membrane alaires ou plagiopatagium (Fig.2 gauche), servent à l'extraction génomique d'ADN. Les micro-prélèvements de sang (entre 120 et 150µl, soit <0,85% du poids), obtenu par ponction de

la veine inter-fémorale traversant l'uropatagium (Fig.2, droite) servent à l'obtention des transcriptomes. Le choix des sites de biopsie et de ponction ainsi que le volume prélevé suivent les recommandations internationales (Sikes & Gannon, 2011), soit moins de 1,5% du poids de l'animal pour la ponction sanguine. Le choix de la veine brachiale étant sujet à caution et à controverse nous l'avons écarté (Ellison et al., 2006; Racey, Swift, & MacKie, 2011).



Fig.2 Cicatrisation 24 jours après biopsie du plagiopatagium (gauche) et prélèvement de sang au niveau de l'uropatagium (droite).

La réalisation régulière (annuellement) de biopsies au niveau des ailes de chiroptère n'altère ni la survie ni le succès reproducteur (Mitchell-Jones & McLeish, 2004). De même, aucun effet adverse n'a pu être mis en évidence du fait de prise de sang sur les chiroptères et aucune différence n'a été noté dans le taux de recapture entre les individus contrôles et les individus prélevés dans des études précédentes (Ellison et al., 2006). Dans notre étude en particulier il n'y a pas eu de différence dans les taux de capture et de survie entre la période avant prélèvement (avant 2013) et après prélèvements (après de 2013), autre que des effets colonie. Aussi, nous pouvons conclure que la capture et les prélèvements n'engendrent pas de risque à court ou long terme sur la santé des populations suivies.



Fig.3 Alimentation d'un Grand Murin juvénile avant relâché.

La membrane alaire des chiroptères est réputée pour être l'un des tissus qui cicatrise le plus vite chez les mammifères (Fig.2, gauche). Néanmoins si la cicatrisation est incomplète entre 2 séries de biopsie ou si des plaies ou des trous sont observés sur l'aile d'un individu nous ne pratiquons pas de biopsie afin de limiter au maximum les défauts d'aérodynamismes potentiels que pourraient engendrer ce prélèvement.

Pour le prélèvement sanguin, l'animal est immobilisé par un opérateur, une épingle stérile 25G est utilisée pour percer la veine inter-fémorale qui est parallèle au tibia sur la partie ventrale de l'uropatagium (queue) chez *Myotis myotis*. La veine est bien visible, présente juste sous la membrane de l'uropatagium. Lorsque le sang perle à la surface de la veine, il est récolté à l'aide de tubes micro-capillaires stériles (Fig.2, droite) ou d'une pipette à usage unique.

Le micro-prélèvement de salive se fait par écouvillonnage de la cavité buccale d'un échantillon restreint (10 % environ) d'individus.

Les échantillons prélevés sont stabilisés sur place, c'est-à-dire congelés à -180°C pour ce qui est du sang et stocké dans du silicagel pour les biopsies. L'ensemble de ces échantillons est ensuite traité par les techniques génomiques (extraction et séquençage) au laboratoire de l'université de Dublin (UCD).

Un échantillonnage restreint de prélèvements de sang est pris sur buvard pour sérologie par le laboratoire de la rage de la faune sauvage de l'ANSES à Nancy. De même, les écouvillons buccaux sont stabilisés dans du RNA later puis traités par le même laboratoire.

III. Description des postes

L'ensemble des manipulations se fait selon un processus de chaîne avec trois postes principaux :

- le transpondage : 1 à 2 postes, chacun constitué d'un manipulateur qui assure la contention et d'une personne habilitée au marquage.
- la biométrie : 2 à 4 postes, chacun constitué d'un manipulateur habilité à la pesée et la mesure de l'avant-bras et d'un scribe.
- l'échantillonnage : 4 à 6 postes chacun constitué d'un manipulateur habilité à la prise de sang, à l'écouvillonnage buccal et à la biopsie et d'un scribe qui assure également la contention.

Un quatrième poste d'au moins 2 personnes assure l'alimentation à l'aide de ténébrions et la réhydratation des individus avant relâché. Quelques personnes assurent le tri des animaux (marqués, non marqués), la surveillance du matériel de capture et le relâché.

IV. Effet des captures

L'impact des captures sur la fréquentation de la colonie peut être mesuré par les enregistrements automatiques des allées et venues des individus, grâce aux antennes positionnées au niveau des sorties des colonies. Si la capture de la majorité des individus constitue un stress majeur et conduit à des désertions on devrait s'attendre à voir une baisse du nombre d'individus sur les enregistrements. Les captures ont lieu en général début juillet.

Si l'on regarde le nombre d'individus adultes enregistrés quotidiennement à Bégonne (Fig.4), on ne note pas de diminution brutale du nombre d'individus à part en 2014. Cette chute est cependant très transitoire et les individus reviennent à la colonie dans les jours qui suivent. De plus comme la capture a lieu quand les juvéniles sont volants, c'est-à-dire que la plupart sont sevrés, les femelles qui n'allaitent plus leur jeune sont plus susceptibles de quitter la colonie. Cependant on n'observe pas de tel phénomène et la pente du départ progressif des femelles n'est pas altérée par la capture. L'effet de cette capture n'a donc pas d'effet mesurable par la fréquentation de la colonie de Bégonne.

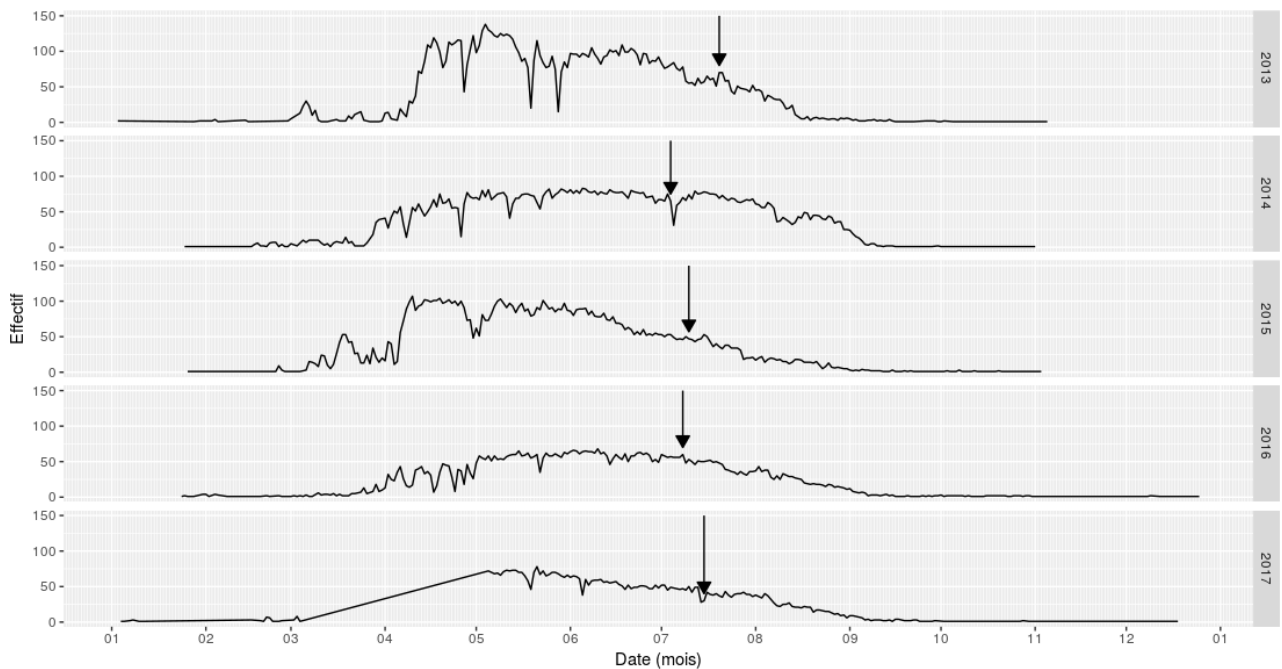


Fig. 4 Nombre d'adultes quotidiennement enregistrés par les antennes de la colonie de Béganne. Les flèches indiquent la date de la Capture

Les constats sont les mêmes quand on s'intéresse à la colonie de Férel, il n'y a pas d'effet notable de la capture sur la fréquentation de la colonie par les adultes (Fig.5). Dans les 2 cas, la plupart des adultes ont quitté la colonie en fin août début septembre. Cependant alors que le départ des adultes est progressif à Béganne dès le mois de juillet, il est plus tardif et plus brutal à Férel et a lieu au mois d'août, soit un mois environ après la capture.

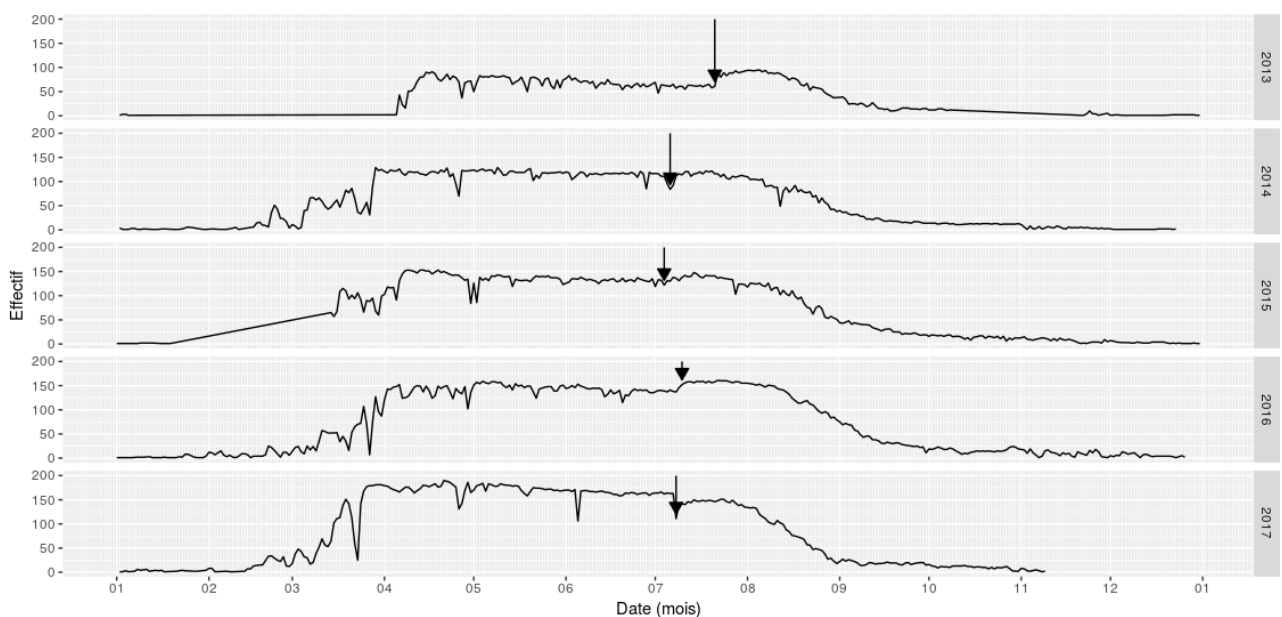


Fig. 5 Nombre d'adultes quotidiennement enregistrés par les antennes de la colonie de Férel. Les flèches indiquent la date de la Capture

Bibliographie

- Ellison, L. E., O'Shea, T. J., Wimsatt, J., Pearce, R. D., Neubaum, D. J., Neubaum, M. A., & Bowen, R. A. (2006). Sampling blood from big brown bats (*Eptesicus fuscus*) in the field with and without anesthesia: Impacts on survival. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(4), 849–852.
- Mitchell-Jones, A. J., & McLeish, A. P. (2004). *Bat Workers' Manual* (3rd ed.).
- Racey, P. A., Swift, S. M., & MacKie, I. (2011). Recommended Methods for Bleeding Small Bats. Comment on Smith et al. 2009. *Acta Chiropterologica*, 13(1), 223–225.
doi:10.3161/150811011X578787
- Sikes, R. S., & Gannon, W. L. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92(1), 235–253. doi:10.1644/10-MAMM-F-355.1