



Demande de renouvellement de dérogation de capture, de marquage permanent et de prélèvements biologiques sur une espèce protégée : Le Grand Murin (*Myotis myotis*).



Ce document est un complément aux formulaires cerfa (13616*01), concernant le programme de recherche et de conservation menée en collaboration entre l'Université de Dublin (Prof. Dr. Emma Teeling & Dr. Sébastien Puechmaille, Irlande), l'INRA (Dr. Eric Petit, France) et l'association de protection de l'environnement Bretagne Vivante (Frédéric Touzalin, Olivier Farcy et Corentin Le Floch).

Résumé

L'association de protection de l'environnement Bretagne-Vivante a décidé de lancer un programme d'étude en 2010 sur une espèce modèle, le Grand Murin (*Myotis myotis*), afin d'estimer les paramètres démographiques essentiels pour comprendre les facteurs influençant la dynamique de ses populations. En effet, de nombreuses espèces de chiroptères européennes n'échappent pas à la tendance générale de la biodiversité à l'érosion et sont menacées notamment du fait de la baisse de leurs effectifs. Malgré le développement de mesures de protection et de surveillance des populations à l'échelle européenne (Battersby, 2010) comme à l'échelle nationale ainsi que la poursuite des plans d'action en faveur des chiroptères, Bretagne-Vivante a constaté que la connaissance des dynamiques des populations progresse peu. Les comptages estivaux ou hivernaux, qui constituent le standard des suivis actuellement en Europe, fournissent des indices parfois difficiles à interpréter selon l'échelle géographique et ne permettent généralement pas de relier les variations annuelles des comptages avec des facteurs environnementaux à moins de connaître les paramètres démographiques de ces populations (Kerbirou et al., 2015).

Le grand murin est inscrit à l'annexe II et IV de la Directive Habitat (92/43/CEE) et figure parmi les espèces européennes dont les populations ont le plus régressé ces soixante dernières années. Le marquage individuel est la seule manière d'estimer les paramètres démographiques et le transpondage est une technique largement utilisée et sans danger pour ces animaux. Avec 7 ans de recul sur cette étude nous pouvons à la fois montrer l'intérêt et l'innocuité de la technique de marquage mais aussi avoir les premiers résultats concernant la démographie et l'utilisation de l'habitat pour 5 colonies suivies.

Ce programme d'étude inclut également un volet d'épidémiologie-surveillance active de la rage, mis en place en collaboration avec l'équipe d'Évelyne Picard-Meyer de l'ANSES (Nancy), ainsi qu'un volet génétique rassemblant les généticiens de l'équipe de recherche d'E. Teeling et de S. Puechmaille de l'université de Dublin (UCD) et É. Petit de l'INRA de Rennes. Ces recherches portent sur les facteurs génétiques du vieillissement.

L'ensemble de ce programme d'étude, basé d'une part sur le marquage individuel permanent et d'autre part sur l'échantillonnage de sang et de patagium, a permis des découvertes inédites à la fois sur la démographie et l'utilisation de l'habitat mais aussi sur les volets plus fondamentaux liés à la rage et au vieillissement. Cependant la validation et la valorisation de nombreux résultats s'inscrit dans un temps long, car cette espèce est longévive avec une espérance de vie de 37 ans (Gaisler, Hanák, Hanzal, & Jarský, 2003). Aussi le programme souffre d'un manque de mesures sur des animaux vieillissants d'âge connu (ayant été marqué juvéniles), il est donc nécessaire de poursuivre le programme puisque actuellement les individus les plus âgés de l'étude dont on connaît précisément l'âge n'ont que 7 ans. Par ailleurs, pour identifier les facteurs environnementaux (climat, habitat, etc.) qui influent sur la dynamique de cette espèce il faut de nombreuses saisons avec des variations qui génèrent des changements dans les paramètres démographiques et cela en comparaisons entre plusieurs colonies. Nous demandons donc un renouvellement des autorisations jusqu'en 2021.

Les objectifs poursuivis par cette demande de renouvellement sont :

- maintenir le marquage pour une meilleure estimation des paramètres démographiques et notamment en ce qui concerne les cohortes les plus âgées
- maintenir les captures et enregistrements passifs durant la période d'accouplement (swarming) afin de valider les résultats sur la survie juvénile
- maintenir les suivis hivernaux par lecture passive des transpondeurs afin de connaître l'utilisation des sites d'hibernation et les déplacements entre ces sites durant l'hiver
- maintenir les prélèvements biologiques (sang et patagium) afin de continuer la construction des pedigrees des populations étudiées et d'approfondir les connaissances sur les flux génétiques entre population, les facteurs génétiques liés au vieillissement et à la réponse immunitaire

- poursuivre la surveillance active de la rage chez cette espèce au vu des résultats recueillis durant la première phase d'étude

I. Identité et qualification des demandeurs

Identité du porteur de la demande d'autorisation	Identité du partenaire chargé de l'épidémio-surveillance de la rage	Identité du partenaire chargé de la recherche sur le vieillissement et l'immunité	Identité du partenaire chargé des pedigrees
Bretagne Vivante 19 rue de Gouesnou BP 63132 BREST Cedex 2	Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy Technopôle Agricole et Vétérinaire - Bâtiment H Domaine de Pixérécourt - CS 40009 54220 Malzéville - France	UCD School of Biology & Environmental Science Director of the Centre for Irish Bat Research Science Centre West University College Dublin Belfield, Dublin 4 Ireland	INRA UMR ESE, 65 rue de Saint-Brieuc Bât. 15, CS 84215, 35042 Rennes Cedex, France
Bretagne-Vivante est, depuis 55 ans, la plus importante association régionale de protection de la nature de France. Reconnue pour son expertise scientifique et éducative, et pour ses compétences de gestionnaire d'espaces naturels, l'association œuvre au quotidien pour la protection des espèces et des espaces et pour la transmission des connaissances à travers les générations. Bretagne Vivante est l'un des membres fondateurs de grands réseaux nationaux tels que France Nature Environnement et Réserves Naturelles de France.	Spécialiste de la rage animale, le laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy joue un rôle prépondérant dans le système français de surveillance de la rage. Depuis plus de 40 ans, le laboratoire participe à la lutte contre cette maladie, en particulier par la conduite de programmes de recherche et de développement et d'expertise. Laboratoire national de référence, cette entité de l'Agence réalise le diagnostic de rage sur animaux n'ayant pas contaminé l'homme. Quelques 495 prélèvements sont reçus annuellement pour diagnostic de la rage. Le laboratoire est également à la tête du réseau national de surveillance et de suivi des infections à lyssavirus des chauves-souris. Dans ce cadre, 400 chauves-souris en moyenne sont été adressées au laboratoire tous les ans.	Cinq principaux domaines de recherche qui sont abordés dans le laboratoire d'évolution moléculaire et de phylogénie des mammifères : 1. Les relations phylogénétiques et l'histoire évolutive des chauves-souris. 2. Les mécanismes moléculaires et évolution de la perception sensorielle chez les mammifères et leurs implications pour les maladies visuelles et auditives. 3. Le Rôle de l'écholocation dans le processus de spéciation. 4. La conservation des vertébrés irlandais se concentrant particulièrement sur les chauves-souris. 5. L'évolution de l'immunité naturelle chez les mammifères. Ces questions sont traitées à l'aide de données moléculaires et interprétées à la lumière de données écologiques, physiologiques, paléontologiques, comportementales et morphologiques.	L'unité mixte de recherche Ecologie et santé des écosystèmes (UMR ESE) développe des projets scientifiques à plusieurs niveaux d'organisation biologique (du gène aux organismes, populations et communautés) dans trois principaux axes thématiques : 1. Analyser les impacts et les réponses aux stress générés par les activités anthropiques. 2. Comprendre et stimuler les mécanismes de restauration écologique. 3. Contribuer à l'élaboration de recommandations pour une gestion durable des ressources naturelles et autres services écologiques associés aux écosystèmes aquatiques.

II. Identité et qualification des personnes intervenant dans le programme

Les principaux opérateurs :

- Éric Petit : vétérinaire, Directeur de recherche à l'INRA, titulaire d'une thèse en écologie qui portait sur l'étude d'une espèce de chauve-souris européenne, la noctule commune et détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère
- Sébastien Puechmaille : Chercheur à l'université de Greifswald et à l'University College de Dublin, titulaire d'une thèse en écologie qui portait sur l'étude d'une espèce de chauve-souris asiatique, la chauve-souris bourdon et détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère
- Frédéric Touzalin : vétérinaire, titulaire d'une thèse en écologie qui portait sur l'étude d'un limicole Européen, l'Avocette élégante et détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère
- Corentin Le Floch : chargé de mission à de Bretagne-Vivante et détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère

Participeront aux opérations de prélèvement biologiques les personnes suivantes :

- Emma Teeling : professeure au laboratory of molecular evolution and mammalien phylogenetics (UCD, Irlande), formée depuis 2013 à la manipulation des chiroptères, au prélèvement de sang, ainsi qu'à la biopsie de plagio-patagium
- Conor Whelan : technicien au laboratory of molecular evolution and mammalien phylogenetics (UCD, Irlande), formé depuis 2013 à la manipulation des chiroptères, au prélèvement de sang ainsi qu'à la biopsie de plagio-patagium
- Nicole Foley : post-doctorante au laboratory of molecular evolution and mammalien phylogenetics (UCD, Irlande), formée depuis 2013 à la manipulation des chiroptères, au prélèvement de sang ainsi qu'à la biopsie de plagio-patagium
- Zixia Huang : post-doctorant au laboratory of molecular evolution and mammalien phylogenetics (UCD, Irlande), formé depuis 2013 à la manipulation des chiroptères ainsi qu'à la biopsie de plagio-patagium
- Megan Power : doctorante au laboratory of molecular evolution and mammalien phylogenetics (UCD, Irlande), formée depuis 2015 à la manipulation des chiroptères, ainsi qu'à la biopsie de plagio-patagium
- Olivier Farcy : chiroptérologue, bénévole expérimenté à Bretagne-Vivante, à l'origine du programme, détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère
- Arnaud Le Houédec : chiroptérologue, chargé de mission à Bretagne-Vivante, détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère
- Yann Lebris : chiroptérologue, bénévole expérimenté à Bretagne-Vivante, détenteur d'une autorisation de capture de chiroptère

III. Espèce concernée

Le Grand Murin (*Myotis myotis*), est une espèce inscrite à l'annexe II et IV de la Directive Habitat (92/43/CEE), permettant de justifier la création de zone Natura 2000. Les individus concernés correspondent aux populations du sud Morbihan, en particulier les colonies de Béganne, Férel, la Roche Bernard, Limerzel et Noyal-Muzillac. Le nombre d'individus vivants marqués et prélevés est limité à 450 par an. La récolte des cadavres dans les colonies fait déjà l'objet d'une dérogation concernant Sébastien Puechmaille et Frédéric Touzalin.

IV. Protocoles d'étude

IV.1. Capture et Marquage

Les captures ont lieu sur site de reproduction (Fig.1) à l'aide de harp traps sur mesure. Néanmoins, la quantité des issues possibles dans certains sites rend nécessaire l'oblitération temporaire (pendant la nuit de capture uniquement) de celles-ci pour obliger les individus à sortir au niveau des harp traps. Une fois l'ensemble des individus sortis, nous nous engageons à retirer le matériel de capture et les bouchons. Cela permet de ne modifier ni la circulation des individus relâchés qui cherchent à rentrer à l'intérieur de la colonie, ni l'aération du sous-toit.

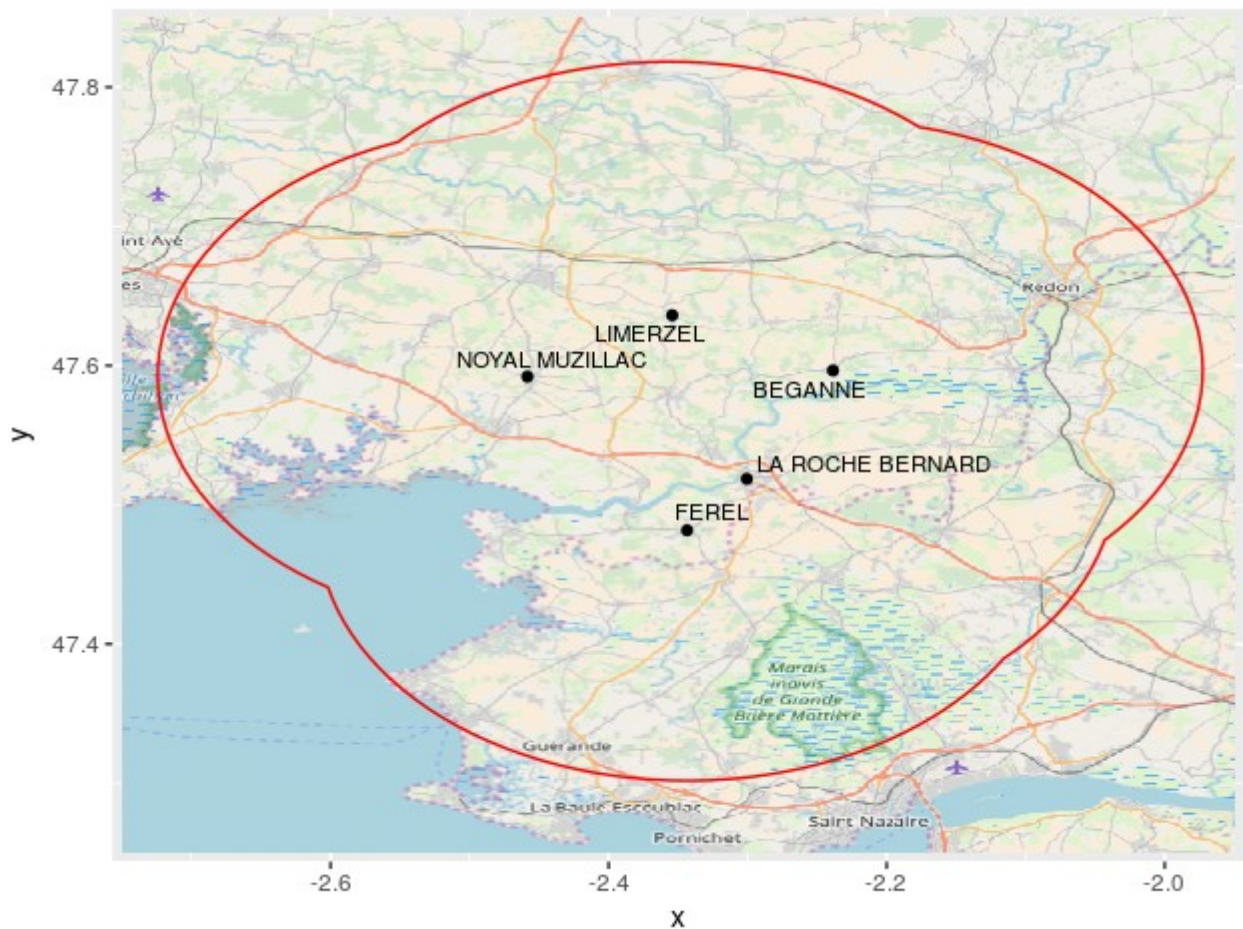


Fig.1. cartographie des colonies suivies. La zone entourée de rouge délimite une zone tampon de 20km autour des colonies.

Les prospections des zones de chasse sont menées dans un périmètre de 20km autour des colonies (voir Fig.1). Les captures en période automnales (swarming) se font également dans ce périmètre en particulier à Pluherlin.

Un descriptif précis de la technique de marquage est décrit dans l'annexe I. L'approche qui a été privilégiée est basée sur le marquage individuel à l'aide de transpondeurs. Les implants sous-cutanés offrent de nombreux avantages par rapport aux bagues traditionnelles. Comme il a déjà été démontré dans d'autres études et sur de nombreux taxons (Bonter & Bridge, 2011; Freeland & Fry, 1995; Paterson et al., 2011; Walker, Trites, Haulena, & Weary, 2012), cette technique s'avère sans conséquence sur la santé et la mobilité des animaux (Britzke, Gumbert, & Hohmann, 2014; Ficke, Myrick, & Kondratieff, 2012; Ratnayake, Morosinotto, Ruuskanen, Villers, & Thomson, 2014; Rigby, Aegerter, Brash, & Altringham, 2012) contrairement aux bagues (López Baucells et al.,

2013). Nous n'avons pas relevé de mortalité, de morbidité, ou de lésions dues à cette technique depuis 7 ans. Cette technique s'avère particulièrement adaptée aux études à long terme.

IV.2. Prélèvements biologiques

Les prélèvements biologiques (détail Annexe I) effectués dans le cadre de cette étude ont des objectifs divers et sont de trois natures différentes :

- micro-prélèvements de sang
- micro-prélèvements de salive
- biopsie de membrane alaire (plagiopatagium)

les prélèvements de sang servent à la fois à une étude transcriptomique (recherche de l'ARN messager circulant afin de déterminer les gènes actifs de l'espèce) et au dosage des anticorps contre les différents virus rabiques.

Les micro-prélèvements de salive servent à la recherche de particules virales de virus de la rage spécifiques des chiroptères. La recherche est réalisée par L'ANSES, qui utilise une méthode de PCR.

Les biopsies de plagiopatagium servent à la fois à établir le génotypage des individus, i.e. leur ascendance et descendance, mais aussi à l'étude longitudinale de la longueur de télomère et de l'hétéroplasmie.

Comme il a été démontré précédemment, il est nécessaire d'échantillonner un maximum d'individus juvéniles afin de réaliser l'objectif de renforcer les connaissances acquises mais également de collecter des données sur des individus de plus de 8 ans. L'étude des processus de vieillissement se fait par comparaison de classe d'âge mais aussi par exploration individuelle des processus moléculaires au cours de la vie. Il est donc indispensable de partir d'un grand échantillon de base pour avoir des individus prélevés annuellement sur le plus long pas de temps possible.

En ce qui concerne les prélèvements pour l'ANSES, seul un faible nombre d'échantillons sont prélevés (environ 10 % des individus capturés).

V. Résultats et bilan de la précédente période

V.1. Démographie

Les quatre principales colonies suivies affichent des dynamiques contrastées (Fig.1 C) malgré leur proximité géographique (<20km) et pratiquement aucun échange entre colonies n'a été observé. Ainsi, la colonie de Férel reste en croissance constante depuis sa découverte (2005) alors que la colonie de Bégonne qui fut en croissance depuis 2007 et pendant les 2 premières années d'étude (2010-2011) montre une chute importante de ses effectifs (Fig.1 B,C) pour revenir à des niveaux comparables au début des années 2000. La colonie de La Roche-Bernard, intégrée à l'étude en 2011, est une petite colonie qui connaît des variations et montre une légère décroissance depuis 2015 (Fig.1 B). Finalement, la colonie de Noyal-Muzillac montre une grande stabilité depuis sa découverte en 2012. Ces résultats contrastés démontrent l'existence de processus de régulation extrêmement locaux, alors qu'on aurait pu s'attendre à une échelle géographique aussi réduite à des évolutions synergiques.

La dynamique de ces colonies ne diffère pas du reste de la Bretagne, dont les principales colonies montrent aussi des variations contrastées (Fig.1 A) avec par exemple la colonie de Dingé (35) qui est en voie d'extinction, celle de Pléchatel (35) en croissance, ou encore celle de Rénac (35) particulièrement stable.

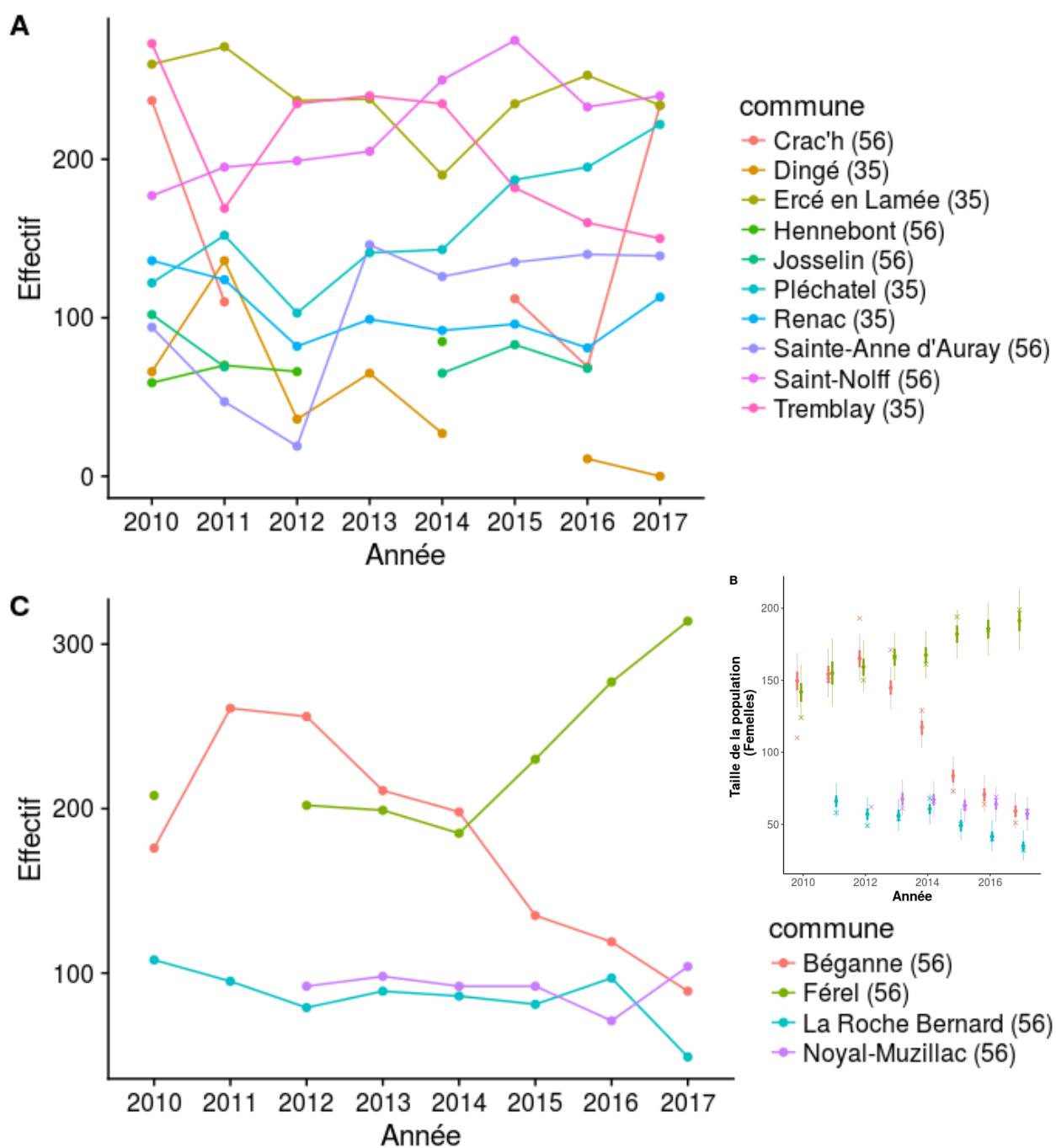


Fig.1. Tendance des populations suivies. A : Comptage annuel (adulte + juvéniles) des colonies bretonnes au mois de juin. B : Estimation du nombre de femelles reproductrices dans les 4 colonies suivies (Modèle de population intégré). C : Comptage annuel (adulte + juvéniles) des 4 principales colonies morbihannaises au mois de juin.

L'apport du marquage est de pouvoir estimer le nombre de femelles reproductrices au sein de la population (Fig.1 B), ce qui n'est pas possible par la simple observation. Le marquage permet en effet l'estimation de la survie des 2 principales classes d'âge, i.e. juvénile (<1an) et adulte, et la fécondité dans ces différentes populations. Ce sont des outils précieux pour comprendre les facteurs qui influencent la dynamique de ces populations.

Par ailleurs, l'analyse saisonnière de la survie a permis d'identifier des périodes clefs dans la dynamique des populations bretonnes. Ainsi, le printemps 2013 a été particulièrement mortifère pour les chiroptères et en particulier les juvéniles. L'enchaînement d'un automne froid, venteux et pluvieux avec un printemps identique est un facteur de mortalité juvénile notamment. Les poids des

juvéniles à l'automne 2012 montrent que la plupart des individus étaient maigres avant l'hibernation, ils ont pu passer l'hiver mais les mauvaises conditions météorologiques du printemps ne leur ont pas permis de compenser leur déficit de poids et donc de survivre.

Cependant les répercussions de ces deux « mauvaises » saisons n'ont pas été les mêmes dans toutes les colonies et elles ont notamment été faibles à Férel. Cette différence montre que le climat n'est pas le seul facteur en cause mais que d'autres facteurs modulent la réponse au climat. Notre hypothèse principale est celle de la ressource alimentaire qui peut différer en fonction des habitats de chasse autour des colonies. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse des habitats de chasse qui montrent une différence importante au niveau du rapport prairie temporaire/culture annuelle entre les colonies de Férel et de Béganne. En effet, ce rapport est en faveur des prairies à Férel alors que c'est l'inverse à Béganne. De plus, le taux de boisement est supérieur à Férel. Si le grand murin chasse principalement les *Carabidae* dans les boisements, il exploite également ceux des prairies après la fauche (Roué & Barataud, 1999), notamment si les surfaces boisées sont insuffisantes. De plus un certain nombre de carabes fréquentent à la fois les boisements et les prairies, une plus grande interface de prairie et de boisement est plus favorable à ces populations de proies que les cultures annuelles qui connaissent de violents remaniements (labours).

Il apparaît donc nécessaire de poursuivre cette étude à la fois afin de mieux connaître le rôle des classes d'âge les plus vieilles dans la dynamique des populations, mais aussi pour mieux comprendre les relations complexes entre l'environnement et les paramètres démographiques.

V.2. Épidémiologie-surveillance active de la rage

Les prélèvements de salive effectués dans le cadre de l'épidémiologie-surveillance active de la rage en collaboration avec l'ANSES n'ont pas permis de mettre en évidence de virus chez les Grands Murins. Cependant, les sérologies effectuées sur les micro-prélèvements sanguins ont mis en évidence la circulation d'anticorps anti-EBLV-1b (European Bat Lysavirus de type 1) et anti-EBLV-2 (European Bat Lysavirus de type 2).

On peut donc supposer que ces individus ont été en contact avec ces virus mais qu'il ne les excrète pas. Il est très difficile de mettre en évidence l'excrétion de virus rabique chez les chiroptères, car la période d'excrétion est ponctuelle, correspond à la virémie, et de courte durée. Aussi il n'est pas possible pour l'instant de connaître le rôle du Grand Murin dans la transmission de la rage : il peut aussi bien être un réservoir et donc potentiellement un vecteur comme un cul de sac épidémiologique et donc se débarrasser du virus sans en être affecté. C'est plutôt la deuxième hypothèse qui prévaut pour l'instant étant donné les très forts titres sérologiques chez certains individus et l'absence de morbidité ou de mortalité constatées dans les colonies concernées à la même période.

Cependant le virus EBLV-1b est bien présent en Bretagne (Fig.2). Par ailleurs, pour la première fois en France des anticorps anti-EBLV2 ont été mis en évidence sans qu'à ce jour le virus ne soit officiellement détecté (Servat, Picard-Meyer, & Cliquet, 2018). Ceci laisse présager la présence de ce virus sur le territoire national. Par ailleurs, ce virus a été mis en évidence dans 6 pays d'Europe (Norvège, Finlande, Allemagne, Royaume-Uni, Pays-Bas et Suisse) essentiellement sur 2 espèces : le murin de Daubenton (*Myotis daubentonii*) et dans une moindre mesure, sur le murin des marais (*Myotis dasycneme*). Il s'agit donc de la première mise en évidence de la circulation de ce virus sur le Grand murin. Deux hypothèses se posent dans ce contexte, soit le grand murin n'est pas affecté par ce virus et sait s'en débarrasser grâce à son système immunitaire d'où la difficulté de le mettre en évidence directement sur cette espèce (Servat et al., 2018), soit il s'agit d'un nouveau virus qui présente une réaction croisée de ces antigènes de capsides avec l'EBLV2.

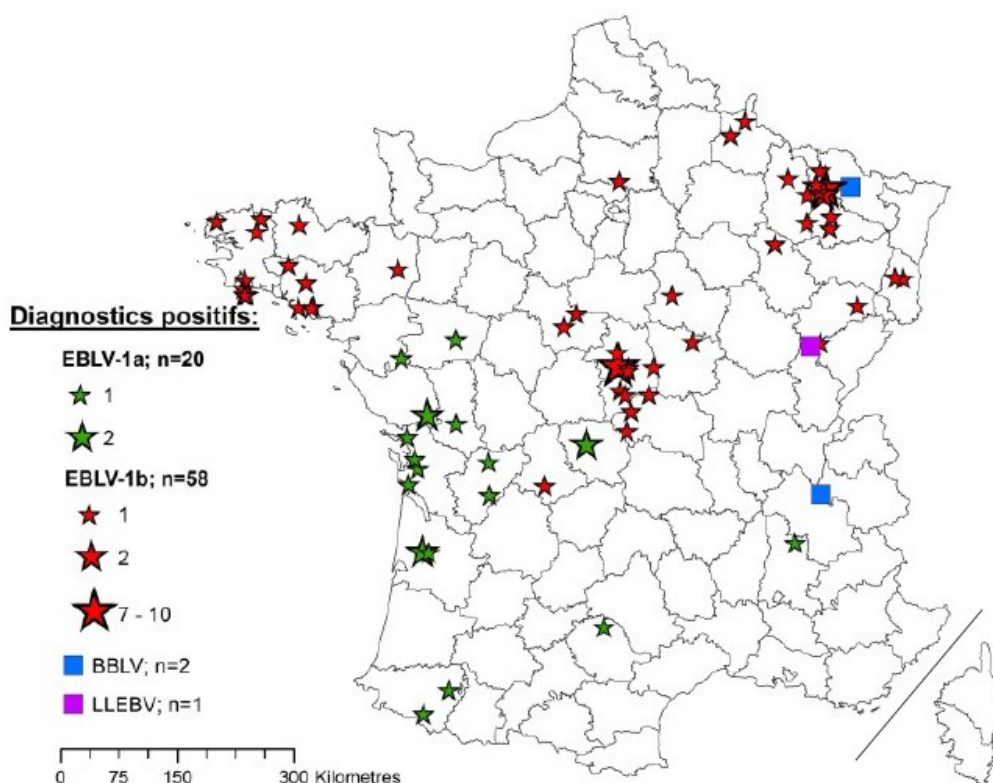


Fig.2. Répartition géographique des cas de rage diagnostiqués sur chauve-souris en France métropolitaine de 1989 à 2017.

Pour toutes ces raisons, l'ANSES est particulièrement intéressée par la poursuite de la surveillance active de la rage (micro-prélèvements de sang notamment) sur les colonies suivies dans le cadre de ce projet. De plus, en raison de l'autorisation de prélèvement sur l'ensemble du territoire nationale obtenue par l'ANSES en 2018 (voir document joint), Frédéric Touzalin sera mandaté pour pratiquer des prélèvements de salive et de sang dans le cadre de la surveillance active de la rage des chiroptères (attribution de niveau 4).

V.3. Génomique

Les chiroptères constituent un modèle idéal pour étudier les mécanismes moléculaires du vieillissement qui restent largement incompris et discutés (Gladyshev, 2016; Kirkwood, 2005; López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013), car elles constituent un contre-exemple des théories du vieillissement. Par exemple, la théorie radicalaire (Harman, 1956) prédit que plus la taille d'un organisme est faible plus son métabolisme est élevé et plus sa durée de vie est courte. Or, avec un poids comparable (25gr), l'espérance de vie du grand murin est 10 fois supérieur à celui d'une souris (Fig.3).

L'étude actuelle menée sur le grand murin en collaboration avec E. Teeling, S. Puechmaille et É. Petit est la première étude longitudinale (>5 ans) qui s'intéresse aux changements moléculaires liés à l'âge chez les chiroptères sauvages. Elle permet d'obtenir un aperçu inégalé des facteurs à la base de la longévité extraordinaire de ces animaux mais aussi des mécanismes de leur survie et de leur santé.

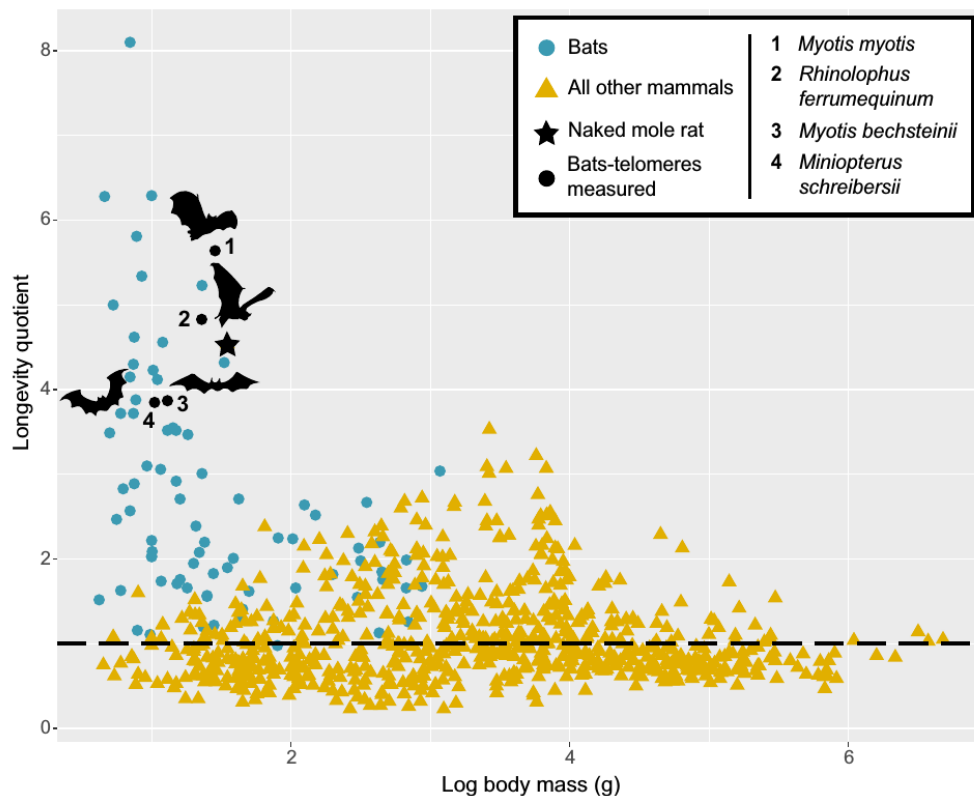


Fig.3. Longévité des mammifères en fonction de leur masse corporelle.

Grace aux données collectées par Bretagne-Vivante depuis le début de l'étude (marquage et suivi des individus) et aux échantillons biologiques (sang et tissus) des résultats prometteurs ont pu être publiés (Foley et al., 2018; Huang, Jebb, & Teeling, 2016; Jebb et al., Pre-print). Au cours de cette étude il a été notamment montré pour la première fois que des micro-prélèvements de sang (<200µl) suffisaient à détecter l'essentiel des transcriptomes d'un individu, c'est-à-dire de l'ADN circulant qui code pour les protéines actives dans l'ensemble de son organisme (Huang, Gallot, et al., 2016). La mise au point de techniques génomiques innovantes a ainsi permis d'obtenir les analyses de transcriptomes pour lesquels il fallait utiliser auparavant des méthodes létales consistant à échantillonner chaque organe. Ces avancées technologiques permettent ainsi d'aller plus loin dans la recherche tout en garantissant l'intégrité des populations sauvages prélevées.

L'analyse des échantillons années après années sur les mêmes individus à l'aide de séquenceurs de dernière génération a permis de découvrir certains processus moléculaires liés à l'âge. Puisque le marquage a commencé en 2010, les échantillons récoltés jusqu'à 2017 correspondent à des individus de 0 (année de naissance) à plus de 8 ans, pour les adultes marqués en 2010. Cette demande a pour objectif de prolonger l'échantillonnage encore 4 ans afin d'obtenir des résultats s'étalant sur environ le 1/3 de l'espérance de vie maximale du grand murin, i.e. de 0 à au moins 12 ans (2010-2021).

Malgré un échantillonnage restreint aux premières années de vie (0-8+), les résultats montrent que le profil de vieillissement du genre *Myotis* est différent des mammifères de même taille. Par l'utilisation de méthodes de génomique comparative et des analyses des transcriptomes (ARN codant pour les protéines), nous avons pu montrer que les mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN, la suppression des cancers, l'autophagie sont sous des pressions de sélection différentes chez le genre *Myotis* comparé à d'autres mammifères et sont sur-exprimés (Huang, Jebb, et al., 2016; Jebb et al., Pre-print). Par ailleurs, les niveaux d'inflammation n'augmentent pas avec l'âge chez les chiroptères, contrairement aux autres mammifères, mais un déclin des fonctions mitochondriales est par contre observé comme chez les autres mammifères. L'étude des transcriptomes sanguins dans les populations sauvages de chiroptères peut donc permettre de mettre

à jour les mécanismes sous-jacents qui expliquent la longévité de ces espèces. De plus, les télomères qui sont les extrémités protectrices des chromosomes des organismes eucaryotes et qui typiquement se raccourcissent à chaque division cellulaire, limitant ainsi l'espérance de vie, n'ont pas montré de raccourcissement avec l'âge chez les *Myotis* (Foley et al., 2018). Cependant, dans d'autres genres de chauve-souris, comme chez les *Rhinolophidae*, ils raccourcissent avec l'âge ce qui montre que plusieurs mécanismes de longévité ont évolué au sein des chiroptères (Foley et al., 2018). Cependant cette étude manque d'échantillons d'individus âgés pour aller plus loin dans ces analyses.

Les objectifs dans l'avenir sont de poursuivre ces explorations afin de comprendre les changements dans l'expression des transcriptomes (Fig.4), les fonctions mitochondriales et le maintien de la longueur des télomères en lien avec l'âge chez le grand murin. A terme, ces études pourraient avoir des implications importantes en médecine humaine pour résoudre les troubles liés au vieillissement des populations dont les coups sociaux sont croissants. Cette étude a été financée jusqu'à la fin 2017 par l'ERC (European Research Council), et le professeur E. Teeling vient d'obtenir une bourse de l'IRC (Irish Research Council) pour le financement sur la période 2018-2021.

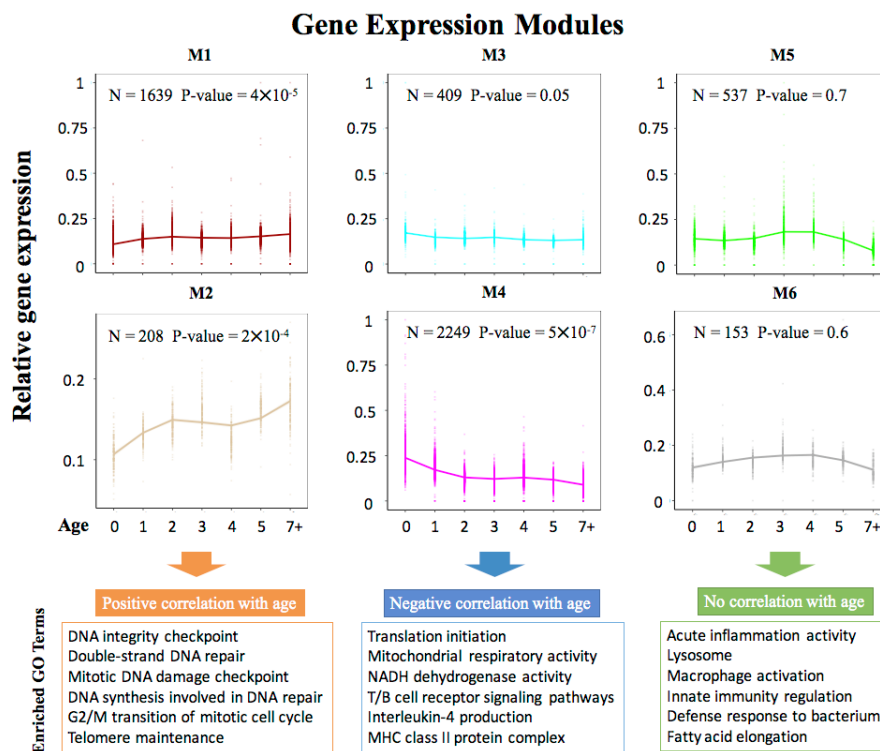


Fig.4. Profile d'expression des gènes en fonction de l'âge (0-7+), données non-publiées. N indique le nombre de gènes dans chacun des 6 modules (M) et P-value indique la significativité de la corrélation avec l'âge. Les modules M1 et M2 sont positivement corrélés avec l'âge (l'expression des gènes augmente avec l'âge) et les modules M3 et M4 sont négativement corrélés avec l'âge (l'expression des gènes diminuent avec l'âge) alors que les modules M5 et M6 ne sont pas corrélés avec l'âge. L'effet de l'expression des gènes testés est indiqué en dessous.

VI. Évaluation de l'impact des méthodes de marquage et de prélèvement sur les populations

Les méthodes de capture, de marquage et de prélèvement qui seront pratiquées seront rigoureusement les mêmes que pendant la période précédente. En terme d'impact, les suivis des colonies de reproduction comme les estimations des tendances démographiques de populations

étudiées montrent que la dynamique des populations est indépendante de nos manipulations (Fig.1, section IV.1). De plus, à l'échelle de la Bretagne, on note des dynamiques très contrastées d'une colonie à l'autre même dans un périmètre restreint, comme dans le cas de nos colonies étudiées.

Si le marquage avait un impact sur la dynamique des populations on aurait pu s'attendre à un effet négatif sur toutes les colonies de la même façon (désertion des gîtes ou baisse générale des effectifs). Hors dans un périmètre de 20km nous pouvons observer une colonie en croissance, une en déclin et deux stables (Fig.1 B et C).

À ce jour nous pouvons donc confirmer que la capture, le marquage et l'ensemble des manipulations effectuées annuellement sur ces populations de chiroptère n'affecte pas leur dynamique comme l'ont montré d'autres études (Rigby et al., 2012). Ce résultat est important à la fois sur un plan éthique et de conservation mais aussi d'un point de vue scientifique, car il montre l'absence de biais dans les estimations des paramètres mesurés ou estimés par rapport aux populations non marquées. Les résultats de cette étude sont donc non biaisés et interprétables comme tel.

Étant démontré (Chap. V.1) que les méthodes employées ne nuisent pas aux animaux et qu'elles n'interfèrent pas sur leur mode de vie nous continuerons à les appliquer avec le même protocole (Annexe I). De plus l'amélioration constante des techniques de génomique nous ont permis de diminuer la taille des échantillons (biopsie de 3mm au lieu de 4mm et prélèvement de sang de 120 à 150µl au lieu de 150 à 200µl). Il est possible dans l'avenir que nous puissions encore diminuer les prélèvements. L'ensemble de ces méthodes sont détaillées en Annexe I.

VI. Plan d'échantillonnage

Le nombre total d'individus capturés varie chaque année et donc le nombre d'individus marqués également (Tab.1). Le nombre d'individus capturés ne dépasse pas les 600 et a varié entre environ 350 et 600 selon les années générant entre 200 et 300 individus marqués (Tab.1). La majorité des individus marqués sont des juvéniles, la plupart des adultes ayant été transpondés les années précédentes. Ces variations sont liées à la fois à la productivité des colonies, au nombre d'individus présents dans la colonie le soir de la capture, et à notre capacité de les capturer.

	2013	2014	2015	2016	2017
Adultes	111	32	71	70	12
Juvéniles	183	186	252	220	183
Total (total capturé)	294 (491)	218 (452)	323 (585)	290 (514)	195 (346)

Tab.1. Effectif marqué chaque année en fonction de l'âge des individus capturés. Entre parenthèse le nombre total d'individus capturés.

L'essentiel des adultes (individus de plus d'un an) étant déjà marqués, les nouveaux adultes marqués sont essentiellement des juvéniles qui ont échappé l'année précédente à la capture, soit des individus ayant perdu leur transpondeur (perte possible jusqu'à plus de 2 ans après la pose), soit des individus qui se reproduisent peu et qui fréquentent ponctuellement les colonies (donc sont rarement capturés) ou bien encore des immigrants.

Les activités de marquage et de prélèvements des colonies ont lieu dans une fourchette maximale, selon les années, allant du 15 juin au 15 août, généralement dans la première quinzaine de juillet. Le recul acquis durant la première phase d'étude permet de justifier la nécessité de marquer le maximum d'individus juvéniles pour répondre aux objectifs. En effet cette demande de renouvellement a pour objectifs d'obtenir des prélèvements sur les cohortes de 8 ans et plus dans les années à venir et notamment d'échantillonner des individus de 11 ans en 2021. Or, la distribution des classes d'âge dans les différentes colonies montre que le nombre d'individus vivant au-delà de 7 ans est faible et les probabilités de les capturer est très faible (Annexe II). Plus l'échantillonnage de départ est grand et plus les probabilités de pouvoir recapturer des individus âgés sera élevée. Parmi

les individus adultes capturés en 2017, 5 avaient au moins 7 ans (capturés adultes en 2010), aucun n'avait 7 ans (marqué juvénile en 2010), 11 avaient plus de 6 ans (capturés adultes en 2011) et 5 avaient 6 ans (marqués juvéniles en 2011), etc. Ainsi la probabilité de capturer un individu 7 ans après sa première capture est inférieure à 0.05.

En raison des variations inter-annuelles importantes du nombre de juvéniles nous maintenons une demande pour un nombre maximum de 450 individus par an. Ce nombre inclus les juvéniles dont le nombre est variable. Il inclut également les « nouveaux » adultes, car ils sont en partie des individus qui ont perdu leur transpondeur et dont on peut retracer, grâce à leur génotype, l'histoire de marquage depuis la première implantation.

Une autre session de capture est également réalisée dans des sites de regroupement automnaux (swarming). La période de ces captures s'étale entre le 15 août et le 15 octobre. Ces captures ont pour objectif d'obtenir la condition corporelle des individus à l'automne, c'est à dire durant la période de prise de poids pré-hivernale. Des biopsies sont également effectuées sur les individus mâles non marqués afin de comprendre leur rôle dans les flux génétiques.

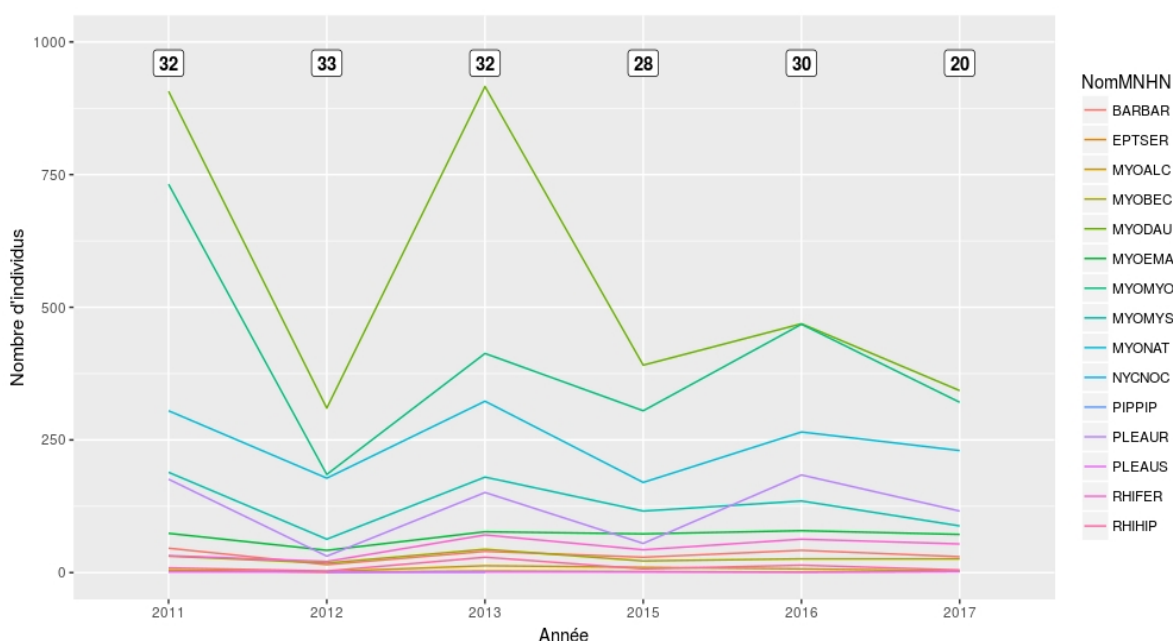


Fig. 5 Effectifs par espèce d'individus capturés chaque année dans le site de Pluherlin. La vignette au-dessus des lignes indique le nombre de nuits de capture.

Dans le Morbihan, le site de Pluherlin a fait l'objet de captures intensives pendant 6 ans. En moyenne une trentaine de nuits par an ont été effectuées (Fig. 5 et Annexe II). Ce site à une configuration idéale. Les variations des effectifs capturés, toute espèce confondues, sont inter-annuelles mais ne montrent pas de tendance au déclin (Fig. 5). Ainsi l'année 2011 fut exceptionnelle pour le nombre de Grand Murin et de Murin de Daubenton capturés et l'année 2013 pour le nombre de Daubenton également. De plus une antenne enregistrant le passage des grands murins a permis de montrer que le taux de capture est probablement inférieur à 50 %. et que les individus capturés continuaient à fréquenter le site mais évitaient les filets.

Le protocole de capture jusqu'ici était d'une trentaine de nuits (Fig.5) dans un intervalle de deux mois. La série de données recueillies permet de montrer qu'il faut capturer au minimum une trentaine de juvéniles marqués pour avoir une distribution correcte du poids de ces derniers, ce qui peut permettre de réduire les nuits de capture à une vingtaine certaines années. Il est également possible d'échantillonner dans un autre site aux configurations proches, les mines de fer de Glénac (Annexe II). Ainsi en fonction du nombre de juvéniles capturé il sera possible de limiter les nuits de capture à Pluherlin et si nécessaire de compléter en pratiquant des captures à Glénac.

VII. Mesures d'atténuation

À la fin des prélèvements, chaque animal est réhydraté et nourrit à l'aide de ténébrions (*Tenebrio molitor*) avant d'être relâché. Il s'agit d'assurer un apport minimal en eau et en calorie pour compenser les pertes liées à la fois au stress de la manipulation et au temps de chasse perdu entre le moment de la sortie de gîte et du relâché. Tous les animaux sont relâchés sur le site de capture.

VIII. Période des opérations

Le marquage et les prélèvements de sang, de salive et de patagium ont lieu une seule fois par an dans chacune des colonies étudiées à des dates variables en fonction du climat printanier mais qui sont comprises entre le 15 juin et le 15 août (généralement dans les 15 premiers jours de juillet). Cette opération étant lourde, elle nécessite la mobilisation de nombreux bénévoles ainsi que des étudiants travaillant sur le sujet pour un bon fonctionnement mais aussi dans un souci de formation à la capture et à la manipulation en lien avec le Muséum d'histoire naturelle de Paris. La liste de tous les participants et de leur fonction dans l'organisation sera fournie chaque année à la DDTM avant le début des premières captures (début juin).

Les captures en période de swarming ont lieu entre le 15 août et le 15 octobre. Elles seront effectuées à Pluherlin pour un minimum de 20 soirées avec prélèvement de patagium uniquement sur les mâles de Grand Murin, non marqués. Un maximum de 10 nuits de capture pourront être effectuées pour compléter l'échantillonnage biométrique sur les juvéniles marqués dans les mines de Glénac. Ses captures sont effectuées et encadrées par des personnes possédant une autorisation de capture.

Un suivi passif (contrôle des individus léthargiques à l'aide de lecteurs sans dérangement) dans les sites d'hibernation est effectué annuellement, chaque première quinzaine des mois de décembre, janvier et février.

Les captures en zone de chasse peuvent se faire de la mi-mars à la mi-octobre. Cependant aucune capture d'individus dans le cadre spécifique de ce programme n'est envisagée, sur les sites potentiels de chasse, pour les années 2018 à 2021.

La présente demande de dérogation pour la poursuite de l'étude sur le Grand Murin correspond à la poursuite du suivi, sur une durée allant du 15/06/18 au 15/10/2021.

IX. Lieu des opérations

Les colonies concernées par la présente demande sont situées dans le sud du Morbihan (Fig.1) :

- École primaire Notre Dame à Férel (56130)
- Église de La Roche Bernard (56130)
- Église de Noyal-Muzillac (56190)
- Église de Béganne (56350)
- 1 place de l'église à Limerzel (56220), jusqu'à présent, 1 place de l'église, bâtiment privé sous réserve du maintien de la colonie suite à des travaux importants dans les combles.

Les captures automnales (swarming) :

- Grande cavité des ardoisières de Pluherlin (56)
- Cavités des mines de Glénac (56)

Les sites suivis systématiquement sont répertoriés dans l'annexe II (Tab.4).

Les analyses génomiques des prélèvements effectués ont lieu au laboratoire de biologie moléculaire de l'université de Dublin (UCD). Les analyses sérologies et les PCR ont lieu au laboratoire de la rage de la faune sauvage de l'ANSES à NANCY.

X. Mesures d'accompagnement

Ces opérations, pour lesquelles cette demande de dérogation est faite, ont essentiellement pour but d'améliorer les connaissances pour la conservation des chiroptères et de mieux comprendre les particularités génomiques de la longévité de ces mammifères. Elles s'accompagnent également de formation des chiroptérologues, de mesures de sensibilisation des acteurs locaux, du grand public, des scolaires.

XI. Compte rendu de l'opération

Un compte-rendu d'activité annuel sera transmis à la DDTM ainsi que la réglementation le prévoit mais aussi à la DREAL et à l'ONCFS pour information. Il sera assorti de la réunion annuelle d'un comité de pilotage et d'un comité scientifique à la fin de la période d'étude.

Un bilan des 5 années précédent est également joint à ce dossier.

Bibliographie

- Battersby, J. (2010). *Guidlines for surveillance and monitoring of european bats* (EUROBATS publications Series, Vol. 5). Bonn, Germany: UNEP/EUROBATS secretariat.
- Bonter, D. N., & Bridge, E. S. (2011). Applications of radio frequency identification (RFID) in ornithological research: a review. *Journal of Field Ornithology*, 82(1), 1–10. doi:10.1111/j.1557-9263.2010.00302.x
- Britzke, E. R., Gumbert, M. W., & Hohmann, M. G. (2014). Behavioral Response of Bats to Passive Integrated Transponder Tag Reader Arrays Placed at Cave Entrances. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 5(1), 146–150. doi:10.3996/082012-JFWM-065
- Ficke, A. D., Myrick, C. A., & Kondratieff, M. C. (2012). The effects of PIT tagging on the swimming performance and survival of three nonsalmonid freshwater fishes. *Ecological Engineering*, 48, 86–91. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.07.011
- Foley, N. M., Hughes, G. M., Huang, Z., Clarke, M., Jebb, D., Whelan, C. V., ... Teeling, E. C. (2018). Growing old, yet staying young: The role of telomeres in bats' exceptional longevity. *Science Advances*, 4(2). doi:10.1126/sciadv.aao0926
- Freeland, W. J., & Fry, K. (1995). Suitability of passive integrated transponder tags for marking live animals for trade. *Wildlife Research*, 22(6), 767–773. doi:10.1071/WR9950767
- Gaisler, J., Hanák, V., Hanzal, V., & Jarský, V. (2003). Results of bat banding in the Czech and Slovak Republics, 1948-2000. *Vespertilio*, 7, 3–61.
- Gladyshev, V. N. (2016). Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes. *Aging Cell*, 15(4), 594–602. doi:10.1111/accel.12480
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
- Huang, Z., Gallot, A., Lao, N. T., Puechmaille, S. J., Foley, N. M., Jebb, D., ... Teeling, E. C. (2016). A nonlethal sampling method to obtain, generate and assemble whole blood transcriptomes from small, wild mammals. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 150–162. doi:10.1111/1755-0998.12447

- Huang, Z., Jebb, D., & Teeling, E. C. (2016). Blood miRNomes and transcriptomes reveal novel longevity mechanisms in the long-lived bat, *Myotis myotis*. *Bmc Genomics*, 17, 906. doi:10.1186/s12864-016-3227-8
- Jebb, D., Foley, N. M., Whelan, C. V., Touzalin, F., Puechmaille, S. J., & Teeling, E. C. (Pre-print). Population level mitogenomics of the long-lived Greater Mouse-eared bat, *Myotis myotis*, reveals dynamic heteroplasmy and challenges the Free Radical Theory of Ageing. *BIORXIV/2017/224592*.
- Kerbiriou, C., Julien, J. F., Monsarrat, S., Lustrat, P., Haquart, A., & Robert, A. (2015). Information on population trends and biological constraints from bat counts in roost cavities: a 22-year case study of a pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus* Schreber) hibernaculum. *Wildlife Research*, 42(1), 35–43. doi:10.1071/WR14197
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*, 120(4), 437–447. doi:10.1016/j.cell.2005.01.027
- López Baucells, A., Puig Mont-serrat, A. X., Mas, M., Freixas, L., Cam-Prodon, J., Guizé Arrizabal, G. T., & Flaquer, D. (2013). *Short-term effect of bands and transponders on body condition and physiological stress on three European bat species*. Presented at the 16 th International Bat Research conference.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- Paterson, W., Pomeroy, P. P., Sparling, C. E., Moss, S., Thompson, D., Currie, J. I., & McCafferty, D. J. (2011). Assessment of flipper tag site healing in gray seal pups using thermography. *Marine Mammal Science*, 27(2), 295–305. doi:10.1111/j.1748-7692.2010.00400.x
- Ratnayake, C. P., Morosinotto, C., Ruuskanen, S., Villers, A., & Thomson, R. L. (2014). Passive Integrated Transponders (PIT) on a small migratory passerine bird: absence of deleterious short and long-term effects. *Ornis Fennica*, 91(4), 244–255.
- Rigby, E. L., Aegerter, J., Brash, M., & Altringham, J. D. (2012). Impact of PIT tagging on recapture rates, body condition and reproductive success of wild Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *Veterinary Record*, 170(4). doi:10.1136/vr.100075

- Roué, S. Y., & Barataud, M. (1999). Habitat et activité de chasse des chiroptères menacés en Europe: synthèse des connaissances actuelles en vu d'une gestion conservatrice. *Le Rhinolophe*, Vol. Spéc. 2, 69–98.
- Servat, A., Picard-Meyer, E., & Cliquet, F. (2018). Bilan de la surveillance des infections à Lyssavirus chez les chiroptères en France métropolitaine: 4 cas détectés en 2017.
- Walker, K. A., Trites, A. W., Haulena, M., & Weary, D. M. (2012). A review of the effects of different marking and tagging techniques on marine mammals. *Wildlife Research*, 39(1), 15–30.