



École Pratique
des Hautes Études



ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la vie et de la terre

Rapport :

**Mémoire de Master 2 : Biodiversité et Gestion de l'Environnement
Parcours : Recherche**

**Diversité et structure génétiques de deux Mégachiroptères
endémiques et sympatriques des Comores
(*Pteropus livingstonii* et *Pteropus seychellensis comorensis*)**

Ali CHEHA

Année Universitaire 2015-2016

**Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE)
UMR 5175 Campus CNRS-1919 Route du Mende
34293 Montpellier**

Sous la Direction de : Aurelien BESNARD

**Maitre de conférences
Aurelien.BESNARD@cefe.cnrs.fr**

Co-encadrants: Claudine MONTGELARD & Mohamed-Thani IBOUROI



CENTRE D'ÉCOLOGIE
FONCTIONNELLE
& ÉVOLUTIVE



ARTS, LETTRES, LANGUES,
SCIENCES HUMAINES ET
SOCIALES
UNIVERSITÉ
PAUL-VALÉRY
MONTPELLIER 3



RESUME

La Roussette de Livingstone (*Pteropus livingstonii*) et la roussette commune des Comores (*Pteropus seychellensis comorensis*) sont deux taxons de mégachiroptères endémiques des Comores. *P.livingstonii* fait partie des espèces de faune les plus menacées par la perte des habitats aux Comores avec une distribution géographique très restreinte à deux des trois îles (Anjouan et Mohéli), *P.s.comorensis* présente une large distribution géographique dans les trois îles mais aussi aux îles de Mayotte et de Mafia en Tanzanie. Ces deux espèces se différencient aussi au niveau du régime alimentaire et de la sélection des dortoirs. Aucun de leurs habitats n'est protégé et font face à un taux de perte d'habitat annuel de 5,8%, un des plus élevé au monde. Le manque d'études sur ces taxons fait que leur conservation n'est pas garantie. Dans le but de contribuer à la mise en place d'un suivi et pour permettre le développement d'un plan de gestion et la mise en place de mesures de conservation efficaces pour ces espèces, nous avons utilisé une approche de phylogéographie et de génétique des populations combinant des marqueurs mitochondriaux avec des locus microsatellites pour estimer la diversité et la structuration génétique des populations des deux espèces entre les îles. Nos résultats suggèrent qu'il y a une structuration génétique entre îles pour *P. livingstonii* (N=59) contrairement à *P. s. comorensis* (N=53) dont aucune forme de différenciation n'est apparente et suggérant la présence de flux de gène entre les populations des trois îles pour cette espèce. La diversité génétique évaluée par la diversité haplotypique et nucléotidique montre des valeurs relativement faible pour les deux espèces ($h=8$; $D_h=0,79$; $\pi=0,0073$ pour *P.livingstonii* et $h=3$; $D_h=0,50$; $\pi=0,0014$ pour *P.s.comorensis*). Les résultats issus des données microsatellites suggèrent qu'il a une richesse polymorphique pour tous les locus même si la taux de succès de l'amplification est faible. D'une manière plus générale, nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la fragmentation et la perte des habitats sont les principaux facteurs qui impactent la diversité et la distribution des populations du *P.livingstonii* par une réduction de leurs sites dortoirs et par la restriction de l'accès aux ressources alimentaires. D'autres études plus approfondies et complètes sur les données microsatellites sont nécessaires pour confirmer nos résultats afin d'établir une meilleure stratégie et des mesures de conservation efficaces pour cette espèce à fortes enjeux de conservation.

Mots clés : Pteropus, Comores, cytochrome b, microsatellite, structuration génétique

ABSTRACT

Livingstone's flying fox (*Pteropus livingstonii*) and the Comorian's fruit bat (*P.seychellensis comorensis*) are two endemic and sympatric species in the Comoro islands. Livingstone's flying fox is among the mostly threatened fauna by habitat loss and fragmentation with a restricted distribution in two of the three islands of Comoros (Anjouan and Mohéli). The Comorian fruit bat has a large distribution in the three islands but also in Mayotte and Mafia islands.

These two species differ also by their diet and roost selection. None of their habitats is protected and face an annual deforestation rate of 5.8%, one of the highest in the world. In these islands, little information is known about genetic diversity, population differentiation. This lack of basic knowledge precludes the development of evidence-based conservation strategies. In order to support and contribute for assessing future monitoring and development of conservation and management measures, we assessed the population structure and genetic diversity for both the two species using both mitochondrial and microsatellite markers. Our results revealed the presence of contrasting geographic structure patterns for the Livingstone's flying fox (N=59) between island while no evidence of genetic differentiation were detected suggesting that there are gene flow for the Comorian fruit bats (N=53) between islands. Genetic diversity assessed by nucleotide and haplotype diversity was relatively low for both the two species ($h=8$; $D_h=0,79$; $\pi=0,0073$ for the Livingstone's flying fox and $h=3$; $D_h=0,50$; $\pi=0,0014$ for the Comorian's fruit bat). The microsatellite data highlight a high polymorphic richness between loci but the amplification success was low for the two species. Generally, our main results support the idea that habitat loss and fragmentation are the important factors impacting the Livingstone's flying fox genetic diversity and distribution by limiting their feeding niche, reducing their roosting site and suggest the need of more comprehensive and complete studies on microsatellite data to inform relevant and efficient conservation actions.

Key words: Pteropus, Comoros islands, cytochrom b, microsatellite, genetic structure

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
II. Matériels et méthodes	8
1. Les deux espèces étudiées	8
2. Zone d'étude et sites d'échantillonnage	9
3. Collecte des échantillons	10
4. Analyses en laboratoire	10
a) Extraction.....	10
b) Amplification et séquençage d'un fragment d'ADN mitochondrial	11
5. Analyses des données de séquences mitochondriales	11
a) Caractérisation de la structure génétique	11
b) Analyse du polymorphisme mitochondrial.....	12
6. Mise au point et génotypage de microsatellites	13
7. Analyse des données microsatellites	14
III. RESULTATS	15
1. Echantillonnage et taux de succès sur l'amplification	15
2. Reconstruction phylogénétique et identification des individus.....	15
3. Diversité génétiques des haplotypes	17
4. Les microsatellites.....	18
IV. DISCUSSION	20
1. Diversité génétique des populations.....	20
2. Structuration génétique entre les différentes populations	21
3. Facteurs influençant la structuration génétique des populations de <i>Pteropus</i>	22
4. Caractérisation des loci microsatellites polymorphes	22
5. Implications pour la conservation	23
6. Limites de l'étude et perspectives	24
a) L'échantillonnage	24
b) Succès de l'amplification.....	24
c) Les microsatellites	25
V. CONCLUSION	25
Références bibliographiques	26

I. INTRODUCTION

Crise de la biodiversité et menaces sur les espèces en milieu insulaire

Le taux d'extinction actuel des espèces excède largement celui constaté au cours l'évolution de la biodiversité à l'échelle de la planète (Smith *et al.* 1993). De nombreux scientifiques parlent de ce fait aujourd'hui d'une « sixième extinction » (Billé *et al.*, 2014). Ce constat n'est pas récent puisqu'il y a plus de 20 ans, Diamond *et al.* (1989) soutenaient déjà que l'extinction massive d'espèces n'était plus une hypothèse mais un évènement en cours et qu'il était considérable. Cependant la prise de conscience de la société et des politiques est plus récente. Contrairement aux crises passées, cette crise de la biodiversité en cours est induite par des causes anthropiques et non naturelles (Billé *et al.*, 2014). Parmi les causes de cette érosion de la biodiversité, la destruction des habitats, par déforestation et conversion des forêts en zones agricole ou urbaine, est considéré comme étant de loin celle la plus importante quantitativement (Billé *et al.*, 2014). Certains travaux ont par exemple montré que l'extinction de la quasi-totalité des petits mammifères indigène en Thaïlande était le résultat de la fragmentation de la forêt (Macdougall and Turkington, 2005). (Pimm and Raven, 2000) estiment que les espèces envahissantes, la surexploitation des populations, la pollution et le changement climatique sont aussi des facteurs majeurs responsables de la crise d'extinction des espèces.

Cependant, la crise de la biodiversité n'est nulle part aussi apparente que sur les îles. En effet, 61% des espèces listées par l'IUCN comme s'étant éteintes dans un passé récent (XVIème siècle) étaient des espèces confinées dans les îles (Tershy *et al.*, 2015). Ce constat vaut pour de nombreux groupes puisque c'est le cas de 67% des mammifères éteints, 94% des oiseaux et 89% des reptiles (Ricketts *et al.*, 2005). En outre, la diversité des espèces est menacée de façon disproportionnée dans les îles par rapport à leur superficie. En effet, avec seulement 5.3% du territoire mondial, les îles hébergent 15-20% des espèces terrestres de plantes et de vertébrés et 45% des espèces classées par l'IUCN comme en danger critique d'extinction (Keitt *et al.*, 2011). Plusieurs facteurs intrinsèques aux espèces insulaires sont connus pour contribuer à leur vulnérabilité. La petite taille de leurs populations et de leurs aires vitales, la faible diversité génétique et le manque de comportements de défense contre les prédateurs (souvent absents des îles) sont autant de caractéristiques qui accentuent les risques d'extinction des espèces insulaires (Billé *et al.*, 2014). Ainsi, en milieu insulaire, les espèces envahissantes, notamment des prédateurs ou des espèces compétitrices des espèces

natives, sont citées comme la première cause d'extinction des espèces et la seconde cause de régression pour les espèces actuellement en danger critique d'extinction après la perte des habitats (Tershy *et al.*, 2015). Ce constat de la menace sur les espèces insulaires est particulièrement inquiétant puisque ces îles hébergent un niveau élevé d'espèces endémiques, ce qui justifie une attention particulière en termes d'action pour la conservation de ces espèces (Kier *et al.*, 2011).

L'archipel des Comores : biodiversité, endémicité et menaces

L'archipel des Comores est une de ces zones insulaires caractérisées par une très grande richesse de sa biodiversité et un fort taux d'endémisme (Sewall *et al.*, 2007). Cette richesse est favorisée par sa topographie, ses paysages, son climat et ses habitats naturels très diversifiés (MAPEEIA, 2009). Les principaux écosystèmes (littoral, savane arbustive, humide lacustre et forestier) hébergent ainsi une faune et une flore indigène riche. Les forêts humides comoriennes hébergent une importante richesse écologique mais aussi économique (comme par exemple *Weinmania comorensis*, *Tambourissa spp*, *Ocotea comorensis*, *Nuxia pseudodentata*, *Ravanea moorei*) qui procurent des services écosystémiques à la population. Le taux d'endémicité de la flore est ainsi par exemple estimée à 33% pour un total de 2000 espèces (Adjanohoun *et al.*, 1982).

En ce qui concerne la faune, bien que pauvre en grands mammifères, cette faune des Comores est très diversifiée et tous les grands groupes taxonomiques y sont représentés. Au sein de cette faune, décrite comme un mélange de taxons provenant d'Afrique et de Madagascar (Weyeneth *et al.*, 2008), on retrouve 42 espèces de reptiles dont 10 sont endémiques (DGEF, 2012). L'avifaune totalise 103 espèces dont 35 sont des espèces forestières endémiques (comme par exemple *Otus pauliani*, *Columba polleni*, *Humblotia flavirostris* ou *Zosterops mouroniensis*, Louette *et al.*, 2004b). Des espèces endémiques et/ou charismatiques sont aussi recensées au sein d'autres ordres comme par exemple *Latimeria chalumnae* (le cœlacanthe), *Chelonia mydas* (la tortue verte), *Eulemur mongoz* (le lémurien mongos), *Roussettus obliviosus* (la petite roussette des Comores) et *Pteropus livingstonii* (la Roussette de Livingstone). La richesse de la biodiversité des Comores et son endémicité font que les Comores font partis des 20 îles ou archipels considérés à l'échelle mondiale comme des zones d'endémisme particulièrement remarquables (Caldecott *et al.*, 1996).

Cependant, la pauvreté de la population humaine des Comores et l'activité humaine ont profondément modifiés la végétation primitive des îles au cours des dernières décennies

(Louette *et al.*, 2004b). L'exploitation forestière a ainsi provoqué un déclin progressif de la surface des forêts et donc de la biodiversité forestière. Par exemple, entre 1973 et 1983, cette exploitation forestière est à l'origine de la diminution de l'ordre de 36% de la surface de forêts sur la Grande-Comore, de 73% sur Anjouan et de 53% à Mohéli au profit des cultures vivrières (DGEF, 2000). En plus de la conversion des forêts pour l'agriculture, plusieurs espèces floristiques sont exploitées pour différents usages tels que l'ébénisterie, la construction des cases traditionnelles, la pratique de la médecine traditionnelle, la confection des produits ornementales et l'utilisation comme source d'énergie (Adjanohoun *et al.*, 1982). Cette exploitation tend à provoquer des éboulements importants des sols, particulièrement sur les fortes pentes d'Anjouan (Labat et Fontaine, 2011). Sewall *et al.*, (2007) rapportent ainsi que les Comores connaissent aujourd'hui un des taux de déforestation annuel les plus élevés dans le monde ; soit 5.8% de sa surface totale.

En plus de l'exploitation forestière, le braconnage des tortues, la chasse des oiseaux sont des pratiques courantes qui pèsent sur la biodiversité (DGEF, 2012). Il en est de même du fait de la prolifération des espèces exotiques envahissantes qui a atteint un niveau sans précédent aux Comores (DGEF, 2000). En effet, après l'abandon des cultures dans les agro-forêts, des forêts ou fourrés secondaires denses dominés par des espèces allochtones (exemple *Psidium cattleianum*, *Clidemia hirta*, *Tristema virrusanum*) s'installent limitant ainsi la régénération de la forêt naturelle (Labat et Fontaine, 2011).

Le niveau d'endémicité qu'accueille l'archipel, les menaces sur ses habitats et ses espèces font que les Comores font partie du hot-spot de l'Océan Indien et est aussi une des cinq zones avec le plus fort enjeu de conservation dans le monde (Myers *et al.*, 2000). Malgré cela, les Comores présentent une insuffisance marquée d'outils de gestion conservatoire appropriés pour la protection de sa biodiversité (DGEF, 2012).

Les *Pteropus* des Comores : entre services écosystémiques et menaces

Parmi la biodiversité des Comores, les chauves-souris occupent une place importante au sein des mammifères. Avec une dizaine d'espèces, dont trois mégachiroptères et sept microchiroptères (Goodman *et al.*, 2010a), les chauves-souris des Comores présentent un intérêt biologique important puisque ce sont les seuls mammifères à avoir colonisé les Comores de façon naturelle (Louette *et al.*, 2004a). Ces espèces fournissent par ailleurs des biens et des services vitaux au bien-être humain. En effet, les espèces comme *Pteropus livingstonii* sont des attraits écotouristiques majeurs et constituent une source d'entrée de

devises pour les communautés locales. D'autre part, *Pteropus livingstonii* et *P.s.comorensis* sont des espèces essentielles pour la pollinisation des fleurs et la dispersion des graines (Trehwella *et al.*, 2001). Elles participent donc fortement à l'entretien et à la régénération des forêts tropicales comoriennes qui hébergent comme nous l'avons vu, une grande diversité d'espèces végétales et animales endémiques et menacées.

Les chauves-souris frugivore du genre *Pteropus* sont extrêmement mobiles et chaque espèce fait des migrations saisonnières de plusieurs centaines de kilomètres (Fox 2006; Tidemann and Nelson, 2004). Ainsi, *Pteropus scapulatus*, une espèce d'Australie possède un domaine vital d'environ 3.5 millions de km² (Sinclair *et al.*, 1996) et *P. poliocephalus*, une autre espèce d'Australie, peut aller se nourrir jusqu'à 50 km de son dortoir (Roberts *et al.*, 2012; Tidemann and Nelson, 2004). Par ces mouvements et migrations, les chauves-souris du genre *Pteropus* sont des espèces clés dans leurs écosystèmes (Almeida *et al.*, 2014) car elles jouent un rôle crucial dans le maintien des habitats forestiers par la dispersion des graines et la pollinisation (Shilton *et al.*, 1999). Cet aspect est primordial pour la dispersion des plantes entre les habitats isolés et les *Pteropus* contribuent ainsi fortement à la configuration spatiale des parcelles d'habitat dans le paysage et au maintien des écosystèmes forestiers. Shilton *et al.*, (1999) ont ainsi montré qu'au moins 300 espèces de plantes sont propagées par les chauves-souris d'Afrique de la famille des Pteropodidae.

Parmi les chauves-souris des Comores, nous nous sommes intéressés à deux espèces en particulier *Pteropus livingstonii* et *Pteropus seychelensis comorensis*. Nous avons choisis ces deux espèces parce qu'elles subissent la dégradation de la forêt et subissent donc de plein fouet les conséquences de la fragmentation des habitats naturels (DGEF, 2012). Outre la fragmentation de l'habitat, la chasse de l'espèce *P. s. comorensis* est fréquente car elle est considérée par les cultivateurs comme une espèce « nuisible » (Trehwella *et al.*, 2001). De plus, Cheke et Dahl (1981) rapportent que l'électrocution est un facteur de mortalité important pour cette espèce. Ce constat provient de l'observation d'un grand nombre de cadavres suspendus aux fils électriques. Les cyclones et les glissements de terrain constituent aussi des menaces ponctuelles mais très destructrices. En effets, durant les cyclones, les fruits sont détruits supprimant ainsi toute source de nourriture et les vents violents arrachent les individus dans leurs perchoirs et les emportent au loin (Louette *et al.*, 2004a).

P. livingstonii et *P. s. comorensis* forment un modèle particulièrement intéressant pour étudier les réponses différentielles en termes génétiques et comportementales des espèces aux modifications anthropiques des habitats. En effet, bien que ces deux espèces soient

sympatriques dans quelques sites à Anjouan et Mohéli et dépendent largement des habitats forestiers pour leur cycle de vie quotidien (Louette *et al.*, 2004a), elles ont une distribution différentes et des préférences en termes d'habitat, de dortoirs et de ressources alimentaires différentes. *P. livingstonii*, présente seulement dans les îles de Mohéli et Anjouan, occupe préférentiellement des dortoirs dans la forêt naturelle humide (Cheke and Dahl, 1981; Goodman *et al.*, 2010a; Mickleburgh *et al.* 1992) . Son régime alimentaire inclue des pollens, des fruits et des feuilles d'une gamme restreinte de plantes endémiques et menacées (Trehwella *et al.*, 2001). La Roussette Commun des Comores est, quant à elle, présente dans des habitats variés tels que milieux urbains, zones agricoles ou parcelles de forêts des quatre îles Comores (Goodman *et al.*, 2010a). son régime alimentaire inclut, en plus de ce qui est aussi consommé par la Roussette de Livingstone, des plantes exotiques telles que les fruits tropicaux (Trehwella *et al.*, 2001). Du fait de leurs écologies sensiblement différentes, et malgré une proximité génétique forte, nous prédisons des réponses différentes des populations aux perturbations anthropiques. Notamment nous prédisons que l'espèce la plus spécialisée (*P. livingstonii*) devrait présenter un statut de population plus défavorable que pour *P. s. comorensis* qui semble plus généraliste et surtout plus enclin à utiliser des habitats anthropisés.

Cependant, les recherches sur les mégachiroptères des Comores ont essentiellement porté sur la morphologie, la structure des dortoirs, le comportement de vol, le rythme d'activité (Trehwella *et al.*, 2001) et la période de la reproduction (Trehwella *et al.*, 1995). A part des études de phylogéographie sur l'ensemble du genre *Pteropus* dans l'océan indien (Cheke and Dahl 1981; Almeida *et al.*, 2014; O'Brien 2005; Chan *et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2009), aucune étude n'a abordé les aspects de migration et dispersion ni même les questions de génétique des populations telles que effets fondateurs, la consanguinité, les variations de flux génétiques entre les populations au sein et entre les îles. Toutefois, des études réalisées sur d'autres espèces de chauves-souris des Comores (*Roussettus obliviosus* et *Miniopterus spp*) utilisant des marqueurs mitochondriaux et nucléaires ont mis en évidence des flux génétiques conséquents entre les îles (Goodman *et al.*, 2010a; Weyeneth *et al.*, 2008). Ces études ont démontré le rôle du vent et de la capacité de vol dans la dispersion des espèces et ont conclu que la distance qui sépare les îles Comores (40-80 km) ne devrait pas constituer de barrière géographique forte aux échanges d'individus entre sous-populations. Trehwella *et al.* (2001) estiment qu'il reste encore beaucoup à apprendre sur les *Pteropus* des Comores, et notamment comment la perte continue de l'habitat peut affecter différemment les deux espèces étudiées ici.

Approche génétique et conservation

Les méthodes génétiques sont de plus en plus utilisées pour la définition de stratégies de conservation des espèces. En effet, ces approches ont montré un grand intérêt dans la résolution des relations phylogénétiques en fournissant des informations sur la variation intra-spécifique (Burland and Wilmer, 2001) particulièrement importante pour les espèces cryptique. C'est ainsi que différentes espèces ont été identifiées au sein de la population des Rhinolophes d'Australie (*Rhinolophus megaphyllus*) à la suite d'une étude systématique moléculaire utilisant des allozymes et la région du contrôle de l'ADNmt (Cooper *et al.*, 1998). De même, un grand nombre d'espèces cryptiques de microcèbes (*Microcebus spp*) et de lépilemurs (*Lepilemur spp*) de Madagascar doivent leurs statuts de conservation à l'approche moléculaire (voir par exemple Heckman *et al.*, 2006; Ravaoarimanana *et al.*, 2004).

Cependant, comprendre la structure génétique des populations pose souvent un défi pour les gestionnaires de la conservation (Buckland *et al.*, 2014) puisqu'il n'existe aucun indice visible qui permettrait de subdiviser un échantillon en plusieurs sous-unités génétiques objectives de gestion (Sinclair *et al.*, 1996). Portant, pour évaluer la viabilité des populations et pour développer des mesures de conservations pertinentes, il est crucial d'obtenir des informations sur la structure génétiques des populations et les flux de gènes entre populations ou sous-populations. Ainsi, les études moléculaires ont montré une grande diversité de la structure génétique des populations dans l'ordre des chiroptères. Par exemple, l'étude réalisée sur des populations de *Pteropus marianus* sur les îles Mariannes et de Palau, utilisant des marqueurs microsatellites et mitochondriaux (D-loop, COI et Cytochrome b), a mis en évidence l'isolation génétique de la population de Palau par rapport à celles des îles Mariannes (Brown *et al.*, 2011). En outre, les méthodes génétiques peuvent caractériser des phénomènes tels que l'isolement par la distance (ex Meyer, 2007), des goulots d'étranglement (ex Wilson *et al.*, 2007) qui peuvent conduire à proposer des mesures de gestion particulières pour les populations concernées. Brown *et al.*, (2011) estiment ainsi que, étant donné que de nombreuses espèces de *Pteropus* géographiquement isolées sont menacées ou en danger d'extinction, l'identification des lignées distinctes, ou d'unités évolutives significatives est indispensable pour informer les programmes de gestion conservatoire de ces espèces. Celui-ci est d'autant plus important que ce type d'étude est rare et que les conséquences génétiques de la fragmentation de l'habitat à petite échelle pour les populations de chauves-souris sont en grande partie inconnues (Meyer *et al* 1998).

Objectifs de l'étude

Dans le but de caractériser la structure génétique des populations des deux espèces modèles que nous avons choisi pour leur écologie contrastée notamment en réponse à la dégradation des habitats, nous avons utilisé des séquences de Cytochrome b et des locus microsatellites pour :

- quantifier la diversité génétique des populations des deux espèces dans les différentes îles ;
- évaluer le niveau de structuration des différentes populations entre les îles et de déterminer si les îles sont connectées par un flux de gènes ou pas.

Ces résultats nous permettront de mieux appréhender les flux de gènes entre les populations, au sein des îles mais aussi entre les îles et l'histoire démographique de ces espèces, des informations nécessaires pour orienter les mesures de gestion conservatoire de ces espèces par exemple à travers la mise en place d'actions ciblées sur les différentes sous-populations.

II. Matériels et méthodes

1. Les deux espèces étudiées

Les deux espèces de *Pteropus* des Comores (*P. livingstonii* et *P. s. comorensis*) (Fig.1) présentent des caractéristiques morphologiques et écologiques différentes. La Roussette de Livingstone (*P. livingstonii*) est caractérisée par un poids moyen de 0,65kg. Son envergure des ailes est de 1,265m en moyenne pouvant atteindre 1,5m (Louette *et al.*, 2004a), ce qui fait de cette espèce la plus grande des chauves-souris frugivores de l'Océan Indien (Goodman, *et al.*, 2010a). De couleur noire, cette espèce est caractérisée par des ailes larges et des oreilles arrondies. Cette forme des ailes qui donne un rapport poids/surface des ailes faible est décrit comme étant en rapport avec sa faculté d'utiliser les courants d'air chaud pour planer (Norberg *et al.*, 2000). La Roussette de Livingstone est endémique des Comores et occupe uniquement les îles d'Anjouan et de Mohéli au sein desquelles elle dépend de son habitat naturel représenté par des forêts montagnardes pour la majeure partie de son alimentation et de ses besoins en matière de dortoirs (Louette *et al.*, 2004a). Son régime alimentaire restreint et variable au gré des saisons fait que cette espèce est considérée comme « spécialiste séquentielle » (Trehwella *et al.*, 2001). La taille réduite de la population, estimée à 1200 individus (Granek, 2002), et la destruction de son habitat fait que cette espèce est classée en « Danger d'extinction » dans la liste rouge de l'IUCN (www.iucnredlist.org) et représente donc une cible d'action de conservation prioritaire aux Comores (DGEF, 2012).

La Roussette commune des Comores (*P. s. comorensis*) est une sous-espèce endémique des Comores et elle est commune au sein des quatre îles (Grande-comore, Anjouan, Mohéli et Mayotte). Elle est aussi présente dans l'île de Mafia au large de la Tanzanie (Cheke, 2011). Cette espèce très remarquable par sa couleur brun foncé et son collier roux pèse environ 0,5kg et possède une envergure de 1m. Les ailes sont courtes, moins larges et moins arrondies que chez la Roussette de Livingstone (Louette *et al.*, 2004a). Son aire de répartition inclut différents types d'habitats allant des zones littorales jusqu'aux habitats forestiers. Son régime alimentaire inclue des fleurs et de fruits divers et différentes plantes. Ce régime présente des chevauchements avec la Roussette de Livingstone (Trehwella *et al.*, 2001). Les gammes d'altitudes des habitats qu'elle utilise varient selon les îles : entre 0 et 1000 m à la Grande-comore mais reste à des altitudes basses dans les autres îles (maximum 500 m à Mohéli). Cette espèce est très abondante aux Comores mais aucune estimation de la taille de sa population n'est disponible. Son aire de répartition et son abondance fait qu'elle est classée en « Préoccupation mineure » par l'IUCN (www.iucnredlist.org).



Fig. 1 : La Rousette de Livingstone (g) et la Rousette commune des Comores (d)

Sources : (d) Durrell Wild Life, (g) Auteur

2. Zone d'étude et sites d'échantillonnage

Cette étude s'est focalisée sur les trois îles (Grande-comore, Anjouan et Mohéli) de l'archipel des Comores (Fig. 2). Ce dernier est situé dans le Canal de Mozambique à égale distance (300 km) entre la côte est-africaine et Madagascar. Les trois îles échantillonnées, distantes de 40km (Grande-Comore et Mohéli) et 80 km (Grande-Comore et Anjouan), sont caractérisées par un relief montagnard dont les sommets culminent à 2361 m, 1595 m et 790 m respectivement pour Grande-Comore, Anjouan et Mohéli.

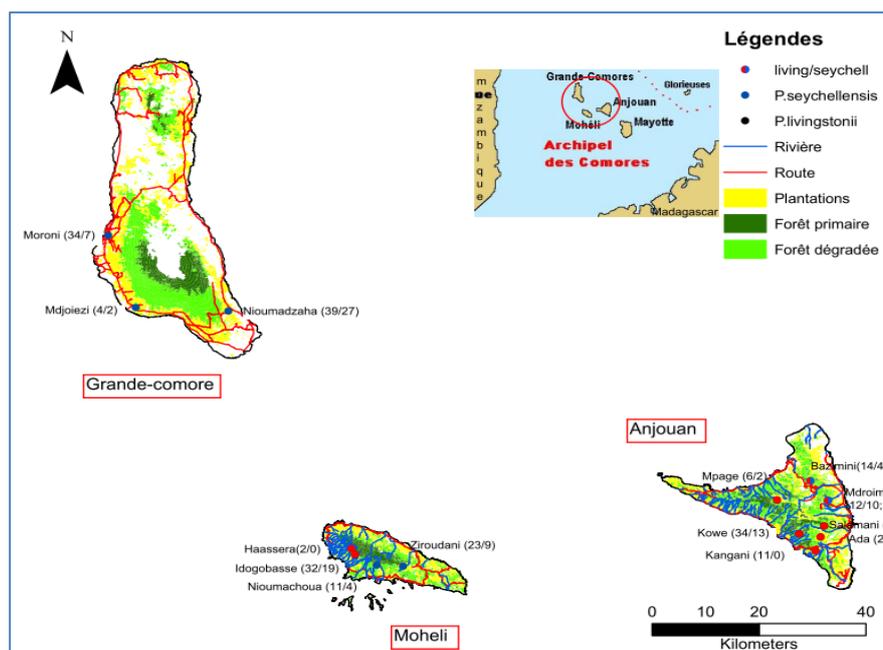


Fig. 2 : Zone d'étude et sites d'échantillonnage

L'échantillonnage utilisé dans cette étude provient de deux sessions de terrain de cinq mois (Novembre 2014-Avril 2015) et trois mois (Janvier-Avril 2016) au cours desquelles ont été échantillonnées dix sous-populations de *P. livingstonii* (sept dans l'île d'Anjouan et trois à Mohéli), et sept sous-populations pour *P. s. comorensis* sur l'ensemble des trois îles (trois en Grande-Comore, deux à Anjouan et deux à Mohéli).

3. Collecte des échantillons

Du matériel fécal a été collecté sous les arbres gîtes des deux espèces de chauves-souris en utilisant des bâches plastiques de 3mx3m de dimension. Celle-ci est posée à partir de 18h et sont relevée tôt le lendemain à partir de 6h00. Chaque échantillon est attribué à une des deux espèces par observation directe des individus occupant le dortoir. Deux protocoles ont été suivis pour la conservation des échantillons de fèces suivant leurs consistances au cours de la première session de terrain. Les fèces à consistance dure sont séchées à l'air libre sous une température variant entre 20 et 25°C et sont ensuite conservés dans des tubes contenant du silica-gel. Pour les échantillons à consistance mole et tendre, les prélèvements sont directement déposés dans des tubes contenant de l'éthanol à 96°. Ces échantillons sont ensuite conservés à une température de -20°C avant leur extraction. Au cours de la deuxième session de terrain, tous les échantillons sont conservés dans l'éthanol.

Une collecte de tissus a également été réalisée chez les deux espèces. Pour cela, nous avons capturés les animaux avec des filets de canopée, la méthode la plus efficace pour capturer les chiroptères de grandes tailles (Desvars *et al.* 2009; Estrada and Coates-Estrada 2002). Des filets de 12m sur 3m ont été installés perpendiculairement aux passages naturels des chauves-souris au sein des sites d'alimentation. Les filets sont disposés à différents niveaux des arbres selon la hauteur et la taille de l'ouverture entre les deux arbres ciblés. Chaque animal capturé est marqué par incision au niveau de l'oreille lors de sa première capture et la biopsie prélevée (environ 2mm) est conservé dans un tube contenant de l'alcool à 96°.

4. Analyses en laboratoire

a) Extraction

Tous les échantillons d'ADN ont été extraits à l'aide de kits d'extraction Qiagen sur colonne. Les échantillons de fèces ont été extraits à la Plateforme ADN dégradé du LABEX CeMEB au sein de l'Université de Montpellier avec le kit Qiagen « DNeasy mericon Food N°69514».

Les tissus sont extraits au Service des Marqueurs Génétiques en Ecologie (SMGE) au sein du Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive en utilisant le kit Qiagen « DNeasy Blood and Tissue N°69506».

b) Amplification et séquençage d'un fragment d'ADN mitochondrial

Un fragment d'environ 460 pb du Cytochrome b de l'ADNmt a été amplifié par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Un mélange réactionnel de 10µl comprenant 5µl de tampon de réaction QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Tampon 2X, 3mM MgCl₂, Taq, dNTPs), 0.5µl des amorces CBPL1 (5' TAC ATC CCA GCC AAC CCA CTA 3') et H15915R (5' AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTT ACA AGAC 3') à la concentration de 10pM, 1 µl d'ADN pure ou 4µl d'ADN dilué au 20^{ème} respectivement pour les échantillons de tissus et de crotte. Le tout est complété par de l'eau ultra pure. Les conditions d'amplification consistent à une phase de dénaturation initiale à 95° pendant 2 minutes suivies de 34 cycles de dénaturations (94°C, 60s), Hybridation (45°C, 60s) et élongation (72°C, 90s) et une élongation finale à 72°C pendant 10mn.

Un volume de 3µl de produit PCR ainsi obtenu est mélangé avec du Bleu pour être contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec du Bromure d'Ethidium. Un marqueur de taille de type DNA Ladder a été utilisé pour contrôler la taille des bandes après migration. Tous les produits PCR contenant un amplicon à la taille attendue de 460 pb, sont mélangés avec de l'eau ultra pure pour avoir un volume minimum de 10µl et envoyés pour séquençage au prestataire Eurofins MWG.

5. Analyses des données de séquences mitochondriales

a) Caractérisation de la structure génétique

Les séquences de Cytochrome b obtenues sont vérifiées et éventuellement corrigées à l'aide du logiciel Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Les séquences sont ensuite alignées à l'aide du logiciel MEGA V 6 (Tamura *et al.*, 2013). Cet alignement s'est fait selon une approche heuristique basée sur l'algorithme Clustal W (Thomson *et al.*, 1994).

Dans un premier temps, les relations généalogiques entre les haplotypes mitochondriaux pour chacune des deux espèces de *Pteropus* comoriens ont été révélées à l'aide de construction de réseaux. L'algorithme Median Joining du programme Network 5 (Brandelt *et al.*, 2009) a été utilisé dans cette phase. Le réseau met en évidence les liens

plausibles entre les différents haplotypes, chacun étant représenté par un cercle dont la dimension est proportionnelle à la fréquence des haplotypes.

Un arbre phylogénétique incluant toutes les séquences des deux espèces a été réalisé en utilisant deux méthodes de construction. La méthode du maximum de vraisemblance a consisté en une sélection du meilleur modèle sur la base du critère BIC (Bayesian Information Criterion) (Nei et Kimura, 2000) avec le logiciel MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Le modèle GTR+G a été retenu et l'arbre en maximum de vraisemblance a été produit avec 1000 itérations de Bootstrap par le logiciel PhyML (Guindon and Gascuel, 2003). La méthode bayésienne a consisté en une sélection du meilleur modèle basé sur la partition des données en tenant compte des variations entre les positions des codons en utilisant Partition finder v1.1 (Lanfear *et al.*, 2012). Cette partition de données a consisté à déterminer le modèle de l'évolution des séquences de nucléotides qui correspond le mieux à chaque partition en fonction de l'AIC (Akaike Information Criterion). Les modèles K80+G, HKY+G et GTR+G sont retenus et appliqués respectivement pour les positions 1, 2 et 3 des codons. L'analyse bayésienne consistait à échantillonner toutes les 500 générations pour 8 000 000 générations consécutives par la méthode de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Les 1600 premiers arbres ne sont pas considérés et les probabilités postérieures pour chaque nœud ont été retenues. L'arbre est enraciné par deux espèces (*P. conspicillatus* et *P. poliocephalus*) et un certain nombre de séquences de *Pteropus* d'autres localités ont été intégrées dans la reconstruction.

b) Analyse du polymorphisme mitochondrial

Afin de déterminer la variation génétique au sein et entre les populations, certains paramètres de diversité ont été calculés avec le programme DNAsp (Librado and Rozas, 2009) : le nombre total de mutations, le nombre d'haplotypes (N), la diversité haplotypique (Hd), la diversité nucléotidique (π) (Saitou and Nei 1987), la moyenne du nombre de différence nucléotidique (k) (Tajima, 1983), et le nombre de site de ségrégation (s). La diversité nucléotidique (π) mesure le nombre moyen de différences entre deux séquences choisies aléatoirement dans l'échantillonnage (Nei and Li, 1979) et la diversité haplotypique (Hd) est la probabilité que deux haplotypes tirés d'une population soient semblables. Ainsi, plus la diversité haplotypique est élevée au sein de l'échantillonnage, plus il y a de chances d'observer des haplotypes différents lorsque l'on sélectionne deux individus au hasard (Saitou and Nei 1987).

Diversité haplotypique : $h = \sum f^2 i$ où f_i est la fréquence de l'haplotype i .

Diversité nucléotidique : $\pi = \sum f_i, f_j, p_{ij}$ avec f_i et f_j fréquences des haplotypes i et j ; p_{ij} le degré de divergence entre les haplotypes i et j .

6. Mise au point et génotypage de microsatellites

Neufs locus microsatellites isolés pour *Pteropus rodricensis* (O'Brien *et al.*, 2007) ont été choisis et testés sur nos deux espèces ; *P. livingstonii* et *P. s. comorensis* (Tab I)..

Tab. I : Détails des marqueurs microsatellites utilisés sur *P. livingstonii* et *P. s. comorensis* (Source : O'Brien *et al.*, 2007).

Locus	Séquences	L(pb)	T(°C)
A1	F: TGCCCATTTCTCTATCCTCAA R: CACTAGTTCTCCCCTGGTCAAG	172-190	59
A2	F: ACTAATCTCAACTGGGTGCTC R: AATTATCTATACTGGCTTTTGTTA	172-180	56
A3	F: TTGATCTGAATGCTGTGTCTCT R: CATGGATTCCGCTAGGCAGTGA	341-345	56
A8	F: GTTTGGTTGATTTTAGTTTTTCAGG R: CTTCGGGCATGTCCTTCATAAATC	267-277	51
B29	F: CTGCCAAGAAGAGAAAAGTTA R: ACCCCCAGGCAGGAGAAAAGAC	239-245	56
CSP7	F: CCACAAGAAACCCAATACTAAC R: CTCCTAGCCCCACAATC	257-265	56
C6	F: CCCCAGGGACCTATCACACT R: CTCCGTTGCCTCATCCAGAAAAT	282-291	59
PH4	F: AGAGAGTAAGATGGGGATGG R: TTCTGCCTGGACCTGGGATG	273-285	59
PH9	F: CTGAACTCTGGGTGGTAATC R: CTCACCTCAAAGAGAATGTG	257-265	51

(L) : longueur de la séquence ; (T) : Température d'hybridation des amorces. Pour ce faire, une phase de mise au point des paramètres réactionnels s'est avérée nécessaire. Cette mise au point a été effectuée à partir des échantillons de tissus de l'espèce *P. s. comorensis* en utilisant des amorces froides. Cela a consisté à définir, dans des réactions de PCR, la température d'hybridation pour chaque amorce en monoplexe. Cette première phase a été suivie de différents tests combinant différentes amorces possédant les mêmes températures

d'hybridation (multiplexage) au cours d'une réaction PCR. Pour les monoplexes, le volume réactionnel est un mélange de 10µl contenant 5µl de tampon de réaction QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Tampon 2X, 3mM MgCl₂, Taq, dNTPs), 1 µl des deux amorces froides à 2 pM et 1 µl d'ADN + 2µl d'eau pour les tissus ou 4 µl d'ADN dilué au 1/20 pour les crottes. Pour les multiplex, le volume réactionnel est un mélange de 10µl contenant 5µl de tampon de réaction QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Tampon 2X, 3mM MgCl₂, Taq, dNTPs), 1 µl du mélange de amorces à 2 pM ; la Forward de chaque locus étant marquée par du fluorochrome).

Le produit PCR est ensuite contrôlé par électrophorèse sur gel d'Agarose à 2% avant d'être dilué puis envoyé pour génotypage dans un séquenceur à 24 capillaires sur la Plateforme de Séquençage du LabEx CeMEB (Université de Montpellier). Le produit de séquençage est un volume d'environ 18,5µl d'un mélange 3µl de produit PCR dilué, 15µl de Formamide et 0.2µl de marqueur de taille LYZ500. Un lot de 21 échantillons provenant de différents sites de collecte a été choisi pour cette première phase de mise au point et génotypage. Les échantillons sélectionnés sont seulement ceux qui ont été amplifiés avec succès en Cytb.

7. Analyse des données microsatellites

Les différents allèles ont été identifiés visuellement et caractérisés sur la base de leur taille en paires de base à l'aide du logiciel GeneMapper (Applied Biosystems). Pour assurer la reproductibilité des résultats, étant donné la nature dégradée de la plus part de nos échantillons, un triplicat sur le génotypage s'est avéré nécessaire. De plus, pour la qualité des résultats une double lecture des génotypes a été réalisée.

Des tests exacts de déficit en hétérozygotie observée (H_O) par rapport à l'hétérozygotie attendue (H_E) sous l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) ont été réalisées à l'aide de GanalEx v6.5 (Peakall and Smouse 2012). L'hypothèse de panmixie au sein des échantillons a été également testée par les estimations des F_{IS} selon Weir and Cockerham (1984) et la significativité des valeurs observées par rapport à celles attendues a été testée au seuil de 5% à l'aide de Fstat (Raymond & Rousset, 1995).

III. RESULTATS

1. Echantillonnage et taux de succès sur l'amplification

Au total, deux cent cinquante-huit échantillons ont été collectés sur le terrain ; soit trente-deux échantillons de tissus et deux cent vingt-six de crottes. Le taux de succès pour l'amplification du Cytb est de 43.41% sur l'ensemble des échantillons mais est variable entre les îles (fig. 3).

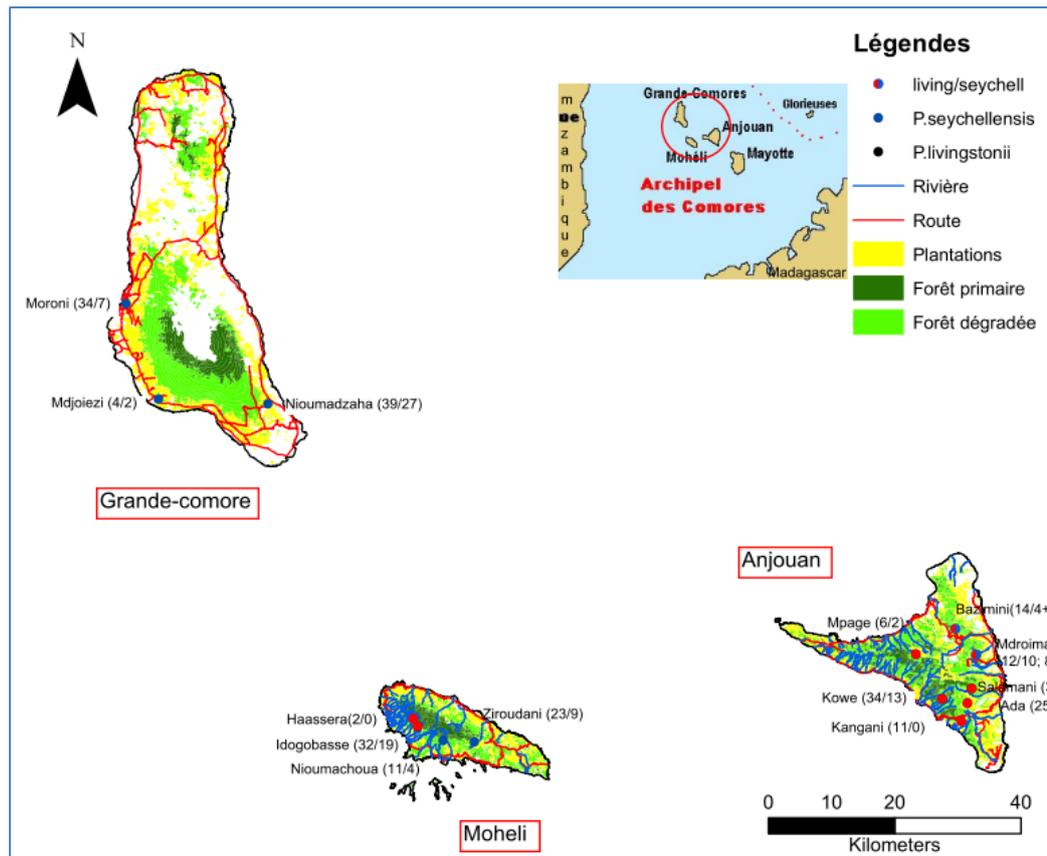


Fig. 3 : Taux d'échantillonnage et succès de l'amplification. Les premiers chiffres indiquent le nombre d'échantillons collecté et le second représente le taux de succès de l'amplification

2. Reconstruction phylogénétique et identification des individus

L'alignement a généré cent douze séquences de 460 pb ; soixante-neuf pour *Pteropus livingstonii* et cinquante-trois pour *Pteropus seychellensis comorensis*, soit respectivement 39% et 49 % de taux de succès pour l'amplification. Un arbre phylogénétique a été construits sur les 112 séquences du cytochrome b et en incluant les séquences de 9 espèces du genre *Pteropus* (*P.niger*, *P. rufus*, *P. giganteus*, *P. lylei*, *P. rodricensis*, *P. pumilus*, *P. vampyrus*, *P.*

voeltzkowi et *P. s. seychellensis*). L'arbre obtenu (Fig.4) montre que tous les échantillons séquencés appartiennent bien aux deux espèces *P.livingstonii* et *P.s.comorensis*. Cinq échantillons qui avaient été assignés *a priori* à *P.livingstonii* (PL 223, 232, 233, 236, 237) étaient en fait des *P. s. comorensis*. Ce biais d'identification représente 5,88% des échantillons amplifiés avec succès.

L'analyse phylogénétique a montré que les topologies des deux approches utilisées (bayésienne et maximum de vraisemblance) sont comparables. Aucune structure géographique par rapport aux trois îles échantillonnées (Anjouan, Mohéli et Grande-comore) n'a été trouvée pour la Roussette Commune des Comores. L'ensemble des haplotypes de *P. s. comorensis* forme un clade qui est moins soutenu par la méthode de maximum de vraisemblance (28%) que par la méthode bayésienne dont la probabilité postérieure indique la valeur de 1. Au contraire ; une structuration phylogéographique a été trouvée entre les îles de Mohéli et Anjouan pour *P. Livingstonii*.

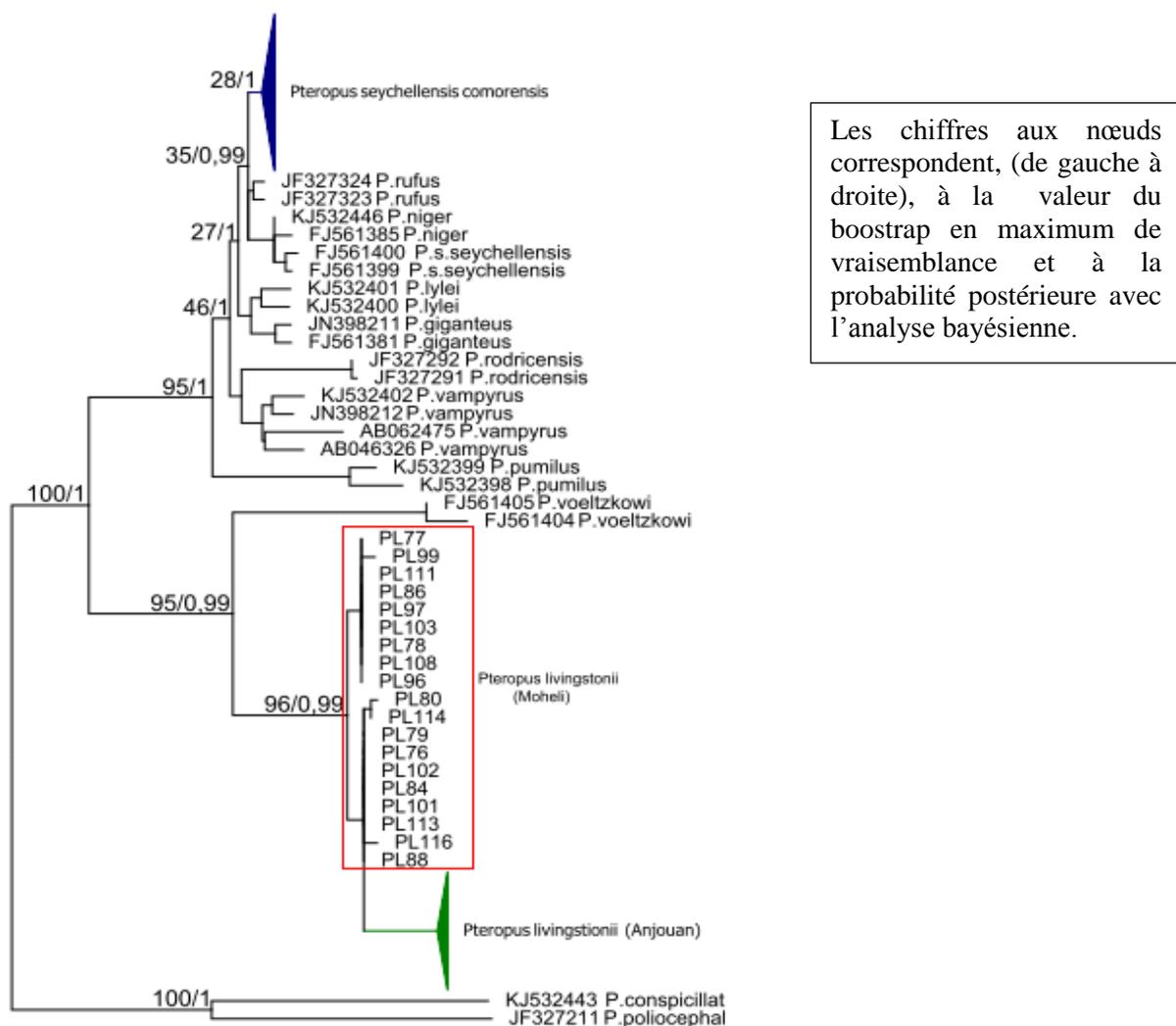


Fig. 4: Arbre de consensus obtenu avec l'analyse bayésienne.

3. Diversité génétiques des haplotypes

Des matrices de séquences de 363 pb ont été générées pour l'ensemble des échantillons des deux espèces *P. livingstonii* (59 individus) et *P. s. comorensis* (53 individus). Les réseaux d'haplotypes générés par le programme Network (Fig.5) ont montré huit haplotypes pour *P. livingstonii* et trois pour *P. s. comorensis*. Pour *P. livingstonii*, trois haplotypes sont spécifiques de l'île de Mohéli tandis que les autres partagent des séquences provenant de différentes sous-populations de l'île d'Anjouan. Aucune forme de structure à l'intérieur des îles ne semble évidente. Il est à noter qu'à Anjouan, un des haplotypes se rencontre dans les six localités échantillonnées.

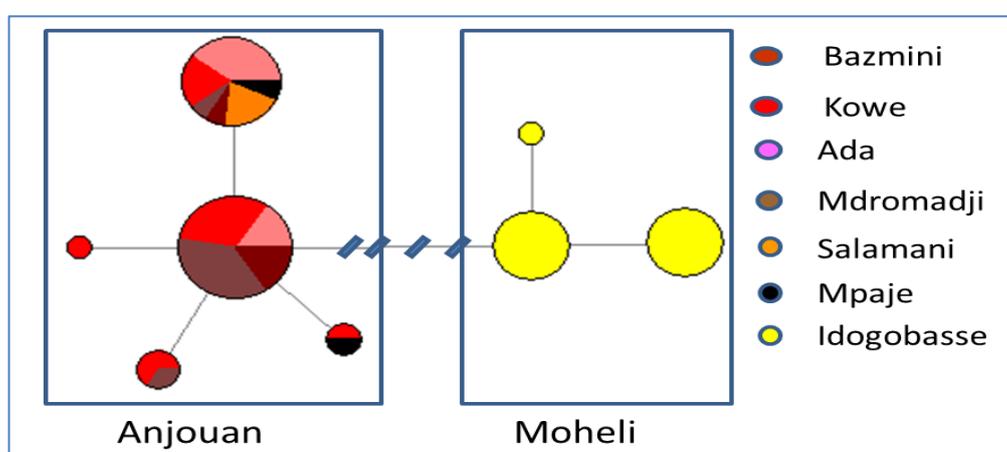


Fig. 5 : Réseau d'haplotypes des populations de *Pteropus livingstonii*.

Les barres dans les branches indiquent des pas mutationnelles, chaque couleur indique un site d'échantillonnage et chaque cercle est proportionnelle aux nombres d'haplotypes identiques.

Les paramètres de diversité pour *P. livingstonii* indiquent une valeur de diversité haplotypique relativement faible ($Hd=0.79$; ± 0.027) et une diversité nucléotidique faible ($\pi=0.0073$; ± 0.0005). Ces valeurs sont comparables entre les deux îles de Mohéli et Anjouan (Tab. II).

Tab. II: Diversité génétique des deux espèces estimée à partir de 363pb de cytochrome b

Espèce/population	n	h	Hd	k	π	s
<i>P.livingstonii</i>	59	8	0.79 ± 0.027	2.62	0.0073 ± 0.0005	9
Mohéli	19	3	0.57 ± 0.057	0.63	0.0017 ± 0.00027	2
Anjouan	40	5	0.64 ± 0.047	0.72	0.0021 ± 0.00027	3
<i>P.s.comorensis</i>	53	3	0.50 ± 0.037	0.52	0.0014 ± 0.00014	2

(n) nombre d'échantillons, (h) nombre d'haploypes, (Hd) diversité haplotypique, (k) nombre moyen de différence nucléotidique, (π) diversité nucléotidique, (s) nombre de site polymorphe

Contrairement à *Pteropus livingstonii*, aucune structure particulière n'a été trouvée entre les populations de *P. s. comorensis* des différentes îles (Fig.6). Cela se traduit par le partage d'haplotypes communs entre les individus des trois îles échantillonnées (Anjouan, Mohéli et Grande-comore). Les valeurs de diversité haplotypique et nucléotidique sont relativement faibles : ($H_d=0.50 \pm 0.037$; $\pi=0.0014 \pm 0.00014$) (Tab. II).

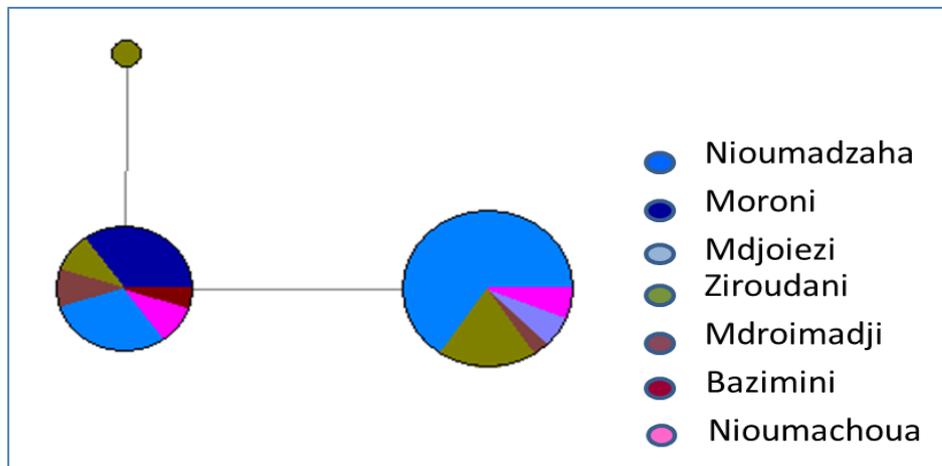


Fig. 6 : Réseau d'haplotypes des populations de *P. s. comorensis*

4. Les microsatellites

Un lot de vingt-et-un échantillons (8 pour *P. livingstonii* et 13 pour *P. s. comorensis*) de différents sites a été choisi pour la mise au point et le génotypage des microsatellites. Au total, trois multiplexes sont amplifiés avec succès sur l'ensemble des locus. Les paramètres de chaque multiplexe et les caractéristiques de chaque microsatellite sont rapportés dans le tableau III.

Tab. III: Caractéristiques des loci microsatellites utilisés

Mix	Locus	Séquences	L (pb)	Motif répété	T(°C)
M1	A1	PET/F- TGCCATTTCTCTATCCTCAA R: CACTAGTTCTCCCCTGGTCAAG	172-190	(GT)17	52
	C6	FAM/F- CCCCGGGGACCTATCACACT R: CTCCGTTGCCTCATCCAGAAAAT	282-291	(ATC)15	
	PH9	VIC/F- CTGA ACTCTGGGTGGTAATC R: CTCACCTCAAAGAGAATGTG	220-228	(TG)23	
M2	A2	FAM/F- ACTAATCTCAACTGGGTGCTC R: AATTATCTATACTGGCTTTTGTTA	172-180	(GT)17	50
	A8	PET/F- GTTTGGTTGATTTTAGTTTTTCAGG R: CTTCGGGCATGTCCTTCATAAATC	267-277	(TG)12	

CSP7		VIC/F- CCACAAGAAACCCAATACTAAC R: CTCCTAGCCCCACAATC	257-265	(CTAT)14	
M3	A3	PET/F- TTGATCTGAATGCTGTGTCTCT R: CATGGATTCCGCTAGGCAGTGA	341-345	(CA)20	
	B29	FAM/F- CTGCCAAGAAGAGAAAGTTA R: ACCCCCAGGCAGGAGAAAGAC	239-245	(CAG)9	54
	PH4	NED/F- AGAGAGTAAGATGGGGATGG R: TTCTGCCTGGACCTGGGATG	273-285	(TTA)12	

(L) : longueur de la séquence, (T) : Température d'hybridation

Tous les loci sont révélés polymorphes pour les deux espèces. Le nombre d'allèles pour les 9 loci varie entre 2 (locus B29) et 8 (locus A2) pour *P. livingstonii* avec une moyenne de 5,22 par locus (Tab IV). La comparaison des deux taux d'hétérozygotie sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg montre que He est supérieure à Ho traduisant un écart positif et suggérant un déficit en hétérozygotie pour les deux espèces. Notons que seuls les locus C6, CSP7 sont en équilibre d'Hardy-Weinberg pour les deux espèces et A2 seulement pour *P. livingstonii*.

Tab. IV: Hétérozygotie et richesse allélique des différents loci

<i>Pteropus livingstonii</i> (N=8)					<i>Pteropus seychellensis comorensis</i> (N=13)			
Locus	Ar	Ho	He	Fis	Ar	Ho	He	Fis
A1	5	0,75	0,75	0,01	2	0,1	0,09	-0,05
C6	5	0,33	0,67	0,50	3	0,20	0,26	0,24
PH9	6	0,71	0,77	0,07	8	0,70	0,83	0,15
A2	8	0,80	0,83	0,03	4	0,37	0,48	0,22
A8	7	0,71	0,79	0,10	3	0,55	0,42	-0,30
CSP7	6	0,10	0,65	0,84	4	0,40	0,68	0,41
A3	4	0,16	0,51	0,67	3	0,50	0,47	-0,04
PH4	4	0,44	0,61	0,28	3	0,30	0,48	0,38
B29	2	0,22	0,44	0,50	4	0,20	0,34	0,42
	5,22	0,46	0,66	0,30	3,77	0,36	0,45	0,25

(Ar) richesse allélique, (Ho) Hétérozygotie observé, (He) Hétérozygotie attendue,

IV. DISCUSSION

A notre connaissance, cette étude est la première réalisée sur la génétique des populations d'espèces de Mégachiroptères des Comores avec un grand nombre d'échantillons collectés de manière non-invasive. Les résultats présentés ici sont prometteurs et représentent les résultats préliminaires d'une étude plus vaste sur ces mégachiroptères dont les objectifs sont à la fois d'étudier la diversité et la structure génétique des populations et de tester la mise en place d'un protocole de suivi de population à travers des données de Capture-Marquage-Recapture basées sur un échantillonnage non invasive pour l'étude et le suivi de la dynamique des populations.

1. Diversité génétique des populations

Nos analyses sur la diversité génétique des populations des deux espèces montrent des taux faibles comparés à d'autres études sur les chauves-souris en milieu insulaire (*Nyctalus azoreum* ; $n=30$, $h=8$, $Hd=0.77$; Salgueiro et al. 2004) mais variables entre les deux espèces. La différence entre les diversités des deux espèces peut être expliquée par les phénomènes historiques des événements de colonisations. En effet, selon O'Brien et al (2009), il y aurait eu au moins trois événements de colonisation des espèces du genre *Pteropus* dans la région du Sud-ouest de l'océan indien en provenance de l'Asie du Sud-Est dont la première vague plus ancienne aurait emporté l'espèce *P.livingstonii* et la troisième et dernière (plus récente et très rapide) aurait emporté l'espèce *P.s.comorensis*. Les faibles taux de diversité au sein de l'espèce *P. s. comorensis* ($n=53$, $h=3$, $Hd=0.50$) sont probablement dus à la colonisation récente de cette espèce avec un faible nombre d'individus fondateurs et probablement avec peu de variation génétique. Par ailleurs, la diversité génétique moyennement faible mais peu élevée en comparaison avec son congénère *P. s. comorensis* ($n=59$, $h=8$, $Hd=0.78$) observée chez la Roussette de Livingstone, ayant suivi la première colonisation de la sous-région, démontre que cette espèce retient la diversité. Ceci est d'autant plus caractéristique que la diversité au sein de chaque île est importante par rapport à celle du *P.s.comorensis* observé même entre les trois îles (Tab. II).

Cependant, ces taux de diversités faibles par rapport à d'autres espèces du même genre suggèrent de la perte de diversité pour ces espèces. A titre d'exemple, une étude réalisée sur *Pteropus niger*, a donné des taux de diversité élevés ($n=39$, $h=20$, $Hd=0.95$; Larsen *et al.*, (2014), pour une espèce qui a connu un événement de colonisation récemment (même période que la colonisation de *Pteropus seychellensis comorensis*). Cela suggère l'existence d'autres facteurs qui impactent sur la diversité de ces espèces. Dans une étude sur la variation

génétique du *Pteropus scapulatus* (Sinclair *et al.* 1996) avait trouvé une sensibilité à la perte de la variation génétique en réponse à la fragmentation de l'habitat même à l'échelle locale. Hoffmann *et al.*, (2003) avait mentionné que la combinaison de la petite taille de la population, la distribution fragmentée et l'isolement provoque souvent une réduction de la diversité génétique, conduisant à la perte de potentiel d'adaptation aux changements environnementaux soudains. Force est de constater, l'archipel des Comores, qui a perdu une grande partie de sa superficie forestière, connaît un des taux de déforestation les plus élevés dans le monde selon Sewall *et al.* (2007) ; soit 5,8%. Ainsi, la perte de l'habitat forestier pourrait avoir contribué à la perte de la diversité génétique des *Pteropus* des Comores. Toutefois, les effets génétiques liés à la fragmentation de l'habitat dépendent de la capacité de dispersion de l'espèce.

2. Structuration génétique entre les différentes populations

L'analyse phylogénétique montre des résultats opposés pour les deux espèces ; d'une part un manque de structuration génétique entre les différentes populations échantillonnées au sein des îles et entre les îles pour *P. s. comorensis* et d'autre part une structuration génétique entre les populations de des deux îles : Mohéli et Anjouan. En effet, nos résultats sur la Roussette commune des Comores ont montré que plusieurs individus des trois îles partagent des haplotypes identiques de séquence d'ADN mitochondrial suggérant ainsi des flux de gènes entre les îles, distants entre 40 et 80km. Des résultats similaires ont été trouvés chez *Artibeus jamaicensis* où l'haplotype le plus commun de l'ADNmt est distribué entre trois îles (Jamaïque, Barbade et St.Vincent), sur une distance totale de 1400 km (Pumo *et al.*, 1988). Cette absence de structuration entre les populations est fréquente pour les chauves-souris en milieu insulaire (Ex Goodman *et al.*, 2010; Larsen *et al.*, 2014; Weyeneth *et al.*, 2008) et correspond aussi avec le schéma général de panmixie observé dans d'autres espèces de chauves-souris australiennes (Sinclair *et al.*, 1996; Webb et Tidemann 1996). Des tels résultats sur l'absence de structure génétique entre les trois îles (Grande-Comore, Anjouan et Mohéli) avaient aussi été obtenus pour la Petite Roussette des Comores (*Roussettus obliviosus*, Goodman, *et al.*, 2010). Cette étude avait conclu que la distance de 40 à 80 km qui sépare les îles ne constitue pas une barrière géographique pour ces espèces de chauves-souris qui ont une forte capacité de dispersion. Les résultats obtenus sur *P. s. comorensis* semblent donc conforter cette conclusion. Cependant, l'absence d'haplotype commun partagés entre les deux îles de Mohéli et Anjouan Pour la Roussette de Livingstone (Fig. 5) montre que les

migrations et dispersions sont limitées à des niveaux intra-île et qu'il n'y a pas de flux de gènes entre les îles.

3. Facteurs influençant la structuration génétique des populations de *Pteropus*

L'étude de la structure génétique entre les populations est nécessaire pour comprendre les processus clés telles que la migration et la dispersion. Plusieurs facteurs intrinsèques sont connus pour influencer la structure génétique des populations de chauves-souris (Burland and Wilmer, 2001). La différence dans la capacité de dispersion et migration des deux espèces de *Pteropus* des Comores peuvent être influencée par la morphologie des ailes. En effet, le rapport poids/surface de l'aile plus important pour la Roussette commune des Comores (par rapport à celui de la roussette de Livingstone) est connu comme caractéristique facilitant la capacité migratoire des espèces (Norberg and Rayner, 1987). Cette capacité de migration très répandue au sein du genre *Pteropus* (ex Brown *et al.*, 2011; Fox, 2006; Roberts, 2012; Tidemann and Nelson, 2004) est en rapport avec des vols battus. Cela explique bien pourquoi *P. livingstonii* possède une faible capacité de dispersion.

En effet, les longues ailes de *P. livingstonii* et son poids élevé lui permet d'utiliser le courant d'air chaud pour se déplacer, réduisant ainsi le nombre de battements de ses ailes (Louette *et al.*, 2004). Cette pratique de vol plané est en rapport avec la morphologie des ailes et concerne généralement des espèces avec une faible capacité de migration (Norberg *et al.*, 2000). Les espèces à envergure plus longue et une grande surface alaire compensent le poids élevé du corps diminuant ainsi la maniabilité des ailes et par conséquent les migrations à longues distances. Par ailleurs, d'autres facteurs intrinsèques tels que des exigences de dortoirs sont connus pour influencer la structure génétique (Burland and Wilmer, 2001). Ainsi des fortes variations spatiales et temporelles de la disponibilité alimentaire combinées à de bonnes capacités de mouvements sont des facteurs qui doivent favoriser la dispersion et la migration et donc faciliter le flux de gènes entre les populations. Ceci pourrait expliquer la faible structuration génétique observée chez *P. s. Comorensis*.

4. Caractérisation des loci microsatellites polymorphes

Le choix de marqueurs microsatellites est important pour des études de génétique des populations et pour la compréhension de l'histoire évolutive des espèces. Les marqueurs utilisés dans cette étude ont été choisis parce qu'ils ont été isolés chez une espèce proche (*P.*

rodricensis) de celles qui sont étudiées ici. En outre, ces marqueurs sont utilisés avec succès dans plusieurs études (Brown *et al.*, 2011; Fox *et al.*, 2012; O'Brien, 2007). Tous les locus testés ont effectivement pu être amplifiés chez les deux taxons étudiés et ils ont montré un degré de polymorphisme variable pour tous les loci (2-8). Ces résultats indiquent l'efficacité des loci microsatellites utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des populations étudiées. Toutefois, les valeurs des indices de fixation et la comparaison de l'hétérozygotie sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg traduit un déficit en hétérozygote. Cependant, ce déficit est actuellement difficile à expliquer étant donné le nombre faible de l'échantillonnage utilisé pendant cette phase.

5. Implications pour la conservation

L'identification des populations génétiquement distinctes est une étape importante pour la gestion et la conservation de la biodiversité car elle conduit à une meilleure compréhension des tendances historiques de la colonisation, la dispersion actuelle et/ou les schémas migratoires. *P. s. comorensis* possède une grande adaptabilité vis-à-vis des variations spatio-temporelles des ressources alimentaires par sa capacité de migration. Ainsi, son abondance importante, sa capacité de migration, sa large répartition et le fait qu'elle utilise des habitats largement anthropisés montrent que cette espèce s'adapte bien aux nouvelles conditions environnementales aux Comores malgré la dégradation de son habitat. Les résultats génétiques vont d'ailleurs dans ce sens. D'un point de vue génétique, en dépit de la faible diversité, cette espèce ne semble pas menacée.

Au contraire du fait de la structuration génétique entre les îles (Anjouan et Mohéli), un niveau élevé de préoccupation en termes de conservation est requis pour la Roussette de Livingstone. Celui-ci est d'autant plus important que *Pteropus livingstonii* est une espèce "parapluie" pour ses habitats. En effet, cette espèce est considérée comme un bio-indicateur (Granek, 2000.). Sa présence caractérise la qualité de l'habitat forestier, qualité qui favorise la présence d'autres espèces endémiques de la flore mais aussi de la faune des Comores. La conservation de cette espèce et de ses habitats contribuerait en conséquence à la conservation d'un grand nombre d'espèces endémiques.

6. Limites de l'étude et perspectives

a) L'échantillonnage

L'échantillonnage de chaque espèce présenté dans cette étude (N=59 *P. livingstonii* ; N=53 *P. s. comorensis*) est important comparé à d'autres études effectuées sur d'autres espèces, comme *Pteropus marianus* (N=39, Larsen *et al.*, 2014) et *Roussettus obliviosus* (N=44, Goodman *et al.*, 2010). Toutefois, les échantillons amplifiés avec succès présentent une certaine hétérogénéité dans leur distribution. Par exemple, pour les échantillons du *P. livingstonii* de Mohéli, seulement ceux du site d'Idogobasse ont été amplifiés avec succès. Ce manque d'homogénéité peut constituer un biais dans une interprétation globale quant au flux de gènes entre les îles. En outre, l'absence d'autres sites d'échantillonnage dans l'île de Mohéli nous prive d'une évaluation globale du niveau de dispersion de l'espèce dans les différents habitats fragmentés. Une campagne d'échantillonnage supplémentaire s'avère donc nécessaire pour *P. livingstonii* afin de disposer d'une vision plus complète de la situation de cette espèce aux Comores.

b) Succès de l'amplification

Globalement, 43.41% des échantillons ont été amplifiés avec succès ; ce qui représente 84.37% des tissus et 37.61% des échantillons de crottes. Du point de vue spécifique, le taux de succès est légèrement supérieur pour *P. s. comorensis* (49.02%) du fait de la présence d'échantillons de tissus. Toutefois, cette légère hausse du taux de succès d'amplification pour *P. s. comorensis*, incluant la matière fécale, est fort probablement liée à la consistance de cette matière fécale qui est plus liquide pour *P. livingstonii*. Ce taux de succès est très faible comparé à celui obtenu par Puechemaille et Petit (2007) pour lesquels 96,8% d'échantillons de crotte de *Rhinolophus hipposideros*, ont été amplifiés avec succès. Taberlet *et al.*, (1999) estiment que les limites des méthodes d'échantillonnage non invasif résultent soit de faible qualité de l'ADN (ADN dégradé) ou la mauvaise qualité de l'extrait (présence d'inhibiteurs de PCR), et donc que la qualité de l'extrait d'ADN dépend largement de la capacité à réduire la présence de molécules qui peuvent inhiber la PCR. Ainsi, pour maximiser les succès dans l'amplification des séquences de Cyt b, une redéfinition d'une séquence de longueur plus courte serait nécessaire.

c) Les microsatellites

Etant donné que les microsatellites sont de courtes séquences (172–345 pb), une amplification de tous les extraits d'ADN pourrait améliorer le taux de succès. Ces données sont importantes pour consolider les résultats fournis par l'ADN mitochondrial. En effet, les marqueurs mitochondriaux ne véhiculent toujours pas la tendance temporelle réelle de l'évolution affichée pour diverses raisons : son hérédité uniparentale, typiquement maternelle et le taux de mutation moins élevé (par rapport aux microsatellites). Cependant, l'utilisation des deux marqueurs donnerait de la robustesse à l'étude. Par ailleurs, ces résultats microsatellites, en plus des études sur l'identification individuelle sont nécessaires pour l'estimation de la taille de populations et la mise en place d'un plan de suivi de la dynamique des populations à travers des méthodes de Capture-Marquage-Recapture non-invasive ; ce dernier point étant crucial pour *P. livingstonii* dont la capture peut être néfaste aux individus et dont la taille de population est très réduite.

V. CONCLUSION

L'étude préliminaire réalisée ici constitue une contribution à la caractérisation de la génétique des populations des mégachiroptères des Comores notamment, *Pteropus livingstonii* et *Pteropus seychellensis comorensis*. D'une manière générale, cette étude aura permis de d'identifier les réponses génétiques différentielles pour les deux espèces sympatriques : la structuration génétique de *P. livingstonii* entre les deux îles de Mohéli et Anjouan et la panmixie globale entre les trois îles pour *Pteropus seychellensis comorensis*. En termes de diversité génétique, cette étude soutient l'hypothèse selon laquelle la perte de l'habitat a une influence sur la diversité génétique particulièrement pour les populations vivant au cœur de la forêt. Par contre, les espèces cosmopolites sont moins sensibles par la perte de l'habitat naturel car elles ne dépendent pas de la qualité de l'habitat mais plutôt, de la surface de l'habitat disponible : d'où une préoccupation élevée en termes de conservation pour *Pteropus livingstonii*.

Cependant, l'absence de politiques de gestion et de conservation aux Comores est une réelle menace pour cette biodiversité. En effet, l'absence d'Aires Protégées terrestres dans un pays de forte endémicité induit un manque d'efficacité dans la gestion à long terme de la protection des espèces. Les menaces toujours fortes sur les habitats naturels renforcent cette nécessité à agir pour préserver ce patrimoine. Etant donné qu'une bonne compréhension de

l'écologie spatiale et du comportement des chauves-souris est essentielle pour une gestion efficace des populations, les recherches en cours pour ces espèces, notamment sur la sélection de la niche écologique et l'utilisation des marqueurs microsatellites pourront nous aider à mieux orienter les actions pour la conservation de ces espèces dans le futur.

Références bibliographiques

- Adjanahoun E.J., Aké Assi L., Ahmed A., Eymé J., Guinko S., Kayonga A. & Lebras, M. (1982). *Medecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution Aux études Ethnobotaniques et Floristiques Aux Comores*. ACCT, Paris, 218p
- Almeida F.C., Giannini N.P., Simmons N.B. and Helgen K.M. (2014). Each Flying Fox on Its Own Branch: A Phylogenetic Tree for Pteropus and Related Genera (Chiroptera: Pteropodidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 77C, 83–95.
- Billé R., Cury P., Loreau M. et Maris V. (2014). *Biodiversité: vers une sixième extinction de masse*. La ville brule, 189p
- Brown V.A., Brooke A., Fordyce J.A. and McCracken G.F. (2011). Genetic analysis of populations of the threatened bat Pteropus mariannus. *Conserv. Genet.* 12, 933– 941..
- Buckland S., Cole N.C., Groombridge J.J., Kupper C., Burke T., Dawson D.A., Gallagher L.E. and Harris S. (2014). High risks of losing genetic diversity in an endemic Mauritian Gecko: Implications for Conservation.” *PloS one*, 9(6), 1-14
- Burland T.M. and Wilmer J.W. (2001) Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Reviews*, 76, 389–409.
- Caldecott J.O., Jenkins M.D., Johnson T.H. and Groombridge B. (1996). Priorities for Conserving Global Species Richness and Endemism. *Biodiversity and Conservation*. 5, 699–727.
- Chan L.M., Goodman S.M., Nowak M.D., Weisrock D.W. and Yoder A.D. (2011). Increased population sampling confirms low genetic divergence among Pteropus (Chiroptera: Pteropodidae) fruit bats of Madagascar and other western Indian Ocean islands. *PLoS Curr*, 21, 1–17.
- Cheke A.S. (2011). Was the Flying-Fox Pteropus Comorensis on Mafia Island (Tanzania) Introduced By Humans ? *Journal of Est African Natural History*, 100(1&2), 59–68.
- Cheke A.S. and Dahl J.S. (1981). The Status of Bats on the Western Indian Ocean Islands with Special Reference to Pteropus. *Mammalia*, 45, 205–38.
- Cooper S.J.B., Reardon T.B. and Skilins J. (1998). Molecular Systematics of Australian Rhinolophid Bats (Chiroptera : Rhinolophidae). *Australian Journal of Zoology*, 46(3), 203-220.
- Desvars A., Duval T., Punelle C., Pascal M. and Vourc'h G. (2009). The flying fox Pteropus seychellensis of Mayotte (Comoros): method of capture and blood sampling. *Journal of Wildlife Management*, 45, 870–873.
- DGEF. (2000). *Strategie Nationale et Plan D'Action Pour La Conservation de La Diversité Biologique*. Rapport. PNUD/FEM/COI/97/BEF31. Moroni, 167p
- DGEF. (2012). *Plan d' Action pour l'Application du Programme de Travail Sur les Aires Protégées de La Convention sur la Diversité Biologique en Union Des Comores*.

- Rapport. PNUD/DGEF, 15p
- Diamond, J.M., Ashmole N.P. and Purves P.E. (1989). The Present, Past and Future of Human-Caused Extinctions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 325(1228), 469–77;
- Estrada A. and Coates-Estrada R.. (2002). Bats in Continuous Forest, Forest Fragments and in an Agricultural Mosaic Habitat-Island at Los Tuxtlas, Mexico. *Biological Conservation*, 103(2), 237–345
- Fox S., Waycott M., Blair D. and Luly J. (2012). Regional Genetic Differentiation in the Spectacled Flying Fox (*Pteropus Conspicillatus* Gould). In : Haberle S.G. and David B. (eds.). *Peopled Landscapes: Archaeological and Biogeographic Approaches to Landscapes*. Terra Australis 34, pp 459–472.
- Fox, S. (2006). *Population structure in the spectacled flying fox, Pteropus conspicillatus: a study of genetic and demographic factors*. Thesis, Schools of Tropical Biology, and Tropical Environment Studies and Geography. James Cook University, Townsville, 160p.
- Goodman S.M., Weyeneth N., Ibrahim Y., Saïd, I. and Ruedi M. (2010a). A Review of the Bat Fauna of the Comoro Archipelago. *Acta Chiropterologica*, 12(1), 117–141
- Goodman S.M., Chan L.M., Nowak M.D. and Yoder A.D. (2010b). Phylogeny and Biogeography of Western Indian Ocean Rousettus (Chiroptera : Pteropodidae). *Journal of Mammalogy* 91(3), 1–16. www.mammalogy.org.
- Granek E. (2000). Conservation des habitats des Roussettes de Livingstone , les massifs forestiers d'Anjouan et Moheli, Comores: Utilisation d'indicateurs socio-écologique. Yamkobe, 6-7, 131-137.
- Guindon G., and Gascuel O. (2003). PhyML: A Simple, Fast and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704.
- Heckman K. L., Rasoazanabary E., Machlin E., Godfrey L.R. and Yoder A.D. (2006). Incongruence between Genetic and Morphological Diversity in *Microcebus Griseorufus* of Beza Mahafaly. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 98.
- Hoffmann A.A., Hallas R.J., Dean J.A. and Schiffer M. (2003) Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest Drosophila species. *Science*, 301, 100–102.
- Hutson Jay, F. (2011). *Méthodes Bayésiennes pour la génétique des populations : Relations Entre structure génétique des populations et environnement*. Thèse de doctorat, Université de Grenoble, 168p
- Keitt B., Campbell K., Saunders A., et al. (2011). The Global Islands Invasive Vertebrate Eradication Database: A tool to improve and facilitate restoration of island ecosystems. in: Veitch C.R., Clout M.N., Towns D.R., (eds.) *Island Invasives: Eradication and Management*. International Union for Conservation of Nature. pp74–77
- Labat, J.N., and Fontaine B. (2011). *Connaitre pour conserver : Le Patrimoine naturel caché des Comores*. MNHN/FRB, Paris, 21p
- Larsen P.A., Hayes C.E., Wilkins M.A., Gomard Y., Sookhareea R., Yoder A.D. and Goodman S.M. (2014). Population Genetics of the Mauritian Flying Fox, *Pteropus Niger*. *Acta Chiropterologica* 16(2): 293–300.
- Librado P. and Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–52.

- Louette M. (2004a). Mammifères. *in*: Louette M., Meitre D. and Locque R. (eds.). *La faune terrestre de l'archipel des Comores*. Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, pp 65–87
- Louette M. (2004b). Environnement. *in*: Louette M., Meitre D. and Locque R. (eds.). *La faune terrestre de l'archipel des Comores*. Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, pp 11–51
- Louette M., Meitre D. and Locque R. (eds.). (2004). *La faune terrestre de l'archipel des Comores*. Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, 456 p.
- Macdougall A.S. and Turkington R. (2005). Are invasive species the drivers or passengers of change in degraded ecosystems? *Ecology*, 86(1), 42–55.
- MAPEEIA. (2009). *Quatrième Rapport National Sur La Diversité Biologique: Comores*. Rapport. Moroni, 104p
- Meyer C.F.J., Kalko E.K.V., and Kerth G. (1998). Small-scale fragmentation effects on local genetic diversity in two Phyllostomid bats with different dispersal abilities in Panama.” *Biotropica*, 41(1), 95–102. ISI:000261961100013.
- Meyer C. F.J. (2007). *Effects of rainforest fragmentation on neotropical bats: Land-Bridge Islands as a Model System*. Thesis. Ulm Universität, 164p.
- Mickleburgh S.P., Hutson A.M. and Racey P.A. (1992). *Old World Fruit Bats: An Action Plan for their Conservation*. IUCN, Gland, Switzerland, 263p
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B. and Kent J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M. and Li W. (1979). Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases (molecular Evolution/mitochondrial DNA/nucleotide Diversity). *Genetics*, 76(10), 5269–5273.
- Norberg U.M., Rayner J.M.V (1987). Ecological morphology and flight in bats (Mammalia: Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 316, 335–427.
- Norberg U.M.L., Brooke A.P. and Trehwella W.J. (2000). Soaring and non-soaring bats of the family Pteropodidae (flying foxes, Pteropus spp.): wing morphology and flight performance. *J. Exp. Bio*, 203, 651–664.
- O'Brien J. (2005). *Phylogeography and Conservation Genetics of the Fruit Bat Genus Pteropus (Megachiroptera) in the Western Indian Ocean*. Thesis. National University of Ireland, 178p
- O'Brien J., McCracken G.F., Say L. and Hayden T.J. (2007). Rodrigues Fruit Bats (*Pteropus Rodricensis*, Megachiroptera: Pteropodidae) Retain Genetic Diversity despite Population Declines and Founder Events. *Conservation Genetics*, 8, 1073–1082.
- O'Brien J., Mariani C., Olson L., Russell A.L., Say L., Yoder A.D. and Hayden, T.J. (2009). Multiple colonisations of the western Indian Ocean by Pteropus fruit bats (Megachiroptera: Pteropodidae): the furthest islands were colonised first. *Mol. Phylogenet. Evol*, 51(2), 294–303.
- Peakall R., Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pimm, S.L. and Raven P. (2000). Biodiversity: extinction by numbers. *Nature*, 403(6772),

843–45.

- Puechmaille S.J. and Petit E.J. (2007). Empirical evaluation of non-invasive Capture-Mark-Recapture estimation of population size based on a single sampling session. *Journal of Applied Ecology*, 44(4), 843–852.
- Pumo D.E., Goldin E.Z., Elliot B., Phillips C.J. & Genoways H.H. (1988). Mitochondrial DNA polymorphism in three Antillean island populations of the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 79–89.
- Ravaoarimanana I.B., Tiedemann R., Montagnon D. and Rumpler Y. (2004). Molecular and Cytogenetic Evidence for Cryptic Speciation within a Rare Endemic Malagasy Lemur, the Northern Sportive Lemur (*Lepilemur Septentrionalis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(2), 440–48.
- Raymond M. and Rousset F. (1995) GENEPOP (version 1.2) : population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 86, 248-249
- ReevesRicketts T.H., et al. 2005. Pinpointing and preventing imminent extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18497–18501.
- Roberts B.J., Catterall C.P., Eby P.v and Kanowski J. (2012). Long-distance and frequent movements of the flying-fox *Pteropus poliocephalus*: implications for management. *PLoS ONE* 7(8), 23-25.
- Ruedi M., Weyeneth N., Teeling E.C., Puechmaille S.J. and Goodman S.M. (2012). Biogeography of Old World Emballonurine Bats (Chiroptera: Emballonuridae) Inferred with Mitochondrial and Nuclear DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1),
- Saitou, N, and Nei M. (1987). The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–25.
- Salgueiro P., Coelho M.M., Palmeirim J.M. and Ruedi M. (2004) Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Molecular Ecology*, 13, 3357–3366.
- Sewall B.J., Granek E., Carroll J.B., Feistner A.T.C., Masefield W., Moutui M.F.E., Reason P.F., Rodriguez-Clark K.M, Saïd I., Trehwella W.J., Vély M. and Wells S. (2007). Plan d'Action pour la Conservation de la Roussette de Livingstone *Pteropus livingstonii*. Moroni, 68 pp
- Shilton L.A., Altringham J.D., Compton S.G. and Whittaker R.J. (1999). Old World Fruit Bats can be long-distance seed dispersers through extended retention of viable seeds in the gut.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266, 219-223.
- Sinclair E.A., Webb N.J., Marchant A.D. and Tidemann C.R. (1996). “Genetic Variation in the Little Red Flying-Fox *Pteropus Scapulatus* (Chiroptera: Pteropodidae): Implications for Management.” *Biological Conservation*, 76, 45–50.
- Smith F.D.M., May R.M., Pellew R., Johnson, T.H., Walter K.R. (1993). How Much Do We Know about the Current Extinction Rate? *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 375-378
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Tershy B.R., Shen K.W., Newton K.M., Holmes N.D., and Croll D.A. (2015). The importance of Islands for the Protection of Biological and Linguistic Diversity.” *BioScience* 65(6): 592–597.
- Tidemann C.R. and Nelson J.E. (2004). Long-Distance Movements of the Grey-Headed

- Flying Fox (*Pteropus Poliocephalus*). *Journal of Zoology*, 263(2), 141–46.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680
- ToewsTrehwella W.J., Reason P.F., Davies J.G. and Wray S. (1995). Observations on the timing of reproduction in the congeneric Comoro Island fruit bats, *Pteropus livingstonii* and *P. seychellensis comorensis*. *Journal of Zoology (London)*, 236, 327–331.
- Trehwella W.J., Rodriguez-Clark K.M., Davies, J.G., Reason P.F. and Wray S. (2001). Sympatric fruit bat species (Chiroptera: Pteropodidae) in the Comoro Islands (Western Indian Ocean): diurnality, feeding interactions and their conservation implications. *Acta Chiropterologica* 3, 135-147.
- Weyeneth N., Goodman S.M., Stanley W.T. and Ruedi M. (2008). The biogeography of Miniopterus bats (Chiroptera: Miniopteridae) from the Comoro Archipelago inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 17, 5205–5219.
- Wilson G.M., Byrd K.S., Caire W. and Van Den Bussche R.A. (2007). Lack of Population Genetic Structure in the Bat Fly (*Trichobius Major*) in Kansas, Oklahoma, and Texas Based on DNA Sequence Data for the Cytochrome Oxidase I (COI) and NADH Dehydrogenase 4 (ND4) Genes. *Proceedings of Oklahoma Academy of Science* 87: 31–36.
- Williamson M., Goodhart C.B., Webb D.A. and Cohen J. (1989). Natural Extinction on Islands [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 325(1228), 457-468.
- Webb N.J. and Tidemann C.R. (1995). Hybridisation between black (*Pteropus alecto*) and grey-headed (*P. poliocephalus*) flying-foxes (Megachiroptera: Pteropodidae). *Aust. Mammal*, 18, 19–26
- Weir B.S. and Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.