Rapport :

Mémoire de Master 2 : Biodiversité et Gestion de l'Environnement

Parcours : Recherche

Structure génétique à petite échelle spatiale des populations de la roussette de Livingstone (*Pteropus livingstonii*): implication pour la conservation.

ALI HASSANI Anziza
Année Universitaire 2018-2019

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

Sous la Direction de : Aurelien BESNARD, Mohamed-Thani IBOUROI & Claudine MONTGELARD

RESUME
Pteropus livingstonii est une espèce de mégachiroptères endémiques des îles d'Anjouan et Mohéli (Archipel des Comores). Elle est confinée dans les forêts montagneuses de hautes altitudes où elle se nourrit exclusivement de pollens, des fruits et des feuilles des plantes forestières. L'espèce joue donc un rôle capital dans la régénération des plantes et des forêts naturelles. La taille de sa population est estimée à environ 1200 individus (850 individus à Anjouan et 350 à Mohéli). *Pteropus livingstonii* fait face à des menaces et pressions liées à la dégradation et la fragmentation de son habitat naturel plus particulièrement à Anjouan où le taux de perte d'habitats naturels a été estimé à 73% sur une période de 10 ans (entre 1973 et 1983). Cette destruction et fragmentation des habitats rendent l'espèce de plus en plus vulnérable à l'extinction. Des mesures de gestions et de conservation urgentes visant à protéger cette espèce sont donc nécessaires pour assurer sa survie sur le long terme. Dans cette étude, nous présentons les résultats d'une étude de la diversité et de la structure génétique des populations de cette espèce à l'échelle des dortoirs de l'île d'Anjouan. Il s'agit de montrer si les différents individus de l'espèce issus des différentes localités de l'île sont structurés génétiquement ou pas dans un but final d'élaborer des méthodes de gestion et de conservation de l'espèce dans l'île d'Anjouan. Nous avons amplifié huit locus microsatellites de 67 individus (11 échantillons de tissus et 56 échantillons de matières fécaux) issus de différentes localités de l'île pour réaliser ces analyses. Nos résultats suggèrent un taux de diversité génétique relativement faible pour toutes les localités et un manque de différentiation génétique entre les différentes localités étudiées à l'exception de la localité de Bazimini (population séparée par 20 km des autres) qui est légèrement structurée par rapport aux autres localités. Le manque de différentiation génétique entre la majorité des dortoirs (localités) suggère des flux de gènes entre eux. Ces échanges de flux de gènes sont probablement limités entre les dortoirs du sud (où la majorité des dortoirs se localisent) et celui de Bazimini. Nous suggérons de considérer l'ensemble des dortoirs comme une seule unité de gestion pour la conservation de l'espèce. Toutefois, du fait de la différentiation entre les populations du sud et celle de Bazimini mais aussi du fait du taux élevé de fragmentations et de perte d'habitats dans cette île, il serait nécessaire d'envisager des campagnes de replantations entre les différents dortoirs pour développer des corridors de dispersion.
Mots clés : ***Pteropus livingstonii*, Anjouan (Comores), conservation, microsatellites, Structure génétique**

ABSTRACT

Pteropus livingstonii is a flying fox species located in the Anjouan and Mohéli Islands (Comoros Archipelago). The species is restricted to mountainous and high elevation forests where it feeds exclusively on pollens, fruits and leaves of forest plants. The species plays thus a vital role in plants and natural forests regeneration. Population size of the species is estimated to be about 1200 individuals (850 individuals in Anjouan and 350 individuals in Mohéli). *Pteropus livingstonii* faces different pressures and threats including natural forest degradation and fragmentation especially in the Anjouan Island where the rate of forest loss is estimated to be about 73% in a period of ten years (between 1973 and 1983). However, the currently high level of habitat disturbance and the conversion of natural forest into agricultural lands render the species vulnerable to extinction. Conservation measures are highly needed in order to assess relevant conservation management to ensure the viability of the species. In this study, we present some results of a fine scale genetic diversity and population structure of Livingston's flying fox population across roosts of the Anjouan Island. We aim at assessing if individuals from each locality are still connected by gene flows although the higher level of habitat fragmentation within the Island. Such information are crucially needed in order to propose conservation measures for the long-term conservation of the species. However, eight microsatellite loci were amplified on 67 different individuals (11 tissues and 56 fecal samples) to carry out such analyses. Our results suggest a relatively low

genetic diversity and the absence genetic structure between the majorities of roosts. We found a moderate genetic structure between the roost of Bazimini (located 20km from the other southeast roosts) and the other roosts. These results suggest that some gene flow probably still occur between the different sub-populations. These gene flow changes are probably limited between the locality of Bazimini and the other southeast roosts. We suggest however, to (1) consider all locality for this species in Anjouan as single management unit, (2) restore forests and secure corridors in the Anjouan remnant forests especially between the different roosts of the species.

Key words: *Pteropus livingstonii*, Anjouan (Comoros), conservation, microsatellite, fine scale genetic structure

Table des matières

I. INTRODUCTION 5
II. MATERIELS ET METHODES 10
Travail sur terrain 10
Milieu d'étude 10
Collecte des données 11
Travaux de laboratoire 12
Méthode d'extraction d'ADN 12
Méthode d'Amplification 12
Analyse des microsatellites 13
III. RESULTATS 14
Echantillonnage de terrain 14
Diversité génétique 14
Structure génétique 15
IV. DISCUSSION 19
Diversité génétique 19
Structure génétique entre les différents dortoirs 19
Facteurs influençant la structure génétique des populations 20
Implications pour la conservation 21
V. CONCLUSION 22
Perspective de recherche 23
VI. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE 24

I. INTRODUCTION

La biodiversité mondiale est incontestablement en déclin (Teyssèdre 2004; Smith et al. 1993). Ainsi plus de 24% des espèces de mammifères, 11% des espèces d'oiseaux et 11% des espèces végétales ont disparus à l'échelle planétaire (Teyssèdre 2004) De nombreux travaux scientifiques démontrent que ces déclins sont liés à des pressions anthropiques (destruction des habitats, déforestations et conversions des forêts en zones agricoles ou urbaines, (Diamond 1989, 1989; Teyssèdre 2004; Billé et al. 2014). Par exemple, l'étude de Diamond et collaborateurs (1989), a montré que l'extinction des Moas en nouvelle Zélande et des lémuriens géants de Madagascar est due à l'expansion démographique de l'homme et aux fortes exigences énergétiques et spatiales que cette expansion implique.

Les régions insulaires sont parmi les zones du monde les plus touchées par ces forts taux de pertes de biodiversité (Quiterie et al. 2019; Leclerc, Courchamp, and Bellard 2018; Holmes et al. 2019). Ces régions sont caractérisées par de faibles richesses spécifiques en comparaison avec d'autres masses continentales (les espèces sont moins redondantes et plus irremplaçables) mais les espèces des îles présentent en contrepartie de forts taux d'endémismes (Costanzi and Steifetten 2019). Les espèces inféodées à ces régions insulaires sont de fait les plus vulnérables à l'extinction à relativement court-terme (Billé et al., 2014, Tershy et al. 2015; MacDougall and Turkington 2005). Par exemple, plusieurs études ont montré que plus de 367 espèces (mammifères, oiseaux reptiles, amphibiens , poissons) ont complètement disparues sur les îles contre seulement 124 sur les continents (Pimm et al. 2014; Pimm and Raven 2000; Pimm et al. 2014; Ricketts et al. 2005; Smith et al. 1993). De plus, Tershy et collaborateurs (2015) ont montré que 61% de toutes les espèces éteintes étaient localisées dans les régions insulaires alors que les îles ne représentent qu'environ 5 % de la surface de la terre (Keitt et al. 2011). Les espèces insulaires présentent généralement des tailles de populations très faibles et sont aussi confinées dans des aires de distribution très restreintes. Ces caractéristiques les rendant très vulnérables à l'extinction sous la pression des modifications des habitats (Williamson 1989). Du fait de leurs isolements géographiques, leurs possibilités de disperser en réponse aux changements brusques d'habitats sont fortement aussi réduites (Paulay 1994). Par ailleurs, les pressions anthropiques sont fortes sur les îles

(Jantz et al. 2015). Parmi les menaces liées aux activités humaines, celle impactant le plus la biodiversité insulaire est la fragmentation des habitats (qui est rapidement visible dans les îles du fait de leurs faibles étendues). Cette fragmentation joue un rôle majeur dans l'extinction des espèces insulaires (Paulay 1994). Cette fragmentation conduit à la réduction d'un habitat favorable pour une espèce donnée en un ensemble de patches favorables mais entourés par des zones non favorables à l'espèce. De ce fait, elle réduit la connectivité entre les sous--populations isolées (Jackson and Fahrig 2016). Cet isolement des sous-populations engendre plusieurs phénomènes à la fois démographiques et génétiques notamment (1) la réduction des tailles des populations dans les patches, (2) la réduction des mouvements entre les patches et donc des flux de gènes entre les sous-populations (Donlan and Wilcox 2008). De plus, cet isolement des sous-populations peut être à l'origine des phénomènes stochastiques chez ces populations, comme par exemple la dérive génétique, la dépression de consanguinité et l'effet Allee (Jackson and Fahrig 2016). Cela va engendrer une perte du pouvoir adaptatif des espèces et ainsi augmenter leurs risques d'extinction (Soulé et al. 1988; Weigelt and Kreft, 2013). Ceci montre bien l'importance de mener des études dans les zones insulaires afin de mieux appréhender les causes de déclins de ces espèces et de proposer des mesures adaptées à leur conservation à long terme (Williamson 1989).

L'archipel des Comores est une zone insulaire mondialement reconnue pour son importance en termes de biodiversité (Myers et al. 2000). La diversité paysagère des Comores, le nombre de ses écorégions, la multiplicité de ses climats ainsi que sa singularité géographique font de ces îles une des régions de l'océan indien les plus riches en faune et en flore avec un taux d'endémisme élevé (Louette et 2004; Goodman et al. 2010). Les îles Comores abritent tous les grands groupes taxonomiques excepté les grands mammifères (Louette et 2004; Goodman et al. 2010). En 2008, Weyeneth et collaborateurs ont montré que la faune comorienne est constituée d'un mélange de la faune Africaine et Malgache. Cette biodiversité a une importance écologique, écotouristique et socio-culturelle et sa conservation et sa valorisation apparaît comme nécessaire au développement économique du pays (Louette et 2004).

Cependant, cette biodiversité exceptionnelle des Comores fait face à des pressions anthropiques très fortes induisant une perte d'habitats naturels. La vitesse de cette dégradation des habitats naturels est classée au premier rang mondial (9,3 % par an, FAO 2010). La principale cause de ces menaces est la pauvreté qui pousse la population de l'archipel à une utilisation non-durable des ressources naturelles (Louette et 2004). La conversion des habitats

naturels en zones de cultures et en zones d'habitations ainsi que l'exploitation excessive du bois conduisent à une perte progressive des habitats naturels et à leur fragmentation (Sewall et al. 2007). En plus, l'exploitation du bois de chauffe comme combustible et pour la construction constituent une menace majeure sur cette biodiversité (Ibouroi, et al. 2018; Sewall et al. 2007). Enfin, l'accès inadéquat aux soins de santé et à l'éducation, la croissance démographique rapide, la faible connaissance des besoins de la faune des Comores, la construction de routes à travers la forêt sont des causes qui contribuent toutes plus ou moins directement, mais durablement, au déclin de la biodiversité de l'archipel (Louette et 2004 ; Sewall et al. 2007 ; Trewhella et al. 2001).

Les chauves-souris des Comores représentent un des groupes de mammifères les plus diversifiés de l'archipel (Goodman et al. 2010). Au total, 10 espèces de chauves-souris appartenant à cinq familles sont connues aux Comores (Goodman et al. 2010). Parmi ces 10 espèces, sept sont des microchiroptères insectivores et trois sont des mégachiroptères frugivores, plus précisément des roussettes (Sewall et al. 2007 ; Trewhella et al. 2001; Goodman et al. 2010). Du fait de cette richesse spécifique élevée des chauves-souris, elles jouent un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes naturels de ces îles (Trewhella et al. 2001). Ayant des aires de repartions différentes mais aussi des régimes alimentaires peu redondants, chaque espèce intervient à sa manière dans le fonctionnement des écosystèmes avec une fonction bien précise d'où l'intérêt global de cette diversité spécifique pour l'équilibre des écosystèmes (Stanton et al. 2019). Certaines espèces interviennent ainsi dans la régulation d'insectes nuisibles des plantations (Goodman et al. 2010), d'autres contribuent dans l'amélioration des agrosystèmes par la pollinisation (ex : *Rousettus obliviosus*), alors que d'autres interviennent dans la régénération des forêts et dans la dynamique des écosystèmes notamment en dispersant les graines des arbres et favorisant ainsi le maintien de la connectivité entre les fragments forestiers (ex : *Pteropus seychellensis comorensis, P. livingstonii*).

La roussette de Livingstone (*Pteropus livingstonii*) est une espèce de chiroptère endémique de Comores distribuée dans les îles d'Anjouan et de Mohéli (Trewhella et al. 2001). Elle est actuellement confinée dans des zones étroites de forêts naturelles à pente raides de 30 à 50° avec des altitudes variant entre 500 à 1100 m (Ibouroi, et al. 2018). En 2001, le nombre de dortoirs de cette espèce avait été évalué à 12 dont 10 à Anjouan et 2 à Mohéli (Trewhella et

al. 1998) avec une taille de population estimée entre 200 à 400 individus (Reason and Trewhella 1994; Trewhella et al. 1998). Des études plus récentes ont montré que l'espèce est localisée dans 21 dortoirs sur Anjouan et Mohéli et que la taille de sa population est de l'ordre de 1200 individus, ce qui en fait un des chiroptères des plus menacé d'extinction au niveau mondial (Daniel et al.2016 ; Ibouroi, et al. 2018). Le régime alimentaire de cette espèce est constitué exclusivement de pollen, de fruits et de feuilles des plantes forestière, majoritairement d'espèces endémiques du pays (Trewhella et al. 2001) . *Pteropus livingstonii* joue de ce fait un rôle capital dans la régénération des plantes des forêts naturelles. Du fait de sa grande taille (800 gr, Goodman et al. 2010), de ses grands déplacements, et de son mode de vie en colonie (70 individus par colonie en moyenne, Ibouroi et al. 2018), l'espèce est en mesure de disperser des fruits de grandes tailles sur de longues distances, ce qui n'est pas le cas des oiseaux frugivores ou d'autres mammifères tels que les lémuriens par exemple dont la capacité de dispersion est faible (Valenta, 2014). Son rôle est donc très important car elle est une des rares, si ça n'est la seule espèce, capable d'assurer la connectivité entre des patches forestiers souvent éloignés les uns des autres (Sewall et al. 2007).

Toutefois, *Pteropus livingstonii* n'est pas épargné par les menaces qui pèsent sur la biodiversité des Comores (Ibouroi et al. 2018). Il est à noter qu'une grande partie de la population de l'espèce (850 des 1200 individus) se loclaise sur l'île d'Anjouan, là où la dégradation et la fragmentation des habitats naturels sont les plus marquées comparées aux autres îles (Boussougou, et al. 2017; Sewall et al. 2007). La perte d'habitats naturels dans cette île sur une période de 10 ans (entre 1973 et 1983) a été estimée à environ 73% contre 36% et 53% pour les îles de la Grande Comores et de Mohéli respectivement (Goodman et al. 2010). Cette dégradation des forêts naturelles de l'île, au profit de l'agriculture mais aussi de la production des huiles essentielles, notamment l'huile d'Ylang, a fortement modifié l'état original des habitats naturels de l'espèce (Sewall et al. 2007). L'île d'Anjouan ne renferme plus actuellement que quelques vestiges de forêts naturelles intactes entourées par des savanes, des zones de plantations et de quelques forêts naturelles fortement dégradées (Fig .1 ; Sewall et al. 2007). Une étude précédente (Ibouroi, et al. 2018) traitant de la structure génétique du *P. livingstonii* entre les deux îles où elle se localise a montré une forte structuration entre ces deux populations situées à 40km l'une de l'autre et séparées par la mer. Bien que les dortoirs étudiés à Mohéli soient séparés seulement par un kkilomètre environ, ceux d'Anjouan sont séparés par des distances allant de 2 à 20 km (Fig .1). Il est donc fort probable qu'une espèce dont les populations sont fortement structurées entre 40 km soit aussi

structurée entre des sous-populations séparées de 30 km entre dortoirs au sein d'une même île. Dans ce sens, la fragmentation des forêts à Anjouan pourrait avoir des impacts négatifs sur ces populations en réduisant la connectivité entre les sous-populations. Cette situation pourrait donc engendrer, comme vu ci-dessus, de la dérive génétique et pourrait ainsi augmenter la vulnérabilité de cette espèces avec de forts risques d'extinction (Jackson and Fahrig 2016). Nombre de scientifiques avancent que cette espèce fait aussi face à d'autres menaces telles que les cyclones qui peuvent causer de nombreux dégâts notamment la destruction des arbres dortoirs mais aussi des plantes utilisées pour l'alimentation (Trewhella et al. 2001 ; Cheke and Dahl 1981; Louette *et al.*, 2004). Ces destructions de type naturel accentuent les menaces et rendent l'espèce de plus en plus vulnérable. Des mesures de gestion et de conservation urgentes visant à protéger cette espèce sont donc nécessaires pour assurer sa survie sur le long terme.

Cette étude a pour but d'étudier la structure génétique des noyaux de populations de l'espèce *Pteropus livingstonii* au sein de l'île d'Anjouan. Elle vise notamment à :

- ✓ Evaluer le niveau de structuration génétique des noyaux de populations entre les sites de repos dans cette île et voir si ces sites sont reliés par des flux géniques ou pas,
- ✓ Evaluer le niveau de la diversité génétique de cette espèce au sein de chaque site.

Ces informations permettront de réfléchir aux modes de gestion et de conservation de l'espèce, notamment en termes spatiaux et de connectivité entre gîtes. Plus précisément, elles aideront à mieux choisir les zones appropriées pour l'élaboration d'éventuels corridors de dispersion entre les différents gîtes pour assurer le maintien de flux du gène entre eux si nécessaire.

La compréhension de la structure génétique des populations ou sous-populations représente un défi majeur pour les conservateurs et les gestionnaires de la biodiversité. Tout d'abord, il n'existe pas des preuves concrètes pour identifier des populations en terme de conservation et aucun indice visible qui permettrait de subdiviser un ensemble de sous-populations en plusieurs sous-unités génétiques de gestion (Stanton et al. 2019; Buckland et al. 2014). Or, pour élaborer des mesures de conservations adéquates, il est nécessaire d'acquérir des connaissances sur la structure génétique des populations ou sous-population et les échanges de gènes entre populations. Ainsi par exemple, des mesures de conservation ont été suggérées de manière explicite pour la roussette des îles Mariannes et des îles Palaos (*Pteropus marianus)* stipulant qu'elles doivent être considérées comme des sous-unités différentes. Au

contraire les dortoirs de *Pteropus marianus* dans les îles de Mariannes peuvent être considérés comme une seule unité de gestion car il existe des flux de gènes entre ces sous-populations à l'intérieur de l'île (Brown et al. 2011a). Par ailleurs, les études génétiques peuvent aider à bien identifier des phénomènes comme l'isolement due à la distance du fait de l'existence de barrières naturelles ainsi qu'anthropiques afin de proposer des mesures de conservation particulières. C'est par exemple ce qui a été réalisé dans le cas d'une espèce insulaire *Anthus berthelotii* oiseau endémique de trois archipels atlantiques dans le nord de la Californie (Spurgin et al. 2014) pour les populations ou sous populations concernées (Meyer, 2007, Buckland et al., 2014 ; Stanton et al. 2019). Il est donc nécessaire d'avoir des connaissances sur la structure génétique entre sous-populations de *Pteropus livingstonii* pour prévoir les conséquences génétiques de la fragmentation de l'habitat à petite échelle et proposer des mesures de gestion pertinentes.

II. MATERIELS ET METHODES

Travail sur terrain

Zones d'étude

Cette étude a été réalisée dans l'île d'Anjouan (Archipel des Comores). L'île d'Anjouan a une superficie estimée à 424 km². Elle est séparée des autres îles de l'Archipel des Comores par une distance de 60 km en moyenne (Louette et al. 2004). L'île présente une topographie très accidentée avec des crêtes aiguës et des flancs abrupts. Son relief est constitué d'une série de chaines de hautes montagnes, dont le point culminant atteint 1595m d'altitude où on identifie actuellement quelques vestiges de forêts naturelles. La partie centrale de l'île est profondément entaillée par de grands cirques. Les trois extrémités de l'île sont dominées par des falaises au niveau du littoral avec un récif frangeant (Louette et al. 2004). L'île est aussi caractérisée par des sols profonds et fragiles, très sensibles à l'érosion induite par l'exploitation des terres. Anjouan se caractérise également par un bon réseau de rivières permanentes (Fig.1).

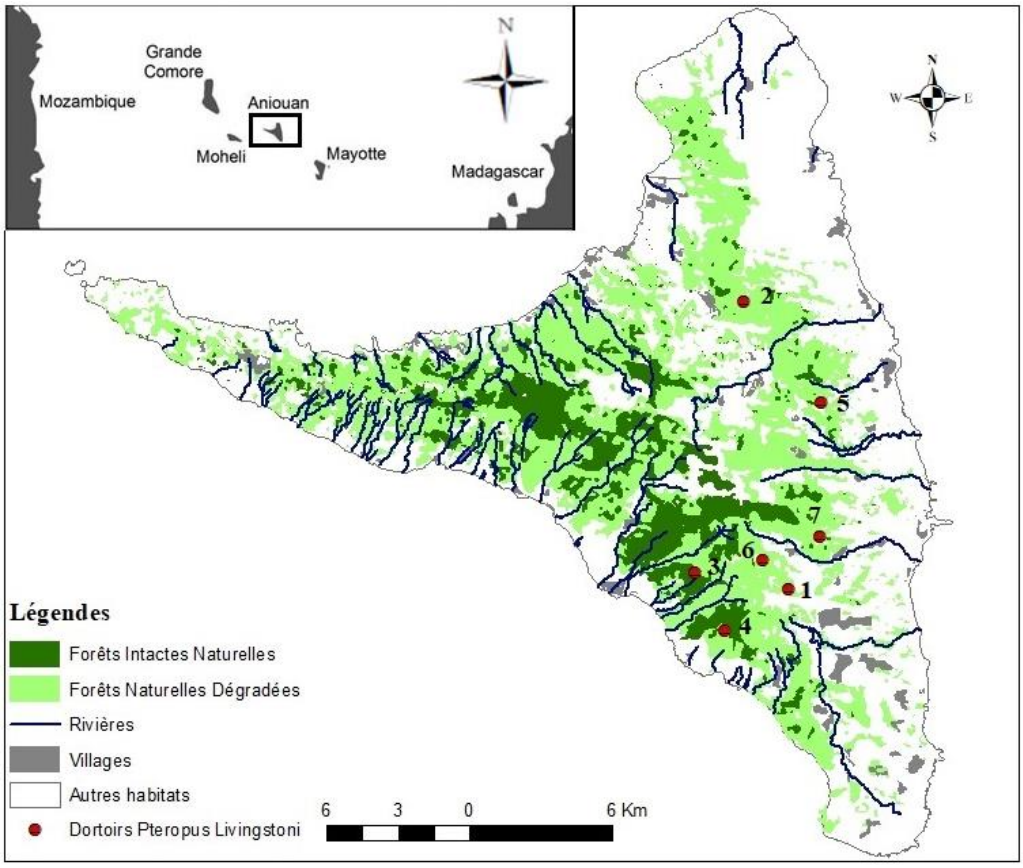

Fig.1 : Sites d'échantillonnages de *P. livingstonii* dans l'île d'Anjouan; les points rouges représentent les sites d'échantillonnage (1= Ada, 2= Bazimini, 3= Kowé, 4= Moya, 5= Mromaji, 6= Ouzini, 7= Salamani)

Au total, sept dortoirs de *P. livingstonii* de l'île d'Anjouan ont été échantillonnés lors des différentes missions sur terrain. Il s'agit des dortoirs d'Ada, Bazimini, Kowé, Moya, Mromaji, Ouzini, et Salamani. Les dortoirs d'Ada, Kowé, Moya, Ouzini, et Salamani sont localisés dans la région Sud-Centre (Domoni-Nyoumakelé) et sont distants d'environ 2 à 3 km entre eux (Fig. 1). Le dortoir de Mromaji est localisé dans la partie Est alors que le dortoir de Bazimini est localisé dans la partie Nord de l'île à environ 20 km du dortoir de Moya et Kowé (région Sud, Fig.1).

Collecte des données

Au cours des différentes missions de terrain sur l'île d'Anjouan (réalisées entre 2014 et 2019), nous avons collecté à la fois des échantillons de tissus et de fèces. Pour capturer les animaux en vue de collecter les échantillons de tissus, nous avons utilisé la méthode des filets de

canopée (Ibouroi et al. 2018a). Ces filets de type japonais de 12 m de longueur et 3 m de hauteur au maillage de 2,5 cm ont été étalés le long des passages naturels des individus dans les sites dortoirs des animaux (Ibouroi, et al. 2018). Chaque individu capturé a été marqué par incision au niveau de l'oreille lors de sa première capture et les biopsies collectées (2 mm) ont été conservés dans des tubes contenant de l'alcool à 96°. Chaque individu capturé a été relâché directement à l'endroit de capture. Les collectes des échantillons de crottes ont été réalisées en utilisant des bâches en plastique placées en dessous de chaque arbre gîte entre 18h00 à 8h00. Les matériels fécaux ont ensuite été ramassés et placés individuellement dans des tubes de 5 ml contenant de l'Ethanol à 96 ° ou contenant du silica-gel. Les échantillons ont été conservés à température ambiante (20–30 ° C) aux Comores avant d'être transportés en France et congelés (- 4 ° C) en attendant l'extraction d'ADN.

Travaux de laboratoire

Méthode d'extraction d'ADN

Les échantillons des fèces ont été extraits au sein de la plateforme « ADN dégradé » du LABEX CeMEB de l'Université de Montpellier en utilisant un kit Qiagen (DNeasy mericon Food N°69514). Pour les échantillons de tissus, les extractions ont été réalisées dans le « Service des Marqueurs Génétiques en Ecologie » (SMGE) au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive en utilisant le Kit Qiagen (DNeasy blood and tissue, No. 69506).

Méthode d'Amplification

L'amplification d'ADN pour les deux types d'échantillons (tissus et crottes) a été réalisée en utilisant la méthode Réaction en Chaine Polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Pour cela, 8 locus microsatellites (A1, C6, PH9, A2, CSP7, A3, B29 et PH4) décrits pour *Pteropus rodricensis* (O'Brien et al. 2007) ont été amplifiés.

Les amorces *forwards* ont été marquées par fluorescences et ont été combinées avec les amorces *reverses* dans 3 multiplexes (M1, M2, M3, Table 1). Chaque PCR contenait un mélange de 10µl (5µl (2pM) de tampon du Multiplex Qiagen (Tampon 2X, 3mM MgCl2, Taq, dNTPs), 1µl (2pM) du mélange d'amorces pour chaque multiplexe, 1µl ou 2µl d'ADN pour les échantillons de tissus et de crottes respectivement et 3µl d'eau. La réaction PCR a été lancée dans un thermocycler Eppendorf (Mastercycler epgradient S) dans les conditions suivantes: une dénaturation initiale à 95 °C pendant 15 min, suivie par 35 cycles de dénaturation (94 °C, 30 s, 90 s à 52 °C, 50 °C et 54 °C respectivement pour les multiplexes M1, M2 et M3, Table 1), une élongation (1 min à 72 °C), et en fin une étape d'élongation finale de 30 min à 60 °C.

Tableau 1: Propriétés des 9 locus microsatellites utilisés dans cette étude.

Multiplexe (M)	Locus	température	Couleurs	Taille d'allèles
	A1	52 °C	Red	145–163
M1	**C6**	52 °C	Blue	208–314
	PH9	52 °C	Green	215–265
	A2	50 °C	Blue	171–187
M2	**A8**	50 °C	Red	NA
	CSP7	50 °C	Green	250–278
	A3	54 °C	Red	277–359
M3	**B29**	54 °C	Blue	210–254
	PH4	54 °C	Black	273–285

Les produits PCR ont été envoyés pour le Génotypage dans la plateforme de Génotypage Séquençage du LabEx CeMEB. Pour cela, nous avons réalisé des dilutions pour chaque produit PCR en fonction des tailles des bandes obtenues après contrôle d'un gel d'agarose à 1%. Les produits ont été analysés dans un séquenceur de 16 ou 24 capillaires (3130 xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) avec la taille standard GS400 (-250) LIZ500 et les allèles pour chaque échantillon ont été vérifiés et corrigés en utilisant le programme GeneMapper v4.5 (Applied Biosystems).

Analyse des microsatellites

La présence d'allèles nuls et d'allèles privés a été testée en utilisant le programme MicroChecker v.2.2.3 **(**Van Oosterhout et al. 2004). Pour déterminer les échantillons uniques des crottes (par la méthode d'identification individuelle), le programme GenAlex 6.1 (Peakall and Smouse 2006) a été utilisé. Ainsi, nous avons évalué la probabilité que deux échantillons fécaux tirés au hasard présentent des génotypes identiques (probabilité d'identité ou PID).

Une valeur de PID < 0,001 est requise pour que les deux échantillons tirés au hasard soient considérés comme deux individus différents (Ibouroi et al. 2018a).

La déviation à l'équilibre de Hardy – Weinberg (HWE) a été testée avec le programme Genepop version 4.2 (Rousset 2008). La diversité génétique a été mesurée à travers des paramètres tels que l'hétérozygotie observée (Ho), l'hétérozygotie attendue (He), le nombre moyen d'allèles par locus (Na), la richesse allélique (Ar), et le coefficient de consanguinité (FIS). Pour cela, nous avons utilisé le programme GenAlex 6.1 pour calculer ces paramètres. Pour évaluer la richesse allélique (Ar), nous avons utilisé la méthode de raréfaction (tableau2) à l'aide du programme HP-Rare 1.0 (Kalinowski 2005). Pour étudier la structuration des populations nous avons utilisé la méthode de *Pairwise Fst*. Les valeurs de Fst ont été calculées entre les coupkes de dortoirs à l'aide du programme GenAlex 6.1. En utilisant ce même programme, une analyse de variance moléculaire (AMOVA) a aussi été réalisée afin d'étudier la variabilité entre les dortoirs mais aussi entre les individus.

La structure génétique de la population entre les dortoirs a été estimée par la méthode de Classification Bayésienne en utilisant le programme STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, Stephens, and Donnelly 2000). Pour cela, nous avons supposé un ensemble de valeurs (k=1 à 10) qui représentent le nombre de sous-populations potentielles. La valeur de K la plus probable est obtenue en traçant un graphique des valeurs des vraisemblance pour chaque valeur de K, mais aussi le ΔK en utilisant le package *pophelper* (Francis 2017) dans le programme R 3.3.2 (R Development Core Team 2018).

III. RESULTATS

Echantillonnage de terrain

Au total, 67 échantillons dont 11 échantillons de tissus et 56 échantillons de fèces de Roussettes de Livingstone ont été utilisés pour les analyses. 12 échantillons partageant le même génotype ont été identifiés et ont été exclus des analyses. Aucun allèle nul n'a été identifié pour les différentes localités ni pour l'ensemble du jeu de donné. Aucune déviation à l'Equilibre de Hardy-Wemberg (HWE) n'a été observée pour chaque localité et pour chaque locus.

Diversité génétique

Les valeurs moyennes de la diversité génétique pour chaque population sont présentées dans le Tableau 2. Tous les locus sont polymorphes et le nombre d'allèles par locus variait de 3

(A1) à 10 (PH9). Considérant les résultats obtenus pour chaque localité, le nombre d'allèles variait de 2,75 (localité de Bazimini) à 3,87 (localité de Salamani) avec une moyenne de 3,50 allèles par localité. La richesse allélique moyenne a été évaluée entre 2,67 (localité de Ouzini) et 2,82 (localité de Ada). Les taux moyens d'hétérozygocités observés et attendues ont été évalués respectivement entre 0,463-0,560 et entre 0,413-0,506 (Tableau 2). Les taux d'hétérozygotie observés les plus élevés sont observés pour les localités de Bazimini, Kowé, Moya et Salamani contrairement aux localités d'Ada, Mromaji et Ouzini où ces taux sont faibles. Par ailleurs, le taux d'hétérozygotie attendue le plus élevé est observé pour la population de Mromaji. Les valeurs moyennes des coefficients de consanguinité (FIS) sont faibles avec des p-values non-significatives pour toutes les localités (p-values > 0,05, Tableau 2).

Populations	**N**	**Na**	**H0**	**He**	**Ra**	**Fis**
Ada	8,000	3,500	0,464	0,491	2,820	0.1164
Bazimini	6,000	2,750	0,552	0,413	2,690	-0.1765
Kowé	10,000	3,375	0,528	0,499	2,780	0.0016
Moya	10,000	3,750	0,507	0,460	2,820	-0.0651
Mromaji	11,000	3,625	0,493	0,506	2,790	0.0592
Ouzini	11,000	3,625	0,463	0,434	2,620	0.0090
Salamani	12,000	3,875	0,560	0,471	2,730	-0.1530

N : nombre d'individus, Na : nombre d'allèles, H0 : hétérozygotie observé, He : hétérozygotie attendu, Ra : richesse allélique, Fis : coefficient de consanguinité, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Structure génétique

Les valeurs des FST pour chaque couple de sites (localités) sont présentées dans le Tableau 3. Le FST prend des valeurs faibles dans presque tous les couples de localités excepté pour la localité de Bazimini en comparaison avec toutes les autres localités (Tableau 3). Ces résultats suggèrent que ces différentes localités ne sont pas structurées génétiquement à l'exception de la localité de Bazimini où une structuration évidente entre sa sous-population et les autres sous-populations est observée.

Tablau3 : Valeurs de FST estimés par couples entre les 7 localités, les valeurs des Fst les plus élevées sont présentées en gras

Ada	Bazimini	Kowé	Moya	Mromaji	Ouzini	Salamani	
-							Ada
0,078	-						Bazimini
0,040	**0,114**	-					Kowé
0,027	**0,087**	0,066	-				Moya
0,045	**0,074**	0,047	0,049	-			Mromaji
0,032	**0,087**	0,045	0,021	0,036	-		Ouzini
0,024	**0,091**	0,033	0,030	0,035	0,033	-	Salamani

Les résultats obtenus avec le test d'AMOVA sont représentés dans la figure 3. Cette analyse montre une variation inter-localités de 9% contre une variation génétique intra-population de 82%.

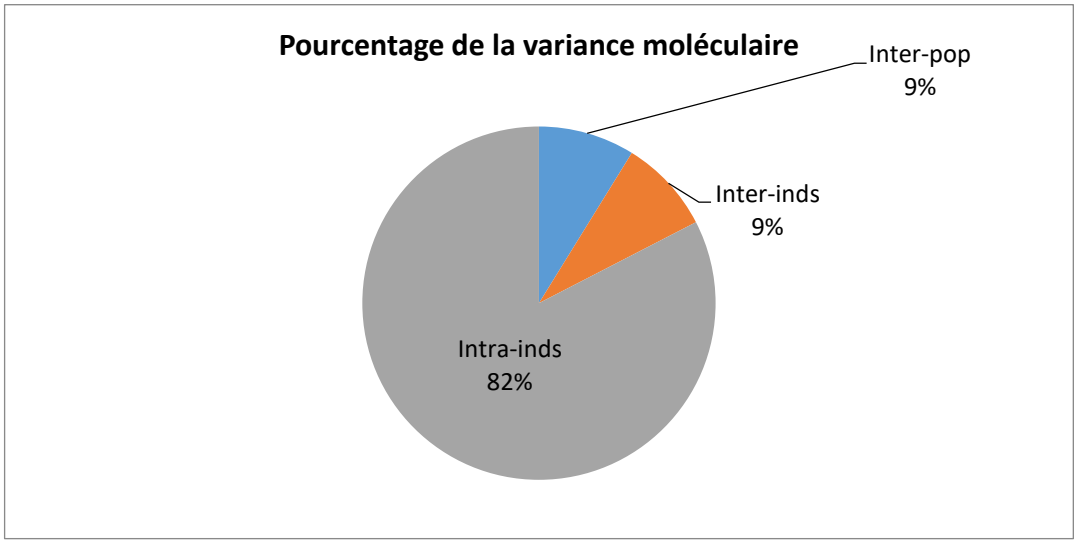

Fig.2. pourcentage de la variance moléculaire entre les individus et entre les localités

L'analyse Factorielle réalisée avec le programme Genetix suggère qu'il n'y a pas de structuration génétique entres les différents localités d'une manière générale. Suivant ces résultats, seule la localité de Bazimini se différentie légèrement des autres localités (Fig. 4).

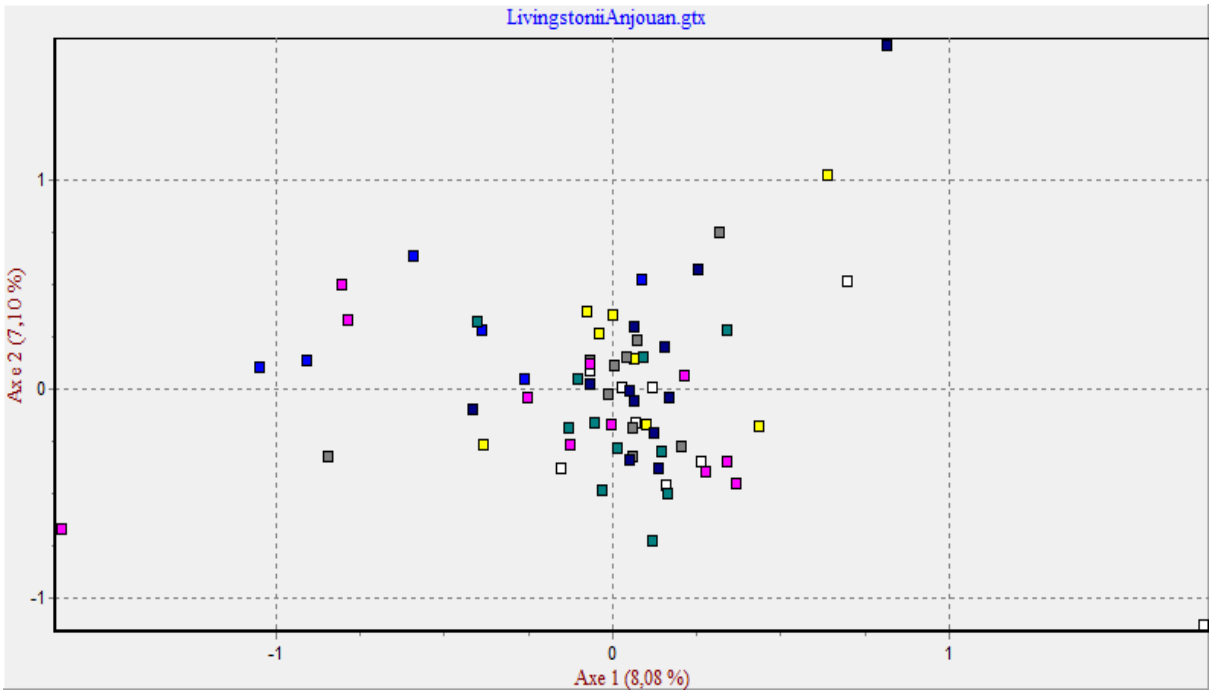

Fig. 3. Analyse de Composantes Factoriels de données microsatellites montrant les interactions des individus de *P. livingstonii* dans les différentes localités.

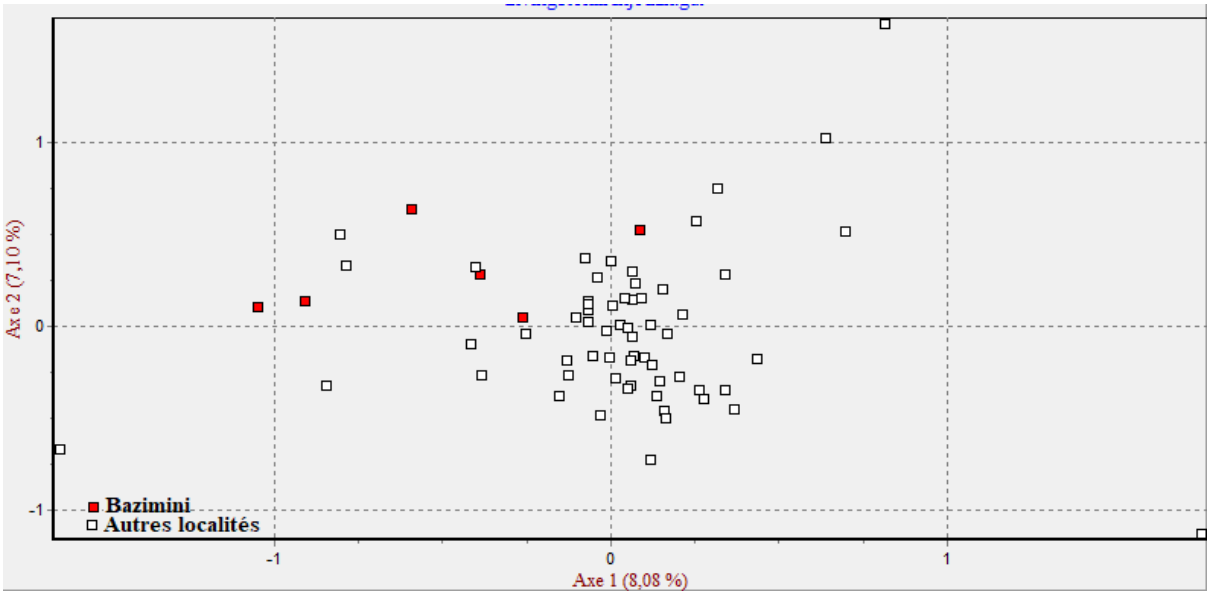

Fig. 4. Structure génétique entre la localité de Bazimini (en rouge) et les autres localités (en blanc) en utilisant l'analyse Factorielle.

L'utilisation du programme STRUCTURE à travers l'analyse bayésienne mais aussi à travers la méthode d'Evanno et du Δk suggère que la meilleure valeur de K est de k=3 (Fig. 5). Malgré cette valeur précise de k, il est difficile de différentier les 3 sous-populations identifiées par l'analyse bayésienne (Fig. 6).

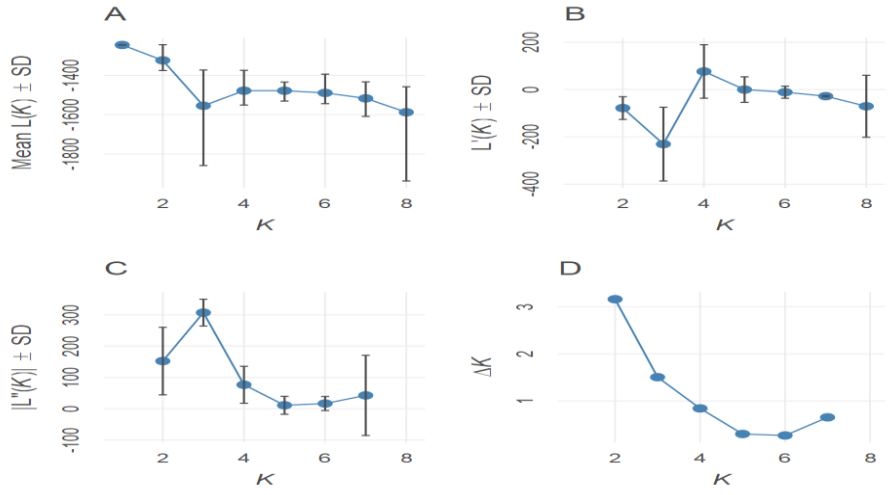

Fig.5. graphe de likelihood Ln(K) avec la function de K et le ΔK pour *P. livingstonii*

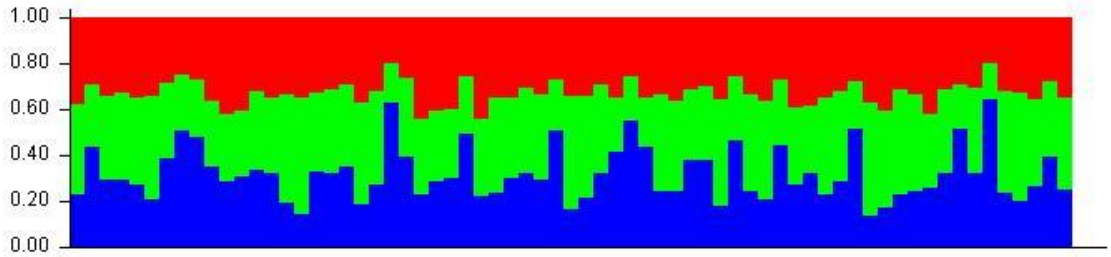

Fig.6. Structuration génétique des populations *du Pteropus livingstonii* entre les différentes localités à Anjouan (K = 3)

L'ensemble des analyses montrent bien que les localités dans l'île d'Anjouan subissent des échanges réguliers entre elles. Ceci suggère qu'il existe probablement des flux de gènes entre ces différentes localités à l'exception de la localité de Bazimini où les taux d'échanges avec les autres localités sont probablement limités.

IV. DISCUSSION

Diversité génétique

Les valeurs de diversité génétique dans les différentes localités étudiées (séparées de 3 à 20 km, Figure 1) au cours de notre étude sont comparables aux valeurs globales obtenues par Ibouroi et al. (2018a) pour les populations de Anjouan et de Mohéli. En comparaison avec d'autres résultats pour d'autres espèces du genre *Pteropus* et notamment dans l'océan Indien et de l'Asie, nos valeurs peuvent être considérées comme faibles. Par exemple, l'étude de Fox et al. (2012) traitant de la diversité et de la structure génétique (6 locus microsatellites avec 712 individus) à l'échelle des dortoirs pour *Pteropus conspicillatus* suggère des valeurs élevées de diversités génétiques dans les différentes localités (H0=0.783, He= 0.799). O'Brien et al. (2007) obtient lui aussi des valeurs de diversités génétiques assez élevées (H0=0.571, He= 0.634) pour *Pteropus rodricensis* dans une étude de 57 individus. Comme cela a été discuté dans Ibouroi et al. (2018a), ces taux faibles de diversités génétiques peuvent être expliqués par taux de dérives génétiques et de consanguinité élevés du fait de la petite taille de la population étudiée (environ 900 individus dans toute l'île) et de leurs capacité de dispersion faible notamment entre les populations de Anjouan et celle de Mohéli (l'île située à 40 km de Anjouan).

Structure génétique entre les différents dortoirs

Un grand nombre d'études ont démontré que les chauves-souris du genre *Pteropus* sont dotées de fortes capacités de dispersion et peuvent parcourir jusqu'à 100 km durant une même nuit (Oleksy et al 2015, 2019). Ces capacités élevées de dispersion favorisent le maintien des flux de gènes entre les noyaux de populations isolées et tendent de fait à maintenir les connectivités entre ces sous-populations (Larsen et al. 2014; Fox et al. 2012; Brown et al. 2011b). Par exemple, des différentiations génétiques faibles ont été obtenues par Ingleby and Colgan (2003) pour des populations de *Pteropus tonganus* localisées dans des zones géographiques séparées par environ 2500 km. Ibouroi et collaborateurs (2018a) ont suggéré une différentiation génétique faible pour *Pteropus seychellensis comorensis* dans les îles des Comores séparées par une distance moyenne de 60 km (voir aussi Chan et al. - 2011). Cependant, d'autres espèces de *Pteropus* sont aussi caractérisées par des taux faibles de dispersions entre des zones relativement proches (Russell et al. 2016). Par exemple, Russell et al. (2016) ont montré une forte structuration génétique des populations de *P. samoensis* situées dans des endroits très proches des îles Samoa et Fijji (5 à 100km). Pour *P. livingstonii*, (O'Brien et al. 2007; Larsen et al. 2014; Fox et al. 2012; Brown et al. 2011b) ont montré des

taux élevés de structurations génétiques entre les îles d'Anjouan et Mohéli (séparées par une bande de mer de 40 km) et ont suggéré qu'entre ces deux populations, les flux de gènes sont très limités avec des taux de migrations relativement faibles entre les individus des deux îles. D'une manière plus globale, notre étude suggère des taux de structuration faible entre les différentes localités étudiées ici à l'exception de la localité de Bazimini (population séparée de 20 km par rapport aux autres) où le taux de différentiation est assez élevé. Ces taux de différentiation génétiques faibles suggèrent des flux de gènes entre les dortoirs au moins les plus proches. D'autres études sur des *Pteropus* de l'océan indien et de l'Asie ont suggéré des résultats similaires avec des taux de flux de gènes élevés dans des endroits plus ou moins proches (Larsen et al. 2014; Fox et al. 2012; Brown et al. 2011b, O'Brien et al. 2007).
Les fortes différentiations génétiques entre les localités du sud (Fig. 1) et celle de Bazimini sont probablement liées à leurs éloignements géographiques, Bazimini étant la localité la plus éloignée des autres dortoirs. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Burland et al. (1999) et ceux de Fox et al. (2012).

Facteurs influençant la structure génétique des populations

La structuration génétique d'une population peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la capacité de dispersion (qui est liée entre autres facteurs à la morphologie de l'espèce), ainsi que d'autres facteurs écologiques par exemple l'écologie alimentaire et les tailles des populations (Burland et Wilmer 2001, Kleyheeg et al. 2015). Norberg et Rayner (1987) ont ainsi suggéré des capacités de dispersions élevées pour *P. seychellensis comorensis* entre les îles Comores (voir aussi Ibouroi et al. 2018). Cette espèce est caractérisée par un rapport poids/surface des ailes élevé, ce qui permet à l'espèce d'avoir un type de vol bâtant les ailes (*non-soaring flight*). Ce type de vol permet à l'espèce de mener un vol rapide lui permettant de pouvoir traverser les bandes de mers (60 km en moyenne) séparant les quatre îles Comores (Ibouroi et al. 2018). Ce type de vol ne permettrait cependant pas à l'espèce de mener des déplacements de très longues distances (2000 à 3000 km) car nécessite beaucoup d'énergie (Norberg et al. 2000). Norberg et al. (2000) ont cependant montré que chez *P. livingstonii*, le rapport poids/surface des ailes de cette espèce est moins élevé. Ce faible rapport poids/surface des ailes confère à l'espèce un type de vol non bâtant ou vol plané (*soaring flight*). Ce type de vol ne nécessite pas beaucoup d'énergie car l'espèce utilise les courants d'air chauds pour se déplacer. Ce type de vol peut permettre à l'espèce de se déplacer sur de très longues distance allant jusqu'à 3000 km (Norberg et al 2000). L'étude réalisée par (Ibouroi et al. 2018) montre pourtant une forte structuration et l'absence de de flux de gènes

entre les populations de Anjouan et de Mohéli séparée par 40 km chez *P. livingstonii*. Cette dernière étude suggère que ce ne sont pas les caractéristiques morphologiques qui sont à l'origine des faibles dispersions chez cette espèce car l'espèce au vu des capacités associées à son type de vol. L'absence de flux de gènes entre des endroits séparés par seulement 40 km (Ibouroi et al. 2018) ou la structuration entre des dortoirs séparés par seulement 20 km à Anjouan (cette étude) suggèrent que d'autres facteurs influencent sa dispersion.

Les tailles des populations, la disponibilité des ressources notamment alimentaires et en dortoirs mais aussi l'état de l'habitat en général sont aussi des facteurs pouvant impacter la dispersion. Les besoins en ressources alimentaires pour les individus et les exigences des dortoirs de bonnes qualités peuvent en effet influencer la structure génétique de population car ces facteurs peuvent subir des variations spatio-temporelles importantes (Ibouroi et al. 2018). La limitation dans la disponibilité de ressources conduisent généralement les individus à élargir leurs domaines vitaux. Quand ces ressources sont abondantes dans l'espace, la dispersion est souvent limitée du fait l'absence de compétition entre individus mais aussi du fait que les coûts associés à la dispersion (prédations, dépenses en énergie) peuvent être plus importants que les gains associés. Dans cette situation les individus « choisissent » donc la philopatrie (Ibouroi et al. 2018). *P. livingstonii* se nourrit principalement de fruits, de feuilles et de pollen qui sont repartis de façon discontinu dans le temps et dans l'espace (Trewhella et al. 2001). De plus, la taille de la population est assez élevée dans cette île d'Anjouan (~900individus). C'est dans cette île où l'on enregistre un taux élevé de fragmentation d'habitat parmi les îles de l'archipel de Comores (Ibouroi, et al. 2018). Ces ressources limitées et dont la disponibilité varie fortement dans le temps et dans l'espace, cette forte abondance de cette population (Anjouan) en comparaison à celle de Mohéli (où la perte d'habitat est limitée) ainsi que ces taux élevés de destruction d'habitats, pourraient induire de la compétion entre les individus. Ceci pourrait expliquer les la faible structuration génétique observée entre les localités de *P. livingstonii* à Anjouan, les individus pouvant avoir de larges domaines vitaux. La structuration entre les localités du sud de l'île et celle de Bazimini peut s'expliquer par son éloignement aux autres dortoirs comme expliqué précédemment (coûts de dispersion élevé par rapport aux gains).

Implications pour la conservation

Les études génétiques sont cruciales pour définir des mesures adéquates pour gérer et conserver la biodiversité mondiale. Cette étude a montré son importance pour la roussette de *Livingstone*, une espèce qui dans l'ensemble des deux îles a été considérée comme une seule

population. Grace aux études génétiques réalisées par Ibouroi et collaborateurs (2018), des mesures de gestion suggèrent de considérer les deux populations des deux îles comme étant deux unités de gestions différentes. Quant à mon étude, le manque de structuration entre la majorité des dortoirs d'Anjouan pour cette espèce me permet de suggérer la considération de ces dortoirs comme une seule unité de gestion. Toutefois, du fait de la différentiation entre les populations du sud et celle de Bazimini (Fig. 1) mais aussi du fait du taux élevé de fragmentation et de perte d'habitats dans cette île, il serait utile d'envisager des campagnes de replantations entre les différents dortoirs et plus particulièrement entre les dortoirs du sud et celui de Bazimini. Ces reboisements pourraient faciliter la connectivité entre ces localités pour cette espèce et ainsi favoriser le maintien de la diversité génétique actuelle.

V. CONCLUSION

En plus de la perte d'habitats à vitesse alarmante du pays menaçant la biodiversité des Comores, le manque d'études sur la faune et la flore de ces îles représente une des menaces qui pèsent sur les espèces endémiques de cet archipel. Ce manque constitue en effet un handicap important pour l'émergence d'une politique publique efficace de conservation. En effet, l'absence d'Aires Protégées Terrestres dans ce pays à fort taux d'endémisme conduit à un manque d'efficacité pour la gestion à long terme et pour la protection des espèces. Un projet de création d'un Réseau National d'Aires Protégées (RNAP) est en train d'être mis en place dans l'archipel. Ce projet a pour objectifs de protéger les espaces naturels ainsi que la biodiversité associée. Pour cette mise en place, une bonne compréhension de l'écologie, de la diversité génétiques et de la structuration des populations des espèces parapluies mais aussi à forte valeur patrimoniale telle que *P. livingstonii* sont nécessaires dans un but par exemple de proposer des mesures de gestion nécessaires à leurs préservations dans les aires protégées.

Cette étude nous a permis d'apporter beaucoup plus de précisions sur la structuration génétique de la population de *P. livingstonii* de l'île d'Anjouan ainsi que les échanges potentiels de flux de gènes entre les principaux dortoirs de l'espèce dans cette île. L'étude nous a permis également d'apporter plus de clartés quant aux différentes mesures de gestion et de conservation à prendre en compte pour maintenir la diversité génétique de l'espèce déjà faible et ainsi d'assurer sa survie sur le long terme. Cette étude va permettre d'élaborer des mesures de gestions et de conservation plus pointue notamment en considérant les différentes localités d'Anjouan comme une seule unité de gestion à considérer pour sa conservation. Elle propose également le rétablissement des corridors forestiers situés entre les différents dortoirs

de l'espèce et plus particulièrement, la replantation des zones situées entre les localités de Bazimini et les autres dortoirs de l'espèce. Cela pourrait assurer le maintien de la diversité génétique et de facilitera les échanges de flux de gènes entre les différentes localités.

Perspective de recherche

La perte des habitats dans l'île d'Anjouan que ce soit naturelle (cyclones, glissements de terrains) ou anthropique ainsi que la destruction volontaire des dortoirs représentent les principales menaces qui pèsent sur *P. livingstonii* et sur la biodiversité de l'île d'une manière globale. Il serait cependant intéressant de mener des études sur la capacité de résilience de cette espèce ainsi que les réactions des populations face aux destructions des dortoirs que ce soit par les humains ou par les facteurs naturels. Ces études aideraient à renforcer les stratégies de conservation.

En complément de cette étude génétique, il serait utile de réaliser des études sur l'écologie spatiale et sur les mouvements de cette espèce entre leurs gites et leurs sites d'alimentation, par exemple en utilisant des suivis GPS. Une telle étude permettrait de localiser les différents sites d'alimentation et de mesurer la distance entre gites et sites d'alimentation ce qui est nécessaire aussi pour renforcer les mesures de conservation. Elle permettrait d'examiner s'il existe encore de la dispersion entre les dortoirs comme le suggère l'analyse génétique.

Suivant des études réalisées sur les tailles des populations de cette espèce (Granek 2000; Daniel et al. 2017), des variations saisonnières sont observées. Les tailles des populations chutent en effet de moitié durant la saison sèche (Granek 2000). Aucune information n'est connue jusqu'à ce jour quant aux lieux de refuge de la moitié de la population en cette saison. Une telle étude (GPS) permettrait donc aussi de comprendre ce qui se passe en cette saison et notamment d'identifier les sites utilisés par les individus durant la saison sèche. Ceci est fondamental car toute la stratégie actuelle de conservation pour cette espèce se focalise sur les dortoirs connus en dehors de cette saison. Les lieux de refuge des individus durant la saison sèche ainsi que les pressions potentielles que peuvent subir les individus dans ces endroits pendant cette saison restent donc clairement un des points les plus limitant pour développer une stratégie de conservation efficace.

Des études socio-économiques vis-à-vis des populations humaines locales sont nécessaires pour identifier leurs visions et perceptions vis-à-vis de la biodiversité, vis-à-vis de la conservation ainsi que de la mise en place d'aires protégées aux Comores. Une telle étude me semble nécessaire car elle permettrait de déterminer quelles sont les difficultés des

populations locales mais aussi quels sont les bras de levier potentiels pour améliorer les stratégies de conservation à mettre en œuvre dans le réseau d'aires protégées à l'échelle nationale pour assurer la conservation de la roussette de Livingstone et de la biodiversité comorienne en générale.

VI. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Billé, Raphaël, Philippe Cury, Michel Loreau, and Virginie Maris. 2014. *Biodiversité: Vers Une Sixième Extinction de Masse*.

Boussougou, Guy Boussougou, Yao Télesphore Brou, and Ibrahim Mohamed. 2017. "Changements de La Couverture Forestière Dans l'île d'Anjouan Entre 1995 et 2014." *Hal-01478236*, 2017.

Brown, Veronica A., Anne Brooke, James A. Fordyce, and Gary F. McCracken. 2011a. "Genetic Analysis of Populations of the Threatened Bat Pteropus Mariannus." *Conservation Genetics* 12 (4): 933–941.

———. 2011b. "Genetic Analysis of Populations of the Threatened Bat Pteropus Mariannus." *Conservation Genetics* 12 (4): 933–941.

Buckland, Steeves, Nik C. Cole, Jim J. Groombridge, Clemens Küpper, Terry Burke, Deborah A. Dawson, Laura E. Gallagher, and Stephen Harris. 2014. "High Risks of Losing Genetic Diversity in an Endemic Mauritian Gecko: Implications for Conservation." *PloS One* 9 (6): e93387.

Burland, T. M., E. M. Barratt, M. A. Beaumont, and P. A. Racey. 1999. "Population Genetic Structure and Gene Flow in a Gleaning Bat, Plecotus Auritus." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 266 (1422): 975–980.

Burland, Tamsin M., and JESSICA WORTHINGTON WILMER. 2001. "Seeing in the Dark: Molecular Approaches to the Study of Bat Populations." *Biological Reviews* 76 (3): 389–409.

Chan, Lauren M., Steven M. Goodman, Michael D. Nowak, David W. Weisrock, and Anne D. Yoder. 2011. "Increased Population Sampling Confirms Low Genetic Divergence among Pteropus (Chiroptera: Pteropodidae) Fruit Bats of Madagascar and Other Western Indian Ocean Islands." *PLoS Currents* 3.

Cheke, A. S., and J. F. Dahl. 1981. "The Status of Bats on Western Indian Ocean Islands, with Special Reference to Pteropus." *Mammalia* 45 (2): 205–238.

Costanzi, Jean-Marc, and Øyvind Steifetten. 2019. "Island Biogeography Theory Explains the Genetic Diversity of a Fragmented Rock Ptarmigan (Lagopus Muta) Population." *Ecology and Evolution*.

Daniel, Bronwen M., Kathleen E. Green, Hugh Doulton, Daniel Mohamed Salim, Ishaka Said, Michael Hudson, Jeff S. Dawson, Richard P. Young, and Amelaid Houmadi. 2017. "A Bat on the Brink? A Range-Wide Survey of the Critically Endangered Livingstone's Fruit Bat Pteropus Livingstonii." *Oryx* 51 (4): 742–751.

Diamond, Jared M. 1989. "The Present, Past and Future of Human-Caused Extinctions." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 325 (1228): 469–477.

Donlan, C. Josh, and Chris Wilcox. 2008. "Diversity, Invasive Species and Extinctions in Insular Ecosystems." *Journal of Applied Ecology* 45 (4): 1114–1123.

Fox, Samantha, Michelle Waycott, David Blair, and Jon Luly. 2012. "Regional Genetic Differentiation in the Spectacled Flying Fox (Pteropus Conspicillatus Gould)." In . ANU E Press.

Francis, Roy M. 2017. "Pophelper: An R Package and Web App to Analyse and Visualize Population Structure." *Molecular Ecology Resources* 17 (1): 27–32.

Goodman, Steven M., Nicole Weyeneth, Yahaya Ibrahim, Ishaka Saïd, and Manuel Ruedi. 2010. "A Review of the Bat Fauna of the Comoro Archipelago." *Acta Chiropterologica* 12 (1): 117–141.

Granek, Elise F. 2000. "Conservation Des Habitats de Roussettes de Livingstone–Les Massifs Forestiers d'Anjouan et Moheli, Comores: Utilisation d'Indicateurs Sociaux et Ecologiques." *Ya Mkobe*.

Holmes, Nick D., Dena R. Spatz, Steffen Oppel, Bernie Tershy, Donald A. Croll, Brad Keitt, Piero Genovesi, Ian J. Burfield, David J. Will, and Alexander L. Bond. 2019. "Globally Important Islands Where Eradicating Invasive Mammals Will Benefit Highly Threatened Vertebrates." *PloS One* 14 (3): e0212128.

Ibouroi, Mohamed Thani, Ali Cheha, Veronique Arnal, Erwan Lagadec, Pablo Tortosa, Gildas Le Minter, Said Ali Ousseni Dhurham, Claudine Montgelard, and Aurélien Besnard. 2018. "The Contrasting Genetic Patterns of Two Sympatric Flying Fox Species from the Comoros and the Implications for Conservation." *Conservation Genetics* 19 (6): 1425–1437.

Ibouroi, Mohamed Thani, Ali Cheha, Guillelme Astruc, Said Ali Ousseni Dhurham, and Aurélien Besnard. 2018. "A Habitat Suitability Analysis at Multi-Spatial Scale of Two Sympatric Flying Fox Species Reveals the Urgent Need for Conservation Action." *Biodiversity and Conservation* 27 (9): 2395–2423.

Ingleby, Sandy, and Don Colgan. 2003. "Electrophoretic Studies of the Systematic and Biogeographic Relationships of the Fijian Bat Genera Pteropus, Pteralopex, Chaerephon and Notopteris." *Australian Mammalogy* 25 (1): 13–29.

Jackson, Nathan D., and Lenore Fahrig. 2016. "Habitat Amount, Not Habitat Configuration, Best Predicts Population Genetic Structure in Fragmented Landscapes." *Landscape Ecology* 31 (5): 951–968.

Jantz, Samuel M., Brian Barker, Thomas M. Brooks, Louise P. Chini, Qiongyu Huang, Rachel M. Moore, Jacob Noel, and George C. Hurtt. 2015. "Future Habitat Loss and Extinctions Driven by Land-Use Change in Biodiversity Hotspots under Four Scenarios of Climate-Change Mitigation." *Conservation Biology* 29 (4): 1122–1131.

Kalinowski, Steven T. 2005. "Hp-Rare 1.0: A Computer Program for Performing Rarefaction on Measures of Allelic Richness." *Molecular Ecology Notes* 5 (1): 187–189.

Keitt, B., K. Campbell, A. Saunders, M. Clout, Y. Wang, R. Heinz, K. Newton, and B. Tershy. 2011. "The Global Islands Invasive Vertebrate Eradication Database: A Tool to Improve and Facilitate Restoration of Island Ecosystems." *Island Invasives: Eradication and Management. IUCN, Gland, Switzerland*, 74–77.

Kleyheeg, Erik, Casper HA Van Leeuwen, Mary A. Morison, Bart A. Nolet, and Merel B. Soons. 2015. "Bird-Mediated Seed Dispersal: Reduced Digestive Efficiency in Active Birds Modulates the Dispersal Capacity of Plant Seeds." *Oikos* 124 (7): 899–907.

Larsen, Peter A., Corinne E. Hayes, Mary A. Wilkins, Yann Gomard, Rajendraprasad Sookhareea, Anne D. Yoder, and Steven M. Goodman. 2014. "Population Genetics of the Mauritian Flying Fox, Pteropus Niger." *Acta Chiropterologica* 16 (2): 293–300.

Leclerc, Camille, Franck Courchamp, and Céline Bellard. 2018. "Insular Threat Associations within Taxa Worldwide." *Scientific Reports* 8 (1): 6393.

Louette, Michel, Rudy Jocqué, and Danny Meirte. 2004. *La Faune Terrestre de l'archipel Des Comores.* 59 (694.1) LOU.

MacDougall, Andrew S., and Roy Turkington. 2005. "Are Invasive Species the Drivers or Passengers of Change in Degraded Ecosystems?" *Ecology* 86 (1): 42–55.

Myers, Norman, Russell A. Mittermeier, Cristina G. Mittermeier, Gustavo AB Da Fonseca, and Jennifer Kent. 2000. "Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities." *Nature* 403 (6772): 853.

Norberg, Ulla M., and Jeremy MV Rayner. 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 (1179): 335–427.

O'Brien, John, Gary F. McCracken, Ludovic Say, and Thomas J. Hayden. 2007. "Rodrigues Fruit Bats (Pteropus Rodricensis, Megachiroptera: Pteropodidae) Retain Genetic Diversity despite Population Declines and Founder Events." *Conservation Genetics* 8 (5): 1073.

Paulay, Gustav. 1994. "Biodiversity on Oceanic Islands: Its Origin and Extinction1." *American Zoologist* 34 (1): 134–144.

Peakall, R. O. D., and Peter E. Smouse. 2006. “GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research.” *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288–295.

Pimm, Stuart L., Clinton N. Jenkins, Robin Abell, Thomas M. Brooks, John L. Gittleman, Lucas N. Joppa, Peter H. Raven, Callum M. Roberts, and Joseph O. Sexton. 2014. “The Biodiversity of Species and Their Rates of Extinction, Distribution, and Protection.” *Science* 344 (6187): 1246752.

Pimm, Stuart L., and Peter Raven. 2000. “Biodiversity: Extinction by Numbers.” *Nature* 403 (6772): 843.

Pritchard, Jonathan K., Matthew Stephens, and Peter Donnelly. 2000. “Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.” *Genetics* 155 (2): 945–959.

Quiterie, Duron, Bourguet Edouard, Thibault Martin, Scussel Sarah, Gouyet Raphaël, Méheut Mathilde, and Vidal Eric. 2019. “Sympatric Invasive Rats Show Different Diets in a Tropical Rainforest of an Island Biodiversity Hotspot1.” *Pacific Science* 73 (2): 199–214.

Reason, P. F., and W. J. Trewhella. 1994. “The Status of Pteropus Livingstonii in the Comores.” *Oryx* 28 (2): 107–114.

Ricketts, Taylor H., Eric Dinerstein, Tim Boucher, Thomas M. Brooks, Stuart HM Butchart, Michael Hoffmann, John F. Lamoreux, John Morrison, Mike Parr, and John D. Pilgrim. 2005. “Pinpointing and Preventing Imminent Extinctions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (51): 18497–18501.

Rousset, Francois. 2008. “Genepop’007: A Complete Re-Implementation of the Genepop Software for Windows and Linux.” *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103–106.

Russell, Amy L., Veronica A. Brown, Ruth CB Utzurrum, Anne P. Brooke, Lisa A. Wolf, and Gary F. Mccracken. 2016. “Comparative Phylogeography of Pteropus Samoensis and P. Tonganus (Pteropodidae: Chiroptera) in the South Pacific.” *Acta Chiropterologica* 18 (2): 325–335.

Sewall, Brent J., Elise F. Granek, Mohamed FE Moutui, Will J. Trewhella, Paola F. Reason, Kathryn M. Rodríguez-Clark, Ishaka Saïd, J. Bryan Carroll, Will Masefield, and Nassuri Toilibou. n.d. “Conservation Action Plan for Livingstone’s Flying Fox.”

Sewall, Brent J., Elise F. Granek, Moutui Moutui, Will J. Trewhella, Paola F. Reason, Kathryn M. Rodríguez-Clark, Ishaka Saïd, et al. 2007. “Conservation Action Plan for Livingstone’s Flying Fox.” *Conservation Action Plan for Livingstone’s Flying Fox*, 1–60.

Smith, Fraser DM, Robert M. May, Robin Pellew, Timothy H. Johnson, and Kerry R. Walter. 1993. “How Much Do We Know about the Current Extinction Rate?” *Trends in Ecology & Evolution* 8 (10): 375–378.

Soulé, Michael E., Douglas T. Bolger, Allison C. Alberts, John Wrights, Marina Sorice, and Scott Hill. 1988. “Reconstructed Dynamics of Rapid Extinctions of Chaparral-Requiring Birds in Urban Habitat Islands.” *Conservation Biology* 2 (1): 75–92.

Spurgin, Lewis G., Juan Carlos Illera, Tove H. Jorgensen, Deborah A. Dawson, and David S. Richardson. 2014. “Genetic and Phenotypic Divergence in an Island Bird: Isolation by Distance, by Colonization or by Adaptation?” *Molecular Ecology* 23 (5): 1028–1039.

Stanton, David WG, Peter Frandsen, Ryan K. Waples, Rasmus Heller, Isa-Rita M. Russo, Pablo A. Orozco-terWengel, Casper-Emil Tingskov Pedersen, Hans R. Siegismund, and Michael W. Bruford. 2019. “More Grist for the Mill? Species Delimitation in the Genomic Era and Its Implications for Conservation.” *Conservation Genetics*, 1–13.

Team, R. Core. 2018. “R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing V, Austria. 2016.” *URL Http://Www. R-Project. Org*.

Tershy, Bernie R., Kuo-Wei Shen, Kelly M. Newton, Nick D. Holmes, and Donald A. Croll. 2015. “The Importance of Islands for the Protection of Biological and Linguistic Diversity.” *Bioscience* 65 (6): 592–597.

Teyssèdre, Anne. 2004. “Vers Une Sixième Grande Crise d’extinctions.” *Biodiversité et Changements Globaux: Enjeux de Sociétés et Défis Pour La Recherche, Paris, ADPF, Ministère Des Affaires Étrangères*, 24–36.

Trewhella, W. J., P. F. Reason, K. M. Clark, and S. R. T. Garrett. 1998. “The Current Status of Livingstone’s Flying Fox (Pteropus Livingstonii) in the Federal Islamic Republic (RFI) on the Comores.” *Phelsuma* 6: 32–40.

Trewhella, Will J., Kathryn M. Rodríguez-Clark, JON. G Davies, Paola F. Reason, and STEPHANIE Wray. 2001. “Sympatric Fruit Bat Species (Chiroptera: Pteropodidae) in the Comoro Islands (Western Indian Ocean): Diurnality, Feeding Interactions and Their Conservation Implications.” *Acta Chiropterologica*, 2001.

TREwHELLA, WILLIAM J., KATHRYN M. Rodriguez-Clark, Jon G. Davies, PAOLA F. Reason, and STEPHANIE Wray. 2001. “Sympatric Fruit Bat Species (Chiroptera: Pteropodidae) in the Comoro Islands (Western Indian Ocean): Diurnality, Feeding Interactions and Their Conservation Implications.” *Acta Chiropterologica* 3 (2): 135–147.

Van Oosterhout, Cock, William F. Hutchinson, Derek PM Wills, and Peter Shipley. 2004. “MICRO-CHECKER: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data.” *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–538.

Williamson, M. 1989. “Natural Extinction on Islands.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 325 (1228): 457–468.