



Programme d'étude concernant l'amélioration des connaissances sur l'écologie et la génétique du Murin à moustaches (*Myotis mystacinus*) et du Murin de Natterer (*Myotis nattereri*) en Corse



Myotis mystacinus (cliché GCC)



Myotis nattereri « corse » (cliché Y.LeBris)

Octobre 2016

Rédaction : Groupe Chiroptères Corse et Dr Sébastien Puechmaille



GROUPE CHIROPTERES CORSE

N° SIREN : 393 679 535

BP 37 20250 CORTE

www.chauvesouriscorse.fr

Programme d'étude concernant l'amélioration des connaissances sur l'écologie et la génétique du Murin à moustaches (*Myotis mystacinus*) et du Murin de Natterer (*Myotis nattereri*) en Corse

Résumé

Le programme d'étude visant à améliorer les connaissances sur l'écologie et la génétique de deux espèces de chauves-souris en Corse, *Myotis nattereri* et *Myotis mystacinus*, a permis d'apporter des informations essentielles en terme de conservation.

D'une part, leur statut taxonomique se précise peu à peu et confirme leur caractère génétique particulier en Corse. Ce travail démontre ainsi clairement un isolement des populations Corses de *M. mystacinus* et *M. nattereri*. Alors que l'isolement de *M. mystacinus* est récent, celui de la population de *M. nattereri* est bien plus ancien. Ces données démontrent **qu'un changement du statut taxonomique de la population Corse de *M. nattereri* est nécessaire** alors que la population Corse de *M. mystacinus* devrait être considérée comme une unité évolutionnaire significative. La révision taxonomique de la population corse de *Myotis nattereri* lui confère un caractère d'endémicité unique à l'île. Il s'agirait de **la seule espèce de mammifères endémique de France métropolitaine**. La responsabilité de la Corse semble prépondérante en terme d'enjeu de conservation pour cette espèce.

D'autre part, la recherche de gîtes par suivi télémétrique de *Myotis nattereri* « corse » a confirmé le caractère très rupicole de l'espèce en période de reproduction. Il apparaît également que la rareté de l'espèce sur l'île ne peut s'expliquer par un manque de disponibilité de ces gîtes à cette période biologique du moins. D'autres facteurs devront être recherchés afin de veiller dans la mesure du possible à la conservation de cette nouvelle espèce endémique de Corse.

Etude réalisée et coordonnée par le Groupe Chiroptères Corse

Analyses génétiques et rédaction du volet « génétique » : Sébastien J Puechmaille de Institut de Zoologie de l'Université de Greifswald

Partenariat financier : Office de l'Environnement de la Corse

Contexte

De récents travaux d'analyses moléculaires et génétiques menées sur différentes espèces de chauves-souris présentes en Europe ont permis de révéler des différenciations taxonomiques étonnantes et souvent subtiles pour certaines d'entre elles (Puechmaille et al., 2012 ; Evin et al., 2008).

Plus particulièrement, pour la Corse, ces analyses, réalisées jusqu'à lors à partir d'un échantillonnage réduit et expérimental, ont permis de confirmer certaines suspicions phénotypiques et comportementales. Deux espèces, le Murin de Natterer (*Myotis nattereri*) et le Murin à moustaches (*Myotis mystacinus*), seraient de bonnes candidates à ce remaniement spécifique, à l'instar du Murin du Maghreb élevé au rang d'espèce en 2000 en Corse (Castella et al., 2000).

L'état actuel des connaissances sur ces deux espèces demeure relativement faible et insuffisant ; Respectivement très rare et peu courant en Corse, le Murin de Natterer et le Murin à moustaches n'ont jamais fait à ce jour l'objet d'études spécifiques sur l'île.

En partenariat avec l'Office de l'Environnement de la Corse, le Groupe Chiroptères Corse a initié la présente étude ayant pour objet d'une part de préciser le statut taxonomique de ces deux espèces en Corse et d'autre part d'améliorer l'état des connaissances sur leur écologie insulaire.

Cette action s'inscrit dans le prochain Plan National d'Actions Chiroptères en cours de rédaction : fiche action n°4 - Améliorer les connaissances des espèces classées en « Données insuffisantes » dans la liste rouge nationale (UICN, 2009) et dans le rapportage N2000 (2013).

Objectif du programme :

L'objectif principal de ce programme consiste en une meilleure prise en compte dans les mesures de conservation de deux espèces de chiroptères menacées en Corse, le Murin de Natterer et le Murin à moustaches.

Présentation des deux espèces étudiées, le Murin de Natterer et le Murin à moustaches

Murin à moustaches

Myotis mystacinus

Mammifères

Chiroptères

Code EUR

1330

ENJEU DE CONSERVATION EN RÉGION CORSE

MOYEN



© GCC

Etat de conservation

Méditerranée
INCONNU

Description de l'espèce

Une des plus petites chauves-souris de Corse (4-8,4g). Son pelage brun-noir est long et dense et plus clair sur la face ventrale. Sa face, peu dégarnie, et ses oreilles sont noires.

Statut de Protection

Directive Habitat	Liste Rouge Mondiale	Liste Rouge Nationale	Liste Rouge Corse 2010	Statut en Corse
Annexe IV	LC	LC	LC	Peu courant

Indice de rareté	Degré de menaces	Niveau de connaissance	Mesure de Protection
3/5	1/5	1/5	1/5

Répartition de l'espèce

Situation en Corse

Aucun gîte de Murin à moustaches n'était connu en Corse avant 2008 malgré sa présence sur 20% des territoires de chasse. Les individus observés sur l'île présentent une taille et une coloration différentes de la forme nominale continentale et des analyses génétiques seront nécessaires pour déterminer son statut taxonomique.

Situation en Europe

Les Murins à moustaches sont en fait un groupe d'espèces cryptiques difficile à appréhender du point de vue taxonomique. Les limites de sa répartition en Europe sont donc floues. Ce sont des espèces globalement peu méridionales excepté pour les Balkans où elles sont bien représentées.

Ecologie & principaux habitats

Le Murin à moustaches est une espèce à préférence forestière où elle parcourt les boisements à proximité des cours d'eau pour chasser par un vol agile le long de la végétation. En Corse, les quelques individus suivis par télémétrie affectionnaient particulièrement les rivières torrentueuses voire des canyons en milieu forestier.

Espèce fissuricole par excellence, elle se faufile aussi bien derrière des écailles rocheuses que sous une écorce ou derrière des volets.

Principales pratiques susceptibles d'avoir des incidences

- Condamnation ou dérangement de gîtes
- Pollution des cours d'eau
- Destruction des ripisylves
- Morcellement des parcelles forestières notamment par des routes
- Coupes rases, notamment en altitude

Actions favorables

- Protéger les gîtes par des mesures réglementaires et/ou physiques.
- Réhabilitation des ripisylves
- Maintenir des zones forestières diversifiées
- Sensibiliser les personnes susceptibles d'en avoir derrière les persiennes

Comme la plupart des espèces de chauves-souris présentes en Corse, aucun gîte d'hibernation n'est connu pour le Murin à moustaches. Les individus s'enfoncent sans doute profondément dans des fissures de rochers et les jointements de divers ouvrages d'arts.

En période de reproduction, les colonies s'installent dans tous types de fissures, ainsi, les 3 seuls gîtes connus sur l'île sont une écaille rocheuse (jusqu'à 24 individus), des revers de volets (environ 200 individus), une fissure d'écorce (reposoir ponctuel d'une femelle avec son jeune) et les autres individus suivis par télémétrie n'ont pas été localisés précisément car inaccessibles dans de grands pans de rochers escarpés.

En Corse, la disponibilité en ce type de gîte rupicole est illimitée, il conviendrait donc plutôt de porter une attention particulière sur les quelques colonies qui s'installent dans le bâti (cf infra) par prise de contact avec les propriétaires et conventionnement.

Des études génétiques devront également être menées afin de clarifier le statut taxonomique du Murin à moustaches de Corse.



Conventionnement avec une commune...

Lors d'un inventaire microrégional avec recherche de gîtes à chauves-souris dans les villages, plusieurs personnes signalent au GCC la présence d'une colonie à la mairie de Letia. En se rendant sur place, les traces de guano et d'urine derrière la plaque de mairie attestent d'un nombre important de femelles, mais surtout, la colonie observée constitue une première pour la Corse puisque ce sont des Murins à moustache. Un travail d'information auprès de la commune est aussitôt mis en place car il est primordial de conserver ce gîte unique. Après enquête il s'avère que les chauves-souris sont connues depuis plusieurs années sur ce site et que leur présence est tolérée. Une convention de partenariat est signée entre le GCC et la commune, notamment pour établir à quelle période des travaux peuvent être réalisés sans nuire aux animaux (la plaque devra être changée à plus ou moins long terme). Il s'agit également d'être attentif aux produits d'entretien des persiennes qui devront faire preuve de leur innocuité pour les chauves-souris.

Murin de Natterer

Myotis nattereri

Mammifères

Chiroptères

Code EUR

1322

ENJEU DE CONSERVATION EN RÉGION CORSE

MOYEN



© Yann LeBris

Etat de conservation

Méditerranée
INCONNU

Répartition de l'espèce

Situation en Corse

Le Murin de Natterer est l'espèce la moins couramment observée en Corse, tant en gîte que sur territoire de chasse. La détection acoustique permet toutefois de mettre en évidence de nouvelles localités. Des analyses génétiques récentes montrent une différenciation importante des individus insulaires.

Situation en Europe

Le Murin de Natterer a un statut taxonomique qu'il sera nécessaire d'éclaircir : les populations ibériques se sont avérées appartenir à l'espèce Murin d'Escaleraï et deux autres lignées ont été découvertes en Europe. La forme nominale a une répartition assez large, jusqu'aux grandes îles méditerranéennes (excepté la Sardaigne)

Ecologie & principaux habitats

Du fait de sa rareté, il est difficile d'établir le type de gîtes occupés préférentiellement par le Murin de Natterer. Si l'on extrapole à partir des données européennes (tout en gardant à l'idée que la population de Corse est fortement différenciée du point de vue génétique), c'est une espèce typiquement forestière, rencontrée notamment dans les forêts d'altitude sur l'île. Elle glane sur leur supports des proies majoritairement non volantes telles que les opilions et les araignées.

Au prix d'efforts considérables pour les localiser, quelques gîtes sont désormais connus en Corse. L'espèce affectionne particulièrement les barres rocheuses en montagne et seule, une galerie de barrage EDF où une centaine d'individus se rassemblent dans une anfractuosité du plafond permet un suivi régulier.

Principales pratiques susceptibles d'avoir des incidences

- Condamnation ou dérangement de gîtes
- Morcellement des parcelles forestières, notamment par des routes
- Rajeunissement et enrésinement des forêts
- Obstruction de l'entrée de grottes/mines (travaux de sécurisation).
- Tous travaux au sein de forêts présentant des arbres gîtes.

Actions favorables

- Conserver les gîtes cavernicoles et arboricoles (en privilégiant les vieux feuillus)
- Protéger les gîtes par des mesures réglementaires et/ou physiques.
- Maintenir des zones forestières diversifiées
- Favoriser la gestion forestière en conservant des îlots de vieillissement
- Nécessité d'en apprendre davantage sur l'espèce et son statut taxonomique

Description de l'espèce

Espèce de petite taille (poids de 5,5-9,5g) aux oreilles assez grandes en spatules de ski et le museau roseâtre. Le pelage ventral est blanc, contrastant fortement avec le dos gris-brun.

Statut de Protection

Directive Habitat	Liste Rouge Mondiale	Liste Rouge Nationale	Liste Rouge Corse 2010	Statut en Corse
Annexe IV	LC	LC	VU	Très rare

Indice de rareté	Degré de menaces	Niveau de connaissance	Mesure de Protection
1/5	3/5	1/5	1/5

Conventionnement avec EDF...

La colonie majeure de Minioptères de Schreibers et de Murins de Capaccini dans une galerie du barrage hydraulique de Sampolo est suivie depuis 2001 par le GCC, partie intégrante du PRCC. En 2003 quelques individus indéterminés sont observés dans un clocheton situé vers l'entrée de la galerie (alors que les deux autres espèces s'installent généralement davantage dans le fond de la galerie). Ce n'est véritablement qu'en juin 2007 qu'un petit essaim d'une cinquantaine d'individus est déterminé comme étant des Murins de Natterer. Leur présence est avérée de fin mai à mi-juillet tous les ans depuis, et en 2014 des nouveaux-nés y sont observés, impliquant ainsi le statut de seule colonie de mise-bas recensée pour cette espèce en Corse, et sans doute ailleurs si son statut d'espèce endémique est confirmé.

Une convention de partenariat a été signée avec EDF en 2010 afin de limiter les travaux susceptibles de nuire aux colonies aux périodes de moindre dérangement. Cette convention concerne la galerie de Tolla (Minioptères présents principalement durant l'hibernation) et la galerie de Sampolo (les 3 espèces de chauves-souris y sont majoritairement pendant l'été).



Protocole d'étude

Afin de répondre au mieux à l'objectif de ce programme, le GCC a mis en place un protocole adapté à savoir :

- afin de préciser le statut taxonomique de ces 2 espèces. La collecte de matériel génétique a été nécessaire et a consisté à prélever de petites membranes de peau (de 2 à 3 mm) au niveau du patagium (aile). Chaque prélèvement a été conditionné individuellement dans un tube de type Eppendorf étiqueté et rempli de silica-gel puis conservé au frais.

Un échantillonnage sur 6 secteurs géographiques distincts a été réalisé (cf tab. 1) soit sur les rares colonies connues (Letia pour le Murin à Moustaches et Ghisoni pour le Murin de Natterer) soit sur site de chasse/transit.

L'ensemble des prélèvements a été transmis au laboratoire universitaire de Ernst-Moritz-Arndt/Greifswald en Allemagne (sous la direction de S. Puechmaille), spécialisé dans ce type d'analyses. Le protocole d'analyse est détaillé en annexe 1 : « analyses génétiques sur *Myotis nattereri* en Corse ».

Le protocole d'analyses et de traitement des données figure à l'annexe I du présent rapport.

- afin d'améliorer les connaissances sur l'écologie des deux espèces. Un suivi télémétrique sur 2 sites d'études (Aitone et Bavella) a permis de localiser des gîtes.

La mise en œuvre de cette action nécessite de capturer des individus femelles (susceptibles de nous indiquer des colonies de reproduction) puis de les équiper d'un émetteur et de localiser en journée le lieu de leur repli diurne. Une équipe d'au minimum 3 personnes (salariés et bénévoles) est nécessaire.

Résultats

Statut taxonomique des 2 espèces *M. nattereri* et *M. mystacinus*

Au cours de cette étude, 77 individus des 2 espèces ont fait l'objet de prélèvements à des fins d'analyses génétiques (tab. 1). Les deux colonies régulières connues sur l'île ont été étudiées (Ghisoni et Letia) et les autres prélèvements ont été collectés au gré des prospections réalisées sur l'île durant l'été (Zonza, Evisa, Corte et Vivario).

	Site	Nbre d'échantillon	sexe	Total
<i>Myotis nattereri</i>	Zonza	8	5F / 3M	38 Mna
	Evisa	3	3M	
	Ghisoni	27	27F	
<i>Myotis mystacinus</i>	Letia	22	22F	39 Mmys
	Evisa	15	7F/8M	
	Corte	1	1F	
	Vivario	1	1F	

Tableau 1 : bilan des prélèvements génétiques réalisés pour Mna et Mmys en Corse en 2015

D'autres prélèvements ont été réalisés par ailleurs au cours de prospections passées, et transmis au laboratoire pour analyse ; ce qui permet de comptabiliser au total, **45 *Myotis nattereri*** sur 5 sites distincts (Albertacce, Zonza, Evisa, Ghisoni et Asco) et **47 *Myotis mystacinus*** sur 5 sites distincts (Letia, Evisa, Corte, Vivario et Asco).

Microsatellites de *M. nattereri* s.l.

Les résultats de l'ACP montrent une très nette différenciation entre la population Corse et les autres populations du continent ou d'Irlande (Figure 1). Cette différenciation est telle qu'il est possible de prédire avec 100% de réussite la provenance d'un individu (Corse versus le reste) seulement sur la base des données microsatellites (DAPC, Figure 2).

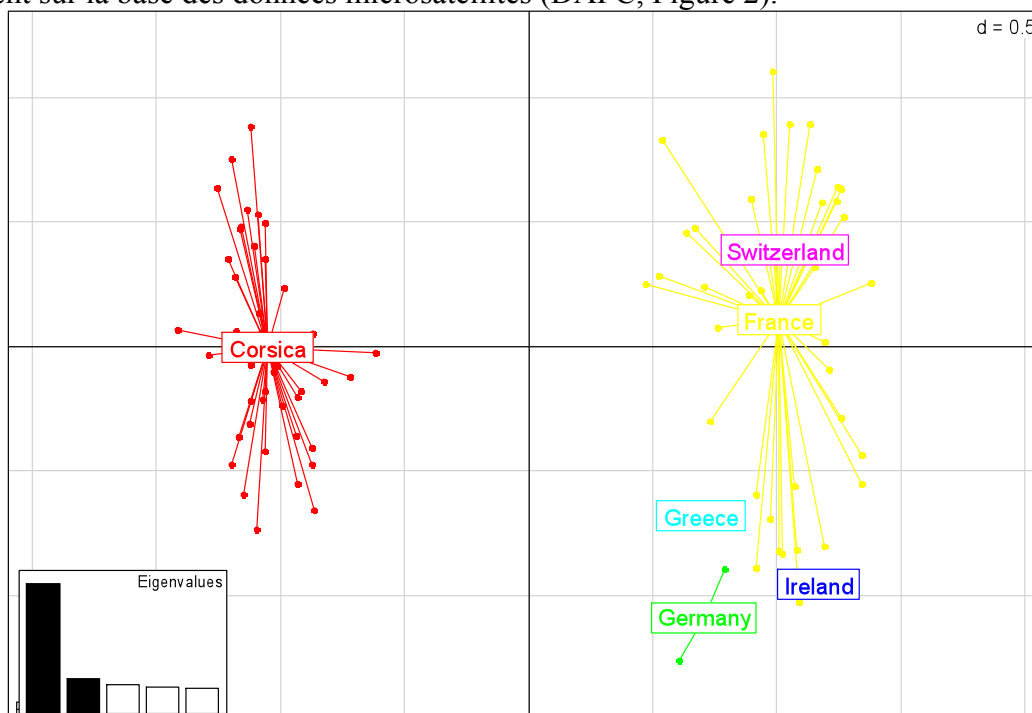


Figure 1. Analyse en Composantes Principales (ACP) montrant la différenciation entre les individus Corses (rouge) et ceux du continent (autres couleurs) en se basant sur l'analyse des microsatellites. L'axe des abscisses explique 22 % de la variance alors que l'axe des ordonnées explique 6%.

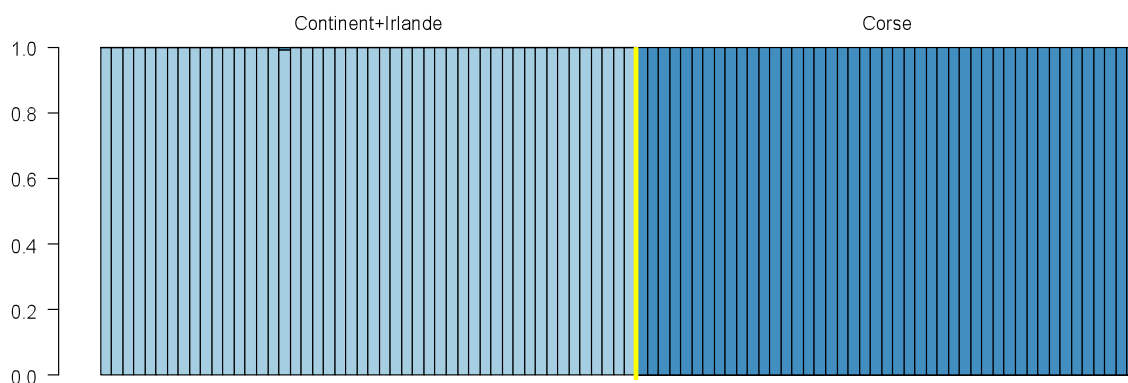


Figure 2. Résultats de la DAPC (analyse discriminante en composantes principales) montrant que les microsatellites permettent d'attribuer avec 100% de réussite les échantillons (chaque barre verticale) à leur origine insulaire ou continentale (+Irlande). L'axe des coordonnées représente la probabilité d'assignation à la population (bleu clair: Continent+Irlande; bleu foncé: Corse).

Si l'on regarde uniquement les échantillons Corses, on observe une différenciation entre les différents sites échantillonnés (Figure 3). Cette importante différenciation est confirmée par le calcul d'un indice de différenciation génétique, le F_{st} , qui varie entre 5 et 10% entre les sites (Table 3).

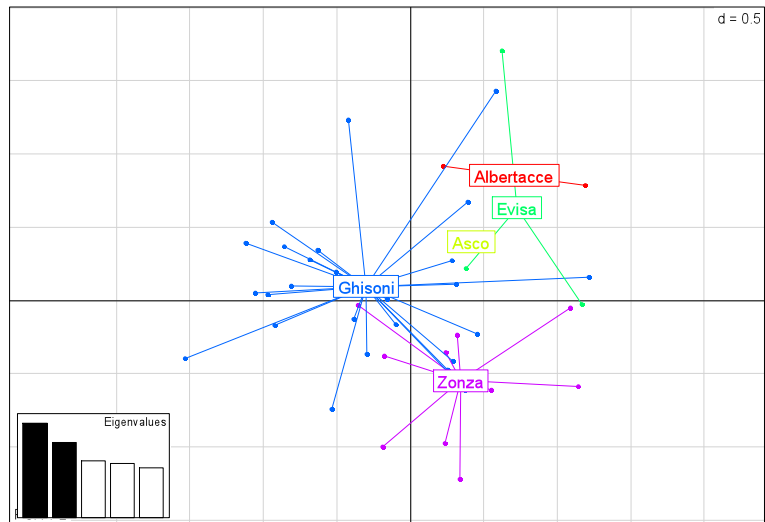


Figure 3. Analyse en Composantes Principales (ACP) montrant la différenciation entre les individus des différents sites de capture en Corse. L'axe des abscisses explique 15 % de la variance alors que l'axe des ordonnées explique 12%.

Table 3. Différenciation génétique (F_{st}) entre les différents sites de capture en Corse. Etant donné que le nombre d'échantillons en provenance d'Asco (1), Albertacce (2) et Evisa (3) était faible, les échantillons de ces trois sites ont été regroupés ensemble (sous le nom AAE) pour le calcul de la différenciation génétique.

	AAE	Zonza	Ghisoni
AAE	0.000	0.104	0.058
Zonza	0.104	0.000	0.046
Ghisoni	0.058	0.046	0.000

Microsatellites de *M. mystacinus*

Les résultats de l'ACP montrent une très nette différenciation entre la population Corse et les autres populations du continent ou d'Irlande (Figure 4). Cette différenciation est telle qu'il est possible de prédire avec 100% de réussite la provenance d'un individu (Corse versus le reste) seulement sur la base des données microsatellites (DAPC, Figure 5).

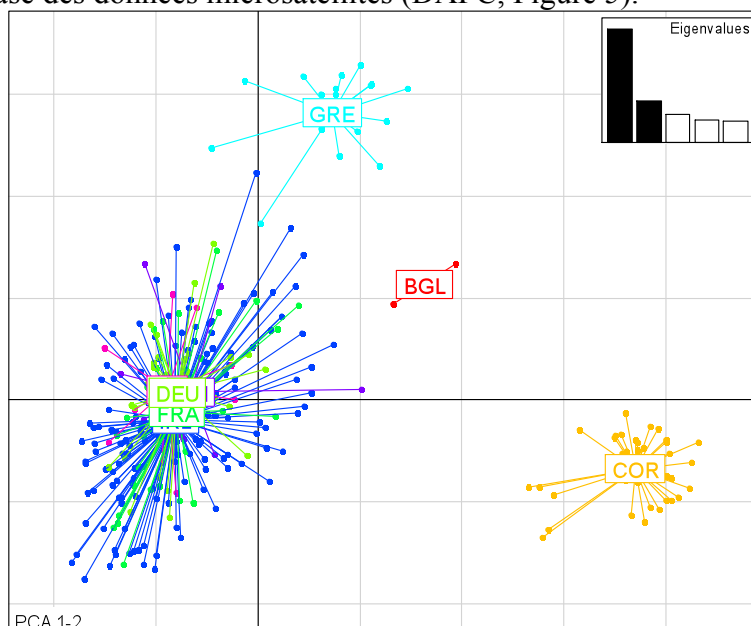


Figure 4. Analyse en Composantes Principales (ACP) montrant la différenciation entre les individus Corses (orange) et ceux du continent (autres couleurs) en se basant sur l'analyse des microsatellites. L'axe des abscisses explique 19 % de la variance alors que l'axe des ordonnées explique 7 %. COR=Corse, BGL=Bulgarie, GRE=Grèce, DEU=Allemagne, FRA=France.

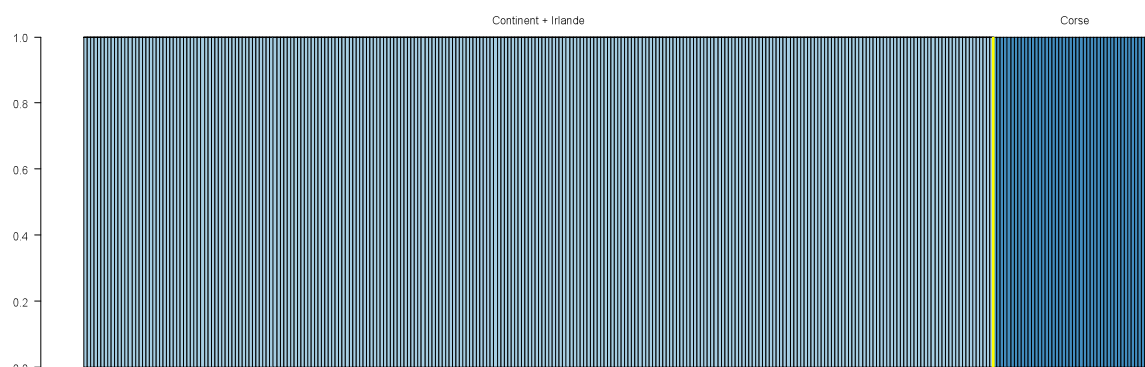


Figure 5. Résultats de la DAPC (analyse discriminante en composantes principales) montrant que les microsatellites permettent d'attribuer avec 100% de réussite les échantillons (chaque barre verticale) à leur origine Corse ou continentale (+Irlande). L'axe des coordonnées représente la probabilité d'assignation à la population (bleu clair: Continent+Irlande; bleu foncé: Corse).

Si l'on regarde uniquement les échantillons Corses, on observe une différenciation entre les différents sites échantillonnés (Figure 8). Cette différenciation est relativement faible comme l'indique l'indice de différenciation génétique, le F_{st} , qui varie de 1.7 à 2.6 % entre les sites (Table 4). La diversité génétique et la richesse allélique de la population Corse sont les plus faibles des populations échantillonnées, y compris quand la comparaison est effectuée avec une autre population insulaire, la population Irlandaise (Table 5).

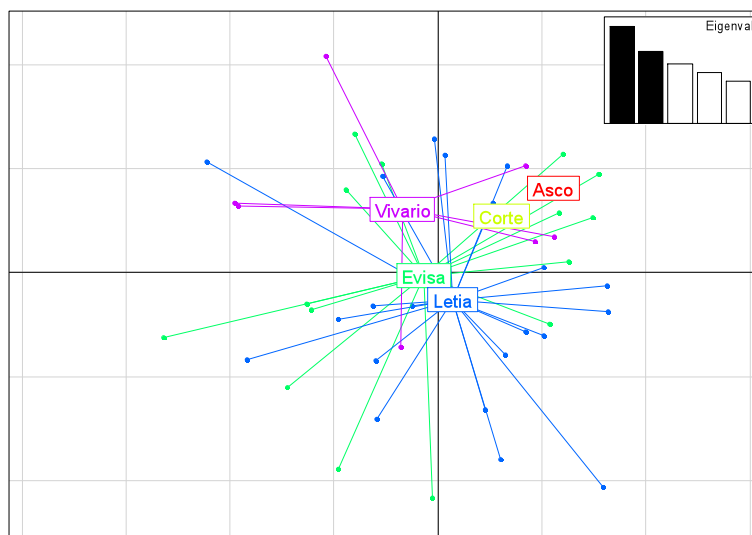


Figure 7. Analyse en Composantes Principales (ACP) montrant la différenciation entre les individus des différents sites de capture en Corse. L'axe des abscisses explique 16 % de la variance alors que l'axe des ordonnées explique 12%.

Table 4. Différenciation génétique (F_{st}) entre les différents sites de capture en Corse. Etant donné que le nombre d'échantillons en provenance d'Asco (1), et Corte (1) était faible, les échantillons de ces deux sites ne sont pas pris en compte pour le calcul de la différenciation génétique.

	Evisa	Letia	Vivario
Evisa	0.000	0.017	0.026
Letia	0.017	0.000	0.026
Vivario	0.026	0.026	0.000

Table 5. Diversité génétique et Richesse allélique par population (sur la base de 3 individus diploïdes)

	IRL	UK	FRA	SUI	ALL	GRE	COR
Diversité génétique	0.632	0.639	0.724	0.749	0.712	0.650	0.497
Richesse allélique	3.249	3.120	3.582	3.826	3.573	3.510	2.547

Introns de *M. nattereri* et *M. mystacinus*

Les reconstructions phylogénétiques à partir des 5 introns nucléaires démontrent que, quelque soit la méthode de reconstruction, les individus *M. nattereri* de Corse forment un clade monophylétique très bien supporté et différencié (Figure 8 et Appendices 1-2). La position de ce clade Corse n'est pas complètement congruente entre les méthodes; les résultats de MRBAYES (Figure 8) et RAXMLv (Appendice 2) placent ce clade basal au groupe *M. nattereri s.l.* alors que BEAST (Appendice 1) place le clade Corse comme groupe frère de *M. nattereri s.s.* Les analyses avec *BEAST (Appendice 3) proposent une autre topologie avec le clade Corse basal de *M. nattereri s.s.* + *M. spA*. Sur l'ensemble des analyses, bien que la position exacte du clade *M. nattereri* de Corse ne soit pas clairement établie, ce clade est très bien supporté et sans aucun doute différencié de tous les autres membres du groupe *M. nattereri s.l.* inclus dans la présente analyse.

Pour *M. mystacinus*, la situation est relativement différente car bien que les individus Corses forment dans la plupart des analyses un clade monophylétique, ce clade est assez mal supporté et est imbriqué à l'intérieur du clade représentant l'espèce (Figure 8 et Appendices 1-2). Il apparaît donc que les analyses des 5 introns nucléaires permettent de démontrer que les individus Corses ne sont pas clairement différenciés des individus de la même espèce présents sur le continent.

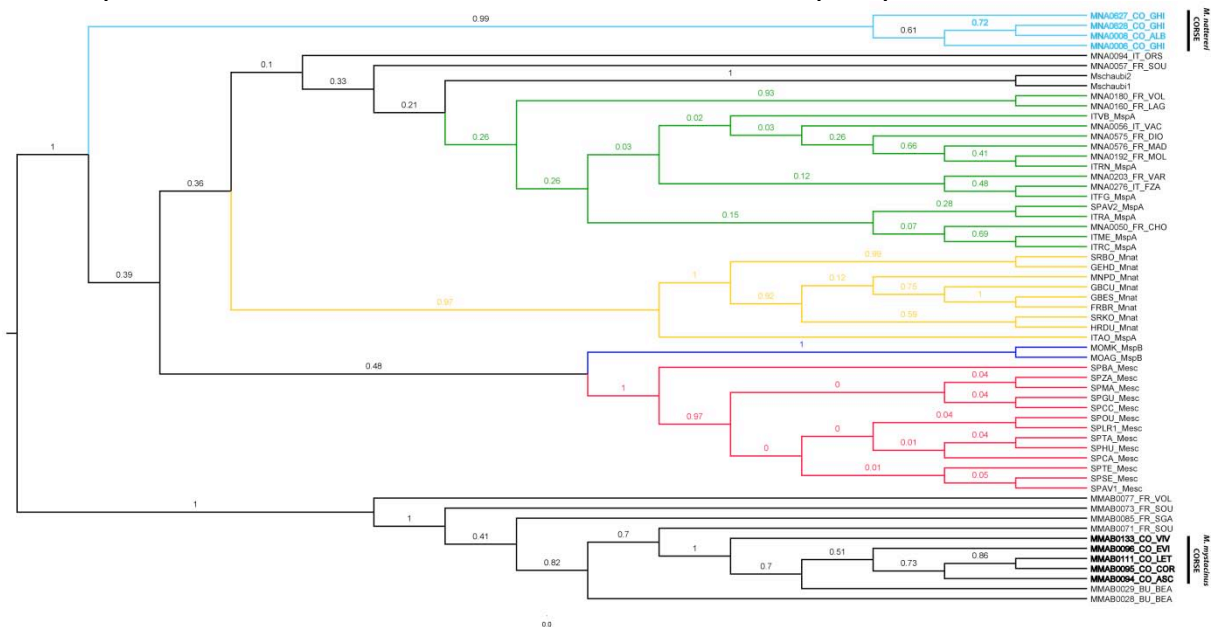


Figure 8. Arbre phylogénétique de MRBAYES montrant les relations telles que reconstruites à partir des 5 introns. Les échantillons issus de cette étude sont nommés par les préfixes "MNA" et "MMAB" pour le groupe *M. nattereri s.l.* et *M. mystacinus* respectivement. Ces préfixes sont suivis d'une abréviation de l'origine géographique de l'échantillon puis du site d'origine. CO=Corse, IT=Italie, FR=France, BU=Bulgarie. Les séquences déjà publiées sont référencées grâce au nom d'échantillon d'origine (cf. Salicini et al. 2011). Les différentes couleurs représentent les grands clades déjà reconnus au sein de *M. nattereri s.l.*; vert= *Myotis sp. A*, bleu foncé= *Myotis sp. B*, rouge= *Myotis. escalerai* ainsi que le clade *Myotis sp. C* de Corse (bleu clair) décrit par Puechmaille et al. (2012). Les valeurs indiquées au-dessus des branches correspondent aux probabilités Bayésiennes à posteriori indiquant le support de ces branches.

Discussion

Cette étude a utilisé divers marqueurs génétiques afin de décrire la structure des populations de *M. nattereri* et *M. mystacinus* et mieux comprendre les différences/similarités entre les populations Corses et leurs congénères continentaux. Cette étude a mis en évidence des similarités entre les deux espèces étudiées mais également des différences importantes.

Nous allons d'abord aborder les deux premières questions posées, "existe-t-il des échanges actuels entre les populations Corses et les populations du continent" et "dans quelle mesure les populations Corses sont différentes de leurs congénères continentaux" ?

Les données génétiques sont très claires pour *M. nattereri*, espèce pour laquelle on peut affirmer qu'il n'existe pas d'échanges. Ceci est appuyé par les microsatellites et en particulier le marqueur Mnatt8 pour lequel la population Corse ne partage aucun allèle avec les populations continentales et les données des introns montrant d'importantes différences qui ne pourraient être maintenues en présence d'échanges génétiques avec le continent. Ceci est d'autant plus vrai que l'ensemble des régions où l'espèce est connue a été échantillonné dans la cadre du projet. Au vu de ces différences, l'absence d'échange entre les populations Corses et le continent date de bien avant la dernière glaciation il y a 20 000 ans et remonte sans aucun doute à plusieurs centaines de milliers d'années voir quelque million.

Les données génétiques sont également très claires pour *M. mystacinus*, espèce pour laquelle on peut affirmer qu'il n'existe pas d'échanges actuels. Ceci est appuyé par les microsatellites et en particulier le marqueur G25 pour lequel la population Corse ne partage aucun allèle avec les populations continentales échantillonnées. Cependant, à l'inverse de *M. nattereri*, les données des introns montrent que l'absence d'échanges n'est pas très ancienne; il est donc probable que les populations Corses aient eu des échanges avec les populations continentales au cours ou depuis les dernières glaciations. A noter qu'aucune donnée génétique des populations Sardes ou Italiennes n'était disponible pour cette étude et qu'il serait utile d'en obtenir afin de savoir si celles-ci ont pu avoir des échanges plus récents avec la population Corse. L'étude des microsatellites montre que la différenciation de la population Corse est importante mais cette différence semble en grande partie due à la dérive génétique plutôt qu'à une longue histoire évolutive comme le montrent les données des 5 introns.

Pour résumer, les populations Corses des deux espèces sont clairement différenciées des populations continentales mais les causes de cette différenciation ne sont pas les mêmes pour les deux espèces, ce qui a d'importantes implications en termes de taxonomie (troisième question).

Pour *M. nattereri*, la population Corses est isolée et différenciée des populations continentales. De telles différences génétiques ne laissent que peu de doute sur le fait que la population Corse de *M. nattereri* nécessite une révision taxonomique formellement décrivant l'espèce qui avait été suspectée par des travaux sur l'ADN mitochondrial (Puechmaille et al. 2012). Par ailleurs, les distances génétiques observées entre les sites échantillonnés en Corse sont relativement importantes, démontrant que les échanges entre ces sites sont également restreints. Il serait alors maintenant important de mieux identifier et comprendre les facteurs qui influencent la structure de la population Corse de *M. nattereri* afin de s'assurer que les différentes zones où l'espèce est présente soient connectées, ce qui semble important pour la préservation de cette espèce rare présentant de faibles effectifs (Courtois et al. 2011).

Pour *M. mystacinus*, la population Corse est isolée des populations continentales depuis bien moins longtemps que pour *M. nattereri*, ce qui rend l'interprétation des données moins évidente. Alors que certains attribuent un statut d'espèce aux populations insulaires isolées (même pour des populations récemment isolées [ex. *Nycatulus leisleri azoreum* considérée par certains comme une espèce à part entière; (Salgueiro et al. 2004; Salgueiro et al. 2007)]), ceci ne semble

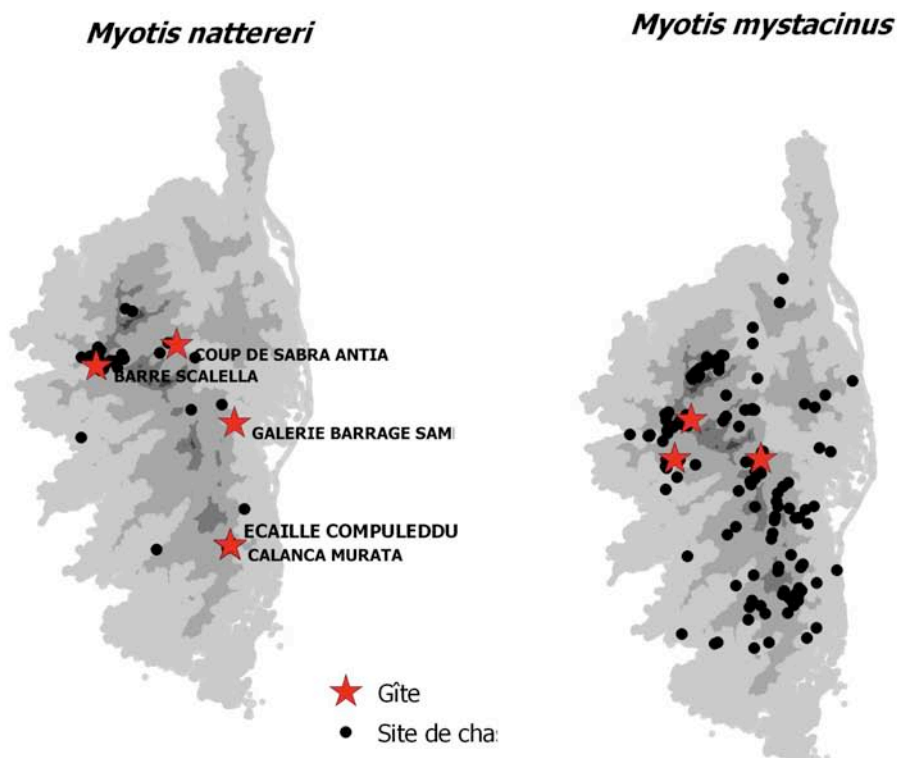
biologiquement pas justifié. Dans d'autres cas relativement similaires, les populations insulaires sont parfois considérées comme une sous-espèce, comme c'est le cas avec *Lasiurus cinereus semotus* à Hawaï (Russell et al. 2015). Une autre espèce Corse a fait l'objet d'une étude génétique approfondie, *Myotis punicus* et comme nous l'avons montré pour *M. mystacinus*, la population Corse de *M. punicus* est isolée des populations continentales (en Afrique du Nord dans ce cas là) (Biollaz et al. 2010). Ainsi, comme dans le cas de *M. punicus*, **la population Corse de *M. mystacinus* devrait être traitée comme une unité évolutive significative (ESU)** et ses liens avec les populations Sardes et Italiennes méritent d'être éclaircis.

Recherche de colonies pour *M. nattereri*

Au total, 2 individus de *Myotis nattereri* ont fait l'objet d'un suivi télémétrique sur 2 sites distincts – Bavella et Aitone. Dans les 2 cas, les individus équipés nous ont permis de localiser le secteur de leur gîte. Situés en pleine paroi rocheuse, les gîtes correspondaient à des écailles ou à des fissures en falaise. Leur localisation précise n'était pas possible en raison de l'inaccessibilité du site nécessitant des moyens techniques importants (installation d'une ligne de rappel, descente en rappels multiples, acheminements aléatoires...).

Cependant, même si cette frustration évidente de ne pas avoir pu observer précisément les gîtes existe, les caractéristiques des secteurs localisés garantissent sur le long terme des conditions de conservation de ces colonies hautement favorables. Seules des modifications importantes de l'environnement proche (incendies par exemple, nuisances sonores majeures) pourraient occasionner des préjudices notables sur les colonies.

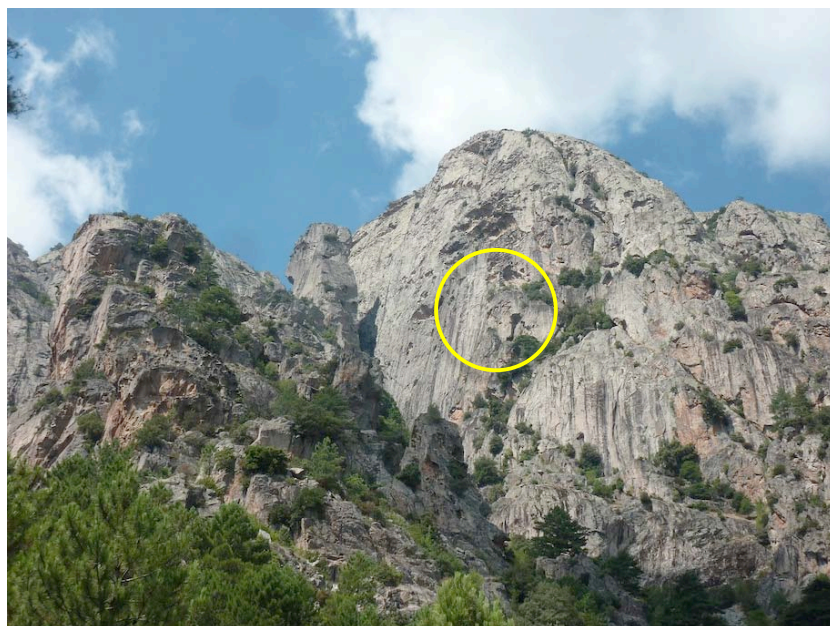
Par ailleurs, ce travail renforce l'intérêt de l'utilisation de la télémétrie pour la recherche de tels gîtes pour ces espèces, technique qui à l'heure actuelle demeure la seule à permettre leur localisation dans le contexte insulaire. Par ailleurs, le développement de technologies telles que les caméras thermiques donne des résultats prometteurs qui pourront être exploités lorsque le matériel deviendra plus performant et moins onéreux.



	Nom du gîte	Type	Statut	Effectif
<i>Myotis nattereri</i>				
Corte	Coup de Sabra Antia	Paroi rocheuse	Reproduction	indéterminé
Evisa	Barre Scalella	Paroi rocheuse	Reproduction	indéterminé
Ghisoni	Galerie Barrage de Sampolo	Galerie EDF artificielle	Reproduction	70 individus
Conca	Ecaille Compuleddu	Paroi rocheuse	Reproduction	indéterminé
Conca	Calanca Murata	Paroi rocheuse	Reproduction	indéterminé
<i>Myotis mystacinus</i>				
Letia	Mairie San Martinu	Volets/plaque de mairie	Reproduction	300 individus
Albertacce	Barre 1001	Ecaille rocheuse	Reproduction	23 individus
Vivario	Vecchio Fumaccie	Paroi rocheuse	Reproduction	indéterminé



Paroi rocheuse de la « Barre Scalella » à Evisa (flèche : localisation approximative du gîte)



Gîte du « Coup de Sabra Antia » à Corté

Conclusion

Les deux volets du programme d'étude mené cette année ont permis d'améliorer notablement l'état des connaissances sur ces 2 espèces en Corse.

Le statut taxonomique se précise peu à peu et confirme leur caractère génétique particulier en Corse. Ce travail démontre ainsi clairement un isolement des populations Corses de *M. mystacinus* et *M. nattereri*.

Alors que l'isolement de *M. mystacinus* est récent, celui de la population de *M. nattereri* est bien plus ancien. Ces données démontrent **qu'un changement du statut taxonomique de la population Corse de *M. nattereri* est nécessaire** alors que la population Corse de *M. mystacinus* devrait être considérée comme une unité évolutionnaire significative.

Par ailleurs, la découverte cette année de 2 nouveaux gîtes pour *Myotis nattereri*, de part leur nature (faille/fissure dans parois rocheuses) et leur isolement, permet de s'assurer que le gîte ne semble pas constituer un facteur limitant pour sa conservation en Corse. L'extrême rareté de l'espèce en Corse pourrait s'expliquer par d'autres facteurs comme par exemple :

- l'isolement géographique des populations insulaires qui ne permet aucun échange avec les populations continentales, corroboré par l'isolement génétique étudié dans le cadre de cette étude ; cette situation pourrait être l'héritage d'une population initiale faible quantitativement, aujourd'hui isolée géographiquement et génétiquement,
- une stratégie démographique basée sur une faible fécondité et une croissance lente des populations (cycle de vie long et petite capacité de dispersion),
- une écologie spécialisée qui mobilise les populations sur une ressource (alimentaire par exemple) ou une niche écologique faible et/ou perturbée,
- la difficulté technique de contacter l'espèce induisant une sous-évaluation des effectifs réels de la population présente sur l'île.
- l'isolement des populations locales les unes par rapport aux autres, difficilement explicable à l'heure actuelle

Toutes ces hypothèses peuvent expliquer en partie ce phénomène mais ne peuvent l'élucider à eux seuls. Il conviendrait de mener aussi des efforts sur la connaissance des exigences trophiques de l'espèce afin de s'assurer que ces facteurs n'entravent pas sa conservation.

La situation pour *Myotis mystacinus* semble moins pré-occupante ; sa répartition en Corse demeure plus homogène et son état de conservation plus assuré. Le petit nombre de gîte connu à ce jour n'est que le reflet du faible effort de recherche mené sur cette espèce dans l'île.

Références bibliographiques :

- Allegrini B, Puechmaille SJ (2013) *Vespertilion (Myotis) latipennis* (Crespon, 1844) : un nom pour la nouvelle espèce *Myotis* sp. A du groupe *nattereri* ? *Le Vespère*, 3, 181-183.
- Benda P, Gazaryan SV, Vallo P (2016) On the distribution and taxonomy of bats of the *Myotis mystacinus* morphogroup from the Caucasus region (Chiroptera: Vespertilionidae). *Turkish Journal of Zoology*, 40, 1-8.
- Benda P, Karatas A (2005) On some Mediterranean populations of bats of the *Myotis mystacinus* morpho-group (Chiroptera: Vespertilionidae). *Lynx*, n s, 36, 9-38.
- Benda P, Ruedi M, Aulagnier S (2004) New data on the distribution of bats (Chiroptera) in Morocco. *Vespertilio*, 8, 13-44.
- Benda P, Tsytsulina KA (2000) Taxonomic revision of *Myotis mystacinus* group (Mammalia: Chiroptera) in the Western Palearctic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 64, 331-398.
- Beuneux G (2004) Morphometrics and ecology of *Myotis cf punicus* in Corsica. *Mammalia*, 684, 269-273.
- Biollaz F, Bruyndonckx N, Beuneux G, Mucedda M, Goudet J, Christe P (2010) Genetic isolation of insular populations of the Maghrebian bat, *Myotis punicus*, in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, 37, 1557-1569.
- Boston ESM, Puechmaille SJ, Scott DD, Buckley DJ, Lundy MG, Montgomery IW, Prodohl PA, Teeling EC (2012a) Empirical assessment of non-invasive population genetics in bats: comparison of DNA quality from faecal and tissue samples. *Acta Chiropterologica*, 14, 45-52.
- Boston ESM, Puechmaille SJ, Scott DD, Buckley DJ, Lundy MG, Montgomery WI, Prodohl PA, Teeling EC (2012b) Empirical assessment of non-invasive population genetics in bats: comparison of DNA quality from faecal and tissue samples. *Acta Chiropterologica*, 14, 45-52.
- Burland TM, Barratt EM, Racey PA (1998) Isolation and characterization of microsatellite loci in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*, and cross-species amplification within the family Vespertilionidae. *Molecular Ecology*, 7, 136-138.
- Cabrera A (1904) Ensayo monográfico sobre los quirópteros de España. *Memorias de la real Sociedad española de Historia natural*, 2, 249-292.
- Cabrera A (1914) *Fauna Ibérica: Mamíferos*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Castella V, Ruedi M (2000) Characterization of highly variable microsatellite loci in the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Ecology*, 9, 1000-1002.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN (2007) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, 7, 184-190.
- Courtois J-Y, Rist D, Beuneux G (2011) *Les chauves-souris de Corse. Groupe Chiroptères Corse*.

Crespon J (1844) Faune méridionale, Nimes, France.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772-772.

Dietz C, Von Helversen O (2004) Illustrated identification key to the bats of Europe. p. 72.

Ellerman JR, Morrison-Scott TCS (1951) Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758 to 1946, 1st edn. British Museum (Natural History).

Evin, A., Baylac, M., Ruedi, M., Mucedda, M. & Pons, J.M., (2008). Taxonomy, skull diversity and evolution in a species complex of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae): a geometric morphometric appraisal. *Biol. J. Linn. Soc.*, 95: 529–538.

Garcia-Mudarra JL, Ibañez C, Juste J (2009) The straits of Gibraltar: barrier or bridge to Ibero-Moroccan bat diversity? *Biological Journal of the Linnean Society*, 96, 434-450.

Goudet J (2005) HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184-186.

Halczok T, Fischer K, Gierke R, Zeus V, Meier F, Tress C, Balkema-Buschmann A, Puechmaille SJ, Kerth G (soumis) Evidence for genetic variation in Natterer's bats (*Myotis nattereri*) across three regions in Germany but no evidence for co-variation with their associated astroviruses. *BMC Evolutionary Biology*.

Heled J, Drummond AJ (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 570-580.

Horáček I, Hanák V, Gaisler J (2000) Bats of the Palearctic region: a taxonomic and biogeographic review. In: *VIIIth European Bat Research Symposium* (ed. Woloszyn BW), pp. 11-157. CIC ISEZ PAN.

Ibañez C, Garcia-Mudarra JL, Ruedi M, Stadelmann B, Juste J (2006) The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterologica*, 8, 277-297.

Igea J, Juste J, Castresana J (2010) Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 369.

Jan C, Dawson DA, Altringham JD, Burke T, Butlin RK (2012) Development of conserved microsatellite markers of high cross-species utility in bat species (Vespertilionidae, Chiroptera, Mammalia). *Molecular Ecology Resources*, 12, 532-548.

Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403-1405.

Jombart T, Devillard S, Dufour AB, Pontier D (2008) Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity*, 101, 92-103.

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

- Kiefer A, Mayer F, Kosuch J, Helversen Ov, Veith M (2002) Conflicting molecular phylogenies of European long-eared bats (*Plecotus*) can be explained by cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 557-566.
- Kiefer A, Veith M (2001) A new species of long-eared bat from Europe (Chiroptera: Vespertilionidae). *Myotis*, 39, 5-16.
- Kuhl H (1817) Die deutschen Fledermäuse. *Neue Annalen der Wetterauischen Gessellschaft für die gesammte Naturkunde*, 4, 11-49.
- Mayer F, Dietz C, Kiefer A (2007) Molecular species identification boosts bat diversity. *Frontiers in Zoology*, 4, 4.
- Mayer F, Von Helversen O (2001) Cryptic diversity in European bats. *Proceedings of the Royal Society of London*, B, 268, 1825-1832.
- Mucedda M, Kiefer A, Pidinchedda E, Veith M (2002) A new species of long-eared bat (Chiroptera, Vespertilionidae) from Sardinia (Italy). *Acta Chiropterologica*, 4, 121-135.
- O' Donnell CFJ, Richter S, Dool S, Monks JM, Kerth G (2016) Genetic diversity is maintained in the endangered New Zealand long-tailed bat (*Chalinolobus tuberculatus*) despite a closed social structure and regular population crashes. *Conservation Genetics*, 17, 91-102.
- Puechmaille SJ, Allegrini B, Boston E, Dubourg-Savage M-J, Evin A, Knochel A, Le Bris Y, Lecoq V, Lemaire M, Rist D, Teeling EC (2012) Genetic analyses reveal further cryptic lineages within the *Myotis nattereri* species complex. *Mammalian Biology*, 77, 224-228.
- R Development Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing, <http://cran.r-project.org/>, Vienna (Austria). R Foundation for Statistical Computing.
- Rambaut A, Drummond A (2007) Tracer v1.4 MCMC Trace Analysis Package, Institute of Evolutionary Biology University of Edinburgh (Scotland) & Department of Computer Science University of Auckland (New Zealand) (2003-2007), <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rode P (1947) Les chauves-souris de France. N. Boubée & C^{ie}, Paris.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539-542.
- Russell AL, Pinzari CA, Vonhof MJ, Olival KJ, Bonaccorso FJ (2015) Two tickets to paradise: multiple dispersal events in the founding of Hoary bat populations in Hawai'i. *PLoS ONE*, 10, e0127912.
- Salgueiro P, Coelho MM, Palmeirim JM, Ruedi M (2004) Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Molecular Ecology*, 13, 3357-3366.
- Salgueiro P, Ruedi M, Coelho MM, Palmeirim JM (2007) Genetic divergence and phylogeography in the genus *Nyctalus* (Mammalia, Chiroptera): implications for population history of the insular bat *Nyctalus azoreum*. *Genetica*, 130, 169-181.

Salicini I, Ibañez C, Juste J (2011) Multilocus phylogeny and species delimitation within the Natterer's bat species complex in the Western Palearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 888-898.

Scott DD, Fitzpatrick S, Bailie DA, Boston ESM, Lundy MG, Buckley DJ, Teeling EC, Montgomery WI, Prodöhl PA (2013) Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite loci for Natterer's bat, *Myotis nattereri* (Vespertilionidae, Chiroptera). *Conservation Genetics Resources*, 1-3.

Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12, 335-337.

Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312-1313.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

von Helversen O, Heller K-G, Mayer F, Nemeth A, Volleth M, Gombkötö P (2001) Cryptic mammalian species: a new species of whiskered bat (*Myotis alcathoe* n. sp.) in Europe. *Naturwissenschaften*, 88, 217-223.

ANNEXE 1 :

Analyses génétiques sur *Myotis nattereri* et *Myotis mystacinus* de Corse

Rapport rédigé par Sébastien J Puechmaille, Institut de Zoologie de l'Université de Greifswald

Contexte

L'utilisation des données génétiques pour séparer les espèces de chauves-souris a réellement pris de l'ampleur à la fin des années 1990. En Europe, le premier cas où des données génétiques ont été utilisées pour démontrer la présence d'espèces cryptiques est celui des pipistrelles (*Pipistrellus pipistrellus* et *P. pygmaeus*). Depuis cela, plus de 10 nouvelles espèces cryptiques ont été découvertes et décrites grâce aux données génétiques (Kiefer & Veith 2001; Mayer & Von Helversen 2001; von Helversen et al. 2001; Kiefer et al. 2002; Ibañez et al. 2006; Mayer et al. 2007). Ce phénomène s'est avéré particulièrement vrai pour les chauves-souris présentes sur les îles comme la Sardaigne (Mucedda et al. 2002), les Açores (Salgueiro et al. 2004; Salgueiro et al. 2007) et la Corse (Beuneux 2004), mais a également été démontré ces dernières années sur le continent (Ibañez et al. 2006; Mayer et al. 2007; Garcia-Mударra et al. 2009).

Deux récentes études génétiques ont montré qu'un nombre non négligeable d'espèces de chauves-souris en Europe représentaient vraisemblablement encore deux espèces 'cryptiques' ou plus (Ibañez et al. 2006; Mayer et al. 2007). Le cas de *Myotis nattereri* est un bon exemple montrant l'utilité des données génétiques. Dans leur étude, Ibañez *et al.* (2006) ont montré que cette espèce était divisée en trois groupes génétiquement très distincts qui se sont séparés il y a plusieurs millions d'années. Ces groupes représentent des espèces potentielles mais l'analyse d'un nombre plus important d'échantillons de différentes provenances et notamment du sud de la France et de la Corse est nécessaire pour conclure. Par ailleurs, l'étude de Mayer *et al.* (2007) montre deux *Myotis* sp. (identifiés comme *Myotis nattereri* selon les critères morphologiques) en provenance d'Autriche et d'Italie du nord qui sont génétiquement très divergents des *M. nattereri* d'Europe centrale. Ces individus sont potentiellement une nouvelle espèce cryptique au sein du 'complexe' *M. nattereri*. Des analyses génétiques effectuées sur des un faible nombre de prélèvements de *Myotis nattereri* dans le sud de la France et en Corse montrent qu'au moins trois espèces cryptiques sont présentes en France et qu'il existe peut-être une quatrième encore non décrite (Puechmaille et al. 2012). Le groupe de *Myotis mystacinus* nécessite également une attention particulière car il regroupe bon nombre d'espèces cryptiques aux aires de distribution relativement mal connues. Les travaux morphologiques de Benda illustrent particulièrement bien ces difficultés et incertitudes (Benda & Tsytulina 2000; Benda et al. 2004; Benda & Karatas 2005; Benda et al. 2016). Clairement, ces espèces méritent une attention toute particulière. D'autres espèces comme *Eptesicus serotinus*, *Plecotus auritus*, *Pipistrellus kuhlii* ou *Hypsugo savii* sont également suspectées de cacher des espèces cryptiques (Mayer & Von Helversen 2001; Benda & Karatas 2005; Ibañez et al. 2006). Ces espèces cryptiques sont cependant parfois impossibles à identifier grâce aux caractères morphologiques sur le terrain (Dietz & Von Helversen 2004). C'est bien pour cette raison que ces espèces sont passées inaperçues jusqu'à maintenant où l'utilisation de données génétiques a permis de les découvrir. Dans ce cas, l'utilisation de la génétique pour assigner les individus à une espèce est directe et très efficace (Clare et al. 2007; Mayer et al. 2007).

Jusqu'à récemment, *Myotis nattereri* était une espèce présente dans la majorité du Paléarctique et l'ensemble de la population Européenne appartenait à la forme nominale, *M. nattereri nattereri* (Kuhl 1817). Au sein du groupe *M. nattereri*, deux espèces avaient été décrites au cours du 19^{ème} et 20^{ème} siècles, en provenance du sud de la France, sous le nom de *Myotis latipennis* (Crespon 1844) et plus tard en Espagne sous le nom de *Myotis escaleraei* (Cabrera 1904) mais ces deux espèces avaient été rapidement invalidées ou non retenues (Cabrera 1914; Rode 1947; Ellerman & Morrison-Scott 1951). Cependant, de récentes études génétiques associées à des données écologiques ont montré que ces deux espèces étaient des

espèces à part entière (Ibañez et al. 2006; Salicini et al. 2011; Puechmaille et al. 2012; Allegrini & Puechmaille 2013).

La situation au sein du groupe *M. mystacinus* a fait l'objet de diverses études mais relativement peu ont utilisé des outils génétiques et la taxonomie au sein du groupe reste difficile à établir (Horáček et al. 2000). L'espèce *Myotis brandtii* a été décrite au cours du 19^{ème} siècle mais a longtemps été considérée comme une sous-espèce de *M. mystacinus* (Ellerman & Morrison-Scott 1951) et ne fut que tardivement reconnue en tant qu'espèce à part entière (Horáček et al. 2000). Plus récemment, *M. alcahoë* a été décrite comme une nouvelle espèce cryptique au sein du groupe *mystacinus* (von Helversen et al. 2001). Le statut taxonomique des populations Ibériques, de nombreuses îles méditerranéennes (dont la Corse) et d'Afrique du Nord reste incertain.

La présente étude génétique vise à clarifier l'identité des populations corses de *Myotis nattereri* et *M. mystacinus* et en particulier de répondre aux questions suivantes:

- 1-Existe-t-il des échanges actuels entre les populations corses et les populations du continent ?
- 2-Dans quelle mesure les populations corses sont différentes de leurs congénères continentaux ?
- 3-Quel statut taxonomique devrait-on donner aux populations corses ?

Méthodologie.

Nous combinons ainsi les deux types de marqueurs afin de mieux répondre aux questions posées (cf. ci-dessus). Des marqueurs hérités des deux parents (c.à.d. nucléaires), sont nécessaires pour évaluer si la population Corse est séparée de celles du continent ou non. Les analyses portent ainsi sur 27 marqueurs nucléaires (22 microsatellites et 5 introns). Les microsatellites ont un taux de mutation très élevé et ont donc offert une bonne résolution pour étudier les événements récents. Leur inconvénient est la saturation de l'information sur de longues échelles de temps. À l'inverse, les introns ayant un taux de mutation plus faible, offrent une moins bonne résolution mais permettent de mieux définir les échanges génétiques sur des échelles de temps plus longues.

Collecte des échantillons et extraction de l'ADN

Les punch d'ailes ont été stockés dans du gel de silice jusqu'à l'extraction. L'extraction de l'ADN génomique entier a été réalisée en utilisant le kit " KingFisher cell and tissue kit " sur le système Flex (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons d'ADN extraits ont été quantifiés sur un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

Pour *M. mystacinus*, un total de 311 échantillons a été inclus dans l'étude; ceux-ci étaient en provenance d'Irlande (n=156), Angleterre (n=10), France (n=34), Suisse (n=10), Allemagne (n=21), Grèce (n=21), Bulgarie (n=2) et Corse (n=47).

Pour *M. nattereri s.l.*, un total de 93 échantillons ont été inclus dans l'étude; ceux-ci étaient en provenance d'Irlande (n=1), France (n=41), Suisse (n=2), Allemagne (n=3), Grèce (n=1), et Corse (n=45). En termes taxonomiques, selon Puechmaille et al. (2012), cela correspond à *M. nattereri s.s.* (n=14), *M. spA* (n=30), *M. escalerai* (n=4) and *M. spC* (n=45; Corse).

PCR et séquençage des introns nucléaires

Cinq paires d'amorces informatives spécifiquement développées pour les mammifères ont été sélectionnées pour offrir une représentation indépendante du génome nucléaire des deux espèces : AAT ABHD11, ACOX2, COPS7A et ROGD1 (Igea et al. 2010; Salicini et al. 2011). Ces loci ont été choisis en fonction de leur variabilité connue chez les Vespertilionidae et parce que il existe déjà des séquences disponibles pour comparaison pour le complexe d'espèce *Myotis nattereri* (Salicini et al. 2011). Le détail des amorces est donné dans la Table 1, ainsi que la longueur des alignements, le nombre de sites informatifs en parcimonie pour chaque locus, tel que calculé dans le MEGA. 6.0 (Tamura et al. 2011). Nous avons séquencé un total de 11 individus pour *M. mystacinus* et 15 pour *M. nattereri s.l.* La sélection des individus s'est

effectuée afin d'obtenir une bonne couverture géographique des populations suspectées d'être proches génétiquement.

Table 1 – Informations sur les amorces utilisées pour amplifier les régions introniques chez *Myotis nattereri s.l.* et *M. mystacinus*. pb, longueur de l'alignement en paires de bases; pi, nombre de sites informatifs en parcimonie. Le modèle GTRGAMMA a été utilisé pour chaque partition dans RAxML.

Primer	pb	pi	Séquence des amorces	Résultats de jModelTest	Modèle utilisé dans MrBayes	Référence
AAT-F1	327	33	RGGCCTRGCYGSCTGCTTCATCTT	TVM+G	GTR+G	(Salicini et al. 2011)
AAT-R1			TCVGASAGYTTGGCTTGRATGAGGCA			
ABHD11-F1	223	17	CTGCTCACCAACCTGGTGGAGGT	TIM3+I	GTR+I	(Salicini et al. 2011)
ABHD11-R1			TTVGGCACRGCTGCATCTGGGC			
ACOX2-F1	387	35	CCTSGGCTCDGAGGAGCAGAT	HKY+I	HKY+I	(Salicini et al. 2011)
ACOX2-R1			GGGCTGTGHAYCACAACTCCT			
COPS-F1	440	25	TACAGCATYGGRCGRGACATCCA	TrN+I	GTR+I	(Igea et al. 2010)
COPS-R1			TCACYTGCTCCTCRATGCCKGACA			
ROGDI-F1	354	21	CTGATGGAYGCGYGTGATGCTGCA	TVM	GTR	(Salicini et al. 2011)
ROGDI-R1			CACGGTGAGGCASAGCTTGTGA			

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été menées dans des réactions de 10 µL contenant 1 µL d'ADN (10 ng / µL), 1 x Platinum Taq Green Hot Start polymerase (Invitrogen, USA), 1 x tampon de PCR vert sans Magnesium, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM de chaque amorce et 0,2 µM de dNTP. Les PCRs ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur AB 2720 (Applied Biosystems, CA, USA) en utilisant un programme 'Touchdown' de 65 à 55 ° C: 95 ° C pendant 2 minutes; 2 cycles à 95 ° C pendant 15 secondes, 65 ° C pendant 30 secondes, 72 ° C pendant 1 minute; suivi de 2 cycles à chacune des températures par décrétement de 2 ° C en commençant à 65 ° C (ex. 63 ° C-57 ° C); 30 cycles à 95 ° C pendant 15 secondes, 55 ° C pendant 30 secondes, 72 ° C pendant 1 minute; 72 ° C pendant 5 minutes. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide d'une exonucléase I et Fastap thermosensibles phosphatase alcaline (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fabricant. Les amplicons ont été séquencés en utilisant le séquençage Sanger fournit par Macrogen Inc. (Séoul, Corée du Sud). Les séquences ont été éditées et alignées en utilisant le logiciel CODONCODE ALIGNER v. 4.2.7 (CodonCode Corporation).

PCR et génotypage de microsatellites

Un total de 22 microsatellites a été amplifié pour *M. nattereri s.l.* en deux multiplexes. Le détail des amorces, des concentrations ainsi que des références est donné dans la Table 2. Le volume total de réaction était de 9 µL par multiplex, plus précisément, 1 x Type-It Master Mix (Qiagen, Hilden, Allemagne), 1 µl d'ADN (10 ng / µl) et des concentrations d'amorces tel qu'indiquées dans la Table 2. Les conditions d'amplification étaient les suivantes: 95 ° C pendant 5 min; 30 cycles de 95 ° C pendant 30 secondes, 60 ° C pendant 90 secondes, 72 ° C pendant 30 secondes; 60 ° C pendant 30 min. Un total de 12 loci microsatellites ont été amplifiés pour *M. mystacinus* avec toutes les conditions exactement comme décrit par Boston et al. (2012b). Les produits de PCR ont été analysés sur un appareil ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, CA, USA). La taille des fragments a été évaluée à l'aide du marqueur de taille LIZ 600 via le logiciel GeneMapper. 5.0 (Applied Biosystems, CA, USA).

Table 2 – Information des amorces utilisées pour amplifier les microsatellites pour *M. nattereri s.l.*. M: numéro de la multiplex. * Ces amorces ont été modifiées par rapport à la publication originale par ajout d'une séquence dite 'pigtail' pour améliorer la spécificité d'amplification.

Locus	primer (µM)	M	primer publication	forward primer sequence	reverse primer sequence
Mnatt-1	0.1	1	Boston et al. (2012a)	FAM-CAATGGCTGGAAGGTGAAA	GTCATTTTGTGGCTGGCTTA
D15	0.22	1	Castella and Ruedi (2000)	FAM-GCTCTCTGAAGAGGCCCTG	ATTCCAAGAGTGACAGCATCC
G30-Mluc	0.22	1	Jan et al. (2012)	FAM-GCTAGAAGTTATGGTCAATGTTCCCTG	*GTTT-GCTAGAAGTTATGGTCAATGTTCCCTG
H23-Mluc	0.16	1	Jan et al. (2012)	FAM-GCTAGAAGTTATGGTCAATGTTCCCTG	ATAGCTATGTTGCCTAAC
G6-Mluc	0.18	1	Jan et al. (2012)	PET-GGCTTTTTGAAAAGACTGAGG	ACATCAGCCAGTTCCTGTTC
A2-Mluc	0.22	1	Jan et al. (2012)	NED-TTTGTTGAGTAAATGAGTGGATGAATG	GTCTCCCTCTCCCCTGGAAC
EF15-Mluc	0.4	1	Jan et al. (2012)	NED-GATCGCAGTCCCTTCC	GCTTATGGGGAGAAATGAG
Mnatt-8	0.64	1	Scott et al. (2013)	VIC-ATCGCGAAAGTAAGGACAA	CTTTACCTCCAGTAGAATGTA
Mnatt-11	0.64	1	Scott et al. (2013)	PET-ATAATATCCCAAGCCTCAAT	CCTTTCTTCTATAGTGGATGC
H29	0.64	1	Castella and Ruedi (2000)	FAM-TCAGGTGAGGATTGAAAACAC	GCTTTATTTAGCATTGGAGAGC
FV5AP	0.14	2	O' Donnell et al. (2016)	FAM-AACAGAGTTTGATGGGCTGTTAG	*GTTTT-TGAGGGTGCATGTGTAAGATTC
Mnatt-2	0.14	2	Boston et al. (2012a)	FAM-ATTTATGAGGCCCTGGTTT	GCATGAGTGTATGTGGAGGA
G31-Mluc	0.12	2	Jan et al. (2012)	VIC-GATCACC AATCATGTAAGGTTTAC	*GTTTT-AAGTCAAGGCCAAGCAAGTC
GZBYR	0.3	2	Halczok et al. (soumis)	FAM-TCCTTGTC ACTATAAGCTCAGTGG	CCAGGCAATAGTCTCCTAGCAC
Mschreib3-Mluc	0.2	2	Jan et al. (2012)	NED-AGCCAGGCACAGCTCAC	*GTTTCT-GTTTTCTTTGGCATCTGAAGG
H19	0.3	2	Castella and Ruedi (2000)	FAM-GGAATCCGAATCCCTGGC	*GTTTCT-GACATCCCCTCACCCCAAC
Paur06	0.48	2	Burland et al. (1998)	FAM-GATCAGATTTCCAAACAGAG	*GTTTCT-AGGTTCTTTCCTCAGCTATG
A13-Mluc	0.42	2	Jan et al. (2012)	FAM-GCCACACTCTGAGCCTAGAAGG	*GTTTCT-TTCCCACCAGCCTTGCTC
E5-Mluc	1.06	2	Jan et al. (2012)	NED-GTGGTACTTTTACTCTCAGTAGTTTC	AAATTATCTTGTTC AATAATCTTC
D9	0.12	2	Castella and Ruedi (2000)	VIC-TCTTTCCTCCCCTGTGCTC	*GTT-TCTGGACCCAAAATGCAGG
B8-Mluc	0.48	2	Jan et al. (2012)	VIC-AAATACCTGAGTGAGAACATTTAGTGGAG	*GTTT-CTCATTA ACTTCATTGGTAAGTGTGTACC
b22	0.2	2	Kerth et al. (2002)	PET-CTGATGCAAGACCCCTTACAAC	*GTTTCT-ACGGCAGCAGTGAAATCAGA

Reconstruction phylogénétique (intron nucléaire des données de séquence)

Les séquences obtenues dans la présente étude ont été combinées aux 34 séquences déjà publiées pour le groupe *nattereri*, à savoir *M. schaubi*, *M. escaleraei*, *M. nattereri s.s.*, *M. spA*, *M. spB* (Salicini et al. 2011). Ces séquences déjà publiées comprennent des individus en provenance de divers pays au travers de l'Europe et d'Afrique du Nord : France, Croatie, Allemagne, Monténégro, Serbie, Angleterre, Italie (y compris la Sicile), Espagne et Maroc. Les analyses pour le groupe *mystacinus* et *nattereri s.l.* ont été effectuées ensemble car chaque espèce est utilisée comme un groupe externe (outgroup) pour l'autre. Le modèle le plus approprié de substitution pour chaque locus (voir la table 1) a été sélectionné sur la base du critère d'information d'Akaike (AIC) via le logiciel jMODELTEST 2.1.10 (Darriba et al. 2012). Les introns ont été partitionnés dans deux analyses Bayésiennes et une analyse de maximum de vraisemblance en plus d'être analysées à l'aide d'une analyse Bayésienne de coalescence multi-espèces. Les analyses Bayésiennes dans BEAST V.1.8 (Heled & Drummond 2010) ont été réalisées à l'aide de trois chaînes MCMC indépendantes de 10 millions de générations chacune, échantillonnées toutes les 1000 générations. Les priors suivants ont été utilisés : Yule speciation, et l'horloge moléculaire stricte et un arbre de départ UPGMA avec les codes d'ambiguïté IUPAC utilisés comme caractères informatifs. La convergence des chaînes a été évaluée dans le logiciel TRACER 1.6 (Rambaut & Drummond 2007). Les résultats des trois chaînes ont été combinés après le retrait de 10% de burn-in dans LOGCOMBINER v.1.8 et un arbre avec crédibilité maximale des clades a été généré dans le logiciel TREEANNOTATOR v. 1.8 et visualisé dans FIGTREE v.1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software>). L'analyse Bayésienne dans MRBAYES v. 3.2 (Ronquist et al. 2012) a été réalisée en utilisant trois chaînes MCMC indépendantes de 30 millions de générations et 5 chaînes chacune, échantillonnées toutes les 1500 générations. Le modèle le plus approprié pour chaque partition a été choisi en fonction des résultats de jMODELTEST et la disponibilité du modèle dans MRBAYES. La température a été fixée à 0.23 et 20% des arbres de départ ont été rejetés comme burn-in. La même procédure que pour BEAST a été suivie pour la convergence, l'annotation de l'arbre et la visualisation. L'analyse du maximum de vraisemblance dans RAXML v. 7.4.2 (Stamatakis 2014) a été menée via le raxmlGUI v. 1.3 (Silvestro & Michalak 2012) avec 1000 répétitions de la méthode de bootstrap approfondie, le modèle GTRGAMMA de substitution pour chaque locus, et une variation du taux par partition. Les arbres ont été visualisés en utilisant FIGTREE. L'analyse Bayésienne de coalescence multi-espèces a été réalisée via *BEAST (Heled & Drummond 2010), en utilisant Yule speciation comme prior, une taille de population "piecewise linear", une horloge stricte avec un taux prior lognormal et un arbre UPGMA pour commencer. Dix chaînes indépendantes de 20 millions de générations, échantillonnées toutes les 500 générations ont été combinées dans LOGCOMBINER avec les 10% de départ enlevées comme burn-in et la convergence des chaînes confirmée dans TRACER. Une topologie de consensus unique a été générée dans TREEANNOTATOR comme indiqué au-dessus.

Analyse des microsatellites

La structure des populations a été étudiée à l'aide d'une Analyse en Composantes Principales (ACP; Jombart et al. 2008) implémentée dans le package adegenet (Jombart 2008) sous R (R Development Core Team 2016). Au vu des résultats très clairs à l'issue de cette analyses (voir Résultats), nous avons utilisé un analyse discriminante en composantes principales (DAPC) pour évaluer dans quelle mesure les données génétiques des microsatellites pouvaient nous permettre d'assigner les individus à leur population d'origine (population Corse versus continentale). Nous avons donc construit une DAPC en discriminant 2 groupes (Corse versus continent). Nous avons alors testé la précision de cette DAPC en utilisant la procédure du 'leave-one-out' consistant à construire une DAPC sur un nombre défini d'individus (ici 92 pour *M. nattereri s.l.* et 310 pour *M. mystacinus*) et en la testant sur l'individu restant. Cette procédure a été répétée autant de fois qu'il y avait d'individus dans le jeu de données (n=93 & 311 fois pour *M. nattereri s.l.* et *M. mystacinus* respectivement). L'indice de différenciation génétique, le F_{st} , a été calculé via le package Hierfstat sous R (Goudet 2005).

Appendice 3. Arbre phylogénétique de *BEAST montrant les relations entre clades telles que reconstruites à partir des 5 introns.

