

Equipe Phylogénie Moléculaire

Institut des Sciences de l'évolution – Montpellier (ISE-M) – UMR 5554 CNRS

Université de Montpellier II - Montpellier

Master 1 – Biodiversité Ecologie Evolution

Année universitaire 2009-2010

Phylogénie et évolution des Chiroptères :

Les Phyllostomidae et l'évolution du régime alimentaire



Gager Yann

Encadrant : Douzery Emmanuel J.P.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	2
1. Approche par supermatrice	2
1.1 Analyses phylogénétiques.....	2
1.2 Reconstruction des caractères ancestraux	2
2. Utilisation de mitogénomes	2
2.1 Spécimens examinés	2
2.2 Méthodes moléculaires.....	2
2.3. Analyses phylogénétiques des mitogénomes	3
RESULTATS	3
1. Supermatrice	3
2. Mitogénomes	4
DISCUSSION	4
1. ANIMALIVORIE (Consommation de Vertébrés et/ou Invertébrés)	5
1.1 « Insectivorie »	5
1.2 Hématophagie	5
1.3 Consommation de Vertébrés.....	6
1.4 Evolution de l'animalivorie et transition vers la phytophagie.....	6
2. PHYTOPHAGIE : (Consommation de « parties de plantes »)	7
2.1 Nectarivorie	7
2.2 Frugivorie.....	7
2.3 Omnivores ou phytophages ?.....	8
3. En résumé	7
4. Etat de caractère du dernier ancêtre commun des Phyllostomidae	8
5. Omnivores ou spécialisés ?	9
6. Faire parler les données existantes : Vers une amélioration des modèles utilisés	9
7. Le futur des bases de données moléculaires	10
7.1 Vers une supermatrice irréprochable	10
7.2 Vers la démocratisation du séquençage de mitogénomes complets ?.....	10
CONCLUSION.....	10
REMERCIEMENTS	11
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

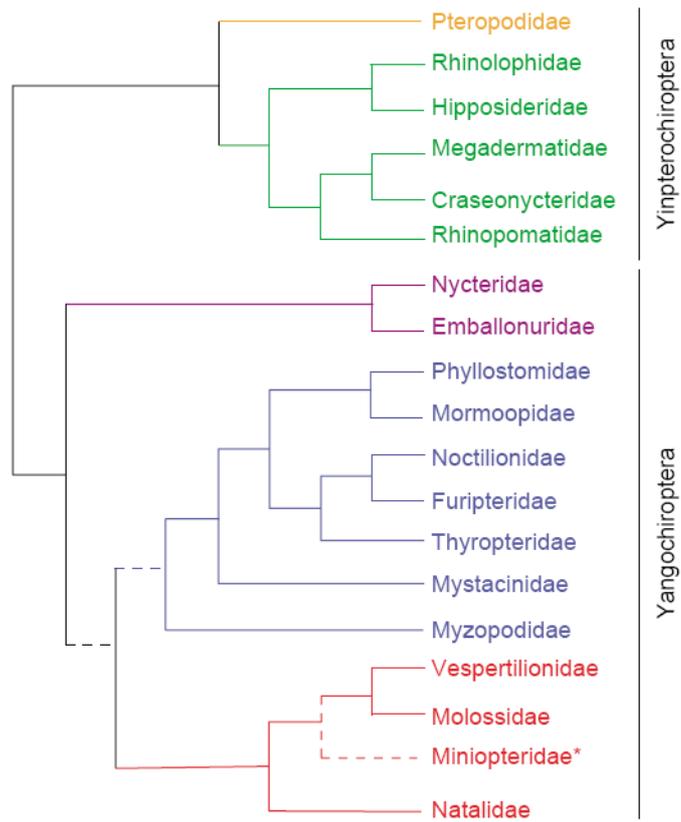


Figure 1 : Phylogénie des Chiroptères (Jones G. & Teeling E., 2006)

INTRODUCTION

Le développement récent de la biologie moléculaire, avec l'étude des génomes mitochondriaux et nucléaires, a considérablement révolutionné notre compréhension du monde vivant et notamment les relations de parenté entre taxons. Dans ce contexte, l'ordre des Chiroptères (= les chauves-souris) constitue un modèle d'étude particulièrement intéressant avec plus de 1116 espèces soit le quart des Mammifères vivants (Simmons 2005). Deux sous-ordres étaient classiquement admis : les Microchiroptères (de petite taille relative et capables d'écholocation) et les Mégachiroptères (de grande taille relative ; Dobson 1875). Récemment, l'ordre a été redécoupé en deux nouveaux sous-ordres pour rompre la paraphylie des Microchiroptères : les Yinpterochiroptera et les Yangochiroptera (cf. figure 1 ; Teeling et al. 2002 ; Teeling et al. 2005). Parmi les Yangochiroptera, la famille des Phyllostomidae, avec 55 genres, 160 espèces recensées (Simmons 2005), s'avère être un modèle de recherche privilégié. Endémique des zones tropicales et subtropicales américaines, elle se caractérise par une grande diversité de régimes alimentaires : la frugivorie, la nectarivorie, la pollinivorie, la carnivorie, l'insectivorie sans oublier l'hématophagie (Arthur et Lemaire 2009). Des études internes aux sous-familles et une phylogénie à l'échelle de la famille, utilisant des séquences de gènes

mitochondriaux (ARNr 12S, ARNr 16S), d'un gène nucléaire (RAG-2) et des données morphologiques, ont déjà été réalisées (Baker et al. 2003). Au cours de ce stage de Master 1, nous avons approfondi l'analyse par supermatrice des gènes nucléaires et mitochondriaux déjà disponibles. La prise en compte d'un plus grand nombre de caractères moléculaires et de nouveaux taxons a ainsi permis de préciser les relations de parenté des Phyllostomidés notamment au niveau des sous-familles et de la distribution des taxons au sein de ces dernières. Une phylogénie bien soutenue était nécessaire afin d'étudier l'évolution des régimes alimentaires de la famille. Par ailleurs, nous avons exploré le séquençage de génomes mitochondriaux complets pour les Phyllostomidae à partir de tissus prélevés sur des taxons en Guyane afin de progresser dans la résolution des relations de parenté. Actuellement, un seul mitogénome complet est disponible pour cette famille avec *Artibeus jamaicensis* (Pumo et al. 1998) ainsi que 9 mitogénomes complets pour 4 autres familles de Chiroptères (Nikaido et al. 2000 ; Lin et Penny 2001 ; Nikaido et al. 2001 ; Lin et al. 2002). Les analyses basées sur ces mitogénomes complets montrent tout l'intérêt de la démocratisation de leur utilisation pour obtenir des phylogénies fiables, préalable nécessaire pour de futures recherches en systématique et écologie évolutive des Chiroptères.

MATERIEL ET METHODES

1. Approche par supermatrice

1.1 Analyses phylogénétiques

Un arbre a été reconstruit pour la famille des Phyllostomidae grâce à une supermatrice utilisant un lot de séquences du génome mitochondrial (ARNr 12S, ARNr 16S, CYB et COI) et du génome nucléaire (RAG-2). Le protocole de réalisation de la supermatrice est présenté en Annexe 1a. La liste des espèces utilisées (avec les références) est disponible en Annexe 1b, la liste des gènes en Annexe 1c. La classification de Baker (2003) a été utilisée pour les sous-familles (Annexe 1d). Les outils utilisés pour les analyses phylogénétiques sont la méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle d'évolution nucléotidique GTR+ Γ +I et le logiciel PAUP* version 4.0b10 pour Unix (Swofford 1998). La solidité de la phylogénie a été estimée par le calcul des bootstraps à chaque nœud après 100 réplifications.

1.2 Reconstruction des caractères ancestraux

La phylogénie issue de la supermatrice des gènes mitochondriaux et nucléaires a servi de support pour y inférer des traits de vie en lien avec l'alimentation. Seuls les taxons possédant des données du projet panTHERIA (Jones et al. 2009) ont été conservés. Une première variable (« dietbreadth ») désigne le nombre de catégories de régimes alimentaires (vertébrés, invertébrés, fruits,

fleurs/nectar/pollen, racines/tubercules ou autres parties de la plante). Ces catégories sont utilisées pour définir le type de régime alimentaire des espèces de chauves-souris : phytophage (fruits et/ou fleurs/nectar/pollen et/ou racines/tubercules et/ou autres parties de la plante), animalivore (vertébrés et/ou invertébrés) et omnivore (au moins une catégorie de phytophage et une d'animalivore). Ces trois catégories ont été codées de manière discrète. Le logiciel R avec l'application APE (Analysis of Phylogenetics and Evolution) et la fonction ACE (Ancestral Character Estimations) a servi à estimer les états de caractères ancestraux et analyser l'évolution des régimes alimentaires grâce à une approche probabiliste (Paradis et al. 2004). Les 3 modèles évalués pour les changements d'état du niveau trophique sont les suivants : taux égaux, taux symétriques et tous les taux différents. Les vraisemblances ont fait l'objet d'un test du ratio de vraisemblance.

2. Utilisation de mitogénomes

2.1 Spécimens examinés

Nous avons obtenu deux échantillons de tissu de Phyllostomidae, un pour *Artibeus obscurus* (T-4669) et un pour *Carollia perspicillata* (T-5412), collectés en Guyane Française par François Catzeflis.

2.2 Méthodes moléculaires

Pour récupérer l'ADN des tissus, nous avons utilisé le protocole « extraction

Espèce	N° d'accession GenBank	Remarque
Artibeus jamaicensis	NC_002009.1	
Canis lupus	FJ032363.2	Outgroup
Cervus elaphus	AB245427.1	Outgroup
Chalinolobus tuberculatus	NC_002626.1	
Myotis lucifugus	v57_scaffold_144518	BLAST sur Ensembl v57
Mystacina tuberculata	NC_006925.1	
Pipistrellus abramus	NC_005436.1	
Pteropus dasymallus	NC_002612.1	
Pteropus scapulatus	NC_002619.1	
Pteropus vampyrus	v57_scaffold_19437	BLAST sur Ensembl v57
Rhinolophus formosae	NC_011304.1	
Rhinolophus monoceros	NC_005433.1	
Rhinolophus pumilus	NC_005434.1	
Rousettus aegyptiacus	NC_007393.1	

Figure 2 : Liste des mitogénomes utilisés pour les analyses phylogénétiques

phénol-chloroforme » (Annexe 2a). La provenance des différentes amorces utilisées est indiquée en Annexe 2b. Le protocole détaillé pour l'amplification par PCR, la purification des fragments amplifiés, la réaction de séquence et le séquençage est disponible en Annexe 2c.

2.3. Analyses phylogénétiques des mitogénomes

Un consensus de ces nouvelles séquences a été obtenu puis aligné manuellement avec 14 mitogénomes complets (12 Chiroptères et deux groupes externes listés dans la Figure 2) grâce au logiciel MUST pour 17635 sites. Les sites ambigus (sites non séquencés ou contenant plus de 10% de gaps et caractères indéterminés) ont été exclus pour ne conserver que 11692 sites. Ce nouvel alignement a permis la reconstruction d'une phylogénie des Chiroptères avec la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle d'évolution nucléotidique GTR+ Γ +I et le logiciel PAUP* version 4.0b10 pour Unix (Swofford 1998). La solidité de la phylogénie a été estimée par le calcul des bootstraps à chaque nœud après 100 répliquations.

RESULTATS

1. Supermatrice

Les arbres reconstruits pour chaque gène séparé (ARNr 12S+16S, CO1, CYB et RAG-2) ainsi que l'arbre issu de la supermatrice pour les gènes

mitochondriaux sont disponibles sur demande. L'arbre issu de la supermatrice des gènes mitochondriaux et nucléaires est visible en figure 3. Cent-vingt espèces y sont incluses incluant trois groupes externes d'autres familles de Chiroptères (*Pipistrellus abramus*, *Mystacina tuberculata* et *Pteronotus parnellii*). L'alignement a résulté en 6883 caractères utilisés pour l'analyse. Un soutien statistique fort est trouvé avec des valeurs de bootstraps \geq à 0,95 pour environ 1/3 des nœuds (39/127). Plus de la moitié des nœuds (69/127) sont supportés par une probabilité \geq 0,80.

L'application APE du logiciel R a permis, d'inférer le niveau trophique du régime alimentaire (phytophagie, animalivorie ou omnivorie) aux taxons de l'arbre, la fonction ACE a permis d'estimer l'état de caractère ancestral à chaque nœud (Figure 4). Les modèles à taux symétrique et celui à taux différents expliquent mieux les données par rapport au modèle à taux égaux (probabilités des tests de ratio de vraisemblance respectives environ égales à 0,05). Le modèle avec tous les taux différents n'est pas significativement différent de celui à taux symétriques (probabilité de 0,18) mais présente une meilleure vraisemblance (-52,4 contre -54,9). De plus, le modèle retenu autorise les 6 changements de niveau trophique possibles (e.g. de l'omnivorie à la carnivorie) contre 3 pour le modèle à taux symétriques. La matrice des taux de

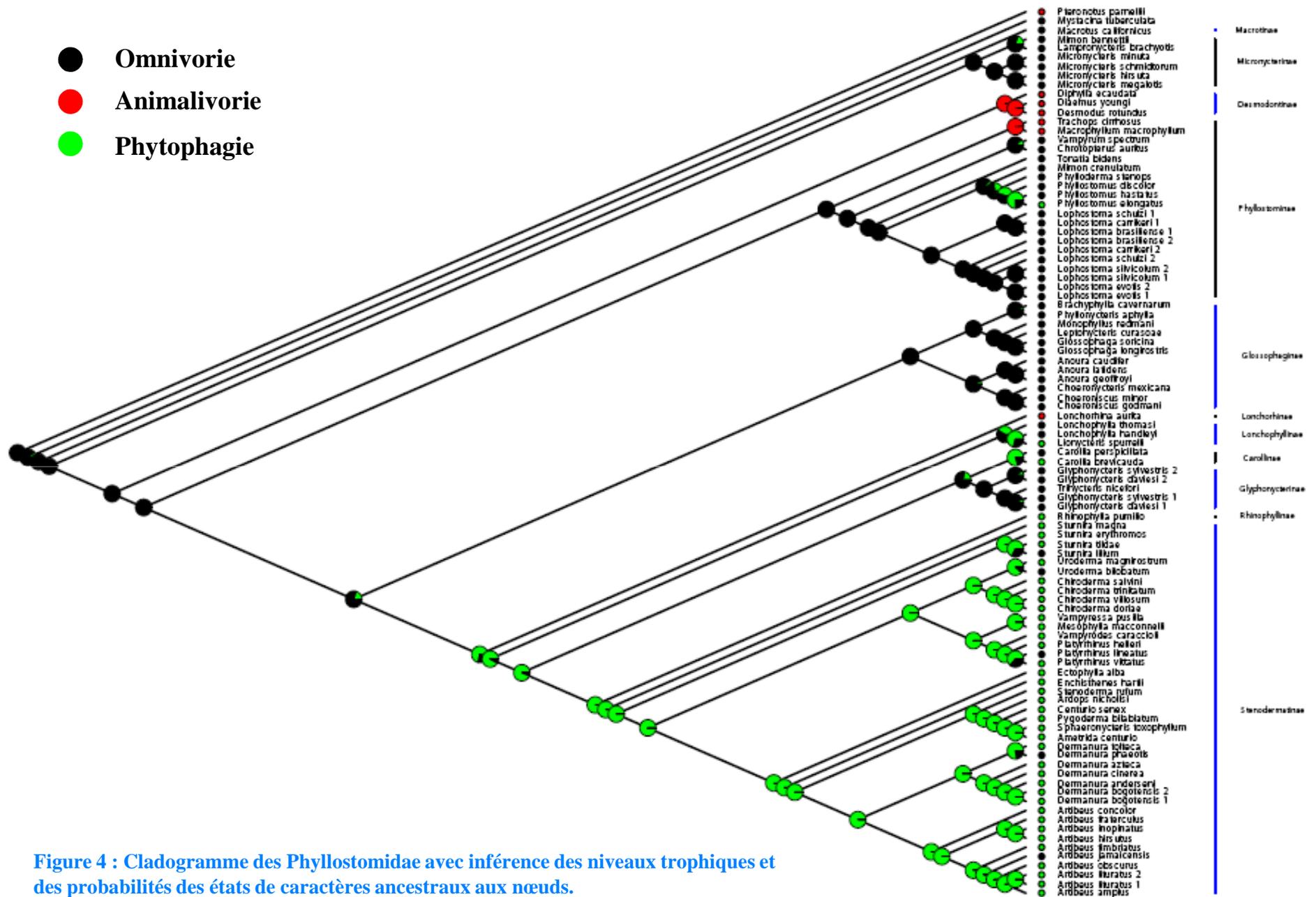


Figure 4 : Cladogramme des Phyllostomidae avec inférence des niveaux trophiques et des probabilités des états de caractères ancestraux aux nœuds.
Niveaux trophiques : phytophagie (vert), omnivorie (noir) et animalivorie (rouge)

Figure 5 : Matrice des taux de changements entre niveau trophique selon une approche probabiliste autorisant tous les changements. 1 = phytophagie, 2 = omnivorie et 3 = carnivorie

	1. Phytophagie	2. Omnivorie	3. Carnivorie
1. Phytophagie	NA	2,4912664	0
2. Omnivorie	0,7139859	NA	0,688983
3. Carnivorie	0	0	NA

transition entre différents niveaux trophiques obtenue d'après l'arbre et les données utilisées est présentée en figure 5. Les probabilités des états de caractères du niveau trophique sont estimées à chaque nœud et présentées sous la forme de diagrammes circulaires. La probabilité des changements tient compte de la longueur des branches. L'état de caractère ancestral du niveau trophique pour le dernier ancêtre commun des Phyllostomidae était probablement omnivore (Figure 4). Un deuxième arbre avec la gamme de ressources utilisées (de 1 à 3) est disponible en Annexe 3. L'évolution du régime alimentaire des Phyllostomidae est abordée dans la partie discussion à la lumière de ces deux arbres.

2. Mitogénomomes

Près de la moitié du mitogénome est désormais séquencée pour *Artibeus obscurus* et *Carollia perspicillata* avec un peu plus de 7kb. La liste des séquences obtenues pour *Artibeus obscurus* lors de cette étude est présentée en Annexe 4a. Les séquences chevauchantes ont fait l'objet de consensus. L'Annexe 4b est une représentation schématique du génome mitochondrial d'*Artibeus obscurus* avec positionnement des fragments séquencés et des amorces utilisées.

L'arbre issu de l'alignement des séquences d'*Artibeus obscurus* et de *Carollia perspicillata* avec 12 mitogénomomes complets de chauves-souris

et deux groupes externes se trouve en Annexe 5. Sur 13 nœuds, 11 sont appuyés par des bootstraps de 100.

DISCUSSION

La concaténation de gènes mitochondriaux et nucléaires (supermatrice) a permis l'obtention de la phylogénie la plus complète en terme d'espèces et de nombre de caractères moléculaires réalisée à ce jour pour la famille des Phyllostomidae. Notre étude vient appuyer les sous-familles décrites par Baker (Baker et al. 2003). La composition en taxons de ces dernières ainsi que les soutiens aux différents nœuds de l'arbre sont résumés en Annexe 6.

En plus de notre étude taxonomique, la phylogénie issue de notre supermatrice a servi de base pour des recherches sur l'évolution du régime alimentaire. L'alimentation chez les Phyllostomidae est un vaste champ de recherche compte tenu de la diversité des régimes alimentaires, d'une omnivorie chez beaucoup d'espèces, avec des types de proies consommées pouvant varier au rythme des saisons et des habitats utilisés. De nombreuses études restent à mener pour pallier un manque de données sur ce sujet. L'analyse de l'arbre avec inférence des niveaux trophiques apporte de nouveaux éléments sur l'évolution des régimes alimentaires chez les Phyllostomidae. Ainsi, le dernier ancêtre

commun de la famille était probablement un omnivore opportuniste, n'ayant pas de restrictions sur son régime alimentaire et s'adaptant aux ressources disponibles. L'évolution des différents régimes alimentaires à partir de l'omnivorie est discutée ci-après.

1. ANIMALIVORIE (Consommation de Vertébrés et/ou Invertébrés) :

1.1 « Insectivorie »

Le régime alimentaire des espèces dites insectivores est majoritairement composé d'insectes mais aussi d'araignées, de scorpions, crustacés et autres Arthropodes. Les représentants de cet embranchement sont abondants et répandus : il est probable que leur diversification ait été à la base d'une évolution et d'une diversification des Chiroptères (Altringham et al. 1996). La prédominance insectivore serait une caractéristique des Macrochinae, des Micronycterinae ainsi que des Phyllostominae à l'exception des quelques espèces préférentiellement carnivores (consommation de Vertébrés). Les seuls insectivores stricts seraient *Macrophyllum macrophyllum* et le genre *Lonchorhina* (Wetterer et al. 2000) répartis dans deux sous-familles (Phyllostominae et Lonchorhinae) phylogénétiquement bien séparées d'après nos résultats (cf. figure 4). Ceci serait en faveur d'une double évolution de l'insectivorie stricte. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour attester de la stricte

insectivorie de ces deux espèces.

1.2 Hématophagie

L'hématophagie est un cas particulier de l'animalivorie. Parmi les Mammifères, elle ne concerne que 3 espèces de chauves-souris : les vampires de la sous-famille des Desmodontinae. Cette évolution unique a fait l'objet de 5 hypothèses majeures (Wetterer et al. 2000). L'hypothèse la plus en accord avec l'estimation de notre état de caractère ancestral est l'évolution à partir d'omnivores arboricoles qui ont commencé à s'alimenter de morceaux de peau ensanglantés sur des blessures (e.g. oiseaux). Les études ayant suggéré la préférence insectivore du dernier ancêtre commun des Phyllostomidae (Ferrarezzi et Gimenez 1996 ; Wetterer et al. 2000) s'accorderait avec deux autres hypothèses :

1. Evolution à partir de chauves-souris spécialisées sur des ectoparasites de Mammifères (tiques par exemple) ;
2. Evolution à partir d'insectivores attirés par les essaims d'insectes concentrés près des blessures ensanglantées de gros animaux.

Ces animaux présentent des adaptations morphologiques (e.g. incisives pointues) mais également physiologiques. Ainsi, *Desmodus rotundus* est le seul Vertébré connu qui ne présente pas d'activité de l'enzyme maltase, indicatrice d'une capacité à assimiler les sucres des plantes (Schondube et al. 2001) ce qui montre une

spécialisation importante du taxon.

1.3 Consommation de Vertébrés

Parmi les Phyllostominae, on retrouve au minimum 3 espèces animalivores non-hématophages incluant des vertébrés (mais aussi des insectes et des fruits) dans leur régime alimentaire (*Trachops cirrhosus*, *Vampyrum spectrum* et *Chrotopterus auritus*; Nowak 1999). Toujours dans cette sous-famille, ce même régime alimentaire se retrouverait chez certaines espèces du genre *Phyllostomus* (Nowak 1999), chez *Tonatia bidens* (Esbérard et Bergallo 2004) ou encore chez *Phylloderma stenops*, observé en train d'attraper un Rongeur du genre *Proechimys* (Emmons et Feer 1997).

La préférence vers l'insectivorie varierait inversement à la taille, elle serait progressivement remplacée par la carnivorie (consommation de Vertébrés) avec l'augmentation de la taille (Giannini et Kalko 2005). Ainsi, l'évolution de la carnivorie pourrait refléter une plus grande taille chez des animaux omnivores (préférentiellement insectivores ?) plutôt qu'un changement majeur du régime alimentaire (Kunz et Fenton 2003). Cette conclusion est en accord avec les données biomécaniques qui montrent que les chauves-souris carnivores sont plus grosses mais proches morphologiquement d'insectivores (Giannini et Kalko 2005). D'autre part, le vol impliquerait des contraintes qui limiteraient la

consommation d'aliments trop volumineux à temps de digestion important que peuvent représenter des Vertébrés (Charles-Dominique et al. 2001). Ce sont des éléments d'explication possible du faible nombre d'espèces consommatrices de Vertébrés au sein des Phyllostomidae.

1.4 Evolution de l'animalivorie et transition vers la phytophagie

La matrice des taux de changements de niveau trophique apporte un éclairage sur l'évolution de l'animalivorie. Un taux relativement important de 0,69 est noté pour le passage de l'omnivorie à l'animalivorie. Les taux de passage de l'animalivorie à l'omnivorie ou à la phytophagie sont estimés à 0 : la spécialisation à l'animalivorie s'apparenterait donc à une impasse évolutive. Cependant, une hypothèse du passage de la préférence à l'animalivorie (surtout insectivorie) à la phytophagie est proposée par Gillette (1975). Des animaux se nourrissant préférentiellement de vers et d'insectes sur les fruits et les fleurs auraient développé une préférence pour la phytophagie, le substrat (la plante) serait ainsi devenu la source de nourriture. C'est ce que l'auteur appelle la « food-source duality ». Ce passage d'une préférence alimentaire à une autre aurait été facilitée par une préadaptation des fleurs et des fruits pour des plantes pollinisées ou dispersées par des Mammifères non-volants (Heithaus 1982). Cette transition vers un régime alimentaire phytophage a

pu s'opérer pour le dernier ancêtre commun de la couronne terminale qui exclue 4 sous-familles préférentiellement animalivores : les Macrotinae, les Micronycterinae, les Desmodontinae et les Phyllostominae. Le taux de passage de l'animalivorie à la phytophagie étant estimé comme nul, il est plus probable que ce dernier ancêtre commun à l'origine d'une spécialisation vers la phytophagie était omnivore à préférence insectivore. Cette hypothèse est appuyée par un taux de passage de l'omnivorie à la phytophagie de 0,71.

2. PHYTOPHAGIE : (Consommation de « parties de plantes »)

D'après nos résultats, on retrouverait plusieurs spécialisations indépendantes vers la phytophagie. Trois taxons isolés sont retrouvés parmi les Phyllostominae, les Lonchophyllinae et les Carrollinae. Un manque de données sur le régime alimentaire pourrait expliquer cette phytophagie stricte au sein de clades omnivores. D'après le projet panTHERIA, *Carollia brevicauda* et *Phyllostomus elongatus* sont strictement phytophages alors que des études montrent l'inclusion d'insectes dans leur régime alimentaire (Herrera et al. 2002 ; Aguirre et al. 2003). La spécialisation majeure vers la phytophagie se serait produite chez le dernier ancêtre commun des Lonchorhinae + Lonchophyllinae + Carrollinae + Glyphonycterinae + Rhinophyllinae + Stenodermatinae.

Un début de spécialisation phytophage (vers la nectarivorie) est très probable pour le dernier ancêtre commun des Glossophaginae et des sous-familles citées précédemment.

2.1 Nectarivorie

Ainsi, les Glossophaginae sont omnivores mais consommeraient surtout du nectar (Baker et al. 2003 ; Feldhamer et al. 2007). Les 38 espèces de la sous-famille présentent un rostre allongé, une dentition réduite en taille et en nombre de dents, et une longue langue avec des poils en bordure pour collecter rapidement le nectar lors de courtes visites sur les fleurs. La récolte s'effectue en sur-place à la manière des colibris (Fleming et al. 2009). Ces transformations morphologiques ne constitueraient pas un frein à l'omnivorie comme l'atteste l'état de caractère omnivore sur le cladogramme de l'étude. D'autres espèces de Phyllostomidae se posent sur les fleurs plutôt que de voler sur place (Fleming et al. 2009). Les fleurs sont visitées de manière opportuniste pour consommer du nectar par ces chauves-souris en général de plus grosse taille et frugivores.

2.2 Frugivorie

La spécialisation majeure vers la frugivorie se serait produite au moins une fois pour le dernier ancêtre commun des Rhinophyllinae et des Stenodermatinae, couronne terminale des Phyllostomidae. Une radiation adaptative se serait

déroulée avec des espèces montrant une préférence notable pour les fruits (Feldhamer et al. 2007) même si quelques espèces sont omnivores. La stricte frugivorie ne se retrouverait que chez les Stenodermatina comprenant les genres *Stenoderma*, *Ardops*, *Centurio*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris* et *Ametrida* (Davalos 2007). Cependant, la seule espèce du dernier genre cité consommerait également des fleurs, du nectar ou du pollen (Charles-Dominique et al. 2001).

2.3 Omnivores ou phytophages ?

Une omnivorie prédominante est retrouvée pour 5 espèces au sein du clade majoritairement phytophage Rhinophyllinae + Stenodermatinae ainsi qu'au sein des Glossophaginae préférentiellement nectarivores. Cet élargissement de la gamme de ressources utilisées serait à mettre en parallèle avec les besoins nutritionnels des chauves-souris. Ces derniers seraient différents selon les espèces, celles ayant de forts besoins ajouteraient des insectes (voire des Vertébrés) à leur régime alimentaire (Herrera et al. 2002) car ils sont riches en protéines et permettraient de satisfaire leurs besoins pour la croissance, la synthèse des tissus et la reproduction (Rex et al. 2010). Les fruits et le nectar, riches en hydrates de carbone, sont des éléments indispensables pour la locomotion et d'autres fonctions coûteuses en énergie. Le passage de la phytophagie

à l'omnivorie (présentant le plus fort taux de la matrice avec 2,49) est le changement de régime alimentaire le plus fréquent, éventuellement pour répondre à des besoins nutritionnels variés mais aussi profiter des ressources disponibles de manière opportuniste.

3. En résumé

Ainsi, l'évolution vers une stricte animalivorie (Vertébrés + « Invertébrés ») se serait produite trois fois dont une pour l'hématophagie. Une stricte spécialisation sur les insectes serait apparue à deux reprises mais ceci impliquerait peu de modifications par rapport à l'état de caractère ancestral. La préférence phytophage serait apparue une fois dans la couronne terminale. Au sein de cette dernière seraient apparues secondairement les préférences nectarivores et frugivores voire la stricte frugivorie. L'évolution de ces différents régimes alimentaires à partir d'un seul et même dernier ancêtre commun est discutée ci-après.

4. Etat de caractère du dernier ancêtre commun des Phyllostomidae

Les fossiles de Chiroptères connus présentent des dentitions de type insectivore. De plus, les contenus stomacaux des fossiles analysés contenaient des restes d'insectes (Rydell et Speakman 1995). Cependant, si ces fossiles étaient omnivores phytophages, un problème de détectabilité se

rencontrerait pour le nectar et pour le jus des fruits, consommés par les Stenodermatinae sans toucher aux graines ni à la pulpe (Dumont 2003) qui ne laisseraient par conséquent pas de traces. Ces éléments ajoutés à une morphologie comparables entre morphotype omnivore et insectivore ne permettent pas de conclure catégoriquement à un état de caractère insectivore pour le dernier ancêtre commun des Phyllostomidae comme avancé dans d'autres études (Ferrarezzi et Gimenez 1996 ; Wetterer et al. 2000). On peut nuancer en parlant d'un dernier ancêtre commun omnivore, et montrant éventuellement une préférence animalivore (insectivore). Mais qu'en est-il réellement du niveau des spécialisations ?

5. Omnivores ou spécialisés ?

Des analyses utilisant les isotopes stables ont montré que les Phyllostomidae sont des espèces omnivores opportunistes (au moins une partie du temps) malgré leurs spécialisations, complétant leur régime de base avec des nutriments provenant de différentes sources alimentaires. Les ajustements se feraient conséquemment aux changements locaux et saisonniers dans la disponibilité des ressources (Rex et al. 2010). La spécialisation permet aux espèces de tirer profit au maximum des ressources, l'omnivorie leur permettrait de répondre à leur besoins nutritionnels et de survivre quand leur nourriture privilégiée devient rare (Fleming 1986). Les différentes spécialisations relatives du

régime alimentaire se seraient produites par la suite à partir de ressources alimentaires variées et réparties tout au long du cycle annuel en Amérique du Sud et Centrale. Une diversification des plantes à fleurs serait à l'origine d'une diversification des chauves-souris phytophages voire insectivores (grâce à une augmentation des insectes pollinisateurs) (Jones et al. 2005). Les différents habitats utilisés, les différentes techniques de vol et d'écholocation pratiquées seraient impliqués dans ces différentes spécialisations sans impliquer un sacrifice de leur capacité à exploiter une grande variété de types de nourriture (Rex et al. 2010). Cette flexibilité ainsi que des spécialisations morphologiques, physiologiques et comportementales expliqueraient la radiation adaptative majeure qu'ont connue les Phyllostomidae.

Des études restent à entreprendre pour préciser le degré des spécialisations des espèces (e.g. disparition d'activité de l'enzyme maltase chez une espèce de vampire). Par ailleurs, les analyses évolutives présentent également de nombreuses perspectives aussi bien du côté des modèles que des bases de données moléculaires.

6. Faire parler les données existantes : Vers une amélioration des modèles utilisés

Le modèle d'évolution nucléotidique utilisé dans cette étude (GTR+ Γ +I), utilisant la

méthode du maximum de vraisemblance, permet d'extraire un maximum d'information. En essayant de détecter l'homoplasie, le maximum de vraisemblance permet de lutter contre la saturation de l'information phylogénétique. Il serait cependant souhaitable d'utiliser différents modèles GTR+ Γ +I indépendants sur les différentes partitions de la supermatrice mais aussi d'évaluer d'autres modèles afin de les comparer entre eux et de mettre en évidence celui qui est le mieux adapté aux données.

7. Le futur des bases de données moléculaires

7.1 Vers une supermatrice irréprochable

Pour cette étude, nous avons utilisé soit le mitogénome complet pour les Chiroptères, soit plusieurs gènes mitochondriaux et nucléaires. L'avantage de ces jeux de données est d'utiliser un grand nombre de sites et de permettre d'améliorer le signal utilisé pour les reconstructions phylogénétiques. Par ailleurs, les différents gènes utilisés présenteraient des modalités évolutives différentes (Wiens 1998) qui pourraient aider les analyses phylogénétiques. Cependant, l'usage de la supermatrice est controversé, notamment quand des données sont manquantes comme dans le cas de notre étude. L'idéal pour cette technique serait donc de séquencer les gènes manquants pour les taxons de notre supermatrice.

7.2 Vers la démocratisation du séquençage des mitogénomes complets ?

L'utilisation de mitogénomes complets est une piste de recherche très intéressante pour obtenir une phylogénie bien soutenue. Le test réalisé sur 14 mitogénomes presque complets de Chiroptères met en évidence un très fort soutien aux nœuds (Annexe 5). Dans un premier temps, il serait souhaitable de compléter le séquençage des mitogénomes pour les deux taxons de l'étude (*Artibeus obscurus* et *Carollia perspicillata*). Cette opération va se trouver facilitée, les fragments obtenus permettront de définir de nouvelles amorces spécifiques et de vérifier la qualité du séquençage avec des chevauchements de fragments. Malgré l'éloignement relatif des deux taxons au sein de la famille des Phyllostomidae, les amorces utilisées étaient similaires et peuvent probablement être mises à profit pour le séquençage d'autres espèces de la famille.

CONCLUSION

Cette étude souligne le besoin d'un échantillonnage taxonomique et génomique important pour obtenir une phylogénie fiable. Cette approche basée sur la famille des Phyllostomidae est une porte ouverte sur de futures études concernant la systématique et l'écologie évolutive des autres Chiroptères.

REMERCIEMENTS

Ce stage a été financé par le programme ANR MITOSYS 2006-2010. Merci à F. Catzeflis, M. Ballenghien, P. Gayral, C. Delsol, F. Cerqueira, E. Desmarais, E. Douzery, F. Botero, A. Taudière et F. Merlet pour les échantillons, le support technique, les conseils et la relecture.

Bibliographie

- Altringham, J. D., T. McOwat and L. Hammond (1996). Bats: biology and behaviour, Oxford University Press.
- Arthur, L. and M. Lemaire (2009). Les chauves-souris de France, Belgique, Luxembourg et Suisse, Biotope.
- Baker, R. J., S. R. Hooper, C. A. Porter and R. A. Van den Bussche (2003). Diversification among New World Leaf-Nosed Bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence, Museum of Texas Tech University.
- Charles-Dominique, P., A. Brosset and S. Jouard (2001). Atlas des chauves-souris de Guyane, MNHN.
- Davalos, L. M., and S. A. Jansa. (2004). "Phylogeny of the Lonchophyllini (Chiroptera: Phyllostomidae)". Journal of Mammalogy **85**:404-413.
- Davalos, L. M. (2007). "Short-faced bats (Phyllostomidae: Stenodermatina): a Caribbean radiation of strict frugivores." Journal of Biogeography **34**: 364–375.
- Dumont, E. (2003). Bats and fruit: An ecomorphological approach. Bat Ecology. T. H. Kunz and M. B. Fenton. Chicago, Illinois, University of Chicago Press: 398-429.
- Emmons, L. H. and F. Feer (1997). Neotropical rainforest mammals : a field guide, University of Chicago Press.
- Esbérard, C. E. L. and H. G. Bergallo (2004). "Aspectos sobre a biologia de *Tonatia bidens* (Spix) no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae)." Revista Brasileira de Zoologia **21**: 253-259.
- Feldhamer, G. A., L. C. Drickamer, S. H. Vessey, J. F. Merritt and C. Krajewski (2007). Mammalogy: adaptation, diversity, ecology, The John Hopkins University Press.
- Ferrarezzi, H. and E. d. A. Gimenez (1996). "Systematic patterns and the evolution of feeding habits in Chiroptera (Archonta: Mammalia)." Journal of Comparative Biology **1**: 75-94.
- Fleming, T. H. (1986). Opportunism versus specialization: the evolution of feeding strategies in frugivorous bats. Dordrecht, Dr W. Junk.
- Fleming, T. H., C. Geiselman and W. J. Kress (2009). "The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective." Annals of Botany 1-27.
- Giannini, N. P. and E. K. V. Kalko (2005). "The guild structure of animalivorous leaf-nosed bats of Barro Colorado Island, Panama, revisited." Acta Chiropterologica **7**: 131-146.
- Gillette, D. D. (1975). "Evolution of feeding strategies in bats." Tembiwa **18**: 39-48.
- Heithaus, C. R. (1982). Coevolution between bats and plants. Ecology of bats T. H. Kunz. New York, Plenum Press: 327-367.
- Herrera, L. G., E. Gutierrez, K. A. Hobson, B. Altube, W. G. Diaz and V. Sanchez-Cordero (2002). "Sources of assimilated protein in five species of New World frugivorous bats." Oecologia **133**: 208-287.
- Jones, G., and E. Teeling. (2006). "The evolution of echolocation in bats." Trends in Ecology & Evolution **21**:149-156.
- Jones, K. E., J. Bielby, M. Cardillo, S. A. Fritz, J. O'Dell, C. D. L. Orme, K. Safi, W. Sechrest, E. H. Boakes, C. Carbone, C. Connolly, M. J. Cutts, J. K. Foster, R. Grenyer, M. Habib, C. A. Plaster, S. A. Price, E. A. Rigby, J. Rist, A. Teacher, O. R. P. Bininda-Emonds, J. L. Gittleman, G. M. Mace and A. Purvis (2009). "PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals." Ecology **90**.
- Jones, K. E., O. R. Bininda-Edmonds and J. L. Gittleman (2005). "Bats, clocks, and rocks: Diversification patterns in Chiroptera." Evolution **59**: 2243-2255.
- Kunz, T. H. and M. B. Fenton (2003). Bat ecology, The University of Chicago.
- Lin, Y.-H., P. A. McLenachan, A. R. Gore, M. J. Phillips, R. Ota, M. D. Hendy and D. Penny (2002). "Four New Mitochondrial Genomes and the Increased Stability of Evolutionary Trees of Mammals from Improved Taxon Sampling." Molecular Biology and Evolution **19**: 2060-2070.
- Lin, Y.-H. and D. Penny (2001). "Implications for Bat Evolution from Two New Complete Mitochondrial Genomes." Molecular Biology and Evolution **18**: 684-688.

- Nikaido, M., M. Harada, Y. Cao, M. Hasegawa and N. Okada (2000). "Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*)." Journal of Molecular Evolution **51**: 318-328.
- Nikaido, M., K. Kawai, Y. Cao, M. Harada, S. Tomita, N. Okada and M. Hasegawa (2001). "Maximum Likelihood Analysis of the Complete Mitochondrial Genomes of Eutherians and a Reevaluation of the Phylogeny of Bats and Insectivores." Journal of Molecular Evolution **53**: 508-516.
- Nowak, R. M. (1999). Walker's mammals of the world, The John Hopkins University Press.
- Paradis, E., J. Claude and K. Strimmer (2004). "APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language." Bioinformatics **20**: 289-290.
- Porter, C. A., and R. J. Baker. (2004). "Systematics of Vampyressa and related genera of Phyllostomid bats as determined by cytochrome-B sequences." Journal of Mammalogy **85**:126-132.
- Pumo, D. E., P. S. Finamore, W. R. Franek, C. J. Phillips, S. Tarzami and D. Balzarano (1998). "Complete Mitochondrial Genome of a Neotropical Fruit Bat, *Artibeus jamaicensis*, and a New Hypothesis of the Relationships of Bats to Other Eutherian Mammals." Journal of Molecular Evolution **47**: 709-717.
- Rex, K., B. I. Czaczkes, R. Michener, T. H. Kunz and C. C. Voigt (2010). "Specialization and omnivory in diverse mammalian assemblages." Ecoscience **17**: 37-46.
- Rydell, J. and J. R. Speakman (1995). "Evolution of nocturnality in bats: Potential competitors and predators during their early history." Biological Journal of the Linnean Society **54**: 183-191.
- Schondube, J. E., L. G. Herrera-M and M. d. R. C. (2001). "Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats." Zoology **104**: 59-73.
- Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. Mammal Species in the world: taxonomic and geographic reference. D. E. Wilson and D. M. Reeder, Hopkins University Press. **1**: 312-529.
- Simmons, N. B., K. L. Seymour, J. Habersetzer and G. F. Gunnell (2008). "Primitive Early Eocene bat from Wyoming and the evolution of flight and echolocation." Nature **451**: 818-822.
- Swofford, D. L. (1998). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Teeling, E. C. (2009). "Hear, hear: the convergent evolution of echolocation in bats?" Trends in Ecology and Evolution **24**: 351-354.
- Teeling, E. C., O. Madsen, R. A. Van den Bussche, W. W. de Jong, M. J. Stanhope and M. S. Springer (2002). "Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **99**: 1431-1436.
- Teeling, E. C., M. S. Springer, O. Madsen, P. Bates, J. O'Brien S and W. J. Murphy (2005). "A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record." Science **307**: 580-584.
- Tuttle, M. D. and M. J. Ryan (1981). "Bat predation and the evolution of frog vocalizations in the Neotropics." Science **214**: 677-678.
- Velazco, P. M. (2005). Morphological phylogeny of the bat genus *Platyrrhinus* Saussure, 1860 (Chiroptera: Phyllostomidae) with description of four new species, Field Museum of Natural History.
- Veselka, N., D. D. McErlain, D. W. Holdsworth, J. L. Eger, R. K. Chlem, M. J. Mason, K. L. Brain, P. A. Faure and M. B. Fenton (2010). "A bony connection signals laryngeal echolocation in bats." Nature **463**: 939-942.
- Wetterer, A. L., M. V. Rockman and N. B. Simmons (2000). "Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): Data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites." Bulletin of the American Museum of Natural History **248**: 200.
- Wiens, J. J. (1998). "Combining data sets with different phylogenetic histories." Systematic Biology **47**: 568-581.

ANNEXE 1a

Protocole de réalisation de la supermatrice

Un lot de séquences de Phyllostomidae du génome mitochondrial (ARNr 12S, ARNr 16S, CYB et COI) et du génome nucléaire (RAG-2) a été collecté sur le National Center for Biotechnology Information/GenBank (liste disponible sur demande). Nous avons ensuite homogénéisé la taxonomie, en tenant compte des synonymes et des nouvelles espèces. La liste des espèces utilisées (avec les références) est disponible en Annexe 1b, la liste des gènes en Annexe 1c. La classification de Baker (2003) a été utilisée pour les sous-familles (Annexe 1d). Nous avons utilisé deux séquences par espèce de Phyllostomidae (une séquence par défaut sinon) pour reconstruire les phylogénies gène par gène. Ces dernières nous ont servi de support pour choisir une séquence sur les deux disponibles par espèce. Si les deux individus de la même espèce étaient regroupés, nous avons fait le choix de garder la séquence correspondant à la branche la plus courte. Le seul écart à cette règle porte sur les paraphylies de *Micronycteris microtis* et *M. megalotis* avec la reconstruction phylogénétique pour le CYB (cytochrome B).. Nous avons décidé de garder *M.microtis* AY380756.1 et *M.megalotis* DQ077429.1.

Ce choix des taxons nous a permis de réaliser une supermatrice avec les gènes mitochondriaux et le gène nucléaire (RAG-2). Ces différentes séquences ont fait l'objet de concaténations par espèce pour reconstruire les arbres phylogénétiques.

ANNEXE 1b

Classification utilisée pour l'étude

Sous-famille	Genre	Espèce	Synonyme (Genre+Espèce)		Référence
Stenodermatinae	Ametrida	centurio			Simmons, 2005
Glossophaginae	Anoura	caudifer			Simmons, 2005
Glossophaginae	Anoura	geoffroyi			Simmons, 2005
Glossophaginae	Anoura	latidens			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Ardops	nicholli			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	flavescens			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	amplus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	concolor			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	fimbriatus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	fraterculus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	hirsutus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	inopinatus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	jamaicensis			Hoofer 2008
Stenodermatinae	Artibeus	lituratus	Artibeus	intermedius	Hoofer 2008
Stenodermatinae	Artibeus	obscurus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Artibeus	planirostris			Hoofer 2008
Stenodermatinae	Artibeus	schwarzzi			Hoofer 2008
Glossophaginae	Brachyphylla	cavernarum			Simmons, 2005
Carollinae	Carollia	brevicauda			Simmons, 2005
Carollinae	Carollia	perspicillata			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Centurio	senex			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Chiroderma	doriae			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Chiroderma	salvini			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Chiroderma	trinitatum			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Chiroderma	villosum			Simmons, 2005
Glossophaginae	Choeroniscus	godmani			Simmons, 2005
Glossophaginae	Choeroniscus	minor			Simmons, 2005
Glossophaginae	Choeronycteris	mexicana			Simmons, 2005
Phyllostominae	Chrotopterus	auritus			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Dermanura	anderseni	Artibeus	anderseni	Hoofer 2008
Stenodermatinae	Dermanura	azteca	Artibeus	aztecus	Hoofer 2008
Stenodermatinae	Dermanura	bogotensis	Artibeus	glaucus bogotensis	Hoofer 2008
Stenodermatinae	Dermanura	cinerea	Artibeus	cinereus	Hoofer 2008
Stenodermatinae	Dermanura	incomitata	Artibeus	incomitatus	Simmons, 2005
Stenodermatinae	Dermanura	phaeotis	Artibeus	phaeotis	Hoofer 2008
Stenodermatinae	Dermanura	tolteca	Artibeus	toltecus	Hoofer 2008
Desmodontinae	Desmodus	rotundus			Simmons, 2005
Desmodontinae	Diaemus	youngi			Simmons, 2005
Desmodontinae	Diphylla	ecaudata			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Ectophylla	alba			Simmons, 2005
Stenodermatinae	Enchisthenes	hartii	Artibeus	hartii	Simmons, 2005
Glossophaginae	Erophylla	sezekorni			Simmons, 2005
Glossophaginae	Glossophaga	longirostris			Simmons, 2005
Glossophaginae	Glossophaga	soricina			Simmons, 2005
Glyphonycterinae	Glyphonycteris	daviesi	Micronycteris	daviesi	Simmons, 2005
Glyphonycterinae	Glyphonycteris	sylvestris	Micronycteris	sylvestris	Simmons, 2005
Glossophaginae	Hylonycteris	underwoodi			Simmons, 2005
Micronycterinae	Lampronnycteris	brachyotis	Micronycteris	brachyotis	Simmons, 2005
Glossophaginae	Leptonycteris	curasoe			Simmons, 2005
Lonchophyllinae	Lionycteris	spurrelli			Simmons, 2005
Lonchophyllinae	Lonchophylla	handleyi			Simmons, 2005
Lonchophyllinae	Lonchophylla	thomasi			Simmons, 2005
Lonchorhininae	Lonchorhina	aurita			Simmons, 2005
Lonchorhininae*	Lonchorhina	inuitata			Simmons, 2005
Lonchorhininae	Lonchorhina	orinocensis			Simmons, 2005
Phyllostominae	Lophostoma	brasiliense	Tonatia	brasiliense	Simmons, 2005
Phyllostominae	Lophostoma	carrikeri	Tonatia	carrikeri	Simmons, 2005
Phyllostominae	Lophostoma	evotis	Tonatia	evotis	Simmons, 2005
Phyllostominae	Lophostoma	schulzi	Tonatia	schulzi	Simmons, 2005
Phyllostominae	Lophostoma	silvicolium	Tonatia	silvicola	Simmons, 2005

Sous-famille	Genre	Espèce	Synonyme (Genre+Espèce)	Référence
Phyllostominae	Macrophyllum	macrophyllum		Simmons, 2005
Macrotinae	Macrotus	californicus		Simmons, 2005
Macrotinae	Macrotus	waterhousii		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Mesophylla	macconnelli		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	brosseti		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	giovanniae		Baker, 2004
Micronycterinae	Micronycteris	hirsuta		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	homezi		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	matses		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	megalotis		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	microtis		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	minuta		Simmons, 2005
Micronycterinae	Micronycteris	schmidtorum		Simmons, 2005
Phyllostominae*	Mimon	bennettii		Simmons, 2005
Phyllostominae	Mimon	crenulatum		Simmons, 2005
Glossophaginae	Monophyllus	redmani		Simmons, 2005
Glossophaginae	Musonycteris	harrisoni		Simmons, 2005
-	Mystacina	tuberculata		Simmons, 2005
Phyllostominae	Phylloderma	stenops		Simmons, 2005
Glossophaginae	Phyllonycteris	aphylla		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Phyllops	falcatus		Simmons, 2005
Phyllostominae	Phyllostomus	discolor		Simmons, 2005
Phyllostominae	Phyllostomus	elongatus		Simmons, 2005
Phyllostominae	Phyllostomus	hastatus		Simmons, 2005
-	Pipistrellus	abramus		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	albericoi		Velazco, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	aurarius		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	brachycephalus		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	dorsalis		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	helleri		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	infuscus		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	ismaeli		Velazco, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	lineatus		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	masu		Velazco, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	matapalensis		Velazco, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	recifinus		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Platyrrhinus	vittatus		Simmons, 2005
-	Pteronotus	parnellii		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Pygoderma	bilabiatum		Simmons, 2005
Rhinophyllinae	Rhinophylla	pumilio		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Sphaeronycteris	toxophyllum		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Stenoderma	rufum		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Sturnira	erythromos		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Sturnira	lilium		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Sturnira	magna		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Sturnira	tildae		Simmons, 2005
Phyllostominae	Tonatia	bidens		Simmons, 2005
Phyllostominae	Tonatia	evotis		Simmons, 2005
Phyllostominae	Tonatia	saurophila		Simmons, 2005
Phyllostominae	Trachops	cirrhosus		Simmons, 2005
Glyphonycterinae	Trinycteris	nicefori	Micronycteris nicefori	Simmons, 2005
Stenodermatinae	Uroderma	bilobatum		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Uroderma	magnirostrum		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Vampyressa	melissa		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Vampyressa	pusilla		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Vampyressa	thyone		Simmons, 2005
Stenodermatinae	Vampyriscus	bidens	Vampyressa bidens	Baker, 2003
Stenodermatinae	Vampyriscus	brocki	Vampyressa brocki	Baker, 2003
Stenodermatinae	Vampyrodes	caraccioli		Simmons, 2005
Phyllostominae	Vampyrum	spectrum		Simmons, 2005

Pour deux espèces (*Mimon bennettii* et *Lonchorhina aurita*), le placement au sein de la phylogénie résulterait d'un artefact (cf. Annexe 6). Ainsi, nous avons inféré les sous-familles probables d'après la littérature existante (cf. Baker 2003).

Genre	Espèce	Synonyme (Genre+Espèce)	12S+16S	CO1	CYBb	RAG-2
Macrophyllum	macrophyllum		AF411540	EF080438.1	FJ155484.1	AF316458.1
Macrotus	californicus				AY380744.1	AF316459.1
Macrotus	waterhousii		AF263229		AY380745.1	AF316460.1
Mesophylla	macconnelli		AY395818	EF080444.1	FJ154122.1	AF316462.1
Micronycteris	brosseti				AY380771.1	
Micronycteris	giovanniae				AY380750.1	
Micronycteris	hirsuta		AY395819	EF080447.1	DQ077415.1	AF316466.1
Micronycteris	homezi		AY395820		AY380754.1	
Micronycteris	matses				DQ077419.1	
Micronycteris	megalotis		AY395821	EU096780.1	DQ077429.1	AF316467.1
Micronycteris	microtis		AY395822		AY380756.1	
Micronycteris	minuta		AY395823		DQ077404.1	AF316468.1
Micronycteris	schmidtorum		AF411535		DQ077406.1	AF316470.1
Mimon	bennettii				DQ903832.1	
Mimon	crenulatum		AF411543	EF080449.1	FJ155478.1	DQ903850.1
Monophyllus	redmani		AY395824			AF316473.1
Musonycteris	harrisoni		AY395844			
Mystacina	tuberculata		AY960981	AY960981.1	AY960981.1	AY141021.1
Phylloderma	stenops		AF411542	EU096830.1	FJ155480.1	AF316480.1
Phyllonycteris	aphylla					AF316478.1
Phyllops	falcatus				AY604448.1	AY604453.1
Phyllostomus	discolor			EF080547.1		
Phyllostomus	elongatus			EF080551.1		
Phyllostomus	hastatus		AF411541	EU096841.1	FJ155479.1	AF316479.1
Pipistrellus	abramus		AB061528	AB061528.1	AB061528.1	
Platyrrhinus	albericoi				FJ154123.1	FJ154321.1
Platyrrhinus	aurarius			EF080561.1	FJ154129.1	FJ154326.1
Platyrrhinus	brachycephalus		AY395825	EF080577.1	FJ154132.1	FJ154329.1
Platyrrhinus	dorsalis				FJ154139.1	FJ154336.1
Platyrrhinus	helleri			EU096845.1	FJ154146.1	FJ154344.1
Platyrrhinus	infuscus				FJ154150.1	FJ154348.1
Platyrrhinus	ismaeli				FJ154155.1	FJ154352.1
Platyrrhinus	lineatus				FJ154172.1	FJ154370.1
Platyrrhinus	masu				FJ154163.1	FJ154361.1
Platyrrhinus	matapalensis				FJ154168.1	FJ154365.1
Platyrrhinus	recifinus				FJ154176.1	FJ154373.1
Platyrrhinus	vittatus				FJ154177.1	FJ154376.1
Pteronotus	parnellii		AF263221	EU096903.1	AY604456.1	AF330817.1
Pygoderma	bilabiatum		AY395826		DQ903821.1	DQ903838.1
Rhinophylla	pumilio		AY395827	EF080600.1		AF316484.1
Sphaeronycteris	toxophyllum		AY395828		AY604452.1	AF316486.1
Stenoderma	rufum		AY395829		AY604431.1	AF316487.1
Sturnira	erythromos				FJ154179.1	FJ154377.1
Sturnira	lilium			EF080684.1	EF536965.1	DQ903848.1
Sturnira	magna		AY395845			
Sturnira	tildae			EF080691.1	DQ903816.1	DQ903847.1
Tonatia	bidens		AF442090		FJ155490.1	AF442088.1
Tonatia	saurophila		AF411531	EF080735.1	FJ155487.1	AF442086.1
Trachops	cirrhosus		AF411539	EU097058.1	FJ155483.1	DQ903852.1
Trinycteris	nicefori	Micronycteris nicefori	AY395830	EF080785.1	AY380749.1	AF316469.1
Uroderma	bilobatum		AY395831	EF080791.1	AY169955.1	AF316491.1
Uroderma	magnirostrum				FJ154180.1	FJ154378.1
Vampyressa	melissa				FJ154185.1	FJ154383.1
Vampyressa	pusilla		AY395832		DQ903825.1	DQ903843.1
Vampyressa	thyone			EF080802.1		
Vampyriscus	bidens	Vampyressa bidens	AY395833	EU097067.1	FJ154181.1	FJ154379.1
Vampyriscus	brocki	Vampyressa brocki	AY395834	EF080799.1		
Vampyrodes	caraccioli		AY395846	EF080808.1	FJ154183.1	FJ154381.1
Vampyrum	spectrum		AF411537	EF080810.1	FJ155482.1	AF316495.1

ANNEXE 1d

Classification des Phyllostomidae par Baker et al. (2003)

Phyllostomidae	
Macrotinae	
<i>Macrotus</i>	
Karyovarians (new unranked taxon)	
Micronycterinae	
<i>Micronycteris</i>	
<i>Lampronnycteris</i>	
Victivarians (new, unranked taxon)	
Desmodontinae	
Diphyllini	
<i>Diphylla</i>	
Desmodontini	
<i>Desmodus</i>	
<i>Diaemus</i>	
Phyllovarians (new, unranked taxon)	
Lonchorhinae	
<i>Lonchorhina</i>	
Unnamed, unranked taxon	
Phyllostominae	
Macrophyllini	
<i>Macrophyllum</i>	
<i>Trachops</i>	
Phyllostomini	
<i>Lophostoma</i>	
<i>Tonatia</i>	
<i>Mimon</i>	
<i>Phylloderma</i>	
<i>Phyllostomus</i>	
Vampyrini	
<i>Chrotopterus</i>	
<i>Vampyrum</i>	
Hirsutaglossa (unranked taxon)	
Glossophaginae	
Glossophagini	
<i>Monophyllus</i>	
<i>Glossophaga</i>	
<i>Leptonycteris</i>	
Brachyphyllini	
<i>Brachyphylla</i>	
Phyllonycterini	
<i>Erophylla</i>	
<i>Phyllonycteris</i>	
Choeronycterini	
Anourina	
<i>Anoura</i>	
Choeronycterina	
<i>Hylonycteris</i>	
<i>Choeroniscus</i>	
<i>Choeronycteris</i>	
<i>Musonycteris</i>	
<i>Lichonycteris</i>	
<i>Scleronycteris</i>	
	Dulcivarians (new, unranked taxon)
	Lonchophyllinae
	<i>Lionycteris</i>
	<i>Lonchophylla</i>
	<i>Platalina</i>
	Nullicauda (unranked taxon)
	Carolliinae
	<i>Carollia</i>
	Glyphonycterinae
	<i>Glyphonycteris</i>
	<i>Trinycteris</i>
	Carpovarians (new, unranked taxon)
	Rhinophyllinae
	<i>Rhinophylla</i>
	Stenodermatinae
	Sturnirini
	<i>Sturnira</i>
	Stenodermatini
	Vampyressina
	<i>Chiroderma</i>
	<i>Vampyriscus</i>
	<i>Uroderma</i>
	<i>Vampyressa</i>
	<i>Mesophylla</i>
	<i>Vampyrodes</i>
	<i>Platyrrhinus</i>
	Mesostenodermatini (new, unranked taxon)
	Enchisthenina
	<i>Enchisthenes</i>
	Ectophyllina
	<i>Ectophylla</i>
	Artibeina
	<i>Artibeus</i>
	<i>Dermanura</i>
	Stenodermatina
	<i>Ariteus</i>
	<i>Ardops</i>
	<i>Stenoderma</i>
	<i>Centurio</i>
	<i>Pygoderma</i>
	<i>Sphaeronycteris</i>
	<i>Ametrida</i>
	<i>Phyllops</i>

ANNEXE 2a

Extraction Phénol-Chloroforme

1. Séchage des fragments découpés à l'étuve (environ 20 minutes).
2. Ajouter 300µl de **Solution de lyse** (Tris 0,1M ; NaCl 0,1M ; EDTA 50 mM ; SDS 1%).

Pour 20 ml :

- 2ml Tris 1M pH 8.5
- 2ml NaCl 1M
- 10ml EDTA 0.1M pH 7.4
- 1ml SDS 20%
- 5ml H2O MilliQ

3. Ajouter 20µl de **Protéinase K** (20mg/ml).
4. Lyse au bain-marie 37°C (3 heures).
5. Broyer occasionnellement au piston, ajouter 10µl de **Protéinase K**
6. Lyse au bain-marie 37°C (3 heures).

Hotte chimique

7. Ajouter 200 µl de **Phénol**.
8. Mélanger 5' par inversion.
9. Centrifugation 13000 rpm (2 min).
10. Ajouter 300 µl d'**Alcool Chloro Iso Amylique**.
11. Mélanger 5 minutes par inversion.
12. Centrifugation 13000 rpm (10 min).
13. Transférer surnageant dans tube propre.
14. Ajouter 300 µl d'**Alcool Chloro Iso Amylique**.
15. Mélanger 5 minutes par inversion.
16. Centrifugation 13000 rpm (10 min).
17. Transférer surnageant dans tube propre. Eventuellement refaire 14 à 16.
18. Ajouter 30 µl d'**Acétate de Sodium** 3M, pH 5.5
19. Mélanger par inversion.
20. Ajouter 300 µl d'**Ethanol absolu froid**.
21. Vérifier présence pelote.

22. Culot en précipitation au congélateur (-20°C) entre 1h et 1 nuit.
23. Centrifugation 13000 rpm (30 min).
24. Faire 1 ou 2 rinçages à l'**Ethanol 70°**.
25. Laisser sécher à l'étuve.
26. Reprendre dans 30 à 50 µl d'**H2O MilliQ**.

2b. Amplification PCR

Solution Mère	<i>[Initiale]</i>	<i>Unité</i>		<i>Qté finale</i>	<i>Unité</i>		<i>Vol. d'ADN par réaction</i>
ADN	50	ng/µl	ADN	25,0	ng	ADN/cDNA	2,00 µl
	<i>[Initiale]</i>	<i>Unité</i>		<i>[Finale]</i>	<i>Unité</i>		<i>Vol. de réactifs pour le mix</i>
dNTP	10	mM	dNTP	0,3	mM	dNTP	0,63 µl
Taq	5	U/µl	Taq	0,05	U/µl	Taq	0,21 µl
Tp	10	X	Tp	1,00	X	Tp	2,10 µl
MgCl2	25	mM	MgCl2	0,0	mM	MgCl2	0,00 µl
Am F	10	µM	Am F	0,50	µM	Am F	1,05 µl
Am R	10	µM	Am R	0,50	µM	Am R	1,05 µl
						Bétaine	2,10 µl
						H₂O	11,76 µl
			Nombre de réactions :	1			
			Volume de réaction :	20	µl	Volume du Mix :	18,90 µl
			Marge pour le mix :	5	%	Volume à distribuer :	18,90 µl

Cycle PCR Mito/Arvico

1. 95°C 3'00"
2. 95°C 0'30"
3. **55°C 0'40"**
4. 72°C 2'30"
5. 39*Etapes 2 à 4
6. 72°C 7'00"

Electrophorèse

Gel d'agarose 1% TAE 1X

Migration 20' à 100 mV

Marqueur de taille : 5µl de SmartLadder

2c. Purification

Découpage sur bandes

- ✓ Colonne de purification
- ✓ Centrifugation 10' 10000 rpm

2d. Réaction de séquence

- ✓ 1 ou 2 µl ADN amplifié – qsp H₂O jusqu'à 7 µl
- ✓ 1 µl primer 3.3M
- ✓ 2 µl BigDye
- ✓ Thermocycleur

1	96°C	2'00"
2	96°C	0'20"
3	55°C	0'20"
4	60°C	4'00"
5	Etapes 2 à 4 35 à 39*	

2e. Précipitation des séquences

- ✓ Ajuster à 20 µl (ajouter 10 µl d'H₂O)
- ✓ Ajouter 2 µl d'EDTA 125mM et 2µl d'Acetate de Sodium 3M
- ✓ Ajouter 50 µl d'Ethanol absolu froid
- ✓ Laisser 5 minutes à température ambiante
- ✓ Centri 30 minutes à 3000 rpm
- ✓ Vidange et centri à l'envers 5 minutes à 600 rpm
- ✓ Ajouter 100 µl d'Ethanol 70°
- ✓ Centri 5 minutes à 3000 rpm
- ✓ Vidange et centri à l'envers 5 minutes à 600 rpm
- ✓ Etuve (80°C) bouchons ouverts 5 minutes
- ✓ Ajouter 16 µl Hidi

ANNEXE 2b

Provenance des amorces de l'étude

Les 42 couples d'amorces utilisés dans ce stage pour amplifier l'ADN mitochondrial sont issues des zones conservées identifiées au sein des Phyllostomidae sur 3 génomes mitochondriaux complets de chauves-souris (*Artibeus jamaicensis*, *Mystacina tuberculata* et *Pipistrellus abramus*) avec le logiciel MUST (Philippe 1993), différents gènes mitochondriaux de Phyllostomidae collectés sur GenBank (ARNr 12S, ARNr 16S, CYB & COI) et des amorces issues de la littérature (Hooper et al. 2008).

ANNEXE 2c

Protocole pour l'amplification par PCR, la purification, la réaction de séquence et le séquençage

Les amplifications par PCR ont été réalisées avec 0,50 µM de chacun des primers, 1,00 X de tampon, 0,05 U/µl de Taq (5 PRIME-PCR Extender Enzyme Mix), 0,3 mM de dNTP et 2ml d'ADN 1/100 (23,93 ng/µl). La réaction de PCR consistait en : la dénaturation à 95°C pendant 3'30'', l'hybridation à 55°C (ou 50°C) pendant 40'', l'élongation à 72°C pendant 2'30'' suivi de 39 cycles avec dénaturation à 95°C pendant 30'', l'hybridation à 55°C pendant 40'', l'élongation à 72°C pendant 2'30'' et une dénaturation terminale de 7' à 72°C.

Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose 1%.

Trois méthodes de purification ont été utilisées : le découpage des bandes sur gel avec la purification des fragments amplifiés sur des colonnes (Montage DNA Gel Extraction Device), la purification des PCR automatisée par billes magnétiques (kit Agencourt Ampure) ou l'Exosap-IT. Pour cette troisième technique, 1/10 du volume du mix PCR d'Exosap y est ajouté avant de passer 15' à 37°C puis 15' à 80°C dans le thermocycleur.

Tous les produits purifiés de PCR ont été passés en réaction de séquence (BigDye Terminator v1.1 ou v3.1) dans les deux sens (utilisation des amorces Forward et Reverse des différents couples) avant d'être séquencés et assemblés (si possible) sur Sequencher v4.5 (Genes Codes Corporation).

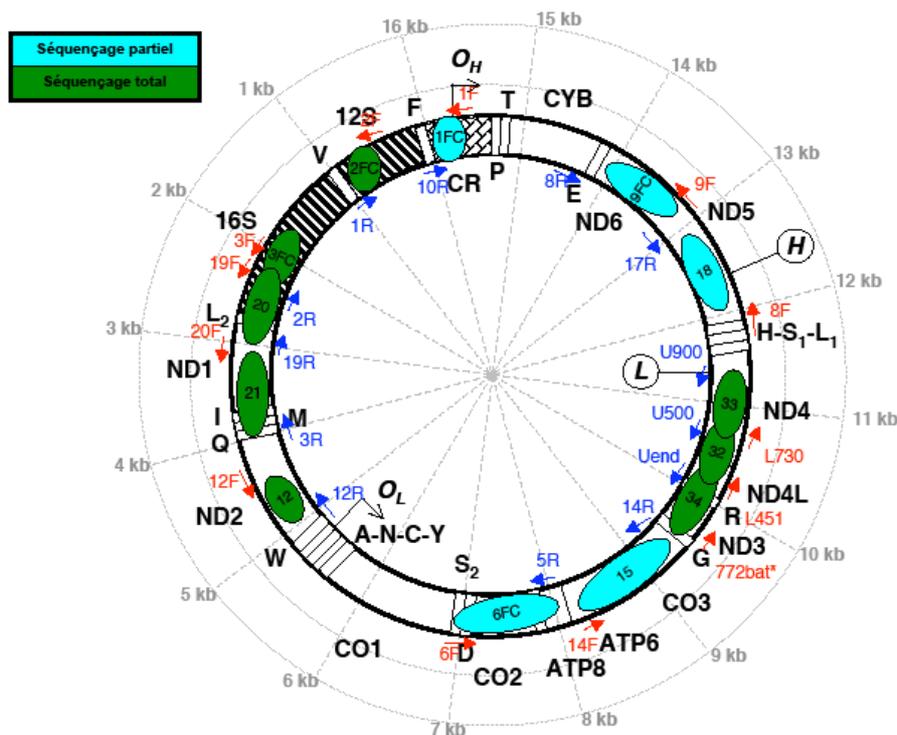
ANNEXE 4a

Liste des séquences générées pendant le stage (dans le sens conventionnel). Le tissu provient d'un échantillon d'*Artibeus obscurus* capturé en Guyane (Tissu T-4669)

Couple d'Amorce	Am. F	Am. R	Taille (pb)	Gène, pb
Ao_2FC	2F	1R	232	12S (partiel)
Ao_3FC	3F	2R	928	16S (partiel) + Leu + ND1 (partiel)
Ao_20	19F	19R		
Ao_21	20F	3R	806	ND1 (partiel) + Ile + Gln + Met (partiel)
Ao_12	12F	12R	420	ND2 (partiel)
Ao_6FC	6F		361	Ser (partiel) + Asp + COII (partiel)
Ao_6FC		5R	225	COII (partiel) + Lys + AT8 (partiel)
Ao_15	14F		319	ATP6 (partiel)
Ao_34	772bat*	Uend	1751	Gly (partiel) + ND3 + Arg + ND4-L + ND4 (partiel)
Ao_32	L451	U900		
Ao_33	L730			
Ao_18	8F		458	ND5 (partiel)
Ao_18		17R	264	ND5 (partiel)
Ao_9FC	9F		448	ND5 (partiel)
Ao_9FC		8R	221	ND6 (partiel)
Ao_1FC	1F		420	D-loop (partiel)
Ao_1FC		10R	269	D-loop (partiel)
TOTAL (pb)			7122	

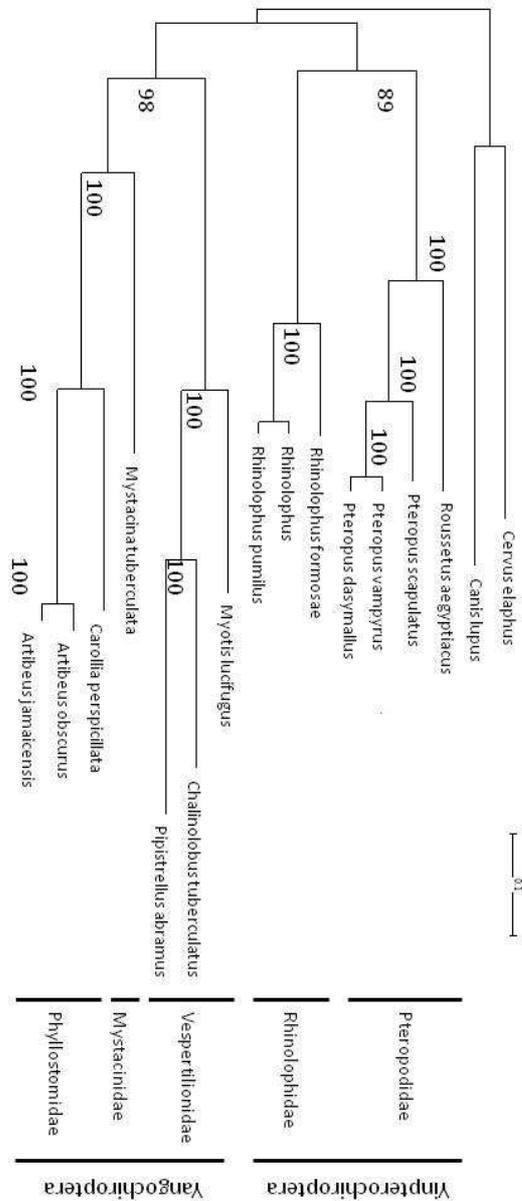
ANNEXE 4b

Représentation schématique des fragments séquencés avec position des amorces sur le génome mitochondrial d'un individu d'*Artibeus obscurus*



ANNEXE 5

Arbre phylogénétique issu de l'alignement des séquences listées en figure 2. La méthode utilisée est le maximum de vraisemblance avec le modèle d'évolution nucléotidique GTR+ Γ +I.



Les deux *Artibeus spp* sont plus proches entre eux que de *Carollia perspicillata*. Les familles connues (Pteropodidae, Rhinolophidae, Vespertilionidae et Phyllostomidae) forment des groupes monophylétiques appuyés par des bootstraps de 100. Rhinolophidae et Pteropodidae forment un clade correspondant à l'infraordre des Yinpterochiroptera (bootstrap de 89). On retrouve les Vespertilionidae, les Mystacinidae et les Phyllostomidae au sein de l'infraordre des Yangochiroptera (bootstrap de 98). La monophylie des Chiroptères est retrouvée dans cet arbre avec un bootstrap de 100.

ANNEXE 6

Révision de la phylogénie issue de la supermatrice de gènes mitochondriaux et nucléaires et inférence des sous-familles sensu Baker (2003).

Sous-famille des Macrotinae

Les deux *Macrotus spp* forment cette sous-famille avec un bootstrap de 100.

Sous-famille des Micronycterinae

Elle regroupe le genre *Micronycteris* (9 espèces, bootstrap de 92), *Lampronnycteris brachyotis* et *Mimon bennetii*. *Micronycteris giovanniae* récemment décrite (2007) est bien séparée de son groupe frère avec un bootstrap de 92. A noter que le genre *Mimon* se trouve éclaté au sein de l'arbre, la deuxième espèce du genre est placée dans la sous-famille des Phyllostominae.

Sous-famille des Desmodontinae

Les 3 espèces de vampires (*Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* et *Diphylla ecaudata*) sont regroupées au sein de cette sous-famille (bootstrap de 98).

Sous-famille des Phyllostominae

On retrouve cette sous-famille mais avec présence de *Lonchorhina inusitata* qui appartient à une autre sous-famille. Les trois *Phyllostomus spp* et les deux *Tonatia spp* sont regroupés entre eux (bootstraps respectifs de 81 et 100). Le genre *Lophostoma* est bien monophylétique (bootstrap de 98) mais un problème de monophylie des espèces se pose pour *L.carrikeri* et *L.brasiliense*. La deuxième espèce du genre *Mimon* (*M.crenulatum*) se trouve dans cette sous-famille.

Sous-famille des Glossophaginae

Un bootstrap de 82 vient appuyer la monophylie de cette sous-famille qui comprend 11 genres. Les trois *Anoura spp* et les deux *Glossophaga spp* sont regroupés entre eux (bootstraps respectifs de 94 et 97).

Sous-famille des Lonchorhinae

Deux des trois espèces du genre *Lonchorhina* sont regroupées, formant cette sous-famille appuyée par un bootstrap de 96. La troisième espèce (*L.inusitata*) serait placée à tort dans la sous-famille des Phyllostominae.

Sous-famille des Lonchophyllinae

Cette sous-famille est composée des 2 *Lonchophylla sp* et de *Lionycteris spurrelli* avec un bootstrap de 98. Le genre *Lonchophylla* apparaît paraphylétique. Le clade *L. handleyi* et *Lionycteris spurrelli* est supporté par un bootstrap de 73. Cet arrangement ne serait pas si bien supporté et ne justifierait pas de modifier la taxonomie actuelle (Davalos, 2004).

Sous-famille des Carollinae

Les deux *Carollia spp* constituent cette sous-famille supportée par un bootstrap de 98.

Sous-famille des Glyphonycterinae

On retrouve cette sous-famille avec le genre *Glyphonycteris* et *Trinycteris nicefori*. Le clade obtient un bootstrap de 74 mais au sein du genre *Glyphonycteris*, *G.daviesi* et *G.sylvestris* sont regroupés par deux fois avec l'autre espèce (bootstraps de 83 et 84).

Sous-famille des Rhinophyllinae

Rhinophylla pumilio est le seul représentant de cette sous-famille dans cette phylogénie, groupe frère de la sous-famille des Stenodermatinae.

Sous-famille des Stenodermatinae

Cette sous-famille comprend à elle seule 20 genres. Malgré un faible soutien aux nœuds (bootstraps de 49 et 50), la proposition d'éclater les 18 espèces de la sous-famille des Artibeinae en deux genres (*Artibeus* et *Dermanura*) est en accord avec l'arbre de cette étude (Hofer 2008). Les 8 espèces de *Platyrrhinus spp*, incluant 4 nouvelles espèces pour la science (Velazco 2005), sont regroupées (bootstrap de 85). Le regroupement des 4 espèces du genre *Chiroderma* est attestée par un bootstrap de 83, celui des 2 espèces du genre *Uroderma* par un bootstrap de 100. La proposition d'éclater le genre *Vampyressa* avec définition d'un nouveau genre (*Vampyriscus*) pour *V.bidens* et *V.brocki* est en accord avec les résultats de cette étude (Baker 2003 ; Porter 2004). Seuls 2 genres de cette dernière sous-famille forment des groupes paraphylétiques mais relativement proches au niveau des relations de parenté (*Sturnira spp*, *Vampyressa spp*).

Seuls deux taxons semblent être mal positionnés au niveau de la sous-famille. *Lonchorhina inusitata* devrait rejoindre *L.orinocensis* et *L.aurita* dans la sous-famille des Lonchorhinae, *Mimon bennettii* devrait se placer avec *M.crenulatum* dans les Phyllostominae. L'éclatement des genres *Mimon* et *Lonchorhina* au sein de la famille serait dû à un artefact de la supermatrice. Ces taxons apparemment proches ne présentent pas les mêmes gènes séquencés (cf ANNEXE 1c). Ainsi, la base de comparaison pour la reconstruction phylogénétique est différente. Le problème rencontré ici ne serait pas l'absence de données en elle-même mais le trop faible nombre de caractères informatifs permettant le regroupement (Wiens 2003). Cela impliquerait une précision affaiblie pour la phylogénie avec un positionnement moins précis des taxons incomplets et une plus grande chance d'être groupés avec des taxons éloignés sur la base d'états de caractère homoplasique. Augmenter le nombre de caractères échantillonnés augmenterait la probabilité d'obtenir des sites informatifs permettant ainsi une plus grande fiabilité de la phylogénie.

Résumé

La famille des Phyllostomidae (Ordre des Chiroptères), avec plus de 160 espèces connues à ce jour et une grande diversité de traits d'histoire de vie, constitue un modèle d'étude original en biologie évolutive. Endémique des zones tropicales et subtropicales américaines, elle se caractérise par une grande diversité de régimes alimentaires : la frugivorie, la nectarivorie, la pollinivorie, la carnivorie, l'insectivorie sans oublier l'hématophagie. Dans cette étude, un lot de séquences de plusieurs gènes mitochondriaux (ARNr 12S + 16S, COI et CYB) et un gène nucléaire (RAG-2) ont été utilisés. L'approche par supermatrice a permis la reconstruction de la phylogénie la plus complète et la plus récente pour la famille à partir de données moléculaires. Cette phylogénie a servi de support pour inférer des données de régime alimentaire et estimer leur état de caractère ancestral. Par ailleurs, l'arbre issu de l'alignement de deux mitogénomes partiellement séquencés dans cette étude (deux espèces de Phyllostomidae, *Artibeus obscurus* et *Carollia perspicillata*) avec 12 autres mitogénomes complets de Chiroptères et deux groupes externes, démontre clairement l'intérêt d'un échantillonnage génomique important pour tenter d'obtenir une phylogénie mieux soutenue. Les analyses phylogénétiques basées sur ces mitogénomes complets constitueront un point de départ prometteur pour de nombreuses études en systématique et en écologie évolutive de tous les Chiroptères.