

PHYLOGÉOGRAPHIE MITOCHONDRIALE DU MULOT SYLVESTRE (*APODEMUS SYLVATICUS*) DANS LA RÉGION PALÉARCTIQUE OCCIDENTALE

Johan René MICHAUX^{1,2}, Elodie MAGNANOU², Caroline NIEBERDING¹, Roland LIBOIS¹

1. Unité de Recherches Zoogéographiques ; Institut de Zoologie ;
Quai Van Beneden, 22, 4020 Liège, Belgique

2. Laboratoire de Paléontologie – cc064 ;
Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier (UMR 5554-CNRS), UM II,
Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

E-mail : Johan.Michaux@ulg.ac.be

Abstract. — We have sequenced 965 base pairs of the mitochondrial DNA cytochrome *b* (mtDNA *cyt b*) from 102 woodmice (*Apodemus sylvaticus*) samples collected from 40 European localities. The aims of the study were to answer the following questions: i) Did the Mediterranean peninsulas play a role as a refuge for small mammals? ii) Is the genetic variability of a small mammal like *A. sylvaticus* higher in the Mediterranean regions as compared with northern Europe? iii) Is it possible to find patterns of postglacial colonisation of Europe other than those presently recognised?

Sequence data were analysed using Distance and Maximum Parsimony phylogenetic reconstruction methods. A minimum spanning network was also calculated. Population genetic structure was determined by analysis of molecular variance (AMOVA). A « mismatch distribution » analysis was also performed to estimate the patterns of expansion.

The results provide a clear picture of the impact of Quaternary glaciations on the genetic and geographic structure of the woodmouse. Analyses indicate a higher genetic variability for the woodmouse in the Mediterranean peninsulas as compared to northern Europe and the role of these peninsulas as refuge regions for small mammals. A new pattern of postglacial colonisation is also proposed where the Iberian and southern France refuge populations colonised almost all the European regions. The Sicilian population appears to be highly differentiated and highly variable. This result emphasises the importance of this island as a « hot spot » for the intraspecific genetic diversity of the woodmouse. Finally, populations of this species in North Africa orig-

inated from south-western Europe and are probably the result of a recent anthropogenic introduction.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, le nombre d'études phylogéographiques a littéralement explosé, particulièrement au niveau de l'Europe (TABERLET *et al.*, 1998; AVISE, 2000; HEWITT, 2001). Ces études ont été effectuées chez une grande variété d'espèces incluant des plantes et différents groupes d'animaux (insectes, amphibiens, poissons, oiseaux et quelques mammifères) (e.g. BILTON *et al.*, 1998; LUCCHINI & RANDI, 1998; LUNT *et al.*, 1998; SANTUCCI *et al.*, 1998; ALEXANDRINO *et al.*, 2000; ENGELBRECHT *et al.*, 2000; MAC HORDON *et al.*, 2000; PITRA *et al.*, 2000; SHARBLE *et al.*, 2000; SZIMURA *et al.*, 2000; MARDULYN, 2001; SEDDON *et al.*, 2001; WIDMER & LEXER, 2001). Elles ont montré l'intérêt des méthodes de biologie moléculaire pour mieux comprendre l'impact des glaciations du Pléistocène sur la diversité génétique des espèces européennes.

Tout au long des derniers 2,4 millions d'années, suivant des fluctuations climatiques cycliques d'environ 100 000 ans, les espèces adaptées aux climats tempérés ont en effet subi de nombreuses contractions et expansions de leurs aires de répartition. Celles-ci donnèrent lieu à l'extinction régulière des populations du Nord de l'Europe pendant les âges

glaciaires. Lors des interglaciaires, ces extinctions furent chaque fois suivies par des expansions rapides de populations à partir de régions refuges situées principalement dans les péninsules méditerranéennes (Espagne-Portugal, Italie, Balkans) (TABERLET *et al.*, 1998). Ce processus impliqua de nombreux étranglements génétiques ayant probablement eu pour conséquence une perte importante de la variabilité génétique intraspécifique des espèces dans le Nord de l'Europe (HEWITT, 1996 ; 1999 ; 2001). Au contraire, les populations vivant dans le Sud de l'Europe furent moins affectées par de telles fluctuations climatiques et devraient présenter une diversité génétique plus importante.

L'isolement de populations de nombreuses espèces dans les péninsules méditerranéennes au plus fort des périodes glaciaires a également conduit à l'apparition de groupes génétiquement différenciés. C'est à partir de ces différents groupes génétiques que les espèces recolonisèrent l'ensemble de l'Europe au terme de la dernière glaciation, il y a environ 16 000 ans. En fonction de la distribution spatiale actuelle de ces groupes au travers de l'Europe, HEWITT (1996, 1999) a reconnu trois grands schémas de recolonisation de cette région : dans le premier (schéma *Chorthippus parallelus*), l'expansion postglaciaire est apparue uniquement à partir de la région balkanique ; dans le second (schéma *Erinaceus europaeus*), les espèces ont recolonisé l'Europe du Nord à partir de trois régions refuges (péninsule Ibérique, Italie-Balkans) ; enfin, selon le troisième (schéma *Ursus arctos*) les espèces ont recolonisé l'ensemble de l'Europe à partir de deux refuges (péninsule Ibérique et région du Caucase).

Si ces études ont donné de nombreuses informations en ce qui concerne la phylogéographie des espèces européennes, l'influence des fluctuations climatiques du quaternaire sur leur diversité génétique apparaît encore obscure sous plusieurs aspects, particulièrement pour certains groupes d'animaux. Ainsi, à l'exception de l'étude effectuée sur le hérisson (*Erinaceus* spp.) (SEDDON *et al.*, 2001) et de quelques données sur le criquet *Chorthippus* spp.

(HEWITT, 1999), très peu de données sont actuellement disponibles chez les animaux pour confirmer que le degré de diversité génétique est plus important chez les populations des péninsules méditerranéennes. Ce type d'information est pourtant particulièrement important pour les études en biologie de la conservation. Par ailleurs, les espèces étudiées actuellement se caractérisent par un des schémas de recolonisation postglaciaire décrits par HEWITT (1999). Est-il néanmoins possible de trouver d'autres schémas de recolonisation chez de nouvelles espèces étudiées ? Enfin, à l'exception de l'étude de SEDDON *et al.* (2001) sur le hérisson, toutes les études effectuées sur les micromammifères européens n'ont été basées que sur un échantillonnage restreint ne représentant qu'une partie de l'aire de répartition des espèces. Ce manque d'information ne permet pas de déterminer le rôle exact des péninsules méditerranéennes en tant que zones refuges pour ce groupe d'animaux. En effet, BILTON *et al.* (1998) ont émis l'hypothèse que les espèces de micromammifères n'ont pas recolonisé la région Paléarctique occidentale à partir des régions refuges du Sud de l'Europe, celles-ci ne représentant que des « usines » à spéciation allopatrique, mais bien qu'elles proviendraient de régions plus orientales comme le Nord du Caucase.

Dans l'objectif de répondre à ces questions, nous avons étudié une petite espèce de rongeur, le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*). Celui-ci présente en effet de nombreux avantages pour une étude phylogéographique : 1) il est inféodé au milieu forestier et est présent depuis au moins trois millions d'années en Europe (MICHAUX & PASQUIER, 1974). Ainsi, au même titre que les forêts qu'il habite, son aire de répartition a très probablement fluctué tout au long des changements climatiques du Pléistocène ; 2) il est relativement commun, facile à piéger et largement distribué sur l'ensemble de la région Paléarctique occidentale ; 3) l'histoire évolutive de cette espèce est bien connue (MICHAUX & PASQUIER, 1974 ; MICHAUX *et al.*, 1997 ; SERIZAWA *et al.*, 2000 ; SUZUKI *et al.*, 2001 ; MICHAUX *et al.*, 2001) et ce genre est bien représenté dans les données fossiles. Une calibration de son horloge moléculaire est ainsi possible.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cent deux *Apodemus sylvaticus* provenant de 40 localités distribuées sur l'ensemble de son aire de répartition ont été utilisés dans les analyses (tableau 1, fig. 1).

L'ADN a été extrait à partir de tissus préservés en éthanol (SAMBROOK *et al.*, 1989). Ces tissus proviennent de la collection d'*Apodemus* de J.R. Michaux (annotés JRM) et de la collection de tissus de mammifères déposée à l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier (CATZEFLIS, 1991 ; annotés T).

Une large portion du gène mitochondrial cytochrome *b* (965 pb) a été amplifiée à l'aide des amorces L7 (5'-ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT -3') et H16 (5'-ACATGAATYGGAGGYCAACCG-3'). Les réactions d'amplification ont été effectuées dans des volumes de 2X50 µl incluant 25 µl de chaque amorce à 2 µM, 20 µl de 1 dNTP 1 mM, 10 µl de tampon 10X de réaction, 10 µl d'eau purifiée et 0,2 µl de Taq DNA polymérase Promega à 5 U/µl. Environ 200 ng d'extrait d'ADN (10 µl) ont été utilisés pour chaque réaction d'amplification, effectuée par un thermocycleur

Origine géographique:		Nombre total d'individus	Symboles des localités (voir Figs. 1, 2 et 3)	Numéros des échantillons ou numéros d'accension GenBank (pour les individus déjà séquencés)	
<i>Apodemus sylvaticus</i>					
Espagne	Euqi (Navarre)	4	E1	T-2141, T-2142, T-2143, T-2144	
	Torta	1	E2	JRM-700	
	Figueras (Catalogne)	1	E3	JRM-578	
Portugal	Murcia	4	E4	JRM-594, JRM-596, JRM-714, JRM-715	
	Murtal	2	P	JRM-563, JRM-564	
France	Py Mantet (Pyrénées orientales)	7	F1	JRM-269, JRM-270, JRM-271, JRM-272, JRM-274, JRM-277, JRM-278	
	Murviel (Hérault)	3	F2	JRM-574, JRM-575, JRM-577	
	Cap Lardier (Var)	4	F3	JRM-142 to JRM-145	
	Sérandon (Corrèze)	1	F4	JRM-396	
	Allier	1	F5	T-665	
	Morvan	1	F6	JRM-589	
	Alpes Maritimes	1	F7	JRM-584	
	Italie	Penne (Abruzzes)	4	I1	JRM-163, JRM-164, JRM-165, JRM-167
		Rome (Latium)	1	I2	JRM-168
		Grosseto (Toscane)	1	I3	JRM-176
San Polo (Latium)		1	I4	JRM-171	
Tarquinia (Toscane)		3	I5	JRM-172, JRM-173, JRM-174	
Sicile	Aspromonte (Calabre)	4	I6	JRM-159 to JRM-162, JRM-551 to JRM-560	
	Alla (Centre Sicile)	3	S1	JRM-304 to JRM-306	
Belgique	Madonia Forest (Nord Sicile)	12	S2	JRM-868 to JRM-879	
	Ardennes	7	B	JRM-101, JRM-102, JRM-103, JRM-104, JRM-105, JRM-106, JRM-107	
Pays-Bas		1	NL	ABO33695	
Allemagne	Dresde (Saxe)	2	A1	JRM-515, JRM-519	
	Leipzig (Saxe)	1	A2	JRM-514	
République Tchèque	Bielefeld	1	A3	JRM-157	
	Kasperske	3	CZ1	JRM-372 to JRM-374	
Suède	Klinec jivoviste	1	CZ2	JRM-375	
Yougoslavie	Uppsala	3	Su	JRM-452, JRM-453, JRM-455	
	Susarra (Vojvodine)	3	Y	JRM-210 to JRM-212	
Slovénie	Skofja	1	SI1	JRM-417	
	Ljubljana (Vecrnapot)	2	SI2	JRM-434, JRM-436	
Ukraine	Tchernobyl	4	U	AF127536, 37, 38, 43	
Grèce	Macedoine	1	Gr1	JRM-181	
	Péloponnèse	1	Gr2	JRM-183	
	Grèce Centrale	1	Gr3	JRM-705	
Roumanie	Cheile Garfistei	1	R1	JRM-570	
	constant county	1	R2	JRM-571	
Turquie	Caycuma (Zonjuidek)	1	Tur	JRM-184	
Tunisie	Ain Dram	4	Tun	JRM-136 to JRM-141	
Maroc	Ket ama	4	M	JRM-136 to JRM-141	
<i>Apodemus flavicollis</i>					
Italie	Abruzzes	1		AJ311150	
France	Allier	1		AJ311151	
<i>Apodemus mystacinus</i>					
Syrie		1		AJ311148	
Grèce		1		AJ311147	
<i>Apodemus agrarius</i>					
Estonie		1		AJ311144	
République Tchèque		1		AJ311145	

Tableau 1. Distribution géographique et références des échantillons d'*Apodemus* utilisés lors des analyses.

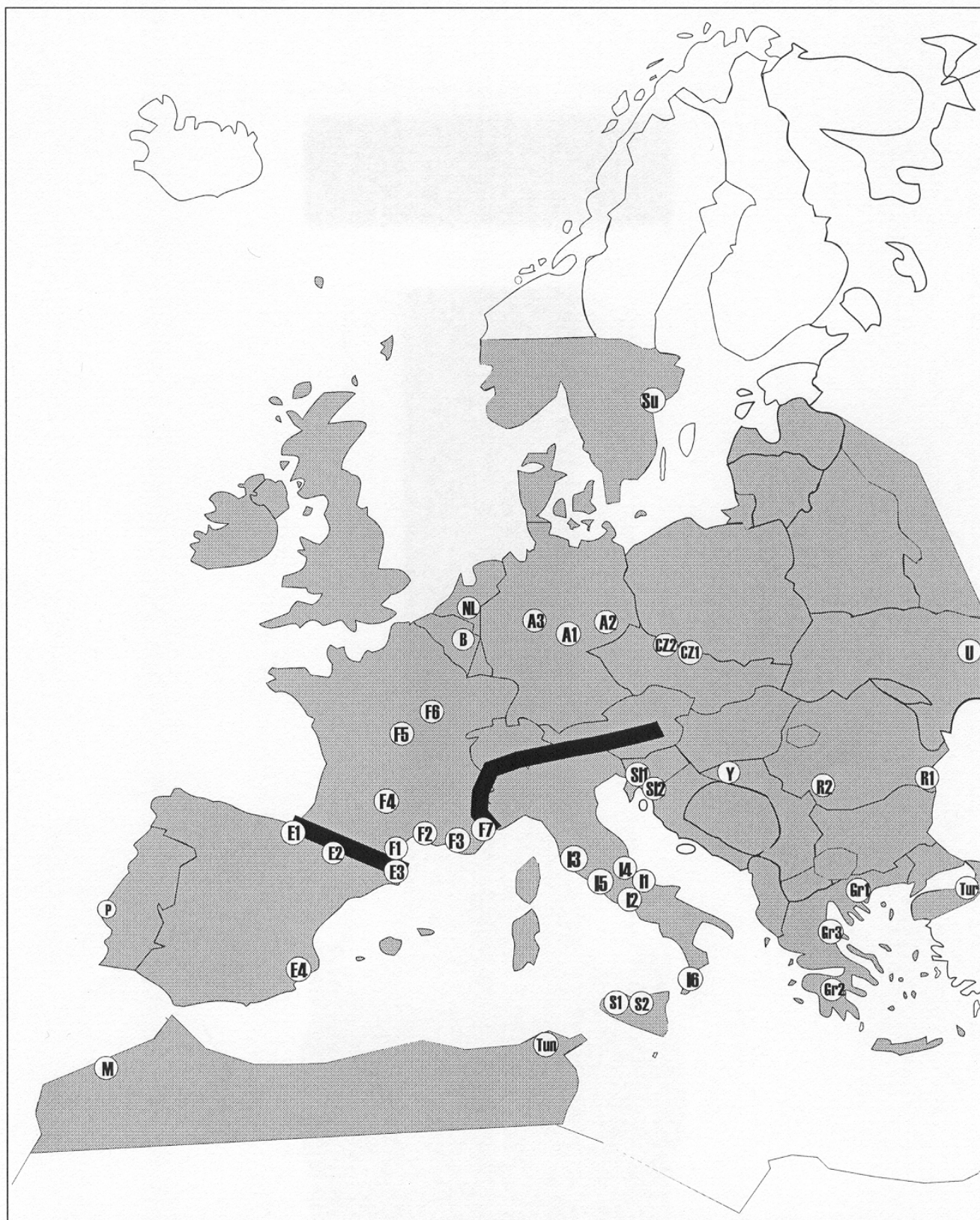


Figure 1. Distribution géographique des échantillons d'*Apodemus sylvaticus* étudiés. La zone grisée correspond à l'aire de distribution de l'espèce (comme décrit par Schilling *et al.*, 1986 ; Zagorodnyuk, 1996 & Mezhzherin, 1997). Les lignes en gras correspondant aux principales barrières biogéographiques européennes, à savoir les Alpes et les Pyrénées.

Labover PTC100 (33 cycles – 20 s à 94 °C, 30 s à 50 °C et 1 min 30 s à 68 °C –, cycle final d'extension de 10 min à 68 °C). Les produits de PCR ont été purifiés avec des colonnes Ultra-free DA Amicon (Millipore), et les deux brins d'ADN séquencés directement avec le kit de séquençage Bigdye terminator (Applied Biosystems) et un séquenceur automatique ABI 310 (Applied Biosystems).

Alignement des séquences et analyses de saturation

Les séquences de cytochrome *b* d'*Apodemus sylvaticus*, d'*A. flavicollis* et d'*A. mystacinus*, issues de GenBank (tableau 1) ont été alignées aux nouvelles séquences en utilisant l'éditeur ED du programme MUST (PHILIPPE, 1993). Une analyse de saturation des données de cytochrome *b* a été effectuée selon la méthode de PHILIPPE & DOUZERY (1994) et HASSANIN *et al.* (1998).

Analyses

Les séquences alignées ont été analysées selon des méthodes de distance (Neighbor Joining, NJ; SAITOU & NEI, 1987) et de maximum de parcimonie (MP; FITCH, 1971) avec le programme PAUP 4.0b8 (SWOFFORD, 1998; NJ : critère ME, estimateur de distance de Kimura à deux paramètres K2P; MP : recherche heuristique, option TBR branch swapping, Maxtrees = 1000). L'analyse NJ a été effectuée selon une distribution gamma pour les taux de substitution entre les sites. Le paramètre alpha (YANG, 1996) et la proportion de sites invariables (I) ont été estimés par la méthode du maximum de vraisemblance en tenant compte de la phylogénie obtenue par l'analyse de distance (programme PAUP 4.0b8). La robustesse des nœuds a été estimée par la méthode du bootstrap (BP) (FELSENSTEIN, 1985) (1000 et 100 répétitions aléatoires pour l'analyse de distance et de MP, respectivement).

Une analyse en réseau a également été effectuée en utilisant le programme MINSPNET disponible dans le programme Arlequin 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Les diversités nucléotidique π et haplotypique h , ont été estimées en utilisant le programme

DNASP (ROZAS & ROZAS, 1997). L'histoire démographique des lignées génétiques mises en évidence a été estimée par une analyse de « mismatch distribution » des différentes substitutions entre paires d'haplotypes en utilisant le programme DNASP (ROZAS & ROZAS, 1997).

La structure génétique populationnelle a été déterminée par une analyse de variance moléculaire (AMOVA) et en calculant ϕ_{ST} avec le programme Arlequin 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Cette analyse a été effectuée à différents niveaux hiérarchiques : entre groupes (correspondant aux sous clades observés), entre populations au sein de chacun de ces sous clades (17 populations ont été définies en fonction de données géographiques, écologiques et géologiques), et enfin au sein de chacune des populations.

Un test de Mantel (MANTEL, 1967) a été effectué pour déterminer une association possible entre les distances génétiques et géographiques séparant tous les échantillons analysés. Seules les populations de Sicile et du Nord de l'Afrique séparées de l'Europe par la mer Méditerranée n'ont pas été prises en compte pour cette analyse. Les distances génétiques entre les échantillons ont été obtenues en effectuant une analyse de distance (estimateur de Kimura à 2 paramètres). Les distances géographiques ont été calculées en utilisant le programme « Encarta World Atlas » (Microsoft Office, 1993-1996).

Les époques de séparation des différentes lignées génétiques observées ont été estimées sur base du pourcentage de divergence génétique obtenu lors d'une analyse de distance (estimateur K2P). Comme proposé par AVISE (2000), la distance génétique entre les différentes lignées a été corrigée en fonction du polymorphisme ancestral en utilisant la formule :

$$P_{net} = P_{AB} - 0.5 (P_A + P_B)$$

où P_{net} est la distance corrigée entre les lignées *A* et *B*, P_{AB} est la distance génétique moyenne obtenue entre les lignées *A* et *B*, et P_A et P_B correspondent aux distances génétiques moyennes entre individus au sein de chacune de ces lignées. Deux points de calibration dérivant de données paléontologiques ont été utilisés pour cette analyse : 1) l'époque de

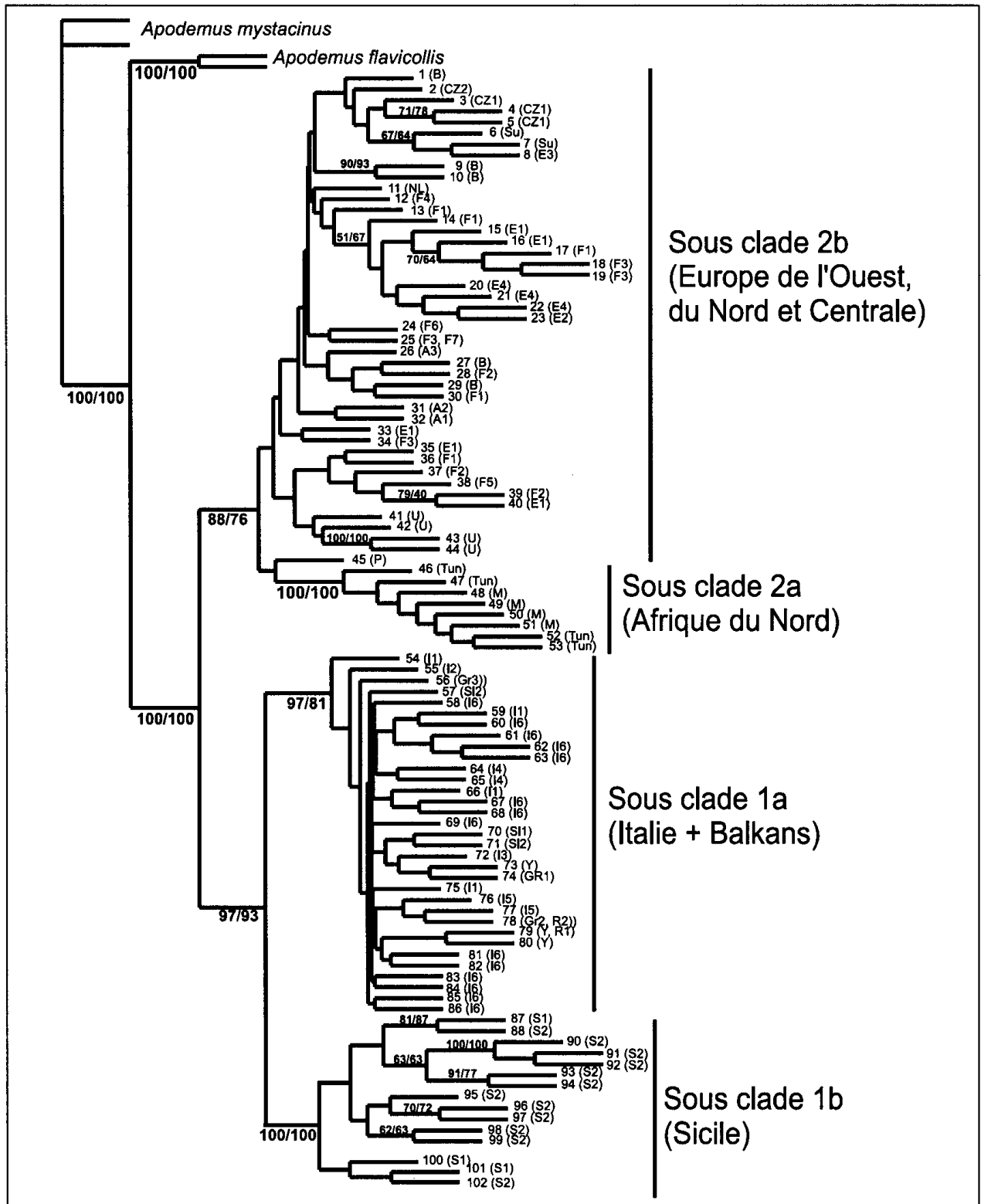


Figure 2. Arbre Neighbour-joining reprenant les 99 haplotypes de mulots sylvestre (désignés de 1 à 99). Les origines géographiques (voir tableau 1 et figure 1) sont donnés en parenthèse. Les chiffres en-dessous des branches indiquent les valeurs de bootstrap au dessus de 50 % obtenues lors des analyses de distance et de maximum de parcimonie.

divergence entre *A. mystacinus* et toutes les petites espèces de *Sylvaemus* estimée à approximativement à 7 millions d'années (AGUILAR & MICHAUX, 1996; MICHAUX *et al.*, 1997); 2. la divergence entre *A. sylvaticus* et *A. flavicollis* estimée à 4 millions d'années (MICHAUX & PASQUIER, 1974; MICHAUX, Comm. Pers.).

RÉSULTATS

Variations des haplotypes et analyses de saturation

Un total de 99 haplotypes différents a été identifié au sein des 102 séquences de cytochrome *b* d'*A. sylvaticus* analysées. La matrice de données complète comprend ces 99 haplotypes ainsi que deux séquences d'*A. flavicollis* et d'*A. mystacinus* utilisées comme groupes externes. Cette matrice contient 965 paires de bases, dont 282 sites (29 %) sont variables et 226 (23 %) sont informatifs pour les analyses de parcimonie. Le ratio moyen entre transitions et transversions est de 2,29. Les fréquences en nucléotides sont : C 26,3 %, T 30,5 %, A 30,7 %, G 12,5 %.

L'analyse de saturation a montré qu'aucun des événements n'est affecté par de l'homoplasie, même au niveau des transitions aux troisièmes positions du codon ($S = 0.76$) généralement saturées dans les études phylogénétiques basée sur le cytochrome *b* (MICHAUX *et al.*, 2002).

Analyses phylogénétiques

L'analyse de distance (fig. 2) a montré que les 99 haplotypes d'*A. sylvaticus* sont divisés en deux grands clades : le premier correspondant aux animaux d'Italie, des Balkans et de Sicile (clade 1), le second reprenant toutes les populations d'Europe de l'Ouest, Centrale et du Nord ainsi que du Nord de l'Afrique (clade 2). Ces clades sont fortement soutenus (valeurs de bootstrap BP de 97 % et 88 %, respectivement) et séparés par un grand degré de divergence génétique (5,4 %). Le premier clade est lui-même divisé en deux sous groupes fortement différenciés (BP 100 %, 3,6 % de divergence génétique). Le premier comprend les animaux de Sicile (sous clade 1b); le deuxième correspond aux

animaux italo-balkaniques (sous clade 1a). Le groupe nord-africain (sous clade 2a) apparaît également nettement divergent (BP 100 %, distance K2P 1,9 %) de toutes les populations d'Europe de l'Ouest (sous clade 2b). Aucune autre structuration géographique nette n'est observée.

L'analyse de parcimonie est caractérisée par un seul arbre le plus parcimonieux (L = 582 pas évolutifs, CI = 0.53, RI = 0.89) identique à celui obtenu lors de l'analyse de distance (valeurs de BP en fig. 2).

L'analyse en réseau (fig. 3) montre également une forte différenciation entre les clades 1 et 2 (22 pas mutationnels). Les populations sicilienne et nord africaine apparaissent également bien séparées des animaux italiens et ouest-européens, avec 17 et 9 pas mutationnels, respectivement. Les sous clades 1a et 2a présentent une topologie « en étoile » suggérant une expansion récente à partir d'un faible nombre d'animaux (AVISE, 2000) alors que les sous clades 1b et 2b apparaissent plus hétérogènes.

Diversité nucléotidique et haplotypique, structure populationnelle

Le degré de diversité nucléotidique et haplotypique a été calculé pour chaque sous clade. Par ailleurs, dans le but de vérifier si la diversité nucléotidique est bien plus importante au sein des régions refuges potentielles en comparaison des populations du Nord de l'Europe, le sous clade 2b a été divisé en deux sous groupes : le premier correspondant aux populations ibériques et du Sud de la France; le second correspondant à toutes les autres populations. Le résultat de ces analyses est résumé au tableau 2. Il indique que les animaux siciliens présentent le plus haut niveau de diversité nucléotidique. Au sein des populations continentales, le groupe correspondant aux populations du sud-ouest de l'Europe (sous clade 2b1) est caractérisé par un niveau significativement ($p < 0.05$) plus important de diversité nucléotidique par rapport aux populations nord-européennes (2b2) ou aux autres sous clades. Au sein de ces derniers (clades 1a et b, 2a), les animaux nord-africains présentent un très faible degré de diversité nucléotidique.

Clade 1	Taille des échantillons	Nombre d'haplotypes	Divergence génétique (% distance K2P)	Diversité nucléotidique (Pi)	Erreur Standard	Diversité haplotypique (h)	Erreur Standard
Sous clade 1a (Italie + Balkans)	26	25	1,22	0,0064	0,0008	0,0968	0,022
Sous clade 1b (Sicile)	15	15	1,33	0,013	0,001	1	0,024
Clade 2							
Sous clade 2a (Afrique du Nord)	8	8	0,29	0,0029	0,0005	1	0,063
Sous clade 2b1* (Sud Ouest de l'Europe)	27	23	1,41	0,0087	0,0007	0,981	0,023
Sous clade 2b2* (Europe du Nord)	26	20	1,09	0,0052	0,001	0,965	0,028

* Les sous clade 2b est divisé en deux groupes différents correspondant aux populations du Sud et du Nord de l'Europe, respectivement.

Tableau 2. Variabilité génétique observée au sein des quatre groupes génétiques d'*A. sylvaticus*.

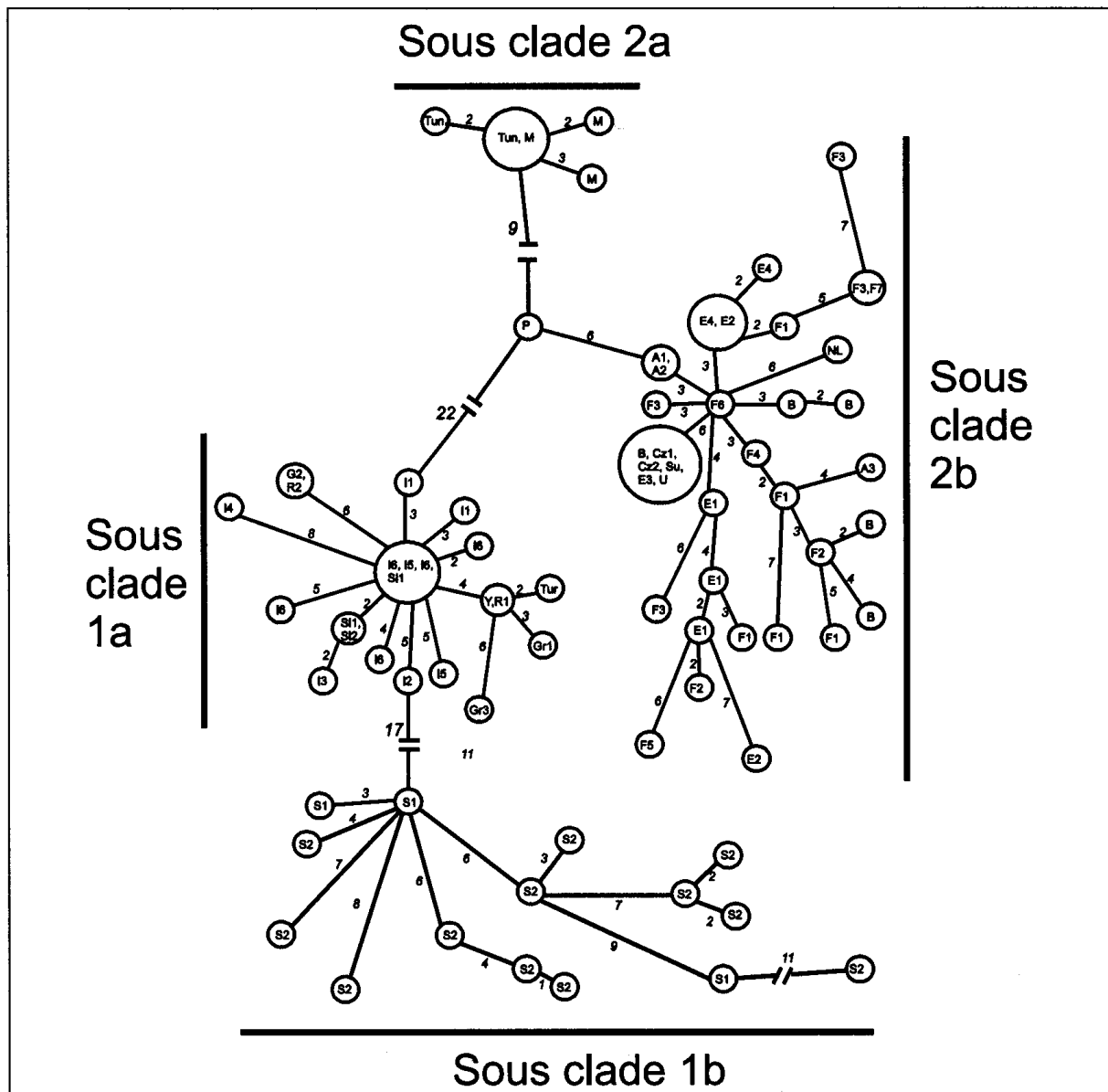


Figure 3. Analyse en réseau construit sur base des séquences de cytochrome *b* d'*Apodemus sylvaticus* obtenues. Les origines géographiques (voir tableau 1 et figure 1) sont indiquées. Pour simplifier la figure, les haplotypes séparés par seulement un pas mutationnel ont été associés. Les nombres en italique correspondent aux pas mutationnels observés entre haplotypes.

Le test de Mantel effectué sur l'ensemble des échantillons continentaux européens n'a pas montré de relation significative entre distance génétique et distance géographique ($p = 0,34$). Ainsi, la structure génétique observée entre les populations de mulots étudiées ne peut s'expliquer par un simple isolement par la distance.

L'analyse de variance moléculaire AMOVA a montré que la majorité (76,2 %) de la variabilité observée au niveau des séquences d'ADN mitochondrial est distribuée entre les quatre grands groupes génétique. Au contraire, un très faible pourcentage de cette variabilité (3,8 %) est observée au sein de chacun de ces groupes.

Comme il pouvait être espéré pour des populations s'étant répandues au terme de la dernière glaciation à partir d'un nombre relativement faible d'animaux, l'analyse de « mismatch distribution » a montré une signature de population en croissance (distribution en « cloche ») pour les sous clades 1a, 2a et 2b. Au contraire, une distribution plus hétérogène caractérise le sous clade sicilien (1b) suggérant une population plus stable moins sujette à une expansion récente.

ANALYSE DE DATATION

La distance K2P moyenne entre *A. mystacinus* et le groupe *A. flavicollis*-*A. sylvaticus*, qui divergèrent il y a 7 millions d'années (Ma), est de 18,4 %. Celle entre *A. flavicollis* et *A. sylvaticus*, qui se séparèrent il y a 4 Ma, est de 11,4 %. Ces valeurs donnent ainsi un taux de 2,6/2,85 % de divergence génétique par million d'année. Quand ce taux est appliqué aux différentes dichotomies observées au sein d'*A. sylvaticus*, et en tenant compte du polymorphisme ancestral de l'ADN mitochondrial, les datations suivantes sont obtenues : 1,5/1,6 Ma pour la séparation entre les clades 1 et 2, 0,8/0,9 Ma pour la séparation entre les sous clades 1a et 1b (tableau 4) et 0,4 Ma pour la séparation des animaux nord africains avec ceux d'Europe de l'Ouest.

DISCUSSION

Deux grands groupes génétiques de mulots en Europe continentale

Les analyses en réseaux, de distance et de maximum de parcimonie montrent clairement que les populations d'*Apodemus sylvaticus* européennes sont séparées en quatre grands groupes génétiquement bien différenciés ne se recouvrant pas géographiquement. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par les méthodes de RFLP (MICHAUX *et al.*, 1996a & b ; 1998a & b ; LIBOIS *et al.*, 2001). Cette structuration géographique est très fortement soutenue, 76,2 % de la variabilité totale de l'ADN mitochondrial (analyse AMOVA, tableau 3) étant distribuée entre ces quatre groupes génétiques. Au contraire, une faible variabilité existe entre les populations présentes au sein de chacun de ces groupes (3,8 % de la variabilité totale).

L'Europe continentale est séparée en deux grandes lignées : la première se distribue du Sud de l'Espagne au sud, à la Suède au nord et à l'Ukraine à l'est ; la seconde est limitée à l'Italie, les Balkans et l'Ouest de la Turquie. Cette forte structuration géographique correspond à la première catégorie phylogéographique décrite par AVISE (2000). Comme déjà proposé pour quelques autres espèces européennes (TABERLET *et al.*, 1998 ; HEWITT *et al.*, 2001 ; SEDDON *et al.*, 2001), cette structuration peut s'expliquer par un isolement de deux groupes de mulots au sein de deux refuges méditerranéens (péninsule ibérique et Italie-Balkans) durant un des pics glaciaires du Pléistocène. Cet isolement a probablement été favorisé par la présence des Alpes qui jouèrent et jouent probablement encore le rôle de barrière biogéographique pour cette espèce (MICHAUX *et al.*, 1996b). Ces deux facteurs empêchèrent les échanges génétiques entre les deux groupes de mulots pendant de longues périodes, provoquant l'apparition de fortes différences génétiques entre eux-ci. Au contraire, les baisses fréquentes du niveau de la mer Adriatique durant les pléniglaciaires du Pléistocène (STRAHLER & STRAHLER, 1989) favorisèrent des contacts entre les populations italiennes et balkaniques, ce qui empê-

cha leur isolement génétique. De manière similaire, la population de mulot sylvestre de l'Ouest de la Turquie est très proche génétiquement du groupe italo-balkanique, suggérant des contacts récents entre eux. Ceux-ci ont pu avoir lieu durant un des derniers âges glaciaires quand la mer de Marmara fût remplacée par des terres émergées.

L'époque de séparation entre les haplotypes ancestraux à la base des deux lignées génétiques européennes est estimée à 1,5/1,6 Ma. Il apparaît ainsi que la structuration génétique intraspécifique du mulot sylvestre est le résultat des fluctuations climatiques du quaternaire. Ce résultat est en accord avec les hypothèses proposées par AVISE (2000), SEDDON *et al.* (2001) et HEWITT (2001).

Régions refuges et recolonisations postglaciaires

Comme prédit par le modèle d'expansion/contraction (NICHOLS & HEWITT, 1994; IBRAHIM *et al.*, 1996; SANTUCCI *et al.*, 1998), l'analyse de la diversité nucléotidique (tableau 2) confirme que le Sud-Ouest de l'Europe (péninsule ibérique et Sud de la France) a représenté une région refuge pour *A. sylvaticus*. En effet, ces populations se caractérisent par un degré de diversité génétique significativement plus important ($p < 0.05$) que celui observé en Europe du Nord. Ainsi, il est très probable que le mulot sylvestre a recolonisé et s'est répandu dans la plupart des régions du Nord et du centre de l'Europe à partir de la péninsule ibérique et du Sud de la France au terme de la dernière glaciation. Ce scénario d'expansion est corroboré par la distribution « en cloche » du groupe ouest-européen lors de l'analyse de « mismatch distribution » (LUIKART *et al.*, 2001). Ainsi, les Pyrénées semblent ne pas avoir représenté un obstacle pour la recolonisation postglaciaire du mulot sylvestre (MICHAUX *et al.*, 1998). Ce résultat va à l'encontre de l'hypothèse émise par BILTON *et al.* (1998) proposant que la majorité des micro-mammifères n'ont pas recolonisé le Nord de l'Europe à partir des péninsules méditerranéennes. Cependant, cette dernière étude ayant été basée sur un échantillonnage très limité ($n = 1$ pour chaque péninsule), elle doit être interprétée avec beaucoup de prudence.

Au contraire des populations du Sud-Ouest de l'Europe, le groupe italo-balkanique est caractérisé par un faible niveau de diversité nucléotidique. Ce résultat est surprenant si l'on sait que les données paléontologiques (AGUILAR & MICHAUX, comm. pers.) et paléoclimatologiques (REILLE & DE BEAULIEU, 1995; TZEDAKIS *et al.*, 1997) attestent du rôle de l'Italie et des Balkans en tant que refuges pour *A. sylvaticus* durant les glaciations du quaternaire. Ce faible niveau de variabilité génétique pourrait s'expliquer par un étranglement génétique important ayant touché ce groupe de mulot lors d'un des derniers pics glaciaires. Cette hypothèse est corroborée par : 1) les longueurs de branches très petites observées chez cette lignée sur l'arbre phylogénétique obtenus lors de l'analyse de distance; 2) la topologie « en étoile » obtenue lors de l'analyse en réseau et caractéristique d'une expansion rapide à partir d'un petit nombre d'animaux fondateurs; 3) une faible valeur de la diversité haplotypique (h) et nucléotidique (Pi) (tableau 2) comme suggéré par AVISE (2000). Cet étranglement génétique pourrait être le résultat de plusieurs facteurs environnementaux :

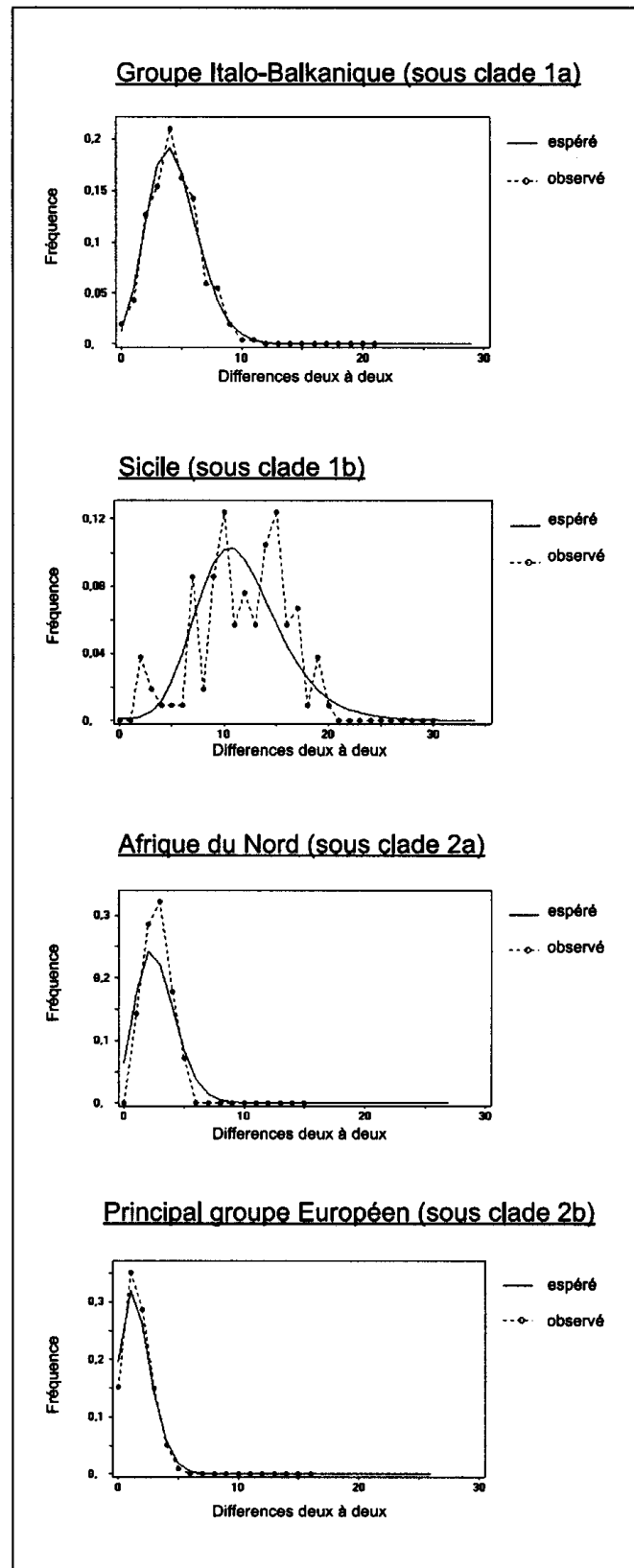
- les données paléoclimatologiques (TZEDAKIS, 1994) ont montré qu'une grande partie des Balkans était plus aride que les autres régions européennes lors des pics glaciaires du Pléistocène. Ce climat a probablement influencé la distribution des habitats du mulot (forêts), ce qui a pu conduire à une fragmentation de ses populations ;
- le nombre d'espèces d'*Apodemus* (*A. flavicollis*, *A. uralensis*, *A. agrarius*, *A. mystacinus*) est nettement plus important en Europe centrale et dans les Balkans qu'en Europe de l'Ouest (*A. flavicollis* et *A. alpicola* uniquement dans les Alpes) (SCHILLING *et al.*, 1986; WILSON & REEDER, 1993). Ainsi, étant donné que ces espèces vivent souvent dans le même habitat, une compétition interspécifique a pu aussi jouer un rôle dans la diminution de variabilité génétique du groupe italo-balkanique, particulièrement lors des derniers pics glaciaires où les ressources alimentaires et les niches écologiques pour ce groupe d'animaux étaient probablement plus limitées.

Cet étranglement génétique pourrait aussi expliquer pourquoi les populations du groupe italo-balkanique n'ont pas contribué aux recolonisations postglaciaires du Nord de l'Europe. Avant de recoloniser cette région, elles ont probablement dû reconstituer leurs effectifs. Durant ce temps, le groupe ouest-européen a pu se répandre très rapidement à travers l'ensemble de la région Paléarctique occidentale empêchant par là une colonisation plus tardive des animaux italo-balkaniques. En effet, une fois établis, les rongeurs peuvent présenter un comportement de rejet et d'agressivité important envers tout nouvel envahisseur (GRANJON & CHEYLAN, 1989). Par ailleurs, la présence d'obstacles topographiques importants comme les Alpes ou les Carpates ont pu aussi empêcher une recolonisation rapide du groupe italo-balkanique. Ce schéma de recolonisation postglaciaire n'avait jusqu'à présent pas encore été mis évidence (TABERLET *et al.*, 1998, HEWITT, 1999, 2001).

Colonisation de l'Afrique du Nord

Comme déjà proposé par LIBOIS *et al.* (2001) sur base de méthodes de RFLP, les analyses phylogénétiques montrent clairement que les mulots nord africains sont regroupés dans un sous clade bien spécifique (100 % BP), lui-même niché au sein du principal groupe européen (clade 2). Cette observation suggère fortement que les animaux nord africains ont une origine ouest-européenne plutôt qu'italienne, sicilienne ou balkanique. L'haplotype le plus proche (45) correspond à un animal portugais. Ceci tend à montrer que leur introduction s'est effectuée via

Figure 4. Analyse de « mismatch distribution » effectuée chez les quatre grandes lignées mitochondriales d'*Apodemus sylvaticus* obtenues. La fréquence espérées est basée sur un modèle de « croissance-déclin » (theta initiales = 0, 2,4, 0 et 0, theta finales = 1000, tau = 4,4, 9,4, 2,7 and 1,6 pour les groupes italo-balkaniques, siciliens, nord-fricains et ouest européens, respectivement), déterminée par le programme DNASP v 3.5 (Rozas & Rozas, 1997).



le détroit de Gibraltar. La grande valeur de h et la faible valeur de Pi (tableau 2), la courbe « en cloche » obtenue lors de l'analyse de « mismatch distribution » (fig. 4) et la topologie en étoile observée dans l'analyse en réseau (fig. 3) suggèrent que cette introduction s'est effectuée très récemment à partir d'un petit nombre d'individus et que celle-ci a été suivie d'une expansion rapide (AVISE, 2000; LUIKART *et al.*, 2001). L'analyse de datation suggère une séparation entre les populations nord africaines et ouest européennes il y a environ 0,4 Ma (Pleistocène Moyen). Cette estimation rejoint les résultats obtenus par LIBOIS *et al.* (2001) sur base de méthodes de RFLP mais ne correspond pas du tout aux données paléontologiques. Celles-ci suggèrent en effet une colonisation récente (Holocène) du mulot en Afrique du Nord (JAEGER, 1975; BURGIO, 1998). Cette différence peut être expliquée selon deux hypothèses :

- Une colonisation récente a pu s'effectuer à partir d'un petit nombre d'individus lors d'une introduction anthropogénique (MICHAUX *et al.*, 1996b, 1998; DOBSON & WRIGHT, 2000). Dans ce cas, le grand degré de divergence génétique observé entre les animaux européens et nord africains pourrait s'expliquer par le fait que les quelques mulots colonisateurs présentaient déjà une différence génétique par rapport aux autres animaux européens étudiés. En effet, comme observé dans ce travail (tableau 2), le refuge ibérique est caractérisé par une grande diversité de types mitochondriaux qui ont pu évoluer séparément quelquefois depuis de longues périodes.
- Une expansion s'est effectuée récemment à partir d'une petite population « d'inoculation » qui était présente en Afrique du Nord depuis le Pléistocène Moyen. Néanmoins, il est difficile d'expliquer pourquoi cette population fondatrice n'aurait pas pu envahir l'ensemble de l'Afrique du Nord tout au long des derniers 400 000 ans, surtout si l'on sait que durant cette période, les conditions éco-climatiques de cette région ont été favorables pour le mulot (JAEGER, 1975; BLONDEL, 1995). Par ailleurs, cette hypothèse ne rejoint pas du tout les données paléontologiques (JAEGER, 1975).

En conclusion, le mulot sylvestre d'Afrique du Nord est originaire d'Europe de l'Ouest et sa colonisation est probablement le résultat d'introductions anthropogéniques récentes comme suggéré par DOBSON (1998) et DOBSON & WRIGHT (2000).

« L'énigme sicilienne »

Jusqu'à cette étude, l'origine des mulots de Sicile était encore inconnue (MICHAUX *et al.*, 1998). Nos données phylogénétiques indiquent maintenant clairement qu'ils sont reliés à la lignée italo-balkanique. Cependant, au contraire des populations des autres îles méditerranéennes où le mulot a été introduit récemment et est génétiquement similaire aux populations continentales (MICHAUX *et al.*, 1996a & b, 1998), la population sicilienne apparaît très différenciée (distance K2P 3,2 %) et séparée des animaux italiens depuis 0,8/0,9 Ma. Le grand taux de variabilité génétique (fig. 3 et tableau 2) observé au sein de cette population et les résultats obtenus par la méthode de RFLP (MICHAUX *et al.*, 1998) confirment cette observation.

Par ailleurs, l'analyse de « mismatch distribution » semble montrer que cette population n'a pas subi une expansion récente mais apparaît plutôt comme relativement stable, et une forte valeur de h et de Pi corrobore cette observation (AVISE, 2000). Deux hypothèses peuvent expliquer cela :

- La population sicilienne a été isolée du continent depuis au moins 0,8 Ma permettant à des haplotypes ancestraux de survivre et de diverger alors que ceux-ci disparaissent dans les régions continentales pour une série de raisons (par ex. étranglements génétiques associés aux âges glaciaires, compétition interspécifique...). Cependant, cette hypothèse ne correspond pas aux données paléontologiques qui attestent d'une part, de la présence du mulot sylvestre en Sicile depuis seulement 70 000-50 000 ans (SARA, comm. pers.), et d'autre part, de l'existence de plusieurs connections entre la Sicile et l'Italie tout au long du dernier million d'années (THALER, 1973; JAEGER, comm. pers.).
- Une lignée génétique ancienne aurait pu survivre quelque part dans le Sud de l'Italie et entrer en Sicile

durant la dernière glaciation, il y a 70 000 ans. Cet ancien stock aurait pu rester isolé sur l'île jusqu'à l'époque actuelle et être protégé des dernières fluctuations climatiques du Pléistocène. Au contraire, les populations continentales ont pu être remplacées par un « stock moderne » s'étant dispersé à partir du refuge italo-balkanique au terme de la dernière glaciation.

Quelle que soit l'hypothèse expliquant la différenciation génétique de la population sicilienne, cette île apparaît comme un véritable « point chaud » de diversité génétique pour le mulot sylvestre. Ce phénomène a déjà été observé chez la perdrix *Alectoris graeca* (LUCCHINI & RANDI, 1998).

Remerciements. — Nous remercions François Catzeffis pour avoir mis à notre disposition les échantillons d'*Apodemus* disponibles dans la collection de tissus en éthanol conservée à l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier. Nous remercions également toutes les autres personnes ayant gentiment accepté de nous envoyer une série d'échantillons de diverses régions européennes : E. Bellinvia, J. Cassaing, S. Escutenaire, M-G. Filippucci, R. Fons, D. Frynta, P. Lymberakis, M. Macholan, S. Morand, D. Murariu, M.G. Ramalhinho, M. Sara., D. Sirugue, H. Tegelström, P. Trontelj, V. Vohralik et R. Wolf

Ce travail a été réalisé grâce au support financier du Fonds national belge de la Recherche scientifique octroyé à J.R. Michaux (mandat « Chargé de recherches », crédits aux chercheurs, crédits pour brefs séjours à l'étranger).

RÉFÉRENCES

- AGUILAR J.-P. & MICHAUX J., 1996. The beginning of the age of Murinae (Mammalia : Rodentia) in southern France. *Acta zool. Cracoviensa*, 3 : 35-45.
- ALEXANDRINO J., FROUFE E., ARNTZEN J.W. & FERRAND N., 2000. Genetic subdivision glacial refugia and postglacial recolonisation in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia ; Urodela). *Molecular Ecology*, 9 : 771-781.
- AVISE J.C., 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- BILTON D.T., MIROL P.M., MASCHERETTI S., FREDGA K., ZIMA J. & SEARLE J.B., 1998. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards post-glacial colonization. *Proceedings Royal Society London Biological Sciences*, 265 : 1219-1226.
- BLONDEL J., 1995. *Biogéographie : approche écologique et évolutive*. Masson eds, Paris.
- BURGIO E., 1998. Le attuali conoscenze sui mammiferi terrestri quaternari della Sicilia. In : *Prima Sicilia. Alle origini della società siciliana*. (ed. Tusa. S), pp. 54-74. Palermo (Sicily).
- CATZEFLIS F., 1991. Animal tissue collections for molecular genetics and Systematics. *Trends in Ecology and Evolution (TREE)*, 6 : 168.
- DOBSON M., 1998. Mammal distributions in the western Mediterranean : the role of human intervention. *Mammal Review*, 28 : 77-88.
- DOBSON M. & WRIGHT A., 2000. Faunal relationships and zoogeographical affinities of mammals in north-west Africa. *Journal of Biogeography*, 27 : 417-424.
- ENGELBRECHT C.C., FREYHOF J., NOLTE A., RASSMANN K., SCHLIEWEN U. & TAUTZ D., 2000. Phylogeography of the Bullhead *Cottus gobio* (Pisces : Teleostei : Cottidae) suggest a pre-Pleistocene origin of the major central European populations *Molecular Ecology*, 9 : 709-722.
- FELSENSTEIN J., 1985. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Zoology*, 34 : 152-161.
- FITCH W.M., 1971. Towards defining the course of evolution : Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20 : 406-416.
- GRANJON L. & CHEYLAN G., 1989. Le sort de rats noirs (*Rattus rattus*) introduits sur une île, révélé par radio-tracking. *Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris*, 309 : 571-575.
- HASSANIN A., LECOINTRE G. & TILLIER S., 1998. The "evolutionary signal" of homoplasy in protein-

- coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny. *Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris, Sciences Vie*, 321 : 611-620.
- HEWITT G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58 : 247-276.
- HEWITT G.M., 1999. Post-glacial recolonisation of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58 : 87-112.
- HEWITT G.M., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10 (3) : 537-549.
- IBRAHIM K.M., NICHOLS R.A. & HEWITT G., 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion *Heredity*, 77 : 282-291.
- JAEGER J.J., 1975. *Les Rongeurs, du Miocène à l'actuel, en Afrique nord-occidentale*. PhD thesis, université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier.
- LIBOIS R.M., MICHAUX J.R., RAMALHINHO M.G., MAUROIS C. & SARA M., 2001. On the origin and systematics of the northern African wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations : a comparative study of mtDNA restriction patterns. *Canadian Journal of Zoology*, 79 : 1-9.
- LUCCHINI V. & RANDI E., 1998. Mitochondrial sequence variation and phylogeographical structure of rock partridge (*Alectoris graeca*) populations. *Heredity*, 81 (5) : 528-536.
- LUIKART G., GIELLY L., EXCOFFIER L., VIGNE J.-D., BOUVET J. & TABERLET P., 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98 : 5927-5932.
- LUNT D.H., IBRAHIM K.M. & HEWITT G.M., 1998. MtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity*, 80 : 633-641.
- MACHORDOM A., SUAREZ J., ALMODOVAR A. & BAUTISTA J.M., 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Molecular Ecology*, 9 (9) : 1324-1338.
- MANTEL N., 1967. The detection of diseases clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27 : 209-220.
- MARDULYN P., 2001. Phylogeography of the Vosges mountains populations of *Gonioctena pallida* (Coleoptera : Chrysomelidae) : a nested clade analysis of mitochondrial DNA haplotypes *Molecular Ecology*, 10 (7) : 1751-1763.
- MICHAUX J. & PASQUIER L., 1974. Dynamique des populations de mulots (Rodentia, *Apodemus*) en Europe durant le Quaternaire. Premières données. *Bulletins Société Géologique France*, 7 (XVI) : 431-439.
- MICHAUX J., AGUILAR J.-P., MONTUIRE S., WOLFF A. & LEGENDRE S., 1997. Les Murinae (Rodentia, Mammalia) néogènes du Sud de la France : évolution et paléoenvironnements. *Geobios*, 20 : 379-385.
- MICHAUX J.R., LIBOIS R. & FONS R., 1996a. Différenciation génétique et morphologique du mulot, *Apodemus sylvaticus*, dans le bassin méditerranéen occidental. *Vie Milieu*, 46 : 193-203.
- MICHAUX J.R., FILIPPUCCI M.G., LIBOIS R.M., FONS R. & MATAGNE R.F., 1996b. Biogeography and taxonomy of *Apodemus sylvaticus* (the woodmouse) in the tyrrhenian region : enzymatic variations and mitochondrial dna restriction pattern analysis. *Heredity*, 76 : 267-277.
- MICHAUX J.R., SARA M., LIBOIS R.M. & MATAGNE R., 1998. Is the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) of Sicily really a « separate » species ? *Belgian Journal of Zoology*, 128 (2) : 211-214.
- MICHAUX J.R., LIBOIS R., RAMALHINHO M.G. & MAUROIS C., 1998. On the mtDNA restriction patterns variation of the iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). Comparison with other west mediterranean populations. *Hereditas*, 129 : 187-194.
- MICHAUX J.R., CHEVRET P., FILIPPUCCI M.-G. & MACHOLAN M., 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis to the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two

- mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12s rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23 : 123-136.
- MICROSOFT OFFICE (1993-1996) CD-Rom *Atlas Mondial Encarta*. Version Windows 95.
- NICHOLS R.A. & HEWITT G.M., 1994. The genetic consequences of long distance dispersal during colonisation. *Heredity*, 72 : 312-317.
- PHILIPPE H., 1993. MUST, a computer package for Management Utilities for Sequences and Trees. *Nucleic Acids Research*, 21 : 5264-5272.
- PHILIPPE H. & DOUZERY E., 1994. The pitfalls of molecular phylogeny based on four species as illustrated by the Cetacea/Artiodactyla relationships. *Journal of Mammalian Evolution*, 2 : 133-152.
- PITRA C., LIECKFELDT D. & ALONSO J.C., 2000. Population subdivision in Europe's great bustard inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence variation. *Molecular Ecology*, 9 : 1165-1170.
- REILLE M. & DE BEAULIEU J., 1995. Long pleistocene pollen records from the Praclaux Crater, South Central France. *Quaternary research*, 44 : 205-215.
- ROBINSON M., GOUY M., GAUTIER C. & MOUCHIROUD D., 1998. Sensitivity of the Relative-Rate Test to Taxonomic Sampling. *Molecular Biology Evolution*, 15 (9) : 1091-1098.
- ROZAS J. & ROZAS R., 1997. DNASP, version 2.0 : a novel software package for extensive molecular population genetic analysis. *Computer Application in the Biosciences*, 13 : 307-311.
- SAITOU N. & NEI M., 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 : 406-425.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T., 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SANTUCCI F., EMERSON B.C. & HEWITT G.M., 1998. Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular Ecology*, 7 (9) : 1163-1172.
- SCHILLING D., SINGER D. & DILLER H., 1986. *Guide des Mammifères d'Europe*. Delachaux and Niestlé, Paris.
- SCHNEIDER S., ROESSLI D. & EXCOFFIER L., 2000. Arlequin, Version 2.0 : a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- SEDDON J.M., SANTUCCI F., REEVE N.J. & HEWITT G.M., 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor* : Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology*, 10 (9) : 2187-2198.
- SERIZAWA K., SUZUKI H. & TSUCHIYA K., 2000. A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochemical genetics*, 38 : 27-41.
- SHARBEL T., HAUBOLD B. & MITCHELL-OLDS T., 2000. Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana* : biogeographie and postglacial colonisation routes of Europe. *Molecular Ecology*, 9 : 2109-2118.
- STRAHLER A.H. & STRAHLER A.N., 1989. *Elements of physical geography*, third edn. John Wiley and Sons, New York.
- SUZUKI H., TSUCHIYA K. & TAKEZAKI N., 2000. A molecular phylogenetic framework for the Ryuku endemic rodents *Tokudaia osimensis* and *Diplothrix legata*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15 : 15-24.
- SWOFFORD D.L., 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SZYMURA J.M., UZELL T. & SPOLSKY C., 2000. Mitochondrial DNA variation in the hybridizing firebellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Molecular Ecology*, 9 : 891-899.
- TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A.G. & COSSON J.F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7 (4) : 453-464.
- THALER L., 1973. Nanisme et gigantisme insulaire. *La Recherche*, 37 : 45-48.

- TZEDAKIS P.C., 1994. Vegetation change through glacial – interglacial cycles : a long pollen sequence perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 345 : 403-432.
- TZEDAKIS P.C., ANDRIEU V., DE BEAULIEU J.L., CRWHURST S., FOLLIERI M. & HOOGHIEMSTR H., 1997. Comparaison of terrestrial and marine records of changing climate of the last 500 000 years. *Earth and Planetary Sciences Letters*, 150 : 171-176.
- WIDMER A. & LEXER C., 2001. Glacial refugia : sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (6) : 269-271.
- WILSON D.E. & REEDER D.M., 1993. *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- WU C.-I. & LI W.H., 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitutions in rodents than in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82 : 1741-1745.
- YANG Z., 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends Ecol. Evol.*, 11 : 367-372.