

Identification moléculaire et histoire phylogéographique et démographique des musaraignes du Maroc septentrional

Molecular identification, phylogeographic and demographic history of shrews from northern Morocco

Violaine NICOLAS^{1*}, François JACQUET¹, Emmanuelle STOETZEL¹, Aude LALIS¹, Arnaud DELAPRE¹,
Hicham EL BRINI², Abderahmane MATAAME², Abdeslam RIHANE³, Sohaib LIEFRIED⁴, Ali
OUAROUR⁴ & Christiane DENYS¹

1. Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR ISyEB MNHN CNRS EPHE Paris VI, 45 rue Cuvier, 75000 Paris, France
(vnicolas@mnhn.fr), (jacquet@gmail.com), (stoetzel@mnhn.fr), (lalis@mnhn.fr), (delapre@mnhn.fr), (denys@mnhn.fr)

2. Université Mohammed V de Rabat, Institut Scientifique, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Maroc

3. Département des Sciences de la Vie et de la Terre, Centre Régional des Métiers de l'Éducation et la Formation (CRMEF), Casablanca, Maroc

4. Laboratoire de Biologie et Santé, Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences, BP 2121, Tétouan, Maroc

Résumé : La distribution géographique et l'écologie des musaraignes du Maroc restent encore mal connues d'autant qu'il est souvent difficile d'identifier les espèces sur le terrain. Lors de deux années (2010 et 2011) nous avons capturé 62 musaraignes dans 10 localités, depuis la péninsule tingitane jusqu'au plateau des Ganntours. Grâce à une approche de type Barcoding (séquençage du gène Cytb), nous avons pu identifier tous ces spécimens comme appartenant à l'espèce *Crocidura russula*. Ces données nous ont permis de mieux étudier l'histoire phylogéographique et démographique de cette espèce à partir de l'ensemble des données actuellement disponibles (101 séquences de 904 pb du gène Cytb). Nos résultats confirment la colonisation récente de l'Europe par cette espèce, via le détroit de Gibraltar, probablement grâce à l'homme. Malgré l'absence de signal phylogéographique fort, nos analyses montrent une absence de panmixie à l'échelle marocaine et un phénomène d'expansion démographique récente. Ceci pourrait indiquer une histoire biogéographique complexe qui mériterait d'être analysée plus finement avec d'autres marqueurs moléculaires et un plus grand nombre de populations.

Mots-clés : Maghreb ; *Crocidura russula*; Barcoding; Génétique; Haplotypes mitochondriaux ; Cytochrome *b*

Abstract : The geographical distribution and ecological preferences of Moroccan shrews are still largely poorly known. Moreover, it is often difficult to identify shrews in the field. We conducted field work on Morocco and captured 62 shrews in 10 localities, from the Tingitane peninsula to Middle Atlas and the region of Ben Guerir (Central Morocco). We identified all these shrews, through a Barcoding approach based on the Cytb gene, as belonging to the species *Crocidura russula*. This allowed us to give additional data on the ecological preferences of this species. We studied the demographic and phylogeographic history of this species based on all available Cytb sequences (101 specimens). Our results confirm the recent colonisation of Europe from Africa, through the Gibraltar Strait and human activities. A demographic expansion was recovered in this species. No clear phylogeographic structure was observed within this species, however Moroccan populations are not panmictic. Additional markers and specimens are needed to fully understand the biogeographic history of this species.

Key words: Maghreb, *Crocidura russula*; Barcoding; Genetics; Mitochondrial haplotypes; Cytochrome *b*.

Abridged English version

Five shrew species are known from Morocco: *Crocidura lusitania*, *C. russula*, *C. tarfayensis*, *C. viaria* and *C. whitakeri* (Aulagnier & Thevenot 1986; Hutterer 1986; Aulagnier *et al.* 2008). *Crocidura lusitania*, *C. viaria* and *C. tarfayensis* are known from Atlantic regions South of the Doukkala and High Atlas (Aulagnier & Thevenot 1986). *Crocidura whitakeri* (endemic from the Maghreb) would occur in Morocco North of the Anti-Atlas, except in the High-Plateaux of Eastern Morocco and in the Tingitane Peninsula (Aulagnier 1987). *Crocidura russula* occurs in south-west Europe and Morocco, from the Tingitane Peninsula to the High Atlas. It seems to be absent from High-Plateaux of Eastern Morocco and from the pre-Saharan regions south of the High Atlas.

In 2010 and 2011, we conducted field work in Northern Morocco (see Denys *et al.* this volume) to precise the

geographical distribution and ecological preferences of Moroccan shrews. Shrews were captured with Pitfall and Sherman traps. This allowed us to capture 62 shrews in 10 localities, from the Tingitane peninsula to Middle Atlas and the region of Ben Guerir (Central Morocco) (Fig. 1). Because shrew species are difficult to identify in the field, we identified our 62 shrews through a Barcoding approach (Nucleotide Blast in Genbank) based on the Cytb gene. DNA barcoding is a process that uses a short DNA sequence from a standard locus, as a species identification tool (Hebert *et al.* 2003). The Cytb gene was previously recognised as one of the most effective gene for molecular shrew species identification (Jacquet *et al.* 2012). Moreover, references sequences were available in the Genbank database for four of the five Moroccan species and for others North African *Crocidura* species (Vogel *et al.* 2003; Lo Brutto *et al.* 2004; Brändli *et al.* 2005; Cosson *et al.* 2005;

Dubey *et al.* 2007; Dubey *et al.* 2008; Nicolas *et al.* 2014a). Our results unambiguously show that the 62 shrews captured during our field work belong to the species *C. russula* (99% nucleotide identity with this species). This allowed us to show the wide ecological preferences of this species: it can be captured in crops, old fields, cork oak forests, zen oak forests, rush beds and gardens (Tab. 1). It is widely distributed from the Tingitane peninsula (Rif) to the High Atlas, and can be found both in humid and sub-humid bioclimatic zones as well as in semi-arid and arid plains of Atlantic Morocco.

We studied the demographic and phylogeographic history of this species based on all available Cytb sequences (101 specimens from Morocco, Netherlands, Germany, France, Switzerland, Spain and Portugal). Our results confirm the recent colonisation of Europe from Africa, through the Gibraltar Strait and human activities (Catzefflis

1984; Vogel *et al.* 2003; Lo Brutto *et al.* 2004; Brändli *et al.* 2005; Cosson *et al.* 2005; Handley & Perrin 2006). At the Moroccan scale, we observed a low nucleotide diversity and no clear phylogeographic structure within this species (Fig. 2). This means that this species has either high dispersal abilities and/or wide ecological preferences allowing gene flow between populations, even during the less favourable periods of the Pleistocene. The neutrality tests indicate a phenomenon of demographic expansion. Moreover, the high haplotype diversity and low nucleotide diversity suggest a population expansion from a low-size ancestral population. Even if no strong phylogeographic pattern was recovered in Morocco our SASHa analyses show that Moroccan populations are not panmictic. Additional markers and specimens are needed to fully understand the biogeographic history of this species.

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies le développement des techniques moléculaires a complètement révolutionné les études sur la biodiversité. Il a, ainsi, été possible de mettre en évidence une biodiversité insoupçonnée (nombreuses espèces cryptiques, c'est-à-dire morphologiquement très similaires mais génétiquement distinctes), mais aussi de mieux appréhender les facteurs à l'origine de cette biodiversité. En raison des progrès considérables des techniques d'extraction, d'amplification et de séquençage ADN ces 20 dernières années, et de la diminution importante de leur coût, les méthodes moléculaires d'identification spécifique sont actuellement en plein essor. C'est dans ce cadre que Hebert et son équipe ont proposé, depuis le début des années 2000, une méthode d'identification appelée «Barcoding». Ils définissent un code-barre ADN comme une courte séquence d'ADN permettant de déterminer l'appartenance d'un individu à une espèce donnée (Hebert et al. 2003; Hebert et al. 2004). En effet, cette séquence d'ADN est censée être quasiment identique chez tous les individus appartenant à une même espèce et différente entre espèces. Le Barcoding repose, donc, sur un principe simple: la variabilité intraspécifique est plus faible que la variabilité interspécifique. Les deux principaux objectifs du Barcoding sont l'identification spécifique des spécimens à partir de leurs séquences ADN et l'accélération de la découverte des nouvelles espèces. Si l'idée d'utiliser des séquences d'ADN pour identifier les espèces n'est pas nouvelle, ce qui est nouveau dans le Barcoding, c'est l'idée qu'une courte séquence d'ADN serait suffisante et que le même gène pourrait être utilisé pour tous les taxons. Le fragment d'ADN qui a été proposé comme code-barre par Hebert et al. est un gène mitochondrial codant pour la première sous-unité de la cytochrome *c* oxydase (CO1), protéine qui a une fonction dans la chaîne respiratoire. Le gène CO1 s'est déjà avéré être un bon marqueur pour le Barcoding chez de nombreux groupes animaux. Ainsi, certaines études ont montré qu'il permet de discriminer plus de 95% des espèces d'oiseaux (Kerr et al. 2007), de poissons (Ward *et al.* 2005), de gastéropodes (Remigio & Hebert 2003), ou encore de lépidoptères (Hajibabaei *et al.* 2006). En revanche, l'étude de Vences et al. (2005) sur les amphibiens a montré que le

gène 16S pouvait se révéler plus efficace que le CO1 comme code-barre. En ce qui concerne les plantes, il apparaît très difficile d'identifier les espèces avec le gène CO1, et plus largement avec le génome mitochondrial (Fazekas et al. 2009). Traditionnellement, le gène Cytochrome *b* (Cytb) a beaucoup été utilisé pour les études de phylogénie et phylogéographie sur les mammifères. Chez les musaraignes, Jacquet et al. (2012), par exemple, ont montré que les gènes Cytb et CO1 sont tous les deux très efficaces pour identifier ces espèces.

Cinq espèces de crocidures sont actuellement connues au Maroc : *Crocidura lusitania*, *C. russula*, *C. tarfayensis*, *C. viaria* et *C. whitakeri* (Aulagnier & Thevenot 1986; Hutterer 1986; Aulagnier *et al.* 2008). *Crocidura lusitania*, *C. viaria* et *C. tarfayensis* sont des espèces des régions atlantiques au sud des Doukkala ou du Haut Atlas (Aulagnier & Thevenot 1986). *Crocidura whitakeri* (endémique du Maghreb) serait présente au Maroc dans toutes les régions situées au nord de l'Anti-Atlas, à l'exception des Hauts Plateaux de l'Oriental et de la péninsule tingitane (Aulagnier 1987). *Crocidura russula* est présente dans le sud-ouest de l'Europe et dans l'extrême nord-ouest de l'Afrique. Au Maroc, elle est abondante depuis la péninsule tingitane jusqu'au Haut Atlas occidental. Comme les autres crocidures, elle semble absente des Hauts Plateaux de l'Oriental et des régions présahariennes au sud du Haut Atlas.

Dans le cadre du projet ANR PEX04-MOHMIE, nous avons réalisé des piégeages de musaraignes dans le Maroc septentrional (Denys et al. Ce volume) afin de préciser les aires de distribution, les préférences écologiques et l'histoire phylogéographique et démographique des espèces de musaraignes marocaines. Pour identifier les espèces, nous avons utilisé une approche de type barcoding basée sur le séquençage du gène du Cytb pour lequel des séquences de référence étaient disponibles pour quatre des cinq espèces (*C. lusitania*, *C. russula*, *C. viaria* et *C. tarfayensis*). En effet, plusieurs études basées sur ce gène ont été publiées ses dernières années sur les musaraignes nord-africaines (Vogel *et al.* 2003; Lo Brutto *et al.* 2004; Brändli *et al.* 2005; Cosson *et al.* 2005; Dubey *et al.* 2007; Dubey *et al.* 2008; Nicolas *et al.* 2014a).

MATERIEL ET METHODES

Piégeages

Des piégeages ont été réalisés dans le nord du Maroc en 2010 et 2011, de la péninsule tingitane jusqu'au plateau des Gantours à l'aide de pièges Sherman et de pitfalls. Différents habitats ont été inventoriés : champs cultivés, jachères, forêts de chêne liège, de chêne zène, de conifères, pâtures. Soixante-deux spécimens ont été capturés dans 10 localités (Fig. 1, Tab. 1, Denys et al. Ce volume). Pour tous ces spécimens un petit morceau de muscle ou de foie a été prélevé et conservé dans de l'éthanol 95° pour les analyses moléculaires.

Extraction, amplification et séquençage de l'ADN

L'ADN a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction (NucleoSpin Tissue Core kit, Macherey Nagel). Le gène du *Cytb* a été amplifié et séquençé à l'aide des amorces L14723 et H15915 (Ducroz et al. 2001). Les conditions de PCR utilisées sont les mêmes que celles de Nicolas et al. (2008). Le séquençage a été réalisé par la méthode Sanger au Genoscope (Evry, France).

Identification spécifique moléculaire

Différentes méthodes existent pour assigner une séquence à une espèce. Nous nous sommes basé sur la comparaison de toutes nos séquences prises une à une à celles présentes dans Genbank par une analyse de type « Nucleotide Blast ». Cette analyse a été effectuée en ligne à partir du site web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Analyses phylogéographiques et démographiques

Nous avons ensuite cherché à retracer l'histoire phylogéographique et démographique de l'espèce *C. russula*. Pour cela, nous avons combiné nos données à celles présentes dans les banques de données. L'inclusion de données manquantes dans les analyses peut conduire à des résultats erronés. Il est, donc, important que toutes les séquences utilisées soient de même longueur et sans donnée manquante. Afin de maximiser à la fois le nombre de spécimens disponibles et la longueur des séquences, nous avons opté pour des séquences de 904 pb. Les séquences *Cytb* de 101 spécimens ont ainsi pu être utilisées (Tab. 1).

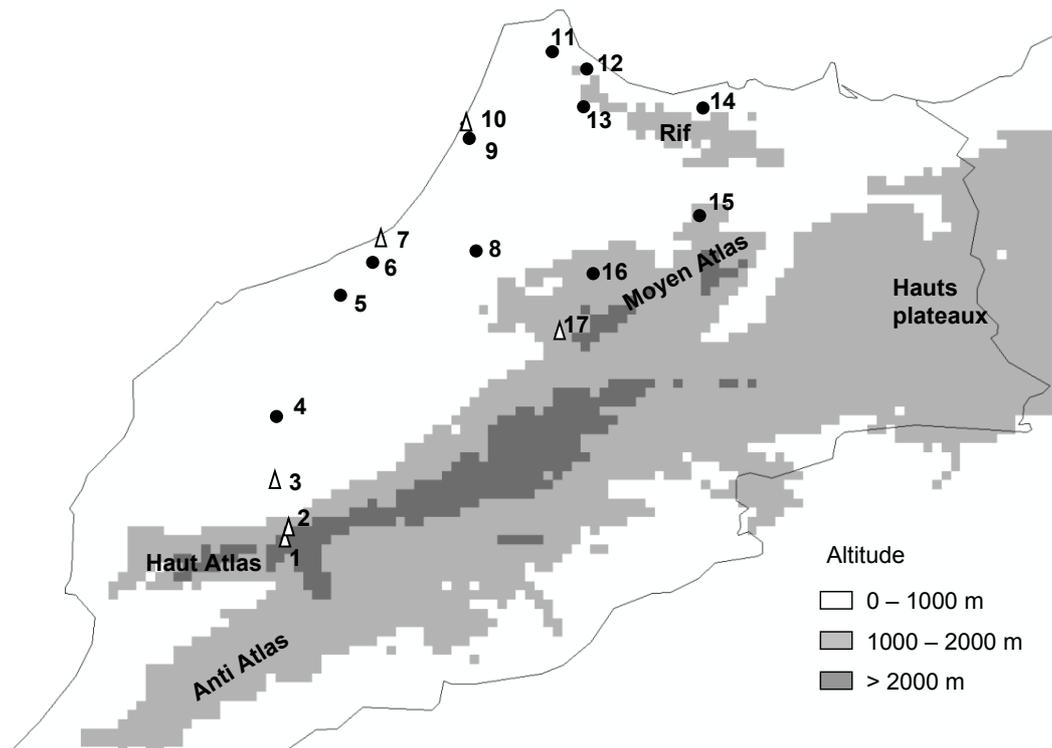


Fig. 1 : Carte du Maroc Nord indiquant les principaux reliefs et les localités de collecte de crocidures séquençées. Cercles noirs : nouvelles localités de capture de crocidures (cette étude), triangles blancs : localités de capture de spécimens de *Crocidura russula* pour lesquels des séquences étaient disponibles dans Genbank. 1 = Imlili, 2 = Oukaimeden, 3 = Marrakech, 4 = Ben Guerir, 5 = Berrechid, 6 = Ben Slimane, 7 = Skhirat, 8 = Dayet Erroumi, 9 = Merja Zerga, 10 = Moulay Bousselham, 11 = Esperada, 12 = Cherouda, 13 = El Khizana, 14 = Beni Hadifa, 15 = Taza, 16 = Ifrane, 17 = Aguelmane.

Fig. 1 : Map of Northern Morocco with the main mountains areas and localities of collect of the sequenced shrews. Black circles : new localities of capture for shrews (this study) ; white triangles : localities of collect of *Crocidura russula* shrews according to Genbank data. 1 = Imlili, 2 = Oukaimeden, 3 = Marrakech, 4 = Ben Guerir, 5 = Berrechid, 6 = Ben Slimane, 7 = Skhirat, 8 = Dayet Erroumi, 9 = Merja Zerga, 10 = Moulay Bousselham, 11 = Esperada, 12 = Cherouda, 13 = El Khizana, 14 = Beni Hadifa, 15 = Taza, 16 = Ifrane, 17 = Aguelmane.

Nous avons construit un réseau d'haplotypes à l'aide du logiciel Network 4.6 (disponible sur www.fluxus-technology.com). Chaque cercle correspond à un haplotype et sa taille est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype dans la population étudiée. La longueur des segments entre chaque haplotype est proportionnelle au nombre de mutations qui les sépare. Le nombre d'haplotypes, la diversité haplotypique (h) et la diversité nucléotidique (p) ont été déterminés grâce au logiciel DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). Un haplotype correspond à une combinaison donnée de nucléotides constituant une séquence pouvant être commune à plusieurs individus. La diversité haplotypique condense les informations sur la fréquence et le nombre d'haplotypes dans une population ; $h = 1 - \sum f_i^2$ (où f_i est la fréquence du i ème haplotype. Plus la diversité haplotypique est élevée au sein de l'échantillonnage, plus il y a de chances d'observer des haplotypes différents lorsque l'on sélectionne deux individus au hasard (Nei 1987). La diversité nucléotidique mesure le nombre moyen de différences entre deux séquences choisies aléatoirement dans l'échantillonnage ; $p = \sum f_i f_j p_{ij}$ (où p_{ij} est la divergence entre les séquences des haplotypes i et j) (Nei & Li 1979). Plus les séquences sont distantes en terme de nombres de sites polymorphes les différenciant, plus la diversité nucléotidique sera élevée.

En testant l'hypothèse de l'équilibre mutation-dérive, les tests de neutralité peuvent détecter un phénomène de sélection ou un écart à l'équilibre démographique de la population comme un goulot d'étranglement ou une expansion de population. Les tests de Tajima (Tajima 1989), de Fu et Li (Fu & Li 1993) et de Fu (Fu 1997) ont été effectués grâce au logiciel DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). La significativité a été testée à l'aide de 10 000 simulations en coalescence sous l'hypothèse nulle d'équilibre.

Nous avons utilisé une analyse SaShA ("Spatial analysis of shared alleles") afin de tester s'il existait une subdivision génétique à l'échelle spatiale. Cette méthode permet de détecter des différences génétiques subtiles même lorsque la diversité génétique est modérée, le flux de gènes est modéré ou élevé, et que l'échantillonnage n'est pas optimal (faible nombre d'individus, échantillons de taille variables entre populations, populations échantillonnées à des échelles spatiales variables) (Kelly et al. 2010). Cette analyse utilise l'information spatiale (distance en km) et allélique (haplotypes) pour détecter des distributions alléliques non uniformes sous un modèle de panmixie. La statistique OM, qui décrit la distance moyenne entre les allèles, est calculée.

RESULTATS

Identification spécifique des spécimens

Pour les 62 individus capturés nous avons obtenu la même réponse avec l'analyse Blast : nos séquences sont identiques à 99% avec les séquences de *C. russula*. Le deuxième pourcentage de similarité le plus élevé (93%) est toujours obtenu avec les séquences de *C. pachyura*, l'espèce sœur de *C. russula* présente en Algérie et en Tunisie. Tous nos spécimens peuvent donc être attribués à l'espèce *C. russula*.

Histoire phylogéographique et démographique de *C. russula*

Sur les 101 séquences de 904 pb, nous avons obtenu 59 haplotypes. Beaucoup ne sont représentés que par un seul individu. De ce fait, la diversité haplotypique est élevée ($h = 0,975 \pm 0,007$). En revanche, le nombre moyen de différences nucléotidiques entre les séquences est faible ($k = 6,929$), ainsi que la diversité nucléotidique ($p = 0,00767 \pm 0,00031$).

La forte diversité haplotypique et la faible diversité nucléotidique sont également visibles sur le réseau d'haplotypes, où de nombreux haplotypes ne diffèrent que par une ou deux substitutions. Le réseau d'haplotypes ne permet pas de mettre clairement en évidence la présence de clades génétiques distincts. Toutefois, quatre haplotypes provenant de la péninsule tingitane (Esperada, Cherouda et El Khizana) semblent former un groupe distinct, qui diffère par au moins sept mutations de tous les autres haplotypes (Fig. 2). Ce groupe rassemble tous les individus d'Esperada (2 individus) et d'El Khizana (1 individu), mais seulement une partie des individus de Cherouda (1 individu sur les 5 séquencés). Les spécimens européens, avec un réseau d'haplotypes en étoile, ne forment pas un clade distinct, et six d'entre eux présentent le même haplotype qu'un spécimen marocain provenant de Cherouda.

L'analyse SaShA des spécimens marocains montre que la distance moyenne observée entre haplotypes partagés est significativement ($P < 0,001$) plus petite (92 km) que la valeur attendue sous un modèle de panmixie (184 km). L'analyse haplotype par haplotype montre que deux des haplotypes les plus communs ont une distribution spatiale restreinte (Ben Slimane, Dayet Erroumi, Ifrane, Merja Zerga pour le premier ; Merja Zerga uniquement pour le deuxième), tandis que le troisième est distribué de façon aléatoire (Fig. 2).

Les tests de neutralité de Fu & Li ($D^* = -3,838$, $F^* = -3,579$), Fu ($F_s = -48,339$) et Tajima ($D = -1,794$) sont tous négatifs et significatifs ($P < 0,05$), ce qui indique un excès de mutations rares dans les populations. Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène d'expansion de population.

DISCUSSION

D'après la littérature, deux espèces de musaraignes sont présentes dans la zone que nous avons échantillonnée : *C. russula* et *C. whitakeri*. A ce jour, *C. whitakeri* reste très mal connue : aucune séquence ADN de référence n'est disponible pour cette espèce, qui a essentiellement été identifiée sur base de critères cranio-dentaires sur des restes osseux issues de pelotes de réjection de rapaces (Aulagnier et al. 1999; Rihane 2004). Malgré un échantillonnage conséquent combinant deux types de pièges et différents habitats (forêts, jachères, champs cultivés, pâtures), nous n'avons pas capturé cette espèce. En effet, nos résultats moléculaires excluent cette possibilité. Sur 5000 petits mammifères capturés par la Smithsonian Institution entre 1969 et 1972, seules quelques *C. whitakeri* ont été identifiées (Vesmanis & Vesmanis 1979; Hutterer 1986). De ce fait, l'écologie de cette espèce reste énigmatique, elle fréquenterait notamment les dunes littorales (Hutterer 1986).

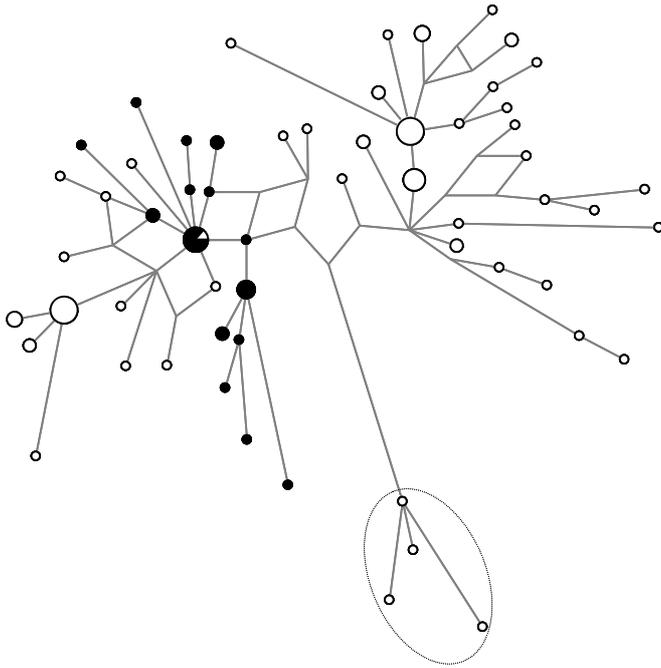


Fig. 2 : Réseau d'haplotypes obtenu pour *Crocidura russula* sur la base de 101 séquences et 904 pb du gène *Cytb*. En noir sont représentés les spécimens européens et en blanc les spécimens marocains. Le cercle en pointillés indique un groupe d'haplotypes provenant de la péninsule tingitane se différenciant des autres par au moins 7 mutations.

Fig. 2 : Haplotype network obtained for *Crocidura russula* based on 101 sequences of 904 bp of the *Cytb* gene. European specimens are in black, and Moroccan specimens are in white. The dotted circle indicates a group of haplotypes coming from the Tingitane peninsula and differing from other haplotypes by at least 7 mutations.

Concernant *C. russula*, nos piégeages indiquent qu'elle peut être trouvée dans un grand nombre d'habitats : champs (blé, tournesol, haricots), jachère, forêts de chêne liège ou de chêne zene, zone ouverte à herbacées, jonchaies, jardin (Tab. 1). Nous confirmons sa large distribution depuis la péninsule tingitane (Rif) jusqu'au Haut Atlas. Elle est présente à la fois dans les étages bioclimatiques humides et sub-humides du Rif, du Moyen Atlas et du Haut Atlas, et dans les étages semi-aride et aride des plaines atlantiques.

Nos résultats confirment ceux de Cosson *et al.* (2005) qui ont montré que la colonisation de l'Europe par *C. russula* est récente et a dû se faire à partir d'un nombre réduit d'individus. L'haplotype le plus fréquent en Europe occupe une position centrale dans le réseau d'haplotypes, et cet haplotype est également présent au Maroc (péninsule Tingitane : localité de Cherouda). Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle cette espèce serait passée d'Afrique du Nord en Europe via le détroit de Gibraltar (Catzeflis 1984; Vogel *et al.* 2003; Lo Brutto *et al.* 2004; Brändli *et al.* 2005; Cosson *et al.* 2005; Handley & Perrin 2006), probablement grâce aux activités humaines et le transfert de denrées alimentaires. Des mouvements humains à travers ce détroit sont attestés depuis l'épipaléolithique et surtout à partir du Néolithique, où les contacts entre les deux rives de la méditerranée sont devenus de plus en plus nombreux du fait

du développement de la navigation (Souville 1998; Mulazzani *et al.* 2010).

Les patrons phylogéographiques à l'échelle du Maroc sont divers : alors que certaines espèces montrent une absence de structure phylogéographique (Batista *et al.* 2006; Harris & Perera 2009; De Pous *et al.* 2013), l'inverse est vrai chez d'autres (Pinho *et al.* 2007; Recuero *et al.* 2007; Stöck *et al.* 2008; Fritz *et al.* 2009; Beukema *et al.* 2010; Nicolas *et al.* 2014b). Cette forte structuration phylogéographique s'explique principalement par les changements climatiques au cours du Plio-Pleistocène qui ont pu conduire à des situations de refuges multiples (Husemann *et al.* 2014). Le Maroc présente, en effet, plusieurs chaînes montagneuses (Rif, Moyen Atlas, Haut Atlas, Anti-Atlas) qui ont probablement favorisé la survie de populations par des mouvements altitudinaux lors des changements climatiques. De plus, par sa position géographique, le Maroc est sous l'influence à la fois de l'Atlantique et de la Méditerranée, ce qui se traduit par la présence d'un grand nombre de climats et de biotopes. A l'échelle marocaine, nous avons trouvé un faible degré de diversité génétique (faible diversité nucléotidique) et une absence de patron phylogéographique clair. Ce résultat suggère, chez cette espèce, soit des capacités de dispersion élevées, soit des préférences écologiques assez larges permettant la connexion entre les populations par des flux de gènes, même pendant les périodes les moins favorables du Pléistocène. La forte diversité haplotypique et la faible diversité nucléotidique observées suggèrent une expansion de population à partir d'une population ancestrale de taille réduite. Le temps depuis cette expansion, a été suffisant pour retrouver un nombre important d'haplotypes par mutation, mais trop court pour accumuler de larges différences entre les séquences en nombre de mutations. Ce phénomène d'expansion de population est également confirmé par les tests de neutralité. Ceci suggère que les événements climatiques passés ont eu un impact sur cette espèce. Malgré l'absence de signal phylogéographique fort, nos analyses SASHA montrent une absence de panmixie à l'échelle marocaine, avec la présence d'haplotypes présentant une distribution spatiale agrégée. Ceci pourrait indiquer une histoire biogéographique complexe qui mériterait d'être analysée plus finement avec d'autres marqueurs moléculaires et un plus grand nombre de populations.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le projet ANR PEX04-MOHMIE. Les analyses moléculaires ont été réalisées grâce au soutien de l'Action Transversale du Muséum « Taxonomie moléculaire, DNA Barcode & Gestion Durable des Collections », le Service de Systématique Moléculaire du Muséum National d'Histoire Naturelle (UMS 2700, Paris, France) et le réseau Bibliothèque du Vivant fondé par le Muséum National d'Histoire Naturelle, l'INRA, et la CEA (Genoscope). L'échantillonnage a été réalisé grâce à l'autorisation du Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification (15 HCEFLCD/DLCDPN/DPRN/CFF), dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut Scientifique de Rabat et le Muséum National d'Histoire Naturelle. Nous remercions les Professeurs M. Fekhaoui et A. Qninba de l'Institut Scientifique (Rabat), T. Benazzou et A. Benhoussa de l'Université Mohammed V de Rabat. Le Professeur A. El Hassani (Directeur de l'Institut Scientifique de Rabat) a mis à notre disposition les stations de

Berrechid et d'Ifrane. Sur le terrain, nous avons bénéficié de l'aide de L. Bourg, L. Tifraouine, M. Sekour, A. Chanine, S. Grosjean, Mr. Hamida et ses fils, A. Chekhaoui, ainsi que des responsables et techniciens des Eaux et forêts : A. Rahmouni (Taza), M. Lakhloufi et S. Dibih (Bab-Boudir, Taza), M. Ouardigh (Merja Zerga). Nous remercions S. Aulagnier pour ses commentaires sur une version antérieure de ce manuscrit.

REFERENCES

- Aulagnier S. 1987. Les Crocidures (Insectivora) du Maroc septentrional : biométrie, systématique. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat*, 11, 193-204.
- Aulagnier S., Haffner P., Mitchell-Jones A.J. et al. 2008. *Guide des mammifères d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient*. Delachaux et Niestlé, Paris, 271 pp.
- Aulagnier S. & Thevenot M. 1986. Catalogue des mammifères sauvages du Maroc. *Travaux de l'Institut scientifique, Série Zoologie*, 41, 1-163.
- Aulagnier S., Thévenot M. & Gourvès J. 1999. Régime alimentaire de la Chouette effraie *Tyto alba* dans les plaines et reliefs du Maroc nord-atlantique. *Alauda*, 67, 323-336.
- Batista V., Carranza S., Carretero M.A. et al. 2006. Genetic variation within *Bufo viridis*: evidence from mitochondrial 12S and 16S rRNA DNA sequences. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 17, 24-33.
- Beukema W., De Pous P., Donaire D. et al. 2010. Biogeography and contemporary climatic differentiation among Moroccan *Salamandra algira*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 626-641.
- Brändli L., Handley L.J., Vogel P. et al. 2005. Evolutionary history of the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) inferred from analysis of mtDNA, Y, and X chromosome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 832-844.
- Catzefflis F. 1984. Systématique biochimique, taxonomie et phylogénie des musaraignes d'Europe (Soricidae, Mammalia). In, p. 133. Université de Lausanne, Lausanne
- Cosson J.F., Hutterer R., Libois R. et al. 2005. Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in the western Mediterranean: a case study with the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula* (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology*, 14, 1151-1162.
- Denys C., Stoetzel E., Lalis A. et al. ce volume. Inventaire des petits mammifères de régions anthropisées et naturelles du Maroc septentrional.
- De Pous P., Metallinou M., Donaire-Barroso D. et al. 2013. Integrating mtDNA analyses and ecological niche modelling to infer the evolutionary history of *Alytes maurus* (Amphibia; Alytidae) from Morocco. *Herpetological Journal*, 23, 153-160.
- Dubey S., Antonin M., Denys C. et al. 2007. Use of phylogeny to resolve the taxonomy of the widespread and highly polymorphic African giant shrews (*Crocidura olivieri* group, Crocidurinae, Mammalia). *Zoology*, 110, 48-57.
- Dubey S., Salamin N., Ruedi M. et al. 2008. Biogeographic origin and radiation of the Old World crocidurine shrews (Mammalia: Soricidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 953-963.
- Ducroz J.F., Volobouev V. & Granjon L. 2001. An assessment of the systematics of arvicoline rodents using mitochondrial DNA sequences: evolutionary and biogeographical implications. *Journal of mammalian Evolution*, 8, 173-206.
- Fazekas A.J., Kesanakurti P.R., Burgess K.S. et al. 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources*, 9 Suppl s1, 130-139.
- Fritz U., Harris D.J., Fahd S. et al. 2009. Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: Old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. *Amphibia-Reptilia*, 30, 63-80.
- Fu Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Fu Y.X. & Li W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133, 693-709.
- Hajibabaei M., Janzen D.H., Burns J.M. et al. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968-971.
- Handley L.J.L. & Perrin N. 2006. Y chromosome microsatellite isolation from BAC clones in the Greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 276-279.
- Harris D. & Perera A. 2009. Phylogeography and genetic relationships of North African *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841 estimated from mitochondrial DNA sequences. *Biologia*, 64, 356-360.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L. et al. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Hebert P.D., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S. et al. 2004. Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2, e312.
- Husemann M., Schmitt T., Zachos F.E. et al. 2014. Palaearctic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaearctic biota. *Journal of Biogeography*, 41, 81-94.
- Hutterer R. 1986. The species of *Crocidura* (Soricidae) in Morocco. *Mammalia*, 50, 521-534.
- Jacquet F., Nicolas V., Bonillo C. et al. 2012. Barcoding, molecular taxonomy and exploration of the diversity of shrews (Soricomorpha: Soricidae) on Mount Nimba (Guinea). *Zool. J. Linnean Soc.*, 166: 672-687
- Kelly R.P., Oliver T.A., Sivasundar A. et al. 2010. A method for detecting population genetic structure in diverse, high gene-flow species. *The Journal of Heredity*, 101, 423-436.
- Kerr K.C., Stoeckle M.Y., Dove C.J. et al. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7, 535-543.
- Librado P. & Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Lo Brutto S., Arculeo M. & Sara M. 2004. Mitochondrial simple sequence repeats and 12S-rRNA gene reveal two distinct lineages of *Crocidura russula* (Mammalia, Soricidae). *Heredity*, 92, 527-533.
- Mulazzani S., Le Bourdonnec F.-X., Belhouchet L. et al. 2010. Obsidian from the Epipalaeolithic and Neolithic eastern Maghreb. A view from the Hergla context (Tunisia). *Journal of Archaeological Science*, 37, 2529-2537.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- Nei M. & Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5269-5273.
- Nicolas V., Hamani A., Amrouche L. et al. 2014a. First molecular evidence for the presence of *Crocidura pachyura* (Mammalia, Soricidae) in Kabylie (Algeria). *Mammalia*, 78, 245-249.

- Nicolas V., Mboumba J.F., Verheyen E. et al. 2008. Phylogeographical structure and regional history of *Lemniscomys striatus* (Rodentia: Muridae) in tropical Africa. *Journal of Biogeography*, 35, 2072-2089.
- Nicolas V., Ndiaye A., Benazzou T. et al. 2014b. Phylogeography of the North African dipodil (Rodentia: Muridae) based on cytochrome-b sequences. *Journal of Mammalogy*, 95, 241-253.
- Pinho C., Harris D.J. & Ferrand N. 2007. Contrasting patterns of population subdivision and historical demography in three western Mediterranean lizard species inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 16, 1191-1205.
- Recuero E., Iraola A., Rubio X. et al. 2007. Mitochondrial differentiation and biogeography of *Hyla meridionalis* (Anura : Hylidae): an unusual phylogeographical pattern. *Journal of Biogeography*, 34, 1207-1219.
- Remigio E.A. & Hebert P.D. 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 641-647.
- Rihane A. 2004. Contribution à l'étude du régime alimentaire de la Chouette effraie *Tyto alba* dans les plaines semi-arides du Maroc. In, p. 270. Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Mohammedia
- Souville G. 1998. Contacts et échanges entre la péninsule Ibérique et le Nord-Ouest de l'Afrique durant les temps préhistoriques et protohistoriques. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Inscriptions et Belles-Lettres*, 142, 163-177.
- Stöck M., Dubey S., Klutsch C. et al. 2008. Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. *Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding*, 49, 1019-1024.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Vences M., Thomas M., Van Der Meijden A. et al. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in zoology*, 2, 5.
- Vesmanis I.E. & Vesmanis A. 1979. Beitrag zur Kenntnis der Crociduren-fauna Marokkos (Mammalia, Insectivora, Soricidae). 1. Die Wimperspitzmäuse aus den Sammlungen des Smithsonian Institution, Washington. *Zoologische Abhandlungen (Staatliches Museum für Tierkunde Dresden)*, 36, 11-80.
- Vogel P., Cosson J.F. & Lopez Jurado L.F. 2003. Taxonomic status and origin of the shrews (Soricidae) from the Canary islands inferred from a mtDNA comparison with the European *Crocidura* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27, 271-282.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H. et al. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 360, 1847-1857.

Tab. 1 : Liste du matériel considéré dans cette étude. Pour les spécimens récemment capturés au Maroc les habitats de capture sont précisés.

Tab. 1 : List of specimens included in this study. For specimens recently captured in Morocco (this study), the habitat of capture is given.

Continent	Pays	Localité	Habitat	Numero terrain	Num Genbank	Référence
Afrique	Maroc	Aguelmane Aziga, Khenifra		IZEA1237		Cosson et al 2005
Afrique	Maroc	BenGuerir	lisière champs de blé - bottes de paille - friche	MA083	KP027891	cette étude
Afrique	Maroc	BeniHadifa	plantation d'oliviers	MA561	KP027908	cette étude
Afrique	Maroc	BeniHadifa	forêt de conifères, sous bois ajonc	MA574	KP027909	cette étude
Afrique	Maroc	BeniHadifa	forêt de conifères, sous bois ajonc	MA601	KP027910	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons, autour d'une daya	MA154	KP027892	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons, autour d'une daya	MA157	KP027893	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons, autour d'une daya	MA165	KP027894	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons	MA168	KP027895	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons, autour d'une daya	MA189	KP027896	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons, autour d'une daya	MA190	KP027897	cette étude
Afrique	Maroc	BenSlimane	forêt ouverte, buissons	MA202	KP027898	cette étude
Afrique	Maroc	Berrechid	entre une haie d'acacias et un champ de blé	MA024	KP027888	cette étude
Afrique	Maroc	Berrechid	entre une haie d'acacias et un champ de blé	MA067	KP027889	cette étude
Afrique	Maroc	Berrechid	entre une haie d'acacias et un champ de blé	MA068	KP027890	cette étude
Afrique	Maroc	Cherouda	champ de blé	MA628	KP027911	cette étude
Afrique	Maroc	Cherouda	champ de blé	MA654	KP027912	cette étude
Afrique	Maroc	Cherouda	forêt méditerranéenne dense	MA656	KP027913	cette étude
Afrique	Maroc	Cherouda	champ de blé	MA661	KP027914	cette étude
Afrique	Maroc	Cherouda	forêt méditerranéenne dense	MA662	KP027915	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	buissons oliviers, amandiers	MA802	KP027941	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	buissons oliviers, amandiers	MA803	KP027942	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	buissons oliviers, amandiers	MA804	KP027943	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	buissons oliviers, amandiers	MA805	KP027944	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	jardin d'une école	MA809	KP027945	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	jardin d'une école	MA817	KP027946	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	jardin d'une école	MA829	KP027947	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	jardin d'une école	MA830	KP027948	cette étude
Afrique	Maroc	Dayet Erroumi	jardin d'une école	MA837	KP027887	cette étude
Afrique	Maroc	El Khizana	forêt de chêne zene	MA512	KP027907	cette étude
Afrique	Maroc	Esperada	champs d'orge non en culture après récolte, en bordure de cyste	MA494	KP027905	cette étude
Afrique	Maroc	Esperada	champs d'orge non en culture après récolte, en bordure de cyste	MA495	KP027906	cette étude
Afrique	Maroc	Ifrane	zone ouverte, rocailleuse à herbacées, aubépines et buissons épineux	MA387	KP027901	cette étude

Afrique	Maroc	Ifrane	zone ouverte, rocailleuse à herbacées, aubépines et buissons épineux	MA390	KP027902	cette étude
Afrique	Maroc	Ifrane	le long d'un muret, zone en friche	MA430	KP027903	cette étude
Afrique	Maroc	Ifrane	le long d'un muret, zone en friche	MA445	KP027904	cette étude
Afrique	Maroc	Imlil		IZEA2633	AY918395	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Marrakech		IZEA5059	AY918393	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Merja Zerga	haies – Chemin dans le village au bord de la lagune	MA678	KP027916	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	champs de tournesols	MA687	KP027917	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	jonchaie (zone inondable de la lagune)	MA711	KP027918	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	jonchaie (zone inondable de la lagune)	MA712	KP027919	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	jonchaie (zone inondable de la lagune)	MA723	KP027920	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	haie, champs de haricots	MA728	KP027921	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	haie, champs de haricots	MA733	KP027922	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	jonchaie	MA736	KP027923	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	haie, champs de haricots	MA737	KP027924	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	jonchaie	MA740	KP027925	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	prairies sur une île de la lagune	MA747	KP027926	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	prairies sur une île de la lagune	MA757	KP027927	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	prairies sur une île de la lagune	MA758	KP027928	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA762	KP027929	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA763	KP027930	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	forêt, genêts, oliviers sauvages	MA772	KP027931	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga		MA775	KP027932	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA788	KP027933	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA789	KP027934	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA790	KP027935	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA791	KP027936	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA792	KP027937	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	buissons de genêts et oliviers, forêt de chêne	MA793	KP027938	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA794	KP027939	cette étude
Afrique	Maroc	Merja Zerga	tas de bois chêne liège, maison forestière Ain Felfel	MA795	KP027940	cette étude
Afrique	Maroc	Moulay Bouselham		IZEA2642	AY918390	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Moulay Bouselham		IZEA2643	AY918392	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Moulay Bouselham		IZEA2646	AY918391	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Moulay Bouselham		IZEA2647	AY918382	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Oukaïmeden		IZEA1572		Cosson et al 2005
Afrique	Maroc	Oukaïmeden		IZEA2622	AY918396	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Oukaïmeden		IZEA2626	AY918395	Brandli et al. 2005

Afrique	Maroc	Oukaimeden		IZEA5061	AY918394	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Oukaimeden		IZEA5063	AY918397	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Skhirat, Rabat		IZEA2641	AY918398	Brandli et al. 2005
Afrique	Maroc	Taza	réserve des cerfs, forêt de chêne liège	MA298	KP027899	cette étude
Afrique	Maroc	Taza	zones ouvertes à cistes bordées par forêts de chênes	MA299	KP027900	cette étude
Europe	Allemagne	Bonn		IZEA5461	AY918375	Brandli et al. 2005
Europe	Allemagne	Bonn		IZEA752		Cosson et al 2005
Europe	Espagne	Candelario		IZEA5936	AY918373	Brandli et al. 2005
Europe	Espagne	Garsola		IZEA1685	AY918374	Brandli et al. 2005
Europe	Espagne	Murillo, Logroño,		IZEA5788		Cosson et al 2005
Europe	France	Goudargue		IZEA5790	AY918381	Brandli et al. 2005
Europe	France	Ile de Sein		19/JFC-R6		Cosson et al 2005
Europe	France	Ile de Sein		9/JFC-R7		Cosson et al 2005
Europe	France	Roscoff		IZEA5545	AY918380	Brandli et al. 2005
Europe	France	Roscoff		IZEA5547	AY918373	Brandli et al. 2005
Europe	France	Roscoff		IZEA5548	AY918373	Brandli et al. 2005
Europe	France	Roscoff		IZEA5550	AY918373	Brandli et al. 2005
Europe	France	Roscoff		IZEA5551	AY918379	Brandli et al. 2005
Europe	France	St. Mortan, Ardèche		IZEA5785	AY918376	Brandli et al. 2005
Europe	France	St. Mortan, Ardèche		IZEA5786	AY918377	Brandli et al. 2005
Europe	Pays Bas	Breskens		IZEA1084		Cosson et al 2005
Europe	Portugal	Unahis da Serra		IZEA5917	AY918378	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	Auvernier, Neuchâtel		PF11003	AY918387	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	Bassins, Vaud		PF10129	AY918383	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	Haut-Geneveys, Neuchâtel		PF11018	AY918385	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	Sion, Valais		IZEA5564	AY918389	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	Sion, Valais		IZEA7518	AY918388	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	St-Cergue, Vaud		PF11231	AY918384	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse	Tartegnin, Vaud		PF10245	AY918386	Brandli et al. 2005
Europe	Suisse			AJ000467	AJ000467	Fumagalli et al 1999
Europe	Suisse			AJ000468	AJ000468	Fumagalli et al 1999