



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

C. R. Biologies 327 (2004) 501–507



Évolution / Evolution

## Découverte d'une nouvelle espèce de souris sur l'île de Chypre

François Bonhomme<sup>a,\*</sup>, Annie Orth<sup>a</sup>, Thomas Cucchi<sup>b</sup>, Eleftherios Hadjisterkotis<sup>c</sup>,  
Jean-Denis Vigne<sup>b</sup>, Jean-Christophe Auffray<sup>d</sup>

<sup>a</sup> « Génome, Populations, Interactions, Adaptation », UMR 5171 CNRS–Ifremer–UM2, CC 063, université Montpellier-2, 34095 Montpellier cedex 05, France

<sup>b</sup> « Archéozoologie et histoire des sociétés », laboratoire d'anatomie comparée, ESA 8045, CNRS, Muséum national d'histoire naturelle, 55, rue Buffon, 75005 Paris, France

<sup>c</sup> Ministry of the Interior, 1453 Nicosia, Chypre

<sup>d</sup> Institut des sciences de l'Évolution, UMR 5554 CNRS–UM2, CC 064, université Montpellier-2, 34095 Montpellier cedex, France

Reçu le 4 janvier 2004 ; accepté après révision le 9 mars 2004

Disponible sur Internet le 13 mai 2004

Présenté par Claude Combes

### Résumé

Une analyse de divergence mitochondriale et nucléaire nous a permis de préciser la position taxinomique des deux espèces de souris qui coexistent à Chypre. L'une est la souris domestique *M. m. domesticus*, l'autre s'est avérée être un nouveau taxon à peu près équidistant des deux espèces non inféodées à l'homme, *M. spicilegus* et *M. macedonicus*. Son origine, datée d'environ 0,5–1 Ma, résulte, soit d'une colonisation ancienne de l'île, soit d'un transport accidentel par les premiers arrivants épipaléolithiques. Dans ce dernier cas, la nouvelle espèce devrait aussi exister quelque part en Asie Mineure. **Pour citer cet article : F. Bonhomme et al., C. R. Biologies 327 (2004).**

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

**A new species of wild mice on the Island of Cyprus.** A mitochondrial and nuclear gene analysis allowed us to precise the taxonomical position of the two sympatric species of mice known to be present on Cyprus. One of them is the commensal house mouse *M. m. domesticus*, and the other revealed to be a new taxon that is a sister species of *M. spicilegus* and *M. macedonicus*. The new species is equidistant from each of these, the divergence dating around 0.5–1 Myr. Its origin either results from an ancient accidental colonisation of the island or from a recent transportation by the first epipalaeolithic settlers. In this last eventuality, the new species would also exist somewhere else in Asia Minor. **To cite this article: F. Bonhomme et al., C. R. Biologies 327 (2004).**

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

**Mots-clés :** Mus ; Chypre ; refuges Pléistocène ; phylogéographie ; ADNmt ; gène *Abpa*

**Keywords :** Mus ; Cyprus ; Pleistocene refugia ; phylogeography ; mtDNA ; *Abpa* gene

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [bonhomme@univ-montp2.fr](mailto:bonhomme@univ-montp2.fr) (F. Bonhomme).

### Abridged English version

Pleistocene climatic oscillations are known to be an important motor in European terrestrial fauna and flora. During cold episodes, several refuges have functioned in the southern peninsulas (Iberian and Italian peninsulas, Balkans), but also further east on the foothills of Caucasus. Recently, such refuges have been shown to produce two different subspecies in the eastern Mediterranean short-tailed mouse, yielding the two subspecies *M. macedonicus macedonicus* and *M. m. spretoides*. In the Mediterranean island of Cyprus, it was known that two species of mice co-existed, the House mouse *M. musculus domesticus* and another form until now referred to as *M. macedonicus* from superficial morphological inspection. Recently, a morphological analysis of recent and subfossil specimens showed that the animals referable to this second taxon were indeed clearly distinguishable from *M. macedonicus*. Here, we characterise genetically seven mouse specimens from Cyprus using 310 pb of mitochondrial 16s-rDNA, 230 pb of the variable part of the mitochondrial D-loop, and 761 pb of the *Abpa* nuclear gene 2nd intron. We compare the sequences obtained with that of the mound builder mouse *M. spicilegus*, the close relative species of *M. macedonicus*. The molecular divergence obtained and the phylogenetic trees resulting from this comparison clearly show that five Cyprus animals are almost equidistant from *M. macedonicus* than it is from *M. spicilegus*, both for mitochondrial and nuclear genes (the levels of mitochondrial nucleotidic divergence observed – about 8% for the D-Loop and 5% for the 16S rRNA – correspond to at least several hundred thousand years). The divergences observed at the *Abpa* 2nd intron were ten times smaller (0.6%).

Altogether, these results clearly indicate that these individuals belong to a new taxon, differentiated from the other two short-tailed species.

This new species, designated here provisionally as *M. sp. nova*, deserves further description of type specimens before it is assigned a name, which possibly could be *M. cypricus*. Indeed, two hypotheses can be formulated as to its origin.

- (i) It is a true endemic having reached Cyprus long before the last glacial episode. This could be in keeping with the observation of fossil mice

in mid-Pleistocene deposits and would imply a colonisation of the island by some rare accidental rafting event. Indeed, the island is separated from the mainland by a deep channel that was never emerged, even during the glacial-period drop-off.

- (ii) It is a quite recent invader that colonised the island with its first human settlers along with the commensal *M. m. domesticus*. In this case, its origin would have to be found in the nearby mainland, where a localised refuge different from the two others, responsible for the existence of the two subspecies of *Mus macedonicus*, could have functioned on the southern coast of Asia Minor.

Our results point out toward the complex functioning of the faunistic refuges having existed in the Near East, a point also underlined by recent phylogeographic data on other terrestrial species such as the European hedgehog.

### 1. Introduction

Les oscillations climatiques liées aux périodes glaciaires ont engendré des mouvements concomitants des faunes terrestres très importants. Dans le domaine paléarctique continental européen, notamment, ces mouvements se sont traduits par le fonctionnement de nombreux refuges dans les péninsules du Sud de l'Europe (Ibérique, Italique, Balkanique) [1], mais il a été également montré que de tels refuges avaient fonctionné plus à l'est, en Asie Mineure [2–4]. Un des apports majeurs de la phylogéographie moléculaire a été de pouvoir étudier les conséquences génétiques de ces alternances de phases d'isolement et d'expansion, et de mettre clairement en évidence leur rôle dans la création d'espèces vicariantes, puis sympatriques. Chez les souris du genre *Mus*, il a été récemment proposé [3] que le fonctionnement de refuges distincts situés au sud du Caucase et autour de la mer Noire était responsable de la différenciation génétique des espèces *Mus spicilegus* et *Mus macedonicus*, ainsi que de l'existence de deux sous-espèces *Mus macedonicus macedonicus* et *Mus macedonicus spretoides*, occupant respectivement le Nord et le Sud de l'aire de répartition de ce taxon.

D'après la littérature, Chypre, grande île océanique de Méditerranée, se situe théoriquement dans l'aire de

répartition de *Mus macedonicus* [5,6] où celle-ci vivrait en sympatrie avec la sous-espèce commensale *Mus musculus domesticus*. Une analyse morphométrique récente, portant sur la distinction interspécifique d'un assemblage de muridés issu d'un site Néolithique précéramique (fin du 9<sup>e</sup> millénaire av. J.-C.), a en effet démontré que deux espèces sympatriques occupaient déjà l'île à cette période [7]. La première appartient clairement à la sous-espèce commensale. La seconde présente une distance morphologique significative avec les souris sauvages actuelles d'Israël (*Mus macedonicus spretoïdes*), qui avaient servi de référence pour le Proche-Orient [7]. Ceci fut interprété selon trois hypothèses :

- (i) la survivance d'une des deux formes du genre *Mus* décrites par Bate [8] et Boeschoten et Sondaar [9] parmi la faune Pléistocène découverte dans cinq grottes ossifères dans la région de Cape Pyla ;
- (ii) une origine géographique différente de celle des *macedonicus* d'Israël, seule sous-espèce avec laquelle la forme chypriote avait été comparée ;
- (iii) la conséquence d'une dérive morphologique holocène liée aux effets stochastiques d'une fondation à partir de quelques individus fortuitement immigrés.

Il était donc intéressant de comprendre les relations de parentés entre ces différents taxons et d'aborder la question de l'origine du peuplement de l'espèce non commensale à Chypre. Dans la présente étude, nous analysons génétiquement six individus actuels en provenance de cette île et montrons que cinq d'entre eux appartiennent à une espèce encore jamais décrite. Nous discutons ces résultats à la lumière du fonctionnement possible des refuges glaciaires ayant existé en Asie Mineure.

## 2. Matériel et méthodes

Onze individus, dont six en provenance de Chypre, ont été analysés (Tableau 1).

L'ADN a été extrait à partir de mandibules récoltées dans les pelotes de réjection de chouette effraie (*Tyto alba*) ou à partir d'un fragment de rate avec le kit DNeasy Tissue QIAGEN. Onze échantillons ont été typés pour l'ADN mitochondrial, et sept pour l'ADN nucléaire.

### 2.1. ADN mitochondrial

270 pb du gène codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiées dans la région la plus variable à partir des

Tableau 1  
Origine géographique des échantillons analysés

Nom des taxons sur la Fig. 1A	Pays	Localités	Espèces
Chypre 1	Chypre	Kissonerga	<i>Mus sp. nova</i>
Chypre 2	Chypre	Mandria	<i>Mus sp. nova</i>
Chypre 3	Chypre	Trombovounos	<i>Mus sp. nova</i>
Chypre 4	Chypre	Ayios Dometios	<i>Mus sp. nova</i>
Chypre 5	Chypre	Kophinou	<i>Mus sp. nova</i>
dom-Chypre 6	Chypre	Kissonerga	<i>Mus musculus domesticus</i>
dom-France	France	Les Embiez	<i>Mus musculus domesticus</i>
musculus	Bulgarie	Sokolovo	<i>Mus musculus musculus</i>
macedonicus	Bulgarie	Jaboltchevo	<i>Mus macedonicus macedonicus</i>
spretoïdes	Israël	Mont Carmel	<i>Mus macedonicus spretoïdes</i>
spicilegus	Serbie	Pančevo	<i>Mus spicilegus</i>
Nom des taxons sur la Fig. 1B	Pays	Localités	Espèces
Chypre 3	Chypre	Trombovounos	<i>Mus sp. nova</i>
dom-Chypre 6	Chypre	Kissonerga	<i>Mus musculus domesticus</i>
dom-France	France	Les Embiez	<i>Mus musculus domesticus</i>
musculus	Pologne	Bialowieza	<i>Mus musculus musculus</i>
macedonicus	Bulgarie	Slantchev Briag	<i>Mus macedonicus macedonicus</i>
spretoïdes	Israël	Mont Carmel	<i>Mus macedonicus spretoïdes</i>
spicilegus	Serbie	Pančevo	<i>Mus spicilegus</i>

amorces précédemment définies [10] entre les positions 1057 et 1329 de la séquence référence de *Mus domesticus* [11], ainsi que 310 pb de la région hypervariable de la D-loop avec ce couple d'amorces : MTL3L (5'-CACCACCAGCACCCAAAGCT-3') et MTL4R (5'-TTGGTTTCACGGAGGATGGT-3'). Les produits de PCR ont été séquencés sur séquenceur automatique ALF AP Biotech. Les séquences correspondantes ont été concaténées et les analyses effectuées sur un total de 494 sites (numéros d'accèsion dans GenBank AY562503 à AY562513 pour la D-loop et AY562521 à AY562531 pour l'ARNr 16S).

## 2.2. Gène nucléaire

Un fragment de 1235 pb du gène *Abpa* a été amplifié avec les amorces ABPA1L (5'-AGCTCACTGGT-GCTCTCTTGC-3') et ABPA1R (5'-CTTAGACACCTGGGGAGAAGG-3'). L'exon 2 (188 pb) ainsi que l'intron 2 (761 pb) ont été séquencés [12]. Les numéros d'accèsion dans GenBank sont AY562514 à AY562520.

La phylogénie de ces haplotypes a été réalisée par la méthode du *neighbour-joining* [13] appliquée à une matrice de divergence nucléotidique corrigée (Kimura 2-paramètres) grâce au logiciel Phylo-Win [14]. La robustesse des arbres a été évaluée par bootstrap (1000 répliqués).

## 3. Résultats

Nous présentons sur la Fig. 1A l'arbre phylogénétique représentant la différenciation mitochondriale des échantillons chypriotes comparée à celles de plusieurs autres taxons proches. Il apparaît clairement que le groupe des individus chypriotes de la forme non commensale se situe à l'intérieur du groupe *spicilegus/macedonicus*, tout en étant à peu près aussi divergent de l'un et l'autre taxon (les valeurs de divergence nucléotidique moyennes pour le fragment de D-loop s'établissent à 0,073, 0,083 et 0,097 pour *spicilegus/macedonicus*, *macedonicus*/Chypre, et *spicilegus*/Chypre respectivement). Pour le fragment d'ADNr-16S, nous obtenons 0,052, 0,047 et 0,039.

Dans la Fig. 1B, nous montrons l'arbre obtenu pour les 661 pb de l'intron 2 du gène nucléaire *Abpa*. Bien que les divergences nucléotidiques soient

modérées (les valeurs de divergence nucléotidique moyenne s'établissent à 0,007, 0,007 et 0,005 pour *spicilegus/macedonicus*, *macedonicus*/Chypre, et *spicilegus*/Chypre respectivement), elles montrent clairement que chaque taxon possède une séquence différente, et l'arbre produit a exactement la même topologie que celui de la Fig. 1A.

L'ensemble de ces résultats montre que deux espèces distinctes sont bien présentes en sympatrie sur l'île : la souris domestique *M. musculus domesticus* d'une part, et d'autre part un nouveau taxon clairement apparenté à *M. spicilegus* et *M. macedonicus*, mais aussi différencié de ces deux derniers qu'ils le sont l'un de l'autre. Ces résultats suggèrent donc fortement que ce taxon est une espèce à part entière, qui ne correspond ni à *M. spicilegus* ni à *M. macedonicus*. La question de l'origine, insulaire ou non, de cette espèce reste posée.

## 4. Discussion

### 4.1. Divergence moléculaire

Les calibrations temporelles disponibles dans la littérature pour les régions étudiées de l'ADN mitochondrial ne nous permettent pas de faire une estimation précise des temps de divergence séparant les trois taxons *spicilegus/macedonicus/sp. nova*. Néanmoins, si l'on considère que la nouvelle espèce se situe à équidistance des deux autres, on peut se référer au chiffre d'environ 1,1 Ma proposé par She et al. [15] sur la base d'une étude d'hybridation ADN/ADN, calibrée par une divergence *Mus/Rattus* située aux alentours de 10 Ma. Quelle que soit la vraie valeur de ce chiffre, elle est synonyme en tout cas d'une séparation des taxons largement antérieure à la dernière glaciation (50 000 à 15 000 AC).

Pour l'intron 2 du gène de la protéine ABP, les divergences moléculaires sont très faibles, mais du même ordre entre les trois taxons (div. moyenne de 0,8 %, ce qui est dix fois plus faible que les valeurs observées pour la DLoop). Notons que la partie exonique que nous avons séquencée (188 pb de l'exon 2, non montré) ne présentait aucune divergence entre les trois espèces, contrairement à ce qui a été observé chez *M. spretus* et *M. musculus* [12].

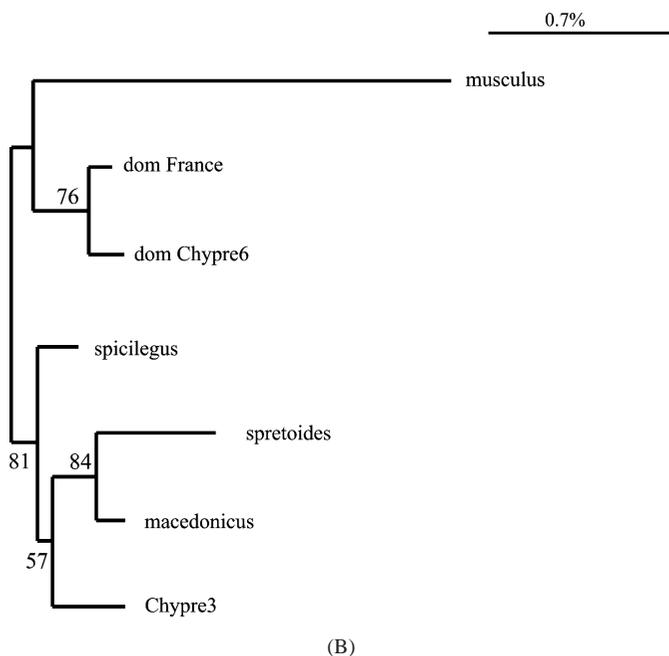
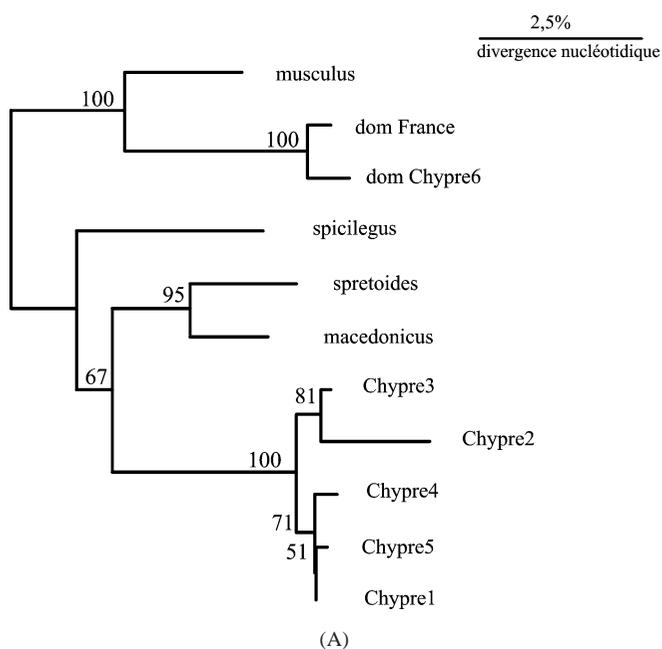


Fig. 1. (A) Phylogénie mitochondriale (ADNr16S & D-Loop) des six échantillons de Chypre et des autres taxons proches. (B) Phylogénie générée à partir des 661 pb de l'intron n° 2 du gène nucléaire *Abpa*. La phylogénie de ces haplotypes a été réalisée par la méthode du *neighbour-joining* appliquée à une matrice de divergence nucléotidique corrigée (Kimura 2-paramètres). La robustesse des nœuds a été évaluée par bootstrap (1000 répliques).

#### 4.2. Origine du taxon chypriote

Nos données montrent donc clairement l'existence d'un troisième taxon *grosso modo* équidivergent de l'une et l'autre espèces jumelles *M. macedonicus* et *M. spicilegus*. A priori, plusieurs scénarios sont possibles pour son origine :

- (i) Il s'agit d'une espèce véritablement endémique depuis longtemps à Chypre et qui aurait survécu jusqu'à nos jours. Elle serait donc, avec *Crocidura zimmermanni* (Crète, [16]), la seule espèce mammalienne endémique pléistocène des îles méditerranéennes à avoir subsisté. Elle aurait colonisé l'île à la faveur d'un événement rare de transport par radeau au cours du Quaternaire. D'après les données géologiques et paléontologiques, il n'a jamais existé de connexion terrestre entre l'île et le continent depuis le Miocène [17], et l'absence de fossiles du Tertiaire suggère que l'île était déjà séparée du continent lors de l'assèchement messinien (–6 Ma) [18,19]. Bien que la recherche portant sur les fluctuations fines des niveaux marins du Pléistocène n'en soit qu'à ses débuts, il ne fait pas de doute que Chypre était séparé par de larges chenaux d'eau profonde lors des régressions marines associées au dernier maximum glaciaire, comme elle l'est encore aujourd'hui [20]. L'endémisme de cette espèce pourrait être corroboré par l'existence des formes du genre *Mus* décrites parmi la faune des gisements pléistocènes de Chypre [9] ainsi que par la mention d'une forme sauvage dans un niveau d'occupation épipaléolithique (10 500 BC) de l'abri sous roche d'Akrotiri-Aetokremnos [21]. L'analyse morphologique de ces fossiles est en cours (Cucchi, obs.pers).
- (ii) L'espèce trouve son origine ailleurs sur le proche continent, où aurait fonctionné un refuge l'isolant de *M. macedonicus*. Elle aurait alors colonisé l'île à la faveur des premiers mouvements humains, en même temps ou peu avant *M. m. domesticus*. Cette occurrence poserait alors la question de la possibilité d'un transport passif et occasionnel d'espèces non strictement commensales lors des déplacements exploratoires de petits groupes humains épipaléolithiques. Chypre et les autres

îles méditerranéennes ont été définitivement colonisées au Néolithique.

Les données disponibles ne permettent pas de trancher pour le moment entre les deux scénarios. L'analyse morphologique des fossiles pléistocènes de Chypre ainsi que l'exploration des isolats géographiques d'Asie Mineure devraient permettre de lever le voile. Cette nouvelle espèce, qui doit faire l'objet d'une description morphologique détaillée de spécimens types, pourrait alors être nommée *Mus cypriacus*.

#### Références

- [1] G.M. Hewitt, Post-glacial re-colonization of European biota, *Biol. J. Linn. Soc.* 68 (1999) 87–112.
- [2] G.M. Hewitt, The genetic legacy of the Quaternary ice ages, *Nature* 405 (2000) 907–913.
- [3] A. Orth, J.-C. Auffray, F. Bonhomme, Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse *Mus macedonicus* reveal multiple glacial refuges south of Caucasus, *Heredity* 89 (5) (2002) 353–357.
- [4] J.M. Seddon, F. Santucci, N.J. Reeve, G.M. Hewitt, Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*, *J. Evol. Biol.* 15 (2002) 463–467.
- [5] J.-C. Auffray, J.T. Marshall, L. Thaler, F. Bonhomme, Focus on the nomenclature of European species of *Mus*, *Mouse Genome* 88 (1990) 7–8.
- [6] P. Orsini, F. Bonhomme, J. Britton-Davidian, H. Croset, S. Gerasimov, L. Haler, Le complexe d'espèces du genre *Mus* en Europe centrale et orientale. II : Critères d'identification répartition et caractéristiques écologiques, *Z. Saugetierkd.* 48 (1983) 86–95.
- [7] T. Cucchi, J.-D. Vigne, J.-C. Auffray, P. Croft, E. Peltenburg, Introduction involontaire de la souris domestique (*Mus musculus domesticus*) à Chypre dès le Néolithique précéramique ancien (fin IX<sup>e</sup> et VIII<sup>e</sup> millénaire av. J.-C.), *C. R. Palevol* 1 (2002) 235–241.
- [8] D. Bate, The mammals of Cyprus, *Proc. Zool. Soc. Lond.* 2 (1903) 341–348.
- [9] G.J. Boeschoten, P.Y. Sondaar, On the fossil mammalia of Cyprus, *Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. B* 75 (1972) 306–308.
- [10] J.-C. Auffray, A. Orth, J. Catalan, J. Gonzalez, E. Desmarais, F. Bonhomme, Phylogenetic position and description of a new species of subgenus *Mus* (Rodentia, Mammalia) from Thailand, *Zool. Sci.* 32 (2) (2003) 119–127.
- [11] M.J. Bibb, R.A. Van Etten, C.T. Wright, M.W. Walberg, D.A. Clayton, Sequence and Gene Organisation of mouse Mitochondrial DNA, *Cell* 26 (1981) 167–180.
- [12] R.C. Karn, A. Orth, F. Bonhomme, P. Boursot, The complex history of a gene proposed to participate in a sexual isolation

- mechanism in house mice, *Mol. Biol. Evol.* 19 (4) (2002) 462–471.
- [13] N. Saitou, M. Nei, The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (4) (1987) 406–425.
- [14] N. Galtier, M. Gouy, C. Gautier, SEAVIEW and PHYLO\_Win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny, *Cabios* 12 (6) (1996) 543–548.
- [15] J.X. She, F. Bonhomme, P. Boursot, L. Thaler, F. Catzeflis, Molecular phylogenies in the genus *Mus*: comparative analysis of electrophoretic scnDNA hybridisation and mtDNA RFLP data, *Biol. J. Linn. Soc.* 41 (1990) 83–103.
- [16] J.W.F. Reumer, Notes on the Soricidae (Insectivora, Mammalia) from Crete. I. The Pleistocene species *Crocidura zoimmermanni*, *Bonn. Zool. Beitr.* 37 (3) (1986) 161–171.
- [17] E. Hadjisterkotis, B. Masala, D. Reese, The origin and extinction of the large Pleistocene Mammals of Cyprus, *Biogeographia* XXI (2000) 593–606.
- [18] G. Constantinou, Geological features and ancient exploitation of the cupriferous sulphide orebodies of Cyprus, in: J.E.A. Muhly (Ed.), *Early Metallurgy in Cyprus, 4000–500 BC*, Periedes Foundation, Larnaca, 1982, pp. 13–24.
- [19] I.G. Gass, Is the Troodos Massif of Cyprus a fragment of Mesozoic Ocean Floor?, *Nature* 220 (1968) 39–42.
- [20] A. Knapp, S. Held, S. Manning, The prehistory of Cyprus: problems and prospects, *J. World Prehist.* 377 (1994) 377–453.
- [21] A.H. Simmons, *Faunal Extinction in an Island Society. Pygmy Hippopotamus Hunters of Cyprus*, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999, p. 381.