



FACULTE DE BIOLOGIE ET DE MEDECINE

Département d'Ecologie et Evolution
Laboratoire de Biologie de la Conservation

**Phylogéographie des principales vipères
européennes (*Vipera ammodytes*, *V. aspis* et
V. berus), structuration génétique et
multipaternité chez *Vipera berus***

Thèse de doctorat ès science de la vie (PhD)

présentée à la
Faculté de Biologie et de Médecine
de l'Université de Lausanne

par

Sylvain Ursenbacher

Biologiste diplômé
de l'Université de Lausanne (Suisse)

Jury

Prof. Jacques Hausser, Président et Rapporteur
Dr. Luca Fumagalli, Directeur de thèse
Dr. Joel Parker, Expert interne
Prof. Pierre Taberlet, Expert externe
Dr. Jean-Claude Monney, Expert externe

Lausanne

2005

Remerciements

Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Plus particulièrement, je tiens à exprimer ma reconnaissance aux personnes suivantes:

Dr. Luca Fumagalli, responsable du Laboratoire de Biologie de la Conservation (LBC) de l'Université de Lausanne qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire où j'y ai énormément appris. Je le remercie pour sa disponibilité, sa confiance ainsi que sa bonne humeur.

Dr. Jean-Claude Monney, resp. du KARCH pour la Suisse Romande (Fribourg, Bern) sans lequel ce travail n'aurait pas été possible, ni même envisagé. Ses précieux conseils et sa grande connaissance des vipères m'ont permis d'effectuer cette étude dans d'excellentes conditions; son soutien sans faille, ses encouragements et nos grandes discussions m'ont à chaque fois redonné une énergie nouvelle pour continuer mes recherches qui, quelque part, sont plutôt nos recherches. Sans parler des purs moments de plaisir à "chasser la vipère" aux quatre coins de la Suisse ou de la France..Finalement, pour certains c'est à **cause** de lui que je travaille avec les serpents; personnellement, je dirai que c'est **grâce** à lui!

Prof. Pierre Taberlet et Dr. Joel Parker, experts, ainsi que Prof. Jacques Hausser, président et rapporteur, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour avoir accepté d'être membre du jury de thèse.

Prof. Cornelis Neet, Professeur à l'Université de Lausanne et chef du Service des forêts, de la faune et de la nature du Canton de Vaud, pour m'avoir soutenu durant mon travail de diplôme, lequel a conduit à la réalisation de ce travail, ainsi que pour son soutien à ce projet. Sans lui, je doute que cette thèse ait été réalisée.

Véronique Helfer, Alberto Conelli, Marco Nembrini, Sylvain Dubey, Cécile Erny et Jonas Cosendai, tous d'"anciens diplômants", avec lesquels j'ai eu beaucoup de plaisir et de joie à travailler. Au près de chacun d'eux, j'ai pu apprendre aussi bien les techniques de laboratoire, la mise au point et le développement des microsattellites ainsi que les analyses génétiques. J'espère que, pour eux, la joie de passer quelques mois à travailler ensemble leur a apporté autant qu'à moi. Je veux aussi ici associer les étudiants qui ont réalisé un travail de certificat sur les serpents, soit Isabelle Dunand, Chantal Peverelli, Matia Rossi et Ivan Sasu, lesquels ont eu une grande patience avec, parfois, des résultats mitigés.

Gilles Thierry, Thierry Durand, Philippe Golay, Jean-Claude Monney, Frank Paysant et Marc Kéry pour leur aide sur le terrain. Grâce à eux, le nombre d'échantillons collectés a été grandement augmenté et certaines études n'auraient tout simplement pas été possibles sans eux. De plus, les "virées" dans plusieurs pays européens ont toujours été mémorables, aussi bien sur le terrain que le soir, autour d'une fondue par exemple... La mise à disposition de tissus par de nombreuses autres personnes m'a permis d'effectuer les différentes analyses intégrées dans ce travail et je les en remercie vivement.

Nadège Duvoisin qui m'a beaucoup aidé au laboratoire, aussi bien avec ses magiques pipettes, que pour les problèmes techniques et la lecture des gels. Elle a toujours su trouver un p'tit moment pour m'aider, même si parfois elle aurait voulu en faire encore plus...

Nelly di Marco pour son aide au laboratoire par ses extractions d'ADN en série et sa légendaire bonne humeur.

Toutes les personnes du LBC, de l'IZEA, puis de l'Institut d'Ecologie et finalement les membres du DEE, et tout particulièrement les personnes qui ont occupé le bureau 1114, pour leur bonne humeur, leur soutien au laboratoire, leur aide pour les analyses ainsi que pour les discussions variées et souvent constructives et la bonne ambiance générale.

Les différents Services de la faune et vétérinaires des cantons de Vaud, Neuchâtel, Berne et des Grisons, ainsi que le DIREN de Franche-Comté et les Préfectures des départements du Doubs et du Jura pour l'obtention des autorisations de captures sur leurs territoires respectifs et les prélèvements sanguins.

Mes parents, ainsi que Sonia et Huguette pour leur soutien à tous les niveaux depuis de nombreuses années.

Stéph' pour son soutien et sa grande compréhension. En espérant que, maintenant, mes nuits seront moins studieuses...

Résumé

Les vipères du genre *Vipera* sont des serpents venimeux distribués dans la totalité du Paléarctique. Malgré cette répartition considérable, elles sont extrêmement menacées, leur déclin étant principalement dû à la destruction et à la fragmentation de leur habitat ainsi qu'à la persécution humaine. Afin d'apporter de nouveaux éléments dans le contexte de la protection de ce groupe de reptiles, nous avons utilisé durant ce travail de thèse différents marqueurs moléculaires pour étudier la structuration génétique à petite et à large échelle chez trois espèces appartenant au genre *Vipera*.

La première étude, une phylogéographie moléculaire de la vipère ammodytes (*Vipera ammodytes*), a montré dans l'ensemble de l'aire de répartition une forte structuration génétique provenant d'isolements antérieures au Pléistocène. La présence d'un nombre important de clades dans le centre des Balkans suggère que cette région a fourni de nombreux refuges isolés durant les glaciations. Ces dernières ont également eu un impact considérable sur la diversité génétique au sein de la majorité des clades, suite à d'importants goulets d'étranglement durant le Pléistocène.

L'étude de la phylogéographie de la vipère aspic (*Vipera aspis*) a montré une différenciation génétique entre les populations présentes de chaque côté des Alpes, mais également une forte structuration interne avec la mise en évidence d'un refuge en France. Cette étude est la première à établir clairement l'utilisation d'un refuge français pour un vertébré terrestre.

La troisième partie de cette thèse a étudié la phylogéographie de la vipère péliade (*Vipera berus*), espèce cible de ce travail. En plus de la mise en évidence d'un groupe génétique inattendu (localisé dans le nord de l'Italie, le sud de l'Autriche, le nord de la Slovénie et l'extrême sud-est de la Suisse), la variabilité génétique au sein du groupe nordique (comprenant les animaux de l'entier de l'aire de répartition de l'espèce à l'exception des individus du groupe italien et les animaux provenant des Balkans) est suffisamment importante pour conclure à l'utilisation de refuges glaciaires nordiques durant les dernières glaciations, en complément des refuges habituellement décrits pour la majorité des espèces animales (soit les péninsules ibérique, italienne et balakanique).

Ces résultats nous ont conduit à effectuer une étude morphologique (quatrième partie) comparant les vipères péliades du "clade italien" et du "clade nordique" décrits ci-dessus. Seules de petites différences morphologiques ont pu être mises en évidence, malgré une séparation de ces groupes estimée à plus d'un million d'années.

Une étude à plus petite échelle, centrée sur le Massif jurassien et certaines populations alpines et françaises, a été entreprise afin d'estimer leur diversité génétique et d'évaluer la structuration génétique entre les populations à l'aide de marqueurs microsatellites (cinquième partie). Une importante structuration a été observée entre les populations distantes de plus de 3 kilomètres, la structuration entre les populations plus proches étant plus limitée. De plus, une diversité génétique plus faible dans les populations jurassiennes et alpines comparativement aux populations du massif central et de la côte atlantique a été constatée, probablement due à une perte de diversité génétique lors de la recolonisation post-glaciaire.

La sixième étude s'est intéressée au succès reproducteur des mâles de vipères péliades en conditions naturelles. Une corrélation entre la taille des mâles et leur succès reproducteur a été relevée, les individus de plus grande taille ayant un succès reproducteur plus élevé. Le taux de multipaternité a aussi été investigué, démontrant que la proportion de pontes issues de plusieurs pères est élevée (69%) malgré la faible densité de vipères observée sur le site étudié. Finalement, aucun lien entre le nombre de

pères au sein d'une ponte et la mortalité des jeunes à la naissance n'a pu être mis en évidence, contrastant avec des travaux précédents.

En conclusion, l'observation de la structuration très marquée chez les vipères péliades devrait permettre d'affiner les méthodes de protection de l'espèce dans le massif jurassien. A plus large échelle, l'importante structuration génétique observée chez les vipères ammodytes, aspic et péliade résultant de l'utilisation de nombreux refuges glaciaires, complémentaires aux refuges habituellement utilisés par les espèces animales, démontre l'intérêt de l'analyse phylogéographique des reptiles pour la compréhension des phénomènes de colonisation et d'extinction des populations durant la fin du Tertiaire et le Quaternaire. La mise en évidence chez les différentes espèces de vipères étudiées de nombreux groupes génétiques distincts (ESUs) devrait conduire à des modifications de la taxonomie ainsi qu'au statut de protection de ces espèces.

Abstract

The vipers of the genus *Vipera* are venomous snakes widespread throughout the Palaearctic regions. Despite a large distribution area, several species are extremely threatened, especially due to the destruction and fragmentation of their habitats, as well as by human persecution. In order to increase the knowledge on these species and to improve their protection, several molecular markers have been used to investigate the genetic structure on small and large scales, within three species of the genus *Vipera*.

The first study, a molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*), showed a considerable structuring throughout the distribution area, due to isolation into refugia before the Pleistocene. A high number of clades in the centre of the Balkans suggests that this region harboured numerous isolated glacial refugia during the last glaciation. Moreover, low genetic diversity within several clades implies that most populations of nose-horned vipers have suffered bottlenecks during the Pleistocene.

The study of the phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) showed genetic differentiation between populations on each side of the Alps, as well as considerable internal genetic structure, suggesting the use of a glacial refugium in France. This study is the first to establish firmly the occurrence of a French refugia for a terrestrial vertebrate.

The third part of this work involved a phylogeographic study of the adder (*Vipera berus*), the target species of this thesis. Three clades were revealed: a Balkan clade (corresponding to the subspecies *V. b. sachalinensis*), an unexpected Italian clade (limited to northern Italy, southern Austria, northern Slovenia and southeasternmost corner of Switzerland) and a Northern clade (including adders of the whole distribution area excepted animals from the Balkan and the Italian clades). The genetic variability within the Northern clade is sufficiently high to conclude that a northern glacial refugia during the last glaciation, in addition to those refugia already described for the main species (Iberian, Italian and Balkan peninsula).

These results motivated a morphological study (part four) comparing the adders from the Italian and the Northern clades describe above. Only small morphological differences have been found, despite the split between these two clades have taken place more than 1 million years ago.

A study on a local scale, focused on the Jura Mountains, on a few populations in the Alps and France was, performed to estimate the genetic diversity and the genetic structure between populations using microsatellite markers (part five). Considerable structure was observed between populations separated by more than 3 kilometres, whereas the structure between closer populations is less marked. Moreover, lower genetic diversity in the populations from Jura Mountains and Alps was noticed compared to populations from Massif Central of Atlantic coast. Such loss of genetic variation probably followed post-glacial recolonisation.

The sixth study focused on the reproductive success of male adders in the wild. A positive correlation between body length and reproductive success was observed. Multiple paternity was also observed in most of clutches (69%) despite the low density of adders in the study area. Finally, no relationship was found between the number of fathers in a clutch and the survival of offspring at birth, contradicting previous studies.

To conclude, the observation of a significant genetic structure in *Vipera berus* will enable recommendations to be made to improve protection of this species in the Jura Mountain. On a larger scale, the considerable genetic structure found within *Vipera ammodytes*,

V. aspis and *V. berus*, resulting from isolation in additional glacial refugia to those already described for other species, demonstrates the relevance of phylogeographic studies of reptiles to better understand the colonisation and disappearance during the last Tertiary and the Quaternary. The observation of several groups of evolutionary significant units (ESUs) within the three studied species might lead to a revision of the taxonomy, as well as their conservation status.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Chapitre 1: Introduction générale	13
1.1 L'apport de la génétique pour la conservation des espèces	13
La phylogéographie	14
L'ADN mitochondrial chez les serpents	14
La génétique des populations	15
Apport de la génétique pour la conservation	16
1.2 Le genre <i>Vipera</i> et les espèces étudiées: systématique et biologie	17
La vipère ammodytes (<i>Vipera ammodytes</i>)	18
La vipère aspic (<i>Vipera aspis</i>)	18
La vipère péliade (<i>Vipera berus</i>)	19
1.3 Bibliographie	22
Chapitre 2: Phylogéographie de la vipère ammodytes (<i>Vipera ammodytes</i>, (L, 1758)): évidence de multiples refuges glaciaires dans la péninsule balkanique	28
2.1 Résumé	28
2.2 Abstract	28
2.3 Introduction	29
2.4 Matériel et Méthodes	30
Echantillonnage et extraction de l'ADN	30
Analyses génétiques	31
Analyses phylogénétiques	31
Temps de séparation et horloge moléculaire	32
2.5 Résultats	33
Analyses phylogénétiques	33
2.6 Discussion	35
Horloge moléculaire et reconstruction phylogéographique	35
Reconstruction phylogéographique	35
Implications taxonomiques	36
2.7 Remerciements	38
2.8 Bibliographie	38
Chapitre 3: Phylogéographie de la vipère aspic (<i>Vipera aspis</i>) basée sur l'analyse de l'ADN mitochondrial: indices de refuges multiples autour de la Méditerranée	42
3.1 Résumé	42
3.2 Abstract	42
3.3 Introduction	43
3.4 Matériel et Méthodes	43
3.5 Résultats et Discussion	45
3.6 Remerciements	47
3.7 Bibliographie	47

Chapitre 4: Phylogéographie de la vipère péliade (<i>Vipera berus</i>) basée sur des marqueurs mitochondriaux et détermination des refuges utilisés durant le Pléistocène	50
4.1 Résumé	50
4.2 Abstract	50
4.3 Introduction	51
4.4 Matériel et Méthodes	52
Echantillonnage	52
Analyses génétiques	52
Analyses des séquences	53
Analyses phylogénétiques	53
4.5 Résultats	56
Analyses des données	56
Analyses phylogénétiques	56
4.6 Discussion	59
Comparaison du taux d'évolution de la CR et du cyt. b	59
Reconstructions phylogéographiques des routes de recolonisation et refuges potentiels	59
4.7 Remerciements	62
4.8 Bibliographie	62
Chapitre 5: Y a-t-il des différences morphologiques entre les deux clades génétiques de la vipère péliade (<i>Vipera berus berus</i>)?	68
5.1 Résumé	68
5.2 Abstract	68
5.3 Introduction	68
5.4 Matériel et Méthodes	69
Mesures	69
Analyses statistiques	69
5.5 Résultats	69
Comparaisons entre les clades	69
Analyse discriminante	70
5.6 Discussion	70
5.7 Remerciements	71
5.8 Bibliographie	72
Chapitre 6: Variations génétiques chez les populations résiduelles de vipères péliades (<i>Vipera berus</i>) du Massif jurassien: implications pour la conservation	74
6.1 Résumé	74
6.2 Abstract	74
6.3 Introduction	74
6.4 Matériel et Méthodes	76
Echantillonnage et extraction de l'ADN	76
Développement des microsatellites	76
Amplification des microsatellites	76
Analyses statistiques	77
Estimation de bottleneck (diminution rapide des effectifs d'une population)	78
Taille de la population (N) et de la population efficace (N_e)	78
Différenciation génétique des populations	78
6.5 Résultats	78

Allèles nuls et équilibre de Hardy-Weinberg	78
Analyses microsatellites	79
Taille de la population (N) et de la population efficace (N_e)	79
Différenciation génétique des populations	80
6.6 Discussion	80
Diversité génétique et taille de la population	80
Différenciation entre les populations	83
Comparaison avec d'autres serpents	84
Implication pour la conservation	84
6.7 Remerciements	85
6.8 Bibliographie	85
Chapitre 7: Succès reproducteur et paternité multiple chez la vipère péliade (<i>Vipera berus</i>) en condition naturelle	90
7.1 Résumé	90
7.2 Abstract	90
7.3 Introduction	90
7.4 Matériel et Méthodes	92
Collecte des échantillons dans les populations naturelles	92
Analyses microsatellites et assignement de parenté	92
Taille des mâles	93
Variabilité et similarité génétique entre les couples	93
7.5 Résultats	93
Estimation du taux d'erreur	93
Résultats des analyses de parenté	94
Liens entre le succès reproducteur des mâles, la SVL et la paternité multiple	94
Proximité entre les mères et les pères potentiels	95
Variabilité et similarité génétique entre les couples	96
7.6 Discussion	96
Paternité multiple	96
Influence de la SVL sur la fécondité	97
Taux de survie et paternité multiple	97
Évitement de consanguinité et diversité génétique	97
7.7 Remerciements	98
7.8 Bibliographie	98
Chapitre 8: Conclusion et implications pour la protection des espèces	102
8.1 Phylogéographie des vipères européennes	102
8.2 Structuration génétique des vipères péliades et paternité	103
8.3 Perspectives	106
8.4 Bibliographie	107
Chapitre 9: Annexes	113

INTRODUCTION GENERALE



Chapitre 1: Introduction générale

L'importante extension de la population humaine a induit et induit toujours une pression grandissante sur notre environnement et sur les espèces qui y vivent. Malgré les développements de la technologie, les surfaces utilisées par l'homme n'ont fait que croître durant les derniers millénaires. En conséquence, la majorité des espèces animales ont été repoussées dans des zones refuges plus ou moins importantes. En plus d'exploiter de grande surface, l'Homme a détruit de nombreux habitats, réduisant encore les surfaces utilisables par les espèces sauvages. A cause de ces mécanismes d'exploitation et de destruction, de nombreuses espèces ont disparu, alors qu'un nombre considérable d'entre-elles sont actuellement disséminées en populations isolées. D'autres facteurs humains, comme la pollution ou l'introduction d'espèces exotiques ont aussi conduit à la disparition et à la diminution des effectifs de certaines espèces.

Or, la diminution des effectifs et l'isolation des populations accroît l'impact des divers phénomènes stochastiques; en effet, un événement catastrophique ou la fluctuation des paramètres environnementaux aura une incidence plus dramatique pour des populations isolées que pour des populations interconnectées, lesquelles pourraient recoloniser un site où l'espèce aurait disparu. Les petites populations ont aussi de grands risques de disparition en raison des fluctuations démographiques, l'effet d'Allee étant un exemple marquant de ce phénomène: il se produit lorsque les mâles et les femelles ont des difficultés à se rencontrer pour s'accoupler à cause d'une faible densité ou d'un sex-ratio biaisé. Finalement, les facteurs génétiques peuvent aussi conduire les petites populations à disparaître. En effet, un faible nombre d'animaux induit une dérive génétique et l'apparition d'accouplements entre apparentés (inbreeding) (Frankham *et al.* 2002). Ces deux éléments diminuent la variabilité génétique et, par dépression de consanguinité, réduisent la fitness des individus (Reed & Frankham 2003). Seuls les échanges réguliers entre populations peuvent rétablir un niveau de variabilité suffisant et réduire les accouplements entre apparentés. En conséquence, les petites populations, de surcroît lorsqu'elles sont isolées, ont un risque élevé d'extinction

Afin de contrebalancer cette disparition massive, l'être humain a conçu différentes méthodes pour protéger les milieux et les espèces (lois, conventions internationales, etc...). En complément, différentes approches scientifiques ont été développées afin d'évaluer et d'améliorer l'état actuel des populations, approches regroupées en tant que discipline dénommée "Biologie de la Conservation". Avec ces différentes méthodes et à des échelles variables, les scientifiques cherchent à effectuer un état des lieux, à analyser les problèmes et à suggérer différents plans de gestion. En espérant ainsi améliorer l'état biologique de la Planète...

1.1 L'apport de la génétique pour la conservation des espèces

Après la découverte de l'ADN par Watson & Crick (1953) et les avancées techniques qui suivirent (PCR, séquençage, etc.), il est actuellement possible de déchiffrer et comprendre l'information génétique contenue dans les cellules vivantes, information centralisée au sein de l'ADN. L'historique des espèces animales et la séparation entre deux taxa peuvent aussi être étudiées à partir des différences observées au niveau de l'ADN (Avisé *et al.* 1987). En effet, le phénomène de mutation de l'ADN (à un taux variable suivant le gène étudié) permet d'obtenir une datation des événements de spéciation en utilisant des marqueurs à taux de mutation faible (phylogénie, phylogéographie). Inversément, des marqueurs à taux de mutation élevé peuvent être utilisés pour des études à une échelle locale (génétique des populations, analyse de paternité).

La phylogéographie

Durant le Pléistocène et les périodes précédentes, les variations climatiques ont conduit les espèces animales et végétales à se déplacer, se réfugiant dans les parties tempérées lors des périodes glaciaires; en Europe, les refuges les plus connus sont les péninsules ibérique, italienne et balkanique (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 2000). Durant les périodes inter-glaciaires, les espèces ont pu recoloniser le nord du continent européen (Hewitt 1999). De nombreuses espèces ont disparu durant ces périodes, ne supportant pas ces variations climatiques ou n'ayant pas pu atteindre les zones refuges. D'autre part, la présence de refuges isolés dans les péninsules a induit la séparation des espèces en groupes distincts qui, petit à petit, se sont séparés génétiquement et, parfois, ont abouti à la création de nouveaux taxa (espèces, sous-espèces ou clades génétiques) (Mayr 1963). Ces séparations gardent alors un signe phylogénétique qui peut être analysé, entre autres, par le séquençage de l'ADN mitochondrial. Ainsi, la phylogéographie peut être définie comme l'étude de la distribution géographique des différentes lignées génétiques au sein des espèces (Avice *et al.* 1987). Or, la détermination de ces lignées et leur localisation permettent de mieux appréhender la diversité génétique présente chez une espèce et de comprendre l'historique et les zones-refuges utilisées durant les dernières glaciations.

De plus, la connaissance des différentes lignées génétiques est importante pour la systématique et la conservation des espèces. Les résultats génétiques permettront de déterminer les ESUs (*Evolutionarily Significant Units*, unité évolutivement significative; Moritz 1995), unités à protéger indépendamment. Au niveau systématique, les analyses génétiques permettent de former des groupes homogènes ayant une histoire commune. L'avantage des marqueurs moléculaires neutres est d'éviter l'utilisation de paramètres morphologiques ayant été influencés par l'environnement (voir par exemple Avice *et al.* 1994; Vicario *et al.* 2003; Wiens *et al.* 2003). En conséquence, l'outil moléculaire, en association avec des mesures morphologiques, anatomiques et biogéographiques permet d'obtenir la définition de taxa fiables et utilisables pour la protection des espèces (Frankham *et al.* 2002).

L'ADN mitochondrial chez les serpents

Dans chaque cellule animale, la respiration cellulaire est effectuée par de nombreuses mitochondries, contenant chacune plusieurs copies d'une molécule d'ADN circulaire (environ 17'000 bp chez les serpents). Cette molécule renferme les gènes codant pour 13 protéines essentielles impliquées dans la phosphorylation oxydative, 2 rARN et 22 tARN nécessaires à l'expression de ces gènes (Boore, 1999). Alors qu'au sein d'un genre l'organisation de ces gènes est conservée, elle varie entre les principaux groupes. Chez les vertébrés, seule une partie non-codante a été observée, la région de contrôle (CR), laquelle possède un rôle dans la duplication de l'ADN mitochondrial. Or, deux copies de cette région de contrôle ont été trouvées dans quelques taxa, tels que certains lézards (Moritz & Brown, 1986; Moritz & Brown, 1987) ou les oiseaux du genre *Amazona* (Eberhard *et al.*, 2001). Plus particulièrement, les serpents dits "évolués" possèdent aussi cette duplication, laquelle est probablement intervenue durant les premières phases de divergence des serpents puisqu'elle est conservée au sein des Viperidae, des Colubridae et des Boidae (Kumazawa *et al.*, 1996; voir Figure 1). Les travaux de Kumazawa et collaborateurs (1996, 1998) démontrent que ces deux copies sont identiques et qu'elles doivent évoluer de manière concertée. Ils émettent aussi l'hypothèse d'un mécanisme permettant de maintenir l'uniformité de ces deux copies, tel que la duplication en tandem ou une conversion de gènes. Les travaux de V. Helfer (2001) et d'A. Conelli (2002) ont aussi démontré la présence de deux régions de contrôle pratiquement identiques chez plusieurs espèces de vipères (aucune différence chez V.

être obtenues. Les microsatellites, qui sont les marqueurs les plus utilisés en génétique des populations, permettent d'évaluer la structuration entre les populations animales, de quantifier les migrations entre ces populations, de comprendre l'organisation fine au sein des populations, mais aussi d'estimer les relations génétiques entre individus et de réaliser des analyses de paternité (Schlötterer & Pemberton 1998). Ces marqueurs nucléaires co-dominants sont localisés partout dans le génome et leur rôle est encore débattu (Li *et al.* 2004). Ils sont constitués de répétitions de 2 à 6 paires de base un nombre variable de fois (par exemple AC reproduit n fois). Leur taux de mutation élevé en font des marqueurs de choix (Neff & Gross 2001).

Apport de la génétique pour la conservation

L'évaluation de la diversité génétique et de l'hétérozygotie permet d'obtenir rapidement une mesure de l'état génétique des populations menacées, et de proposer une gestion adéquate. Une population isolée et génétiquement peu différenciée possède de plus grands risques de disparition que des populations génétiquement plus variées. L'exemple de la vipère péliade étudiée par Madsen et collaborateurs (Madsen *et al.* 1996; Madsen *et al.* 1999; Madsen *et al.* 2004) montre qu'une population isolée, ne possédant aucune variabilité génétique au niveau du MHC (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et qui déclinait de manière régulière depuis une dizaine d'années a été rétablie par l'introduction de mâles provenant d'une population génétiquement plus diversifiée. Cet exemple démontre à quel point la richesse génétique peut être un paramètre primordial pour la survie d'une population. Il est donc important de connaître la diversité génétique des populations afin de s'assurer que leur éventuelle diminution n'est pas la résultante d'une faible diversité, auquel cas il serait possible de restaurer la population par l'introduction de nouveaux animaux génétiquement variés et différents (voir Madsen *et al.* 1999; Madsen *et al.* 2004). Une réintroduction accroît directement la variabilité génétique et augmente l'hétérozygotie. Il en résulte un plus grand potentiel évolutif, permettant une meilleure adaptation aux variations environnementales, et une augmentation de la fitness des individus composant la population.

Les outils génétiques permettent aussi d'évaluer les liens entre des populations et d'estimer si un nombre de migrants entre les populations est suffisant pour éviter une dérive génétique. L'évaluation directe des migrants par capture-marquage-recapture est un travail considérable qu'il est souvent impossible de réaliser dans les populations naturelles. Par l'utilisation d'outils moléculaires, un indice de dispersion et de contact entre les populations peut être évalué. Par ces moyens, il est donc possible d'établir si les populations sont encore interconnectées et échangent régulièrement des animaux, ou si le passage est peu fréquent ou nul. En conséquence, la remise en contact de populations isolées par la création de corridors permet d'éviter un isolement des animaux et la consanguinité qui en découle.

Le comportement reproducteur peut aussi être étudié à partir des outils moléculaires. En complément des observations de terrain, comme les observations directes d'accouplement, il est possible d'évaluer le nombre de mâles accédant réellement à la reproduction. Au niveau de la consanguinité, il est évident qu'une population présentant un nombre limité de pères va réduire la diversité génétique transmise à la génération suivante. Le comportement reproducteur a donc un impact direct sur la taille efficace de la population (N_e).

1.2 Le genre *Vipera* et les espèces étudiées: systématique et biologie

Le genre *Vipera* fait partie de la famille des Vipéridés, laquelle est subdivisée en deux sous-familles: les vipères "vraies" (Viperinae) présentes en Eurasie et en Afrique, et les Crotalinae regroupant des serpents américains et asiatiques, possédant tous une paire de fossettes nasales thermosensibles. Le genre *Vipera sensu lato* comprend plusieurs groupes ou sous-genres (*Vipera*, *Acridophaga*, *Rhinaspis*, *Montivipera* et *Daboia*), dont les deux derniers sont considérés comme genres valides par certains auteurs (Ashe & Marx 1988; Nilson *et al.* 1999; Lenk *et al.* 2001; Mallow *et al.* 2003). Le genre *Vipera sensu stricto* (*Vipera*, *Acridophaga* et *Rhinaspis*) comporte principalement des espèces eurasiatiques, avec la présence de deux taxa en Afrique (*V. latastei gaditana* et *V. monticola*). La découverte de plusieurs taxa durant les trois dernières décennies (*V. barani*, *V. darevskii*, *V. lotievi*, *V. nikolskii*, *V. pontica*, *V. ammodytes georgwallneri*, *V. latastei gaditana*, *V. seoanei cantabrica*, *V. ursinii graeca*, *V. u. moldavica*; Sochurek 1974; Saint Girons 1977; Böhme & Joger 1983; Braña & Bas 1983; Vedmederya *et al.* 1986; Nilson & Andren 1988; Billing *et al.* 1990; Nilson *et al.* 1993; Nilson *et al.* 1995), ainsi que la redéfinition d'espèces qui semblaient bien connues (*V. aspis*; Zuffi 2002) ou la considérable diversité au sein du groupe des *Vipera ursinii* (voir Nilson & Andren 2001) suggèrent que ce genre ne possède pas encore une systématique clairement établie.

Au niveau génétique, peu de travaux sur le genre *Vipera* sont disponibles: Lenk *et al.* (2001) a réalisé une étude sur la sous-famille des Viperinae, montrant que le genre *Vipera s. s.* était monophylétique; des travaux très récents de Garrigues *et al.* (2005) confirment ces résultats. Ils démontrent également, à l'aide du séquençage du cytochrome b, la séparation de *Vipera s. s.* en 3 groupes génétiquement bien différenciés: (i) *V. ammodytes*, (ii) *V. aspis* et *V. latastei* et (iii) les vipères du groupe *Pelias*. Les résultats obtenus par les méthodes de séquençage de l'ADN mitochondrial sont en contradiction avec la plupart des travaux précédents basés sur les distances immunologiques (Herrmann *et al.* 1987; Herrmann *et al.* 1992; Herrmann & Joger 1997). Ces résultats, ainsi que d'autres travaux en cours (Joger *et al.* 2003) vont probablement modifier la systématique du genre *Vipera s. s.* Néanmoins, aucune investigation génétique au sein des espèces n'a été effectuée, alors que la variabilité morphologique des *Vipera* est parfois considérable (par exemple Zuffi 1999).

Au niveau biogéographique, l'observation des fossiles montre que le groupe des "*V. aspis*" (dont découlent les actuelles *V. aspis*, *V. ammodytes* et *V. latastei*) est arrivé en Europe au début du Miocène (23.5-22 millions d'années, Myr; Ivanov *et al.* 2000). Au cours du Miocène moyen (16-11 Myr), peu de fossiles de ce groupe ont été retrouvés, laissant présager que le groupe "*V. aspis*" a fortement régressé au profit des vipères orientales (actuelles *Macrovipera*), des Elapidae et des Colubridae "évolués" (Szyndlar & Rage 1999; Ivanov *et al.* 2000). Les fossiles du groupe "*V. aspis*" sont à nouveau fréquents au Miocène supérieur (11-5.3 Myr) avant de décliner, cette fois au profit d'animaux du groupe "*berus*" arrivés en Europe centrale durant le Pliocène inférieur (5.3-3.4 Myr) et en Europe occidentale au début du Quaternaire (Szyndlar & Rage 1999; Ivanov *et al.* 2000). Avec des observations comportementales sur la répartition actuelle des espèces, (Saint Girons 1980a) suggère que les taxa *V. aspis* – *V. latastei* – *V. ammodytes* auraient trouvé refuge dans les péninsules européennes (*V. latastei* en Espagne, *V. aspis* en Italie et *V. ammodytes* dans les Balkans) durant le Quaternaire alors que le sous-genre *Pelias* serait plutôt revenu de Sibérie suite aux glaciations.

Dans cette étude, je me suis efforcé d'examiner la structuration génétique chez les espèces européennes ayant les aires de répartition les plus importantes et ayant une position systématique bien définie, soit *V. ammodytes*, *V. aspis* et *V. berus*. Selon les

hypothèses de Saint Girons (1980a), ces espèces devraient avoir occupé aussi bien les péninsules italiennes (*V. aspis*), balkanique (*V. ammodytes*) que des refuges à l'est de l'Europe et en Sibérie (*V. berus*). Combinées, ces études devraient permettre de comprendre plus finement l'organisation historique des espèces de vipères en Europe et leurs interactions.

La vipère ammodytes (*Vipera ammodytes*)

La vipère ammodytes (*Vipera ammodytes*) possède une aire de répartition méridionale, du centre de l'Europe à l'extrême ouest de l'Asie. Elle est présente à l'est de l'Italie, dans les Balkans, en Grèce continentale et sur plusieurs de ses îles, ainsi qu'en Turquie et dans le Caucase. Plusieurs sous-espèces sont décrites, mais certaines ont une validité discutable (voir Chap. 2).

De par sa grande répartition, cette espèce possède une biologie et une morphologie variables. Plusieurs types de dessins dorsaux et de colorations sont observables, certaines conduisant à la description de sous-espèces. Le fort développement des écailles apicales formant une "corne" sur le nez a également été utilisé pour la systématique de cette espèce.

Des zones de contact entre cette espèce et la vipère péliade sont observées entre autres en Roumanie où l'hybridation de ces deux espèces est présente mais rare (I. Ghira, pers. comm.). D'autres observations d'hybridation ont été observées (Mertens 1956; Mertens 1964). Comme pour *V. aspis* (voir ci-dessous), la vipère ammodytes et la vipère péliade sont principalement parapatriques, la première occupant les milieux les plus chauds alors que la seconde survit dans les sites plus froids et plus humides.

Finalement, la grande richesse spécifique chez les amphibiens (Crnobrnja-Isailovic *et al.* 1997; Arntzen & Wallis 1999) et les reptiles (Gasc *et al.* 1997) dans les Balkans suggère qu'un historique particulièrement complexe aurait induit une forte spéciation. Néanmoins, cette zone n'a pas encore été étudiée au niveau phylogéographique et les Balkans sont souvent considérés comme un seul refuge, sans considérer une structuration interne de ce refuge. Ainsi, le Chapitre 2 sera axé sur la recherche des différents groupes biogéographiques de la vipère ammodytes, avec une discussion sur la diversité génétique observée dans les Balkans et des suggestions au niveau de la taxonomie.

La vipère aspic (*Vipera aspis*)

La vipère aspic est présente dans le sud de l'Europe, entre l'Espagne et l'extrême nord-ouest de la Slovénie. Elle est limitée dans sa répartition par la *V. latastei* en Espagne, alors que sa limite nordique est liée aux conditions climatiques (Saint Girons 1975). En effet, cette espèce requiert une température suffisante pour terminer son cycle de reproduction avant d'entrer en hibernation. L'aspic est observée en sympatrie avec la péliade au nord de son aire de répartition ou dans les Alpes, ces deux espèces étant en compétition directe, la vipère aspic limitant l'aire de répartition de *V. berus* (Saint Girons 1975; Monney 1996).

La systématique de cette espèce est sujette à discussion. Suite à une étude morphologique (Zuffi & Bonnet 1999), Zuffi (2002) propose d'élever *V. a. aspis*, *V. a. atra*, *V. a. zinnikeri* et *V. a. hugyi* au niveau spécifique et de placer *V. a. francisciredi* en synonymie de *V. a. aspis*. Néanmoins, ces propositions sont controversées (voir Filippi 2003; Zuffi 2003). Or, récemment, Golay (2005) a démontré que *V. aspis* n'était qu'un écotype alpin de *V. a. aspis*, alors que *V. a. francisciredi* était un taxon valide. Ainsi, l'analyse génétique de cette espèce permettra de définir les unités phylogéographiques, ainsi que les zones utilisées par cette espèce durant les dernières

glaciations. Les travaux très récents de Garrigues *et al.* (2005), basés sur l'analyse de l'ADN mitochondrial, suggèrent que cette espèce comprend deux groupes génétiques, l'un français (*V. a. aspis*, *V. a. atra* et *V. a. zinnikeri*) et l'autre italien (*V. a. francisciredi* et *V. a. hugyi*). De plus, ils observent que les vipères du sud des Alpes françaises (qui ont un venin neurotoxique; De Haro *et al.* 2002) sont séparées de *V. a. aspis* et que *V. a. atra* est différent des *V. a. aspis* (ce qui contredit les travaux morphologiques de Golay 2005). Néanmoins, les résultats de leur étude sont contestables car leur échantillonnage limité (10 animaux) n'intègre par l'entier de l'aire de répartition de l'espèce. Ainsi, le Chapitre 3 investiguera la phylogéographie de la vipère aspic sur l'entier de l'aire de répartition afin de confirmer ou d'infirmer les travaux de Garrigues.

La vipère péliade (*Vipera berus*)

Systématique et biogéographie

La vipère péliade est le serpent terrestre ayant la plus grande aire de répartition (Saint Girons 1980a). Elle occupe toute la partie nordique de l'Eurasie, de la Grande-Bretagne à la côte Pacifique de la Russie (Ile Sakhaline) et des Balkans jusqu'au cercle polaire en Scandinavie (Gasc *et al.* 1997). Malgré sa large distribution, les différences morphologiques sont faibles et seulement 3 sous-espèces ont été décrites: *V. b. bosniensis* (Boettger 1880) qui occupe toute la péninsule Balkanique, *V. b. sachalinensis* (Zarevsky 1917) présente sur l'Ile Sakhaline et le long de la côte russe du Pacifique et l'espèce nominale qui occupe le reste de l'aire de répartition. Ces taxa sont basés sur des différences morphologiques (écaillures céphaliques, nombre d'écaillures ventrales ainsi que sur les dessins dorsaux, voir Saint Girons 1978; Nilson *et al.* 1994). Néanmoins, des analyses d'une partie du cytochrome b (309 bp) démontrent que seulement 2 lignées génétiques sont observées, *V. b. sachalinensis* étant peu différenciée de *V. b. berus* (Joger *et al.* 1997).

Récemment, certaines espèces présentant d'importantes similitudes avec *V. berus*, ont été décrites (*V. nikolskii*, *V. barani* et *V. pontica*). La distribution de *V. nikolskii* est encore discutée, certaines personnes suggérant que les *V. nikolskii* mélaniques ne sont que des variétés de *V. berus*, alors que les "vraies" *nikolskii* possèdent une coloration proche de *V. berus* et sont localisées plus au sud (Milton & Zinenko 2003). La position taxonomique de *V. pontica* est aussi sujette à caution, certains auteurs estimant que cette espèce n'est qu'une variété de *V. barani* (Baran *et al.* 2001). Néanmoins, il semble que ces espèces soient au mieux des sous-espèces de *V. b. berus* puisque *V. barani* est proche génétiquement de *V. b. bosniensis* et que *V. b. nikolskii* est quasiment identique à *V. b. berus* (Joger *et al.* 1997). L'utilisation d'une partie limitée du cytochrome b rend ces travaux contestables, mais les travaux récents de Joger *et al.* (2003) tendent à confirmer ces résultats.

Afin de confirmer ou d'infirmer la présence de groupes génétiquement distincts chez la péliade, la phylogéographie de l'espèce sera étudiée par l'analyse de deux gènes mitochondriaux et sur l'entier de l'aire de répartition (Chap. 4). Cette approche permettra d'observer les zones de refuges utilisées par *V. berus* durant les glaciations et de comparer la variabilité génétique à l'importante homogénéité morphologique. La péliade vit actuellement dans des milieux extrêmes, elle est donc un excellent candidat pour la mise en évidence de refuges glaciaires localisés dans le nord de l'Europe, leur présence étant discutée (voir par exemple Bilton *et al.* 1998; Stewart & Lister 2001).

En complément, des mesures morphologiques spécialement orientées sur les clades observés dans le Chapitre 4 seront effectuées dans le Chapitre 5. En effet, plusieurs études morphologiques n'ont pas pu mettre en évidence de grandes différences au sein

de *V. b. berus* à l'exception de quelques légères variations clinales du nombre d'écailles céphaliques et de plaques ventrales (voir Saint Girons 1978). Pourtant, il apparaît que, localement (Autriche méridionale), certains animaux appartenant à *V. b. berus* ont une écaillure comparable à *V. b. bosniensis* alors que le dessin dorsal est conforme à la sous-espèce nominale (Saint Girons 1978).

Populations jurassiennes et structuration génétique chez les serpents

Malgré son importante aire de répartition, la péliade est menacée de disparition dans l'ouest de l'Europe (Castanet & Guyétant 1989; Völkl & Thiesmeier 2002). Elle a été incorporée sur la liste des espèces protégées de nombreux pays (France, Allemagne, Suède, Suisse, Slovénie, ...). En Suisse, elle est considérée comme "espèce menacée" à "espèce très menacée" (Grossenbacher & Hofer 1994), le degré de menace variant selon les régions. Aux Grisons et dans les Alpes, elle est encore présente en grande densité lorsque les milieux sont intacts. Dans les Préalpes, elle occupe uniquement des habitats isolés mais en grande densité. Dans cette région, elle est en concurrence directe avec la vipère aspic (Monney 1996), qui est actuellement en période d'expansion (Ferrière 1986; J.-C. Monney, comm. pers.). Finalement, la péliade est très menacée dans le Massif jurassien suisse, puisqu'elle est présente uniquement dans 5 populations comprenant entre 20 et 100 adultes environ (Ursenbacher & Monney, obs. pers.). De plus, quelques animaux ont été observés aléatoirement proche de ces populations (distance inférieure à 6 Km). Dans le Massif jurassien français, le nombre de populations est évalué à 46 selon Pinston *et al.* (2000), mais plusieurs ne possèdent que quelques animaux observés régulièrement. Une seule zone semble encore renfermer une densité de populations importante, le complexe humide du bassin du Dugeon (Haut Doubs, France; Pinston *et al.* 2000) y recense 19 populations, alors que l'échange d'individus semble possible avec 5 populations supplémentaires. Ils estiment par contre que les autres populations ne sont pas véritablement interconnectées.

La connaissance de la structuration des populations de péliades est donc nécessaire pour leur protection dans le Massif jurassien. En effet, des déplacements saisonniers de plus d'un kilomètre (jusqu'à 1300 m en une année) ont été observés chez cette espèce en Scandinavie (Viitanen 1967) et jusqu'à 1900 m en Angleterre (Prestit 1971); des déplacements à grandes distances restent rares et les animaux retournent généralement au même site d'hivernage. Des déplacements plus faibles sont observés en Suisse, avec une distance maximale de 500 m environ (Neumeyer 1987; Moser 1988; Monney 1996). Or, ces déplacements se produisent, pour les mâles, lors de la recherche des femelles réceptives en avril-mai et pour les femelles gestantes, lors de la recherche du meilleur site de gestation. Au sein de certaines populations, des déplacements entre les sites d'accouplements, de nourrissage et d'hibernation ont été constatés (Moser 1988; Monney 1996). Toutefois, *V. berus* est considérée comme une espèce plutôt philopatricienne (Madsen & Shine 1992b; Luiselli 1993b). Par contre, peu de données sur la dispersion des jeunes sont disponibles. Seul Saint Girons (1981), par une approche expérimentale, a cherché à évaluer ces déplacements. Il suggère que deux stratégies de dispersion sont présentes chez les nouveau-nés: sa première hypothèse impliquait des mouvements circulatoires, alors que la seconde supposait que la durée et l'intensité de la phase de dispersion varient beaucoup d'un individu à l'autre, les deux postulats n'étant pas exclusifs. Mais ces observations ont été effectuées sur un nombre très faible de juvéniles, puisque seulement 4 des 80 vipéreaux de *V. aspis* et *V. berus* relâchés ont été recapturés l'été suivant leur naissance. Ainsi, les phénomènes de dispersion peuvent se produire durant la phase juvénile, période où peu d'animaux sont observés. Puisque la dispersion juvénile ne peut pas être évaluée directement, les données génétiques devraient permettre d'évaluer si elle suffit aux populations pour rester interconnectées.

Malheureusement, le nombre d'études de la structuration génétique chez les serpents est faible. Par exemple, chez *Vipera aspis*, la séparation entre les populations du Massif jurassien semble peu marquée (Jaggi *et al.* 2000); néanmoins, l'utilisation de RAPD ne semble pas offrir une définition suffisante pour mesurer la structuration génétique à petite échelle. Pour *Sistrurus catenatus* (Crotalinae, Viperidae), espèce de la même famille que la péliade et possédant une biologie assez similaire, la structuration est marquée même à de faibles distances (marqueurs microsatellites, $F_{ST} = 0.040$, $p < 0.001$ pour 2 populations distantes de 1.5 Km), alors que la différenciation entre populations éloignées de moins de 50 Km est importante (F_{ST} varie entre 0.085 et 0.261; Gibbs *et al.* 1997). De plus, la structuration interne des populations est considérable (F_{IS} compris entre 0.118 et 0.353, toutes les valeurs étant significatives). Chez *Crotalus horridus*, les animaux hibernant dans le même site sont génétiquement liés, alors que la différenciation génétique (F_{ST}) entre les sites d'hibernation distants de quelques centaines de mètres est significative dans 50% des comparaisons (Villarreal *et al.* 1996). A l'inverse, la structuration génétique chez les couleuvres semble très faible. Pour *Elaphe obsoleta*, les F_{ST} observées entre des populations distantes de 0.5 à 6 Km varient entre 0.00 et 0.027, alors que les F_{IS} ne sont pas différents de zéro (Gibbs & Weatherhead 2001); les résultats obtenus avec des marqueurs microsatellites confirment les observations établies à partir de RAPD (Lougheed *et al.* 1999). Chez les couleuvres aquatiques *Nerodia sipedon sipedon*, 3 populations distantes de 1 à 1.5 Km sont significativement différentes, mais la différenciation est faible ($F_{ST} = 0.006$; Prosser *et al.* 1999). Ainsi, il est probable que les Viperidae, espèces en général peu mobiles, montrent des structurations importantes, alors que les Colubridae, qui sont en général plus mobiles (car chassant de manière active et parcourant ainsi de grandes surfaces) possèdent une structuration génétique plus faible.

Dans le Chapitre 6, la structuration entre dix populations du Massif jurassien sera étudiée à l'aide de marqueurs moléculaires; en complément, 6 populations réparties dans les Préalpes, le Massif central et la côte Atlantique seront également analysées afin de comparer la diversité génétique entre les différentes régions. Le niveau d'isolement géographique, la taille et la menace des populations étant très variées, il sera possible d'évaluer si ces éléments sont liés aux paramètres génétiques. En complément, ces résultats permettront d'élaborer des principes pour la protection de la péliade, voire d'autres serpents européens. Finalement, la comparaison entre les résultats obtenus chez la vipère aspic par Jaggi *et al.* (2000) et chez la vipère péliade permettra de mieux comprendre la dynamique des deux espèces, la première étant en cours de colonisation des habitats de la seconde.

Reproduction

La vipère péliade est certainement le serpent dont la reproduction est la plus étudiée. En effet, de nombreuses études ont déjà été effectuées, le plus souvent basées sur l'observation du comportement des mâles et des femelles dans la nature et sur la paternité en milieux confinés (voir Höggren & Tegelstrom 2002, pour un compte-rendu). Chez cette espèce, les mâles sortent d'hibernation entre 20 et 40 jours avant les femelles afin de finir la maturation des spermatozoïdes (Viitanen 1967; Prestt 1971; Saint Girons 1975; Monney 1994). Ensuite, les mâles muent avant de s'accoupler avec les femelles (Saint Girons 1980b; Monney 1994). Puisque les femelles ne s'accouplent que tous les 2-3 ans (voire plus) (Saint Girons & Kramer 1963; Viitanen 1967; Prestt 1971; Capula & Luiselli 1994b; Monney 1994), le sex-ratio des animaux sexuellement actifs est fortement biaisé en faveur des mâles (Madsen & Shine 1993). Ce biais conduit les mâles à se battre pour accéder aux femelles réceptives. Ordinairement, les mâles les plus lourds gagnent ces combats (Madsen 1988; Madsen & Shine 1992a; Luiselli 1993b) et il

en a été conclu que les plus gros avaient un succès reproducteur plus élevé. Néanmoins, les accouplements des femelles avec de petits mâles peuvent survenir lorsque les mâles dominants sont occupés à défendre l'accès aux femelles. Ainsi, les femelles s'accouplent souvent plusieurs fois, soit avec le même mâle, soit avec des mâles différents (Andren & Nilson 1987; Madsen *et al.* 1992; Luiselli 1993a). En captivité et grâce à différentes approches moléculaires, la multipaternité a été confirmée (Stille *et al.* 1986; Höggren & Tegelstrom 1995; Höggren & Tegelstrom 2002), mettant en doute l'hypothèse de Nilson & Andren (1982) suggérant la présence d'un bouchon copulatoire qui éviterait les paternités multiples. Cependant, ce bouchon a peut-être une fonction limitatrice (et non exclusive) des échanges de sperme puisque le premier accouplement semble féconder un maximum d'ovules (Höggren & Tegelstrom 2002). De plus, dans certaines populations, les accouplements multiples diminuent le taux d'œufs non fécondés et le nombre de nouveau-nés mort-nés (Madsen *et al.* 1992). Néanmoins cette hypothèse est sujette à discussion (Capula & Luiselli 1994a).

Ce travail (Chap. 7) sera donc la première analyse de paternité dans des populations sauvages afin de confirmer la présence de multipaternité en conditions naturelles. L'assignement de la paternité permettra d'obtenir la fécondité des mâles et de corrélérer la taille des mâles et leur fécondité, donc d'atteindre les paramètres de fécondité des mâles sans modifier leur comportement par une maintenance dans un endroit confiné.

1.3 Bibliographie

- Andren C, Nilson G (1987) The copulatory plug of the adder, *Vipera berus* - does it keep sperm in or out. *Oikos* **49**, 230-232.
- Arntzen JW, Wallis GP (1999) Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*): morphological and mitochondrial DNA data. *Contributions to Zoology* **68**, 181-203.
- Ashe J, Marx H (1988) Phylogeny of viperine snake (Viperinae): Part II. Cladistic analysis and major lineages. *Field Zool.* **52**, 1-23.
- Avise JC, Arnold J, Ball RMJ, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Avise JC, Nelson WS, Sibley CG (1994) DNA-sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New-World vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5173-5177.
- Baran I, Joger U, Kutrup P, Turkozan O (2001) On new specimens of *Vipera barani* Bohme & Joger, 1983 from northeastern Anatolia, and implications for the validity of *Vipera pontica* Billing, Nilson & Sattler, 1990 (Reptilia, Viperidae). *Zoology in the Middle East* **23**, 47-53.
- Billing H, Nilson G, Sattler U (1990) *Vipera pontica* sp. n, a new viper species in the kaznakovi group (Reptilia, Viperidae) from Northeastern Turkey and adjacent Transcaucasia. *Zoologica Scripta* **19**, 227-231.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, Searle JB (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1219-1226.
- Boettger O (1880) Die Reptilien und Amphibien von Syrien, Palästina und Cypern. *Ber. senckenb. naturf. Ges. Frankfurt* **1879/1880**, 132-219.
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* **27**, 1767-1780.
- Böhme W, Joger U (1983) Eine neue Art des *Vipera berus*-Komplexes aus der Türkei. *Amphibia-Reptilia* **4**, 265-271.
- Braña F, Bas S (1983) *Vipera seoanei cantabrica* ssp. n. *Munibe* **35**, 87-88.
- Capula M, Luiselli L (1994a) Can female adders multiply. *Nature* **369**, 528.
- Capula M, Luiselli L (1994b) Reproductive strategies in alpine adders, *Vipera berus*. The black females bear more often. *Acta Oecologica* **15**, 207-214.
- Castanet J, Guyétant R (1989) *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France* Société Herpétologique de France, Paris.

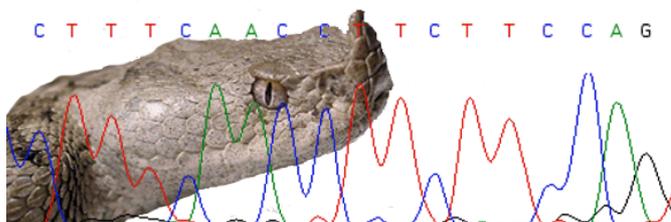
- Conelli A (2002) *Phylogéographie mitochondriale de la vipère aspic, Vipera aspis (Viperidae) et organisation de l'ADN mitochondrial chez trois espèces de vipères européennes (V. aspis, V. ammodytes et V. ursinii)* Travail de diplôme, non publié, Université de Lausanne.
- Crnobrnja-Isailovic J, Djukic G, Krstic N, Kalezic ML (1997) Evolutionary and palaeogeographical effect on the distribution of the *Triturus cristatus* superspecies in the central Balkans. *Amphibia-Reptilia* **18**, 321-332.
- De Haro L, Robbe-Vincent A, Saliou B, Valli M, Bon C, Choumet V (2002) Unusual neurotoxic envenomations by *Vipera aspis aspis* snakes in France. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 137-145.
- Eberhard JR, Wright TF, Bermingham E (2001) Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 1330-1342.
- Ferrière R (1986) *Vipera berus berus* L. dans les Alpes-Maritimes et l'extrême sud-est des Alpes-de-Haute-Provence: un problème de biogéographie. 2ème partie: situation actuelle - interprétation. *Biocosme mésogéen* **3**, 121-182.
- Filippi E (2003) On the proposed elevation of *Vipera aspis* subspecies to full species rank: A cautionary note. *Amphibia-Reptilia* **24**, 235-238.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Garrigues T, Dauga C, Ferquel E, Choumet V, Failloux A-B (2005) Molecular phylogeny of *Vipera Laurenti*, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Gasc J-P, Cabela A, Crnobrnja-Isailovic J, Dolmen D, Grossenbacher K, Haffner P, Lescure J, Martens H, Martínez Rica JP, Maurin H, Oliveira ME, Sofianidou TS, Veith M, Zuiderwijk K (1997) *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe* Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ, Johnson G (1997) Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **6**, 1123-1132.
- Gibbs HL, Weatherhead PJ (2001) Insights into population ecology and sexual selection in snakes through the application of DNA-based genetic markers. *Journal of Heredity* **92**, 173-179.
- Golay P (2005) *Systématique du complexe Vipera aspis (Serpentes, Viperidae) en Suisse*, Université de Montpellier.
- Grossenbacher K, Hofer H (1994) Liste rouge des reptiles menacés de Suisse. In: *Liste rouge des espèces animales menacées de Suisse* (ed. Duelli P), p. 97. OFEFP, Bern.
- Helfer V (2001) *Organisation de l'ADN mitochondrial chez la vipère péliade (Serpentes: Viperidae: Vipera berus) et implications phylogéographiques de la variabilité de la région de contrôle* Travail de diplôme, non publié, Université de Lausanne.
- Herrmann HW, Joger U (1997) Evolution of viperine snakes. In: *Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite* (eds. Thorpe RS, Wüster W, Malhorta A), pp. 43-61. Oxford University Press, Oxford.
- Herrmann HW, Joger U, Nilson G (1992) Molecular phylogeny and systematics of viperine snakes I: General phylogeny of European vipers (*Vipera sensu stricto*). In: *Proceedings of the Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica* (eds. Korsós Z, Kiss I), pp. 219-224, Budapest, Hungary.
- Herrmann HW, Joger U, Nilson G, Sibley CG (1987) First steps towards a biochemically based reconstruction of the phylogeny of the genus *Vipera*. In: *Proceedings of the Fourth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica* (eds. Van Gelder JJ, Strijbosch H, Bergers PJM), pp. 195-200, Nijmegen, Holland.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Höggren M, Tegelstrom H (1995) DNA-fingerprinting shows within-season multiple paternity in the adder (*Vipera berus*). *Copeia*, 271-277.
- Höggren M, Tegelstrom H (2002) Genetic evidence for first-male mating advantage in the adder (*Vipera berus*). In: *Biology of the Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Ivanov M, Rage J-C, Szyndlar Z, Venczel M (2000) Historique et origine géographique des faunes de serpents en Europe. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **96**, 15-24.

- Jaggi C, Wirth T, Baur B (2000) Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. *Biological Conservation* **94**, 69-77.
- Joger U, Kalyabina S, Schweiger S, Mayer W, Orlov NL, Wink M (2003) Phylogeny of the Eurasian *Vipera* (Subgenus *Pelias*). In: *12th Ordinary General Meeting. Programme and abstracts, 12-16 August 2003* (ed. Herpetologica SE). Societas Europaea Herpetologica, St-Petersburg, Russia.
- Joger U, Lenk P, Baran I, Böhme W, Ziegler T, Heidrich P, Wink M (1997) The phylogenetic position of *Vipera barani* and of *V. nikolskii* within the *Vipera berus* complex. In: *Herpetologia Bonnensis* (eds. Böhme W, Bischoff W, Ziegler T), pp. 185-194. Zoologisches Forschungsinstitut und Museum A. Koenig, Bonn.
- Lenk P, Kalyabina S, Wink M, Joger U (2001) Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia : Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 94-104.
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 991-1107.
- Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ (1999) Hierarchical patterns of genetic population structure in black rat snakes (*Elaphe obsoleta obsoleta*) as revealed by microsatellite DNA analysis. *Evolution* **53**, 1995-2001.
- Luiselli L (1993a) Are sperm storage and within season multiple mating important components of the adder reproductive biology. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **14**, 705-710.
- Luiselli L (1993b) High philopatry can produce strong sexual competition in male adders, *Vipera berus*. *Amphibia-Reptilia* **14**, 310-311.
- Madsen T (1988) Reproductive success, mortality and sexual size dimorphism in the adder, *Vipera berus*. *Holarctic Ecology* **11**, 77-80.
- Madsen T, Shine R (1992a) A rapid, sexually selected shift in mean body size in a population of snakes. *Evolution* **46**, 1220-1224.
- Madsen T, Shine R (1992b) Sexual competition among brothers may influence offspring sex ratio in snake. *Evolution* **46**, 1549-1552.
- Madsen T, Shine R (1993) Temporal variability in sexual selection acting on reproductive tactics and body size in male snakes. *American Naturalist* **141**, 167-171.
- Madsen T, Shine R, Loman J, Hakansson T (1992) Why do female adders copulate so frequently. *Nature* **355**, 440-441.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999) Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**, 34-35.
- Madsen T, Stille B, Shine R (1996) Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**, 113-118.
- Madsen T, Ujvari B, Olsson M (2004) Novel genes continue to enhance population growth in adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation* **120**, 145-147.
- Mallow D, Ludwig D, Nilson G (2003) *True Vipers: natural history and toxinology of Old World vipers* Krieger Publishing Company, Malabar, Florida.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution* Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mertens R (1956) Über Reptilienbastarde, II. *Senck. biol.* **37**, 383-394.
- Mertens R (1964) Über Reptilienbastarde, III. *Senck. biol.* **45**, 33-49.
- Milto KD, Zinenko OL (2003) Distribution and morphological peculiarities of adders of the *Vipera berus* complex in Eastern Europe. In: *12th Ordinary General Meeting. Programme and abstracts, 12-16 August 2003* (ed. Herpetologica SE). Societas Europaea Herpetologica, St-Petersburg, Russia.
- Monney J-C (1996) *Biologie comparée de Vipera aspis L. et de Vipera berus L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes bernoises* unpublished thesis, University of Neuchâtel, Switzerland.
- Monney JC (1994) Comparaison des cycles annuels d'activité de *Vipera aspis* et *Vipera berus* (Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes bernoises (ouest de la Suisse). *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **71-72**, 49-61.
- Moritz C (1995) Uses of Molecular Phylogenies for Conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **349**, 113-118.
- Moritz C, Brown WM (1986) Tandem duplication of d-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA. *Science* **233**, 1425-1427.

- Moritz C, Brown WM (1987) Tandem duplications in animal mitochondrial DNA: variation in incidence and gene content among lizards. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7183-7187.
- Moser A (1988) *Untersuchung einer Population der Kreuzotter (Vipera berus L.) mit Hilfe der Radiotelemetrie*, Universität Basel.
- Neff BD, Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* **55**, 1717-1733.
- Neumeyer R (1987) Density and seasonal movements of the adder (*Vipera berus* L.) on a subalpine environment. *Amphibia-Reptilia* **2**.
- Nilson G, Andren C (1982) Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. *Hormones and Behavior* **16**, 404-413.
- Nilson G, Andren C (1988) A new subspecies of the subalpine Meadow Viper, *Vipera ursinii* (Bonaparte) (Reptilia, Viperidae), from Greece. *Zoologica Scripta* **17**, 311-314.
- Nilson G, Andrén C (2001) The meadow and steppe vipers of Europe and Asia - the *Vipera (Acridophaga) ursinii* complex. *Acta Zoologica, Academiae Scientiarum Hungaricae* **47**, 87-267.
- Nilson G, Andrén C, Joger U (1993) A re-evaluation of the taxonomic status of the Moldavian steppe viper based on immunological investigations, with a discussion of the hypothesis of secondary intergradation between *Vipera ursinii rakosiensis* and *Vipera (ursinii) renardi*. *Amphibia-Reptilia* **14**, 45-57.
- Nilson G, Andrén C, Szyndlar Z (1994) The systematic position of the common adder, *Vipera berus* (L.) (Reptilia, Viperidae), in North Korea and adjacent regions. *Bonner Zoologische Beiträge* **45**, 49-56.
- Nilson G, Tuniyev B, Andrén C, Orlov N, Joger U, Herrmann H-W (1999) Taxonomic position of the *Vipera xanthina* complex. In: *Kaupia, Phylogeny and Systematics of the Viperidae* (ed. Joger U), pp. 99-102. Hessisches Landesmuseum Darmstadt / Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Nilson G, Tuniyev B, Orlov N, Höggren M, Andrén C (1995) Systematics of the Vipers of the Caucasus: polymorphism or sibling species? *Asiatic Herpetological Research* **6**, 1-26.
- Pinston H, Craney E, Pépin D, Montadert M, Duquet M (2000) *Amphibiens et Reptiles de Franche-Comté. Atlas commenté de répartition* Groupe naturaliste de Franche-Comté (éd.), Besançon.
- Prestt I (1971) An ecological study of the viper *Vipera berus* in southern Britain. *Journal of Zoology* **164**, 373-418.
- Prosser MR, Gibbs HL, Weatherhead PJ (1999) Microgeographic population genetic structure in the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon* detected using microsatellite DNA loci. *Molecular Ecology* **8**, 329-333.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* **17**, 230-237.
- Saint Girons H (1975) Coexistence de *Vipera aspis* et *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un problème de compétition interspécifique. *Terre et Vie* **29**, 590-613.
- Saint Girons H (1977) Systématique de *Vipera latastei latastei* Bosca, 1978 et description de *Vipera latastei gaditana*, subsp. n. (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **84**, 599-607.
- Saint Girons H (1978) Morphologie externe comparée et systématique des Vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **85**, 565-595.
- Saint Girons H (1980a) Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Compte rendu des Séances de la Société de Biogéographie* **496**, 146-172.
- Saint Girons H (1980b) Le cycle des mues chez les vipères européennes. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **105**, 551-559.
- Saint Girons H (1981) Quelques observations sur la dispersion des nouveau-nés chez *Vipera berus* et *Vipera aspis* dans le bocage atlantique (Reptilia: Viperidae). *Amphibia-Reptilia* **2**, 269-272.
- Saint Girons H, Kramer E (1963) Le cycle sexuel chez *Vipera berus* (L.) en montagne. *Revue Suisse de Zoologie* **70**, 191-221.
- Schlötterer C, Pemberton J (1998) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review. In: *Molecular approaches to ecology and evolution* (eds. DeSalle R, Schierwater B). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Sochurek E (1974) *Vipera ammodytes gregorwallneri* n. ssp. *Herpet. Blätt.* **1**, 1-4.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 608-613.

- Stille B, Madsen T, Niklasson M (1986) Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. *Oikos* **47**, 173-175.
- Szyndlar Z, Rage J-C (1999) Oldest fossil vipers (Serpentes: Viperidae) from the Old World. In: *Kaupia, Phylogeny and Systematics of the Viperidae* (ed. Joger U), pp. 9-20. Hessisches Landesmuseum Darmstadt / Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Vedmederya VJ, Grubant VN, Rudayeva VA (1986) On the question of the name of the black viper in the forest steppes of the European part of the USSR. *Vestnik Karkov Univ.* **288**, 83-85.
- Vicario S, Caccone A, Gauthier J (2003) Xantusiid "night" lizards: a puzzling phylogenetic problem revisited using likelihood-based Bayesian methods on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 243-261.
- Viitanen P (1967) Hibernation and seasonal movements of the viper, *Vipera berus berus* (L.), in southern Finland. *Annales Zoologici Fennici* **4**, 472-546.
- Villarreal X, Bricker J, Reinert HK, Gelbert L, Bushar LM (1996) Isolation and characterization of microsatellite loci for use in population genetic analysis in the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. *Journal of Heredity* **87**, 152-155.
- Völkl W, Thiesmeier B (2002) *Die Kreuzotter - ein Leben in festen Bahnen?* Laurenti Verlag.
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738.
- Wiens JJ, Chippindale PT, Hillis DM (2003) When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders. *Systematic Biology* **52**, 501-514.
- Zarevsky SF (1917) Formes nouvelles du genre *Vipera*, trouvées dans l'empire russe: *Vipera tigrina* n. sp and *Vipera berus* var. *sachalinensis* var nova? *Annuaire Mus. zool. Acad. Petrograd* **21**.
- Zuffi MAL (1999) Activity patterns in a viviparous snake, *Vipera aspis* (L.), from Mediterranean central Italy. *Amphibia-Reptilia* **20**, 313-318.
- Zuffi MAL (2002) A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia* **23**, 191-213.
- Zuffi MAL (2003) On the subspecies of *Vipera aspis*: A reply to Filippi. *Amphibia-Reptilia* **24**, 238-241.
- Zuffi MAL, Bonnet X (1999) Italian subspecies of the asp viper, *Vipera aspis*: patterns of variability and distribution. *Italian Journal of Zoology* **66**, 87-95.

PHYLOGEOGRAPHIE DE LA VIPERE AMMODYTES



Chapitre 2: Phylogéographie de la vipère ammodytes (*Vipera ammodytes*, (L, 1758)): évidence de multiples refuges glaciaires dans la péninsule balkanique

S. Ursenbacher¹, S. Schweiger², L. Tomovic³, J. Crnobrnja-Isailovic⁴, L. Fumagalli¹ & W. Mayer²

¹Laboratoire de Biologie de la Conservation, Département d'Ecologie et Evolution, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne (Switzerland)

²First Zoological Department, Molecular Systematics, Natural History Museum, Burgring 7, A-1014 Vienna, Austria

³Institute of Zoology, Faculty of Biology, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia and Montenegro

⁴Institute for Biological Research, Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia and Montenegro

2.1 Résumé

La vipère ammodytes (*Vipera ammodytes*) occupe une grande partie du sud-est de l'Europe et la proche Asie Mineure. Les relations phylogénétiques ont été étudiées à l'aide de deux régions de l'ADN mitochondrial (cytochrome b et région de contrôle). Un nombre important de clades a été observé au sein de cette espèce, confirmant la séparation des sous-espèces *V. a. montandoni*, *V. a. meridionalis* et *V. a. transcaucasiana*. Par contre, *V. a. ammodytes*, *V. a. gregorwallneri* et *V. a. ruffoi* ne présentent aucune distinction génétique, impliquant leur mise en synonymie. Plusieurs clades observés présentent aucune différenciation morphologique, malgré une séparation estimée à environ 4 millions d'années. La présence de vipères ammodytes dans certaines îles des Cyclades nous a permis d'évaluer la première horloge moléculaire pour les Viperinae, confirmant les valeurs observées chez des Crotalinae. Finalement, l'importante diversité génétique au sein de la péninsule balkanique et les routes de recolonisation de cette espèce sont discutées.

2.2 Abstract

The nose-horned viper (*Vipera ammodytes*) occurs in a large part of the southeastern Europe and near Asia Minor. Phylogenetic relationships were constructed for a total of 60 vipers using sequences from two mitochondrial gene regions (cytochrome b and control region). A considerable number of clades were observed within this species, confirming the split of the subspecies *V. a. montandoni*, *V. a. meridionalis* and *V. a. transcaucasiana*. In contrast, *V. a. ammodytes*, *V. a. gregorwallneri* and *V. a. ruffoi* do not display any genetic difference, suggesting that these subspecies can be regarded as synonyms. Moreover, some clades do not exhibit any morphological differences, despite a split 4 Myr ago. The presence of *V. ammodytes* in the Cyclades Islands allows us to estimate the first molecular clock for the Viperinae, confirming the evaluation for Crotalinae. Finally, the large genetic diversity within the Balkan peninsula and the recolonisation routes were discussed.

2.3 Introduction

Depuis une vingtaine d'années, l'étude des relations phylogénétiques a considérablement progressé grâce au développement de l'utilisation des marqueurs moléculaires neutres. Les différentes lignées peuvent ainsi être détectées, permettant de déterminer les groupes historiques et de proposer une taxonomie basée sur l'historique des populations (par exemple Zamudio & Greene, 1997; Rodriguez-Robles & De Jesus-Escobar, 1999; Burbrink *et al.*, 2000; Rodriguez-Robles & De Jesus-Escobar, 2000; Burbrink, 2001). Or, les serpents européens ne sont devenus le sujet de recherche en phylogéographie moléculaire que récemment (Carlsson & Tegelström, 2002; Guicking *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2002; Chap. 3; Chap. 4).

Les espèces venimeuses du Paléarctique appartenant au genre *Vipera* sont connues en Europe depuis le début du Miocène (Szyndlar & Rage, 1999; Szyndlar & Rage, 2002). Les premières vipères qui ont envahi l'Europe au début du Miocène appartenaient au "complexe *Vipera aspis*", lequel inclus les espèces actuelles suivantes: *V. aspis*, *V. ammodytes* et *V. latastei* (Obst, 1983); ces trois taxa occupent actuellement le sud du continent européen. Durant le milieu du Miocène, un nombre réduit de fossiles a été retrouvé, suggérant que la répartition de ce groupe a fortement régressé (Szyndlar & Rage, 1999). Par contre, les ancêtres de ce complexe étaient à nouveau répartis dans toute l'Europe à la fin du Miocène et au Pliocène (Szyndlar & Rage, 1999). A la fin du Pliocène, *V. ammodytes* était encore présente au nord des Carpates (Szyndlar, 1984). Actuellement, la vipère ammodytes est répandue dans le sud-est de l'Europe (nord de l'Italie et le sud de l'Autriche et à travers tous les pays des Balkans) et s'étend à l'est jusqu'aux montagnes du Caucase. La taxonomie de cette espèce est basée uniquement sur des caractères morphologiques. La littérature récente (Eiselt and Baran, 1970; Biella, 1983; Biella and Blättler, 1989; Crnobrnja-Isailovic and Haxhiu, 1997) suggère la présence de 7 sous-espèces distinctes: *V. a. ammodytes* (Linnaeus, 1758), *V. a. illyrica* (Laurenti, 1768), *V. a. meridionalis* (Boulenger, 1903), *V. a. montandoni* (Boulenger, 1904), *V. a. transcaucasiana* (Boulenger, 1913), *V. a. ruffoi* (Bruno, 1968) et *V. a. gregorwallneri* (Sochurek, 1974). *V. a. transcaucasiana* est parfois considérée comme une espèce valide (Obst, 1983; Baran & Atatür, 1998; Nilson *et al.*, 1999). Golay *et al.* (1993) reconnaissent seulement trois sous-espèces: *V. a. ammodytes* (incluant *V. a. gregorwallneri* et *V. a. ruffoi*), *V. a. meridionalis* (incluant *V. a. montandoni*) et *V. a. transcaucasiana*. Au contraire, Herprint International (Ulber, 1994-1997) reconnaît cinq sous-espèces: *V. a. ammodytes*, *V. a. meridionalis*, *V. a. montandoni*, *V. a. transcaucasiana* et *V. a. gregorwallneri*.

La grande diversité morphologique et taxonomique de cette espèce dans les Balkans permet de définir plusieurs axes de recherches: (1) examiner les relations phylogénétiques chez *Vipera ammodytes* à l'aide de marqueurs moléculaires, (2) explorer les routes de recolonisation, (3) dater les événements de séparation entre les clades, (4) comparer la structuration issue des événements historiques avec la taxonomie actuelle et (5) observer l'influence des glaciations du Pléistocène sur le pattern de différenciation génétique au sein de cette espèce.

2.4 Matériel et Méthodes

Echantillonnage et extraction de l'ADN

Soixante individus de *Vipera ammodytes* ont été utilisés pour les analyses phylogéographiques, représentant toutes les sous-espèces reconnues. La localité et la source des échantillons sont présentées en Annexe 1 alors que la localisation est indiquée sur la Figure 1. Un spécimen de *V. berus* a été utilisé comme outgroup. L'ADN génomique total a été extrait à partir d'échantillons conservés en alcool à l'aide de kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

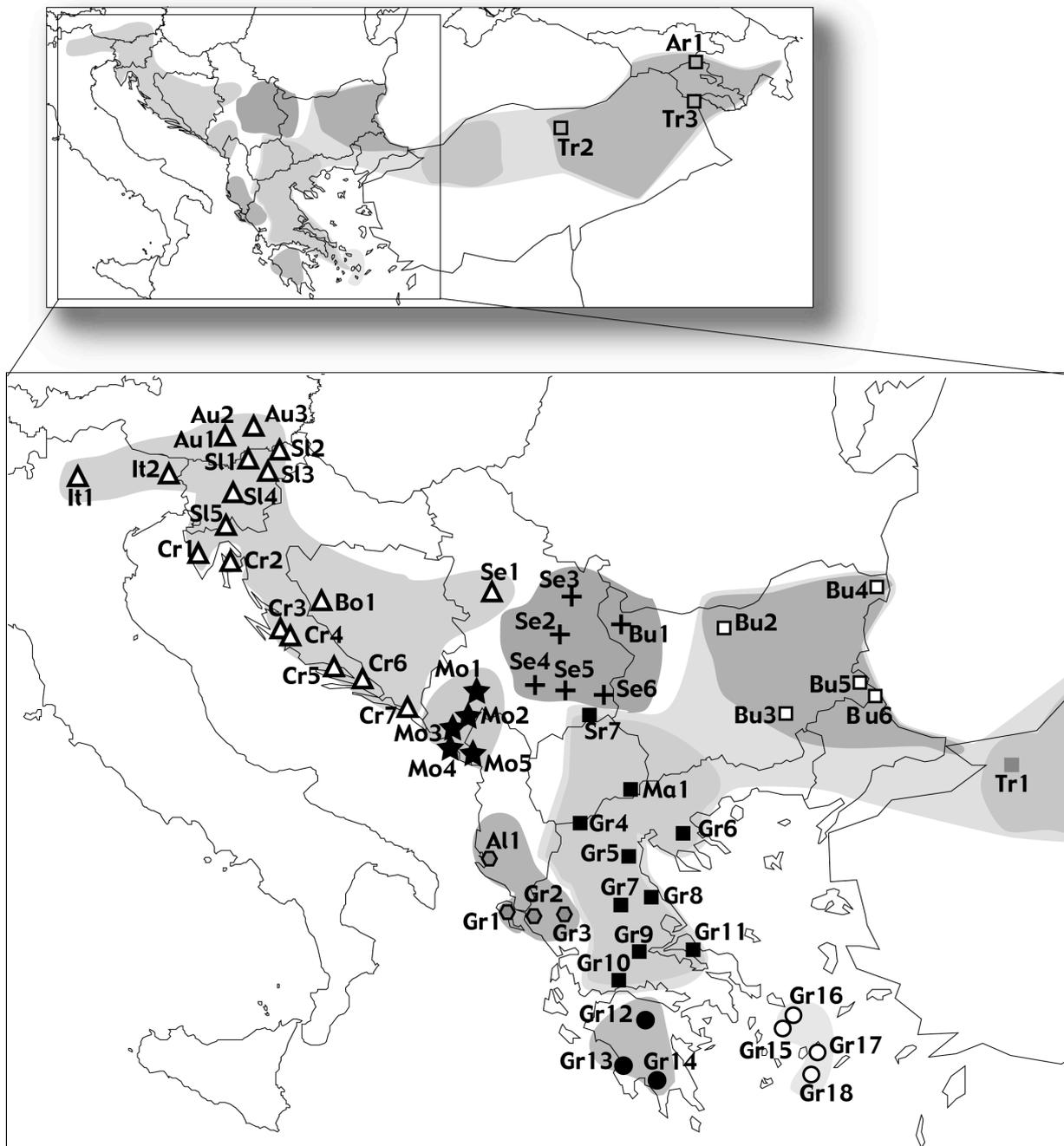


Figure 1 Localisation des 60 *Vipera ammodytes* analysées dans cette étude. Les symboles correspondent aux clades génétiques (voir Figure 2).

Analyses génétiques

Un fragment du cytochrome b (cyt. b) a été amplifié par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) à l'aide des primers LS14841 (5'-GGATCAAACATTTCAACTTGATG-3') et V15136H (5'-TCTGTGAATGGGGGTTCTACTG-3') (voir Figure 2, Chap. 1 pour la position des primers). La PCR a été effectuée dans un volume de total de 25 µl contenant 2 µl du produit d'extraction, 1x de tampon PCR (Qiagen), 2mg/ml de solution Q (Qiagen), 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.5µM de chaque primers et 0.5 unité de *Taq* polymérase (Qiagen). L'amplification a été réalisée avec 35 à 45 cycles de dénaturation à 94°C durant 30 sec., d'appariement à 50°C pendant 45 sec et d'élongation à 72°C pendant 60 sec.

Pour l'amplification d'une partie importante de la région de contrôle (CR), nous avons utilisé deux paires de primers: L16148VA - H16551VA et L16571VA - H690 (Kumazawa *et al.*, 1996; Chap. 4). La PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 2 µl de produit d'extraction, 1x de tampon PCR (Qiagen), 2mg/ml de solution Q (Qiagen), 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.5µM de chaque primer et 0.5 unité de *Taq* polymérase (Qiagen). Les conditions d'amplification ont été composées de 35-45 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 sec., d'alignement à 56°C pour la première partie de la CR et à 59°C pour la seconde pendant 30 sec. et d'élongation à 72°C pendant 45 sec.

Les produits de PCR ont été purifiés avec des kits QIAquick PCR Purification (Qiagen). Le séquençage a été réalisé avec les primers H16551VA, L16571VA, H690, LS14841 et HCYTV_L (5'-AGGCTCCAGCAACCCATTAGG-3') dans 10 µl contenant 2-5 µl d'ADN amplifié, 1 µl de primer à 10 µM et 4 µl du kit de réaction ABI PRISMTM Dye Terminator 3.1 cycle sequence Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). De l'eau a été ajoutée à concurrence d'un volume total de 10 µl. Les réactions de séquences ont été visualisées par un séquenceur automatique ABI 3100 (Applied Biosystems). Les séquences ont été déposées dans GeneBank (DQ186103-DQ186198 et DQ186476-DQ186520).

Analyses phylogénétiques

Les séquences de l'ADN mitochondrial ont été alignées à l'œil. La possibilité de saturation au premier, second et troisième codon du cyt. b, ainsi que pour les transitions et les transversions du troisième codon a été testée en comparant les distances par paire non corrigées (*p*) et les distances par paire corrigées selon Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) calculées par PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). La saturation du jeu de données combinant le cyt. b et la CR a été testée de manière identique. Afin de comparer le taux d'évolution du cyt. b et de la CR, nous avons comparé les distances par paire non corrigée du cyt. b et de la CR.

Nous avons effectué un test d'homogénéité (1000 réplicats) pour vérifier si les deux régions pouvaient être combinées dans un seul jeu de donnée (Farris *et al.*, 1995). Une évaluation du caractère non aléatoire des données a été effectuée en estimant la valeur du *g*₁ (skewness) de la distribution des longueurs de 2x10⁶ arbres aléatoires générés par PAUP* pour la CR et le cyt. b individuellement et pour tous les codons du cyt. b (Hillis & Huelsenbeck, 1992). Le modèle d'évolution le plus approprié a été sélectionné à l'aide du programme MODELTEST (Posada & Crandall, 1998). Le modèle choisi a été utilisé pour les analyses de maximum de vraisemblance (ML) dans PHYML (Guindon & Gascuel, 2003). Des analyses bayésiennes ont été réalisées avec MRBAYES v3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) avec le modèle GTR+G+I en simulant 2x10⁶ générations avec des arbres échantillonnés tous les 100 cycles et 4 chaînes indépendantes. Les premiers 2x10⁵ arbres ont été supprimés ("burnin"). Seules les probabilités postérieures supérieures à 50% issues des 18'000 arbres retenus ont été conservées. Quatre réplicats indépendants ont

été réalisés et inspectés pour contrôler la consistance des analyses et éviter les optimums locaux (Huelsenbeck & Imennov, 2002).

Les analyses de parcimonie maximale (MP) ont été effectuées en considérant les insertions comme un nouvel état (5^{ème} base) avec les réglages suivants: recherche heuristique avec ajout de pas aléatoires et méthode TBR d'échange de branches. La solidité de l'analyse a été testée avec 10'000 bootstraps. Les analyses de distances par Neighbour-Joining (NJ) ont été effectuées avec le modèle suggéré par MODELTEST. La solidité de l'analyse NJ a été testée avec 10'000 bootstraps.

Temps de séparation et horloge moléculaire

Afin de déterminer le temps de séparation entre les clades, la distance génétique moyenne a été calculée avec PAUP* en utilisant la correction Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). L'hypothèse d'une horloge moléculaire a été vérifiée avec le test statistique du ratio χ^2 , afin de déterminer si le taux d'évolution est différent entre les clades (Muse & Weir, 1992).

Bien que les estimations d'horloge moléculaire doivent être traitées avec prudence, la présence de vipères ammodytes sur plusieurs îles des Cyclades a permis la première estimation du taux de mutation chez les vipères européennes puisque ces îles sont séparées du continent depuis des périodes déterminées.

Toutes les îles grecques (Crète comprise) étaient interconnectées au milieu du Miocène. Durant le Tortonien (9 – 7 Millions d'années, Myr), l'eau a séparé la Crète, les Cyclades et le Péloponnèse du continent (Dermitzakis, 1990). La vipère ammodytes n'a jamais colonisé la Crète (l'espèce n'y est pas présente et aucun fossile n'y a été découvert; Holman, 1998), on peut donc estimer que la dispersion initiale des vipères ammodytes s'est produite après la séparation de la Crète du continent et qu'elles n'ont donc pas colonisé les Cyclades durant cette période. La crise de la salinité durant le Messinien (environ 5.4 Myr) a remis en connexion toutes les îles des Cyclades avec le continent, au contraire de la Crète (Schröder, 1986), permettant aux ammodytes de coloniser tout le bassin de la mer Egée, mais pas la Crète. Par la suite, au cours du Pliocène inférieur (5.3-3.4 Myr) et jusqu'au Pléistocène inférieur (1.6-1 Myr), les îles ont été isolées par l'augmentation du niveau de la mer Méditerranée (Schröder, 1986). En considérant que les ammodytes soient arrivées durant le Messinien, cette séparation a conduit les populations d'ammodytes à s'isoler et à évoluer séparément. Plus récemment, la Mer Egée a subi de grandes fluctuations de niveau résultant des dernières glaciations (Schröder, 1986); ces variations récentes (dès 1.6 Myr environ) ont permis à certaines îles d'être à nouveau interconnectées au continent, bien qu'il soit difficile de déterminer exactement lesquelles (Greuter, 1971). La profondeur actuelle de la mer permet d'obtenir des indications sur ces reconnections (voir Sfenthourakis, 1996), le niveau de l'eau ayant baissé entre 100 et 200 m au cours des glaciations. Des îles telles que Kéa ont été reconnectées au continent, mais il n'est pas certain que les autres îles l'aient été (voir Sfenthourakis, 1996). Il est donc possible que certaines îles des Cyclades aient été colonisées (ou recolonisées) à cette période. En conclusion, on peut suggérer que la séparation des populations d'ammodytes entre les Cyclades et le continent a eu lieu soit au cours du Pliocène inférieur (5.3-3.4 Myr) soit au début du Pléistocène (environ 1.6 Myr). A partir de ces deux datations, le taux de divergence sera estimé grâce à la distance entre les ammodytes des Cyclades et de la Grèce continentale (distance moyenne corrigée selon Tamura-Nei) et sera comparé aux valeurs observées chez les autres Viperidae afin de trancher entre les deux hypothèses.

2.5 Résultats

L'analyse des 927 bp du cyt. b a révélé 48 haplotypes à partir des 60 *V. ammodytes*. Il y a 181 (19.5%) sites variables (23.7% en incluant l'outgroup), dont 158 (17.0%, 17.3% en incluant l'outgroup) sont phylogénétiquement informatifs selon les critères de l'analyse MP. Pour la CR, 982 bp ont été analysés, révélant 45 haplotypes à partir des 60 échantillons. La combinaison des deux jeux de données présente 56 haplotypes différents avec 304 (15.9%) sites variables (21.6% en incluant l'outgroup), dont 257 (13.5%, 13.6% en incluant l'outgroup) sont phylogénétiquement informatifs. La distance non-corrigée (p) entre les *V. ammodytes* varie entre 0 et 6.0%, alors que la distance moyenne entre les ammodytes et la péliade atteint 11.2%. Nous avons testé le taux de saturation pour la CR et le cyt. b (le gène entier et chaque codon séparément). Au sein des ammodytes, des signes de saturation ont été observés seulement pour les transitions du 3^{ème} codon du cyt. b alors que la saturation devient évidente entre *V. ammodytes* et *V. berus* dans les deux gènes. De plus, les statistiques g_1 ont été mesurées pour la CR ($g_1 = -0.390$: $p < 0.01$) et pour le cyt. b ($g_1 = -0.455$: $p < 0.01$), ainsi que pour tous les codons du cyt. b ($g_1 = -0.370$: $p < 0.01$ pour la première position; $g_1 = -0.601$: $p < 0.01$ pour la seconde position et $g_1 = -0.478$: $p < 0.01$ pour la troisième position); tous les gènes et chaque codon montrent un signal phylogénétique significatif. Ainsi, la saturation n'a pas été considérée comme un facteur important et tous les codons ont donc été utilisés dans les analyses ultérieures et aucune pondération a été appliquée. De plus, un taux de mutation plus important pour le cyt. b a été observé (à partir des distances non corrigées au sein de la vipère ammodytes: $y = 0.609x$, $r^2 = 0.770$ $p < 0.001$).

Analyses phylogénétiques

Le test d'homogénéité indique un signal phylogénétique différent entre les deux parties étudiées de l'ADN mitochondrial ($p = 0.048$). La dissemblance est liée à des positions relatives différentes pour les clades Monténégrin et Nord-Est (voir ci-dessous), alors que tous les échantillons appartiennent au même clade avec le cyt. b et la CR. En conséquence, nous avons décidé de présenter que les analyses réalisées avec le jeu de données combinées.

Pour les analyses ML, le meilleur modèle de substitution choisi par MODELTEST a été le modèle TIM+I+G (fréquence A = 0.2846; fréquence C = 0.2904; fréquence G = 0.1084; fréquence T = 0.3166; proportion de sites invariables = 0.5825; valeur de gamma = 0.6226). La Figure 2 montre la topologie obtenue par l'analyse ML avec le support des analyses bayésiennes. L'analyse MP heuristique produit 103 arbres les plus parcimonieux ayant chacun 716 pas (CI = 0.554, RI = 0.906). Les valeurs de bootstraps des analyses de MP et NJ sont montrées sur la Figure 2. Tous les arbres issus des différentes analyses montrent clairement la présence de 7 clades distincts chez *V. ammodytes*: clade Monténégrin (échantillons du Monténégro), clade Nord-Est (centre et est de la Serbie, ouest de la Bulgarie), clade Nord-Ouest (Italie, Autriche, Slovaquie, Croatie, Bosnie et ouest de la Serbie), clade Sud-Ouest (Albanie, nord-ouest de la Grèce), clade Cyclades (îles des Cyclades), Clade Péloponnèse (région du Péloponnèse) et clade Sud-Est (Grèce, majeure partie de la Macédoine, extrême sud de la Serbie, centre et est de la Bulgarie et la Turquie). Le clade Monténégrin semble être la lignée basale, à partir desquelles les autres clades de vipères ammodytes sont issus pour la CR, alors que le clade basal du cyt. b est le clade Nord-Est. La moyenne de distance entre les

clades est élevée (distance non corrigée (p) = 4.6% pour cyt. b+CR et 5.7% pour le cyt.

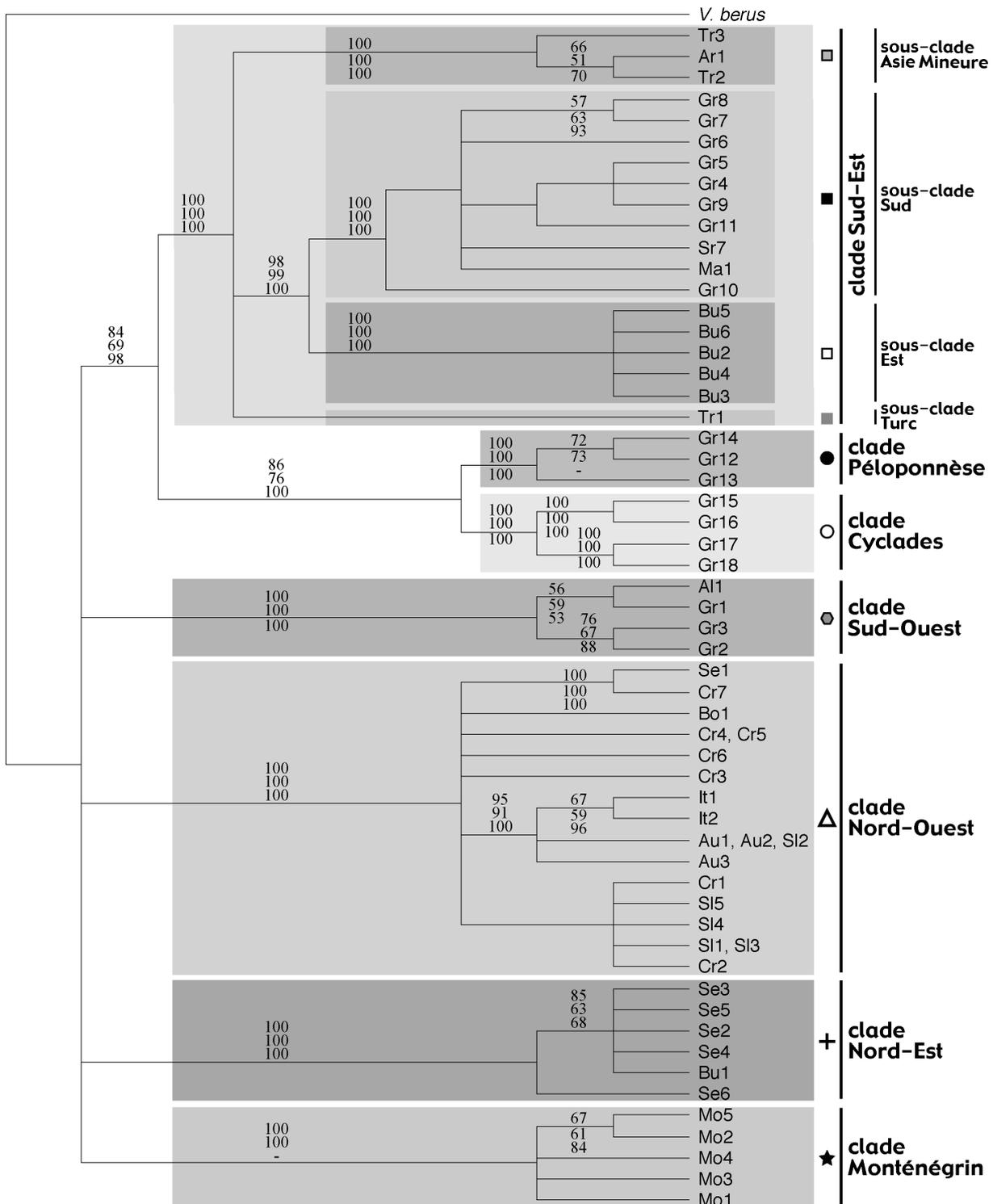


Figure 2 Arbre bootstrap consensus (valeur supérieur à 50%) issu de 10'000 bootstraps de l'analyse de parcimonie. Pour les nœuds principaux, le support issu de 10'000 bootstraps est indiqué pour les analyses de distances (NJ), pour les analyses de parcimonie maximale (MP), ainsi que pour les probabilités postérieures issues des méthodes bayésiennes. Le code d'identification des animaux et les symboles correspondent à la Figure 1.

b seul).

De plus, 4 sous-clades peuvent être observés à l'intérieur du clade Sud-Est: le sous-clade Turc (ouest de la Turquie), le sous-clade Asie Mineure (centre et est de la Turquie, Géorgie), le sous-clade Sud (Grèce continentale, Macédoine et l'extrême sud de la Serbie) et le sous-clade Est (centre et est de la Bulgarie, Turquie européenne). La moyenne des distances entre les sous-clades est importante (distance non corrigée (p) = 2.7% pour cyt. b+CR et 3.8% pour le cyt. b seul).

Le test de ratio issu des analyses de vraisemblance (Huelsenbeck & Crandall, 1997) ne rejette pas l'hypothèse d'un taux de mutation homogène entre les clades les plus méridionaux (clades Cyclades, Péloponnèse et du Sud-Est) ($2\Delta = 32.78$, $df = 30$, $p > 0.05$). En conséquence, la distance génétique entre les populations du sud est concordante avec les événements géologiques qui seraient responsables de la séparation de ces régions. Le taux de mutation peut donc être estimé à partir de la séparation entre les Cyclades et la Grèce. La distance génétique moyenne entre les animaux des Cyclades et du Péloponnèse (les animaux les plus proches génétiquement) est de 5.77% pour le cyt. b et de 3.12% pour la CR. Le taux de divergence peut donc être estimé à 1.09-1.70% (moyenne: 1.39%) par Myr pour le cyt. b et à 0.59-0.92% (0.75%) par Myr pour la CR selon notre première hypothèse et à 3.61% par Myr pour le cyt. b et 1.95% par Myr pour la CR suivant le second postulat.

2.6 Discussion

Horloge moléculaire et reconstruction phylogéographique

Cette étude présente deux estimations du taux de divergence issu de deux différentes hypothèses de recolonisation; les valeurs de ce taux sont respectivement de 1.09-1.70% (moyenne 1.39%) et 3.61% pour le cyt. b. A titre de comparaison, le taux de divergence pour les mammifères (qui possèdent un taux de mutation en général plus important que les reptiles; Martin & Palumbi, 1993) est proche de 2% pour le cyt. b (Brown *et al.*, 1979; Klicka & Zink, 1997) et a été estimé à 1.4% pour les Crotalinae (Wüster *et al.*, 2002). Il est donc très improbable que la seconde hypothèse (une colonisation récente des Cyclades il y a environ 1.6 Myr) se soit produite. En effet, il serait étonnant que le taux de mutation soit 2.5 fois plus important chez les ammodytes que chez les autres Viperidae ou 1.8 fois plus important que chez les mammifères. On peut donc conclure que la colonisation des Cyclades s'est produite durant la crise de la salinité du Messinien et que les animaux insulaires ont ensuite été séparés des populations continentales durant le Pliocène inférieur; le taux de divergence chez *Vipera ammodytes* peut ainsi être évalué à 1.4% par Myr pour le cyt. b et à 0.75% par Myr pour la CR. Cette valeur est donc identique aux estimations basées sur le cyt. b et le ND4 de plusieurs espèces de Crotalinae (Wüster *et al.*, 2002), indiquant un taux de mutation comparable au sein des Viperidae.

Reconstruction phylogéographique

En accord avec les données fossiles, les ancêtres de la vipère ammodytes sont apparus en Europe centrale au début du Miocène et ont subsisté dans cette région jusqu'à la fin du Pliocène. Nos résultats suggèrent que la séparation basale des différents clades d'ammodytes a eu lieu au cours du Pliocène inférieur (4.1 Myr selon la divergence entre les clades). Il est difficile de déterminer quel est le groupe historique qui a colonisé l'Europe, puisque les groupes basaux obtenus pour le CR et le cyt. b sont différents (pour le CR: clade Monténégrin; pour le cyt. b: clade Nord-Est) et qu'aucun support entre les 4 clades basiques est observé (voir Figure 2). Néanmoins, il semble que les ammodytes aient recolonisé le sud-est de l'Europe et l'Asie à partir du centre des Balkans, probablement des clades Nord-Est ou Monténégrin (Serbie, Monténégro, Albanie). Les

fossiles indiquent que les ancêtres de *V. ammodytes* étaient présents surtout au nord des Balkans au cours du Miocène (Szyndlar & Rage, 1999). A cette même période, la péninsule balkanique a subi de grands changements de relief, de climat et de végétation, perdant ainsi d'anciens corridors et en retrouvant d'autres (Ancelkovic, 1988; Oosterbroek & Arntzen, 1992; Rage & Rocek, 2003). Les populations d'ammodytes ont probablement migré vers le sud au cours du Miocène, mais elles ont été arrêtées dans la région Monténégro/Serbie par des barrières orographiques ou hydrographiques. Au cours du Pliocène inférieur, les vipères du groupe *V. berus* ont commencé à coloniser l'Europe centrale, conduisant au déclin du groupe *V. aspis* (Szyndlar & Rage, 1999). Il est donc probable que les ammodytes aient été isolées dans la région Monténégro/Serbie au Pliocène inférieur, poussées dans le sud par le groupe des *V. berus* et limitées dans leur progression au sud par des barrières orographiques ou/et hydrographique ou par la présence du groupe des vipères orientales.

A partir de leur refuge situé dans la région Monténégro/Serbie, les *V. ammodytes* ont recolonisé l'Europe suivant trois routes: 1) par l'est / nord-est; 2) par le nord-ouest et 3) par le sud-est. La première route de colonisation est probablement due à la formation de la dépression de Skadar et la rivière Dim, qui est apparue après la formation des Alpes Dinariques (Cvijic, 1991; Rage & Rocek, 2003). La seconde route est vraisemblablement intervenue légèrement plus tard et la colonisation a dû se produire le long de la côte Adriatique. A la même période, les animaux ont recolonisés le sud, tous d'abord en colonisant la région de l'Albanie et les côtes ouest de la Grèce (clade Sud-Ouest), puis plus au sud et à l'est, formant le clade Sud-Est.

Le clade Sud-Est a été séparé durant le milieu du Pliocène (2.7 Myr basé sur la divergence entre les clades) en quatre sous-clades, colonisant l'Asie Mineure par la suite. En conséquence, les glaciations du Quaternaire n'ont pas eu d'influence sur le nombre de clades observés, mais elles ont eu un impact sur la diversité génétique au sein des différents clades. La plupart des clades et des sous-clades ont une distance génétique interne très faible (0.11-0.37% pour le cyt. b), à l'exception du clade Nord-Ouest (distance génétique moyenne du cyt. b: 0.71%; 0-1.62%), du Clade Péloponnèse (moyenne: 1.08%; 0.76-1.29%) et le clade des Cyclades (moyenne: 1.20%; 0.22-1.73%). Cette grande homogénéité implique que plusieurs clades ont subi des réductions d'effectifs (bottleneck) au cours des dernières glaciations (80'000-260'000 années; basé sur l'horloge moléculaire définie dans cette étude et le taux de divergence moyen à l'intérieur des clades les moins variables). A part le clade Sud-Est qui est séparé en sous-clades bien déterminés, le clade Nord-Ouest est celui qui possède la plus grande diversité génétique; il montre une légère structure, probablement due à la présence de nombreux petits refuges glaciaires le long des côtes adriatiques durant le Quaternaire comme démontré pour les lézards (Podnar *et al.*, 2004; Podnar *et al.*, 2005). Néanmoins, une analyse plus fine devrait être exécutée (aussi bien pour la vipère ammodytes que pour d'autres espèces animales et végétales) pour la détermination des différentes zones-refuges dans cette région.

Implications taxonomiques

L'espèce *Vipera ammodytes* regroupe plusieurs sous-espèces dont la validité est douteuse (Tomovic & Dzukic, 2003, et références citées dans cet article). Nos résultats démontrent clairement que les populations d'Italie, d'Autriche, de Slovénie, de Croatie, de Bosnie et de l'ouest de la Serbie sont génétiquement proches. La description de différences morphologiques au sein de ce groupe a conduit à la description de *V. a. ruffoi* en Italie, *V. a. illyrica* dans l'ouest des Balkans et *V. a. gregorwalneri* en Autriche (Laurenti, 1768; Bruno, 1968; Sochurek, 1974). Au contraire, les résultats génétiques

suggèrent que ces trois sous-espèces devraient être considérées comme des synonymes de *V. a. ammodytes*.

La séparation génétique au sein du clade Sud-Est est apparue durant le milieu du Pliocène. Bien que Tomovic & Dzukic (2003) ne considéraient pas *V. a. montandoni* comme une sous-espèce valide car aucune différenciation morphologique avait pu être mise en évidence entre les échantillons macédoniens et bulgares, une étude plus récente et plus complète (Tomovic, sous presse) démontra le contraire. Les données génétiques confirment aussi la présence d'un groupe distinct incluant tous les échantillons de la plus grande partie de la Bulgarie, de la Macédoine, de l'extrême sud de la Serbie ainsi que du nord et du centre de la Grèce (correspondant à *V. a. montandoni*). Ainsi, nous suggérons de conserver *V. a. montandoni* comme sous-espèce valide (au contraire de Christov *et al.*, 1997; Christov & Beshkov, 1999; Tomovic & Dzukic, 2003).

Il est intéressant de remarquer que la présence de clades génétiquement bien séparés présents en Serbie, au Monténégro et en Albanie n'a jamais été suggéré à partir des observations morphologiques. Tomovic & Dzukic (2003), lesquels ont effectué une importante étude morphologique basée sur plus de 250 animaux dans cette région, n'ont pas détecté la moindre particularité au sein de ces populations, bien que la séparation génétique soit intervenue durant le Pliocène inférieur.

Bien que *V. a. transcaucasiana* ait parfois été considérée comme une espèce valide (Obst, 1983; Nilson *et al.*, 1999, mais voir Baran & Atatür, 1998), les résultats génétiques démontrent que ce taxon doit être considéré comme une sous-espèce, confirmant les dernières études morphologiques (Tomovic, sous presse).

Pour conclure, la vipère ammodytes, comme de nombreuses autres espèces de reptiles européens (Surget-Groba *et al.*, 2001; Guickling *et al.*, 2002; Poulakakis *et al.*, 2003), montrent une considérable diversité génétique dans les Balkans. Si les différences morphologiques confirment les différenciations génétiques, la taxonomie devrait être révisée. Néanmoins, *V. a. ruffoi*, *V. a. illyrica* et *V. a. gregorwalneri* doivent être considérées comme synonyme de *V. a. ammodytes*, les variations morphologiques devant résulter d'adaptations locales. La pertinence des sous-espèces *V. a. meridionalis* et *V. a. montandoni* est confirmée par les résultats de cette étude. D'autre part, nos résultats génétiques désapprouvent l'élévation de *V. a. transcaucasiana* au rang d'espèce. Etant donnée la considérable structure génétique chez *V. ammodytes*, des révisions taxonomiques plus détaillées devraient être conduites en combinant l'analyse de gènes mitochondriaux, nucléaires et par l'examen des différences morphologiques. Notre étude démontre aussi que la séparation des différents clades a eu lieu avant les fluctuations glaciaires du Quaternaire. Les changements climatiques du Pléistocène ont influé uniquement la structuration interne de certains clades. Finalement, la considérable diversité génétique observée chez la vipère ammodytes démontre une grande diversité génétique dans la région balkanique, zone où les études phylogéographiques sont particulièrement rares. Afin de comprendre les phénomènes de recolonisation et de mieux appréhender la complexité des refuges dans cette région, la réalisation d'autres études phylogéographiques dans les Balkans est nécessaire.

2.7 Remerciements

Ce travail a été financé par des bourses du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (Fonds No 3100-059132.99/1) et par la Société Académique Vaudoise. Jelka Crnobrnja-Isailovic a été partiellement financée par des bourses DAAD et MNTR de la République Serbe. Nous remercions S. Tome (Slovenian Museum of Natural History, Ljubljana, Slovénie), Maria Dimaki (Goulandris Natural History Museum, Athènes, Grèce), Petros Lymberakis (Natural History Museum of Crete, Grèce), Rastko Ajtic (Institute for Nature Conservation, Belgrade, Serbie), Tamás Tóth (Budapest, Hongrie), Wolfgang Böhme (Natural History Museum "A. Köenig", Bonn, Allemagne) pour les échantillons. Les commentaires de J. Cosendai et S. Dubey ont grandement amélioré ce manuscrit.

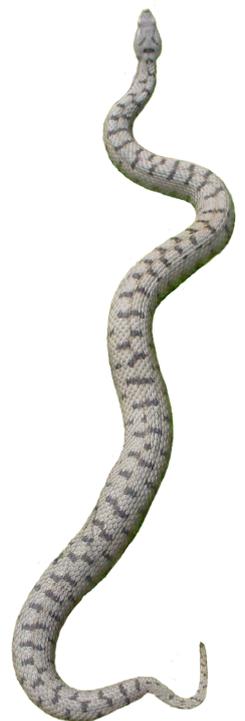
2.8 Bibliographie

- Ancelkovic M (1988) *Geologija Jugoslavije* IRO "Gradjevinska knjiga", Beograd.
- Baran I, Atatür MK (1998) *Turkish herpetofauna (amphibians and reptiles)*, Ankara.
- Biella H-J (1983) *Die Sandotter* A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Biella H-J, Blättler E (1989) Problematik der unterartlichen Eingliederung nord- und südwestlicher *Vipera ammodytes* - Populationen, dargestellt am Beispiel der südslovenischen Sandvipere (Reptilia, Serpentes: Viperidae). *Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum Fur Tierkunde in Dresden* **45**, 11-22.
- Boulenger GA (1903) On the geographical variations of the sand-viper, *Vipera ammodytes*. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1**, 185-186.
- Boulenger GA (1904) On the sand viper of Roumania (*Vipera ammodytes*, var. *montandoni*). *Ann. Mag. Nat. Hist.* **7**, 134-135.
- Boulenger GA (1913) On the geographical races of *Vipera ammodytes*. *Ann. Mag. Nat. Hist.* **8**, 283-287.
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1967-1971.
- Bruno S (1968) Sulla *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) in Italia. *Mem. Mus. Civ. Stor. nat.* **15**, 289-336.
- Burbrink FT (2001) Systematics of the eastern ratsnake complex (*Elaphe obsoleta*). *Herpetological Monographs*, 1-53.
- Burbrink FT, Lawson R, Slowinski JB (2000) Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): A critique of the subspecies concept. *Evolution* **54**, 2107-2118.
- Carlsson M, Tegelström H (2002) Phylogeography of Fennoscandian adders (*Vipera berus*). In: *Biology of the Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Christov K, Beshkov VA (1999) on the subspecies morphological characteristics of the Sand Vipers (*Vipera ammodytes*) from different locations in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* **51**.
- Christov K, Matev I, Iliev Y (1997) Major characteristics of three *Vipera ammodytes* subspecies from laboratory conditions. *Folia Zoologica* **46**, 286-288.
- Crnobrnja-Isailovic J, Haxhiu I (1997) *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758). In: *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe* (eds. Gasc J-P, Cabela A, Crnobrnja-Isailovic J, et al.), pp. 384-385. Societas Europaea Herpetologica, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Cvijic J (1991) *Geomorfologija* Zavod za udcbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Dermitzakis DM (1990) Paleogeography, geodynamic processes and event stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area. International Symposium on: Biogeographical Aspects of Insularity, Roma 1987. *Accad. Naz. Lincei* **85**, 263-288.
- Eiselt J, Baran I (1970) Ergebnisse zoologischer Sammelreisen in der Türkei: Viperidae. *Annalen des Naturhistorischen Museum Wien* **74**, 357-369.
- Farris JS, Kallersjo M, Kluge AG, Bult C (1995) Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* **44**, 570-572.
- Golay P, Smith HM, Broadley DG, Dixon JR, McCarthy C, Rage J-C, Schätti B, Toriba M (1993) *Endoglyphs and other major venomous snakes of the world. A checklist* Azemiops, Geneva.
- Greuter W (1971) Betrachtungen zur Pflanzengeographie der Südägäis. In: *Evolution in the Aegean, Opera Botanica* (ed. A. S), pp. 49-64.

- Guickling D, Joger U, Wink M (2002) Molecular phylogeography of the Viperine Snake *Natrix maura* and the Dice Snake *Natrix tessellata*: first results. In: *11th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica (SEH)* (ed. Vogrin M), pp. 49-59. Biota, Zalec, Slovenia.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.
- Hillis DM, Huelsenbeck JP (1992) Signal, Noise, and Reliability in Molecular Phylogenetic Analyses. *Journal of Heredity* **83**, 189-195.
- Holman JA (1998) *Pleistocene amphibians and reptiles in Britain and Europe* Oxford University Press, Oxford – New York.
- Huelsenbeck JP, Crandall KA (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**, 437-466.
- Huelsenbeck JP, Imennov NS (2002) Geographic origin of human mitochondrial DNA: Accommodating phylogenetic uncertainty and model comparison. *Systematic Biology* **51**, 152-U153.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754-755.
- Klicka J, Zink RM (1997) The importance of recent ice ages in speciation: A failed paradigm. *Science* **277**, 1666-1669.
- Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, Ozawa T (1996) Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: Highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1242-1254.
- Laurenti JN (1768) *Spicimen Medicum exhibens Synopsis Reptilium emendatum cum experimentis circa venena et antidota Reptilium Austriacorum*, Vienna.
- Linnaeus (1758) *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*, 10th ed. edn.
- Martin AP, Palumbi SR (1993) Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4087-4091.
- Muse SV, Weir BS (1992) Testing for equality of Evolutionary rates. *Genetics* **132**, 269-276.
- Nagy ZT, Joger U, Guickling D, Wink M (2002) Phylogeography of the European whip snake, *Coluber (Hierophis) viridiflavus* Lacépède, 1789, as inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene and ISSR genomic fingerprinting. In: *Proceedings of the 11th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica (SEH)* (ed. Vogrin M), pp. 49-59. Biota, Zalec, Slovenia.
- Nilson G, Tuniyev B, Andrén C, Orlov NL (1999) Vipers of Caucasus: taxonomic considerations. In: *Kaupia, Phylogeny and Systematics of the Viperidae* (ed. Joger U), pp. 103-106. Hessisches Landesmuseum Darmstadt / Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Obst FJ (1983) Zur Kenntnis der Schlangengattung *Vipera* (Reptilia, Serpentes, Viperidae). *Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum Fur Tierkunde in Dresden* **38**, 229-235.
- Oosterbroek P, Arntzen JW (1992) Area-Cladograms of Circum-Mediterranean Taxa in Relation to Mediterranean Paleogeography. *Journal of Biogeography* **19**, 3-20.
- Podnar M, Mayer W, Tvrkovic N (2004) Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Organisms, Diversity & Evolution* **4**, 307-317.
- Podnar M, Mayer W, Tvrkovic N (2005) Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **14**, 575-588.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Poulakakis N, Lymberakis P, Antoniou A, Chalkia D, Zouros E, Mylonas M, Valakos E (2003) Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard *Podarcis erhardii* (Squamata : Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**, 38-46.
- Rage JC, Roček Z (2003) Evolution of anuran assemblages in the Tertiary and Quaternary of Europe, in the context of palaeoclimate and palaeogeography. *Amphibia-Reptilia* **24**, 133-167.
- Rodríguez-Robles JA, De Jesus-Escobar JM (1999) Molecular systematics of New World lamproleptine snakes (Colubridae): implications for biogeography and evolution of food habits. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 355-385.
- Rodríguez-Robles JA, De Jesus-Escobar JM (2000) Molecular systematics of new world gopher, bull, and pinesnakes (*Pituophis* : Colubridae), a transcontinental species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**, 35-50.

- Schröder B (1986) Das postorogene Känozoikum in Griechenland/Ägäis. In: *Geologie von Griechenland: Beiträge zur regionalen Geologie der Erde* (ed. Jacobshagen V), pp. 209-240. Borntraeger, Berlin.
- Sfenthourakis S (1996) A biogeographical analysis of terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea) from the central Aegean islands (Greece). *Journal of Biogeography* **23**, 687-698.
- Sochurek E (1974) *Vipera ammodytes gregorwallneri* n. ssp. *Herpet. Blätt.* **1**, 1-4.
- Surget-Groba Y, Heulin B, Guillaume GP, Thorpe RS, Kupriyanova L, Vogrin N, Maslak R, Mazzotti S, Venczel M, Ghira I, Odierna G, Leontyeva O, Monney JC, Smith N (2001) Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 449-459.
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Szyndlar Z (1984) Fossil snakes from Poland. *Acta Zoologica Cracoviensis* **28**, 1-156.
- Szyndlar Z, Rage J-C (1999) Oldest fossil vipers (Serpentes: Viperidae) from the Old World. In: *Kaupia, Phylogeny and Systematics of the Viperidae* (ed. Joger U), pp. 9-20. Hessisches Landesmuseum Darmstadt / Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Szyndlar Z, Rage J-C (2002) Fossil record of the true vipers. In: *Biology of Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW), pp. 413-418. Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 512-526.
- Tomovic LJ (in press) Systematics of nose-horned Viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus, 1758). *Herpetological Journal*.
- Tomovic LJ, Dzukic G (2003) Geographic variability and taxonomy of the nose-horned viper, *Vipera ammodytes* (L. 1758), in the central and eastern parts of the Balkans: A multivariate study. *Amphibia-Reptilia* **24**, 359-377.
- Ulber T (1994-1997) *Catalogue of Valid Species and Synonyms. Volume 2. Viperinae and Atractaspididae* Herprint International, Bredell, S.A, Ulber.
- Wüster W, Salomão MDG, Quijada-Mascareñas JA, Thorpe RS, BBBSP (2002) Origins and evolution of the south american pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: *Biology of Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Zamudio KR, Greene HW (1997) Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta* : Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of Linnean Society* **62**, 421-442.

PHYLOGEOGRAPHIE DE LA VIPERE ASPIC



Chapitre 3: Phylogéographie de la vipère aspic (*Vipera aspis*) basée sur l'analyse de l'ADN mitochondrial: indices de refuges multiples autour de la Méditerranée

S. Ursenbacher*, A. Conelli*, P. Golay§, J.-C. Monney°, M. A. L. Zuffi∞, G. Thiery™, T. Durand[¶] & L. Fumagalli*

*Laboratoire de Biologie de la Conservation, Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne (Suisse)

§Cultural Fondation Elapsoïdea, CH – 1219 Aire – Genève (Suisse)

° Centre de Coordination pour la Protection des Amphibiens et des Reptiles de Suisse (KARCH), CH-3005 Bern (Suisse)

∞ Museo di Storia Natruale e del Territorio, Università di Pisa, Via Roma 79, I – 56011 Calci (Italie)

™ 805 Rue du Pré de l'Ane, F – 73000 Chambéry (France)

¶ Saury, F-74210 La Tuile (France)

Ce Chapitre sera publié dans Molecular Phylogenetics and Evolution (2005)

3.1 Résumé

Nous avons utilisé la région de contrôle de l'ADN mitochondrial pour examiner la phylogéographie et déterminer les refuges utilisés par la vipère aspic (*Vipera aspis*) dans le sud de l'Europe. Les analyses phylogéographiques révèlent deux clades majeurs, localisés de chaque côté des Alpes, comme déjà démontrés par de nombreuses autres études. De plus, le clade ouest est clairement subdivisé en deux groupes, l'un présent en Espagne et dans la région pyrénéenne, l'autre localisé en France et en Suisse. Cette étude est la première description formelle d'un refuge dans le sud de la France utilisée par un vertébré terrestre durant la fin du Quaternaire.

3.2 Abstract

We used mitochondrial DNA control region sequences to examine the phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) and determine the refugia they used in southern Europe. Phylogeographic analyses reveal two major clades, one on each side of the Alps. Moreover, the western clade is clearly subdivided in two groups, the first in Spain, including the Pyrenean region, and one in France and Switzerland. This study is the first definite description of refugia in southern France during the last periods of the Quaternary for a terrestrial vertebrate.

3.3 Introduction

Les fluctuations climatiques du Pléistocène ont eu une influence considérable sur la distribution et l'étendue de la diversité génétique intraspécifique des espèces vivant dans les zones tempérées européennes. La répétition des périodes glaciaires et interglaciaires a conduit les espèces à se déplacer dans des refuges méridionaux et, lorsque les conditions climatiques redevenaient plus clémentes, à s'étendre à partir de ces refuges (Hewitt, 1996). Par conséquent, après la recolonisation du continent, les espèces ont maintenu leurs différences, formant des groupes génétiques divergents conduisant parfois à un événement de spéciation (Hewitt, 2001). Trois refuges principaux ont été proposés pour la majorité des espèces tempérées vivant en Europe, soit les péninsules ibérique, italienne et balkanique (voir Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000); cependant des refuges glaciaires complémentaires au centre et dans le nord de l'Europe ont récemment été suggérés (Bilton *et al.*, 1998; Nesbø *et al.*, 1999; Kotlik & Berrebi, 2001; Stewart & Lister, 2001; Pfenninger & Posada, 2002; Seddon *et al.*, 2002; Chap. 4).

La majorité des études mesurant les conséquences génétiques des anciennes fluctuations démographiques ont été réalisées sur des espèces endothermes ayant une grande capacité de dispersion (par exemple Avise 2000). Au contraire, peu d'études ont été exécutées sur des organismes poïkilothermes pouvant survivre sur des surfaces limitées et ayant un faible potentiel de dispersion tels que les serpents, probablement à cause de leur comportement discret et la difficulté à obtenir un échantillonnage représentatif. La vipère aspic (*Vipera aspis*) est une espèce des zones tempérées qui vit dans le sud-ouest du continent européen. Cinq différentes sous-espèces sont actuellement reconnues: *V. a. aspis* en France et en Suisse, *V. a. atra* dans la partie ouest des Alpes, *V. a. zinnikeri* en Espagne, dans les Pyrénées et dans le sud-ouest de la France, *V. a. francisciredi* dans le nord et le centre de l'Italie, ainsi que dans l'extrême sud de la Suisse, et *V. a. hugyi* dans le sud de l'Italie (mais voir les travaux récents de Zuffi, 2002).

Cette étude se propose d'investiguer la phylogéographie de la vipère aspic dans l'entier de son aire de répartition par le séquençage de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial. Les buts principaux sont de: (i) localiser les refuges glaciaires localisés autour de la Méditerranée, (ii) évaluer la distribution et la diversité génétique au sein de ces refuges, (iii) estimer le potentiel des espèces poïkilothermes actuellement localisées dans le sud de l'Europe à révéler la structure interne au sein des refuges méditerranéens (tels que les péninsules italienne, ibérique et balkanique).

3.4 Matériel et Méthodes

Au total, 53 vipères aspics ont été échantillonnées (Figure 1 et Annexe 2). Suivant les sources du matériel biologique utilisé, l'ADN a été extrait à partir du sang, de mues ou de tissus. La vipère péliade (*Vipera berus*), la vipère de Lataste (*V. latastei*) et la vipère ammodytes (*Vipera ammodytes*) ont été utilisées comme outgroups. L'ADN génomique total a été extrait à l'aide de colonnes QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Une portion de 677 paires de bases (bp) de la région de contrôle (CR) de l'ADN mitochondrial a été séquencée à l'aide des primers L 16571VA (Chap. 4) et H690 (Kumazawa *et al.*, 1996) (voir Figure 2, Chap. 1 pour la position des primers). La chaîne de réaction de polymérase (PCR) a été conduite dans un volume de 25µl contenant 2µl du produit d'extraction, 1x de buffer PCR (Qiagen), 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.5µM de chaque primers et 0.5 unités de *Taq* polymérase (Qiagen). Les conditions d'amplification ont consisté en 35-45 cycles de 30 sec à 94°C de dénaturation, 30 sec à 56°C d'appariement et 45 sec à 72°C d'extension. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide de kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Le séquençage a été effectué dans un volume de

7.5 µl contenant 3-4 µl d'ADN amplifié, 0.5-1.5 µl de primers à 1-3 µM et 3µl de ABI PRISM™ Dye Terminator cycle sequence Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). De l'eau a été ajoutée jusqu'à concurrence d'un volume total de 7.5µl. Les séquences ont été visualisées sur un séquenceur automatique ABI 377 (Applied Biosystems). Les séquences ont été déposées sur GeneBank (Accession numbers DQ168595-DQ168615).

Les séquences d'ADN mitochondrial ont été alignées à l'aide de la méthode Clustal (Higgins *et al.*, 1992). Nous avons utilisé deux approches pour examiner les relations phylogénétiques entre les haplotypes de *V. aspis*: les analyses de parcimonie maximale (MP) et du maximum de vraisemblance (ML), telles qu'implémentées dans PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002), ainsi que la méthode de parcimonie statistique (Tcs; Templeton *et al.*, 1992; Crandall, 1994). Alors que les analyses de MP et de ML ont des difficultés à résoudre les relations entre les haplotypes très proches, la méthode de parcimonie statistique permet d'analyser ceux-ci plus finement. Les analyses de MP ont été conduites en utilisant la méthode TBR d'échanges de branches, alors que les insertions ont été considérées comme un nouvel état (5^{ème} base). La solidité des reconstructions phylogénétiques a été évaluée grâce à 1000 répliquats de bootstraps. Pour l'analyse ML, un total de 56 modèles de substitution ont été évalué avec MODELTEST v3.06 (Posada & Crandall, 1998) et PAUP*. Le meilleur modèle choisi par la méthode du test hiérarchique

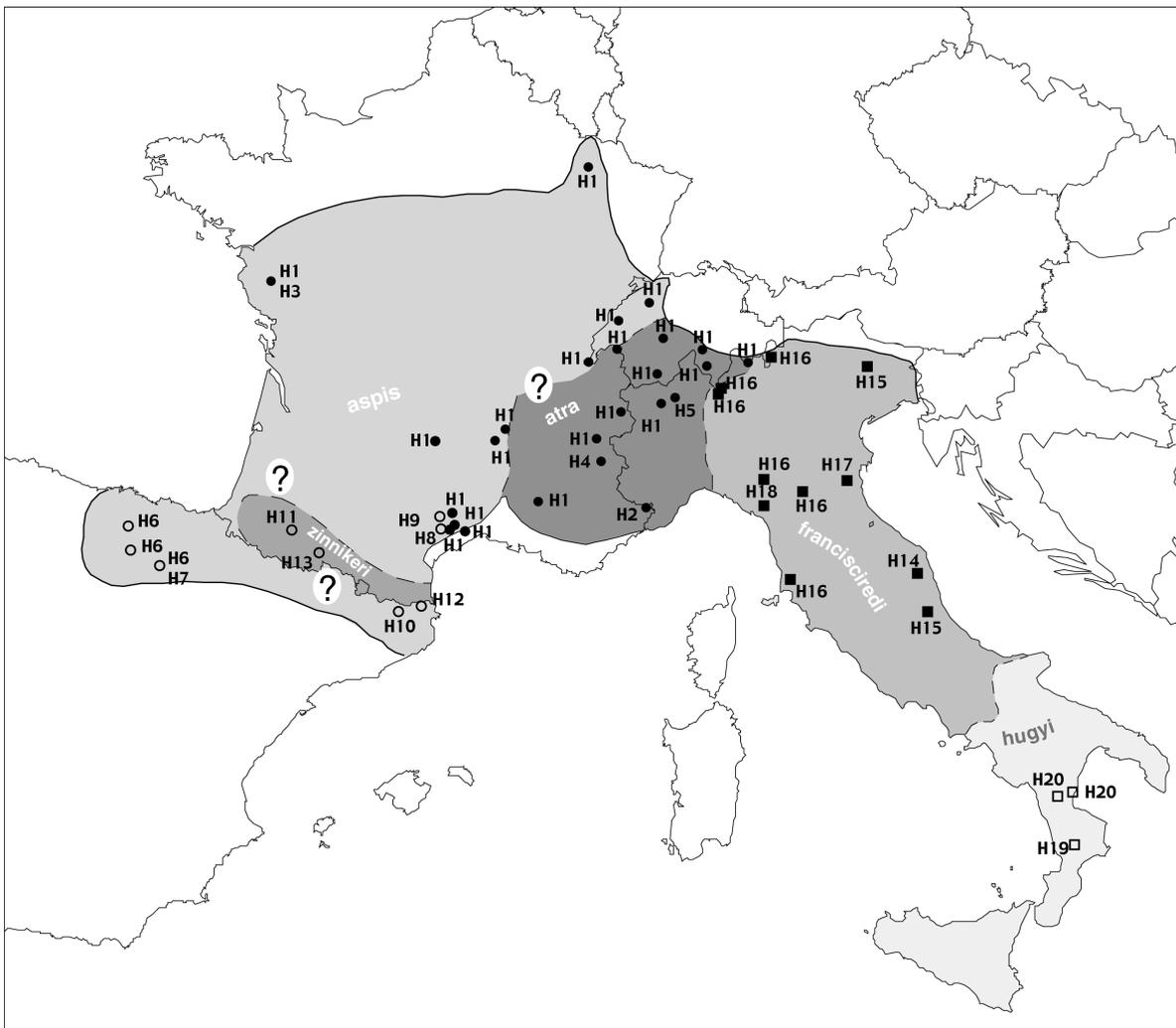


Figure 1 Localisation des échantillons de *Vipera aspis* analysés dans cette étude. Les distributions géographiques des différentes sous-espèces sont symbolisées par des couleurs différentes (basé sur Zuffi, 2002). Clade 1A: cercles blancs; clade 1B: cercles noirs; clade 2A: carrés blancs; 2B carrés noirs.

de ratio de vraisemblance a été le modèle HKY+G (fréquence A = 0.2808; fréq. C = 0.2466; fréq. G = 0.1271; fréq. T = 0.3455; ratio transitions/transversions = 1.5210; paramètre gamma = 0.3003). Les résultats de la parcimonie statistique montrent les relations généalogiques entre les haplotypes ont été présentées graphiquement par un réseau calculé par le programme TCS 1.3 (Clement *et al.*, 2000). Les distances (distances non-corrigées) entre les sous-espèces ou les clades ont été calculées par MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). La différenciation génétique a été évaluée par une analyse de variance moléculaire et par le calcul des indices Φ_{ST} à différents niveaux (AMOVA telle qu'implémentée dans ARLEQUIN 2.0, Schneider *et al.*, 2000): entre les groupes (correspondant aux clades définis par les analyses MP et ML) et à l'intérieur des groupes.

3.5 Résultats et Discussion

Parmi les 53 échantillons analysés, 20 haplotypes ont été obtenus à partir de 677 bp. de la CR. La présence de 41 (6.1%) sites variables (15.5% en intégrant les outgroups), parmi lesquels 34 (56, 8.3% incluant les outgroups) sont phylogénétiquement informatifs suivant les critères de l'analyse de MP. Une insertion au sein des *V. aspis* a été détectée, alors que 18 insertions sont observées entre les vipères aspics et les outgroups. La distance génétique (distance non-corrigée) entre les sous-espèces varie entre 0.66 et 4.4%, à l'exception de *V. a. aspis* et *V. a. atra* qui possèdent des haplotypes communs.

Les analyses de MP et de ML ont toutes les deux produit des cladogrammes similaires (données non présentées), distinguant deux clades particulièrement bien supportés chez *V. aspis*: (i) un clade Ouest (valeur de bootstraps de l'analyse MP: 91%) comprenant les échantillons d'Espagne, de France, de la majeure partie de la Suisse, ainsi que de l'extrême nord-ouest de l'Italie (*V. a. aspis*, *V. a. atra* et *V. a. zinnikeri*); (ii) un clade Est (valeur de bootstraps de l'analyse MP: 95%) regroupant les individus de la péninsule italienne à l'exception de l'extrême nord-ouest (*V. a. hugyi* et *V. a. francisciredi*). Au sein du clade Ouest, 2 groupes peuvent être définis: (1A) un sous-clade du sud (Espagne, sud-ouest de la France, appartenant tous à *V. a. zinnikeri*) et (1B) un sous-clade du nord (la majeure partie de la Suisse et de la France ainsi que l'extrême nord-ouest de l'Italie, appartenant tous à *V. a. aspis* et *V. a. atra*). Le clade Est peut aussi être divisé en (2A) un groupe du sud (*V. a. hugyi*) et (2B) un groupe central et nordique (*V. a. francisciredi*). Nos résultats confirment la systématique actuelle de cette espèce à l'exception de

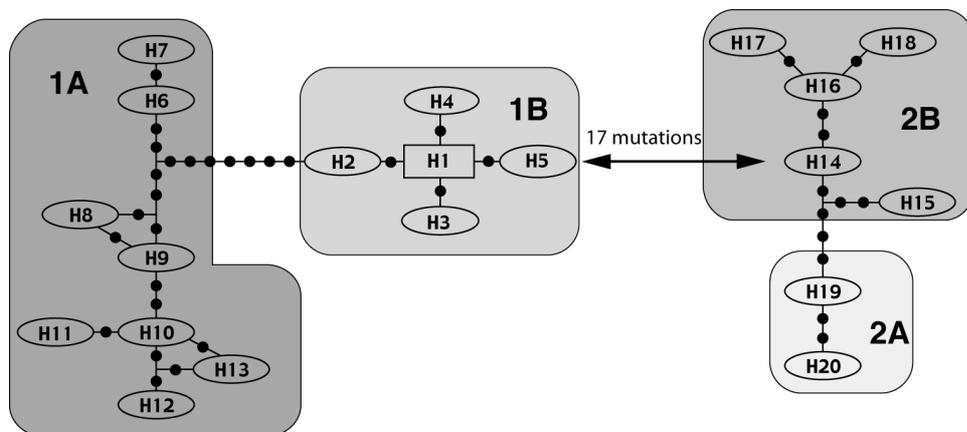


Figure 2 Réseau obtenu par parcimonie statistique avec le programme TCS (Clement *et al.*, 2000), basé sur 677 bp de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial et issu de 20 haplotypes distincts de *Vipera aspis*. Les cercles noirs représentent le nombre de mutations entre les haplotypes. L'analyse de parcimonie statistique estime à 11 le nombre maximal de mutations au sein d'un réseau pour éviter les risques d'homoplasie (confiance > 95%)

V. a. atra. Par contre, nos observations contredisent partiellement les travaux de Garrigues *et al.* (2005) concernant la position de *V. a. zinnikeri* et ceux de Zuffi (2002) qui suggérait d'élever *V. a. atra* au rang d'espèce et de mettre en synonymie *V. a. aspis* et *V. a. francisciredi*.

L'analyse de parcimonie statistique confirme les résultats obtenus par les analyses cladistiques, mais montre une meilleure résolution entre les haplotypes au sein des clades. Lorsque le nombre de mutation est inférieur ou égal à 11, les relations entre les haplotypes ont plus de 95% de probabilité d'éviter l'homoplasie (21 des 22 liens montrent un niveau de confiance significatif indiquant qu'aucun événement d'homoplasie ne soit survenu). La parcimonie statistique produit 2 réseaux (Minimum Spanning Network) liant les haplotypes mitochondriaux (Figure 2), lesquels distinguent trois lignées géographiques exclusives, correspondant au sous-clade 1A, au sous-clade 1B et au regroupement des sous-clades 2A et 2B.

L'AMOVA montre que la majeure partie de la variance totale (93.6%) est expliquée par les différences entre les clades, alors que la variance à l'intérieur des clades est limitée à 6.4% de la variance totale.

Pour les espèces tempérées, 3 principaux refuges glaciaires européens ont été proposés pour de nombreuses espèces (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000): l'Espagne, l'Italie et les Balkans. D'autres refuges nordiques ont aussi été suggérés pour les espèces supportant des conditions climatiques plus froides (voir Bilton *et al.*, 1998; Nesbø *et al.*, 1999; Seddon *et al.*, 2002). La vipère aspic montre 2 clades principaux de chaque côté du Massif Alpin. Cette importante séparation a déjà été observée chez de nombreuses espèces animales, telles que les musaraignes, du groupe *Sorex araneus* (Taberlet *et al.*, 1994), des tritons du genre *Triturus* (Wallis & Arntzen, 1989), la truite *Salmo trutta* (Bernatchez *et al.*, 1992), l'abeille *Apis mellifera* (Garnery *et al.*, 1992), ou la sauterelle *Chorthippus parallelus* (Cooper *et al.*, 1995).

La séparation de deux sous-clades en Italie issue des analyses MP et ML est plus discutable. En effet, le nombre d'échantillons provenant du sud de l'Italie est limité et le nombre de substitutions (4) entre les sous-clades 2A et 2B est faible. De plus, le manque d'échantillons dans cette région peut être la raison de la non-détection d'haplotypes intermédiaires. Néanmoins, la présence de deux (ou plus) refuges en Italie a déjà été proposé pour d'autres taxa (Demesure *et al.*, 1996; Podnar *et al.*, 2005).

Au sein de l'autre clade, 2 refuges différents ont été utilisés par les vipères aspics. Au contraire du clade italien, l'importante différence entre les deux sous-clades (moyenne: 1.82%) ne peut pas être expliquée par un manque d'échantillons, puisque la région de contact entre les deux sous-clades a été explorée de manière intensive. Alors que l'Espagne est déjà considérée comme une zone refuge importante pour de nombreuses espèces (voir Taberlet *et al.*, 1998), nous suggérons que le sud de la France a aussi été un refuge pour la vipère aspic durant la dernière glaciation. Ce refuge français a aussi été suggéré pour d'autres espèces de serpents (Chap. 4), pour le lézard vivipare (Guillaume *et al.*, 2000), le barbeau (Kotlik & Berrebi, 2001), des escargots (Pfenninger & Posada, 2002) ou pour certaines plantes (Vogel *et al.*, 1999; Palme & Vendramin, 2002). L'une des caractéristiques communes à toutes ces espèces est une faible dispersion et la possibilité de survivre dans un environnement froid et humide. En conséquence, les patterns de recolonisation proposés par Taberlet *et al.* (1998) ou Hewitt (2000) semblent être limités aux espèces à dispersion élevée, mais ne semblent pas montrer tous les refuges utilisés durant les dernières glaciations.

Les données présentées dans cette étude démontrent l'utilité de l'analyse des espèces possédant des exigences écologiques particulières telles que les reptiles pour établir la

structuration fine des régions utilisées comme refuges durant les dernières glaciations et le degré à partir duquel différentes populations ont survécu dans ces zones et ont recolonisé les zones périphériques durant les périodes interglaciaires. De manière générale, nos résultats démontrent la présence potentielle de multiples petits refuges, en complément des principaux refuges glaciaires localisés dans les péninsules méditerranéennes utilisées par les espèces tempérées européennes.

3.6 Remerciements

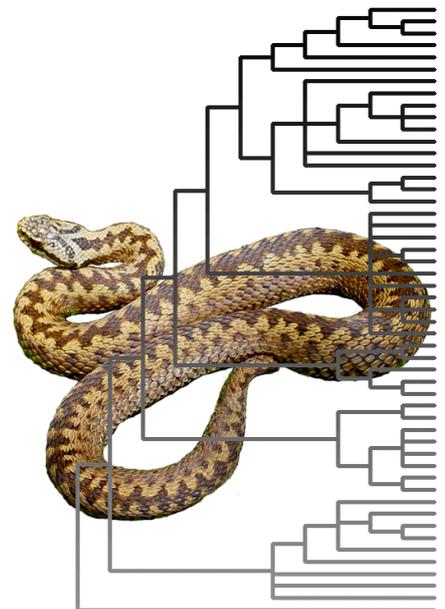
Ce travail a été financé par une bourse du Fonds National pour la Recherche Scientifique (Fonds No 3100-059132.99/1). Nous remercions M. Cocquio (Saltrio, Italie), B. & A. Conelli (Arzo, Suisse), O. Lourdaï (Chizé, France), S. Dummermuth (Oberdorf, Suisse), J. Ferrez (BTVS, Portugal), E. Garcia Franquesa (MZB, Barcelona, Espagne), J. Garzoni (Lausanne, Suisse), P. Geniez & M. Chelyan (EPHE Montpellier, France), E. Lasne (Angers, France), S. Mazzotti, A. Meyer (KARCH, Bern, Suisse), M. Nembrini (Bellinzona, Suisse), J.-M. Pillet (Ravoire, Suisse), M. Poggesi (MZUF, Firenze, Italie), B. & L. Rechsteiner (Arzo, Suisse), R. Rosoux & G. Baron (La Rochelle, France) pour la mise à disposition des échantillons.

3.7 Bibliographie

- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* Harvard University Press, Cambridge.
- Bernatchez L, Guymard R, Bonhomme F (1992) DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* **1**, 161-173.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, Searle JB (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1219-1226.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1660.
- Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GM (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the european grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **4**, 49-60.
- Crandall KA (1994) Intraspecific Cladogram Estimation - Accuracy at Higher Levels of Divergence. *Systematic Biology* **43**, 222-235.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L) in Europe. *Evolution* **50**, 2515-2520.
- Garnery L, Cornuet J-M, Solignac M (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* **1**.
- Garrigues T, Dauga C, Ferquel E, Choumet V, Failloux A-B (2005) Molecular phylogeny of *Vipera Laurenti*, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Guillaume CP, Heulin B, Arrayago MJ, Bea A, Braña F (2000) Refuge areas and suture zones in the Pyrenean and Cantabrian regions: geographic variation of the female MPI sex-linked alleles among oviparous populations of the lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Ecography* **23**, 3-10.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992) Clustal-V - Improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences* **8**, 189-191.
- Kotlik P, Berrebi P (2001) Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* **10**, 2177-2185.

- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, Ozawa T (1996) Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: Highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1242-1254.
- Nesbø CL, Fossheim T, Vøllestad LA, Jakobsen KS (1999) Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology* **8**, 1387-1404.
- Palme AE, Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* **11**, 1769-1780.
- Pfenninger M, Posada D (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* **56**, 1776-1788.
- Podnar M, Mayer W, Tvrtkovic N (2005) Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **14**, 575-588.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin, a software for population genetic data analysis. University of Geneva, Geneva.
- Seddon JM, Santucci F, Reeve N, Hewitt GM (2002) Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 463-467.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 608-613.
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet P, Fumagalli L, Hausser J (1994) Chromosomal versus mitochondrial-DNA Evolution - Tracking the evolutionary history of the southwestern european populations of the *Sorex araneus* Group (Mammalia, Insectivora). *Evolution* **48**, 623-636.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A Cladistic-Analysis of Phenotypic Associations with Haplotypes Inferred from Restriction Endonuclease Mapping and DNA-Sequence Data .3. Cladogram Estimation. *Genetics* **132**, 619-633.
- Vogel JC, Rumsey FJ, Schneller JJ, Barrett JA, Gibby M (1999) Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* **66**, 23-37.
- Wallis GP, Arntzen JW (1989) Mitochondrial-DNA variation in the crested newt subspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution* **43**, 88-103.
- Zuffi MAL (2002) A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia* **23**, 191-213.

PHYLOGEOGRAPHIE DE LA VIPERE PELIADE



Chapitre 4: Phylogéographie de la vipère péliade (*Vipera berus*) basée sur des marqueurs mitochondriaux et détermination des refuges utilisés durant le Pléistocène

S. Ursenbacher¹, M. Carlsson², V. Helfer¹, H. Tegelström² & L. Fumagalli¹

¹Laboratoire de Biologie de la Conservation, Département d'Ecologie et Evolution, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne (Suisse)

²Department of Conservation Biology and Genetics, EBC, Uppsala University, Norbyv. 18D, SE-752 36 Uppsala (Suède)

Ce Chapitre a été soumis à Molecular Ecology

4.1 Résumé

La phylogéographie de la vipère péliade (*Vipera berus*) a été examinée par l'analyse de l'ADN mitochondrial de 1043 bp du cytochrome b et 918 bp de la région de contrôle. Nos résultats suggèrent que la région de contrôle (qui est dupliquée chez les vipères) et le cytochrome b évoluent à une vitesse comparable chez cette espèce. Les analyses phylogénétiques montrent que les péliades sont divisées en trois lignées mitochondriales, issues de zones de refuges déjà décrites pour d'autres espèces. Cependant, le clade le plus nordique montre une structuration importante, probablement due à des refuges secondaires en France et dans les Carpates. De plus, les péliades du nord-ouest de l'Europe appartiennent à des populations relictuelles, qui se sont réfugiées dans des zones différentes et localisées au nord des Alpes. En conséquence, il semble que les péliades, comme probablement d'autres espèces, ont utilisé des refuges au sud de l'Europe ainsi que des refuges plus "cryptiques" dans les zones nordiques.

4.2 Abstract

The phylogeography of the adder (*Vipera berus*) was examined by analysing mitochondrial DNA (mtDNA) sequence variation in 1043 bp of the cytochrome b and in 918 bp of the control region. Our results suggest that both the duplicated control region and cytochrome b evolve at a similar rate in this species. Phylogenetic analyses of our data show that adders are divided into three major mitochondrial lineages, resulting from refugia already described for other species. However, the most northern clade shows an important structure, probably due to secondary refugia located in the French and Carpathian regions. Moreover, adders from the northwest of Europe belong to an additional refugial population, distinct from other and located north of the Alps. Thus, it seems that adders, as probably other species, have used southern and more northern "cryptic" refugia.

4.3 Introduction

La recolonisation des zones eurasiatiques désertées durant les rigoureuses périodes glaciaires a été sujette à de nombreuses études, particulièrement durant les dix dernières années grâce aux progrès des techniques génétiques (Hewitt, 2000). La distribution actuelle des espèces tempérées est le résultat de nombreux mouvements induits par les changements climatiques passés. De manière générale, il est considéré que la faune et la flore européennes ont survécu aux dernières glaciations dans l'une des trois péninsules du sud du continent européen (péninsules ibérique, italienne et balkanique) ou plus à l'est, dans la région du Caucase. A partir de ces zones refuges, les espèces ont recolonisé les zones nordiques durant les périodes climatiquement plus clémentes (périodes interglaciales, voir Hewitt 1996). Ce pattern de recolonisation a été corroboré chez plusieurs organismes par l'étude génétique (Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 1999), l'isolement des individus dans ces différents refuges conduisant ces animaux à se diversifier génétiquement. Néanmoins, des études récentes basées sur des données fossiles et phylogéographiques ont suggéré la présence d'autres refuges, plus nordiques, contredisant ainsi les études préalables. (par exemple Bilton *et al.* 1998; Stewart & Lister 2001; Brunhoff *et al.* 2003; Haase *et al.* 2003; Palmé *et al.* 2003).

Par sa forme haplotypique et puisqu'il est hérité uniquement de manière maternelle, l'ADN mitochondrial est devenu le marqueur moléculaire privilégié pour les études phylogénétiques et phylogéographiques chez les animaux. La variation de l'ADN mitochondrial a procuré de considérables informations permettant de résoudre la phylogéographie de nombreuses espèces (Avice 2000). La région de contrôle (CR), portion de l'ADN mitochondrial non-codant, a été l'une des parties les plus étudiées puisqu'elle possède suffisamment de variations pour les études intraspécifiques (Brown *et al.* 1986; Moritz *et al.* 1987). Une autre portion souvent étudiée est le cytochrome b (cyt. b), et dans une moindre mesure les sous-unités de la NADH déshydrogénase (ND1 à ND6). Dans certains cas, ces gènes ont montré un niveau de variation aussi élevé voire plus important que la CR, bien que ces parties soient des régions codantes et qu'elles devraient être plus exposées à une pression de sélection (Questiau *et al.* 1998; Randi *et al.* 2001). Néanmoins, plusieurs auteurs ont critiqué l'utilisation de la CR dans les études intraspécifiques chez certaines espèces de serpents puisque la variabilité de la CR n'était pas suffisante (Ashton & de Queiroz 2001; Douglas *et al.* 2002). Kumazawa *et al.* (1996) ont montré que la CR de l'ADN mitochondrial des serpents était dupliquée pour les familles avancées de serpents (comme les Colubridae, les Elapidae et les Viperidae) et que les deux séquences sont soumises à une forte évolution concertée avec, au plus, seulement quelques paires de bases différentes entre les deux CR.

La vipère péliade (*Vipera berus*) est le serpent terrestre possédant l'aire de répartition la plus importante au monde, recouvrant approximativement le tiers du continent eurasiatique (Saint Girons 1980). Elle peut être observée de l'Ecosse jusqu'à la côte Pacifique russe, et de l'Albanie et la Grèce au sud jusqu'au cercle arctique au nord (69°N) en Scandinavie (voire Figure 1). Trois sous-espèces sont actuellement reconnues: *V. berus bosniensis* (Boettger 1880) qui est présente dans la péninsule Balkanique et *V. b. sachalinensis* (Zarevsky 1917) qui est limitée à l'île de Sakhaline et l'extrême est de la Russie. La forme nominale *V. b. berus* est répartie dans toutes les autres parties de l'aire de répartition. La péliade supporte des températures basses, elle est donc présente en montagne dans des altitudes assez élevées (1000-2600 m) dans le sud de son aire de répartition (Gasc *et al.* 1997). Cette espèce présente une faible variation morphologique, comme suggéré par l'importante répartition de la forme nominale (Saint Girons 1978). Plusieurs recherches ont étudié les variations génétiques des péliades au niveau local

(Stille *et al.* 1986; Madsen *et al.* 2000; Carlsson & Tegelström 2002); néanmoins, aucun travail a étudié la variation génétique de la péliade sur l'entier de son aire de répartition.

Le but de cette étude est de caractériser la structure des populations et l'historique de colonisation des péliades dans l'entier de l'aire de répartition à l'aide de marqueurs mitochondriaux. Cette étude, basée sur un reptile adapté aux conditions nordiques, permettra d'apporter de nouvelles perspectives aux contradictions entre les hypothèses basées uniquement sur les refuges nordiques et les postulats arguant des refuges additionnels en Europe centrale.

L'accroissement rapide des populations à la suite des contractions post-glaciaires a été testé pour les populations du sud et du nord. Les modèles d'expansion/contraction (Nichols & Hewitt 1994; Hewitt 1996) suggèrent que les contractions et les expansions régulières des aires de répartitions conduisent les populations nordiques à disparaître durant les périodes froides alors qu'elles migrent en direction du nord pendant les périodes inter-glaciaires. On s'attend donc à ce que les populations nordiques de péliades montrent une diversité génétique inférieure aux populations du sud à cause des événements fondateurs, exposant ainsi une signature génétique de population en expansion rapide, telle que prédits par ces modèles. Finalement, les données génétiques présentées dans cette étude pourront partiellement combler le manque de phylogéographie chez les serpents du Paléarctique.

4.4 Matériel et Méthodes

Echantillonnage

Afin d'évaluer la diversité génétique chez la péliade, des échantillons ont été collectés sur l'entier de l'aire de répartition, avec un biais pour les zones de refuges présumées dans le sud de l'Europe. Des échantillons issus de 80 spécimens répartis dans 60 localités (Figure 1) et 1 spécimen de *Vipera seoanei* utilisé comme outgroup ont été obtenus sur le terrain ou à partir de collections (voire Annexe 3). Suivant l'origine du matériel, l'ADN a été extrait à partir de sang, de mues ou de tissus. Les échantillons de tissus ont été prélevés sur des animaux congelés ou préservés en alcool dans différentes collections, les mues ont été collectées dans la nature, alors que le sang a été extrait à partir de la veine caudale sur des animaux vivants capturés dans la nature (Bush & Smeller 1978) et maintenu dans un tampon (*Queen's lysis buffer*, voir Seutin *et al.* 1991) ou dans de l'éthanol. L'ADN génomique total a été extrait soit par l'utilisation de kits QIAamp DNA Mini Kit ou DNEasy Tissue Kit (Qiagen), soit par l'utilisation de la procédure au sel (Paxton *et al.* 1996).

Analyses génétiques

Une partie de la CR (918 bp) de l'ADN mitochondrial a été séquencé pour tous les échantillons. Une partie importante (1043 bp) du cyt. b a aussi été séquencée pour une sélection des 50 individus de ces animaux, représentatif de la diversité haplotypique de la CR. Après alignement de trois séquences de l'ADN mitochondrial publiés (Kumazawa *et al.* 1996; Kumazawa *et al.* 1998), des primers spécifiques ont été créés; une première partie de la CR a été amplifiée à l'aide des primers L16148VA (5'-TCTCTAGCCCCAAAGCTAG-3') et H16551VA (5'-AGCCAGAGGCCTTGGAAAGAG-3') (voir Figure 2, Chap. 1 pour la position des primers). Les valeurs correspondent à la position sur la molécule de l'ADN mitochondrial de *Dinodon semicarinatus* séquencé par Kumazawa *et al.* (1998). La seconde partie amplifiée à l'aide des primers L16571VA (5'-CTCTTTCCAAGGCCTCTGGCT-3') et H690 (Kumazawa *et al.* 1996) est située sur la CR dupliquée présente chez les serpents avancés (Kumazawa *et al.* 1996; Kumazawa *et*

al. 1998). Ces deux copies de la CR sont pratiquement identiques chez les serpents avancés déjà étudiés (Kumazawa *et al.* 1996), et totalement identique chez la seule péliade testée (totalisant 1101 bp pour les deux copies de la CR; V. Helfer, données non publiées). Le cyt. b a été amplifié avec les primers L14724Vb (5' - G A T C T G A A A A C C A C C G T T G - 3') , H 1 5 5 4 8 V b (5' - A A A T A G A A A G T A T C A T T C T G G T T T A A T - 3') , L 1 5 1 6 2 V b (5'-CTCCCATGAGGACAAATATC-3') et H15914Vb (5'-CCAGCTTTGGTTTACAAGAAC-3') (voir Figure 2, Chap. 1 pour la position des primers), créés à partir de plusieurs séquences de reptiles publiées (Kumazawa & Nishida 1995; Kumazawa *et al.* 1996; Janke & Arnason 1997; Kumazawa *et al.* 1998) ainsi qu'une partie du cyt. b de *V. ursinii* déposée dans GeneBank (accession No AF182552). La chaîne de réaction de polymérase (PCR) a été réalisée dans un volume de 25 µl contenant 2 µl du produit d'extraction, 1x de tampon PCR (Qiagen), 2mg/ml de Q solution (Quiagen), 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.5µM de chaque primer et 0.5 unité de *Taq* polymérase (Qiagen). Les conditions d'amplification ont consisté en 35-45 cycles de 30 sec à 94°C de dénaturation, 30 sec à 56°C d'appariement pour la première partie de la CR et 59°C pour la seconde partie, et 45 sec à 72°C d'extension. Les conditions PCR pour le cyt. b étaient: 35-45 cycles à 94°C durant 45 sec, 50°C pendant 60 sec et 72°C durant 90 sec. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Le séquençage a été effectué avec les primers H16551VA, L16571VA, H690, L14724Vb et H15914Vb dans un volume total de 7.5 µl contenant 3-4 µl d'ADN amplifié, 0.5-1.5µl de primer à 1-3 µM et 3µl de ABI PRISM™ Dye Terminator cycle sequence Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). De l'eau a été ajoutée jusqu'à concurrence de 7.5µl de volume total. Les séquences ont été visualisées sur un séquenceur automatique ABI 377 (Applied Biosystems). Les séquences seront déposées sur GeneBank (Accession numbers DQ185938-DQ186080).

Analyses des séquences

Les séquences de l'ADN mitochondrial ont été alignées à l'aide de la méthode Clustal (Higgins *et al.* 1992). La saturation a été testée pour la première, la seconde et la troisième position des codons du cyt. b, ainsi que pour les transitions et les transversions de la troisième position des codons du cyt. b en comparant les distances par paires non-corrigées avec les distances par paires corrigées selon Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993), calculées avec PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). La saturation dans les données combinant la CR et le cyt. b a aussi été testée en comparant les distances non-corrigées et les divergences corrigées selon Tamura-Nei. Afin d'évaluer le taux relatif d'évolution entre la CR et le cyt. b, les distances non-corrigées par paire ont été comparées.

Analyses phylogénétiques

Seule les 51 animaux qui ont été séquencés aussi bien pour la CR (918 bp) et le cyt. b (1043 bp) ont été utilisés pour les analyses phylogénétiques. Les séquences ont été analysées avec PAUP*. Nous avons effectué un test d'homogénéité (1000 replicats) afin d'évaluer si les deux régions analysées peuvent être combinées dans un jeu de données unique (Farris *et al.* 1995). Une évaluation du caractère non aléatoire des données a été effectuée en estimant la valeur du g_1 (skewness) de la distribution des longueurs des arbres sur un échantillon aléatoire de 10000 arbres aléatoires générés par PAUP* pour le jeu de données regroupant la CR et le cyt. b, ainsi que pour les données de la CR seule, et du cyt. b seul (ainsi que pour tous les codons indépendamment) (Hillis and Huelsenbeck, 1992). Les analyses de maximum de parcimonie (MP) ont été réalisées (recherches heuristiques avec des additions pas-à-pas aléatoires et la méthode TBR d'échange de branches) avec les insertions considérées comme un nouvel état (5^{ème} base), la solidité de l'arbre consensus a été testé avec 10'000 bootstraps. Le jeu de

données combiné a aussi été analysé avec l'analyse de maximum de vraisemblance (ML) et la méthode de distance Neighbor-joining (NJ). Pour les analyses ML, le meilleur modèle de substitution choisi par MODELTEST v3.06 (Posada & Crandall 1998) a été TIM+I+G (freq. A = 0.2902; freq. C = 0.2840; freq. G = 0.1159; freq. T = 0.3099; proportion de sites invariants = 0.7146; gamma = 0.9549). Les analyses NJ ont aussi été effectuées en utilisant le modèle TIM+I+G, comme suggéré par MODELTEST. La stabilité des arbres a été testée par 10'000 bootstraps pour les analyses NJ et 100 bootstraps pour les analyses ML. Toutes les analyses indiquées ci-dessus ont aussi été réalisées pour la CR et le cyt. b séparément, avec les modèles optimisés pour chaque jeu de données.

La diversité nucléotidique (π) entre les groupes phylogénétiques a été calculée à l'aide d'Arlequin V 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Les résultats obtenus ont été comparés par une ANOVA.

Afin de détecter un signe de croissance rapide d'une population à partir d'un groupe fondateur restreint, nous avons étudié la distribution des différences par paires entre tous les animaux. Ces distributions ont aussi été utilisées pour dater l'expansion des clades génétiques (τ) (Rogers 1995; Rogers & Jorde 1995). Les distributions ont été tracées et testées par un test de goodness-of-fit en utilisant des bootstraps

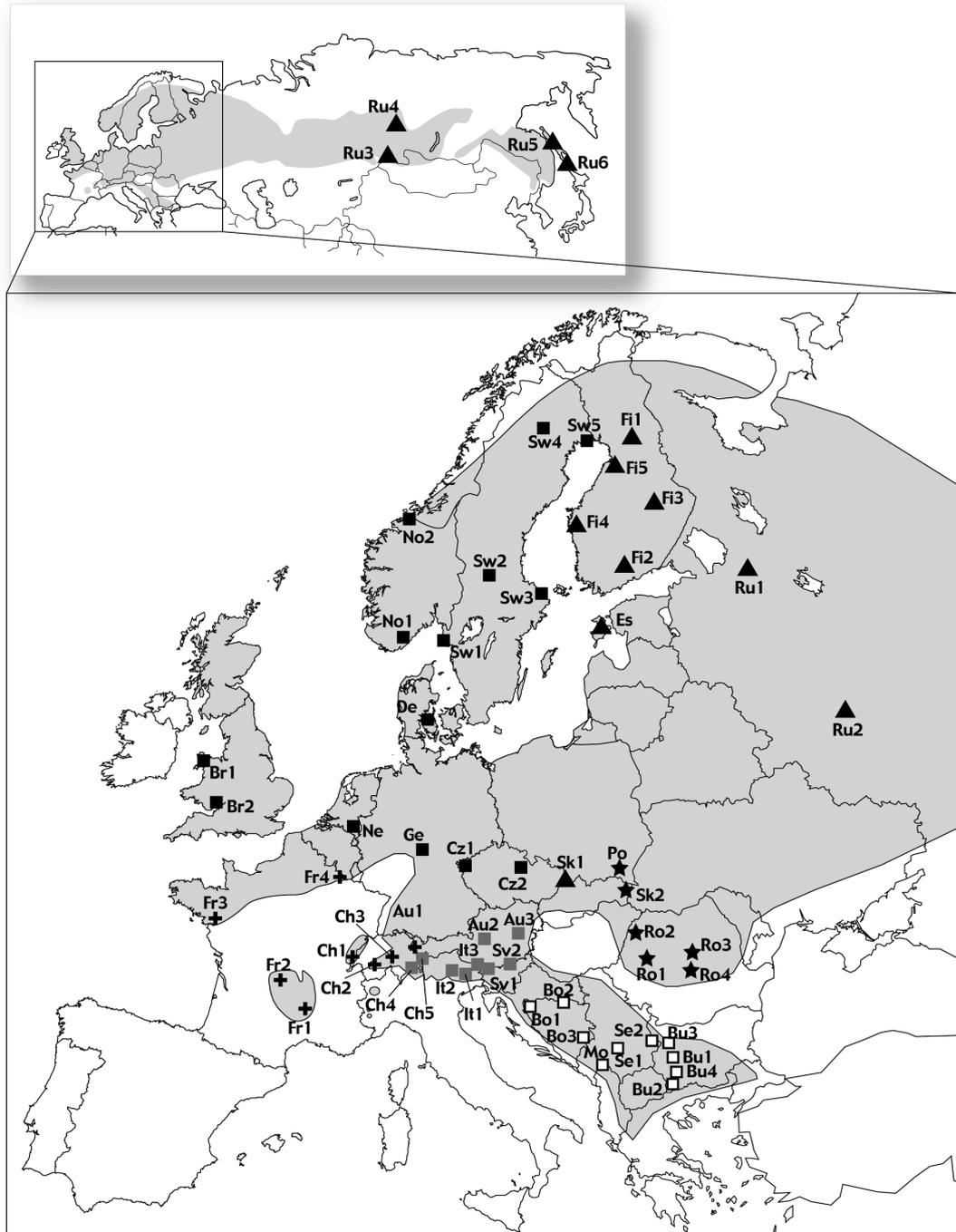


Figure 1 Localisation des 80 péliades étudiées dans cette étude provenant de 60 sites. Le nom des localités correspond au numéro d'identification des individus et les symboles se réfèrent aux affinités phylogénique présente en Figure 2.

paramétriques (1,000 réplicats) avec ARLEQUIN. De plus, le test de Tajima (Tajima, 1989) a été utilisé pour tester si une expansion rapide s'était produite (voir Aris-Brosou & Excoffier, 1996). Ce test, basé sur la distance entre haplotypes a été utilisé à la place du test de Fu (Fu, 1997), lequel est basé sur la fréquence des haplotypes. Le test de Fu est plus régulièrement utilisé, mais il ne peut pas être employé sur notre jeu de données puisque nous avons que des haplotypes différents.

Un taux de mutation de 1.4% par millions d'années (Myr), tel que proposé par Wüster *et al.* (2002) pour le cyt. b et le ND4 (lesquels sont caractérisés par un taux de substitution similaire) et un temps de génération de 5 ans a été utilisé pour l'évaluation du temps d'expansion.

4.5 Résultats

Analyses des données

Un total de 45 haplotypes de la CR ont été obtenus à partir des 80 échantillons de *Vipera berus*. 75 (8.1%) sites variables (10.9% en incluant l'outgroup) ont été observés, dont 45 (4.9%, 5.3% en incluant l'outgroup) sont phylogénétiquement informatifs sous les critères de MP. Quatre insertions ont été observées entre les échantillons de péliades, alors que trois insertions supplémentaires ont été remarquées avec l'outgroup. Pour le jeu de données combinant la CR et le cyt. b, comprenant 1961 bp à partir de 50 échantillons de *Vipera berus*, 147 sites (7.5%) sont variables (11% incluant l'outgroup), dont 91 sites (4.6%) sont informatifs selon les critères de la MP (4.8% en incluant l'outgroup). La distance génétique non corrigée (p) s'étend de 0 à 2.6% entre les péliades, alors que la distance entre *V. berus* et *V. seoanei* varie entre 4.8 et 5.7%.

Nous avons testé la saturation chez la CR et le cyt. b (tout le gène et chaque codon séparément). A l'intérieur de *V. berus*, de légers signes de saturations sont observables pour les transitions du 3ème codon, alors que cette saturation est évidente entre *V. berus* et l'outgroup pour les deux gènes (graphiques non montrés). De plus, les statistiques g_1 ont été mesurées pour la CR ($g_1 = -0.497$: $p < 0.01$) et pour le cyt. b ($g_1 = -0.769$: $p < 0.01$), ainsi que pour chaque codon du cyt. b ($g_1 = -0.909$: $p < 0.01$ pour la 1ère position; $g_1 = -0.927$: $p < 0.01$ pour la 2ème position et $g_1 = -0.737$: $p < 0.01$ pour la 3ème position). Ces données indiquent que tous les codons possèdent un signal phylogénétique fort. Pour cette raison, la saturation n'a pas été considérée comme un facteur significatif et toutes les positions nucléotidiques ont été utilisées de manière égales dans les analyses suivantes. De plus, la différence génétique inter- et intraspécifiques entre la CR et le cyt. b indiquent un taux d'évolution similaire entre ces deux gènes (pour les distances non corrigées entre *V. berus*, $y = 1.076x$, $r^2 = 0.507$, $p < 0.01$).

Analyses phylogénétiques

Le test d'homogénéité montre aucun conflit entre les reconstructions réalisées à partir de la CR et du cyt. b ($p = 0.143$). En conséquence, nous avons décidé de présenter uniquement les analyses réalisées avec le jeu de données combiné.

Les analyses MP, NJ et ML montrent trois clades phylogéographiques bien séparés, avec une séparation du clade le plus répandu en quatre sous-clades phylogéographiquement et géographiquement distinguable, même si le support des bootstraps est faible (Figure 2). Le premier clade (le clade italien) inclut tous les échantillons d'Italie, du nord de la Slovénie, de l'Autriche (à l'exception de l'extrême ouest) et le sud-est de la Suisse. Le second clade (le clade balkanique) contient tous les *V. berus bosniensis* provenant de la péninsule Balkanique. Le troisième clade (le clade nordique) regroupe toutes les péliades de l'Europe à l'est, à l'ouest et au nord des Alpes, ainsi que les animaux de la partie asiatique de l'aire de répartition. Ce clade peut être subdivisé en un sous-clade

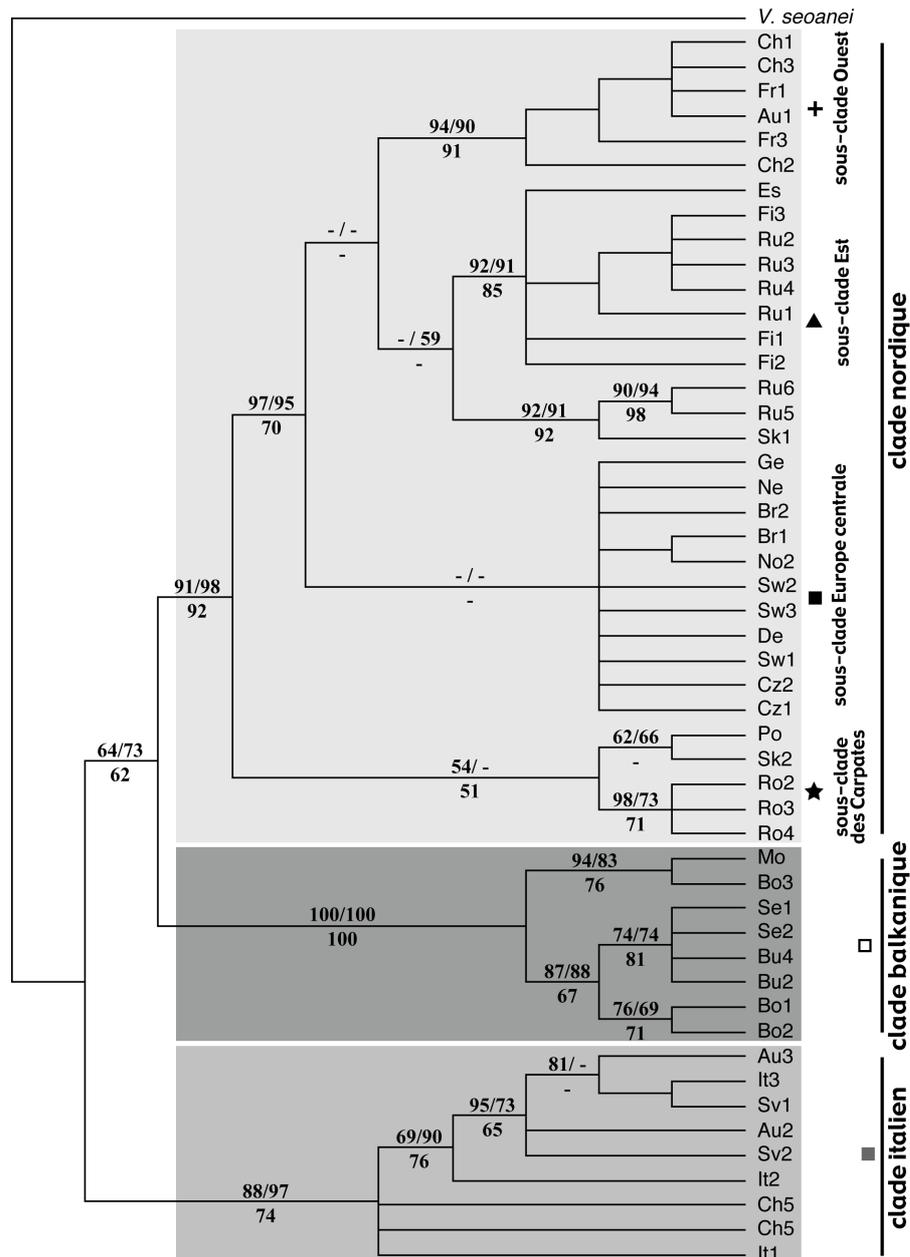


Figure 2 Arbre de parcimonie maximale issu du strict consensus des 18'900 arbres les plus courts (307 pas) basé sur le jeu de données combiné (région de contrôle et cytochrome b) pour *Vipera berus*. Les valeurs de bootstraps sont indiquées pour les nœuds présentant plus de 50% des 10'000 répliqués de l'analyse de distance Neighbour-Joining, des 10'000 répliqués de l'analyse de parcimonie maximale et des 100 répliqués obtenus pour l'analyse de maximum de vraisemblance. Les codes d'identifications et les symboles correspondent aux populations échantillonnées visibles sur la Figure 1. Note: deux animaux de la population Ch5 présentent des haplotypes différents.

Tableau 1 Valeurs des paramètres issus des analyses de distribution des différences par paires, de la divergence par paire de nucléotides (m) et la valeur des test d'expansion récente de la population.

	clade nordique	intervalle de confiance 95%	clade italien	intervalle de confiance 95%	clade balkanique	intervalle de confiance 95%
t	11.3	6.88 - 20.5	10.07	4.10 - 25.1	7.51	3.46 - 11.4
q ₀	2.25	0 - 6.59	6.10	0 - 24.4	0.013	0 - 4.15
q ₁	38.9	22.3 - 1289	37.8	16.7 - 4690	32.1	11.8 - 6687
m	11.4	7.70 - 15.7	11.9	7.28 - 22.1	5.89	3.68 - 9.75
Tajima's D	-1.389		-0.407		-0.522	
p	0.064		0.353		0.332	
Test du goodness-of-fit	0.0021		0.0360		0.0307	
p	0.936		0.358		0.447	
<hr/>						
Datation de l'expansion basé sur t (Myr)	1.03	0.63 - 1.87	-	-	-	
Datation de l'expansion basé sur m (Myr)	1.04	0.70 - 1.43	-	-	-	

basal (sous-clade des Carpates), regroupant les animaux de la Roumanie, de l'est de la Slovaquie, du sud de la Pologne, alors que le reste des haplotypes forme un groupe nordique supporté avec de hautes valeurs de bootstraps. Ce dernier groupe contient trois sous-clades monophylétiques. Toutes les péliades de Russie et de Finlande forment un sous-clade distinct (le sous-clade Est), tout comme les péliades de France, de Suisse et le l'extrême ouest de l'Autriche sont regroupées au sein du sous-clade Ouest. Tous les autres haplotypes du clade nordique forment un groupe basé sur un seul caractère non équivoque, ce qui implique un manque de support des bootstraps. La majorité des haplotypes à l'intérieur de ce groupe sont phylogénétiquement non résolus, avec des variations seulement sur les branches terminales, mais tous sont originaires du nord-ouest de l'Europe.

La diversité nucléotidique varie au sein des clades entre 0.33 et 0.62%, le clade balkanique montrant une valeur plus faible que les clades italien et nordique. En fait, la différence entre le clade nordique et les clades du sud (clades italien et balkanique) n'est pas significative ($p = 0.72$). La distance génétique corrigée selon Tamura-Nei s'étend entre 1.7 et 2.0%. Le clade italien et le clade nordique sont les moins divergents, alors que la distance la plus importante est observée entre le clade balkanique et le clade italien.

Les tests d'expansion de populations ne sont pas significatifs pour le test de goodness-of-fit pour les 3 clades (Tableau 1). Le test de neutralité de Tajima montre des valeurs clairement non-significatives pour les clades italien et balkanique. La valeur du test de Tajima pour le clade nordique montre une tendance ($p = 0.064$), malgré le nombre d'animaux peu élevé ($n = 33$) et le caractère très conservatif de ce test. Ainsi, et malgré la valeur non-significative du test de Tajima, nous avons daté la période d'expansion de la population du clade nordique à partir des distributions des distances génétiques (τ) ainsi qu'à partir de la moyenne des différences nucléotidiques par paire (m). Le temps d'expansion estimé est comparable entre ces méthodes pour ce clade (Tableau 1).

4.6 Discussion

Comparaison du taux d'évolution de la CR et du cyt. b

La CR est souvent utilisée pour les analyses phylogéographiques au niveau intraspécifique à cause de son haut degré de variabilité puisque cette partie subit des contraintes fonctionnelles plus faibles que les parties codantes de l'ADN mitochondrial (Vilà *et al.* 1997; Barratt *et al.* 1999; Doukakis *et al.* 1999; Nesbø *et al.* 1999; Steinfartz *et al.* 2000; Terry *et al.* 2000). Toutefois, chez certaines espèces d'oiseaux et de serpents, le taux de substitution est comparable voir plus faible que pour le cyt. b ou d'autres gènes mitochondriaux (Questiau *et al.* 1998; Ashton & de Queiroz 2001; Randi *et al.* 2001). Nos résultats montrent un taux d'évolution de la CR chez la péliade pas plus élevé que celui du cyt. b et les deux gènes semblent être utiles comme marqueurs moléculaires pour étudier la phylogéographie au niveau intraspécifique, au moins dans le genre *Vipera*. Le faible taux d'évolution de la CR chez certains oiseaux et certains serpents suggère une possible contrainte sur cette partie de l'ADN mitochondrial. La présence de deux (ou plus) copies de la CR chez certains oiseaux et les serpents évolués peut avoir une influence sur le taux de substitution (Questiau *et al.* 1998; Ashton & de Queiroz 2001; Randi *et al.* 2001). En séquençant une partie de l'ADN mitochondrial, il y a toujours le risque d'amplifier un pseudogène de la CR intégré dans l'ADN nucléaire (voir Sorenson & Fleischer 1996; Zhang & Hewitt 1996). Ce n'est pas un problème pour les régions codantes comme le cyt. b, puisque des codons stop sont rencontrés, mais le risque est présent pour la CR qui est non-codante. Néanmoins, il est peu probable que nous ayons amplifié une copie nucléaire de la CR puisque nos séquences étaient aisées à lire, sans bruit de fond dans les électrophéogrammes (voir Questiau *et al.* 1998). De plus, la lecture de plus de 3'000 bp continus depuis le 3' du cyt. b jusqu'à la 2ème copie de la CR a été effectuée pour plusieurs individus de 4 espèces du genre *Vipera* (V. Helfer & A. Conelli, données non publiées) à partir des primers créés pour cette étude, les pseudogènes intégrés dans l'ADN mitochondrial étant en général de petite taille. Finalement, la partie codante (cyt. b), lorsqu'elle est traduite en acides aminés, donne une séquence comparable aux autres séquences de reptiles publiées (Kumazawa *et al.* 1996), sans insertion ou mutation non-sens. Ensemble, ces patterns sont consistants avec une origine mitochondriale de la CR et du cyt. b amplifiés dans la présente étude.

Reconstructions phylogéographiques des routes de recolonisation et refuges potentiels

Les analyses phylogénétiques basées sur les reconstructions MP, NJ et ML ont révélé la présence de trois clades principaux possédant des distributions géographiques non-chevauchantes. Le premier clade est géographiquement limité à l'Italie et ses régions périphériques (Autriche, Slovénie et sud-est de la Suisse). Le second clade est localisé dans les Balkans et regroupe tous les échantillons de l'aire de répartition de *V. b. bosniensis*. Finalement, le troisième clade regroupe les péliades depuis la Grande-Bretagne à l'ouest et jusqu'à l'extrême est de la Russie, et au nord jusqu'au cercle polaire en Scandinavie (Figure 2). Toutes les études disponibles sur les squamates suggèrent un taux de substitution variable entre 0.5 et 1.4% de divergence par Myr. pour différentes régions de l'ADN mitochondrial (Zamudio & Greene 1997; Gubitza *et al.* 2000; Malhotra & Thorpe 2000; Wüster *et al.* 2002). Ces estimations comportent des gènes mitochondriaux caractérisés par un taux de substitution faible (comme le 12S et 16S-rRNA) ainsi que des régions évoluant plus rapidement (cyt. b et ND4). Pour cette raison, Wüster *et al.* (2002) suggèrent un taux de divergence de 1.4% pour le cyt. b. En appliquant cette évaluation à nos données, nous pouvons dater la séparation des clades à environ 1.4 Myr (distance corrigée selon Tamura-Nei entre les clades: 1.89%). Même si

cette estimation doit être prise avec précaution à cause d'un manque de calibration, il permet de donner une évaluation raisonnable. En conclusion, nous suggérons que la division entre les trois clades principaux de péliades s'est probablement passée durant le milieu du Pléistocène.

En plus de la structure phylogéographique décrite ci-dessus, le clade nordique montre une structure interne. Ce clade est divisé en quatre sous-clades géographiquement séparés (Figure 2). Certains des nœuds définissant ces sous-clades ont un support (bootstraps) faible car lié à seulement quelques mutations, ils sont néanmoins discernables dans les reconstructions MP et NJ. Cependant, en considérant que les populations de péliades issues des sous-clades ont été séparées dans différents refuges durant la dernière glaciation, une petite différence génétique des sous-clades est informative si elle est consistante géographiquement. Le clade nordique contient un sous-clade basal localisé dans la région des Carpates. Nos résultats indiquent que cette région doit être la source du clade nordique, tous comme plusieurs études sur les petits mammifères l'ont déjà démontré (Bilton *et al.* 1998; Seddon *et al.* 2002). Des refuges additionnels pour les autres sous-clades peuvent être identifiés, correspondant au pattern décrit par Bilton *et al.* (1998) et Nesbø *et al.* (1999). Le clade Est (voir Figure 2) inclut toutes les péliades de l'est de l'Europe jusqu'à la côte Pacifique russe, impliquant la présence de péliades présentes dans au moins un refuge localisé au nord-est ou à l'est des Carpates durant les dernières glaciations (0.94% de divergence génétique; 0.7 Myr). Il y a aussi de fortes évidences pour la présence d'une population réfugiée à l'ouest des Alpes (sous-clade Ouest), probablement au sud de la région du Massif central ou sur la côte Atlantique (0.29% de différence génétique avec les autres sous-clades; 0.2 Myr). Cette estimation grossière est en concordance avec une subdivision de la population survenue lors de la deuxième glaciation (Saahle) (Rohling *et al.* 1998). Un refuge dans le sud de la France a déjà été suggéré par Guillaume *et al.* (2000) pour le lézard *Lacerta (Zootoca) vivipara*, qui est actuellement en sympatrie avec *V. berus* dans la majeure partie de son aire de répartition, ainsi que pour plusieurs espèces de plantes (Konnert & Bergmann 1995; Comes & Abbott 1998; Vogel *et al.* 1999). De plus, d'autres exemples basés sur le barbeau (Kotlik & Berrebi 2001), une espèce d'escargot (Pfenninger & Posada 2002), le noisetier (Palme & Vendramin 2002) et certains ptéridophytes (Vogel *et al.* 1999) fournissent des évidences que le sud de la France a aussi été utilisé comme zone de refuge durant les dernières glaciations. Quelques lignées de l'Europe centrale (au nord des Alpes), lesquelles n'ont pas de liens phylogénétiques bien définis dans notre analyse, proviennent de toute évidence d'autres refuges que ceux décrits ci-dessus, mais plutôt de refuges inédits localisés au nord des Alpes entre la France et la Pologne.

Toutes les séparations décrites ci-dessus présentes dans les sous-clades nordiques sont apparues durant les derniers cycles glaciaires du Quaternaire (Rohling *et al.* 1998), suggérant ainsi la persistance de populations-refuges dans le nord des Alpes. Ces résultats sont aussi confirmés par les évaluations issues des distributions de distance par paire. L'expansion des péliades du clade nordique peut être datée à partir du mode de la distribution des distance par paire (τ) et à partir de la moyenne du nombre de différence (m), suggérant que le nombre de péliades du clade nordique a rapidement augmenté il y a environ 1 Myr (Tableau 1). De plus, l'importante diversité génétique au sein du clade nordique (au même niveau ou plus importante que pour les clades du sud) conforte l'hypothèse de la persistance de grandes populations dans le nord de l'Europe durant le Quaternaire. Ainsi, nos données confirment la présence de refuges nordiques pour les péliades, même si la résolution phylogéographique ne nous permet pas de spéculer sur les localisations de ces zones de refuges (voir aussi Bucci & Vendramin 2000; Haase *et al.* 2003).

Plusieurs études de taxons européens démontrent que les trois péninsules localisées dans le sud de l'Europe (péninsules ibérique, italienne et balkanique) ont été des zones de refuges glaciaires. Il a été démontré que l'un ou plusieurs de ces refuges ont été la source des populations actuelles qui occupent actuellement des milieux préalablement inhospitaliers dans la partie nordique du continent (voir Taberlet *et al.*, 1998 et Hewitt, 2000). Taberlet et collaborateurs (1998) ont caractérisé trois principales routes de recolonisation à partir des refuges méditerranéens, contribuant de manière diverse à la recolonisation des parties nordiques du continent européen. Néanmoins, des patterns de recolonisation alternatifs ont été proposés pour des petits mammifères ou des plantes, suggérant que les populations méditerranéennes sont restées endémiques dans leurs refuges (Bilton *et al.* 1998; Palme *et al.* 2003). Pour les petits mammifères, l'origine des populations actuelles du nord et du centre de l'Europe provient du centre-est de l'Europe, avec plusieurs refuges additionnels à l'Est, alors que les populations issues des péninsules du sud de l'Europe se sont maintenues de manière plus ou moins isolée. Si ce pattern de recolonisation s'est répété durant plusieurs glaciations, le nombre important de petits mammifères endémiques pourraient en être la conséquence (Bilton *et al.* 1998). De manière identique, les études sur les mammifères, les poissons, certains escargots ou arbres (Nesbø *et al.* 1999; Jaarola & Searle 2002; Seddon *et al.* 2002; Brunhoff *et al.* 2003; Haase *et al.* 2003; Palme *et al.* 2003) ont montré que les refuges du sud ne sont pas les sources de recolonisation. Le haut niveau de diversité génétique présent dans les clades nordiques de ces espèces nous laisse penser que plusieurs petits refuges étaient occupés. Dans ce contexte, il est possible que la portée des expansions à partir des refuges du sud ait été limitée par la présence et des interactions avec les populations résiduelles qui ont subsisté dans les zones nordiques (voir Stewart & Lister, 2001).

Les modèles de recolonisation "traditionnels" basés sur des refuges au sud (voir Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 2000) sont souvent opposés aux hypothèses arguant pour la présence de refuges nordiques (voir Stewart & Lister 2001; Stewart 2003). Les premiers modèles sont principalement basés sur des espèces du sud et du centre de l'Europe, habitant actuellement des zones tempérées à chaudes. Ces espèces n'ont évidemment pas survécu aux conditions climatiques extrêmes des périodes glaciaires; en conséquent, ces espèces ne sont pas forcément indicatives pour indiquer les refuges glaciaires les plus nordiques et les recolonisations du continent européen en découlant. Au contraire, certains travaux (Bennett *et al.* 1991; Bilton *et al.* 1998; Nesbø *et al.* 1999; Willis *et al.* 2000; Hanfling *et al.* 2002; Kullman 2002) ont suggéré que d'autres refuges localisés au nord des Alpes (et plus particulièrement au nord des péninsules méditerranéennes) avaient été utilisés durant les glaciations les plus rudes. Les espèces utilisées dans ces études sont généralement caractérisées par un haut niveau de tolérance aux conditions climatiques froides et ont la possibilité de survivre dans des zones propices de taille limitée. Les péliades présentent un pattern de recolonisation intermédiaire entre ces deux extrêmes. En effet, cette espèce a utilisé aussi bien des refuges nordiques que des refuges au sud de l'Europe durant le Pléistocène, avec des variations entre ces deux types de refuges. Actuellement, les péliades les plus méridionales sont confinées aux zones de hautes altitudes où les conditions climatiques sont suffisamment froides pour la survie de cette espèce nordique. Durant les périodes glaciaires, ces populations méridionales ont pu coloniser les zones plus basses en altitude, occupant des sites de plus grande taille, augmentant ainsi leurs effectifs. Lors du début des périodes interglaciaires, les populations méridionales ont pu atteindre les refuges dans les zones d'altitudes, alors que les populations nordiques ont pu recoloniser les surfaces libérées des glaces. Ainsi, nous suggérons que le pattern actuellement observé pour les péliades est issu d'une colonisation du centre et du nord de l'Europe à partir des refuges nordiques, alors que les populations méridionales sont actuellement confinées dans de petites zones refuges.

Globalement, l'augmentation des données climatologiques, paléontologiques et biologiques, ainsi que la résolution fine des phylogéographies d'espèces variées permettront d'obtenir une vue plus complète des différents patterns de recolonisation et des refuges utilisées durant les dernières glaciations, suggérant la coexistence des refuges nordiques et méridionaux en Europe. Dans ce contexte, nous ne voyons pas de contradiction entre les modèles "traditionnels" de refuges méridionaux avec les hypothèses plus récentes de refuges nordiques "cryptiques"; au contraire, les mouvements de populations durant les périodes glaciaires peu favorables pour les espèces vivantes, les routes de recolonisation et la localisation des différents refuges varient entre les espèces aux possibilités de dispersion et aux besoins écologiques différents. L'hétérogénéité des conditions climatiques au sein des différents refuges, lesquelles offraient des habitats très différents, a conduit à complexifier les patterns de recolonisation; la fragmentation et la reconnexion des populations rendent ainsi toute généralisation difficile. Néanmoins, des approches multidisciplinaires intégrant des résultats génétiques, avec des simulations des climats historiques, la palynologie et la biogéographie permettront de comprendre plus précisément les effets des fluctuations passées du climat et leurs implications sur la diversité biologique.

4.7 Remerciements

Ce travail a été financé par une bourse du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (Fonds No 3100-059132.99/1), le "Swedish Natural Science Research Council" et la Fondation Nilsson-Ehle. Nous remercions N. Ananjeva, J.-P. Baron, J. Crnobrnja-Isailovic, T. Durand, P. Ernits, I. Ghira, B. Heulin, D. Huber, R. Jones, L. Krecsak, S. Mancic, R. Maslak, D. Modry, T. Maddelena et le Museo cantonale di Storia Naturale de Lugano, S. Mazzotti, H. Olsvik, S. Paasanen, Y. Surget-Groba, G. Thiery, R. Thorpe, S. Tome et le Slovenian Museum of Natural History, L. Tomovic, A. Westerström, A. Zuiderwijk et le Zoological Institute of St-Petersburg pour les échantillons. Les remarques et suggestions de I. Dupanloup, J.-C. Monney, J. Nylander, P. Taberlet, W. Wüster ainsi que de trois lecteurs anonymes ont permis d'améliorer considérablement ce manuscrit.

4.8 Bibliographie

- Aris-Brosou S, Excoffier L (1996) The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 494-504.
- Ashton KG, de Queiroz A (2001) Molecular systematics of the western rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-loop in phylogenetic studies of snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**, 176-189.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* Harvard University Press, Cambridge.
- Barratt EM, Gurnell J, Malarky G, Deaville R, Bruford MW (1999) Genetic structure of fragmented populations of red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *Molecular Ecology* **8**, S55-S63.
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willis KJ (1991) Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* **18**, 103-115.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, Searle JB (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1219-1226.
- Boettger O (1880) Die Reptilien und Amphibien von Syrien, Palästina und Cypern. *Ber. senckenb. naturf. Ges. Frankfurt* **1879/1880**, 132-219.
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid Evolution of Animal Mitochondrial-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1967-1971.

- Brunhoff C, Galbreath KE, Fedorov VB, Cook JA, Jaarola M (2003) Holarctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. *Molecular Ecology* **12**, 957-968.
- Bucci G, Vendramin GG (2000) Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Molecular Ecology* **9**, 923-934.
- Bush M, Smeller J (1978) Blood collection & injection in snakes. *Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician* **Feb.**, 211-214.
- Carlsson M, Soderberg L, Tegelstrom H (2004) The genetic structure of adders (*Vipera berus*) in Fennoscandia: congruence between different kinds of genetic markers. *Molecular Ecology* **13**, 3147-3152.
- Carlsson M, Tegelström H (2002) Phylogeography of Fennoscandian adders (*Vipera berus*). In: *Biology of the Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Comes HP, Abbott RJ (1998) The relative importance of historical events and gene flow on the population structure of a Mediterranean ragwort, *Senecio gallicus* (Asteraceae). *Evolution* **52**, 335-367.
- Douglas ME, Douglas MR, Schuett GW, Porras LW, Holycross AT (2002) Phylogeography of the western rattlesnake (*Crotalus viridis*) complex, with emphasis on the Colorado Plateau. In: *Biology of the Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Doukakis P, Birstein VJ, Ruban GI, DeSalle R (1999) Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*. *Molecular Ecology* **8**, S117-S127.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995) Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* **44**, 570-572.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- Gasc J-P, Cabela A, Crnobrnja-Isailovic J, Dolmen D, Grossenbacher K, Haffner P, Lescure J, Martens H, Martínez Rica JP, Maurin H, Oliveira ME, Sofianidou TS, Veith M, Zuiderwijk K (1997) *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe* Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Gübitz T, Thorpe RS, Malhotra A (2000) Phylogeography and natural selection in the Tenerife gecko *Tarentola delalandii*: testing historical and adaptive hypotheses. *Molecular Ecology* **9**, 1213-1221.
- Guillaume CP, Heulin B, Arrayago MJ, Bea A, Braña F (2000) Refuge areas and suture zones in the Pyrenean and Cantabrian regions: geographic variation of the female MPI sex-linked alleles among oviparous populations of the lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Ecography* **23**, 3-10.
- Haase M, Misof B, Wirth T, Baminger H, Baur B (2003) Mitochondrial differentiation in a polymorphic land snail: evidence for Pleistocene survival within the boundaries of permafrost. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 415-428.
- Hanfing B, Hellems B, Volckaert FAM, Carvalho GR (2002) Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* **11**, 1717-1729.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992) Clustal-V - Improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences* **8**, 189-191.
- Hillis DM, Huelsenbeck JP (1992) Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *Journal of Heredity* **83**, 189-195.
- Jaarola M, Searle JB (2002) Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **11**, 2613-2621.
- Janke A, Arnason U (1997) The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent archosauria (birds and crocodiles). *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1266-1272.

- Konnert M, Bergmann F (1995) The geographical-distribution of genetic-variation of Silver Fir (*Abies alba*, Pinaceae) in Relation to Its Migration History. *Plant Systematics and Evolution* **196**, 19-30.
- Kotlik P, Berrebi P (2001) Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* **10**, 2177-2185.
- Kullman L (2002) Boreal tree taxa in the central Scandes during the Late-Glacial: implications for Late-Quaternary forest history. *Journal of Biogeography* **29**, 1117-1124.
- Kumazawa Y, Nishida M (1995) Variations in mitochondrial transfer-RNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 759-772.
- Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, Ozawa T (1996) Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: Highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1242-1254.
- Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, Ozawa T (1998) The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics* **150**, 313-329.
- Malhotra A, Thorpe RS (2000) The dynamics of natural selection and vicariance in the Dominican anole: Patterns of within-island molecular and morphological divergence. *Evolution* **54**, 245-258.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA - relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 269-292.
- Nesbø CL, Fosshem T, Vøllestad LA, Jakobsen KS (1999) Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology* **8**, 1387-1404.
- Nichols RA, Hewitt GM (1994) The genetic consequences of long-distance dispersal during colonization. *Heredity* **72**, 312-317.
- Palme AE, Su Q, Rautenberg A, Manni F, Lascoux M (2003) Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. *Molecular Ecology* **12**, 201-212.
- Palme AE, Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* **11**, 1769-1780.
- Paxton RJ, Thorén PA, Tengö J, Estoup A, Pamilo P (1996) Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. *Molecular Ecology* **5**, 511-519.
- Pfenninger M, Posada D (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* **56**, 1776-1788.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Questiau S, Eybert MC, Gaginskaya AR, Gielly L, Taberlet P (1998) Recent divergence between two morphologically differentiated subspecies of bluethroat (Aves : Muscicapidae : *Luscinia svecica*) inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Molecular Ecology* **7**, 239.
- Randi E, Lucchini V, Hennache A, Kimball RT, Braun EL, Ligon JD (2001) Evolution of the mitochondrial DNA control region and cytochrome b genes and the inference of phylogenetic relationships in the avian genus *Lophura* (Galliformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 187-201.
- Rogers AR (1995) Genetic-evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* **49**, 608-615.
- Rogers AR, Jorde LB (1995) Genetic-evidence on modern human origins. *Human Biology* **67**, 1-36.
- Rohling EJ, Fenton M, Jorissen FJ, Bertrand P, Ganssen G, Caulet JP (1998) Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature* **394**, 162-165.
- Saint Girons H (1978) Morphologie externe comparée et systématique des Vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **85**, 565-595.
- Saint Girons H (1980) Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Compte rendu des Séances de la Société de Biogéographie* **496**, 146-172.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin, a software for population genetic data analysis. University of Geneva, Geneva.
- Seddon JM, Santucci F, Reeve N, Hewitt GM (2002) Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 463-467.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* **69**, 82-90.

- Sorenson MD, Fleischer RC (1996) Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 15239-15243.
- Steinfartz S, Veith M, Tautz D (2000) Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Molecular Ecology* **9**, 397-410.
- Stewart JR (2003) Comment on "Buffered tree population changes in a quaternary refugium: Evolutionary implications". *Science* **299**, 825.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 608-613.
- Stille B, Madsen T, Niklasson M (1986) Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. *Oikos* **47**, 173-175.
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Tajima F (1989) The effect of change in population-size on DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 597-601.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 512-526.
- Terry A, Bucciarelli G, Bernardi G (2000) Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific Ocean and Sea of Cortez populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution* **54**, 652-659.
- Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* **276**, 1687-1689.
- Vogel JC, Rumsey FJ, Schneller JJ, Barrett JA, Gibby M (1999) Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* **66**, 23-37.
- Willis KJ, Rudner E, Sumegi P (2000) The full-glacial forests of central and southeastern Europe. *Quaternary Research* **53**, 203-213.
- Wüster W, Salomão MDG, Quijada-Mascareñas JA, Thorpe RS, BBBSP (2002) Origins and evolution of the south american pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: *Biology of Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Zamudio KR, Greene HW (1997) Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta* : Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of Linnean Society* **62**, 421-442.
- Zarevsky SF (1917) Formes nouvelles du genre *Vipera*, trouvées dans l'empire russe: *Vipera tigrina* n. sp and *Vipera berus* var. *sachalinensis* var nova? *Annuaire Mus. zool. Acad. Petrograd* **21**.
- Zhang DX, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 247-251.

MORPHOLOGIE DE LA VIPERE PELIADE



Chapitre 5: Y a-t-il des différences morphologiques entre les deux clades génétiques de la vipère péliade (*Vipera berus berus*)?

S. Ursenbacher*, I. Sasu*, M. Rossi* & J.-C. Monney^o

*Laboratoire de Biologie de la Conservation, Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne (Suisse)

^oCentre de Coordination pour la Protection des Amphibiens et des Reptiles de Suisse (KARCH), CH-3005 Bern (Suisse)

Ce Chapitre sera publié dans *Herpetologia Petropolitana* (Proceedings of the 12th Meeting of the Societas Europaeas Herpetologica)

5.1 Résumé

La morphologie de 164 vipères péliades (*Vipera berus berus*) a été analysée afin de rechercher des différences morphologiques entre les clades nordique et italien déterminées génétiquement (voir Chap. 4). La pholidose et certaines proportions corporelles ont été mesurés, comprenant au total 17 paramètres. Plusieurs éléments montrent des différences significatives entre les clades (par exemple les écailles sous-caudales, supralabiales, infralabiales et pariétales). De plus, l'analyse discriminante sépare les deux clades avec un niveau d'assignation important.

5.2 Abstract

The morphologies of 164 adders (*Vipera berus berus*) were analysed in order to assess whether morphological differences occur between the Northern and the Italian clades. Pholidosis and some body proportions were measured, corresponding to 17 parameters. Several parameters show significant differences between clades (e. g. subcaudals, labials, sublabials, parietal scales). Moreover, discriminant analyses separate both clades with high degrees of accuracy of a correct classification.

5.3 Introduction

La vipère péliade (*Vipera berus*; Linnaeus, 1758) est le serpent terrestre possédant l'aire de répartition la plus importante (Saint Girons, 1978). Malgré cette vaste distribution, seulement 3 sous-espèces sont reconnues: *V. b. berus*, *V. b. bosniensis* (Boettger, 1880), *V. b. sachalinensis* (Zarevsky, 1917). La forme nominale est présente de la France jusqu'au milieu de la Russie, avec de minimes variations morphologiques malgré une distribution sur près de 10'000 km (Saint Girons, 1978). L'homogénéité à l'intérieur de cette sous-espèce a aussi été confirmée par deux études basées sur des marqueurs génétiques (Joger *et al.*, 2003; Chap. 4), à l'exception des péliades présentes en Italie, dans le nord de la Slovénie, le sud de l'Autriche et l'extrême sud-est de la Suisse. Suite à la découverte de cette importante différence génétique (la séparation entre les deux clades peut être évaluée à plus d'un million d'années), le sujet de cette étude est de comparer la morphologie de ces deux groupes génétiques.

d'importantes persécutions durant le XIX^{ème} et le XX^{ème} siècle, les autorités locales de l'époque rémunérant les citoyens pour tout serpent tué. Comme les grands carnivores, les vipères ont été décimées et ont disparu localement (par exemple 570'000 vipères ont été tuées en 27 ans dans 3 départements de l'est de la France, Kaufmann 1893). Ces facteurs ont eu un impact considérable sur la fragmentation des populations, en les isolant; à cause des processus stochastiques, ces populations génétiquement isolées ont évolué séparément, pouvant conduire à une dérive génétique et à l'apparition de la consanguinité.

Actuellement, peu d'études sur la structuration génétique des populations de serpents ont été publiées: basée sur l'analyse de marqueurs microsatellites, aucune structuration génétique est observée entre les sites d'hibernation distant de quelques kilomètres chez la couleuvre *Elaphe obsoleta* (Lougheed *et al.* 1999). Les couleuvres aquatiques *Nerodia sipedon sipedon* présentent aussi une structuration peu marquée mais néanmoins significative entre des populations distantes d'environ 1.5 km (Prosser *et al.* 1999). Au contraire, les crotales (*Crotalus horridus*) montrent une importante philopatrie, la distance génétique entre les sites d'hibernation (distants de 500-3000 m) étant importante et significative dans 50% des comparaisons (Villarreal *et al.* 1996). Chez *Sistrurus catenatus catenatus*, les marqueurs microsatellites dévoilent une très forte structuration des populations (Gibbs *et al.* 1997), alors que les analyses basées sur les marqueurs RAPD ne présentaient aucune structuration pour les mêmes populations (Gibbs *et al.*, 1994; voir Gibbs *et al.* 1997 pour la comparaison des deux études). Les résultats de Jaggi *et al.* (2000) montrent aussi une faible structuration à partir de marqueurs RAPD chez *V. aspis* dans le Massif jurassien. Ainsi, il semble que les Viperidae soient plutôt philopatriques (Gibbs *et al.* 1997; Villarreal *et al.* 1996), alors que les Colubridae sont plus mobiles (Lougheed *et al.* 1999, mais voir aussi Prosser *et al.* 1999). En plus d'une structuration forte chez la majorité des études basées sur les Viperidae, la perte de diversité génétique semble avoir un impact considérable sur la survie des serpents. En effet, Madsen et collaborateurs (Madsen *et al.* 1996; Madsen *et al.* 1999; Madsen *et al.* 2004) ont démontré que *Vipera berus* était particulièrement sensible à la dépression de consanguinité, laquelle a diminué la survie des juvéniles conduisant la population étudiée à décroître rapidement.

La vipère péliade (*Vipera berus*) est le serpent terrestre possédant la plus grande aire de distribution (Saint Girons 1980). Néanmoins, cette espèce est très menacée localement, spécialement en Europe de l'Ouest (Castanet & Guyétant, 1989; Völkl & Thiesmeier, 2002) où la fragmentation des habitats est importante. Les faibles déplacements (Viitanen 1967; Prestt, 1971; Neumeyer 1987; Monney 1996) ainsi que le haut niveau de philopatrie des adultes (Madsen & Shine 1992; Luiselli 1993) suggèrent une forte structuration génétique entre les populations. Les péliades ont un comportement discret et le niveau de migration des juvéniles n'est pas véritablement connu malgré l'étude de Saint Girons (1981). Or, le déplacement des juvéniles peut être la seule source de migration entre les populations. Finalement, les routes et le trafic routier possèdent également un impact considérable sur la structuration des vipères, les subadultes et les mâles étant fréquemment écrasés (Bonnet *et al.* 1999, Brito & Alvares, 2004); puisque les péliades peuvent survivre dans des zones limitées à quelques hectares (Saint Girons, comm. pers.; Monney & Ursenbacher, obs. pers.), les populations résiduelles sont particulièrement disséminées.

Dans le Massif jurassien (situé entre la France et la Suisse), les péliades sont considérées comme en danger, 51 sites étant répertoriés (46 en France, 5 en Suisse); toutefois tous ne semblent pas permettre la survie à long terme de leur population, mais abritent uniquement quelques vipères régulièrement observées (Pinston *et al.* 2000; Perret *et al.* 2002). La plupart des populations semblent isolées et seule une région abrite plusieurs

5.4 Matériel et Méthodes

Mesures

Nous avons mesuré 164 *Vipera berus berus* issues des collections du Musée d'Histoire Naturelle de Genève (MHNG): 101 animaux (54 femelles et 47 mâles) du clade nordique ainsi que 63 vipères (35 femelles et 28 mâles) du clade italien. Le clade a été assigné en fonction de la localisation de l'animal collecté et des aires de répartition définies dans le Chapitre 4. et par Joger *et al.* (2003). Le nombre d'écaillés ventrales (V), sous-caudales (C), apicales (A), pariétales (P), intercanthales (I), ainsi que, mesuré sur les deux côtés, le nombre total d'écaillés loréales (L), canthales (CA), périoculaires (PO), supralabiales (SUP), infralabiales (SUB) et parafrontales (PA) ont été comptés selon la méthode employée par Saint Girons (1978).

Le nombre de rangs d'écaillés entre les périoculaires et les supralabiales a aussi été dénombré sur les deux côtés (RO). Au total, 12 paramètres décrivant l'écaillure céphalique ont été mesurés. De plus, la longueur totale (LOT.C), la longueur de la queue (LO.Q), la taille museau-cloaque (SVL), la longueur (LO.T) et la largeur de la tête (LR.T) ont été évaluées. A partir de ces mesures, la taille relative de la queue (%TAIL = LO.Q/LOT.C) et de la tête (%HEAD = LO.T/LOT.C), ainsi que la largeur relative de la tête (%W.T = LR.T/LO.T) ont été calculées. Seuls les adultes et les subadultes d'une longueur totale supérieure à 300 mm ont été inclus dans les analyses.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS 11.0.1 pour MacOSX (SPSS Inc.). Les analyses ont été effectuées aussi bien en groupant les sexes qu'en séparant les mâles des femelles. En premier lieu, les SVL ont été comparées entre les clades afin d'évaluer l'homogénéité du jeu de données. Ensuite, le test de Student, le test de Welsch (t-tests) et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparer les différents paramètres entre les clades. L'analyse discriminante a été conduite en utilisant toutes les mesures céphaliques ainsi que les ratios (%TAIL, %HEAD et %W.T).

5.5 Résultats

Comparaisons entre les clades

Aucune différence de SVL entre les clades a été mise en évidence, tant pour les mâles et les femelles analysés ensemble ($Z = -0.507$, $p = 0.612$) que pour les sexes séparés ($Z = -0.269$, $p = 0.788$ pour les femelles, $Z = -0.991$, $p = 0.321$ pour les mâles). Toutes les différences significatives entre les deux clades sont présentées dans le Tableau 1. Des

Tableau 1 Probabilités issues des tests de t et des tests de Wilcoxon pour les paramètres possédant au moins une valeur significative. NS = $P > 0.05$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.005$.

	Mâles et femelles		Femelles		Mâles	
V	0.020	*	0.062	NS	0.064	NS
C	0.000	***	0	***	0	***
L	0.001	***	0.029	*	0.009	**
SUP	0.012	*	0.122	NS	0.003	***
SUB	0.002	***	0.017	*	0.012	*
I	0.001	***	0.005	***	0.089	NS
P	0	***	0.002	***	0.013	*
%TAIL	0.119	NS	0.036	*	0.358	NS

différences significatives ont été observées pour le nombre de sous-caudales (C), de loréales (L), d'infralabiales (SUB) et de pariétales (P) aussi bien pour les analyses effectuées avec les animaux des deux sexes regroupés que séparés. Seuls les mâles présentent une différence significative du nombre d'écailles supralabiales (SUB), alors que les femelles montrent des différences significatives pour le nombre d'écailles intercanthales (SUP) et pour la proportion de la queue (%TAIL). Quand les mâles et les femelles sont analysés conjointement, le nombre d'écailles ventrales (V) diffèrent significativement entre les clades, mais pas lorsque les sexes sont analysés séparément.

Analyse discriminante

Le résultat de l'analyse discriminante regroupant les mâles et les femelles est présentée en Figure 1. L'appartenance au bon clade et au bon sexe est prédite à un taux variant entre 68.5 et 85.7% par l'analyse discriminante conjointe. En séparant les sexes, les analyses discriminantes permettent de prédire la bonne appartenance à 83.3-88.6% pour les femelles et 91.5-92.9% pour les mâles.

5.6 Discussion

Les clades nordique et italien montrent plusieurs différences significatives (voir Tableaux 1 et 2), certaines permettant de déterminer morphologiquement le clade de l'animal. Les péliades du clade italien possèdent un nombre plus faible d'écailles sous-caudales (environ 3 écailles de moins que les animaux du clade nordique), un nombre plus important de loréales et d'infralabiales, ainsi qu'un nombre plus faible d'intercanthales; les pariétales sont aussi moins fractionnées chez les animaux du clade italien (Tableau 2). Le nombre d'écailles ventrales semble aussi être plus faible pour le clade italien, mais les différences sont non significatives lorsque les analyses sont

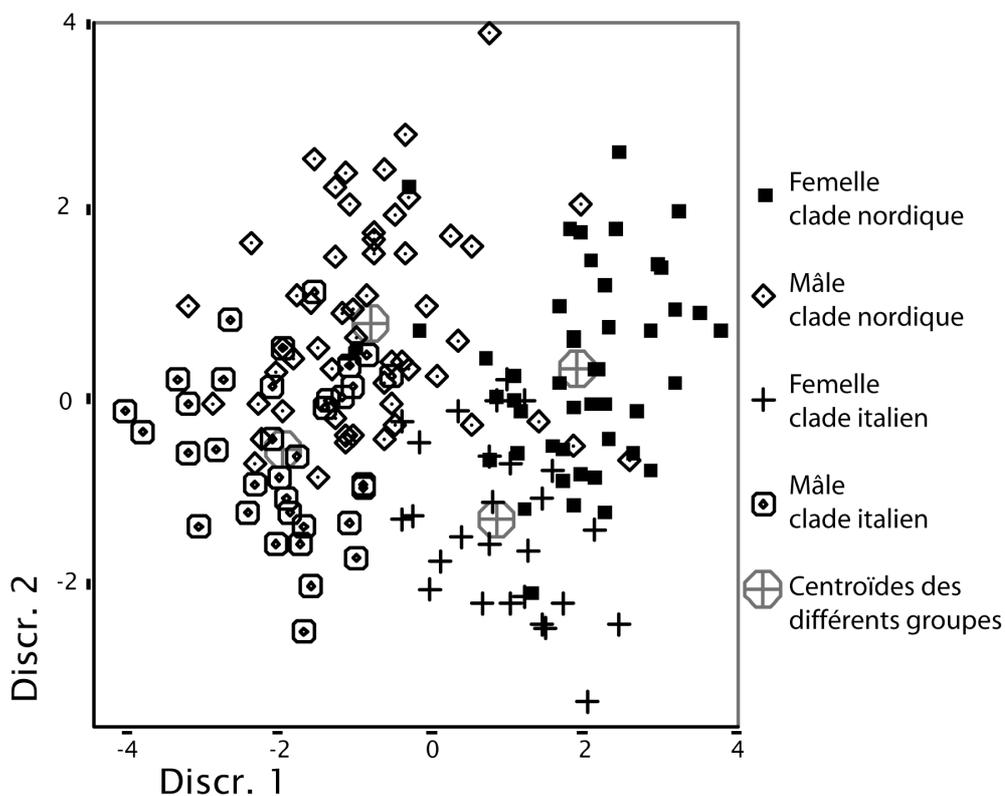


Figure 1 Analyse discriminante regroupant tous les animaux (Discr. 1: 77.8% de la variance; Discr. 2: 20.8% de la variance; λ de Wilks = 0.1836, $p < 0.0005$).

Tableau 2 Mesurations moyennes chez les mâles et les femelles pour chaque clade, ainsi que l'écart-type, le minimum et le maximum observé.

<i>GROUPE</i>			<i>V</i>	<i>C</i>	<i>L</i>	<i>SUP</i>	<i>SUB</i>	<i>I</i>	<i>P</i>
Femelle	clade italien	moyenne	145.77	27.63	6.71	17.63	20.89	6.91	1.97
			± 3.23	± 2.13	± 2.47	± 0.84	± 1.37	± 2.62	± 0.38
		n = 35	minimum maximum	137 153	23 34	2 11	16 19	19 24	2 14
	clade nordique	moyenne	147.15	30.50	5.54	17.17	20.00	8.70	2.46
			± 3.55	± 3.59	± 2.40	± 1.61	± 2.06	± 3.26	± 0.86
		n = 54	minimum maximum	139 155	21 39	1 11	12 20	15 25	4 18
Mâle	clade italien	moyenne	142.43	34.36	5.89	17.93	21.21	6.82	2.00
			± 3.73	± 2.39	± 2.60	± 1.15	± 2.17	± 2.63	± 0.27
		n = 28	minimum maximum	134 149	29 39	2 12	16 22	15 26	3 12
	clade nordique	moyenne	144.11	36.81	4.47	17.11	19.96	7.91	2.47
			± 3.54	± 2.71	± 1.99	± 1.03	± 1.77	± 2.69	± 0.95
		n = 47	minimum maximum	135 152	30 42	0 9	15 19	16 23	2 16

effectuées séparément chez les mâles et chez les femelles. Saint Girons (1978) a déjà observé un nombre plus faible d'écaillés ventrales pour des péliades appartenant au clade italien. Scali & Gentilli (1999) ont aussi montré un nombre plus faible d'écaillés ventrales chez les spécimens provenant de la plaine du Po (nord de l'Italie).

Néanmoins, le nombre d'animaux analysés n'est pas considérable et la majorité des péliades du clade italien provient de l'Engadine (canton des Grisons, extrême sud-est de la Suisse) et peut montrer des paramètres morphologiques différents du reste des animaux du clade italien. A cause du faible nombre d'animaux par site, il n'a pas été possible d'analyser en détail ce jeu de données. Ainsi, le nombre d'échantillons pour chaque clade devrait être augmenté, en intégrant particulièrement plus d'animaux de Russie, de Scandinavie, d'Italie, de Slovénie et d'Autriche; l'augmentation du jeu de données devrait améliorer la résolution des différences morphologiques. Finalement, l'ajout de caractères morphologiques tel que le dessin dorsal (voir Nilson and André (2001) pour le groupe *V. ursinii*) permettrait aussi de révéler de plus grandes différences morphologiques chez *V. b. berus*. Cependant, ces résultats préliminaires suggèrent que de faibles différences morphologiques peuvent être mesurées entre les clades génétiques déterminés chez *V. b. berus*.

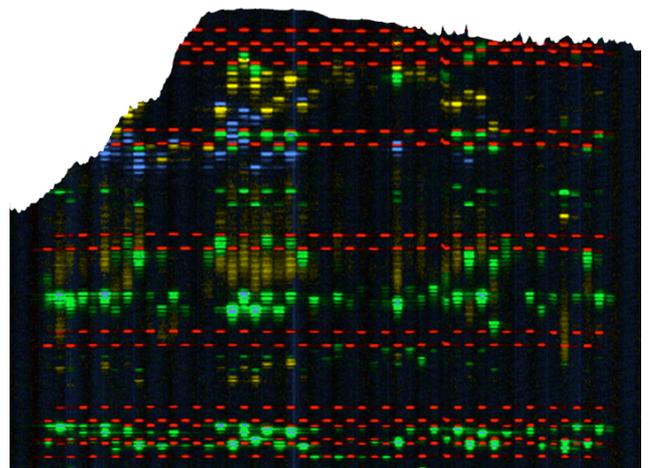
5.7 Remerciements

Ce travail a été financé par le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (Fonds No 3100-059132.99/1). Nous remercions le Musée d'Histoire Naturelle de Genève (Suisse) et plus particulièrement la responsable des collections Reptiles, Mme Fisch-Muller, pour le prêt de sa collection, ainsi que Philippe Golay pour ses commentaires.

5.8 Bibliographie

- Boettger O (1880) Die Reptilien und Amphibien von Syrien, Palästina und Cypern. *Ber. senckenb. naturf. Ges. Frankfurt* **1879/1880**, 132-219.
- Joger U, Kalyabina S, Schweiger S, Mayer W, Orlov NL, Wink M (2003) Phylogeny of the Eurasian *Vipera* (Subgenus *Pelias*). In: *12th Ordinary General Meeting. Programme and abstracts, 12-16 August 2003* (ed. Herpetologica SE). Societas Europaea Herpetologica, St-Petersburg, Russia.
- Linnaeus (1758) *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*, 10th ed. edn.
- Nilson G, Andrén C (2001) The meadow and steppe vipers of Europe and Asia - the *Vipera* (*Acridophaga*) *ursinii* complex. *Acta Zoologica, Academiae Scientiarum Hungaricae* **47**, 87-267.
- Saint Girons H (1978) Morphologie externe comparée et systématique des Vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **85**, 565-595.
- Scali S, Gentili A (1999) Morphometric analysis and sexual dimorphism of extinct adders (*Vipera berus*) of the Po plane (Northern Italy). In: *Current studies in herpetology, Proceedings of the 9th Ordinary General Meeting of the SEH* (eds. Miaud C, Guyétant R), pp. 391-396. SEH, Le Bourget du Lac, France.
- Zarevsky SF (1917) Formes nouvelles du genre *Vipera*, trouvées dans l'empire russe: *Vipera tigrina* n. sp and *Vipera berus* var. *sachalinensis* var nova? *Annuaire Mus. zool. Acad. Petrograd* **21**.

STRUCTURATION GENETIQUE DE LA VIPERE PELIADE DANS LE MASSIF JURASSIEN



Chapitre 6: Variations génétiques chez les populations résiduelles de vipères péliades (*Vipera berus*) du Massif jurassien: implications pour la conservation

S. Ursenbacher¹, J.-C. Monney² & L. Fumagalli¹

¹Laboratoire de Biologie de la Conservation, Département d'Ecologie et Evolution, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne (Suisse)

²KARCH, Centre de Coordination pour la protection des Amphibiens et des Reptiles de Suisse, Bernastrasse 5, CH -3005 Bern (Suisse)

6.1 Résumé

Malgré sa grande aire de répartition, la vipère péliade (*Vipera berus*) est particulièrement menacée dans l'ouest de l'Europe à cause de l'importante fragmentation de son habitat induite par les activités humaines. De plus, les persécutions passées et présentes ont aussi contribué à la disparition locale de cette espèce. Dans le Massif jurassien, le nombre de populations est très limité et la plupart sont géographiquement isolées. A l'aide de 7 marqueurs microsatellites, nous avons investigué la structuration et la diversité génétique de 10 populations jurassiennes. Une forte structuration entre les différents sites a été trouvée, même si elles ne sont pas géographiquement isolées. De plus, la diversité génétique au sein des populations du Massif jurassien et des Alpes est significativement plus faible que celle des autres populations françaises étudiées, ces différences provenant de la recolonisation post-glaciaire. Finalement, des suggestions concernant la conservation de cette espèce dans des habitats fragmentés sont proposées.

6.2 Abstract

Although the adder (*Vipera berus*) has a large distribution area, this species is particularly threatened in western Europe, due to the high fragmentation of its environment and human persecution. We used seven microsatellite loci to investigate genetic structure and diversity in the Jura Mountains, where the species is limited to only a few scattered populations. We found that *V. berus* exhibits considerable structure between populations, even if they are not geographically isolated. Moreover, the genetic diversity within populations in Jura Mountains and Alps is significantly lower than in French populations, due to the recolonisation after the last glaciation. Finally, suggestions for the conservation of this species in fragmented landscape are proposed.

6.3 Introduction

Dans le Monde, et plus particulièrement dans les pays industrialisés, de nombreuses espèces de reptiles sont menacées de disparition. Par conséquent, la plupart des espèces sont protégées dans la majeure partie de l'Europe de l'Ouest (voir par exemple Corbett, 1989; Hofer *et al.*, 2001). La destruction de leur habitat est la principale menace; cependant, les serpents, et plus particulièrement les serpents venimeux, ont subi

populations interconnectées pouvant être considérées comme une métapopulation (zone humide du bassin du Drugeon)

Afin d'évaluer les différences entre les populations résiduelles de péliades dans le Massif jurassien, 13 marqueurs microsatellites ont été développés. L'étude de populations du Massif jurassien, des Alpes, du Massif Central (France) et de la région de Rennes (France) permettra de comparer la diversité génétique entre des populations n'ayant pas subi l'influence de l'Homme durant les dernières décades. Finalement, nous présenterons des informations essentielles pour la conservation de cette espèce en milieu fortement fragmenté.

6.4 Matériel et Méthodes

Echantillonnage et extraction de l'ADN

Des échantillons de 285 péliades provenant de 10 populations parmi les plus denses du Massif jurassien ont été prélevés. En complément, 65 animaux de 3 populations alpines, 23 péliades de 2 populations du Massif Central (France) et 19 individus d'une population de la région de Rennes ont été collectés (Figure 1). Tous les animaux ont été mesurés, pesés et marqués par coupe d'écaillés ou avec un microchip (DataMars SA, Lugano, Suisse) et des échantillons ont été prélevés pour les analyses génétiques (sang ou écaillés). L'ADN génomique total a été extrait avec des kits QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Développement des microsatellites

Quatre banques de données enrichies contenant des fragments de microsatellites de péliades a été commandée à GIS (Genetic Identification Services, Chatsworth, US). Des fragments d'ADN contenant des répétitions CA, GA, AAC et AAG ont été insérés dans des cellules One Shot® Top10 (Invitrogen AG, Bâle, Suisse). 102 colonies ayant intégré un fragment d'ADN de la banque de données enrichie ont été retenues et la partie intégrée a été amplifiée à l'aide des primers M13f et M13r (Invitrogen) selon les conditions recommandées par le fournisseur. Les produits de PCR ont été contrôlés sur gel d'agarose, puis purifiés à l'aide de kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) et séquencés. Des primers ont été créés avec OLIGO V 4.0 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, US) pour les séquences intégrant un microsatellite. L'amplification des microsatellites à partir de ces primers a ensuite été testée sur gel d'agarose et les conditions de PCR ont été optimisées pour chaque locus.

Amplification des microsatellites

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume de 25 µl contenant 2 µl du produit d'extraction, 1x de tampon PCR (Qiagen), 2mg/ml de solution Q (Qiagen), du MgCl₂ à des concentrations variables suivant les locus (voir Tableau 1), 0.2mM de dNTPs, 0.5µM de chaque primer et 0.5 unités de *Taq* polymérase (Qiagen); une coloration fluorescente en 5' sur le primer forward a été utilisée. L'amplification des microsatellites a été exécutée sur des machines PCR Perkin-Elmer 9700 (Applied Biosystems, US). Toutes les réactions ont été effectuées avec 35 cycles de 30 sec. à 94°C, 30 sec. à la température d'alignement (Tableau 1) et 45 sec. à 72°C, suivi d'une extension finale de 5 minutes à 72°C. La taille des produits PCR a été visualisée sur un séquenceur automatique ABI 377 (Applied Biosystems, US) et la taille des allèles a été estimée à l'aide du programme GENSCAN 3.1 (Applied Biosystems, US).

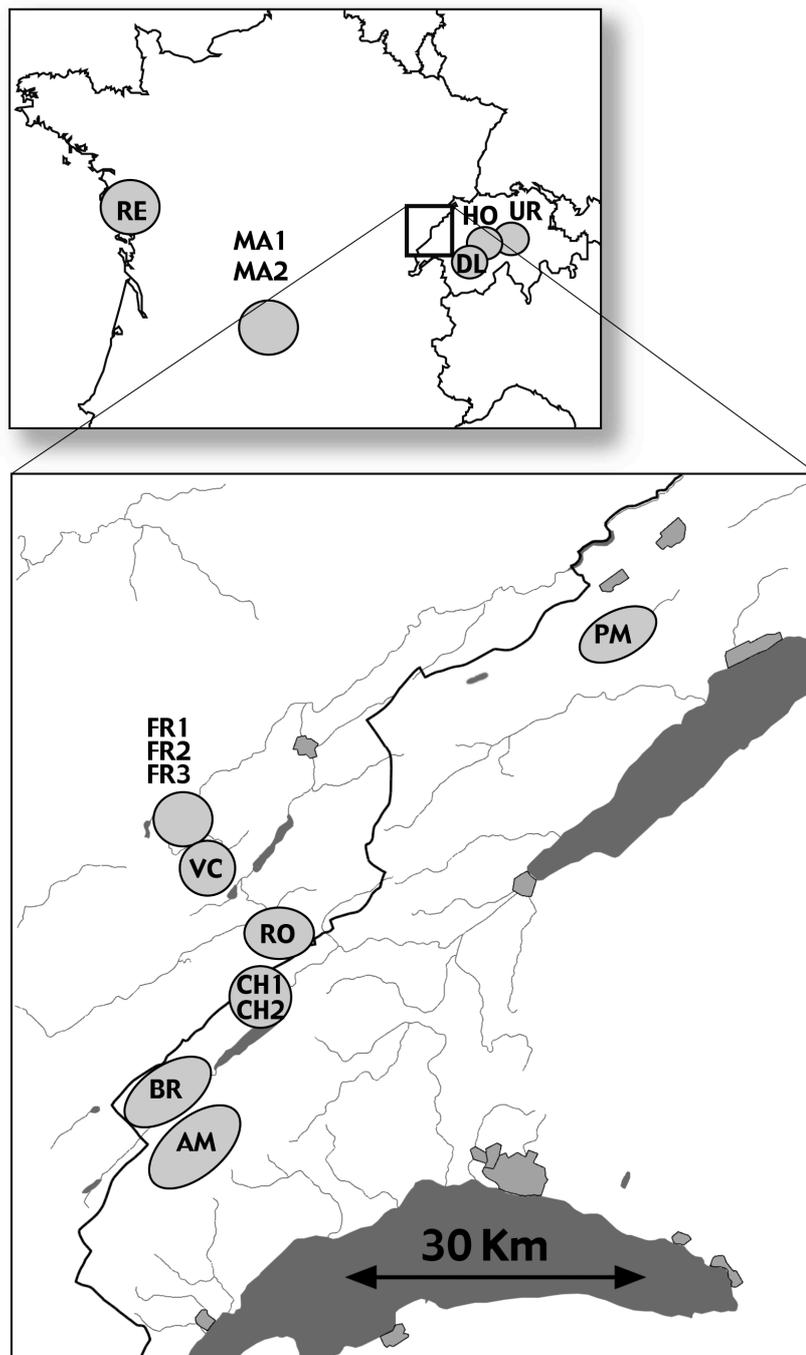


Figure 1 populations de vipères péliades échantillonnées

Analyses statistiques

La présence d'allèles nuls ou d'erreurs de lecture a été contrôlée avec MICRO-CHECKER 2.1 (Van Oosterhout *et al.* 2004) pour chaque population. Les loci montrant une probabilité élevée de présence d'allèles nuls ont été supprimés du jeu de données. Pour les loci restants, nous avons estimé la fréquence allélique, la richesse allélique (A_R), l'hétérozygotie observée et attendue (H_O et H_E) avec le programme FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). L'estimation du niveau de structuration interne des populations F_{IS} et les déviations de l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été estimées et testées avec 1000 permutations à l'aide de FSTAT. D'éventuels liens entre les loci ont été testés de manière identique.

Nous avons comparé la richesse allélique entre les différentes régions (Massif jurassien, Alpes, Massif central et Rennes) par une ANOVA à l'aide de SPSS 11.0.2 (SPSS Inc.).

Estimation de bottleneck (diminution rapide des effectifs d'une population)

Afin de déterminer si des bottlenecks peuvent être détectés à partir des données moléculaires, le programme BOTTLENECK (Cornuet & Luikart 1996; Piry *et al.* 1999) a été utilisé pour d'examiner une éventuelle déviation de l'équilibre mutationnel. Le modèle à deux types de mutations (TPM, di Rienzo *et al.* 1994) avec un taux de 95% de mutation par pas simple (Single-Step Mutation, SSM; Ohta & Kimura 1973) avec une variance entre les pas multiples de 12 a été choisi comme suggéré par Piry *et al.* (1999). Afin de tester la puissance de ces tests, des estimations avec d'autres paramètres ont été effectuées (80 à 99% de SSM, variance entre les pas multiples compris entre 2 à 24). En fonction du nombre de loci utilisés, nous avons employé le test de Wilcoxon pour effectuer les analyses statistiques de l'excès d'hétérozygotes.

Taille de la population (N) et de la population efficace (N_e)

Lorsqu'un nombre suffisant de recaptures a été effectué sur un site étudié, la taille de la population des adultes a pu être estimée à l'aide du module CAPTURE (Otis *et al.* 1978) du programme MARK 3.2 (Marshall *et al.* 1998). Afin de comparer la taille de la population (N) avec la taille de la population effective (N_e), nous avons utilisé ESTIM 1.2 (Vitalis & Couvet 2001a) pour évaluer N_e .

Différenciation génétique des populations

La différenciation génétique entre les populations, F_{ST} (Weir & Cockerham 1984), a été estimée et la déviation par rapport à la valeur nulle a été testée par permutation (1000 permutations) grâce au programme FSTAT. Pour toutes les comparaisons multiples, la valeur critique de la probabilité a été ajustée selon la correction de Bonferroni (Rice 1989) pour comparaisons multiples.

L'isolation par la distance entre les populations du Massif jurassien a été testée avec un test de Mantel (Mantel, 1967) en comparant les valeurs par paire de $F_{ST}/(1-F_{ST})$ avec les distances géographiques par paire (log transformé) à l'aide du programme FSTAT. En effet, la comparaison de $F_{ST}/(1-F_{ST})$ avec la distance géographique est plus efficace pour tester l'isolation par la distance que la comparaison entre les valeurs de F_{ST} et la distance géographique (Rousset, 1997).

6.5 Résultats

Allèles nuls et équilibre de Hardy-Weinberg

Nous avons développé 13 microsatellites ayant un niveau de polymorphisme important (voir Tableau 1). Quatre d'entre eux (Vb-B1, Vb-D6, Vb-D12 et Vb-D'13) montrent un excès d'homozygotes, l'équilibre de Hardy-Weinberg étant significativement différent de 0 pour ces quatre microsatellites. De plus, le locus Vb-D17 est lié aux loci Vb-B18 et Vb-B'10, alors que le locus Vb-B'9 est lié à Vb-D'10 ($p < 0.05$). En conséquence, nous avons conservé les loci Vb-A8, Vb-A11, Vb-B'2, Vb-B10, Vb-B'10, Vb-B18 et Vb-D'10 pour les analyses ultérieures.

Un haut niveau d'homozygoté pour le locus Vb-B'10 au sein de la population MA1 et pour le locus Vb-B10 dans la population RE a été observé, ceci étant probablement dû à la présence d'allèles nuls uniquement au sein de ces populations.

Analyses microsatellites

La variation génétique, exprimée par la moyenne de la richesse allélique et par l'hétérozygotie attendue, est significativement plus faible dans les populations du Massif jurassien et dans les Alpes que dans les populations du Massif Central et de Rennes (A_R : ANOVA, $F = 8.81$, $p = 0.002$; H_E : ANOVA, $F = 6.35$, $p = 0.008$) (Tableau 2).

Deux populations (MA1 et RE) présentent une structure interne (F_{IS}) significative, mais ces valeurs élevées sont dues à un haut degré d'homozygotie dans un seul locus (voir ci-dessus). Les autres populations ne montrent pas de structuration significative (Tableau 2).

Le test de rang de Wilcoxon implémenté dans BOTTLENECK est significatif uniquement pour une seule population (DL), laquelle montre une déficience en hétérozygotes. Cette population montre aussi une A_R significativement plus faible que les autres populations du Massif jurassien ($t = 2.399$, $p = 0.043$).

Taille de la population (N) et de la population efficace (N_e)

Pour les populations suivies pendant plus d'une année, la taille de la population a été estimée et ces valeurs sont exposées dans le Tableau 2. De plus, la taille effective a été estimée pour la plupart des populations. Néanmoins, 7 d'entre elles ont une valeur négative de η_S (déséquilibre identitaire intra-populationnel, qui décrit l'étendue avec laquelle l'identité génétique est corrélée entre les loci, voir Vitalis & Couvet, 2001b), induisant l'impossibilité d'estimer la taille de la population effective avec ESTIM (Tableau 2). Aucune relation a été mise en évidence entre la taille effective (N_e) et la taille de la population ($r^2 = 0.003$, $p = 0.930$) ou la richesse allélique ($r^2 = 0.039$, $p = 0.583$), ni entre la taille de la population et la richesse allélique ($r^2 = 0.139$, $p = 0.410$).

Tableau 2 Diversité génétique observée parmi les 16 populations de *Vipera berus* étudiées à partir de 7 marqueurs microsatellites; n = nombre d'animaux analysés; H_O = hétérozygotie observée; H_E = hétérozygotie attendue, A_R = richesse allélique; F_{IS} = structuration interne; N = taille de la population estimée (adultes seulement); N_e = taille effective de la population estimée par ESTIM (Vitalis & Couvet 2001a).

	population	n	H_O	H_E	A_R	F_{IS}	N	N_e
Massif jurassien	CH1	63	0.533	0.533	3.14	-0.003	46 ± 10	132.20
	CH2	62	0.511	0.515	2.94	0.005	31 ± 6	52.46
	BR	34	0.560	0.589	3.14	0.042	20 ± 4	144.04
	PM	30	0.351	0.387	2.19	0.044	20 ± 8	Infini
	AM	24	0.382	0.439	2.81	0.096	20 ± 10	210.80
	RO	14	0.52	0.478	2.32	-0.09		7.16
	VC	12	0.476	0.458	2.58	-0.039		62.60
	FR1	17	0.518	0.516	2.97	-0.005		Infini
	FR2	14	0.527	0.502	2.95	-0.038	17 ± 8	14.40
	FR3	15	0.495	0.512	2.86	0.034	15 ± 7	Infini
Alpes	UR	20	0.457	0.47	2.91	0.027		144.31
	HO	23	0.638	0.589	3.00	-0.086		Infini
	DL	22	0.347	0.376	2.11	0.075		24.16
Massif Central	MA1	18	0.556	0.681	4.04	0.184		Infini
	MA2	5	0.629	0.679	3.86	0.074		Infini
Rennes	RE	19	0.501	0.6503	3.80	0.256		28.89

Différenciation génétique des populations

D'importantes différences génétiques entre les populations ont été détectées (F_{ST} moyen = 0.269, $p < 0.001$; voir Tableau 3). Pour les populations distantes de moins de 3.5 Km, les valeurs de F_{ST} sont plus faibles, mais restent importantes (entre 2.6 et 4.1%, voir Figure 2), même si les populations sont considérées comme appartenant à la même métapopulation. De plus, certains sites montrent des valeurs moyennes plus élevées, particulièrement DL (et dans une moindre mesure AM et PM). De manière générale, une forte isolation par la distance est observée entre les populations du Massif jurassien (test de Mantel, $p < 0.01$; voir Figure 2).

6.6 Discussion

Diversité génétique et taille de la population

Une différence significative de richesse allélique a été décelée entre, d'un côté, les populations du Massif central (MA1 et MA2) et de la côte Atlantique (RE) et de l'autre, les populations du Massif jurassien et des Alpes. La présence de bottlenecks ne peut pas expliquer ces valeurs plus faibles puisque aucun signe de bottleneck a été détecté chez la majorité des populations. De plus, les populations alpines sont relativement éloignées des activités humaines et leur environnement a été peu perturbé. Dans des populations stables, une faible richesse allélique (A_R) peut aussi être due à une taille efficace (N_e) faible (Frankham *et al.*, 2002). Cependant, aucune relation entre N_e et A_R a pu être observée dans les populations étudiées et les sites alpins sont aussi étendus et abritent autant de vipères que celles du Massif central ou de la côte Atlantique. Ainsi la différence de richesse allélique significative ne peut pas être due à des tailles de populations différentes. Finalement, cette différence peut avoir une origine historique; les Alpes et le Jura étaient couverts de glace durant la dernière glaciation et ils n'ont été recolonisés qu'après la fonte complète des glaciers (il y a environ 12'000 ans) par des animaux réfugiés en France (voir Chap. 4). Les populations de la côte Atlantique et du Massif central étant plus proches du refuge glaciaire, elles ont donc conservé une diversité génétique plus élevée.

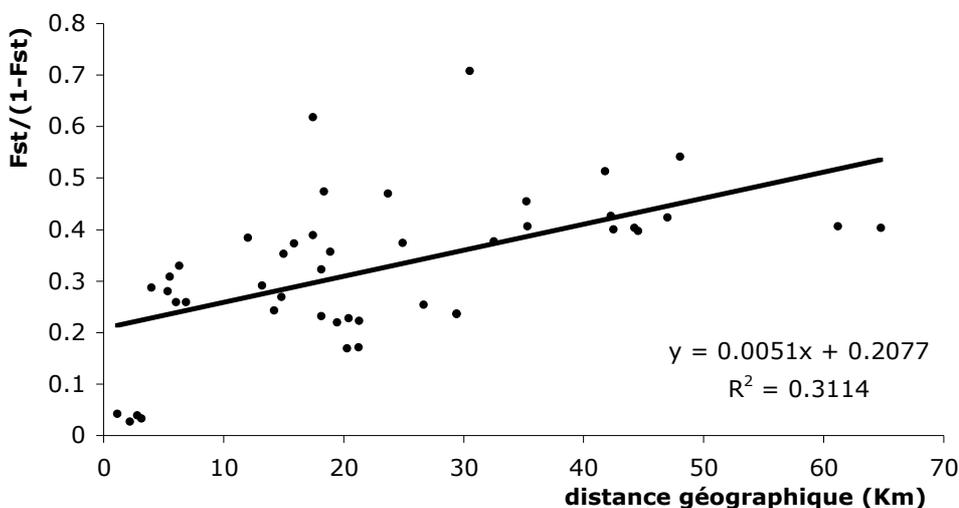


Figure 2 isolation par la distance entre les 10 populations de vipères péliades du Massif jurassien. Les comparaisons sont effectuées par paire de populations.

Tableau 1 loci microsatellites caractérisés pour *Vipera berus* avec les séquences des primers, la température d'alignement, la concentration de MgCl₂, et le niveau de variabilité génétique (A_R est basée sur 3 animaux diploïdes)

Locus	Séquences des primers (5' 3')	Motif répété	Température d'alignement	Concentration en MgCl ₂	Nombre d'allèles	H_o	H_s	H_T	F_{IS}	A_R	Allèle nul
Vb-A8	5'-ATTTCACCATGCGCTCCAGAA-3' 5'-GGTACACTCATTTGTGATGAAC-3'	CA	55°C	1.5	11	0.354	0.342	0.445	0.001	2.391	non
Vb-A11	5'-GGTCAGTAACATCAGTCTGC-3' 5'-AGTCTTCCCTTACTTTGGCG-3'	CA	58°C	1.5	4	0.509	0.483	0.620	-0.004	2.893	non
Vb-B1	5'-TGGGCGTGGTCACCTCAATG-3' 5'-GGATGAAAGGCAGGGAGATG-3'	GA	58°C	1.5	3	0.174	0.392	0.562	0.575	2.241	oui
Vb-B2	5'-CTGAACAGAACAGGAGAG-3' 5'-GGAAAACGAAGCAGTCAGGC-3'	GA	58°C	1.5	22	0.472	0.507	0.760	0.053	3.334	non
Vb-B9	5'-GATGGCTTTGAGTGGCACAG-3' 5'-CACAGAAATAGGCTGACTCC-3'	GA	58°C	1.5	12	0.333	0.370	0.588	0.058	2.793	non
Vb-B10	5'-CGTGAGGTGTGTAATAAG-3' 5'-CTATTTGAATCCACCAAGT-3'	GA	55°C	2.5	14	0.383	0.457	0.663	0.104	2.850	non
Vb-B'10	5'-GCAAAATTAATTTTGGGGTAGG-3' 5'-GAGATAGAGAACAAAGTAGAGG-3'	GA	58°C	2.5	9	0.524	0.553	0.745	0.021	3.324	non
Vb-B18	5'-TGCTGGTGGGAATCACAATG-3' 5'-CACAAAAGCTGCCTGCAAAAG-3'	GA	52°C	2.5	18	0.527	0.551	0.801	0.063	3.844	non
Vb-D6	5'-AGTTCCCACTTTGTGCTCTC-3' 5'-CTAGCAATTTGACCTGTTACC-3'	AAG	58°C	2.5	26	0.491	0.767	0.929	0.309	4.782	oui
Vb-D'10	5'-GTCCTCCTTATCATCTATCC-3' 5'-CCTGGGTGCTCTCTCAG-3'	AAG	58°C	2.5	19	0.740	0.764	0.900	0.003	4.509	non
Vb-D12	5'-ACCAAGTGTGCTGTACCAATC-3' 5'-CCCCAGGTATTAGCAACGGG-3'	AAG	58°C	1.5	3	0.225	0.342	0.572	0.294	2.349	oui
Vb-D'13	5'-ATCTCCAGAGCATCCATTTC-3' 5'-TTGGCATCACCCCTTTCC-3'	AAG	55°C	2.5	20	0.210	0.777	0.935	0.682	5.063	oui
Vb-D17	5'-TTTCTGCCCAATTTTACGAC-3' 5'-TGTAAGATGTTCCGAGTAGC-3'	AAG	56°C	2.5	22	0.694	0.701	0.913	0.009	4.837	non

Tableau 3 valeurs de F_{ST} estimées par l'analyse de 7 loci microsattelites dans 16 populations de péliades (*Vipera berus*). La significativité a été testée par permutation (120000 permutations).

	Massif jurassien											Alpes			Massif Central	
	CH1	CH2	BR	PC	AM	RO	VC	FR1	FR2	FR3	UR	HO	DL	MA1	MA2	
<i>Massif</i>	CH1	-														
<i>jurassien</i>	CH2	0.041	-													
	BR	0.192	0.226	-												
	PC	0.298	0.351	0.289	-											
	AM	0.322	0.382	0.206	0.287	-										
	RO	0.219	0.248	0.180	0.339	0.320	-									
	VC	0.212	0.261	0.273	0.299	0.415	0.278	-								
	FR1	0.147	0.180	0.192	0.284	0.289	0.263	0.206	-							
	FR2	0.145	0.186	0.191	0.286	0.313	0.280	0.236	0.026 ^{NS}	-						
	FR3	0.188	0.244	0.203	0.288	0.274	0.272	0.223	0.032 ^{NS}	0.038 ^{NS}	-					
<i>Alpes</i>	UR	0.212	0.265	0.259	0.396	0.362	0.242	0.315	0.267	0.321	0.261	-				
	HO	0.279	0.321	0.260	0.269	0.320	0.253	0.278	0.294	0.284	0.270	0.315	-			
	DL	0.344	0.417	0.362	0.496	0.442	0.440	0.422	0.360	0.417	0.392	0.413	0.417	-		
<i>Massif</i>	MA1	0.266	0.314	0.212	0.295	0.260	0.283	0.267	0.224	0.231	0.207	0.270	0.218	0.348	-	
<i>central</i>	MA2	0.268	0.314	0.178 ^{**}	0.360 ^{**}	0.289 ^{**}	0.260 ^{**}	0.289 [*]	0.255 ^{**}	0.270 [*]	0.213 ^{**}	0.255 ^{**}	0.245	0.374 ^{**}	0.069 ^{**}	
<i>Rennes</i>	RE	0.260	0.310	0.233	0.277	0.304	0.256	0.223	0.262	0.285	0.242	0.165	0.191	0.380	0.199 [*]	

^{NS} p > 0.05; * p = 0.05; ** p = 0.01; pour toutes les autres valeurs, p < 0.005

La diversité génétique au sein des populations du Massif jurassien est assez faible. De plus, les 3 populations (FR1, FR2 et FR3) appartenant à la dernière métapopulation jurassienne (la dernière zone où les péliades sont en grande densité sur une surface importante) ne montrent pas une diversité génétique plus élevée que les autres populations isolées (t-test = -0.855, $p = 0.417$). Néanmoins, certaines populations montrent une diversité génétique encore plus faible, particulièrement DL pour laquelle un signe de bottleneck a été détecté. Cette réduction de la taille de la population peut être due à une période plus chaude (avant le petit âge glaciaire), durant laquelle un petit nombre d'animaux aurait persisté sur le Massif montagneux dont la population DL est issue. En effet, BOTTLENECK détecte les réductions de populations pour une période comprise entre $2N_e$ et $4N_e$ générations (Piry *et al.* 1999). Pour les péliades, l'intervalle de détection peut être évalué à une période comprise entre 240 et 1600 ans (temps de génération = 6-8 ans pour les péliades en montagne; $N_e = 20-50$ animaux), soit bien avant les persécutions humaines. La valeur importante de F_{ST} entre cette population et les autres peut aussi être considérée comme un signe de dérive génétique au sein d'une population ayant subi un bottleneck.

Aucun bottleneck a été détecté dans le site PM bien qu'il montre une valeur de A_R plus faible. De vieilles observations (Ischer 1930) montrent une très forte diminution du nombre de vipères tuées entre 1906 et 1926 sur la commune abritant la population PM (à cette époque, les vipères tuées étaient payées aux chasseurs). Cette diminution d'un facteur 10 indique que la population de péliade a subi un très fort bottleneck, mais celui-ci est trop récent (environ 15 générations) pour être détecté par BOTTLENECK.

Différenciation entre les populations

La structuration entre les populations de *V. berus* est importante, même entre des populations géographiquement proches. Pour les populations isolées de plus de 3.5 km, les valeurs de F_{ST} sont au minimum égales à 0.15 (voir Figure 2). Pour les populations qui sont géographiquement proches (CH1 et CH2; FR1, FR2 et FR3; MA1 et MA2), les valeurs de F_{ST} sont comprises entre 2.6 et 6.9%, même si les populations sont séparées de seulement 1 à 3 km d'un environnement favorable aux animaux. Certaines comparaisons par paires ne sont pas significatives, à cause d'un nombre trop faible d'animaux échantillonnés (< 20 échantillons). Néanmoins, la structuration à petite échelle chez les péliades s'avère être très marquée, bien que la faible distance et des milieux favorables permettent aux animaux de migrer d'une population à l'autre. Nos résultats suggèrent que les vipères sont très philopatrides, confirmant ainsi les suggestions de Madsen & Shine (1992) et Luiselli (1993). Au contraire, Jaggi *et al.* (2000) ont démontré à l'aide de marqueurs RAPD que la vipère aspic ne semble pas posséder une structuration locale aussi marquée. Or, l'aspic et la péliade sont en concurrence directe dans la partie ouest de l'aire de répartition de la seconde (Monney, 1996). Ces deux espèces semblent ne pas présenter la même dynamique de colonisation-recolonisation puisque le manque de structuration observé chez les aspics est un indice de dispersion marquée, permettant aux populations d'échanger régulièrement des gènes (au contraire de la vipère péliade). Cette dynamique pourrait résulter d'un historique différent. En effet, les péliades sont probablement arrivées dans leur aire de répartition actuelle rapidement après le retrait des glaciers, cette espèce pouvant survivre dans des conditions environnementales rudes. Après la recolonisation, elles se sont maintenues dans ces zones, n'ayant plus la possibilité de disperser et réduisant ainsi les échanges entre populations. Au contraire, la vipère aspic a recolonisé le Massif jurassien à partir du sud de la France (Chap. 3) plus récemment puisque cette espèce requiert une température plus importante. Dans les Alpes et le Massif jurassien, la recolonisation de l'aspic a donc repoussé la péliade dans les zones les plus froides et

les plus humides (Ferrière, 1986; J.-C. Monney, pers. comm.). Actuellement, la vipère aspic possède une dynamique de recolonisation plus élevée avec un degré de dispersion plus important que la péliade (comme l'indique les travaux de Jaggi *et al.*, 2000, bien qu'il serait utile d'effectuer la même analyse avec des microsatellites, marqueurs plus fins et conduisant parfois à des résultats différents, voir Gibbs *et al.*, 1994), affectant les paramètres de conservation de ces espèces dans l'ouest de l'Europe (voir ci-dessous). Néanmoins, les paramètres de dispersion chez l'aspic sont actuellement influencés par les activités humaines, réduisant la colonisation de certaines régions par cette espèce (par exemple sur le plateau suisse) et modifiant ainsi les interactions entre les deux taxa.

Comparaison avec d'autres serpents

Peu d'études sur la structuration génétique chez les serpents sont disponibles. Nos résultats confirment la faible migration chez les Viperidae, comme observé précédemment chez *Crotalus horridus* et *Sistrurus catenatus* (Villarreal *et al.* 1996; Gibbs *et al.* 1997). La valeur de F_{ST} (0.04) observée entre des populations de *S. catenatus* distantes de 1.5 km (Gibbs *et al.* 1997) sont comparables aux observations réalisées chez la péliade pour des distances comparables. Le niveau est aussi du même ordre de grandeur pour *Crotalus horridus* entre des sites d'hibernation distant de 500 à 3000m (F_{ST} variable entre 0.05 et 0.12). Ainsi, ces travaux confirment la forte philopatrie des Viperidae dans les milieux tempérés.

Implication pour la conservation

Nos résultats basés sur les analyses génétiques montrent que les péliades sont extrêmement peu mobiles et que les populations peuvent être considérées comme complètement isolées à partir de quelques kilomètres, les mouvements entre les populations distantes de plus d'un 1 km étant très rares et ne permettant pas aux populations de rester génétiquement homogènes. Par conséquent, toutes les populations, même si elles semblent géographiquement interconnectées, doivent être considérées comme des unités indépendantes. La majorité des populations étudiées occupe des zones limitées à 15-30 ha, avec un nombre d'animaux inférieur à 50 adultes. A partir des résultats génétiques, plusieurs directives pour la conservation de la vipère péliade dans le Massif jurassien (et probablement les autres populations fragmentées) peuvent être suggérées:

- 1) toutes les populations ont un rôle majeur pour la survie de la péliade dans le Massif jurassien puisqu'elles sont génétiquement distinctes;
- 2) la création de corridors permettant de reconnecter les populations de péliades serait peu utile puisque les mouvements naturels entre les populations interconnectées sont très faibles;
- 3) la création de milieux favorables distants de plus de 2-3 km des populations actuelles serait peu propice puisque les péliades, en raison de leur faible taux de migration, ne recoloniseront pas ces sites. A l'inverse, l'augmentation de la surface utilisable des populations actuelles serait plus opportune afin que les vipères puissent diffuser dans la périphérie du site favorable et, graduellement, recoloniser de nouveaux emplacements. Pour les péliades, cette stratégie semble plus appropriée que la création de nouveaux sites éloignés et interconnectés par des corridors.

En conclusion, les principaux aménagements pour la protection des vipères péliades devraient être entrepris directement sur les populations actuelles afin d'éviter leur extinction (p. ex. limiter le nettoyage des pâturages par des brûlis, ou

débroussaillage) et de permettre leur diffusion dans la proche périphérie. Actuellement, les populations du Massif jurassien ne montrent pas de pertes considérables de variabilité génétique, telles qu'observées par Madsen *et al.* (1996) à Smygehuk (Suède). Dans cette population, la translocation de mâles a été la méthode utilisée pour rétablir une population viable (Madsen *et al.* 1999; Madsen *et al.* 2004). Dans le Massif jurassien, de telles translocations ne semblent pas être nécessaires actuellement. Néanmoins, l'intensification de la surveillance des plus petites populations devrait être entreprise et des mesures de différents paramètres morphologiques et biologiques directement liés à la diversité génétique et/ou à la consanguinité telles que la mortalité des jeunes à la naissance (Madsen *et al.* 1996) ou l'anomalie des écailles (Gautschi *et al.* 2002) devraient être effectuées.

6.7 Remerciements

Ce travail a été financé par des bourses du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (Fonds No 3100-059132.99/1) et de la Société Académique Vaudoise. Nous remercions T. Durand, F. Paysant et G. Thiery pour la mise à disposition d'échantillons. Ceux-ci ont été prélevés avec les autorisations de la Conservation de la Faune du Canton de Vaud (Suisse), le Service de la Faune de Neuchâtel et Fribourg (Suisse), la Préfecture du Département du Doubs (France) et la Préfecture du Département du Jura (France). Des discussions avec J. Goudet et S. Dubey ont permis d'améliorer ce travail.

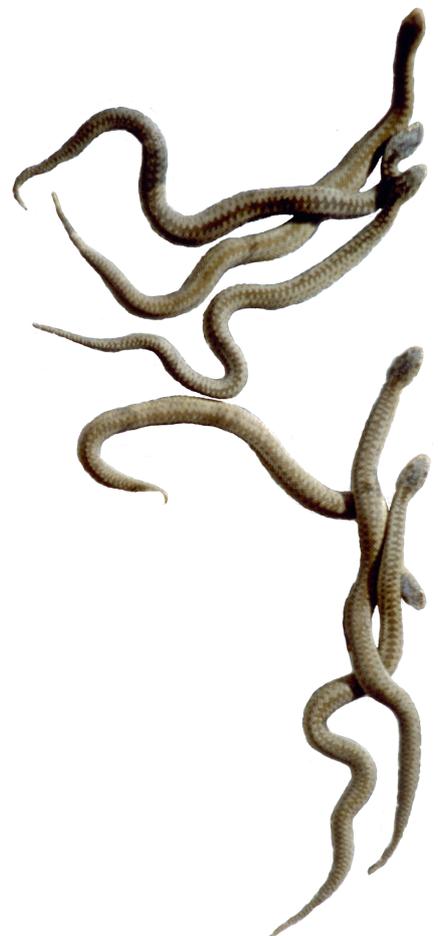
6.8 Bibliographie

- Bonnet X, Guy N, Shine R (1999) The dangers of leaving home: dispersal and mortality in snakes. *Biological Conservation* **89**, 39-50.
- Brito JC, Alvares FJ (2004) Patterns of road mortality in *Vipera latastei* and *V. seoanei* from northern Portugal. *Amphibia-Reptilia* **25**, 459-465.
- Castanet J, Guyétant R (1989) *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France* Société Herpétologique de France, Paris.
- Corbett K (1989) *Conservation of European Reptiles and Amphibians* SEH, IUCN, London.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-3170.
- Ferrière R (1986) *Vipera berus berus* L. dans les Alpes-Maritimes et l'extrême sud-est des Alpes-de-Haute-Provence: un problème de biogéographie. 2ème partie: situation actuelle - interprétation. *Bioscosme mésogéen* **3**, 121-182.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Gautschi B, Widmer A, Joshi J, Koella JC (2002) Increased frequency of scale anomalies and loss of genetic variation in serially bottlenecked populations of the dice snake, *Natrix tessellata*. *Conservation Genetics* **3**, 235-245.
- Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ (1994) Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 329-337.
- Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ, Johnson G (1997) Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **6**, 1123-1132.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Hofer U, Monney J-C, Dusej G (2001) *Les reptiles de Suisse. Répartition, habitats, protection* Birkhäuser Verlag AG.
- Ischer A (1930) *La Vipère péliade des Ponts de Martel*.
- Jaggi C, Wirth T, Baur B (2000) Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. *Biological Conservation* **94**, 69-77.

- Kaufmann M (1893) *Les Vipères de France: morsures - traitement* Asselin et Houzeau, Paris.
- Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ (1999) Hierarchical patterns of genetic population structure in black rat snakes (*Elaphe obsoleta obsoleta*) as revealed by microsatellite DNA analysis. *Evolution* **53**, 1995-2001.
- Luiselli L (1993) High philopatry can produce strong sexual competition in male adders, *Vipera berus*. *Amphibia-Reptilia* **14**, 310-311.
- Madsen T, Shine R (1992) Sexual competition among brothers may influence offspring sex ratio in snake. *Evolution* **46**, 1549-1552.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999) Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**, 34-35.
- Madsen T, Stille B, Shine R (1996) Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**, 113-118.
- Madsen T, Ujvari B, Olsson M (2004) Novel genes continue to enhance population growth in adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation* **120**, 145-147.
- Mantel N (1967) Detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Monney J-C (1996) *Biologie comparée de Vipera aspis L. et de Vipera berus L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes bernoises* unpublished thesis, University of Neuchâtel, Switzerland.
- Neumeyer R (1987) Density and seasonal movements of the adder (*Vipera berus* L.) on a subalpine environment. *Amphibia-Reptilia* **2**.
- Ohta T, Kimura M (1973) Model of mutation appropriate to estimate number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research* **22**, 201-204.
- Otis DL, Burnham KP, White GC, Anderson DR (1978) Statistical inference from capture data on closed animal population. *Wildlife Monographs* **62**, 7-135.
- Perret C, Fallot P, Monney J-C, Claude F (2002) Inventaire des sites à reptiles de l'arc jurassien de Suisse occidentale. Mandat de l'Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage.
- Pinston H, Craney E, Pépin D, Montadert M, Duquet M (2000) *Amphibiens et Reptiles de Franche-Comté. Atlas commenté de répartition* Groupe naturaliste de Franche-Comté (éd.), Besançon.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**, 502-503.
- Prestt I (1971) An ecological study of the viper *Vipera berus* in southern Britain. *Journal of Zoology* **164**, 373-418.
- Prosser MR, Gibbs HL, Weatherhead PJ (1999) Microgeographic population genetic structure in the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon* detected using microsatellite DNA loci. *Molecular Ecology* **8**, 329-333.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Saint Girons H (1980) Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Compte rendu des Séances de la Société de Biogéographie* **496**, 146-172.
- Saint Girons H (1981) Quelques observations sur la dispersion des nouveau-nés chez *Vipera berus* et *Vipera aspis* dans le bocage atlantique (Reptilia: Viperidae). *Amphibia-Reptilia* **2**, 269-272.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Viitanen P (1967) Hibernation and seasonal movements of the viper, *Vipera berus berus* (L.), in southern Finland. *Annales Zoologici Fennici* **4**, 472-546.
- Villarreal X, Bricker J, Reinert HK, Gelbert L, Bushar LM (1996) Isolation and characterization of microsatellite loci for use in population genetic analysis in the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. *Journal of Heredity* **87**, 152-155.
- Vitalis R, Couvet D (2001a) ESTIM 1.0: a computer program to infer population parameters from one- and two-locus gene identity probabilities. *Molecular Ecology Notes* **1**, 354-356.
- Vitalis R, Couvet D (2001b) Two-locus identity probabilities and identity disequilibrium in a partially selfing subdivided population. *Genetical Research* **77**, 67-81.

Völkl W, Thiesmeier B (2002) *Die Kreuzotter - ein Leben in festen Bahnen?* Laurenti Verlag.
Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure.
Evolution **38**, 1358-1370.

PATERNITE CHEZ LA VIPERE PELIADE



Chapitre 7: Succès reproducteur et paternité multiple chez la vipère péliade (*Vipera berus*) en condition naturelle

S. Ursenbacher¹, C. Erny¹ & L. Fumagalli¹

¹Laboratoire de Biologie de la Conservation, Département d'Ecologie et Evolution, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne (Suisse)

7.1 Résumé

La paternité multiple a été démontrée en captivité chez la vipère péliade (*Vipera berus*), mais elle n'a jamais été étudiée dans la nature. Nous avons utilisé treize loci microsatellites pour assigner la paternité dans 15 pontes échantillonnées durant 3 ans. La proportion de pontes engendrées par plusieurs mâles est très élevée (69%), malgré la faible densité de péliades dans les sites étudiés. Le succès reproducteur des mâles augmente avec leur taille et seuls les plus grands arrivent à obtenir une paternité unique au sein d'une ponte. Au contraire des lézards, aucun évitement de consanguinité ou de sélection des mâles basée sur leur niveau d'hétérozygoté et leur variabilité génétique ont été remarqués, probablement induits par une territorialité différente entre les serpents et les lézards. Finalement, aucune relation entre le nombre de pères détectés dans une ponte et la survie des nouveau-nés a été observée, suggérant que la paternité multiple est nécessaire uniquement dans des populations ayant un taux de consanguinité élevé ou/et une faible fécondité des mâles.

7.2 Abstract

Multiple paternity has been demonstrated in adder (*Vipera berus*) in captivity, but it has never been examined in the wild. We used thirteen microsatellite loci to assign paternity to 15 clutches collected during 3 years. The proportion of multiple sired clutches is very high (69%), despite the low density of adders in these populations. Male reproductive success increased with the body length and only the largest have sired monopaternity clutches. In contrast to lizards, no inbreeding avoidance or selection of males based on heterozygosity and individual genetic variability was found, probably due to different territorial behaviours between lizards and snakes. Finally, no relationship between the number of fathers siring the clutch and the offspring's survival was detected, suggesting that multiple paternity is necessary only in wild populations with a high level of inbreeding and/or a low male fecundity.

7.3 Introduction

La paternité multiple et la compétition spermatique sont fréquentes chez de nombreux groupes d'animaux (Birkhead & Møller, 1998). Un seul accouplement est généralement suffisant pour fertiliser la ponte entière (mais voir Madsen *et al.*, 1992), la raison des accouplements multiples des femelles est donc expliquée comme une manière d'obtenir un avantage génétique (évitement de la consanguinité, augmentation de la compétition spermatique, ...). Ainsi, ces multiples appariements permettent aux femelles de s'accoupler avec des mâles génétiquement très différents, leurs permettant d'éviter les conséquences induites par des accouplements consanguins (Partridge, 1983;

Charlesworth & Charlesworth, 1987). De plus, les femelles devraient aussi s'accoupler avec les mâles possédant le taux d'hétérozygotie le plus élevé, augmentant ainsi l'hétérozygotie de leurs descendances (Brown, 1997). Par conséquent, si le choix du partenaire est effectué de manière active par la femelle, les appariements multiples et la compétition spermatique devraient induire un avantage pour certains mâles. De l'autre côté, les accouplements multiples augmentent directement la fécondité des mâles, particulièrement lorsqu'ils ne s'investissent pas après l'accouplement. Pour eux, le succès reproducteur est fonction du nombre de femelles fécondées, même si la femelle s'est déjà accouplée (voir Parker, 1992).

Les études sur la paternité multiple sont abondantes pour les oiseaux et les mammifères (par exemple Reynolds, 1996; Birkhead & Møller, 1998) alors que chez les reptiles, et plus particulièrement les serpents, ces études sont rares (Höggren & Tegelstrom, 1995; Garner *et al.*, 2002; Prosser *et al.*, 2002). Pourtant, les serpents possèdent des caractéristiques singulières suggérant qu'ils pourraient être des organismes-modèles précieux pour étudier le choix des partenaires sexuels (Prosser *et al.*, 2002). Par exemple, le manque de liens sociaux entre les couples, ainsi que le manque de soins parentaux (contrairement aux oiseaux et aux mammifères) simplifient l'étude des facteurs influençant la sélection sexuelle. De plus, le comportement reproducteur de plusieurs reptiles a déjà été étudié de manière exhaustive en captivité ou sur le terrain, permettant des comparaisons entre les résultats obtenus par l'assignement de paternité basé sur l'ADN et les comportements observés dans la nature.

La vipère péliade est un petit serpent venimeux (Mallow *et al.*, 2003) largement distribué dans le nord de l'Eurasie. Les femelles se reproduisent tous les deux ou trois ans, le sex-ratio des animaux sexuellement actifs est donc biaisé envers les mâles (Madsen & Shine, 1993). La période de reproduction est limitée dans le temps (3-4 semaines par année); par conséquent, les mâles courtisent activement les femelles. En raison du nombre plus important de mâles, des combats s'engagent entre eux pour accéder aux femelles réceptives, les plus grands et les plus lourds gagnant généralement ces combats (Madsen, 1988; Madsen & Shine, 1992; Luiselli, 1993a). Un comportement de surveillance de la femelle par le mâle est courant (Andrén, 1986). Cependant, d'autres accouplements avec le même mâle ou d'autres individus sont fréquents (Andren & Nilson, 1987; Madsen *et al.*, 1992; Luiselli, 1993b). La paternité multiple a été observée chez la vipère péliade en captivité (Stille *et al.*, 1986; Höggren & Tegelstrom, 1995; Höggren & Tegelstrom, 2002), bien que l'hypothèse d'un bouchon copulatoire ait été suggérée par Nilson & Andren (1982) (mais voir aussi Stille *et al.*, 1986; Stille *et al.*, 1987; Höggren & Tegelstrom, 2002). Chez plusieurs espèces de serpents, la conservation à long terme du sperme a été observé (Saint Girons, 1975; Gist & Jones, 1987; Schuett, 1992), mais elle n'a pas été démontrée chez la péliade (Luiselli, 1993b; Höggren & Tegelstrom, 1996). Récemment, Höggren & Tegelstrom (2002) ont établi que, en captivité, le premier accouplement engendrait un nombre de descendants plus important. Finalement, le nombre d'accouplements semble diminuer le nombre de nouveau-nés mort-nés (Madsen *et al.*, 1992) mais ce postulat est débattu (Capula & Luiselli, 1994).

Le comportement de reproduction de la péliade a été étudié en détail et cette espèce est probablement le serpent européen le mieux étudié. Bien que la paternité multiple soit présente chez *V. berus*, toutes les études examinant la fécondité des mâles ont été effectuées en captivité. Afin de déterminer le père de chaque nouveau-né et le taux de paternité multiple dans des populations naturelles, nous avons utilisé des marqueurs microsatellites développés spécifiquement pour cette espèce (Chap. 6). Le comportement des mâles et l'impact de leur taille ont aussi été examinés afin de confronter les résultats génétiques avec les observations réalisées dans la nature. Le nombre de pères au sein d'une portée et le taux de survie (voir Madsen *et al.*, 1992) ont été évalués et différentes

stratégies reproductives ont été suggérées. Finalement, nous avons testé la relation entre la variabilité génétique et la fécondité des mâles ainsi que le lien entre le succès reproducteur paternel et la divergence génétique du couple.

7.4 Matériel et Méthodes

Collecte des échantillons dans les populations naturelles

Les nouveau-nés ont été collectés durant 3 ans (2000, 2001 et 2002) dans deux populations séparées du Massif jurassien suisse (Vallée de Joux, 46°40'N, 6°20'E) à une altitude d'environ 1'100 m. Les deux populations sont distantes d'environ 1.5 Km et sont considérées comme isolées, aucune migration ayant été observée entre 1997 et 2004. Durant le monitoring, tous les animaux ont été mesurés, pesés et marqués. Tous les nouveau-nés, ainsi que les adultes capturés entre 1997 et 1998 ont été marqués à chaud (hot-branding). A partir de 1999, les adultes et les subadultes ont été marqués avec des microchips (DataMars SA, Lugano, Suisse) et des échantillons ont été prélevés (sang ou écailles) pour toutes les vipères capturées. L'endroit exact de capture a été noté sur une carte détaillée ou localisé grâce à un GPS.

Afin d'obtenir les pontes, les femelles gestantes ont été capturées avant la naissance des nouveau-nés (fin août ou début septembre). Elles ont été maintenues dans des cages individuelles placées sur le terrain d'étude. Après la ponte, les nouveau-nés ont été mesurés, pesés et un échantillon de tissu a été prélevé (1-2 mm de l'extrême bout de la queue). Des échantillons de tissus ont aussi été prélevés sur les nouveau-nés mort-nés. Toutes les femelles et leurs progénitures ont été relâchées à l'endroit de leur capture.

Analyses microsatellites et assignement de parenté

L'ADN génomique total a été extrait grâce au kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Nous avons utilisé 13 microsatellites décrits au Chapitre 6. L'assignement de parenté a été effectué par une approche de vraisemblance à l'aide du programme CERVUS 2.0 (Marshall *et al.*, 1998). Ce programme calcule les distributions attendues du test statistique Δ , qui correspond à la différence entre les valeurs de vraisemblance des deux mâles les plus probables. A partir des distributions obtenues par simulations, CERVUS détermine une valeur critique afin d'évaluer le niveau de confiance de l'assignement. Ce programme est particulièrement sensible à la proportion de candidats échantillonnés (Jones & Ardren, 2003). Par conséquent, le nombre de mâles adultes a été estimé pour chaque population et pour chaque année entre 1997 et 2002 à l'aide du module CAPTURE (Otis *et al.*, 1978) intégré dans le programme MARK 3.2 (White & Burnham, 1999). Le pourcentage moyen du nombre de mâles capturés a été estimé par cette méthode à 82%. Finalement, la probabilité de présence d'allèles nuls au sien des 13 microsatellites a été détectée par CERVUS. La détection des allèles nuls est importante puisqu'ils produisent de fausses exclusions dans les assignements de paternité (Jones & Ardren, 2003). CERVUS peut évaluer la fréquence des allèles nuls pour chaque locus et peut les intégrer dans les simulations. Néanmoins, pour tous les loci ayant des allèles nuls, Jones & Ardren (2003) suggèrent de considérer les homozygotes comme des hétérozygotes possédant un allèle nul afin d'éviter de fausses exclusions. Les assignations de paternité ont été effectuées avec et sans cette modification et les résultats ont été comparés.

De plus, les animaux présentant, à un locus donné, des résultats douteux ont été analysés plusieurs fois (jusqu'à 5 fois) afin d'assurer un génotypage correct. Basée sur ces répétitions, une estimation du taux d'erreur a pu être obtenue en comparant le nombre de résultats différents entre les génotypages successifs (nombre d'erreur par réaction). En complément, le nombre d'incompatibilité entre les génotypes des mères et

de leurs nouveaux-nés a été comptabilisé, permettant aussi d'évaluer, par ce biais, le taux d'erreur. Finalement, le programme CERVUS estime aussi le taux d'erreur des nouveau-nés en fonction du génotype des mères et du taux d'allèles nuls. Ces différents résultats seront comparés.

Taille des mâles

Le rapport entre la longueur des mâles (longueur museau-cloaque, SVL) et leur succès reproducteur annuel a été testé (t-test). La SVL a aussi été comparée entre les pères et les mâles sans progéniture, ainsi qu'entre les mâles étant père unique au sein d'une ponte et les autres pères. Dans les pontes possédant plusieurs pères, la taille des mâles ayant engendrés le plus de nouveau-nés a été comparée à la taille des mâles ayant enfantés le moins de jeunes. La SVL a été mesurée sur le terrain et a dû être corrigée car les mesures n'ont pas toujours été effectuées l'année où le mâle a engendré des nouveau-nés. En conséquence, la SVL a été calculée pour tous les pères en fonction des relations suivantes: les subadultes (jusqu'à 37 cm) grandissent de 0.05 cm par jour, alors que les mâles adultes croissent de 0.01 cm par jour (1 année = 210 jours à cause de l'hibernation). Ces vitesses de croissance ont été estimées par capture-recapture dans les deux populations.

Variabilité et similarité génétique entre les couples

Pour tester la relation entre le succès reproducteur et la diversité génétique individuelle, nous avons mesuré l'hétérozygoté de chaque mâle pour tous les loci ne possédant pas d'allèles nuls (déterminé par CERVUS, voir plus haut). De plus, nous avons utilisé la méthode décrite par Coulson *et al.* (1998) pour évaluer la similarité génétique: la moyenne d^2 a été calculée comme la moyenne du carré de la distance entre les deux allèles pour chaque locus (uniquement pour les loci sans allèles nuls). Cette méthode implique un modèle de mutation par pas (Stepwise Mutation Model, SMM) pour tous les loci utilisés (voir Coulson *et al.*, 1998; Pemberton *et al.*, 1999). Alors que l'hétérozygoté individuelle est affectée par des accouplements récents entre apparentés (effet lié à la consanguinité), la moyenne d^2 est affectée par des événements plus anciens et elle est plus sensible aux accouplements entre animaux éloignés génétiquement (voir Pemberton *et al.*, 1999; Weatherhead *et al.*, 2002). Pour les deux méthodes, nous avons comparé la variabilité génétique entre les pères et les autres mâles (t-test) et testé le lien entre la variabilité génétique et le nombre de nouveau-nés par corrélation.

L'apparentement entre individus R (Relatedness) a été calculé pour tous les couples potentiels par KINSHIP v1.2 (Goodnight & Queller, 1999) en utilisant tous les microsatellites ne présentant pas d'allèle nul. La comparaison des valeurs R entre les couples ayant engendrés des nouveau-nés et les autres couples a été testée par un test de t, alors qu'une corrélation a été effectuée entre le nombre de nouveau-nés et les valeurs de R.

7.5 Résultats

Estimation du taux d'erreur

Entre 3 et 60% (suivant les locus; moyenne: 30.7%) des nouveau-nés ont été analysés au moins 2 fois. A partir de ces répétitions, nous avons pu déterminer que le locus Vb-B18 présentait un taux d'erreur considérable (29%); il a donc été retiré pour effectuer les analyses de paternité. Le taux d'erreur basé sur les 12 locus restant a été estimé à 2.5%, ce taux élevé étant basé uniquement le le repassage d'animaux problématique à la première lecture. Basé sur les contradictions observées entre le génotypage des mères et

Tableau 1 femelles reproductrices avec le nombre de nouveau-nés, le nombre de pères assignés par ponte, le nombre de nouveau-nés non-assignés et les mesures de taille et de longueur de la femelle avant la ponte.

Femelle No	Nombre de nouveau-nés	Nombre de pères dans la portée (prob. > 80%)	Nombre de nouveau-nés non-assignés (prob. < 80%)	SVL de la femelle (cm)	Poids de la femelle (g.)
16	2	2	0	56.0	128
17	8	3	0	58.4	202
21	7	4	1	52.0	119
32	9	2	0	52.2	155
38	7	1	0	53.5	108
41	8	3	0	51.9	143
59	8	2	0	53.9	144
70	7	3	2	49.0	121
85	4	3	0	51.5	120
421	10	1	0	48.9	114
442	7	1	0	50.0	93
448	8	3	0	51.3	104
453	7	1	0	47.4	98
Moyenne	7.1 ±2.1	2.4 ±1.1	0.23	52.0 ±2.99	126.8 ±29.1

de leurs nouveau-nés, le taux d'erreur a pu être estimé à 0.4% (6 erreurs, dont 5 pouvant être expliquée par la présence d'allèles nuls). L'évaluation effectuée par CERVUS indique un niveau d'erreur de 1.6%; ce taux a pu ainsi être intégré dans ce logiciel pour tenir compte du taux d'erreur de typage dans les évaluations de la fiabilité de l'assignement. En excluant le locus Vb-B18, le niveau d'erreur de génotypage est donc suffisamment faible pour ne pas influencer sur les assignements obtenus à partir de CERVUS.

Résultats des analyses de parenté

Quinze femelles (7 provenant de la première population, 8 de la seconde) ont été capturées et ont donné naissance à 115 nouveau-nés. De plus, 43 mâles (25 dans la première population, 18 dans la seconde) ont été considérés comme pères potentiels. CERVUS a détecté des allèles nuls dans 4 des 12 loci (Vb-A8, Vb-B1, Vb-D6 et Vb-D'13). Leur père a été attribué à 99 nouveau-nés avec un niveau de confiance supérieur à 80%, la majorité des animaux non assignés appartenant à 2 pontes (11 des 16 nouveau-nés non-attribués). En utilisant les modifications suggérées par Jones & Ardren (2003), la paternité a été attribuée à 102 nouveau-nés avec le même niveau de confiance. Seulement 9 assignements (9%) sont différents entre les deux méthodes (dont 3 dans les deux pontes problématiques citées ci-dessus). En conséquence, seuls les résultats utilisant les modifications suggérées par Jones & Ardren (2003) seront utilisés pour les analyses ci-dessous.

Pour les deux sites, 102 des 115 nouveau-nés ont été assignés avec un taux de confiance supérieur à 80 ou 95%, la majorité (56%) étant supérieure à 95%. A l'exception de trois, tous les animaux non-assignés appartiennent à deux pontes, localisées dans la même zone, en limite de la population 1. Les assignements étant faibles pour ces deux pontes (50 et 62%), elles n'ont pas été incluses dans les analyses ultérieures (Tableau 1).

Liens entre le succès reproducteur des mâles, la SVL et la paternité multiple

Un père unique a été trouvé dans seulement 4 pontes (31%) et toutes appartiennent à la population 2. Au sein des autres pontes, nous avons trouvé 2 pères différents dans 3 pontes, 3 pères dans 5 pontes et 4 pères dans 1 ponte. Le nombre de pères par ponte

n'est pas significativement différent entre les populations ($p = 0.638$). Vingt-et-un pères différents ont été assignés dans les 13 pontes, six d'entre eux étant assignés à 2 pontes différentes, et un seul à trois pontes. La différence de SVL entre les pères retrouvés dans une seule ou dans plusieurs pontes est significatif ($t = -3.295$, $p = 0.004$). Les pères sont significativement plus grands que les autres mâles ($t = -2.200$, $p = 0.030$). De plus, les pères uniques au sein d'une ponte sont significativement plus grands que les autres pères ($t = -2.905$, $p = 0.008$). Au sein de chaque ponte ayant une paternité multiple, les mâles les plus féconds sont plus grands (SVL = 46.97 et 45.30, respectivement), mais la différence n'est pas significative ($t = -0.981$; $p = 0.337$). De plus, le nombre de nouveau-nés engendrés chaque année est corrélé avec la taille du père ($r^2 = 0.161$, $p = 0.038$, voir Figure 1).

Le nombre de pères au sein d'une ponte a d'impact ni sur le nombre de nouveau-nés ($r^2 = 0.039$, $p = 0.518$), ni sur la survie des nouveau-nés à la naissance ($r^2 = 0.000$, $p = 0.945$).

Proximité entre les mères et les pères potentiels

Aucune relation significative entre le nombre de nouveau-nés produit par un mâle et la date de la première capture annuelle (qui donne une indication sur la date de sortie d'hibernation) ($r^2 = 0.004$; $p = 0.823$) ou avec la distance entre la femelle et le père ($r^2 = 0.080$; $p = 0.138$) a été détectée. De plus, la date de la première capture annuelle ne diffère pas significativement entre les pères et les autres mâles ($t = -0.597$; $p = 0.554$).

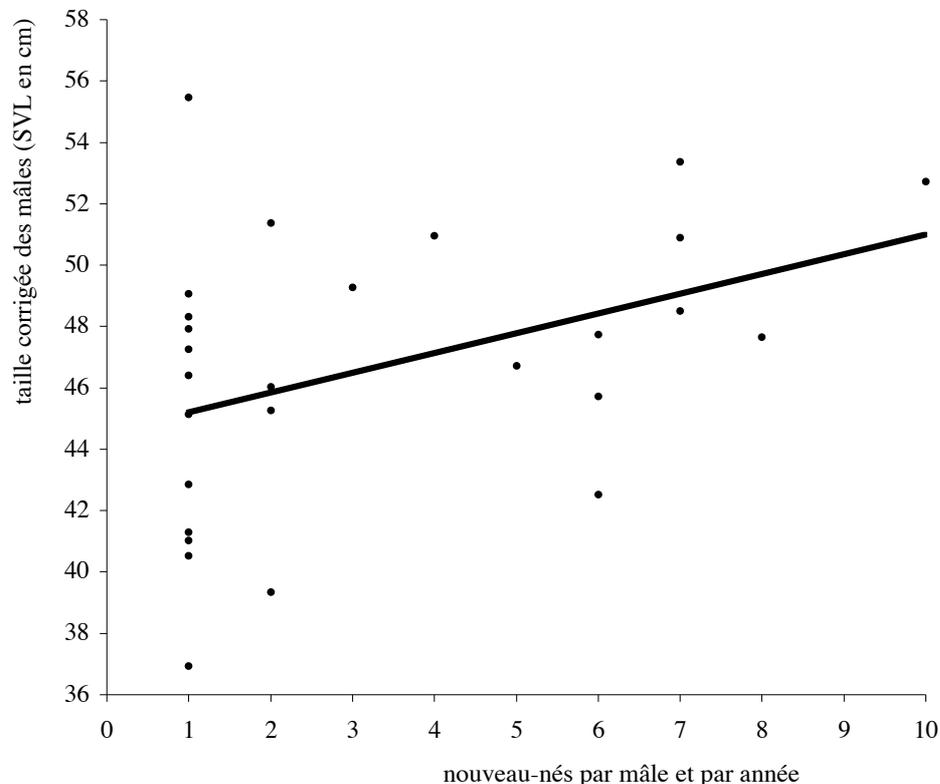


Figure 1 lien entre la taille des pères (longueur museau-cloaque SVL) et le nombre de nouveau-nés engendrés par année ($r^2 = 0.161$; $p = 0.038$)

Variabilité et similarité génétique entre les couples

L'apparentement (R) entre les couples ayant produits des nouveau-nés n'est pas différent de l'apparentement entre toutes les paires possibles au sein d'une population ($R = 0.074$ et 0.022 pour la population 1, $p = 0.301$). Aucune relation a pu être détectée entre le nombre de nouveau-nés engendré par les pères et l'apparentement entre les couples ($r^2 = 0.058$, $p = 0.217$).

Aucune différence d'hétérozygoté ou de moyenne d^2 entre les pères et les autres mâles a été observée (moyenne de l'hétérozygoté = 0.507 et 0.503 , $p = 0.904$; moyenne $d^2 = 162.0$ et 148.5 , $p = 0.596$); de même, aucune corrélation entre le nombre de nouveau-nés et l'hétérozygoté ou la moyenne d^2 des pères (transformation logarithmique, voir Pemberton *et al.*, 1999) a été remarquée (Spearman $r = 0.089$, $p = 0.570$; Pearson $r = -0.123$, $p = 0.432$).

7.6 Discussion

Paternité multiple

La paternité multiple a déjà été observée chez les *Vipera berus* captives, en présence d'une haute densité de mâles (Höggren & Tegelstrom, 1995). Toutefois, notre étude démontre que la multipaternité intervient aussi dans les populations naturelles, même si la densité de péliades est faible (1 adulte/hectare, voir Ursenbacher & Monney, 2003). Par conséquent, l'hypothèse de Nilson & Andren (1982) suggérant que la contraction de l'utérus après l'accouplement produite par des sécrétions rénales permettait d'éviter la fécondation par d'autres mâles ne peut être confirmée. La description de ce bouchon copulatoire a déjà été critiquée par Stille *et al.* (1986). Höggren & Tegelstrom (1995) ont démontré que la multipaternité est fréquente lorsque la densité d'animaux est élevée comme en captivité. Nous confirmons donc que la multipaternité n'est pas évitée par la présence d'un bouchon copulatoire dans des populations naturelles. Néanmoins, il est possible que certaines sécrétions rénales se produisent, permettant de réduire la fécondité des accouplements suivants (voir Höggren & Tegelstrom, 2002), mais n'évitant pas la fécondation. Cependant, le bouchon copulatoire peut avoir un autre rôle (voir ci-dessous).

La multipaternité est évitée pour certaines pontes; dans ces cas, le père unique est l'un des plus grands mâles existant dans la population. Puisque les pontes avec de la monopaternité sont engendrées par les plus grands mâles, on peut supposer qu'ils utilisent une stratégie particulière: si l'un des plus grands mâles trouve une femelle réceptive, il va rester auprès d'elle pour s'accoupler plusieurs fois et éviter les accouplements de la femelle avec d'autres mâles (ce mâle va gagner tous les combats puisqu'il est l'un des plus grands). La surveillance post-copulatoire a déjà été observée chez *V. berus* (Andrén, 1986; Luiselli, 1995). Cette stratégie garantit un nombre important de nouveau-nés pour ce mâle; toutefois il doit être certain que la femelle ne s'est pas encore accouplée, puisque le premier accouplement induit la plus grande descendance (Höggren & Tegelstrom, 2002). D'un autre côté, si un grand mâle rencontre une femelle qui s'est déjà accouplée, ce mâle a aucun intérêt à rester avec cette femelle puisque le premier accouplement va induire la plus grande descendance. Par conséquent, pour appliquer cette stratégie, les gros mâles doivent pouvoir déterminer s'ils sont les premiers à s'accoupler; la sécrétion rénale pourrait donc avoir un rôle dans le "marquage" des femelles déjà accouplées, permettant ainsi aux mâles d'adapter leur stratégie reproductrice.

Toutefois, la plupart des études du comportement reproducteur des Viperidae sont basées sur l'étude du comportement des mâles, le choix de la femelle n'ayant jamais été

observé. Or, chez les oiseaux ou les mammifères, le partenaire est sélectionné par les femelles en fonction de l'âge, de la taille, de la couleur, Quelques observations préliminaires sur des *Vipera aspis* femelles en captivité semblent montrer un évitement de certains mâles (P. Golay, obs. pers.). Ainsi, il serait intéressant de tester le choix du partenaire par les femelles.

Influence de la SVL sur la fécondité

Les femelles péliades s'accouplent tous les deux ou trois ans, le sex-ratio des animaux reproducteurs est donc biaisé (Madsen & Shine, 1993). En conséquent, les mâles se battent pour accéder aux femelles et, généralement, le plus grand gagne (Andrén, 1986; Madsen, 1988; Luiselli, 1993a) et obtient plus de jeunes (cette étude). Néanmoins, les petits mâles pourraient subrepticement s'accoupler et ainsi obtenir une descendance ("sneaking males"). Cette étude est la première évaluant la proportion de ces mâles dans une population de péliades. Nous avons montré que, bien que les plus petits s'accouplent et obtiennent des nouveau-nés, seuls les plus grands peuvent obtenir une progéniture nombreuse ou être le père unique d'une ponte (ce qui produit un nombre considérable de jeunes). Dans quelques rares cas, les petits mâles sont les pères dominants au sein ponte, probablement lorsque leur accouplement a été le premier, avant de se faire déloger par un mâle plus grand. Puisque les petits mâles ne peuvent éviter que les femelles s'accouplent avec des mâles plus grands, ils devraient chercher à multiplier le nombre d'accouplements afin d'obtenir une plus grande fécondité. Des déplacements plus importants durant la période de reproduction devraient en découler. Cependant, le nombre d'accouplements et les déplacements ne sont pas plus élevés pour ces mâles dans notre étude. Le faible nombre de femelles réceptives et les grandes distances entre elles sur notre terrain d'étude sont probablement les causes de la non-détection de cette stratégie.

Taux de survie et paternité multiple

Au contraire de Madsen *et al.* (1992) en Suède et de manière identique à Capula & Luiselli (1994) en Italie, nous n'avons pas trouvé de relation entre le nombre de pères et le taux de survie des nouveau-nés à la naissance. Or, des investigations postérieures sur la population étudiée par Madsen et collaborateurs ont démontré que le niveau de diversité génétique était particulièrement bas dans cette population (Madsen *et al.*, 1996) et que l'impact de l'introduction de nouveaux mâles a conduit à une augmentation rapide du nombre d'adultes (Madsen *et al.*, 1999; Madsen *et al.*, 2004). A l'inverse, les populations utilisées dans cette étude ne souffrent pas d'un niveau de diversité génétique exceptionnellement bas (Chap. 6), probablement comme la population étudiée par Capula & Luiselli (1994). Ainsi, lorsque les mâles ont un niveau de fertilité très bas, la multipaternité possède un effet positif sur la survie des nouveau-nés (voir Loman *et al.*, 1988). En conséquence, la corrélation entre le nombre de père et le taux de survie des nouveau-nés intervient uniquement dans les populations possédant une diversité génétique exceptionnellement faible et/ou une faible fertilité des mâles.

Evitement de consanguinité et diversité génétique

Chez certaines espèces de lézards, les accouplements entre individus sans lien de parentés produisent plus de nouveau-nés (Olsson *et al.*, 1996) et les couples se forment en évitent les partenaires les plus apparentés (Stow & Sunnucks, 2004). De tels comportements n'ont pas été observés chez les serpents (Weatherhead *et al.*, 2002; cette étude). Chez les péliades, les femelles ne choisissent pas les mâles les moins apparentés pour s'accoupler et le succès reproducteur des mâles ne dépend pas de leur niveau d'hétérozygoté ou de leur variabilité génétique (moyenne d^2). Les différentes

stratégies observées chez les serpents et les lézards peuvent résulter d'une territorialité divergente. Les lézards étudiés par Stow & Sunnucks (2004) et par Olsson *et al.* (1996) possèdent une territorialité importante, alors que les péliades et les couleuvres aquatiques américaines (Weatherhead *et al.*, 2002) ne montrent aucun comportement de territorialité et s'accouplent au hasard. Les espèces sans forte structuration interne (telle qu'induite par une territorialité marquée chez les lézards) n'ont pas besoin d'éviter la consanguinité puisque les mouvements au sein de la population sont suffisants pour garantir des accouplements au hasard.

Cette étude a démontré que les plus grands mâles de péliades ne gagnent pas seulement les combats pour accéder aux femelles mais sont aussi les pères de la majorité des nouveau-nés. De plus, il a été montré que les paternités multiples étaient fréquentes dans la nature, même avec une faible densité d'animaux. Finalement, aucun évitement de consanguinité ou de sélection pour une variabilité génétique plus importante a pu être détecté chez les vipères, probablement à cause d'une territorialité nul chez les serpents. Néanmoins, l'impact du comportement sexuel des femelles étant fortement sous-estimé dans les études sur les reptiles, les prochaines investigations devraient être conduites sur le choix des femelles afin d'évaluer si elles sélectionnent leurs partenaires.

7.7 Remerciements

Nous remercions S. Sachot, C. König et V. Helfer pour leur aide sur le terrain. N. Duvoisin et N. di Marco nous ont grandement aidés pour les travaux de laboratoire. Nous remercions J.-C. Monney et J. Cosendai pour leurs suggestions sur les premières versions du manuscrit. Ce travail a été financé par des bourses du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (Fonds No 3100-059132.99/1) et de la Société Académique Vaudoise.

7.8 Bibliographie

- Andrén C (1986) Courtship, mating and agonistic behaviour in a free-living population of adders, *Vipera berus*. *Amphibia-Reptilia* **7**, 353-383.
- Andren C, Nilson G (1987) The copulatory plug of the adder, *Vipera berus* - does it keep sperm in or out. *Oikos* **49**, 230-232.
- Birkhead TR, Møller AP (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London.
- Brown JL (1997) A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioral Ecology* **8**, 60-65.
- Capula M, Luiselli L (1994) Can female adders multiply. *Nature* **369**, 528.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 237-268.
- Coulson TN, Pemberton JM, Albon SD, Beaumont M, Marshall TC, Slate J, Guinness FE, Clutton-Brock TH (1998) Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 489-495.
- Garner TWJ, Gregory PT, McCracken GF, Burghardt GM, Koop BF, McLain SE, Nelson RJ (2002) Geographic variation of multiple paternity in the common garter snake (*Thamnophis sirtalis*). *Copeia*, 15-23.
- Gist DH, Jones JM (1987) Storage of sperm in the reptilian oviduct. *Scanning Microscopy* **1**, 1839-1849.
- Goodnight KF, Queller DC (1999) Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* **8**, 1231-1234.
- Höggren M, Tegelstrom H (1995) DNA-fingerprinting shows within-season multiple paternity in the adder (*Vipera berus*). *Copeia*, 271-277.
- Höggren M, Tegelstrom H (1996) Does long-term storage of spermatozoa occur in the adder (*Vipera berus*)? *Journal of Zoology* **240**, 501-510.

- Höggren M, Tegelstrom H (2002) Genetic evidence for first-male mating advantage in the adder (*Vipera berus*). In: *Biology of the Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Jones AG, Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* **12**, 2511-2523.
- Loman J, Madsen T, Hakansson T (1988) Increased fitness from multiple matings, and genetic heterogeneity: a model of a possible mechanism. *Oikos* **52**, 69-72.
- Luiselli L (1993a) High philopatry can produce strong sexual competition in male adders, *Vipera berus*. *Amphibia-Reptilia* **14**, 310-311.
- Luiselli L (1993b) Are sperm storage and within season multiple mating important components of the adder reproductive biology. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **14**, 705-710.
- Luiselli L (1995) The mating strategy of the European adder, *Vipera berus*. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **16**, 375-388.
- Madsen T (1988) Reproductive success, mortality and sexual size dimorphism in the adder, *Vipera berus*. *Holarctic Ecology* **11**, 77-80.
- Madsen T, Shine R (1992) A rapid, sexually selected shift in mean body size in a population of snakes. *Evolution* **46**, 1220-1224.
- Madsen T, Shine R (1993) Temporal variability in sexual selection acting on reproductive tactics and body size in male snakes. *American Naturalist* **141**, 167-171.
- Madsen T, Shine R, Loman J, Hakansson T (1992) Why do female adders copulate so frequently. *Nature* **355**, 440-441.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999) Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**, 34-35.
- Madsen T, Stille B, Shine R (1996) Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**, 113-118.
- Madsen T, Ujvari B, Olsson M (2004) Novel genes continue to enhance population growth in adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation* **120**, 145-147.
- Mallow D, Ludwig D, Nilson G (2003) *True Vipers: natural history and toxinology of Old World vipers* Krieger Publishing Company, Malabar, Florida.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Nilson G, Andren C (1982) Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. *Hormones and Behavior* **16**, 404-413.
- Olsson M, Shine R, Madsen T, Gullberg A, Tegelstrom H (1996) Sperm selection by females. *Nature* **383**, 585-585.
- Otis DL, Burnham KP, White GC, Anderson DR (1978) Statistical inference from capture data on closed animal population. *Wildlife Monographs* **62**, 7-135.
- Parker GA (1992) Snakes and female sexuality. *Nature* **355**, 395-396.
- Partridge L (1983) Non-random mating and offspring fitness. In: *Mate choice* (ed. Bateson P), pp. 227-255. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pemberton JM, Coltman DW, Coulson TN, Slate J (1999) Using microsatellites to measure the fitness consequences of inbreeding and outbreeding. In: *Microsatellites: evolution and applications* (eds. Goldstein DB, Schlotterer C), pp. 151-164. Oxford University Press, Oxford.
- Prosser MR, Weatherhead PJ, Gibbs HL, Brown GP (2002) Genetic analysis of the mating system and opportunity for sexual selection in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Behavioral Ecology* **13**, 800-807.
- Reynolds JD (1996) Animal breeding systems. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 68-72.
- Saint Girons H (1975) Sperm survival and transport in the female genital tract of reptiles. In: *The Biology of Spermatozoa* (eds. Hafez ESE, Thibault CG), pp. 106-113. S. Karger, Basel, Switzerland.
- Schuett GW (1992) Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: *Biology of pitvipers* (eds. Campbell JA, Brodie ED). Selva, Tyler, Texas.
- Stille B, Madsen T, Niklasson M (1986) Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. *Oikos* **47**, 173-175.
- Stille B, Niklasson M, Madsen T (1987) Within season multiple paternity in the adder, *Vipera berus* - reply. *Oikos* **49**, 232-233.

- Stow AJ, Sunnucks P (2004) Inbreeding avoidance in Cunningham's skinks (*Egernia cunninghami*) in natural and fragmented habitat. *Molecular Ecology* **13**, 443-447.
- Ursenbacher S, Monney JC (2003) Résultats de 5 années de suivi d'une population de Vipère péliade (*Vipera berus*) dans le Jura Suisse: estimation des effectifs et discussion des méthodes d'estimation. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **107**.
- Weatherhead PJ, Prosser MR, Gibbs HL, Brown GP (2002) Male reproductive success and sexual selection in northern water snakes determined by microsatellite DNA analysis. *Behavioral Ecology* **13**, 808-815.
- White GC, Burnham KP (1999) Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* **46**, 120-139.

CONCLUSION ET IMPLICATION POUR LA PROTECTION DES ESPECES



Chapitre 8: Conclusion et implications pour la protection des espèces

8.1 Phylogéographie des vipères européennes

Par leur capacité de survivre dans des refuges de taille limitée (quelques km² suffisent à maintenir une population de vipères pendant plusieurs centaines d'années), ainsi que par leur faible capacité de dispersion (informations confirmées par cette étude, voir Chap. 6), les vipères semblent être des animaux idéaux pour la localisation des différents refuges utilisés par les espèces animales durant les dernières glaciations, ainsi que les routes de recolonisation. Les résultats obtenus dans ce travail démontrent l'utilisation des refuges principaux déjà connus (voir Taberlet *et al.* 1998; Hewitt 2000), tels que l'Espagne (*V. aspis*), l'Italie (*V. aspis* et *V. berus*) et les Balkans (*V. ammodytes* et *V. berus*), mais prouvent aussi l'utilisation de nombreux autres refuges (sud de la France, nombreux refuges dans les Balkans, refuges nordiques), probablement de taille plus réduite. Le "micro-refuge" français n'avait pas encore été mis en évidence pour les vertébrés terrestres, mais l'avait déjà été pour des plantes et des invertébrés. La diversité au sein de la péninsule balkanique est plus inattendue, bien que sa géographie complexe et l'impact plus faible des glaciations (Tzedakis *et al.* 2002) pouvaient laisser entrevoir une diversité considérable. Ce grand nombre de refuges pourrait expliquer la forte diversité chez de nombreuses espèces, comme les tritons par exemple (Arntzen & Wallis 1999). Malheureusement, la phylogéographie des espèces balkaniques est encore très sommaire, et seules quelques études générales sont disponibles. Comme ces micro-refuges devaient être limités à des surfaces réduites, peu de mammifères ont pu y survivre durant les dernières glaciations. L'espèce la plus nordique, la péliade, présente aussi une structuration importante, mettant en évidence des refuges au Nord des Alpes. Néanmoins, notre étude n'a pas pu localiser ce ou ces refuges. Ainsi, ce travail a permis de confirmer que les vipères (et très probablement les reptiles de manière générale) sont d'un grand intérêt pour la détermination des micro-refuges (ou refuges cryptiques) utilisés par les espèces animales et pour obtenir des informations biogéographiques pertinentes. De plus, ces reptiles ont montré une grande diversité génétique, plus importante que pour la majorité des espèces étudiées en Europe. Cette diversité est probablement due, à nouveau, à leur faible dispersion et à leur possibilité de survivre dans des zones limitées, confirmant ainsi les hypothèses décrites ci-dessus.

La grande diversité génétique observée chez les vipères devrait conduire à la détermination de nombreux ESU et probablement conduire à des modifications de la taxonomie. Ainsi, la combinaison d'études génétiques et morphologiques chez la péliade permet de démontrer que, chez cette espèce, peu de différences morphologiques apparaissent entre les clades génétiques malgré leur ancienne séparation (environ 1.5 Myr). Cette absence de différenciation morphologique flagrante ne permet pas d'affirmer qu'une nouvelle sous-espèce de péliade peut être définie, bien que les groupes soient génétiquement bien différenciés. Concernant la vipère aspic, les résultats de la génétique confirment la taxonomie de cette espèce à l'exception de *V. a. atra* et contredit les hypothèses de Zuffi (2002). Les travaux récents de Golay (2005) démontrent que *V. a. atra* n'est qu'un écotype de *V. a. aspis* adapté aux conditions montagneuses. La combinaison des études génétiques et morphologiques permet donc de mettre en synonymie *V. a. aspis* et *V. a. atra* malgré les travaux de Garrigues *et al.* (2005). Concernant la vipère ammodytes, les analyses génétiques démontrent une diversité génétique considérable avec la détermination d'au moins 7 (mais plutôt 10) clades bien définis et séparés avant le Pléistocène. Or, les études morphologiques actuelles ne

permettent pas de trouver des différences morphologiques entre ces clades. Les résultats génétiques vont conduire à des analyses morphologiques plus fines sur l'entier de l'aire de répartition de l'espèce afin de chercher d'éventuelles différences morphologiques qui pourraient conduire à la révision complète de la systématique de cette espèce. Néanmoins, et comme pour la péliade, on observe une plus grande différenciation génétique que morphologique, avec la détermination de groupes "cryptiques". Afin de conserver un maximum de diversité génétique au sein de ces taxa, les résultats génétiques devront influencer sur la conservation de ces espèces.

La mise en évidence de ces nombreux groupes génétiques chez les différentes espèces devrait conduire à des modifications du statut de protection de ces espèces. Pour l'aspic, la disparition de *V. a. atra* en tant que sous-espèce pourrait conduire la Suisse (ce taxon n'étant présent pratiquement que dans ce pays) à modifier ses mesures de protection; en effet, la vipère aspic des Alpes (*V. a. atra*) est actuellement considérée comme peu menacée, alors que *V. a. aspis* de plaine est extrêmement vulnérable. La mise en synonymie de ces deux sous-espèces pourrait donc modifier la liste rouge des reptiles de Suisse. Au contraire, la détermination d'un clade italien de vipère péliade va modifier son degré de menace et devrait impliquer une protection particulière du clade italien qui est localisé sur une surface limitée (nord de l'Italie, extrême sud-est de la Suisse, le sud de l'Autriche et le nord-est de la Slovénie). En Suisse, la séparation en 2 taxa différents aboutira à une protection différenciée (listes rouges 2005) entre les populations du Jura, des Préalpes et des Alpes centrales qui sont particulièrement menacées alors que les populations du clade italien, localisées en Engadine et sa périphérie, sont moins menacées malgré une surface occupée plus faible (en raison d'une forte densité et d'un degré de destruction plus faible de son habitat). Globalement, le clade italien est particulièrement menacé puisque ce clade est en concurrence directe avec d'autres espèces de vipères dans une grande partie de son aire de répartition (*V. aspis* en Italie et *V. ammodytes* en Italie, en Autriche et en Slovénie). Finalement, afin de protéger au mieux la péliade, la zone de contact entre ces deux clades devrait être définie en Suisse, en Autriche et en Slovénie. Pour cela, l'utilisation combinée de marqueurs mitochondriaux et nucléaires permettrait de déterminer aisément les zones de contact et d'introgession. Pour la vipère ammodytes, peu d'implications directes pour la protection peuvent être effectuées pour l'instant. En effet, bien qu'il soit important de protéger les différents groupes génétiques distincts, des analyses morphologiques complémentaires sont nécessaires afin d'établir si des groupes distinguables existent, lesquels pourraient alors être protégés de manière différenciée.

Ainsi, les résultats obtenus dans les Chapitres 2 à 4 démontrent une importante différenciation génétique chez les vipères qui va impliquer une révision profonde pour la majorité des clades. De plus, par ses caractéristiques, ce groupe démontre un grand intérêt pour la description des refuges et des routes de recolonisation de la fin du Pléistocène et du Quaternaire.

8.2 Structuration génétique des vipères péliades et paternité

De nombreuses populations de vipères péliades ont disparu en Suisse durant les 50 dernières années. En effet, plusieurs sites référencés dans les banques de données du KARCH (entre autres les observations de E. Kramer entre 1940 et 1980) n'abritent actuellement plus de péliades. Ces zones ont été parcourues à de nombreuses reprises par J.-C Monney depuis 1992 dans le cadre de l'inventaire des reptiles du Jura vaudois (Perret *et al.* 2002) ou par moi-même en 2003-2004 lors de l'actualisation des listes rouges. De plus, une analyse SIG a été réalisée par Métral (2001) dans le Massif jurassien afin de déterminer quels étaient les sites potentiels pour cette espèce; les

milieux les plus favorables ont ensuite été explorés à plusieurs reprises sans découvrir d'indice de présence de l'espèce. En plaine et à faible altitude, la disparition de la vipère péliade est probablement naturelle car elle découle de l'élévation de la température depuis la fin du petit âge glaciaire (il y a 200-300 ans) et de la concurrence avec la vipère aspic. Pour le Massif jurassien, ces paramètres ne sont pas valides car la température est suffisamment faible pour le maintien de la péliade et la concurrence avec l'aspic n'est pas encore apparente. De plus, aucune raison environnementale ne peut être avancée pour expliquer les disparitions locales de populations puisque Métral (2001) n'a pas trouvé de différences significatives entre les sites où l'espèce est encore présente et les sites d'où elle a disparu. En conséquence, plusieurs hypothèses expliquant ces extinctions peuvent être envisagées:

1° Impact direct de l'homme:

Les destructions volontaires pratiquées durant le XIX^{ème} et XX^{ème} siècle ont probablement fait disparaître de nombreuses populations. Bien que ces destructions précèdent les relevés du KARCH, elles ont considérablement fragmenté la distribution de l'espèce et ont, à certains endroits, probablement réduit le nombre d'individus à un nombre trop faible pour que ces populations puissent survivre à moyen terme; en conséquence, ces populations ont encore été observées durant le milieu du XX^{ème} siècle, mais sont actuellement éteintes. De plus, des destructions très locales (par exemple l'acharnement d'un amodiateur à la destruction des vipères bien que légalement protégées) ou des prélèvements par des terrariophiles peuvent conduire une population à disparaître. D'après des simulations effectuées par Ursenbacher (1998), la destruction ou le prélèvement régulier de quelques animaux adultes conduit irrémédiablement à la disparition de la population. En plus de cet impact direct, les disparitions peuvent aussi avoir des raisons indirectes, comme l'entretien trop important des lisières, la coupe de tous les buissons, la destruction ou le colmatage des murets, la fauche de l'herbe et/ou le broutage intensif. Cet entretien, souvent encouragé par les propriétaires des terrains, a pu conduire certains pâturages à devenir défavorables aux serpents, induisant la disparition des populations de péliades.

2° Effet démographique:

Les anciennes petites populations, le plus souvent isolées, ont pu évoluer de manières différentes; suivant leur taille, le nombre d'animaux a pu fluctuer de manière considérable, jusqu'à atteindre un nombre trop faible pour le maintien de la population. Le risque de disparition d'une population étant directement lié à sa taille, les populations qui se seraient maintenues jusqu'à nos jours sont probablement les plus importantes. Mais le hasard peut aussi avoir fait se maintenir quelques populations de petite taille.

3° Impact de la génétique:

L'isolement plus ou moins important des populations de péliades a conduit celles-ci à évoluer génétiquement de manière distincte. Suivant la taille de la population, le niveau de la migration entre les populations et des événements stochastiques, la dérive génétique a été plus ou moins forte. La disparition de la diversité génétique dans certaines populations pourrait être à l'origine de leur disparition par baisse de la fécondité, comme observé à Smygehuk (Suède) (Madsen *et al.* 1996). Comme les péliades sont philopatriques et que les déplacements sont très faibles même entre des populations proches (voir Chap. 6), la diversité génétique est donc difficilement augmentée par la migration naturelle. De plus, ces comportements ne favorisent pas la colonisation de nouveaux sites ou la recolonisation.

Ces trois hypothèses ne sont pas exclusives. En effet, les deux dernières sont souvent liées, puisque la diminution du nombre d'animaux pour des raisons démographiques va

augmenter la consanguinité, et donc diminuer la diversité génétique, laquelle va induire une diminution du nombre des effectifs, faisant entrer la population dans une spirale (vortex) conduisant à sa disparition. D'un autre côté, la 1^{ère} hypothèse peut aussi avoir eu un impact sur le nombre d'animaux dans une population donnée, conduisant celle-ci à subir les phénomènes des deux autres hypothèses.

Afin de protéger au mieux les populations relictuelles, il faut veiller à ce que les paramètres avancés par la 1^{ère} hypothèse ne puissent plus intervenir. En effet, les vipères sont actuellement protégées, mais les destructions volontaires sont encore nombreuses. Or, l'impact de la disparition d'une femelle gestante (les animaux les plus vulnérables car les plus exposés) est considérable sur la survie d'une population à long terme (Ursenbacher 1998). Quant aux paramètres stochastiques, il est possible de les suivre, mais impossible de les maîtriser; seule l'augmentation de la surface utilisable par les vipères, l'augmentation des proies et la diminution des risques de prédatations permettraient de diminuer les risques de disparition. Des mesures d'aménagement comme l'entretien favorable des lisières (voir Ursenbacher 1998), le maintien de murs en pierres sèches, de tas de pierres et de zones buissonnantes et à hautes herbes (zones peu pâturées, pas engraisées et peu entretenues) devraient permettre d'améliorer les sites actuels. Puisque la majorité des populations de péliades vivent actuellement dans des zones entretenues par les agriculteurs, ces aménagements devraient leur être suggérés.

Au niveau génétique, les populations étudiées ne semble pas montrer une richesse allélique particulièrement basse. De plus, aucune diminution de la survie des juvéniles n'a pu être observée (comme observé par Madsen & Shine 1996), il est donc probable que les sites étudiés ne souffrent pas de consanguinité. Néanmoins, certaines populations possèdent une diversité génétique légèrement plus faible que les plus grandes populations jurassiennes et alpines (PM dans le Jura, DL dans les Préalpes, cf. Chap. 6), ces sites devraient donc être surveillés en priorité. En effet, la disparition de 80% des effectifs en 10 ans sur le site suivi par Madsen et collaborateurs démontre la rapidité de l'extinction d'une population. En conséquence, les populations résiduelles de péliades devraient être continuellement surveillées afin de suivre d'éventuelles diminutions drastiques telles qu'observées en Suède. Si une décroissance des effectifs est observée sans qu'une modification environnementale n'en soit la cause, des raisons génétiques pourraient être envisagées. La réintroduction d'animaux serait alors envisageable afin d'éviter la disparition de la population. Dans un complexe de populations interconnectées (méta-population), la disparition de certaines populations est compensée par la colonisation de nouveaux sites et la recolonisation d'habitats où l'espèce a disparu. Les péliades étant des animaux peu mobiles, le taux de recolonisation est réduit. De plus, la fragmentation et l'isolement induits par l'homme réduisent aussi ce taux. L'intervention humaine est donc actuellement le seul moyen pour augmenter la diversité génétique au sein de la plupart des populations. Le cas école de Madsen et collaborateurs (Madsen *et al.* 1999; Madsen *et al.* 2004) démontre que l'introduction d'une vingtaine de mâles apporte une diversité génétique suffisante au maintien de la population. En conséquence, l'intervention humaine, même si elle comporte des risques (voir ci-dessous) devrait être tentée lorsque tous les paramètres suggèrent que la population va disparaître. Néanmoins, ces lâchés devraient être réalisés avant la quasi-extinction de la population (les chances de succès du lâché sont alors trop faibles), mais quand les effectifs de la population diminuent régulièrement depuis une dizaine années. Finalement, des réintroductions dans les zones où l'espèce a disparu devraient être testées puisque l'émigration semble très limitée. Cependant, plusieurs conditions préalables doivent être remplies avant les réintroductions:

- Les effectifs des populations-cibles devraient être en régression régulière depuis une dizaine d'années sans que des facteurs environnementaux ou humains (destructions, prélèvements) puissent être mis en cause;
- Les animaux introduits devraient provenir d'une population géographiquement et génétiquement proche. Il est évident que des animaux élevés en captivité provenant de populations diverses ne seraient pas adaptés, risqueraient de transmettre des maladies ou d'introduire des gènes non adaptés (outbreeding depression) et fragiliseraient encore plus la population-cible.
L'introduction d'animaux provenant de plusieurs populations pourrait apporter une plus grande diversité génétique; par contre, les risques d'importation de maladies seraient également accrus;
- Une réflexion approfondie sur la détermination des meilleurs candidats à la réintroduction (et leur nombre) devrait être entreprise. En effet, plusieurs classes d'âges peuvent être réintroduites avec des objectifs différents: des mâles (dans le but d'apporter de la variabilité génétique, cf. Madsen *et al.* 1999), des femelles gestantes (pour introduire des nouveau-nés qui seraient directement imprégnés par leur nouvel environnement), des nouveau-nés (après le maintien en captivité des femelles en milieu clos) ou des subadultes (juste avant leur première reproduction, afin d'éviter l'importante mortalité des juvéniles). Néanmoins, toutes ces stratégies comportent des avantages et des inconvénients et leurs impacts sur la (les) population(s) prélevée(s) et sur la survie des animaux introduits sont très variables. Des simulations démographiques devraient permettre de mieux préparer ces introductions en augmentant les chances de succès et en limitant les risques pour la (les) population(s)-source(s);
- Les animaux lâchés devraient être marqués et génotypés afin d'être reconnus et de pouvoir quantifier leur apport individuel dans la future population;
- Un suivi rigoureux durant au moins 2 générations (10-15 ans) devrait être exécuté afin d'évaluer le développement de la population-cible et de la (les) population(s)-source(s), d'évaluer l'impact du lâché sur la diversité génétique et d'obtenir ainsi un maximum d'informations pour d'autres ré-introductions.

En conclusion, cette étude a permis d'établir que les vipères possèdent une structuration génétique importante, aussi bien sur l'entier de leur aire de répartition qu'au niveau populationnel. Cette structuration résulte de deux paramètres importants pour ces espèces: une faible dispersion et la possibilité de survivre sur de petites zones pendant de longues périodes. De manière générale, cette forte séparation semble se retrouver chez de nombreuses espèces de *Viperidae* vivant dans les milieux tempérés, seule l'étude de Jaggi *et al.* (2000) démontrant le contraire. L'analyse des populations de cette espèce à l'aide de marqueurs microsatellites devrait être entreprise pour confirmer les résultats obtenus avec des RAPD, la vipère aspic étant aussi particulièrement menacée en plaine.

8.3 Perspectives

La phylogéographie de plusieurs espèces de vipères européennes a montré son grand intérêt pour la détermination des zones refuges utilisées durant le Pléistocène. L'étude phylogéographique des autres espèces du genre *Vipera* (plus particulièrement *V. latastei* et *V. ursinii*) devrait conduire à une meilleure compréhension de la diversité des refuges espagnols (*V. latastei* et *V. seoanei*) et paléarctique (*V. ursinii*). De plus, la phylogénie du genre *Vipera s.s.* devrait être réalisée avec l'intégralité des espèces. Les travaux préliminaires de Garrigues *et al.* (2005) et de Joger *et al.* (2003) demandent à être confirmés et complétés par l'étude d'un nombre de gènes supplémentaires. Ce travail

permettrait aussi de mieux comprendre les phénomènes de colonisation, de disparition et d'interaction des Viperidae dans la zone Paléarctique depuis l'arrivée des vipères en Europe (Miocène).

La considérable diversité observée dans le refuge balkanique indique que d'autres études de phylogéographie sur les reptiles ou d'autres espèces à faible dispersion devraient être conduites dans cette région. Elles permettraient de comprendre la richesse spécifique observée dans cette région, tout comme les études phylogéographiques effectuées dans la péninsule Ibérique ont permis de comprendre la diversité génétique présente dans cette zone.

Les résultats obtenus dans cette thèse ont permis de mettre en évidence un clade italien insoupçonné chez *V. berus*. Néanmoins, la délimitation précise de la zone de contact entre les deux clades n'a pas été localisée et aucune différence morphologique flagrante n'a pu être mise en évidence. Or, la résolution de ces deux aspects est nécessaire à une protection plus efficace de cette espèce. Ainsi, des mesures morphologiques complémentaires devraient être entreprises sur un nombre plus élevé d'animaux alors que des analyses génétiques devraient être réalisées dans les zones de contact (les Grisons et en Autriche) pour déterminer précisément la localisation des deux groupes génétiques. En complément, les analyses sur les zones de contact permettraient d'estimer le déplacement des animaux, d'évaluer le niveau d'introgession entre les groupes et de comprendre la dynamique de recolonisation de cette espèce.

8.4 Bibliographie

- Andren C, Nilson G (1987) The copulatory plug of the adder, *Vipera berus* - does it keep sperm in or out. *Oikos* **49**, 230-232.
- Arntzen JW, Wallis GP (1999) Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*): morphological and mitochondrial DNA data. *Contributions to Zoology* **68**, 181-203.
- Ashe J, Marx H (1988) Phylogeny of viperine snake (Viperinae): Part II. Cladistic analysis and major lineages. *Field Zool.* **52**, 1-23.
- Avise JC, Arnold J, Ball RMJ, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Avise JC, Nelson WS, Sibley CG (1994) DNA-sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New-World vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5173-5177.
- Baran I, Joger U, Kutrup P, Turkozan O (2001) On new specimens of *Vipera barani* Bohme & Joger, 1983 from northeastern Anatolia, and implications for the validity of *Vipera pontica* Billing, Nilson & Sattler, 1990 (Reptilia, Viperidae). *Zoology in the Middle East* **23**, 47-53.
- Billing H, Nilson G, Sattler U (1990) *Vipera pontica* sp. n, a new viper species in the kaznakovi group (Reptilia, Viperidae) from Northeastern Turkey and adjacent Transcaucasia. *Zoologica Scripta* **19**, 227-231.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, Searle JB (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1219-1226.
- Boettger O (1880) Die Reptilien und Amphibien von Syrien, Palästina und Cypern. *Ber. senckenb. naturf. Ges. Frankfurt* **1879/1880**, 132-219.

- Böhme W, Joger U (1983) Eine neue Art des *Vipera berus*-Komplexes aus der Türkei. *Amphibia-Reptilia* **4**, 265-271.
- Braña F, Bas S (1983) *Vipera seoanei cantabrica* ssp. n. *Munibe* **35**, 87-88.
- Capula M, Luiselli L (1994a) Can female adders multiply. *Nature* **369**, 528.
- Capula M, Luiselli L (1994b) Reproductive strategies in alpine adders, *Vipera berus*. The black females bear more often. *Acta Oecologica* **15**, 207-214.
- Castanet J, Guyetant R (1989) *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France* Société Herpétologique de France, Paris. p.
- Crnobrnja-Isailovic J, Duki G, Krsti N, Kalezi ML (1997) Evolutionary and palaeogeographical effect on the distribution of the *Triturus cristatus* superspecies in the central Balkans. *Amphibia-Reptilia* **18**, 321-332.
- De Haro L, Robbe-Vincent A, Saliou B, Valli M, Bon C, Choumet V (2002) Unusual neurotoxic envenomations by *Vipera aspis aspis* snakes in France. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 137-145.
- Ferrière R (1986) *Vipera berus berus* L. dans les Alpes-Maritimes et l'extrême sud-est des Alpes-de-Haute-Provence: un problème de biogéographie. 2ème partie: situation actuelle - interprétation. *Biocosme mésogéen* **3**, 121-182.
- Filippi E (2003) On the proposed elevation of *Vipera aspis* subspecies to full species rank: A cautionary note. *Amphibia-Reptilia* **24**, 235-238.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 617 p.
- Garrigues T, Dauga C, Ferquel E, Choumet V, Failloux A-B (2005) Molecular phylogeny of *Vipera Laurenti*, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**, 35-47.
- Gasc J-P, Cabela A, Crnobrnja-Isailovic J, Dolmen D, Grossenbacher K, Haffner P, Lescure J, Martens H, Martínez Rica JP, Maurin H, Oliveira ME, Sofianidou TS, Veith M, Zuiderwijk K (1997) *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe* Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. p.
- Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ, Johnson G (1997) Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **6**, 1123-1132.
- Gibbs HL, Weatherhead PJ (2001) Insights into population ecology and sexual selection in snakes through the application of DNA-based genetic markers. *Journal of Heredity* **92**, 173-179.
- Golay P (2005) *Systématique du complexe Vipera aspis (Serpentes, Viperidae) en Suisse*, Université de Montpellier.
- Grossenbacher K, Hofer H (1994) Liste rouge des reptiles menacés de Suisse. In: *Liste rouge des espèces animales menacées de Suisse* (ed. Duelli P), p. 97. OFEFP, Bern.
- Herrmann HW, Joger U (1997) Evolution of viperine snakes. In: *Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite* (eds. Thorpe RS, Wüster W, Malhorta A), pp. 43-61. Oxford University Press, Oxford.
- Herrmann HW, Joger U, Nilson G (1992) Molecular phylogeny and systematics of viperine snakes I: General phylogeny of European vipers (*Vipera sensu stricto*). In: *Proceedings of the Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica* (eds. Korsós Z, Kiss I), pp. 219-224, Budapest, Hungary.

- Herrmann HW, Joger U, Nilson G, Sibley CG (1987) First steps towards a biochemically based reconstruction of the phylogeny of the genus *Vipera*. In: *Proceedings of the Fourth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica* (eds. Van Gelder JJ, Strijbosch H, Bergers PJM), pp. 195-200, Nijmegen, Holland.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Höggren M, Tegelstrom H (1995) DNA-fingerprinting shows within-season multiple paternity in the Adder (*Vipera berus*). *Copeia*, 271-277.
- Höggren M, Tegelstrom H (2002) Genetic evidence for first-male mating advantage in the adder (*Vipera berus*). In: *Biology of the Vipers* (eds. Schuett GW, Höggren MH, Douglas ME, Greene HW). Eagle Mountain Publishing, Sandy, UT.
- Ivanov M, Rage J-C, Szyndlar Z, Venczel M (2000) Historique et origine géographique des faunes de serpents en Europe. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **96**, 15-24.
- Jaggi C, Wirth T, Baur B (2000) Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. *Biological Conservation* **94**, 69-77.
- Joger U, Kalyabina S, Schweiger S, Mayer W, Orlov NL, Wink M (2003) Phylogeny of the Eurasian *Vipera* (Subgenus *Pelias*). In: *12th Ordinary General Meeting. Programme and abstracts, 12-16 August 2003* (ed. Herpetologica SE). Societas Europaea Herpetologica, St-Petersburg, Russia.
- Joger U, Lenk P, Baran I, Böhme W, Ziegler T, Heidrich P, Wink M (1997) The phylogenetic position of *Vipera barani* and of *V. nikolskii* within the *Vipera berus* complex. In: *Herpetologia Bonnensis* (eds. Böhme W, Bischoff W, Ziegler T), pp. 185-194. Zoologisches Forschungsinstitut und Museum A. Koenig, Bonn.
- Lenk P, Kalyabina S, Wink M, Joger U (2001) Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia : Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 94-104.
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 991-1107.
- Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ (1999) Hierarchical patterns of genetic population structure in black rat snakes (*Elaphe obsoleta obsoleta*) as revealed by microsatellite DNA analysis. *Evolution* **53**, 1995-2001.
- Luiselli L (1993a) Are sperm storage and within season multiple mating important components of the adder reproductive biology. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **14**, 705-710.
- Luiselli L (1993b) High philopatry can produce strong sexual competition in male adders, *Vipera berus*. *Amphibia-Reptilia* **14**, 310-311.
- Madsen T (1988) Reproductive success, mortality and sexual size dimorphism in the adder, *Vipera berus*. *Holarctic Ecology* **11**, 77-80.
- Madsen T, Shine R (1992a) A rapid, sexually selected shift in mean body size in a population of snakes. *Evolution* **46**, 1220-1224.
- Madsen T, Shine R (1992b) Sexual competition among brothers may influence offspring sex ratio in snake. *Evolution* **46**, 1549-1552.
- Madsen T, Shine R (1993) Temporal variability in sexual selection acting on reproductive tactics and body size in male snakes. *American Naturalist* **141**, 167-171.

- Madsen T, Shine R (1996) Determinants of reproductive output in female water pythons (*Liasis fuscus*: Pythonidae). *Herpetologica* **52**, 146-159.
- Madsen T, Shine R, Loman J, Hakansson T (1992) Why do female adders copulate so frequently. *Nature* **355**, 440-441.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999) Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**, 34-35.
- Madsen T, Stille B, Shine R (1996) Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**, 113-118.
- Madsen T, Ujvari B, Olsson M (2004) Novel genes continue to enhance population growth in adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation* **120**, 145-147.
- Mallow D, Ludwig D, Nilson G (2003) *True Vipers: natural history and toxinology of Old World vipers* Krieger Publishing Company, Malabar, Florida. p.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution* Harvard University Press, Cambridge, MA. p.
- Mertens R (1956) Über Reptilienbastarde, II. *Senck. biol.* **37**, 383-394.
- Mertens R (1964) Über Reptilienbastarde, III. *Senck. biol.* **45**, 33-49.
- Métral F (2001) *Répartition potentielle de la Vipère péliade (Vipera berus): comparaison de sites potentiellement favorables avec et sans populations dans le Jura vaudois*, Université de Lausanne.
- Milto KD, Zinenko OL (2003) Distribution and morphological peculiarities of adders of the *Vipera berus* complex in Eastern Europe. In: *12th Ordinary General Meeting. Programme and abstracts, 12-16 August 2003* (ed. Herpetologica SE). Societas Europaea Herpetologica, St-Petersburg, Russia.
- Monney J-C (1996) *Biologie comparée de Vipera aspis L. et de Vipera berus L. (Reptilia, Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes bernoises* unpublished thesis, University of Neuchâtel, Switzerland. 179 pp p.
- Monney JC (1994) Comparaison des cycles annuels d'activité de *Vipera aspis* et *Vipera berus* (Ophidia, Viperidae) dans une station des Préalpes bernoises (ouest de la Suisse). *Bulletin de la Société Herpétologique de France* **71-72**, 49-61.
- Moritz C (1995) Uses of Molecular Phylogenies for Conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **349**, 113-118.
- Moser A (1988) *Untersuchung einer Population der Kreuzotter (Vipera berus L.) mit Hilfe der Radiotelemetrie*, Universität Basel.
- Neff BD, Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* **55**, 1717-1733.
- Neumeyer R (1987) Density and seasonal movements of the adder (*Vipera berus* L.) on a subalpine environment. *Amphibia-Reptilia* **2**.
- Nilson G, Andren C (1982) Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. *Hormones and Behavior* **16**, 404-413.
- Nilson G, Andren C (1988) A new subspecies of the subalpine Meadow Viper, *Vipera ursinii* (Bonaparte) (Reptilia, Viperidae), from Greece. *Zoologica Scripta* **17**, 311-314.
- Nilson G, Andrén C (2001) The meadow and steppe vipers of Europe and Asia - the *Vipera (Acridophaga) ursinii* complex. *Acta Zoologica, Academiae Scientiarum Hungaricae* **47**, 87-267.
- Nilson G, Andrén C, Joger U (1993) A re-evaluation of the taxonomic status of the Moldavian steppe viper based on immunological investigations, with a discussion

- of the hypothesis of secondary intergradation between *Vipera ursinii rakosiensis* and *Vipera (ursinii) renardi*. *Amphibia-Reptilia* **14**, 45-57.
- Nilson G, Andrén C, Szyndlar Z (1994) The systematic position of the Common Adder, *Vipera berus* (L.) (Reptilia, Viperidae), in North Korea and adjacent regions. *Bonner Zoologische Beitrage* **45**, 49-56.
- Nilson G, Tuniyev B, Andrén C, Orlov N, Joger U, Herrmann H-W (1999) Taxonomic position of the *Vipera xanthina* complex. In: *Kaupia, Phylogeny and Systematics of the Viperidae* (ed. Joger U), pp. 99-102. Hessisches Landesmuseum Darmstadt / Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Nilson G, Tuniyev B, Orlov N, Höggren M, Andrén C (1995) Systematics of the Vipers of the Caucasus: polymorphism or sibling species? *Asiatic Herpetological Research* **6**, 1-26.
- Perret C, Fallot P, Monney J-C, Claude F (2002) Inventaire des sites à reptiles de l'arc jurassien de Suisse occidentale. Mandat de l'Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage.
- Pinston H, Craney E, Pépin D, Montadert M, Duquet M (2000) *Amphibiens et Reptiles de Franche-Comté. Atlas commenté de répartition* Groupe naturaliste de Franche-Comté ( d.), Besançon. 116 pp p.
- Prestt I (1971) An ecological study of the viper *Vipera berus* in southern Britain. *Journal of Zoology* **164**, 373-418.
- Prosser MR, Gibbs HL, Weatherhead PJ (1999) Microgeographic population genetic structure in the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon* detected using microsatellite DNA loci. *Molecular Ecology* **8**, 329-333.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* **17**, 230-237.
- Saint Girons H (1975) Coexistence de *Vipera aspis* et *Vipera berus* en Loire-Atlantique: un problème de compétition interspécifique. *Terre et Vie* **29**, 590-613.
- Saint Girons H (1977) Systématique de *Vipera latastei latastei* Bosca, 1978 et description de *Vipera latastei gaditana*, subsp. n. (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **84**, 599-607.
- Saint Girons H (1978) Morphologie externe comparée et systématique des Vipères d'Europe (Reptilia, Viperidae). *Revue Suisse de Zoologie* **85**, 565-595.
- Saint Girons H (1980a) Biogéographie et évolution des vipères européennes. *Compte rendu des Séances de la Société de Biogéographie* **496**, 146-172.
- Saint Girons H (1980b) Le cycle des mues chez les vipères européennes. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **105**, 551-559.
- Saint Girons H (1981) Quelques observations sur la dispersion des nouveau-nés chez *Vipera berus* et *Vipera aspis* dans le bocage atlantique (Reptilia: Viperidae). *Amphibia-Reptilia* **2**, 269-272.
- Saint Girons H, Kramer E (1963) Le cycle sexuel chez *Vipera berus* (L.) en montagne. *Revue Suisse de Zoologie* **70**, 191-221.
- Schlötterer C, Pemberton J (1998) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review. In: *Molecular approaches to ecology and evolution* (eds. DeSalle R, Schierwater B). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Sochurek E (1974) *Vipera ammodytes gregorwallneri* n. ssp. *Herpet. Bl tt.* **1**, 1-4.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 608-613.

- Stille B, Madsen T, Niklasson M (1986) Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. *Oikos* **47**, 173-175.
- Szyndlar Z, Rage J-C (1999) Oldest fossil vipers (Serpentes: Viperidae) from the Old World. In: *Kaupia, Phylogeny and Systematics of the Viperidae* (ed. Joger U), pp. 9-20. Hessisches Landesmuseum Darmstadt / Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Tzedakis PC, Lawson IT, Frogley MR, Hewitt GM, Preece RC (2002) Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science* **297**, 2044-24047.
- Ursenbacher S (1998) *Estimation de l'effectif et analyse du risque d'extinction d'une population de Vipère péliade (Vipera berus L.) dans le Jura vaudois* Travail de diplôme, non publié, Université de Lausanne.
- Vedmederya VJ, Grubant VN, Rudayeva VA (1986) On the question of the name of the black viper in the forest steppes of the European part of the USSR. *Vestnik Karkov Univ.* **288**, 83-85.
- Vicario S, Caccone A, Gauthier J (2003) Xantusiid "night" lizards: a puzzling phylogenetic problem revisited using likelihood-based Bayesian methods on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 243-261.
- Viitanen P (1967) Hibernation and seasonal movements of the viper, *Vipera berus berus* (L.), in southern Finland. *Annales Zoologici Fennici* **4**, 472-546.
- Villarreal X, Bricker J, Reinert HK, Gelbert L, Bushar LM (1996) Isolation and characterization of microsatellite loci for use in population genetic analysis in the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. *Journal of Heredity* **87**, 152-155.
- Völkl W, Thiesmeier B (2002) *Die Kreuzotter - ein Leben in festen Bahnen?* Laurenti Verlag. 159 p.
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738.
- Wiens JJ, Chippindale PT, Hillis DM (2003) When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders. *Systematic Biology* **52**, 501-514.
- Zarevsky SF (1917) Formes nouvelles du genre *Vipera*, trouvées dans l'empire russe: *Vipera tigrina* n. sp and *Vipera berus* var. *sachalinensis* var nova? *Annuaire Mus. zool. Acad. Petrograd* **21**.
- Zuffi MAL (1999) Activity patterns in a viviparous snake, *Vipera aspis* (L.), from Mediterranean central Italy. *Amphibia-Reptilia* **20**, 313-318.
- Zuffi MAL (2002) A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia* **23**, 191-213.
- Zuffi MAL (2003) On the subspecies of *Vipera aspis*: A reply to Filippi. *Amphibia-Reptilia* **24**, 238-241.
- Zuffi MAL, Bonnet X (1999) Italian subspecies of the asp viper, *Vipera aspis*: patterns of variability and distribution. *Italian Journal of Zoology* **66**, 87-95.

Chapitre 9: Annexes

Annexe 1 échantillons de *Vipera ammodytes* utilisés dans cette étude

espèce	localisation	pays	code	
<i>V. a. ammodytes</i>	Friaul, Musi	Italie	It2	
	Velenje	Slovenie	Sl1	
	Maribor	Slovenie	Sl2	
	Huda luknja – Ctajerska	Slovenie	Sl3	
	Ljubljana, Javor	Slovenie	Sl4	
	Sneznik	Slovenie	Sl5	
	Rovinj	Croatie	Cr1	
	Krk Island	Croatie	Cr2	
	Bokanjac - Zadar	Croatie	Cr3	
	Zadar	Croatie	Cr4	
	Mosor Mt.	Croatie	Cr5	
	Omis	Croatie	Cr6	
	near Dubrovnik	Croatie	Cr7	
	Vaganac River Canyon	Bosnie	Bo1	
	Stubice hill – Valjevo	Serbie	Se1	
	Uvac River Canyon – Zlatar Mt.	Serbie	Se2	
	Lisina spring – Beljanica Mt.	Serbie	Se3	
	village Brzece – Kopaonik Mt.	Serbie	Se4	
	Cumanska River – Medveca	Serbie	Se5	
	village Brod – Crna Trava	Serbie	Se6	
	village Tepca – Tara River Canyon	Montenegro	Mo1	
	Mrtvica River Canyon	Montenegro	Mo2	
	Cetinje	Montenegro	Mo3	
	Budva	Montenegro	Mo4	
	Skadarsko lake	Montenegro	Mo5	
	village Kaluger - Belogradcisko	Bulgarie	Bu1	
	<i>V. a. gregorwalneri</i>	Friesach	Autriche	Au1
Carinthia, Friesach		Autriche	Au2	
Carinthia, Frantschach		Autriche	Au3	
<i>V. a. ruffoi</i>	Bozen	Italie	It1	
<i>V. a. meridionalis</i>	Crnovska River – Trgovicte	Serbie	Sr7	
	Nov Dojran	Macédoine	Ma1	
	Vlore	Albanie	Al1	
	Corfou	Grèce	Gr1	
	Igoumenitsa	Grèce	Gr2	
	near Ioannina	Grèce	Gr3	
	Prespa lake	Grèce	Gr4	
	Olymp	Grèce	Gr5	
	Chalkidiki	Grèce	Gr6	
	Olymp, Damasi	Grèce	Gr7	
	Mont Ossa	Grèce	Gr8	
	Lamia	Grèce	Gr9	
	Nafpaktos	Grèce	Gr10	
	North Evvia	Grèce	Gr11	
	Basin of Feneos	Grèce	Gr12	
	Kiparissia	Grèce	Gr13	
	Lakonia, Kardamili	Grèce	Gr14	
	Siros	Grèce	Gr15	
	Tinos	Grèce	Gr16	
	Naxos	Grèce	Gr17	
	Ios	Grèce	Gr18	
	Sapanca	Turquie	Tr1	
	Vil. Sivas nordh Zara	Turquie	Tr2	
	<i>V. a. montandoni</i>	village Sadovec - Plevensko	Bulgarie	Bu2
		village Nadezden - Harmanlijsko	Bulgarie	Bu3
North costal area		Bulgarie	Bu4	
Carevo		Bulgarie	Bu5	
Ahtopol		Bulgarie	Bu6	
<i>V. a. transcaucasiana</i>	Aralik	Turquie	Tr3	
	Kura valley	Arménie	Ar1	
<i>V.berus</i>	Massif jurassien	Suisse	outgroup	

Annexe 2 Spécimens de *Vipera aspis* utilisé dans cette étude, avec la désignation de l'haplotype de la région de contrôle (CR) de l'ADN mitochondrial.

Taxon	Localité	Collection	haplotype
<i>V. aspis aspis</i>	Val Bregaglia (Suisse)	IE-LBC	H1
	Val Bregaglia (Suisse)	IE-LBC	H1
	Jura vaudois (Suisse)	IE-LBC	H1
	Genève (Suisse)	IE-LBC	H1
	Balm (Suisse)	S. Dummermuth	H1
	Mont-Saint-Quentin, Loraine (France)	IE-LBC	H1
	Saint Sauveur en Rue, Massif Central (France)	IE-LBC	H1
	Massif du Pilat (France)	IE-LBC	H1
	Prapic, Haute Savoie (France)	IE-LBC	H1
	Vendée (France)	O. Lourdais	H1
	Mont de l'Hortus, Hérault (France)	IE-LBC	H1
	Cabrials, Hérault (France)	M. Cheylan, BEV. 7794	H1
	La Chouette, (France)	E. Lasne	H1
	Cournonterral (France)	M. Cheylan	H1
	Mont Ventoux (France)	IE-LBC, J. Garzoni	H1
	Hospitalet du Larzac (France)	M. Cheylan; BEV-845	H2
	Breil sur Roya, Alpes Maritimes (France)	IE-LBC	H3
	Vendée (France)	O. Lourdais	H4
	Orcières, Hautes Alpes (France)	IE-LBC	H5
	<i>V. a. atra</i>	Kandersteg (Switzerland)	IE-LBC
Grimentz (Suisse)		IE-LBC	H1
Ritorto, Val Bavona (Suisse)		IE-LBC	H1
Val Bedretto (Suisse)		J. Garzoni	H1
Chapelle d'Abondance, Haute Savoie (France)		IE-LBC	H1
Cornet de Rosland, Savoie (France)		IE-LBC	H1
Gressoney, Val d'Aosta (Italie)		MZUF 30520	H1
Piedicavallo, Biella (Italie)		IE-LBC	H6
<i>V.a. zinnikeri</i>	Pancarbo, Burgos (Espagne)	IE-LBC	H7
	Camales, La Rioja (Espagne)	IE-LBC	H7
	Soria (Espagne)	A. Meyer	H7
	Soria (Espagne)	A. Meyer	H8
	Emiron du Larzac, Gard (France)	IE-LBC	H9
	Caune de Blandas, Gard (France)	IE-LBC	H10
	Alt Aneu, Catalunya (Espagne)	MZB98-1468	H11
	Lescu, Pyrenees (France)	IE-LBC	H12
	Val de Ter, Catalunya (Espagne)	IE-LBC	H13
	Pyénées Atlantiques (France)	R. Rossoux, RE	H14
	<i>V.a. francisiredi</i>	Macerata, Marche (Italie)	MZUF 38298
Trento, Trentino Alto-Adige (Italie)		MZUF 31765	H16
Gran Sasso (Italie)		IE-LBC	H16
Populonia, Toscana (Italie)		IE-LBC	H17
Monte Vemtasso (Italie)		S. Mazzotti, MCSNF	H17
Lago Brasion (Italie)		S. Mazzotti, MCSNF	H17
Arzo (Suisse)		IE-LBC	H17
Arzo (Suisse)		IE-LBC	H17
Cantello, Varese (Suisse)		M. Cocquio	H17
Val Poschiavo (Suisse)		IE-LBC	H17
Livergnano, Pianoro (Italie)		RE0282	H18
Alpi Apuane (Italie)		IE-LBC	H19
<i>V. a. hugyi</i>		Sila Grande (Italie)	M.A. L. Zuffi
	Monte Pollino, Calabria (Italie)	J.-M. Pillet	H21
	Monte Pollino, Calabria (Italie)	IE-LBC, Garzoni	H21
	Trebisacce, Calabria (Italie)	J.-M. Pillet	H21
<i>V. ammodytes</i>	Selo Brod – Crna Trava (Serbie)	L. Tomovic, S. Tome & J. Crnobrnja-Isailovic	
<i>V. latastei</i>	Ribeira de Monção, Terras Bouro (Portugal)	BTVS 02-0718	
<i>V. berus</i>	Vallée de Joux (Suisse)	IE-LBC	

Note: acronymes des instituts et des Musées: IE-LBC = Institut d'Ecologie – Laboratoire de Biologie de la Conservation, Lausanne (Suisse) ; MCSNF = Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara (Italie); BTVS = Banco de Tecidos de Vertebrados Selvagens – Instituto da Conservação da Natureza, Gerês (Portugal); MZUF = Museo Zoologico Università di Firenze (Italie); RE =Muséum d'Histoire Naturelle de La Rochelle (France); MZB = Museu de Zoologia de Barcelona (Espagne); BEV = EPHE Biologie & Ecologie des Vertébrés, Montpellier (France).

Annexe 3: échantillons de *Vipera berus* utilisés dans cette étude. Le code de la population (correspondant à ceux utilisés dans la Figure 1 et la Figure 2), le collecteur ou la collection et l'haplotypes de la région de contrôle (CR) et du cytochrome b (cyt. b) sont indiqués. (n = nombre d'animaux dont la région de contrôle a été séquencée).

Taxon	Code de la population	n	Localisation	Collecteur / collection	CR	cyt. b
<i>V. b. berus</i>	Sv1	1	Krma, Slovénie	ML 3501	H30	J36
	Sv2	1	Jelendol, Slovénie	ML 5460	H32	J38
	Au1	1	Vorarlberg, Autriche	D. Huber	H2	J3
	Au2	1	Zederhaus, Autriche	IE-LBC collection	H33	J39
	Au3	1	Puchberg a. Schneeberg, Autriche	IE-LBC collection	H34	J40
	It1	1	Pontebba, Italie	MCSNLU V 1228	H28	J33
	It2	1	Val Cimoliana, Italie	MCSNF RE0209	H31	J37
	It3	1	Ugorizza, Italie	Y. Surget	H30	J35
	Ch1	6	Vallée de Joux Switzerland	IE-LBC collection	H1	J1
	Ch2	5	Préalpes fribourgeoises, Switzerland	IE-LBC collection	H3	J4
	Ch3	4	Uri, Switzerland	IE-LBC collection	H4	J5
	Ch4	1	Sils, Switzerland	IE-LBC collection	H28	
	Ch5	5	Pontresina, Suisse	IE-LBC collection	H28, H29	J32, J34
	Fr1	1	Massif Central, France	G. Thierry	H1	J2
	Fr2	1	Massif Central, France	G. Thierry	H1	
	Fr3	1	Paimpont, France	B. Heulin	H5	J6
	Fr4	1	Ardennes, France	G. Thierry	H5	
	Ne	1	Putten, Pays-Bas	ZMA 12133, Amsterdam	H8	J9
	Br1	1	Bangor, Pays-de-Galles	R. Thorpe	H6	J7
	Br2	1	Pays-de-Galles	R. Jones	H7	J8
	Ge	1	Fulda, Allemagne	U. Joger	H9	J13
	Cz1	1	Hranicna, Rép. Tchèque	D. Modry	H10	J14
	Cz2	1	Hradec Kralove, Rép. Tchèque	ML 3675	H8	J10
	Sk1	1	Skalité, Slovaquie	D. Modry	H15	J18
	Sk2	1	Vihorlat Montain, Slovaquie	Y. Surget	H24	J28
	Po	1	Ustrzyki Dolne, Pologne	R. Maslak	H23	J27
	Ro1	2	Apuseni Montain, Roumanie	I. Ghira	H25	
	Ro2	1	Oradea, Roumanie	I. Ghira	H25	J29
	Ro3	1	Chirui, Roumanie	L. Krecsak	H26	J30
	Ro4	1	Cîrta, Roumanie	L. Krecsak	H27	J31
	De	1	Fyns Hoved, Danemark	EBC collection	H11	J15
	No1	1	Kvannes, Norvège	EBC collection	H8	
	No2	1	Ertvågøya, Norvège	Hans Olsvik	H12	J16
	Sw1	1	Grebbestad, Suède	EBC collection	H8	J11
	Sw2	1	Mora, Suède	EBC collection	H13	J17
	Sw3	1	Långalma, Suède	EBC collection	H8	J12
	Sw4	1	Ligga, Suède	EBC collection	H8	
	Sw5	1	Staffans, Suède	EBC collection	H14	
	Fi1	1	Karhujärvi, Finlande	EBC collection	H16	J20
	Fi2	1	Hämeenlinna, Finlande	EBC collection	H16	J21
	Fi3	1	Polvijärvi, Finlande	S. Paasanen	H17	J22
	Fi4	1	Övermark, Finlande	EBC collection	H16	
	Fi5	1	Oulunsalo, Finlande	EBC collection	H18	
	Es	1	Hiumaa, Estonie	P. Ermits	H16	J19
	Ru1	2	Shulgino, St Petersburg Prov, Russie	ZISP 20862#21	H16, H19	J23
	Ru2	2	Dedilovskie Vysetki, Tula Prov., Russie	ZISP 21098#87/06177	H16, H20	J24
Ru3	2	Altai, Russie	N. Ananjeva	H17, H21	J25	
Ru4	1	Krasnoyarsky Kroy, Russie	ZISP18310, St Petersburg	H22	J26	
<i>V. b. bosniensis</i>	Bo1	1	Bihac, Bosnie	ML 3622	H36	J42
	Bo2	1	Slavonski Brod, Bosnie	ML 3621	H37	J43
	Bo3	1	Treskavica, Bosnie	ML 3882	H35	J41
	Mo	1	Bjelasica mountain, Montenegro	L. Tomovic & J. Crnobrnja-Isailovic	H38	J44
	Se1	1	Kopaonik mountain, Serbie	L. Tomovic & J. Crnobrnja-Isailovic	H39	J45
	Se2	1	Stara Planina mt., Serbie	L. Tomovic & J. Crnobrnja-Isailovic	H40	J46
	Bu1	1	Vitoshe Mountain, Bulgarie	A. Westerström	H41	
	Bu2	1	Pirin Mountain, Bulgarie	A. Westerström	H43	J48
	Bu3	1	Stara Planina, Bulgarie	A. Westerström	H43	
	Bu4	1	Musala Mountain, Bulgarie	A. Westerström	H42	J47
<i>V. b. sachalinensis</i>	Ru5	1	Khabarovsky Kroy, Russie	ZISP 18635, St Petersburg	H44	J49
	Ru6	1	Yuzhno-Sakhalinsk, Russie	ZISP 20282, St Petersburg	H45	J50
<i>V. seoanei</i>		1	Espagne	T. Durand		

Note: acronymes des Muséums et des Instituts: ML, Prirodosloveni Muzej Slovenije, Ljubljana (Slovénie); IE-LBC, Institut d'Ecologie – Laboratoire de Biologie de la Conservation, Lausanne (Suisse); MCSNLU, Museo Cantonale di Storia Naturale, Lugano (Suisse); MCSNF, Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara (Italie); ZMA, Zoological Museum of Amsterdam (Pays-Bas); EBC, Department of Conservation Biology and Genetics, Evolutionary Biology Centre, Uppsala (Suède); ZISP, Zoological Institute of St Petersburg (Russie).

Annexe 4: résultats de l'analyse des 13 loci microsatellites étudiés pour les 16 populations en Suisse et en France, avec le numéro de l'animal, son sexe et site où il a été capturé (code de la population, voir Chap. 6).

No	sexe	Pop.	A8	A11	B1	B'2	B'9	B10	B'10	B18	D6	D'10	D12	D'13	D17													
1	mâle	Ch1	202	202	146	148	181	183	219	219	299	299	220	220	263	286	132	140	263	278	288	294	100	103	316	316	189	195
2	mâle	Ch1	202	202	148	150	183	183	209	219	299	337	220	220	266	282	136	140	263	272	294	297	103	103	328	328	189	198
5	femelle	Ch1	202	202	146	148	183	183	219	219	299	337	220	234	263	286	132	134	269	278	294	297	100	100	310	310	165	201
7	femelle	Ch1	202	204	150	150	181	181	209	219	337	337	220	248	263	282	134	138	278	315	294	306	103	103	316	316	189	192
14	femelle	Ch1	202	206	146	148	181	181	219	219	299	299	220	220	263	286	132	132	263	275	297	312	100	100	334	334	189	189
15	mâle	Ch1	202	202	148	148	181	183	209	219	299	299	220	220	263	286	132	132	269	269	288	294	103	103	298	310	162	198
16	femelle	Ch1	202	202	148	150	181	183	219	221	299	299	220	220	263	266	132	132	278	278	294	297	100	100	328	328	165	189
17	femelle	Ch1	202	202	146	150			219	219	299	299	220	220	263	286	134	138	263	278	294	297	100	103	328	328	192	192
25	femelle	Ch1	202	204	146	148	183	183	219	219	337	337	218	218	263	263	132	132	278	281	294	303	100	103	310	310	189	201
30	femelle	Ch1	202	202	148	150	183	183	219	219	299	299	220	220	263	266	132	136	269	269	294	294	103	103	328	328	192	198
32	femelle	Ch1	202	202	146	148	183	183	219	219	299	299	220	220	263	266	132	140	263	263	288	294	100	103	316	316	192	198
47	femelle	Ch1	202	202	146	150	183	183	219	219	299	299	220	246	263	286	140	140	269	278	288	297	100	103	310	310	192	198
48	femelle	Ch1	202	204	148	148	181	181	219	219	299	337	220	220	266	286	136	136	263	287	294	294	103	103	310	310	165	192
56	femelle	Ch1	202	202	148	150	183	183	219	219	299	299	220	220	263	263	140	140	272	278	294	312	100	103	334	334	192	192
57	mâle	Ch1	202	202	148	148	183	183	217	219	337	337	220	246	263	266	132	132	263	278	294	297	100	103	307	310	192	198
58	femelle	Ch1	202	204	146	148	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	132	132	278	278	288	294	100	100	310	310	189	189
59	femelle	Ch1	202	202	146	146	181	181	219	219	299	299	220	220	266	282	132	140	263	263	294	297	103	103	334	334	189	198
62	mâle	Ch1	202	202	146	148	181	181	219	219	299	299	220	220	263	286	132	140	263	278	288	297	100	103	310	328	192	191
64	juv. mâle	Ch1	204	204	144	148	181	183	219	219	299	337	220	220	263	286	132	132	278	278	297	312	103	103	307	310	189	201
66	femelle	Ch1	204	204	146	150	181	181	219	219	299	299	220	248	263	282	132	140	269	315	312	312	103	103	316	316	189	192
68	mâle	Ch1	202	204	150	150	183	183	219	219	299	339	220	220	266	286	132	140	263	263	294	312	100	103	316	334	165	192
69	femelle	Ch1	202	204	144	148	183	183	217	219	337	337	220	246	263	268	126	132	278	278	294	297	100	103	307	307	165	189
74	mâle	Ch1	202	204	148	148	181	181	209	219	299	299	220	220	263	263	122	140	278	278	288	294	100	103	310	328	162	198
78	mâle	Ch1	202	204	150	150	181	181	209	219	339	339	220	248	263	282	132	140	278	315	294	306	103	103	316	334	189	192
81	mâle	Ch1	202	204	146	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	266	132	140	269	272	294	294	103	103	316	331	192	192
85	femelle	Ch1	202	204	150	150	183	183	219	219	299	337	220	220	263	263	122	140	269	278	294	297	100	100	328	328	192	198
88	juv. femelle	Ch1	202	202	146	148	183	183	219	219	299	337	220	234	263	286	134	134	269	278	297	312	100	103	310	310	189	201
89	juv. femelle	Ch1	202	206	148	148	183	183			299	299	220	234	263	263	132	136	269	278	297	297	100	100	307	307	165	201
90	mâle	Ch1	202	202	150	150	183	183	219	219	299	337	220	220	266	286	132	140	263	263	288	315	100	103	310	334	165	192
91	juv. femelle	Ch1	202	206	148	146	181	181	219	219	337	337	220	220	266	278	132	136	272	278	294	297	103	103	328	328	162	189
94	mâle	Ch1	202	204	146	148	181	181	219	219	299	299	220	220	263	286	132	132	269	269	309	315	100	100	289	331	192	192
96	juv. mâle	Ch1	202	202	146	148	181	181	219	219	299	337	220	238	263	286	132	132	269	269	297	297	100	103	310	310	165	201
97	mâle	Ch1	202	204	146	148	183	183	219	219	299	337	220	246	263	263	132	132	278	278	294	297	100	103	307	310	165	165
98	mâle	Ch1	202	204	148	150	181	181	219	219	299	299	220	220	263	286	122	132	272	272	294	315	100	103	307	316	165	192
99	femelle	Ch1	202	204	150	150	181	181	219	219	299	299	220	220	263	282	122	140	269	278	303	306	103	103	289	289	189	192
401	mâle	Ch1	202	202	148	148	183	183	219	219			220	220			132	136					100	100			189	192
402	juv. mâle	Ch1	202	202	148	148	181	181	209	219	299	337	220	220	263	266	136	136	263	275	297	312	103	103	328	334	189	192
406	mâle	Ch1	202	204	150	150	181	183	219	219	299	337	218	234	263	282	126	140	278	278	294	294	100	100	334	334	177	189
412	juv. mâle	Ch1	202	202	146	148	181	183	215	219	299	337	220	236	263	286	132	132	269	269	297	297	100	103	310	310	165	201
413	mâle	Ch1	204	204	144	150	181	181	219	219	299	337	220	220	286	286	132	132	263	263	294	312	100	103	307	310	165	189
414	juv. mâle	Ch1	202	202	146	150	181	183	209	219	299	337	220	220	263	266	132	132	263	278	294	297	100	103	289	331	192	192
415	mâle	Ch1	202	204	150	150	181	181	219	219	299	337	220	220	266	286	132	132	272	278	288	294	100	103	316	316	189	192
416	femelle	Ch1	202	202	148	150	181	181	215	219	299	337	220	220	263	266	132	140	278	278	294	294	103	103	316	316	192	192
417	femelle	Ch1	202	204	148	150	181	181	219	219	299	337	220	248	263	263	126	132	278	281	294	312	100	103	331	331	189	189
422	femelle	Ch1	202	206	148	150	181	181	215	219	299	299	220	220	263	263	140	140	269	278	288	297	100	103	310	310	192	192
424	femelle	Ch1	202	202	148	150	183	183	217	219	299	337	220	220	263	263	126	140	269	287	288	294	100	100	316	316	162	192
425	mâle	Ch1	202	204	148	148	183	183	219	219	299	299	220	220	263	266	126	132	278	278	288	294	100	103	328	331	189	192
426	mâle	Ch1	202	202	148	148	181	181	209	221	299	337	220	220	263	266	134	136	278	263	288	315	100	100	316	316	165	201
430	mâle	Ch1	202	204	148	148	181	183	219	219	299	299	220	246	263	286	132	138	263	278	288	294	100	103	316	331	192	195
431	mâle	Ch1	202	202	148	148	181	183	219	219	299	299	220	220	263	286	132	140	263	278	288	312	100	103	316	334	189	192
432	femelle	Ch1	202	202	146	150			219	219	299	299	220	220	263	286	140	140	278	278	297	297	100	103	310	310	192	192
433	juv. femelle	Ch1	202	204	148	148	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	126	140	278	287	288	288	100					

219	femelle	Pm	202	202	146	146	183	183	219	223	347	347	220	248	286	286	122	122	269	272	288	291	91	91	292	292	180	180	
220	juv. femelle	Pm	202	204	146	146	183	183	215	219	347	347	220	246	286	286	122	132	272	272	288	294	100	100	292	292	177	180	
221	femelle	Pm	202	202	146	146	183	183	219	219	299	347	220	220	286	286	122	132	272	272	291	291	100	100	298	298	177	180	
222	mâle	Pm	202	202	146	146	183	185	219	223	299	347	220	220	286	286	122	122	266	272	288	294	91	91	292	292	180	180	
223	mâle	Pm	204	204	146	146	183	183	219	219	347	347	248	248	286	286	122	122	266	275	288	291	91	91	292	292	180	180	
224	mâle	Pm	204	204	146	146	183	183	215	219	347	347	220	246	286	286	122	122	263	269	288	291	91	91	292	292	177	180	
225	mâle	Pm	202	204	146	146	183	185	215	219	347	347	220	246	286	286	122	132	272	272	291	291	100	100	298	298	171	180	
229	mâle	Pm	202	204	146	146	183	183	215	219	347	347	220	220	286	286	132	132	266	266	288	288	91	91	292	292	177	210	
231	femelle	Pm	202	202	146	146	183	183	215	219	299	347	220	220	286	286	122	132	266	272	288	294	91	100	298	298	177	177	
232	mâle	Pm	202	204	146	146	183	183	219	221	347	347	220	246	286	286	122	122	269	272	288	291	100	100	292	292	177	180	
233	femelle	Pm	202	204	146	146	183	183	219	223	347	347	220	220	286	286	122	132	272	272	291	294	103	103	292	292	177	180	
234	femelle	Pm	202	204	146	146	183	183	215	219	347	347	220	246	286	286	132	132	263	263	294	294	100	103	298	298	198	198	
235	juv. femelle	Pm	202	204	146	146				209	209	347	347	220	246	286	286	122	122	272	275			103	103	292	292	180	180
236	juv. femelle	Pm	202	202	146	146	183	183	234	236	347	347	220	246	286	286	122	132	272	272	288	288	91	91	292	292	180	180	
301	mâle	Am	202	202	146	146	183	183	219	238	299	299	246	246	286	286	136	136	275	275	312	324	100	100	307	310	162	204	
302	femelle	Am	202	202	146	146	183	183	256	256	299	299	246	246	286	286	126	126	278	278			100	100	310	310	162	204	
303	juv. mâle	Am	202	202	146	150	183	183	238	238	299	299	246	246	268	286	132	132	269	272			100	100	313	313	216	216	
304	nv-né mâle	Am	202	202	146	146	181	181	223	238	299	299	246	246	286	286	132	132	269	275	294	324	100	100	310	310	189	216	
305	femelle	Am	202	202	146	146	181	181	219	238	299	299	246	246	286	286	132	134	266	266	288	288	100	100	298	298	204	216	
307	juv. femelle	Am	202	202	146	150	181	181	223	223	299	299	246	246	266	286	126	132	269	275	294	294	100	100	310	310	189	204	
309	femelle	Am	202	202	146	146	181	181	219	238	299	299	246	246	286	286	126	132	272	272	324	324	100	100	307	307	162	201	
311	femelle	Am	202	202	146	150	183	183	238	238	299	299	246	246	286	286	132	134	269	269	294	324	100	100	313	313	204	216	
312	femelle	Am	202	202	146	146	183	183			299	299	246	246	286	286	132	132	269	275	288	294	100	100	298	298	201	216	
313	femelle	Am	202	202	146	146	181	181	236	238	299	299	246	246	286	286	132	132	269	269			100	103	298	298	204	207	
314	femelle	Am	202	202	146	146	183	183	238	252	299	299	246	246	266	286	132	134	266	272	288	324	100	100	298	298	162	216	
315	juv. femelle	Am	202	202	146	146	183	183	223	223	299	299	246	246	286	286	134	134	296	301			100	100	310	310	204	222	
316	juv. femelle	Am	202	202	146	150	181	181	219	238	299	299	246	246	286	286	132	132	275	275	324	324	100	100	310	310	204	210	
317	mâle	Am	202	202	146	146	181	181	238	238	299	299	220	246	286	286	132	134	275	275			100	100	307	307	207	216	
318	femelle	Am	202	202	146	150	181	181	219	238	299	299	246	246	286	286	132	134	266	269	300	300	100	100	310	310	216	222	
319	femelle	Am	202	206	146	146	185	185	219	238	299	299	246	246	286	286	132	134	272	272	327	327	100	100	307	307	168	168	
320	femelle	Am	202	202	146	146	181	181	219	238	299	299	246	246	286	286	132	132	266	266	324	324	100	103	298	298	204	216	
321	femelle	Am	202	202	146	146	183	183	219	223	299	299	246	246	286	286	132	132	266	266	294	297	100	100	313	313	216	216	
322	femelle	Am	202	206	146	146	183	183	219	252	299	299	246	246	286	286	126	132			288	300	100	100	310	310	204	216	
323	femelle	Am	202	202	146	150	181	181	223	238	299	299	246	246	266	286	132	132	269	269	288	324	100	100	307	307	204	222	
324	mâle	Am	202	202	146	150	181	183	219	238	299	299	220	246	282	286	132	132	269	269	288	312	100	100	307	310	201	216	
325	femelle	Am	202	202	146	146	181	181	219	223	299	299	246	246	266	286	126	136	275	275	294	312	100	100	313	313	162	204	
326	femelle	Am	202	202	146	150	181	181	238	238	299	299	246	246	266	286	132	132			324	324	100	103	310	310	204	216	
327	femelle	Am	202	202	150	150	181	181	223	238	299	299	246	246	286	286	126	132	275	275	288	312	100	100	310	310	210	222	
601	femelle	Ro	202	204	148	150	181	181	252	252	299	337	220	220	282	282	122	132	272	272	291	291	100	100	350	350	183	192	
602	mâle	Ro	202	202	146	146	181	181	219	252	299	299	220	246	266	266	122	132	266	269	294	309	100	100	310	310	204	204	
603	mâle	Ro	202	204	146	148	181	181	219	252	299	337	220	246	266	266	132	126	266	266	291	309	100	100	319	319	192	192	
604	femelle	Ro	202	202	146	150	181	181	252	252	299	299	220	220	266	266	132	132	272	272	291	291	100	100	307	307	183	183	
605	mâle	Ro	202	202	146	148	181	181	219	219	299	299	246	246	266	286	122	132	266	266	309	309	100	103	319	319	189	204	
606	juv. femelle	Ro	202	202	146	150	181	181	219	252	299	337	220	246	266	266	122	132	266	272	291	309	100	100	319	319	192	204	
607	femelle	Ro	202	204	146	150	181	181	219	252	299	337	220	246	266	286	132	132	266	266	291	309	100	100	319	319	183	204	
608	femelle	Ro	202	202	148	150	181	181	252	252	299	337	220	220	266	266	132	132	266	266	291	291	103	103	310	310	183	192	
609	juv. femelle	Ro	202	202	146	148	181	181	219	252	299	299	220	246	266	266	132	132	266	266	291	309	100	103	319	319	183	204	
610	femelle	Ro	202	202	146	150	181	181	219	219	299	337	220	246	266	286	122	122	266	266	291	309	103	103	316	316	183	194	
611	mâle	Ro	202	202	148	150	181	181	219	252	299	337	220	246	266	286	122	122	266	272	291	309	100	103	319	319	189	202	
612	femelle	Ro	202	202	146	150	181	181	219	252	299	299	220	220	266	266	132	132	266	266	291	294	100	103	310	310	192	204	
613	femelle	Ro	202	204	146	148	181	181	252	252	299	337	220	220	266	266	132	132	266	266	291	291	103	103	307	307	183	183	
614	mâle	Ro	202	202	148	148	181	181	219	252	299	299	220	246	266	266	122	132	266	272	291	309	100	100	319	319	189	192	
651	femelle	Vc	202	202	146	148	181	181	219	221	299	337	220	220	263	288	122	122	272	303	285	297	100	103	340	340	201	201	

1916	femelle	Mal	193	204	146	146	181	181	221	221	343	343	212	212	263	286	148	148	275	281	300	324	100	100	316	316	180	183
1917	femelle	Mal	189	202	146	146	181	181	213	221	339	343	220	226	266	266	148	148	278	278	300	300	100	100	307	307	162	183
1918	femelle	Mal	202	202	146	148	181	181	213	213	299	339	212	222	263	263	132	152	260	263	300	306	100	100	316	316	168	180
1919	måle	Mal	202	202	146	146	181	181	217	217	299	343	212	212	286	286	126	146	263	263	300	324	100	100	262	328	186	186
1920	femelle	Mal	193	202	146	146	181	181	219	221	299	299	212	226	286	290	126	146	260	260	300	300	100	100	310	310	168	186
1941	måle	Mal	193	202	146	146			221	22	299	345	212	248	266	286	126	150	281	293	288	303	100	100	310	310	168	180
1942	femelle	Mal	193	202	146	148	181	181	213	219	299	349	212	212	263	263	122	132	260	278	285	285	100	100	295	295	180	183
1943	femelle	Mal	193	202	146	146	183	183	219	221	299	343	212	212	263	263	132	150	284	284	285	306	100	100	316	316	168	183
1944	måle	Mal	202	202	146	148	181	181	213	219	299	339	212	212	263	263	132	154	248	263	285	294	100	100	262	328	174	180
X	måle	Mal	193	200	148	148	181	181	262	262	339	339	222	248	286	286	132	146	263	306	285	309	100	100	295	295	162	180
X+1	måle	Mal	202	202	146	146			213	227	339	343	212	212	263	263	132	146	278	281	273	285	100	100	262	298	168	180
1910	måle	Ma2	202	202	146	148	181	183	221	221	299	347	224	224	286	290	146	162	287	287	300	300	100	100	325	325	171	174
1911	femelle	Ma2	196	202	146	148	181	181	221	225	299	347	212	224	266	290	146	146	293	293	297	306	100	100	307	307	180	183
1912	femelle	Ma2	202	202	146	146	185	185	221	221	339	343	212	212	266	286	128	146	284	306	273	315	100	100	331	331	162	186
1913	femelle	Ma2	193	202	146	150	183	183	219	223	349	349	248	248	266	286	132	146			294	306	100	100	319	319	162	183
1914	femelle	Ma2	202	202	146	150	183	183	221	223	297	297	220	220	266	266	128	146	263	275	273	294	100	100	304	304	171	183
2051	måle	Re	202	208	146	148	181	183	209	278	339	343	220	220	263	286	104	122	278	299	303	312	103	103	295	322	198	198
2052	femelle	Re	202	202	146	148	181	181	209	280	339	341			286	286	122	122	287	287	312	312	100	103			162	198
2053	måle	Re	194	202	148	148	181	183	272	272	299	323	191	191	288	288	122	158	260	293	303	306	103	103	307	307	204	204
2054	måle	Re	202	208	148	148	181	181	209	209	339	339	220	220	266	286	122	122	299	306	306	309	103	103	304	307	171	174
2055	måle	Re	202	202	148	148			209	209			222	222	286	288	122	122			312	312	103	103			192	201
2056	måle	Re	206	208	146	146			209	209	299	299	246	246	266	266	122	122			303	303	100	103			162	171
2057	femelle	Re	202	202	146	148									266	288	104	122					100	103			201	213
2058	måle	Re	198	208	148	148							212	212	266	286	122	132					100	100			162	201
2059	måle	Re	198	208	148	148									263	286	132	132			285	306	100	100			201	204
2060	femelle	Re	202	202	146	148							222	246	263	286	122	122	278	293	285	306	103	103			162	192
2062	femelle	Re	202	208	148	148			209	209			220	220	263	288	104	130	257	299	285	306	103	103			192	201
2063		Re	198	208	148	148	181	183	209	272	323	341	191	191	266	286	122	132	260	269	303	324	100	100	307	322	162	201
2064		Re	194	202	146	148	181	181	209	209	323	339	220	220	286	286	130	158	257	260	288	318	103	103	316	319	171	204
2065	måle	Re	194	198	148	148	183	183	209	217	299	299	191	191	266	286	122	162	269	287	315	318	103	103	307	307	162	174
2066	måle	Re	202	202	148	148	181	183	209	209	299	341	246	246	286	286	122	130	257	257	288	303	103	103	316	316	162	198
2067	måle	Re	202	208	146	146	181	181	209	272	343	343	220	220	286	286	122	122	260	293	309	309	100	103	316	316	162	204
2068	femelle	Re	198	208	146	148	183	183	209	209	299	299	220	220	263	286	122	132	296	296	288	318	103	103	331	331	177	201
2069	femelle	Re	202	202	146	146	183	183	209	209	339	341	220	220	286	286	136	158	257	296	303	318	103	103	304	304	177	198
2070		Re	202	202	146	148	181	181	272	278	299	345	191	191	286	286	122	122	260	287	306	312	103	103	304	304	192	204

Annexe 5: résultats de l'analyse des 13 loci microsattellites étudiés pour les nouveau-nés de *Vipera berus* utilisés dans le Chap. 7, avec le numéro de l'animal, son année de naissance et le numéro de mère.

No	naissance	mère	A8	A11	B1	B'2	B'9b	B10	B'10	B18	D6	D'10	D12	D'13	D17													
16.01	2002	16	202	202	148	148	181	181	217	219	299	299	220	220	263	263	134	134	263	278	288	294	100	103	316	316	165	192
16.02	2002	16	202	202	148	150	181	183	221	221	299	299	220	220	266	266	132	134	278	278	288	294	100	100	316	328	165	192
17.01	2000	17	202	202	146	146	181	181	219	219	299	299	220	220	263	263	138	140	263	278	288	297	100	103	328	328	192	201
17.02	2000	17	202	202	150	150			219	219	299	299	220	220	263	286	134	138	263	263	297	297	100	100	310	310	192	201
17.03	2000	17			146	148	181	181	219	219	299	299	212	220	263	263	138	140	263	278			100	100			192	201
17.04	2000	17			146	148	181	181					220	248	263	263	132	138	263	278			103	103			192	192
17.05	2000	17	202	202	148	146	181	181	219	219	299	299	220	220	263	263	132	138	263	278	294	297	103	103	310	310	192	201
17.06	2000	17	202	202	148	150	181	181	219	219	299	299	220	220	263	286	132	138	263	278	297	297	100	103	328	328	192	201
17.07	2000	17	202	202	146	150	181	181	219	219	299	299	218	220	286	286	132	138	278	278	294	297	100	103	328	328	192	192
17.08	2000	17	202	202	148	150	181	181	219	219	299	299	220	220	263	286	132	138	278	278	294	297	103	103	328	328	192	201
20.01	2001	20	202	202	146	150	181	181	219	219	299	299	220	244			132	132	312	312	285	288	100	103	322	353	189	198
20.02	2001	20	202	202	144	146	181	181	209	219	299	299	220	234	266	266	132	132	312	312			100	103	353	353	162	198
20.03	2001	20	202	202	146	150	181	181	219	219	299	299	220	244	266	266	132	132	269	269			100	103	353	353	189	201
20.04	2001	20	202	202	146	150	181	181	209	221	299	299	220	220	266	266	132	132	312	312	288	297	103	103	353	353	189	201
20.06	2001	20	202	202	144	146	181	181	219	219	299	299	220	234	266	266	132	132	269	269	288	297	103	103	298	298	189	201
20.07	2001	20	202	202	144	146	181	181	219	219	299	299	220	236	266	266	132	132	269	269	288	297	100	103	298	298	189	201
21.01	2001	21	202	202	150	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	126	138	269	269	294	309	100	100	310	310	189	201
21.02	2001	21	202	202	148	150	181	181	219	219	299	299	220	220	266	282	132	138	269	269	288	294	100	100	310	310	189	192
21.03	2001	21	202	202	148	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	138	138	269	269	294	294	100	100	328	328	189	192
21.04	2001	21	202	202	146	148	181	183	219	219	299	299	216	220	266	266	132	138	269	269	294	294	100	103	328	334	189	192
21.05	2001	21	202	202	146	148	181	181	219	219	299	299	220	220	263	263	132	138	269	269	294	294	100	103			189	192
21.06	2001	21	202	202	150	150	181	181	219	219	299	299	220	220	266	282	132	138	269	269	288	294	100	100	310	334	189	192
32.01	2000	32	202	202	146	146	183	183	219	219	299	299	220	220	263	263	132	132	263	263	288	294	100	103	316	316	189	198
32.02	2000	32	202	202	146	150			219	219	299	299	220	220	263	266	132	132	272	272	288	294	100	103	328	328	192	192
32.03	2000	32	202	202	148	148	183	183	219	219	299	299	220	220	266	266	140	140	263	263	294	294	100	103	316	316	192	195
32.04	2000	32	202	202	148	148	181	183	219	219	299	299	220	220	263	263	138	140	278	278	294	294	103	103	316	316	198	198
32.05	2000	32	202	202	146	148	183	183	219	219	299	299	220	220	263	286	132	138	263	263	288	288	100	103	316	316	189	192
32.06	2000	32	202	202	146	148	183	183	219	219	299	299	218	220	263	286	138	140	263	278	294	294	100	103	316	316	192	195
32.07	2000	32	202	202	146	146			219	219	299	299	218	220	263	266	132	132	263	263	288	294	100	103	316	316	192	201
32.08	2000	32	202	202	148	148	183	183	217	219	299	299	220	220	263	263	132	132	263	263	294	294	100	100	316	316	192	195
32.09	2000	32			146	148	181	183			299	299	220	220	263	263	132	138	278	278	288	288	103	103	316	316	189	198
38.01	2002	38	202	202	148	148			217	219	299	337	220	220	266	282	132	140	269	315	309	312	100	100	328	328	162	192
38.02	2002	38	202	202	148	148	181	183	217	219	299	337	220	220	263	266	126	140	278	315	288	294	100	100	310	331	192	201
38.03	2002	38	200	202	148	150	183	185	217	219	299	337	220	220	263	266	126	140	269	315	288	309	100	103	310	331	192	201
38.04	2002	38	202	202	148	150	181	183	217	219	299	337	220	220	263	266	126	140	269	315	309	312	100	100	328	331	192	201
38.05	2002	38	202	202	148	150	181	183	217	219	337	337	220	220	263	282	126	132	269	269	288	309	100	100	310	331	192	201
38.06	2002	38			148	148			219	219					266	282	132	138	278	315	288	309	103	100			162	192
38.07	2002	38	202	202	148	150			217	219	299	337	220	220	263	266	126	140	269	315	294	312	100	103	310	310	201	192
41.01	2000	41	202	206	148	150			219	219	299	337	220	220	282	282	132	138	269	269	294	294	100	100	334	334	162	189
41.02	2000	41	202	202	146	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	282	132	132	269	278	288	294	100	103	310	328	162	192
41.03	2000	41	202	206	146	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	126	126	269	278	294	294	100	100	328	328	192	192
41.04	2000	41			148	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	266	126	132	269	278	294	294	100	100	313	313	189	192
41.05	2000	41	202	204	146	150			219	219	299	337	220	220	263	263	118	132	269	269	294	309	100	100	328	328	189	192
41.06	2000	41	202	206	148	148	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	126	132	269	278	309	312	100	103	310	328	189	192
41.07	2000	41	202	202	146	150			219	219	299	337	218	220	266	282	132	132	269	278	294	309	100	103	313	313	189	192
41.08	2000	41	204	206	146	148	181	181	219	219	299	337	220	220	263	282	126	132	269	269	294	309	100	100	334	334	192	192
48.01	2000	48	204	204	148	150	183	183	209	219	299	337	220	246	263	286	136	140	287	296	291	294	100	103	310	310	165	192
48.02	2000	48	204	204	148	150	183	183	209	219	337	337	220	220	263	286	136	138	263	269	288	294	103	103	331	331	192	201
48.03	2000	48	204	204	148	150	181	183	209	219	337	337	220	220	263	286	136	138	287	296	294	294	103	103	310	331	165	201
48.04	2000	48	204	206	148	150	183	183	219	219	299	299	220	220	263	266	136	140	263	269	294	294	103	103	328	328	192	201
48.05	2000	48	204	204	148	150	181	183	217	219	299	337	220	246	263	286	136	140	263	269	294	294	100	103	310	310	165	201
48.06	2000	48	204	204	148	150	183	183	209	219	337	337	220	220	263	286</												

421.05	2001	421	202	202	146	150	181	183	219	219	299	299	220	220	263	263	126	132	269	269	294	309	100	100	328	334	162	192
421.06	2001	421	202	202	150	150			219	219	299	299	220	220	263	263	118	126	269	269	294	294	100	100	328	328	162	192
421.07	2001	421	202	202	148	150	181	183	219	219	299	299	220	220	263	263	126	132	269	269	294	297	100	100	328	334	162	192
421.08	2001	421	202	204	146	150	181	183	219	219	299	299	220	220	263	282	118	126	269	269	294	309	100	100	328	334	162	189
421.09	2001	421	202	202	146	148			219	219	299	299	220	220	263	282	126	132	269	272	294	309	100	100	328	334	192	192
421.10	2001	421	202	204			181	183	211	219	299	299	220	220	263	263	118	140	269	269	294	294	100	100	325	334	162	192
442.01	2001	442	202	206	148	150	181	181	219	219	337	337	220	220	263	263	132	132	269	269	288	294	100	103	328	334	189	201
442.02	2001	442	204	206	146	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	126	132	269	269	294	294	100	103	328	334	189	201
442.03	2001	442	204	206	148	150	181	181	219	219	337	337	220	220	263	282	126	132	269	269	294	294	100	103	328	334	189	201
442.04	2001	442	202	204	150	150	181	181	219	219	337	337	220	220	263	263	126	132	269	269	288	288	100	103	331	331	192	201
442.05	2001	442	202	204	150	150	181	181	219	219	337	337	220	220	263	263	126	132	269	269	288	294	103	100	331	331	189	201
442.06	2001	442	204	206	148	150	181	181	219	219	337	337	220	220	263	263	126	126	269	269	294	294	100	103	328	331	192	201
442.07	2001	442	204	206	148	150	181	181	219	219	299	337	220	220	263	263	132	132	269	269	294	294	100	103	334	334	189	201
448.01	2002	448	202	202	148	148			219	219	299	337	220	220	263	266	140	140	269	269	288	303	100	100	334	334	192	192
448.02	2002	448	202	202	148	148	181	183	219	219	299	337	220	220	266	286	132	140	269	269	309	312	103	103	310	310	192	201
448.03	2002	448	202	202	146	148	183	183	219	219	299	337	220	220	263	263	132	140	269	269			100	100	334	334	189	192
448.04	2002	448	202	202	146	148	183	183	219	219	299	335	220	220	263	266	140	140	269	269			100	100	328	328	192	192
448.05	2002	448	202	202	146	148	183	183	219	219	299	337	220	220	263	266	138	140	269	309			100	100	328	328	189	189
448.06	2002	448	202	204	146	146			219	219	299	299	220	220	263	263	132	140	269	269	288	303	100	100			189	189
448.07	2002	448	202	204	146	148	183	183	219	219	299	299	220	220	263	266	138	140	269	309	288	294	100	103	310	328	192	195
448.08	2002	448	202	202	146	146			219	274	299	299	220	220	263	263	132	140	269	269	288	303	100	100	334	334	189	189
453.01	2002	453	202	202	148	148	181	181	219	219	299	337	220	248	282	282	132	132			288	294	100	103	310	331	192	192
453.02	2002	453	202	202	148	148			219	221	299	299	220	248	263	282	132	140	278	309	288	315	100	103	334	334	192	192
453.03	2002	453	202	204	148	150	181	181	219	221	299	299	220	220	263	282	138	140	263	309	294	312	100	103	310	331	192	192
453.04	2002	453	202	202	148	150	181	183	209	219	299	337	220	246	282	282	132	132	263	309	294	312	100	103	310	331	192	192
453.05	2002	453	202	202	148	150	181	183	219	223	299	337	220	220	263	282	132	140	278	312	288	312	100	103	310	331	192	192
453.06	2002	453	202	202	148	150	183	183	219	223	299	299	220	246	263	282	140	140	263	309	294	312	100	103	310	310	192	192
453.07	2002	453	202	204	148	148	181	181	209	219	299	299	220	248	263	282	132	132	263	309	288	312	100	103	310	331	192	192