



HAL
open science

Flux géniques et dispersion chez un rongeur à démographie cyclique dans un paysage agricole intensif

Bertrand Gauffre

► **To cite this version:**

Bertrand Gauffre. Flux géniques et dispersion chez un rongeur à démographie cyclique dans un paysage agricole intensif. *Ecologie, Environnement*. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2009. Français. NNT: . tel-00575336

HAL Id: tel-00575336

<https://theses.hal.science/tel-00575336>

Submitted on 10 Mar 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie des populations et écologie

Ecole Doctorale : SIBAGHE

présentée et soutenue publiquement

par

Bertrand Gauffre

le 3 Février 2009

titre :

**Flux géniques et dispersion chez un rongeur à démographie
cyclique dans un paysage agricole intensif**

JURY

Mr Oscar **GAGGIOTTI**, Université Joseph Fourier, Grenoble, Rapporteur
Mr Xavier **LAMBIN**, Université d'Aberdeen, Rapporteur
Mr Olivier **HARDY**, Université libre de Bruxelles, Examineur
Mr Philippe **JARNE**, CNRS, Montpellier, Examineur
Mr Vincent **BRETAGNOLLE**, CNRS, Chizé, Directeur de thèse
Mr Jean-François **COSSON**, CBGP, Montpellier, Co-directeur de thèse

RESUME

La dispersion est un trait d'histoire de vie qui joue un rôle majeur dans le fonctionnement des populations naturelles. Comprendre ce phénomène et son évolution est aujourd'hui déterminant pour la gestion des populations dans des écosystèmes de plus en plus anthropisés. Cette étude s'est attachée à caractériser la dispersion et ses déterminants chez le campagnol des champs, *Microtus arvalis*, dans un paysage agricole de l'Ouest de la France. L'instabilité spatio-temporelle des agro-écosystèmes et la démographie cyclique de ce petit rongeur colonial en font un modèle exceptionnel pour aborder cette problématique. La constitution d'une banque de marqueurs microsatellites nous a permis d'utiliser des approches de génétique des populations et de génétique paysagère. Une seule entité génétiquement homogène couvre les 500 km² du site d'étude et le patron d'isolement par la distance qui caractérise cette « population » indique que seule la distance limite le flux génique dans ce paysage. Les variations des patrons génétiques au cours des cycles reflètent l'instabilité de la balance entre dérive génétique et dispersion et montrent que le flux génique est positivement lié à la densité. Les patrons de dispersion, différents entre mâles et femelles (dispersion biaisée vers les mâles), suggèrent que la dispersion n'est pas déterminée par les mêmes causes évolutives selon le sexe. La colonisation par les femelles des habitats temporaire (les cultures annuelles), particulièrement massive lors des pullulations, permet la cohésion spatiale de la population. Sa cohésion génétique est assurée par les migrations répétées des mâles entre colonies pour la reproduction. Ce fonctionnement est rendu possible par l'extrême rapidité cycle de vie du campagnol des champs qui compense l'instabilité du paysage. L'intégration des différents résultats de cette étude dans un modèle de dispersion couplé à un modèle dynamique de paysage devrait permettre d'évaluer l'impact de l'évolution de l'agriculture sur cette espèce emblématique de la biodiversité de ces paysages.

MOTS-CLEFS

Dispersion, colonisation, flux génique, paysage, structures sociales, biais de dispersion, dynamique cyclique, densité dépendance, microsatellites, génétique paysagère, rongeurs, *Microtus arvalis*

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord vivement Xavier Lambin et Oscar Gaggiotti d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Olivier Hardy et Philippe Jarne de me faire l'honneur d'être membres du jury.

Je tiens également à remercier mes deux directeurs de thèse, Vincent Bretagnolle et Jean-François Cosson pour m'avoir fait confiance et m'avoir accompagné pendant ces 3 années d'intenses et passionnantes recherches.

Bien des années plus tard, à l'heure de mettre un point final à cette thèse, je ne peux m'empêcher de penser à ce lointain matin qui me vit pousser la porte du CBGP pour la première fois. C'était en mars 2002, je voulais découvrir ce qu'était la recherche. J'ai trouvé un peu plus...

S'il ne fallait y remercier qu'une seule personne ce serait sans aucune hésitation Armelle Cœur d'Acier. Résumer ici tout ce que je lui dois serait vraiment trop long et embarrassant. Je lui exprime donc simplement toute ma profonde reconnaissance et mon amitié.

Je tiens à remercier chaleureusement Denis Bourguet et Jean-Marc Duplantier, mes deux chers DU. A travers eux, merci à l'ensemble des permanents (je pense notamment à Sylvie Hart et Serge Meusnier) qui font du CBGP non seulement le laboratoire idéal pour faire une thèse dans les meilleures conditions matérielles, mais aussi un lieu convivial où l'on se sent tout simplement bien (et y'a pas encore la piscine dans le patio !).

Un immense merci à Arnaud Estoup. Quel plaisir et quelle fierté pour moi ce fut de travailler avec maître Nono. Pour la rigueur, pour tous les encouragements et pour m'avoir donné confiance en mon travail : merci d'avoir été là.

Un grand merci à Maxime Galan et Yannick Chaval qui m'ont accompagné dans de mémorables périodes Chizéens. Merci Max pour ton expertise toute Aveyronnaise et tes coups de main en Biologie Moléculaire. Merci à Sylvain Piry pour son immense disponibilité et son incroyable rapidité à résoudre tous mes problèmes de programmation, de SIG ou de base de données. Mes remerciements se tournent également vers Réjane Streiff, Nathalie Charbonnel, Manue Jousset, Philippe Gauthier, Gauthier Dobigny, Jeff Martin pour tous ces petits coups de mains et conseils qui rendent les choses si simples ! Un merci très spécial à Karine Berthier qui a fait plus que de me montrer la voie. Merci pour ses conseils et son expertise campagnolesque. Merci aussi pour son soutien et ses encouragements. A nos collaborations présentes et futures !

Merci à Julien Foucaud, l'Anda, avec qui j'ai passé les plus incroyables moments cébégiens. Des coupes du monde de ping-pong du Cébégépé (et la mémorable défaite de dark Bourguet) au Jorki Club du Cébégépé : Gauthier, Benoit, Asraf, Arnaud, Ben, Felipe, Adri, Olivier, Max et les autres. Que de bons souvenirs ! Sans parler des moments d'extase à entendre cette rhétorique rouquino-parigote toute en nuance et modération. Merci pour ta présence, tes conseils et tes

encouragements. Après Dr Comète et Dr Flamme... c'est au tour de Nounours ! Merci à tous ceux qui ont partagé mon bureau pendant ces longues années. De la belle Julie (alias Comète) à Manu en passant par Stuart. Merci enfin à Anne Loiseau pour avoir relu cette thèse.

Un salut spécial à la SERL team de 2007. les 2 Alex, Philippe, Florent, Camille, Thierry, Adèle et super Julie, comme toujours dans le rôle de la locomotive. J'ai passé des moments formidables à organiser ce congrès à leurs cotés. C'est un magnifique souvenir que je garde de cette expérience.

J'adresse un immense merci aux personnels et étudiants du CEBC. A Chizé, j'ai trouvé une deuxième famille de science, inattendue, faite de naturalistes ou même pire : d'ornithologistes ! Je n'oublierai jamais ma première soirée « ornithos » chez Sylvie... Quoi ? Y'a des gens qui parlent d'oiseaux comme moi et mes potes on parle de foot ??? Un monde vraiment nouveau, un vrai choc culturel. Merci à tous d'avoir rendu mes séjours dans la forêt plus qu'agréables. Je remercie spécialement Sylvie Houte sans qui parfois j'aurais eu du mal à arriver...

Il y a quelque chose que je retiendrai au dessus de tout et qui à mes yeux symbolise l'esprit «Chizé » : la solidarité. Qui se traduit non seulement dans la facilité à trouver de l'aide lorsqu'il s'agit d'organiser les lourdes sessions de piégeages campagnols mais aussi dans le quotidien du laboratoire à travers des discussions passionnantes et coups de mains entre étudiants (sans Alex, Thomas ou Mira je serais encore en train de m'arracher les cheveux sur R...). Merci à tous les piégeurs et coupeurs d'oreilles : de Steeve (le premier, quel souvenir !) à Adri en passant par les Alex, Benoit, Léo, Camille, Stephane, Olive, Victor, Jess, William, Damien,... et le plus grand d'entre tous, qui a supporté sans jamais rechigner les colonies « bonus » (la vaaaache !) qui concluaient nos longues journées de terrain en 2007 : l'immense Salomon Brodier !

Je voudrais également vivement remercier Pablo Inchausti et Vincent pour leur disponibilité et les passionnantes discussions « campagnols » qui ont ponctuées mes séjours au CEBC. Confronter mes résultats de génétique des pops au regard critique de ces deux écologistes fut un exercice pas toujours confortable. Mais cela reste l'une des expériences les plus formatrice et enrichissante de ma thèse.

Enfin un très grand merci à Thomas de Cornulier qui m'a invité et accueilli si généreusement à Aberdeen. Ce séjour Ecossois, et les discussions qui l'ont animé, restera comme l'un des meilleurs souvenirs de ma thèse. Merci pour son aide et ses conseils en statistiques spatiales.

Au cours de cette thèse j'ai également collaboré avec des chercheurs étrangers à mes deux labos : Eric Petit avec qui, pendant quelques mois, j'ai eu le bonheur d'échanger de passionnants mails. Je le remercie de m'avoir, à travers sa rigueur et un regard neuf sur mon travail de génétique des pops, fait progresser et avancer dans ce domaine. Merci pour tous ses conseils, ses éclairages et son aide dans la rédaction de mon deuxième article. Je remercie également Jean-Pierre Rossi pour ses conseils en statistiques spatiales.

D'un point de vue moins professionnel, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné dans mon temps libre au cours de ces 3 années de doctorat. Mes amis, Bernard, Titou, Cyrille, Laurie², Alex, Max, Nico, Seb, Lucie, Nathalie, Viola, Delphine, Seb le petit génie, Béné et tant d'autres... Merci aussi à tous mes coloc, Amalia, Sophie et Cyrille avec qui je n'ai partagé que de bons moments. Thanks Sophie, I miss your cakes so much!!! Et les deux petites dernières Elletra et Camille. Un grazie speciale a Angelo. Senza di te, minchia ! no so se l'avrei fatto... di rimanere non troppo lontano dal mondo vero. No puoi immaginare quanto felice et fiero sono di pensare che fra poco saresti dottore dal universita di Montpellier !

Je terminerai en remerciant ma famille pour sa présence et son soutien tout au long de ces longues années d'études. Merci à mon grand père et à ma grand-mère (special thanks for the mamie-mobile), merci à la fratrie : Olivier et Marie et, finalement, plus que n'importe qui d'autre je remercie mes parents. Rien ne s'obtient sans travail. Je les remercie de m'avoir transmis, parmi tant d'autres, cette clef de la réussite. Je suis fier de leur dédier cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	7
I) La dispersion	9
I.1 La dispersion, au cœur de la dynamique et de la génétique des populations	9
I.2 Les causes ultimes de la dispersion, et son évolution	11
II) Mesurer la dispersion	12
II.1 Approches directes	13
II.2 Estimer les flux géniques en génétique des populations : Approches indirectes	14
II.2.1 Modèles en populations discrètes : le modèle en îles et ses extensions	15
II.2.2 Modèle en population continue : le modèle d'isolement par la distance (IBD)	16
III) Structure génétique spatiale des populations dans les paysages	17
III.1 Qu'est ce qu'une population dans la réalité d'un paysage ?	11
III.3 Apports et concepts de la génétique paysagère	11
IV) Problématique générale	21
V) Le modèle d'étude : un micromammifère cyclique dans un paysage agricole intensif	22
V.1 Attendus génétiques dans les populations cycliques de micromammifères	22
V.2 Le campagnol des champs, <i>Microtus arvalis</i>	25
V.3 La dispersion chez le campagnol des champs	27
V.4 Dynamique des populations du campagnol des champs sur le site d'étude de Chize	28
VI) Objectifs de la thèse	33

I) Structure génétique spatiale : influence du paysage sur les flux géniques.....	37
I.1 Contexte	38
I.2 Résultats et discussion	41
I.3 Conclusion	44
II) Système d'appariement et évolution de la dispersion biaisée entre les sexes.....	47
II.1 Contexte	48
II.2 Résultats et discussion	49
II.3 Conclusion	53
III) Influence de la densité sur la dispersion.....	55
III.1 Contexte.....	56
III.2 Résultats et discussion	58
III.3 Conclusion	62

INTRODUCTION GENERALE

I) La dispersion

I.1 La dispersion, au cœur de la dynamique et de la génétique des populations

Les populations naturelles, qu'elles soient subdivisées ou non, sont des systèmes spatialisés à l'intérieur desquels la dispersion constitue un ciment cohésif. En effet, la dispersion joue un rôle central dans la dynamique et l'évolution des populations (Dieckmann et al. 1999), permettant la cohésion génétique des espèces à travers l'espace, leur persistance en dépit d'extinctions locales et enfin la recherche de conditions environnementales favorables dans un environnement dynamique, variable et hétérogène. Il existe une importante littérature sur les déterminants de la dispersion et ses conséquences (Clobert et al. 2001; Dieckmann et al. 1999; Lenormand 2002; Stenseth & Lidicker 1992). Ce phénomène complexe a tant d'implications que sa définition est généralement modulée par les différents auteurs en fonction de leur intérêt (les causes, les mécanismes, les conséquences), du niveau de perception considéré (individus, populations, espèces, communautés) et du domaine d'application (écologie, biologie de la conservation, génétique des populations). Le mouvement de dispersion est caractérisé par trois étapes principales sur lesquelles vont opérer des mécanismes proximaux et ultimes de différente nature : la décision de départ (ou *émigration*), la phase de *transfert* ou d'exploration, et la décision de fixation (ou *immigration*) dans un site d'arrivée (Ims & Hjermann 2001).

En génétique des populations le terme de migration est plus souvent utilisé pour désigner ce phénomène bien que cela puisse prêter à confusion car la migration désigne aussi, en écologie, les mouvements saisonniers entre des habitats exploités à différents moments du cycle annuel. La migration « génétique » implique le mouvement de gamètes ou d'individus, qui entraînent un flux génique, c'est-à-dire l'échange de génomes et donc d'allèles entre les populations, ou au sein d'une même population. C'est pourquoi en génétique des populations on parle souvent de migration (ou dispersion) *efficace* car seuls les mouvements de dispersion entraînant une reproduction seront pris en compte dans les estimations du flux génique. La migration interagit avec d'autres processus micro-évolutifs tels que la dérive génétique et la sélection, et affecte par là même le potentiel adaptatif et la viabilité des populations (Frankham 2005).

La dispersion est un trait d'histoire de vie de l'individu. Elle peut être définie comme le mouvement effectué par un individu entre sa population de naissance et la population où il va se reproduire (Ims et al. 2008; Johnson & Gaines 1990). Lorsqu'une espèce est distribuée de façon continue et/ou dans le cas de très grandes populations, il n'y a pas de changement de population à proprement parler et la dispersion est alors définie comme le mouvement permanent effectué entre

un lieu de naissance et un lieu de reproduction. La dispersion est alors caractérisée par la distance parents-progéniture (Rousset 1997; Wright 1942). Cette définition est toutefois restrictive car elle n'inclue que la dispersion juvénile. La dispersion adulte, effectuée entre deux sites de reproduction, est souvent négligée car généralement plus courte en distance (Paradis et al. 1998). D'autre part, cette dispersion de reproduction n'est pas prise en compte dans les modèles de génétique des populations qui reposent sur des hypothèses de cycle de vie simples alternant reproduction et dispersion.

La dispersion a d'importantes conséquences pour la dynamique des populations et des métapopulations (Hanski & Gaggiotti 2004; Hanski & Gilpin 1997; Lambin et al. 2000). Du point de vue d'une population particulière elle est, avec les taux de natalité et de mortalité, un facteur déterminant de sa dynamique. C'est la combinaison de l'immigration et de l'émigration. Dans la dynamique des métapopulations son rôle est crucial car elle permet la recolonisation des patches d'habitat après des événements d'extinction (Johnson & Gaines 1990; Whitlock 2001). Les métapopulations ne pourraient en fait pas survivre très longtemps en l'absence de (re)colonisation (Stacey et al. 1997). Sous le même terme de dispersion, on peut donc distinguer la migration (mouvement vers un patch occupé) et la colonisation (mouvement vers un patch vide). La colonisation détermine la façon dont les individus se distribuent au niveau des limites des aires de répartition et est ainsi un facteur important des processus d'invasion des milieux par des espèces exotiques. Dans le cas des populations à dynamique cyclique, les transferts d'individus, via la dispersion, peuvent synchroniser les fluctuations d'abondance (Bjornstad et al. 1999a; Haydon & Steen 1997). Le degré de synchronie entre les populations est alors, en partie, conditionné par la relation entre la dispersion et la distance géographique (Paradis et al. 1999). La dispersion et la démographie sont étroitement liées à travers la densité. La densité-dépendance de la dispersion a été établie chez un grand nombre d'espèces (Lidicker & Stenseth 1992; Matthysen 2005). Dans la majorité des cas la relation entre densité et dispersion est positive (Matthysen 2005) : une densité plus forte a pour conséquence plus de compétition (pour les ressources ou la reproduction) et donc plus de dispersion. Des cas de densité dépendance négative ont toutefois déjà été reportés (Ims & Andreassen 2005; Petty et al. 2000). Dans cette problématique, il est important de préciser s'il est question de l'émigration, de l'immigration ou de la migration (immigration – émigration) pour une population donnée ou de la dispersion (migration + colonisation) dans le cadre de métapopulation (avec des fluctuations de densité qui sont alors synchrones). La densité dans le site d'origine influence la probabilité d'émigration tandis que la densité dans le site d'arrivée influence la probabilité d'intégration et de reproduction de l'immigrant.

Enfin, au cours de son transfert entre deux patches un individu qui disperse va être confronté à un paysage naturel et ses éléments constitutifs. De ce fait, le trajet qu'il empruntera, la distance qu'il

parcourra seront étroitement liés à la structure et à la connectivité du paysage. Dans ce contexte certains éléments du paysage peuvent représenter des barrières (parfois infranchissables) à la dispersion. De même, les variations de qualité de l'habitat, qu'elles soient naturelles ou induites par les activités humaines ont potentiellement une grande influence sur la dispersion et son évolution.

I.2 Les causes ultimes de la dispersion, et son évolution

Au-delà des déterminants immédiats (ou agents extrinsèques) qui vont influencer la dispersion au cours de ses différentes étapes (i.e. la densité, la structure du paysage, une perturbation, etc), la dispersion en tant que comportement, est soumise à des pressions de sélection. Il existe quatre familles de facteurs qui agissent sur l'évolution de la dispersion : l'instabilité de l'habitat, l'évitement de la consanguinité, les interactions entre apparentés et les risques liés à la dispersion (Gandon & Michalakis 2001; Ims & Andreassen 2000; Johnson & Gaines 1990). De nombreux modèles verbaux ont été construits pour mettre en avant l'un ou l'autre de ces facteurs, mais c'est leur interaction qui rend particulièrement complexe la compréhension de l'évolution de la dispersion.

Disperser, c'est d'abord prendre un risque. Entreprendre un déplacement peut être très coûteux pour l'individu, par la dépense d'énergie qu'il représente et le risque de mortalité associé. De même, l'installation dans un nouvel environnement peut comporter un désavantage pour l'individu. Ainsi le coût lié à la dispersion va contre sélectionner ce comportement (Gandon & Michalakis 2001).

Eviter la compétition entre apparentés. La présence d'apparentés sur un même site (le site de naissance) entraîne une compétition entre eux. La dispersion, même si elle comporte un risque pour l'individu qui disperse pourrait augmenter la valeur sélective de ses apparentés et donc quand même être sélectionnée à travers une augmentation de la valeur sélective inclusive de l'individu qui disperse. Dans des populations saturées et stables, la dispersion évolue même si les coûts de dispersion sont très élevés. Dans un modèle simple où chaque site ne peut être occupé que par un seul individu, Hamilton et Mayr (1977) montrent que la force qui pousse les individus à émigrer est la compétition entre apparentés. Des modèles plus récents permettent la prise en compte d'un plus grand nombre de facteurs.

Eviter la consanguinité. Les croisements entre apparentés augmentent le taux d'homozygotie et donc les risques d'exposition aux allèles récessifs délétères (Frankham 1995) qui peut se traduire par une mortalité accrue des fœtus ou des juvéniles et/ou une valeur sélective plus faible des individus. Disperser est un moyen efficace pour éviter ce type de croisements (Gandon 1999; Greenwood 1980; Perrin & Mazalov 1999; Perrin & Mazalov 2000).

Une adaptation à l'instabilité de l'habitat. La variation temporelle de la qualité des patches d'habitat devrait sélectionner la dispersion comme une stratégie d'étalement des risques (ceux associés à la dispersion vs ceux associés à la dégradation de l'habitat). Ainsi, Gandon & Michalakis (2001) montrent que l'instabilité de l'habitat exerce une influence plus importante que les interactions entre apparentés ou la dépression de consanguinité sur les taux de dispersion.

Biais de dispersion entre les sexes. Des modèles récents s'intéressent plus particulièrement à l'évolution d'un biais de dispersion entre les deux sexes (Perrin & Mazalov 1999; Perrin & Mazalov 2000). Ils confirment les hypothèses formulées par Greenwood (1980), montrant que les interactions entre apparentés (coopération ou compétition) sont capables d'entraîner un sexe à disperser plus que l'autre à partir du moment où il existe une asymétrie entre les deux sexes. En effet, il faut que la coopération ou la compétition soient plus intense dans un sexe que dans l'autre. Par exemple, dans les espèces polygynes, la compétition entre mâles pour l'accès aux femelles est susceptible de dépasser l'intensité de la compétition entre femelles pour l'accès aux ressources nécessaire pour l'élevage des jeunes. La dépression de consanguinité peut à elle seule également conduire à une dispersion biaisée entre les sexes (Perrin & Mazalov 1999). De plus elle peut interagir sur l'asymétrie créée par l'asymétrie de compétition ou de coopération. L'effet de la consanguinité est alors d'augmenter les différences de comportement entre les deux sexes tout en diminuant globalement les taux de dispersion (Perrin & Goudet 2001; Perrin & Mazalov 2000).

Il existe donc une relation subtile entre toutes ces forces en présence. Les règles et les pressions de sélection qui régissent les décisions de dispersion vont principalement dépendre de la structure du voisinage social de départ et d'arrivée de l'individu. La dispersion est en ce sens indissociable de l'organisation sociale et du système de reproduction. Les différentes causes évolutives présentées ci-dessus ne prédisent pas nécessairement un comportement de dispersion identique, par exemple en terme de distance (Ronce et al. 2001). On peut également envisager que pour une même cause immédiate, la dispersion sera modulée différemment selon les causes évolutives qui la déterminent. Dans ce contexte et afin de pouvoir départager les différents facteurs ultimes de la dispersion et l'effet des causes immédiates sur ceux-ci, il convient de bien décrire et mesurer ce phénomène.

II) Mesurer la dispersion

Estimer la dispersion des individus demeure un problème constant en écologie du fait de la complexité de ce phénomène et des contraintes liées aux techniques utilisées pour l'étudier. La dispersion est généralement décrite par un paramètre synthétique qui peut être soit un taux soit une

distance, ces paramètres pouvant être mesurés par des méthodes directes et des méthodes indirectes.

Chez les animaux, la distance seuil en deçà de laquelle on considère qu'il n'y a pas eu dispersion peut être définie par les limites de territoire ou de domaine vital (Peacock 1997). Obtenir la distribution des distances de dispersion est un travail difficile et le plus souvent quantifier la dispersion revient plus simplement à mesurer son taux.

Approches directes et approches indirectes. La première catégorie d'approches (les approches directes) concerne les techniques qui permettent d'observer la dispersion (Capture-Marquage-Recapture, CMR, radiopistage) tandis que la seconde catégorie d'approches (dites indirectes) se base sur des inférences faites à partir de l'observation de patrons génétiques qui ont été engendrés par la dispersion. Les différences entre ces deux méthodes ont pour conséquence qu'elles ne mesurent pas tout à fait la même chose (Bossart & Prowell 1998; Whitlock & McCauley 1999) ce qui les rends plus complémentaires que concurrentes (Broquet et al. 2006; Koenig et al. 1996). Les approches directes vont précisément mesurer les mouvements réalisés par les individus tandis que les approches indirectes vont mesurer le flux génique, c'est-à-dire la dispersion efficace, celle qui aura été suivie par une reproduction.

II. 1 Approches directes

Les approches non génétiques sont largement employées sur les grands mammifères ou sur les oiseaux auxquels elles se prêtent plus particulièrement. Dans ces approches, il est difficile de déterminer l'efficacité des mouvements mesurés sur le terrain en termes d'évolution des populations et de maintien du flux génique. Il est par exemple très difficile de déterminer si le lieu de (re)capture est celui où l'individu s'installe définitivement et où il va se reproduire. D'autre part, les probabilités de recapture diminuent rapidement avec la distance au lieu de capture ce qui biaise systématiquement l'estimation des distances de dispersion vers de plus faibles valeurs. De ce fait, de nombreux projets se sont tournés vers l'intégration d'approche génétique dont le but est essentiellement d'estimer les migrations d'individus à travers l'analyse du flux génique.

Toutefois, les marqueurs moléculaires permettent aussi de mesurer des distances et taux de dispersion à travers des méthodes directes. C'est grâce à des expériences de lâchés de drosophiles *Drosophila pseudoobscura* portant un allèle muté codant pour des yeux oranges, que Dobzhansky & Wright (1943) ont pu étudier la dispersion de ces mouches. Aujourd'hui, l'étude directe de la dispersion à l'aide de marqueurs génétiques est réalisée le plus souvent grâce aux tests d'assignation, dont le principe est d'attribuer les individus à une population d'origine.

L'assignation se fait en comparant le génotype multilocus à des marqueurs génétiques hypervariables (en général des microsatellites) d'un individu cible aux fréquences alléliques de différentes populations. La comparaison se fait généralement en calculant la vraisemblance du génotype dans chaque population (Paetkau et al. 2004; Rannala & Mountain 1997), mais elle peut aussi être réalisée à l'aide de distances génétiques calculées entre l'individu cible et chacune des populations (Cornuet et al. 1999). Une technique équivalente du point de vue conceptuel est l'analyse de parenté (Jones & Ardren 2003): l'assignation d'un individu ne se fait plus dans ce cas à une population mais directement à ses parents (voire à l'un ou à l'autre, le plus souvent la mère). En supposant que le(s) parent(s) ne se sont pas dispersés, il est alors possible de mesurer la distance parent-propagule pour obtenir des données sur la dispersion (Streiff et al. 1999; Telfer et al. 2003). Les méthodes directes basées sur l'analyse de marqueurs génétiques sont très performantes car elles ne nécessitent pas de recapture (Koenig et al. 1996). Elles permettent ainsi, à moindre coût, d'obtenir des résultats autant (Berry et al. 2004; Favre et al. 1997) voire plus (Telfer et al. 2003) fiables que les résultats délivrés par des méthodes directes plus classiques de CMR. Chez le Campagnol terrestre *Arvicola terrestris* par exemple, des analyses de parenté conduisent à des estimations des taux et distances de dispersion qui sont trois et deux fois plus grandes, respectivement, que ce qui est obtenu par CMR (Telfer et al. 2003).

Une autre méthode pour estimer la dispersion directement en utilisant des approches de génétique des populations est de comparer les différences de fréquences alléliques, mesurées par F_{ST} avant et après dispersion : la variation de F_{ST} entre jeunes (avant dispersion) et adultes (après dispersion) dépend en effet uniquement du taux de dispersion de ces derniers (Vitalis 2002). Cette méthode, adaptée à des structures d'échantillonnage hiérarchisées permet d'estimer à la fois des taux et des distances de dispersion (ou du moins les échelles spatiales de dispersion). Finalement lorsque cette approche est appliquée sur les mâles et femelles séparément elle permet de révéler les biais de dispersion entre les sexes (Fontanillas et al. 2004).

II.2 Estimer les flux géniques en génétique des populations : approches indirectes.

Ces méthodes, dont les fondements théoriques sont anciens, ont vu leur application augmenter assez récemment avec l'avènement de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Saiki et al. 1988) associée à la découverte de marqueurs génétiques neutres et très polymorphes (Estoup & Angers 1998), qui les rend plus simples à mettre en œuvre et moins onéreuses. Un autre avantage des méthodes indirectes est qu'elles intègrent les 3 phases de la dispersion (émigration, transit puis immigration) ce qui est rarement le cas des méthodes directes. De plus les méthodes indirectes intègrent tous les mouvements de dispersion dans l'espace mais aussi dans le temps, sur un grand

nombre de générations. Toutefois, cela se fait au détriment de la connaissance précise des mouvements de dispersion qui seront moyennés dans le temps et l'espace.

L'étude de la distribution spatiale de la variabilité génétique est donc un moyen d'accéder à la connaissance du flux génique pour ensuite faire des inférences sur la dispersion. La dispersion n'est cependant pas le seul déterminant de la structure génétique des populations, et le lien entre structure génétique et dispersion ne peut être atteint qu'à travers la modélisation des divers paramètres responsables de cette structure, ainsi que leur interaction. Les inférences quantitatives qu'il est possible de réaliser sur la dispersion sont donc possibles dans le cadre de modèles théoriques dont les présupposés sont nombreux et plus ou moins en phase avec la réalité biologique. La dispersion est le plus souvent décrite par un paramètre synthétique qui peut être soit un taux soit une distance. Leur estimation suppose notamment que ce comportement soit homogène dans l'espace.

Ces estimations reposent sur des modèles évolutifs plus ou moins réalistes. L'objet de cette partie est d'en présenter les principaux, et/ou ceux qui seront évoqués dans cette thèse.

II.2.1. Modèles en populations discrètes : le modèle en îles et ses extensions

Le modèle en îles est historiquement le premier et son succès repose largement sur une relative simplicité mathématique. Il a pour origine la relation définie par Wright (1951) entre la différenciation génétique et le nombre de migrants dans un modèle à nombre infini de populations d'un organisme diploïde hermaphrodite :

$$F_{ST} = 1/4Nm + 1 \quad (\text{Eq. 1}),$$

où N est la taille efficace d'une population, m le taux d'immigration dans cette population, et F_{ST} un indice de fixation qui mesure les différences de fréquences alléliques entre populations. Cet indice peut être interprété comme la part de variance des fréquences alléliques qui est due aux différences entre populations (Wright 1951), ce qui a conduit à la mise au point d'un estimateur de F_{ST} basé sur l'analyse de variance (Weir & Cockerham 1984). L'équation 1 est la relation la plus utilisée pour estimer des taux de dispersion, mais cette approche a été critiquée parce que le modèle sous-jacent est irréaliste (Whitlock & McCauley 1999). Toutefois, autant les données empiriques (Bohonak 1999) que des données simulées (Slatkin 1994) indiquent que cette méthode est robuste, les estimations de taux de migration étant valides même pour des jeux de données qui ne répondent pas à toutes les hypothèses du modèle.

Le modèle dit de « stepping stone » (Kimura & Weiss 1964) propose une extension plus réaliste au modèle en îles. Car contrairement à ce dernier, les échanges de gènes ne se font qu'entre

populations (ou dèmes) contiguës. On considère parfois des stepping-stone unidimensionnels, correspondant biologiquement à des populations disposées linéairement le long d'un cours d'eau par exemple. Dans ce cas, une population reçoit une fraction m de gènes migrants, issus à parts égales ($m/2$) de chacune des deux populations adjacentes. Il existe aussi des modèles bidimensionnels. Là, les échanges de gènes s'effectuent entre populations contiguës dans les deux directions spatiales, une population reçoit une proportion $m/4$ de gènes migrants de chacune de ses quatre voisines (elle émet elle-même une fraction identique de migrants en direction de chacune de ses populations voisines). Comme dans le modèle en îles, mais au moyen de développements analytiques plus complexes, il existe un lien entre la différenciation entre dèmes, mesurée par exemple par le paramètre F_{ST} , et l'intensité des flux migratoires, mesurée par le nombre Nm de migrants (Slatkin & Barton 1989). Par ailleurs, dans le modèle stepping-stone, la différenciation entre deux populations dépend de la distance qui les sépare. Ainsi, à titre d'exemple, Slatkin (1991) montre, par le biais de la théorie de la coalescence, la relation suivante, dans le cadre d'un stepping-stone unidimensionnel circulaire (les effets de bord sont de la sorte supprimés) composé de d dèmes :

$$F_{ST}(i) = 1 / [1 + (8Nm/i)] \quad (\text{Eq. 2}),$$

avec i désignant la distance entre 2 dèmes ; $i = 1, 2, \dots$ (Cette relation suppose d grand et i petit devant d) Des résultats similaires, quoique d'obtention plus difficile, peuvent être établis concernant des modèles bidimensionnels (Slatkin 1991).

II.2.2 Modèle en population continue : le modèle d'isolement par la distance (IBD)

Les capacités de dispersion de la plupart des espèces sont plus faibles que leurs aires géographiques. La dispersion s'effectue le plus souvent à courte distance relativement aux distances maximales entre populations ou individus échantillonnés, les fréquences alléliques seront donc plus semblables entre populations/individus proches qu'entre populations/individus éloignées: c'est ce qu'on appelle l'isolement par la distance (Wright 1942). Ce patron se traduit par une augmentation des distances génétiques, telles qu'elles peuvent être mesurées par des F_{ST} , avec les distances géographiques. Des résultats théoriques démontrent qu'il existe une relation linéaire entre $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ et les distances géographiques, pour des populations situées dans un habitat à une dimension comme un écotone ou une rivière, ou leur logarithme naturel, pour des populations occupant un habitat à deux dimensions (Rousset 1997). En ce sens les stepping stones sont en fait des modèles discrets d'IBD. La pente de la régression entre les deux quantités dépend de la distance de dispersion et de la densité d'individus, ce qui donne un moyen d'estimer la distance si

la densité est connue (Rousset 1997). Cette méthode a été étendue à des analyses au niveau individuel, dans lesquelles les distances génétiques ne sont plus mesurées entre populations mais entre individus, à l'aide du paramètre a_r (Rousset 2000) ou du paramètre \hat{e}_r (Watts et al. 2007), pour être applicable à des espèces à distribution continue. Dans un espace à deux dimensions on peut estimer la taille de voisinage (Nb) à partir de l'inverse de la pente de la régression entre distance génétique et le logarithme de la distance géographique. En se basant sur la relation mathématique suivante :

$$Nb = 4\pi D_E \sigma^2 \quad (\text{Eq. 3}),$$

où D_E est la densité efficace, et σ la distance moyenne parents-progéniture, et connaissant D_E par ailleurs, on peut donc estimer les distances moyennes de dispersion entre parents- progéniture. Les estimations obtenues sont cohérentes avec des mesures directes des distances de dispersion, tout au moins à une échelle locale (Broquet et al. 2006; Rousset 2000; Rousset & Raymond 1997; Sumner et al. 2001), et elles sont robustes à de nombreux écarts aux modèles sous-jacents (Leblois et al. 2003; Leblois et al. 2004; Vekemans & Hardy 2004).

III) Structure génétique spatiale des populations dans les paysages

Un pré-requis à l'estimation de la dispersion en génétique des populations est donc de se placer dans le cadre d'un modèle théorique qui soit le plus adapté à la réalité biologique de l'espèce considérée. Ainsi, déterminer comment les individus sont structurés dans l'espace est de première importance avant d'utiliser ces modèles.

D'autre part, dans ces modèles théoriques, la structure génétique spatiale des populations est uniquement vue comme la conséquence de la dispersion. Les estimations de taux ou distances de dispersion sont réalisées en faisant deux hypothèses fortes qui sont celles de la symétrie (il y a autant d'individus qui dispersent de la population A vers la population B que l'inverse) et de l'isotropie (les probabilités de disperser sont égales dans toutes les directions, si bien que la position moyenne des propagules est la même que celle de leur parents). Il n'est donc pas tenu compte dans ces modèles des caractéristiques du paysage naturel dans lequel les individus dispersent. Celui-ci est simplifié à l'extrême. Or dans la réalité, les paysages dans lesquels les espèces évoluent sont souvent complexes et influencent directement le flux génique.

III.1 Qu'est ce qu'une population dans la réalité d'un paysage ?

Définir une population est donc de première importance lorsque l'on s'intéresse à la dispersion. Le concept de population est central dans les sciences biologiques et de nombreuses définitions peuvent être trouvées dans la littérature (Waples & Gaggiotti 2006).

Par opposition aux définitions statistiques qui définissent la population comme un agrégat d'objets sur lesquels sont réalisées des inférences par échantillonnage les définitions biologiques réfèrent exclusivement à des groupes d'individus qui partagent certaines propriétés communes. Parmi les nombreuses définitions biologiques trouvées dans la littérature, deux principales tendances se dégagent : les définitions reposant sur un paradigme écologique et celles reposant sur un paradigme évolutif (Crawford 1982). Dans le paradigme écologique, les forces de cohésion sont principalement de nature démographique, et l'accent est porté vers la coexistence des individus dans le temps et l'espace, de manière à ce que chaque individu ait l'opportunité d'interagir avec les autres (compétition, interactions sociales, etc.). Dans le paradigme évolutif, la force cohésive est principalement génétique, et l'accent est porté sur les interactions reproductives entre individus. La *population évolutive* peut être définie comme un groupe d'individus de la même espèce vivant dans une zone géographique suffisamment restreinte de telle sorte que chaque membre ait potentiellement une chance équivalente de se reproduire avec chaque membre du sexe opposé (Hartl & Clark 1997). Définir de manière plus précise ce qu'est une population reste difficile et varie d'une espèce à l'autre en raison de l'existence de structures géographiques ou paysagères qui conduisent à des patrons de distribution spatiale des organismes non aléatoire. De plus il existe souvent certains types de rassemblements ou d'agrégations, comme la formation de bancs, de troupeaux, de colonies, etc. qui impliquent une reproduction non aléatoire des individus. Cela se traduit généralement par une structuration génétique des populations.

Dans ce contexte la structure du paysage est un facteur clef. Celle-ci est caractérisée par la taille des patches d'habitats favorables à l'espèce considérée et la matrice, plus ou moins défavorable, qui relie ces habitats dans le paysage. L'*habitat*, dans ce manuscrit, définit l'ensemble des milieux utilisés par une espèce. Un paysage peut être homogène sur de vastes espaces (avec donc une distribution continue des habitats) ou au contraire être très fragmenté (habitats discrets). Cette structure conditionne en partie la taille des populations ainsi que leur connectivité, et donc l'influence de la dérive génétique et des flux géniques sur la diversité génétique neutre. Un paysage très fragmenté ne permettra qu'à des populations de petite taille et isolées de subsister. Ces propriétés favoriseront la dérive génétique entraînant une diminution de la diversité génétique à l'intérieur des fragments et une augmentation de la différenciation génétique entre ces fragments.

Au contraire, de vastes habitats homogènes, s'ils sont favorables, permettront le maintien de populations à large effectif avec pour effet de limiter la dérive génétique.

III.3 Apports et concepts de la génétique paysagère

La génétique paysagère est une nouvelle discipline au carrefour de la génétique des populations de l'écologie du paysage et des statistiques spatiales. Son but est de décrire et de comprendre l'influence des structures paysagères et des facteurs environnementaux sur la structuration spatiale de la variabilité génétique (Holderegger & Wagner 2008; Manel et al. 2003; Storfer et al. 2007).

Jusqu'alors, en génétique des populations, le moyen d'aborder ce problème consistait à prédéfinir – et échantillonner – des populations *a priori* (sur la base de propriétés visibles partagées par les individus, comme par exemple leur origine géographique) puis à comparer leurs propriétés génétiques dans un cadre statistique fréquentiste. Des outils développés récemment avec l'émergence de la génétique paysagère permettent de réaliser des inférences précises sur le nombre d'unités populationnelles et les éléments paysagers ou environnementaux qui les délimitent. Ces méthodes de partitionnement des individus (ou de clustering) ont été récemment développées dans un cadre statistique Bayésien (Manel et al. 2002; Manel et al. 2005; Pritchard et al. 2000). Elles reposent sur l'hypothèse qu'il existe K populations (K étant inconnu) dans la zone étudiée. Chaque population étant une unité panmictique caractérisée par ses propres fréquences alléliques aux loci analysés. Chaque individu est affecté avec une certaine probabilité aux différentes populations inférées sur la base de son génotype multilocus. Ces approches utilisent le fait que l'existence d'une structure génétique au sein d'un échantillonnage induit nécessairement un écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et un déséquilibre de liaison entre loci. De manière simplifiée le modèle prend en compte la présence de ces déséquilibres en introduisant une structure de populations qui minimise autant que possible ces déséquilibres (Pritchard et al. 2000). Ces modèles peuvent prendre en considération l'origine mélangée (hybride) des individus souvent attendue lorsque les populations sont proches génétiquement (Falush et al. 2003). Enfin, plus récemment, la prise en compte du cadre spatial de la structure des populations dans ces modèles, en introduisant comme *prior* les coordonnées spatiales des individus apporte un raffinement supplémentaire à ces approches qui deviennent explicitement spatialisées (Chen et al. 2007; Francois et al. 2006; Guillot et al. 2005). La localisation de discontinuités génétiques en relation avec les éléments et caractéristiques du paysage procure des informations essentielles sur les contraintes spatiales qui influencent les individus qui dispersent. Bien que très utiles, ces approches présentent encore certaines hypothèses contraignantes liées au modèle de population implémenté, c'est-à-dire des populations panmictiques. Très récemment des approches statistiques basées sur les valeurs

propres et prenant l'espace explicitement en compte apparaissent prometteuses en ce sens qu'elles ne reposent sur aucun modèle (Jombart et al. 2008; Patterson et al. 2006).

La connaissance de la structure des populations en relation avec le paysage est d'un grand intérêt pour comprendre le fonctionnement des populations, et particulièrement les contraintes qui, dans un contexte spatial, pèsent sur la dispersion. Ce champ thématique renvoie à de nombreuses disciplines telles que la biologie évolutive ou la biologie de la conservation pour laquelle la connaissance de la connectivité des paysages – le degré auquel un paysage facilite ou gêne les organismes entre patches de ressource - est un pré-requis indispensable (Taylor 93).

IV) Problématique générale

Après avoir été considérée comme un bruit de fond impossible à mesurer, la dispersion est devenue un thème majeur en biologie au cours des dernières années (Nathan 2001). Dans le contexte actuel de la fragmentation des habitats, des changements climatiques ou encore des invasions biologiques, c'est une attention croissante qui est portée à son rôle crucial. Comprendre ce phénomène et son évolution apparaît aujourd'hui déterminant pour améliorer la gestion des populations naturelles dans des écosystèmes toujours plus modelés par la main de l'homme. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse.

Pour cela une description et une compréhension approfondie de la dispersion est nécessaire :

1) Des facteurs ultimes de la dispersion

. Quelles sont les causes évolutives de ce comportement ? Quelles conséquences ?

2) Des facteurs proximaux de la dispersion

. Comment des agents extrinsèques agissent sur la dispersion ?

. Comment les paysages affectent ils la dispersion ? Quelles contraintes imposent-ils ?

. Comment la densité affecte t'elle la dispersion ?

3) Enfin comment ces différentes forces et contraintes interagissent ?

Pour aborder cette thématique l'outil génétique, de part ses développements techniques et analytiques récents, apparaît aujourd'hui le plus pertinent. Dans cette étude, le modèle biologique est un petit rongeur, le campagnol des champs, dans un paysage agricole intensif. Cette espèce à l'avantage d'être abondante, facile à capturer, assez bien connue notamment à travers des études de dynamique des populations. Ce petit rongeur est un modèle remarquable pour étudier la dispersion car d'une part il est cyclique et, d'autre part il est emblématique de paysages extraordinairement instables et hétérogènes dans lesquels la dispersion subie d'importantes contraintes et est suspectée de jouer un rôle déterminant. Ainsi, dans cette étude, nous nous sommes attachés à considérer cet écosystème complexe comme un élément indissociable de cette problématique. Les pratiques agricoles et la mosaïque des milieux fournissent un cadre quasi-expérimental pour étudier la dispersion.

V) Le modèle d'étude : un micromammifère cyclique dans un paysage agricole intensif.

V.1 Attendus génétiques dans les populations cycliques de micromammifères

La propension à fluctuer, souvent de façon synchrone sur de grandes distances, est assez répandue dans le règne animal, notamment chez les micromammifères (Encadré 1). L'impact des fluctuations périodiques d'abondance sur la structure génétique spatiale des populations cycliques de rongeurs et les niveaux de diversité génétique à court et long terme sont à ce jour mal connus. La variabilité spatiale et temporelle des densités peut fortement affecter la taille efficace des populations, leur structure spatiale comme le degré d'isolement et la migration efficace (Whitlock 2001) avec donc des conséquences sur leurs patrons génétiques. Ces populations présentent des fluctuations périodiques d'abondance généralement très marquées et très rapides, concernant souvent peu de générations (moins de 15). Dans ces populations, la phase de déclin se caractérise par un effondrement brutal pouvant atteindre 98 % ou plus des effectifs (Boonstra et al. 1998). A la suite de ce déclin, les populations conservent de très faibles effectifs sur des laps de temps faibles (généralement inférieurs à 10 générations). Suite à cette phase de faible densité, les populations suivent généralement une période de croissance quasiment exponentielle qui va conduire à des densités extrêmement élevées caractérisant la pullulation. Par exemple chez les rongeurs, la taille des populations peut augmenter de huit à 22 fois sur une période de six mois (Krebs et Myers, 1974). Les populations cycliques de rongeurs peuvent donc être considérées comme des métapopulations soumises, périodiquement, à des processus d'extinction et de recolonisation de forte amplitude. Les fortes variations de la taille des populations, et de leur structure spatiale, peuvent fortement modifier l'équilibre dérive génétique - migration au cours d'un cycle.

En s'appuyant sur les théories de la génétique des populations, on peut tenter de relier les événements démographiques forts et antagonistes que subissent ces populations à des attendus génétiques en termes de diversité et de patrons spatiaux. Dans les populations cycliques de rongeurs, la période de déclin et de faible densité constitue un goulot d'étranglement démographique. D'un point de vue génétique, elle peut conduire à une diminution rapide du nombre d'allèles, à une érosion de l'hétérozygotie et dans certains cas entraîner une dépression de consanguinité (Nei et al., 1975 ; Chakraborty et Nei, 1977 ; Maruyama et Fuerst, 1985 ; Frankham, 1995a ; 1995b). Dans le cas de populations isolées, la restauration de la diversité génétique, perdue durant la période de faible densité, peut s'effectuer par le biais des mutations (Nei et al., 1975 ; Hedrick, 2005). Cependant, même en considérant des conditions optimales, c'est-à-dire des taux de

mutation élevés et une très faible dérive génétique, comme cela peut être le cas durant la phase de croissance, la restauration de la diversité génétique nécessitera un grand nombre de générations sans que les populations ne subissent de nouveaux effondrements démographiques (Hedrick, 2005). Par conséquent, dans le cas de populations isolées, la récurrence des « crashes » démographiques avec une périodicité inférieure à 15 générations devrait conduire à long terme à un affaissement de la diversité génétique, et donc altérer le potentiel adaptatif et évolutif des populations (Hedrick et al., 1992 ; Mills et Smouse, 1994 ; Frankham, 1995a ; 1995b ; Newman et Pilson, 1997). Ehrich et Jorde (2005) ont illustré ce phénomène par des simulations. Leurs résultats montrent que dans le cas de populations isolées (qui ne reçoivent pas d'immigrants), la diversité génétique est perdue extrêmement rapidement. En contradiction avec ces attendus, de nombreuses études empiriques ont montré que les populations cycliques de rongeurs étaient généralement caractérisées par des niveaux de variabilité génétique élevés (Berthier et al. 2006; Ehrich & Jorde 2005; Ehrich et al. 2001a; Ehrich et al. 2001b; Ehrich & Stenseth 2001; Plante et al. 1989).

Les flux géniques peuvent prévenir et/ou restaurer la perte de variabilité génétique suite à un goulot d'étranglement (Hedrick 2005). D'un point de vue théorique, il semble qu'un seul migrant efficace par génération suffit à prévenir les effets de la dérive génétique dans les populations (Wang 2004). La quantité de variabilité maintenue dans les populations dépend du degré de diversification entre les populations échangeant des migrants et de l'intensité des flux de gènes (du nombre d'immigrants efficaces). Ehrich et Jorde (2005) ont illustré l'importance de la migration dans le maintien de la variabilité génétique à long terme dans les populations soumises à des fluctuations périodiques d'abondance. Leurs simulations montrent qu'un nombre limité d'immigrants par génération à partir d'une population source moyennement diversifiée suffit pour que la diversité dans les populations fluctuantes atteigne une valeur d'équilibre. Dans une approche empirique Berthier et al. (2006) montrent que le rétablissement du flux génique en phase de croissance démographique permet de compenser la perte locale de diversité génétique, conséquence des effets de la dérive génétique lors des périodes de faible densité. Ces travaux mettent en avant l'importance de la dispersion pour le maintien de la variabilité génétique dans les systèmes cycliques.

Dans un modèle de métapopulation l'intensité du flux génique dépend de la dispersion efficace entre les populations locales et/ou lors des recolonisations de demeures éteintes (Whitlock 2001). L'impact des processus d'extinction recolonisation sur la structure génétique est fortement lié au mode de formation des nouvelles colonies (Slatkin 1987; Wade & McCauley 1988; Whitlock & McCauley 1990). Lorsque les individus qui colonisent un nouveau dème sont issus de la même population locale (modèle de « propagule pool », Slatkin 1977) ou de populations génétiquement proches, la migration ne peut pas contrebalancer les effets de la dérive et la structure génétique est

renforcée (Pannell & Charlesworth 2000; Wade & McCauley 1988; Whitlock 1992). Cette situation est très probable dans le cas où les capacités de dispersion de l'espèce sont restreintes dans l'espace (Wade & McCauley 1988). Si les migrants sont issus au hasard de l'ensemble des populations locales (modèle dit « migrant pool », Slatkin 1977) la structure génétique peut être renforcée ou réduite en fonction du nombre de colonisateurs. Si celui-ci est faible, la dérive génétique peut être plus importante que les flux de gènes et induire de la différenciation. *A contrario*, s'il est élevé, les flux de gènes peuvent contrebalancer l'effet de la dérive et ainsi réduire le degré de différenciation. L'estimation de la différenciation au sein d'une métapopulation fournit donc des informations sur les événements démographiques sous-jacents et sur les modalités de dispersion.

Encadré 1 Fluctuations cycliques d'abondances

De nombreuses populations naturelles présentent d'importantes variations temporelles de leurs effectifs. Ces changements drastiques de la taille des populations ont longtemps intrigué. De nombreux écrits historiques relatent ainsi les effets dévastateurs de nuées de criquets ou la prolifération inopinée de certains rongeurs. De même, les invasions soudaines de lemmings, font partie intégrante du folklore nordique (Stenseth & Ims 1993; Turchin 2003). L'intérêt scientifique pour ces populations à dynamique instable débute avec les travaux de Charles Elton qui fut le premier à décrire et à s'interroger sur les fluctuations périodiques d'abondance de certaines populations notamment chez les petits mammifères (Elton 1924; Lenormand 2002; Nathan 2001; Ronce 2007). Le caractère régulier des fluctuations, avec une période supérieure à un an entre les pics d'abondance, permet de discriminer les fluctuations cycliques des simples variations saisonnières et des fluctuations de densité anarchiques ou épisodiques (Stenseth 1999). Les écologistes n'ont de cesse de s'interroger sur les causes possibles de ces fluctuations pluriannuelles. Batzli (1992) référence pas moins de 22 hypothèses différentes pour expliquer la dynamique cyclique de certaines populations. Plus de 80 ans après les travaux d'Elton le débat est toujours vif autour de questions fondamentales telles que : Quels mécanismes écologiques génèrent ces fluctuations cycliques ? Ces mécanismes sont-ils communs à toutes les populations cycliques ? La compréhension de ces mécanismes permettra-t-elle d'expliquer pourquoi certaines populations cyclent et d'autres non ? (Hudson & Bjornstad 2003; Ims & Yoccoz 1997). Récemment ces questions ont pris un nouveau relief avec le déclin des cycles constaté en Europe sur un nombre important de taxons (Ims et al. 2008)

Aujourd'hui 3 hypothèses principales émergent pour rendre compte de la cyclicité : 1) les effets maternels, 2) les effets de la nourriture et 3) ceux des prédateurs spécialistes. Chacune est capable de générer de tels cycles (Inchausti & Ginzburg 1998; Turchin & Hanski 2001), la dernière étant préférée par les auteurs pour les cycles scandinaves. Pour pouvoir générer des oscillations périodiques, ces prédateurs doivent répondre numériquement aux abondances de rongeurs avec un temps de retard. Ce type de prédation existe principalement chez les prédateurs spécialistes sédentaires, tels que la belette *Mustela nivalis* ou l'hermine *Mustela erminea*, alors que des prédateurs généralistes sédentaires ou spécialistes nomades auraient un effet stabilisant sur la dynamique de leur proies (Turchin & Hanski 2001).

Une autre caractéristique de la dynamique des populations de rongeurs est la synchronie (Liebhold et al. 2004) qui peut être observée sur de grandes distances (Bjornstad et al. 1999b). Cette propriété est pratiquement une règle dans les dynamiques cycliques, aussi bien dans les modèles théoriques (Bjornstad 2000; Bjornstad et al. 1999a) que dans la nature (Angerbjorn et al. 2001). La relation entre cyclicité et synchronisme est forte mais n'est pas particulièrement claire (Bjornstad 2000; Haydon & Steen 1997; Lundberg et al. 2000). L'idée ancienne selon laquelle les processus responsables des deux phénomènes étaient identiques a été démentie par Moran (Bjornstad et al. 1999b; Moran 1953). Celui-ci a montré que des populations ayant une structure de densité-dépendance commune peuvent être synchronisées par des événements densité-indépendants autocorrélés à large échelle, comme les fluctuations climatiques (Benton et al. 2001; Koenig 2002). Outre l'effet Moran, 1) la dispersion et 2) les prédateurs nomades ont été proposés pour expliquer le synchronisme à des échelles plus modestes, de quelques dizaines de km (Bjornstad et al. 1999b; Ims & Andreassen 2000).

Lorsque l'on se place dans un modèle d'IBD dans une population continue, l'impact des fluctuations spatiales et temporelles des effectifs sur l'estimation des flux de gènes, via le produit dérivé $D_E \sigma^2$, apparaît relativement faible quand ces fluctuations ne sont ni trop importantes ni trop récentes (> 20 à 50 générations dans le passé) (Leblois et al. 2004). La mémoire génétique par rapport aux goulets d'étranglement et aux explosions démographiques n'est pas identique. Ainsi, les explosions démographiques constitueraient les changements qui entraînent le biais le plus important avec une sous-estimation du produit $D\sigma^2$; on sous-estime l'augmentation récente des densités. Dans le but d'estimer les paramètres de dispersion, sous l'hypothèse d'un modèle d'IBD en population continue et de possibles fluctuations démographiques, il semble important : 1) d'utiliser des marqueurs moléculaires fortement polymorphes (*e.g.* microsatellites) ; 2) d'effectuer un échantillonnage à une échelle spatiale cohérente avec la valeur de σ (avec les capacités de dispersion de l'espèce considérée) et 3) de se placer au sein d'une zone où les densités apparaissent relativement homogènes (Leblois et al. 2004).

V.2 Le campagnol des champs, *Microtus arvalis*

De part ses pullulations récurrentes, le campagnol des champs est toujours considéré comme un ravageur des cultures. Pourtant, il est depuis peu également au centre de problématiques de conservation de la biodiversité en tant qu'élément clef à la base de certains réseaux trophiques des agro-écosystèmes. Ainsi, dans l'Ouest de la France, le Busard cendré *Circus pygargus*, oiseau à forte valeur patrimoniale, et prédateur spécialisé du campagnol des champs, se trouve directement limité par la présence du campagnol dans une relation que l'on peut qualifier de bottom-up (Millon & Bretagnolle 2005). Ce constat souligne l'intérêt de comprendre le fonctionnement des populations de Campagnol des champs dans un contexte de conservation autant que dans un contexte de lutte intégrée. Dans l'Ouest de la France, l'abondance de ce rongeur est soumise à d'importantes fluctuations interannuelles formant des cycles d'une périodicité de 3 ans (Butet & Leroux 1993; Lambin et al. 2006).

Le campagnol des champs est probablement le mammifère le plus abondant d'Europe avec une distribution continue de la cote ouest de la France au centre de la Russie (Mitchell-Jones et al. 1999). Sa répartition est limitée aussi bien au nord qu'au sud par l'effet du climat. La limite septentrionale se calque relativement bien sur l'isotherme 16° de juillet. Il est ainsi absent en Scandinavie et en Grande-Bretagne. La limite méridionale coïncide avec la limite de la zone d'aridité estivale (région méditerranéenne) ou permanente (zones arides du sud de la Russie).



Photo 1 : Le campagnol des champs, *Microtus arvalis*. Son pelage est brun-gris au dessus et gris à gris jaunâtre au dessous mais il n'y a pas de limite nette.

Le campagnol des champs a un corps trapu et arrondi. A l'âge adulte, la longueur de la tête et du corps varie entre 9 à 13 cm, la queue de 3 à 4,5 cm pour un poids 18 à 45 g. Cette espèce est remarquable par son cycle de vie extrêmement rapide. En effet, la maturité sexuelle est atteinte au bout de 30 jours pour les mâles et des femelles âgées de seulement 3 semaines peuvent être gestantes. La gestation dure de 19 à 21 jours. On peut compter 3 à 4 portées annuelles de 8 petits (2 à 12). Les jeunes sont sevrés au bout de 20 jours. Enfin, sa durée de vie n'excède pas 19 mois. La saison de reproduction varie en fonction de la latitude et du climat. Lorsque les conditions climatiques le permettent (hivers doux), il peut se reproduire tout au long de l'année (Le Louarn & Quéré 2003).

Le Campagnol des champs est diurne et nocturne, surtout en été. Son régime alimentaire est omnivore essentiellement composé de luzerne, d'herbes, de céréales, de racines des plantes cultivées et sauvages et parfois d'insectes. Ostfeld (1985) montre que la distribution de la nourriture est le facteur qui influence le plus la distribution spatiale des femelles.

Celles ci vivent groupées en colonies dans des galeries souterraines creusées à faible profondeur avec de nombreuses ouvertures béantes reliées en surface par des coulées tandis que les mâles sont plus probablement solitaires (Dobly & Rozenfeld 2000). Le domaine vital s'étend jusqu'à 1500 m² pour les mâles et environ 350 m² pour les femelles mais varie en fonction du milieu. Il est plus petit dans des milieux riches ou caractérisés par un couvert faible et donc des risques de prédation importants et, inversement, est plus grand lorsque les ressources sont moins importantes ou le couvert plus important.

De nombreuses études expérimentales, souvent en laboratoire, se sont intéressées aux comportements sociaux de ce rongeur. Dobly (2005) montre que seules les femelles marquent leur

territoire pour le défendre. Dans une autre étude, Haise et Rozenfeld (2002) montrent que les jeunes femelles ont tendance à rester avec leur mère et pourraient ainsi décaler leur propre reproduction. A contrario, d'autres études menées en laboratoire indiquent que la formation de groupes familiaux incluant les mêmes mâles et femelles sur de longues périodes sont possibles tout comme la participation des mâles à l'élevage des jeunes (Gromov 2005). L'existence de couples stables est toutefois considérée comme rare dans cette espèce et n'a pas été vérifiée dans la nature. Des comportements agressifs des mâles adultes envers les sub-adultes, particulièrement les jeunes mâles, semble être à l'origine de la dispersion natale de ces derniers (Gromov 2005).

Plus que les habitats, c'est le type de paysage qui semble conditionner la présence du campagnol des champs (Le Louarn & Quéré 2003). Il aime particulièrement les zones d'openfield où les réseaux de haies sont peu importants et où beaucoup de surfaces agricoles sont vouées à la prairie naturelle. Il colonise toutefois les champs cultivés et les prairies temporaires mais l'agriculture intensive pourrait lui être défavorable (Butet & Leroux 2001; Jacob 2003a; Jacob 2003b; Le Louarn & Quéré 2003). Il affectionne les prairies pâturées (herbes rases), les digues et les talus enherbés, les champs de luzerne, les polders. Il abonde dans les régions de grande culture. En revanche, il évite les prairies très humides et les grandes herbes. Des études suggèrent que la proportion de milieux pérennes a un effet sur sa dynamique (Raoul et al. 2001), même si la relation est peut-être indirecte, à travers les communautés de prédateurs présents.

De nombreuses populations de campagnol des champs sont caractérisées par des fluctuations périodiques d'abondances. L'analyse de 29 séries temporelles d'Europe de l'est indique qu'il existe un gradient latitudinal de l'intensité des cycles chez cette espèce (Tkadlec & Stenseth 2001). Les populations les plus stables sont au nord et les plus fluctuantes et cycliques au sud. Ce patron suggère un effet de la saisonnalité sur l'existence et l'intensité des cycles.

V.3 La dispersion chez le campagnol des champs

La dispersion natale des femelles chez le campagnol des champs pourrait être systématique et a été observée de 50 à 160 m environ (Boyce & Boyce 1988b). Par des approches expérimentales Dobly et Rozenfeld (2000) montrent que de jeunes femelles immatures et non apparentées peuvent rapidement s'associer et fonder de nouveaux groupes coloniaux. La dispersion des femelles reproductrices s'effectue à de plus courtes distances et est beaucoup plus rare. Elle n'a été notée qu'à forte densité et pour des femelles solitaires. Elle peut toutefois atteindre 500 m et être répétée plusieurs fois (Boyce & Boyce 1988a). A notre connaissance peu d'informations sont disponibles sur la dispersion des mâles dans cette espèce. Une étude de phylogéographie indique cependant que la dispersion serait biaisée vers les mâles dans cette espèce (Hamilton et al. 2005). Paradoxalement

dans une autre étude génétique, réalisée à fine échelle spatiale, les auteurs ne trouvent aucune différence entre les patrons de dispersion des mâles et des femelles (Schweizer et al. 2007). Dans cette étude basée sur des populations définies *a priori*, les auteurs suggèrent que la structuration génétique mise en évidence à très fine échelle spatiale (0.4 à 2.5 km) est le résultat d'une faible dispersion efficace et de structures sociales.

Influence des pratiques agricoles. Les pratiques agricoles ont un effet considérable sur les populations de campagnol des champs. En particulier, le labour détruit la quasi-totalité de la population (Jacob 2003b). D'autres pratiques telles que la fauche ou la moisson éliminent une forte proportion de dispersant, isolent les patches d'habitat favorables et réduisent les déplacements probablement par augmentation du risque de prédation (Jacob 2003b; Johannesen et al. 2000). D'autres études suggèrent au contraire que ces pratiques provoquent artificiellement une part d'émigration vers les parcelles voisines (Boyce & Boyce 1988b). Dans certains systèmes peu intensifs, l'effet des pratiques agricoles n'est pas mentionné (Huitu, Norrdahl, & Korpimäki 2004), mais il est difficile de savoir s'il était faible ou juste ignoré dans l'étude. Dans les systèmes agricoles où la surface labourée annuellement dépasse les 80%, l'impact de ces pratiques sur la cyclicité le synchronisme et la distribution spatiale des populations est mal connu. Aucune étude théorique, à notre connaissance, ne prédit l'effet d'évènements de mortalité catastrophiques, saisonniers, et vraisemblablement densité-indépendants comme les pratiques agricoles, sur la cyclicité.

V.4 Dynamique des populations du campagnol des champs sur le site d'étude de Chizé

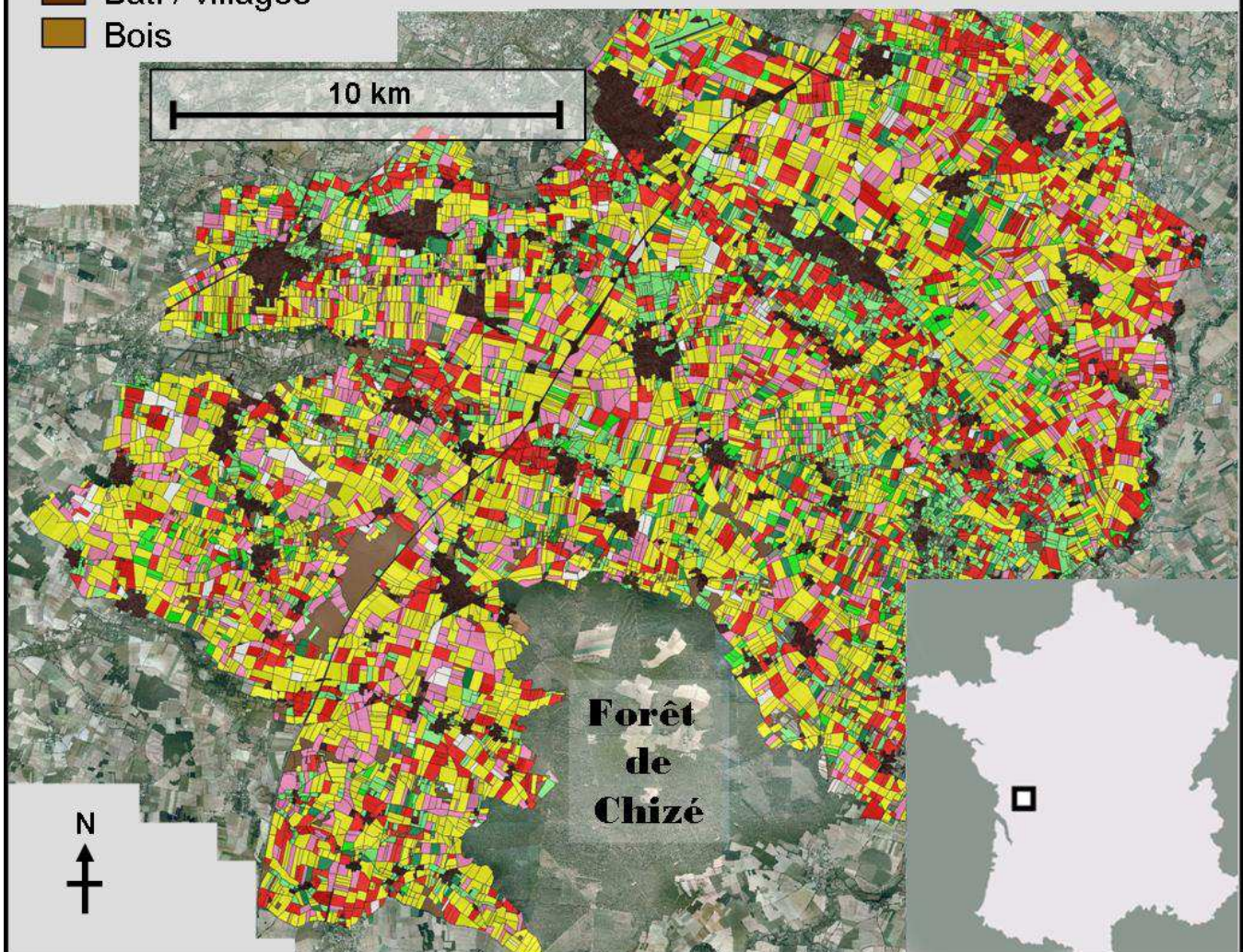
Le site d'étude : la plaine céréalière de Chizé. C'est dans le sud des Deux-Sèvres qu'est située la zone d'étude sur laquelle ces travaux de thèse ont été réalisés. Il s'agit d'une plaine cultivée en céréales, maïs, tournesol, petit pois et colza essentiellement, dans laquelle l'élevage (bovins, caprins) est encore présent mais en diminution. Les parcelles sont encore de taille moyenne (3 ha) mais en cours d'agrandissement. Sur ce site d'étude, les prairies permanentes et semi-pérennes ne représentent plus que 10 % des surfaces cultivées contre 60 % en 1970. Elles ont donc accusé une réduction très importante de leur surface au cours des vingt dernières années.

La répartition des différentes cultures reste cependant très hétérogène sur l'ensemble de la zone d'étude. En effet, bien que le paysage soit composé d'une matrice dominée par les céréales, il existe des zones où les autres cultures prennent plus d'importance. Ainsi, la pression de remembrement n'a pas été partout la même, il reste des zones, en général à proximité des villages



- Céréale
- Colza
- Maïs / Tournesol
- Ray-grass
- Luzerne
- Prairie
- Bâti / villages
- Bois

Encadré 2 : le site d'étude de Chizé,
avec l'assolement de l'année 2006
indiquant les 6 principaux types de cultures.



où la biodiversité est plus importante. L'intérêt de ce site d'étude réside dans sa taille (près de 500 km², 13000 parcelles agricoles) et son suivi. Tous les ans, l'assolement est en effet relevé et reporté sur un système d'information géographique (SIG) permettant une connaissance qualitative à la fois dans l'espace et dans le temps de l'ensemble de la zone d'étude (Encadré 2).

Dynamique des populations et patrons spatiaux d'abondance. Le suivi de la dynamique des populations du Campagnol des champs réalisé depuis 1995 sur la zone d'étude de Chizé indique que cette population suit un cycle de 3 ans (Lambin et al. 2001, Figure 1). Butet et Leroux (2001) constatent une corrélation négative entre l'amplitude des cycles de *Microtus arvalis* dans les marais de l'Ouest de la France et l'intensification de l'agriculture (conversion de prairies naturelles en céréales). Sur le site d'étude de Chizé, une diminution de l'intensité des pullulations est observée depuis 2002, celle-ci coïncide avec un démarrage plus tardif des pullulations. D'autre part, l'année 2007 qui théoriquement devait être une année de faible densité a vu une pullulation de campagnol des champs tardive (démarrage en juin) qui a remplacé le pic de pullulation attendu en 2008.

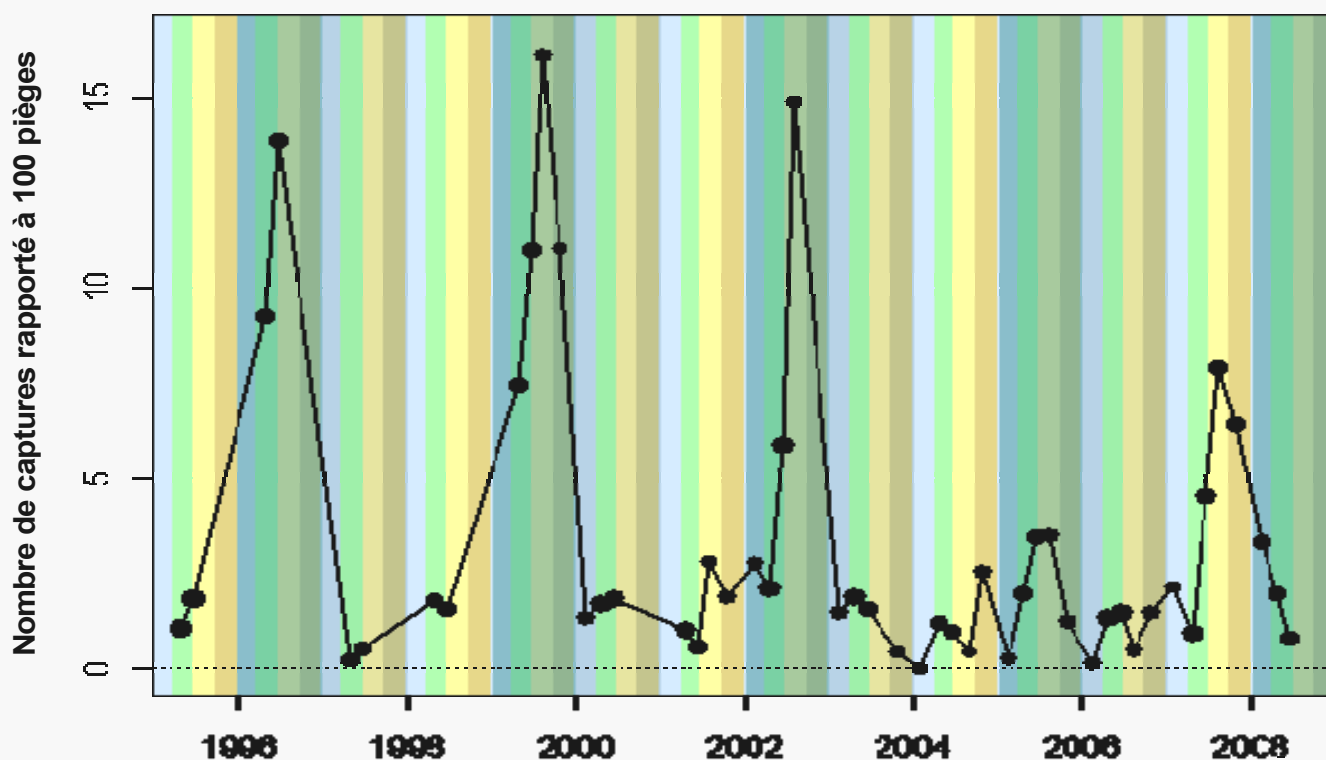
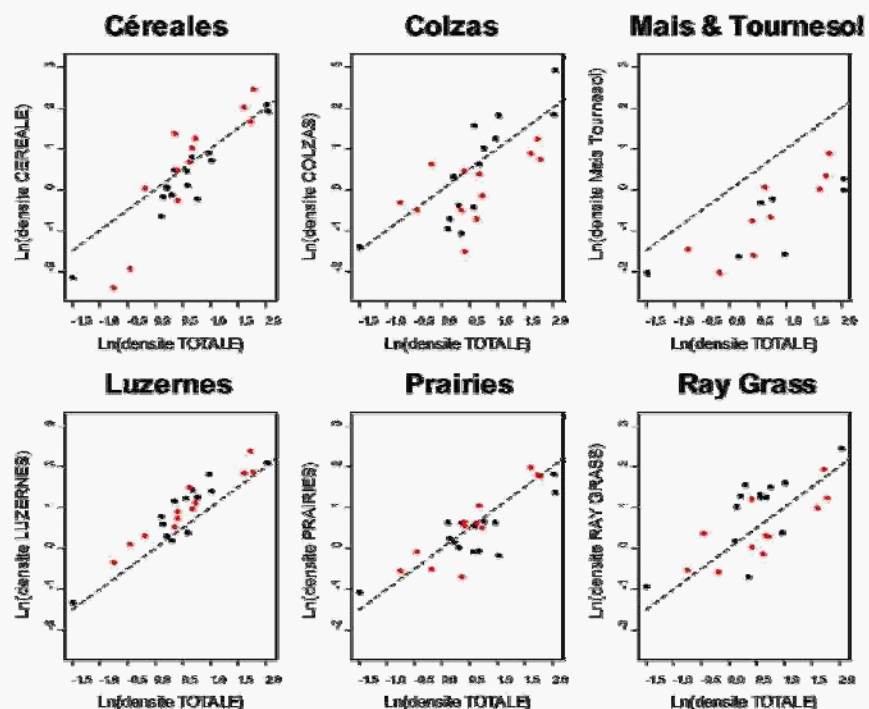


Figure 1 : Série temporelle d'abondance de campagnol des champs sur le site d'étude de Chizé. Pour chacun des principaux types de culture la moyenne du nombre de captures (ramenée à 100 pièges) des parcelles piégées est calculée. Chaque point sur la figure correspond à la moyenne de ces moyennes par type de culture.

L'étude couplée de l'abondance du campagnol des champs et de sa distribution spatiale (de Cornulier 2005) a mis en évidence une grande hétérogénéité des patrons d'abondance, à des échelles spatiales imbriquées. Une synchronie des cycles est observée à l'échelle de la zone d'étude et, au-delà, à une échelle régionale (Lambin et al. 2001). Pourtant, à l'échelle fine des parcelles, l'hétérogénéité des habitats et les perturbations causées par les pratiques agricoles suppriment toute dépendance spatiale. Il est en effet peu probable que ce soit l'absence d'une dispersion active entre les différents milieux de ce système la cause de l'absence apparente d'interconnexion entre les milieux.

L'analyse générale des variations d'abondance du campagnol des champs révèle que la principale source de variation est temporelle, avec une composante interannuelle prédominante qui correspond aux cycles, et une composante saisonnière moins marquée (de Cornulier 2005). Ensuite le type de culture représente le facteur le plus important au sein d'une année. Les densités maximales de campagnols des champs lors des pullulations se trouvent en règle générale dans les céréales luzernes et colzas. Ce sont plutôt les cultures pérennes : le ray-grass la luzerne, et les prairies qui hébergent les plus fortes concentrations en périodes de faibles densités (Figure 2). Cela va dans le sens d'un effet refuge (Jacob 2003a) pour les campagnols sans toutefois constituer une preuve forte. D'autre part, aucun effet de la distance à ces milieux n'a été détecté, suggérant que les parcelles pérennes ne sont pas la source principale de recolonisation des cultures annuelles. Il est possible par exemple que la fraction survivante des

Figure 2 : Densité de campagnol des champs pour chacun des principaux types de culture en fonction de la densité totale sur la zone d'étude (échelle log). Chaque point représente une session de piégeage « annuelle » (soit 90 parcelles au total). En noir les sessions d'Avril et en rouge les sessions de Juin. La ligne pointillée indique la densité moyenne sur toutes les cultures.



populations soit suffisante à la recolonisation ou, plus probablement que celle-ci ait lieu à partir des bordures enherbées des parcelles. Enfin, la hauteur de végétation a un effet positif sur le taux de capture, mais différent en fonction des cultures. Cet effet est plus marqué dans les cultures fourragères : luzerne, ray-grass et prairies.

D'après la taille typique des parcelles sur le site d'étude de Chizé, les distances de dispersion natale mentionnées précédemment permettent généralement au mieux d'atteindre les parcelles immédiatement limitrophes à la parcelle d'origine, voire les parcelles adjacentes d'un ordre 2 ou 3. Dans ces milieux agricoles intensifs, les patches d'habitats peu perturbés, tels que les cultures fourragères à rotation pluriannuelle et les prairies pourraient avoir un effet important (e.g. refuge) dans la dynamique générale, et pourraient donc structurer la distribution des campagnols.

VI) Objectifs de la thèse

Cette thèse a pour objectif de décrire la dispersion et ses déterminants à travers l'étude d'une population cyclique de campagnols des champs dans un paysage agricole extrêmement perturbé et hétérogène. Nous avons employé des approches de génétique des populations afin de caractériser l'influence du paysage et de la démographie sur les flux géniques pour comprendre le rôle de la dispersion dans le fonctionnement de cette population.

Peu d'études se sont intéressées aux flux géniques et à la dispersion dans les agro-écosystèmes, particulièrement pour des espèces animales directement inféodées aux habitats agricoles. Les milieux agricoles sont en effet le plus souvent vu comme une matrice défavorable qui isole les patches d'habitat « naturel » (Coulon et al. 2004; Coulon et al. 2006).

Les concepts et méthodes utilisés sont ceux de la génétique des populations, dont le but est de comprendre les forces qui déterminent l'évolution biologique (Wright 1931) : Parmi ces forces micro-évolutives la dispersion tient une place majeure. Les approches individus-centrées pour lesquelles il n'y a aucun a priori sur l'organisation spatiale des individus ont été privilégiées dans cette thèse.

Ce manuscrit est organisé en 3 parties : 1) La caractérisation de la structure génétique dans l'espace et la détermination de l'influence du paysage sur les flux géniques par des approches de génétique paysagère. 2) A une échelle beaucoup plus fine nous nous sommes intéressé à l'organisation sociale et au système d'appariement, et leur conséquences sur l'évolution de la dispersion, notamment en termes de biais entre les sexes. 3) Enfin, dans la troisième partie de ce manuscrit nous avons étudié l'influence de la dynamique cyclique, et à travers elle de la densité, sur les patrons génétiques et la dispersion.

PRINCIPAUX RESULTATS

I) Structure génétique spatiale : influence du paysage sur les flux géniques

ARTICLE 1 : **Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis***

B. Gauffre, M. Galan, V. Bretagnolle and J.F. Cosson.

Molecular Ecology Notes 2007 7, 830-832.

We isolated and characterized 14 dinucleotide microsatellite loci in the common vole *Microtus arvalis* (Palas). Two multiplex panels both comprising seven loci were developed. Application to a set of 21 individuals allowed clear and easy characterization of allele sizes except for one locus which was then withdrawn from further analyses. The number of alleles ranged from 4 to 19 per locus with the observed heterozygosity ranging from 0.55 to 0.95. These sets of microsatellite loci provide high throughput capacity for population genetic studies at a minimum cost.

ARTICLE 2 : **Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape**

B. Gauffre, A. Estoup, V. Bretagnolle and J.F. Cosson.

Molecular Ecology 2008 17, 4619-4629.

Gene flow in natural populations may be strongly influenced by landscape features. The integration of landscape characteristics in population genetic studies may thus improve our understanding of population functioning. In this study, we investigated the population genetic structure and gene flow pattern for the common vole, *Microtus arvalis*, in a heterogeneous landscape characterised by strong spatial and temporal variation. The studied area is an intensive agricultural zone of approximately 500 km² crossed by a motorway. We used individual-based Bayesian methods to define the number of population units and their spatial borders without prior delimitation of such units. Unexpectedly, we determined a single genetic unit that covered the entire area studied. In particular, the motorway considered as a likely barrier to dispersal was not associated with any spatial genetic discontinuity. Using computer simulations, we demonstrated that recent anthropogenic barriers to effective dispersal are difficult to detect through analysis of genetic variation for species with large effective population sizes. We observed a slight, but significant, pattern of isolation-by-distance over the whole study site. Spatial autocorrelation analyses detected genetic structuring on a local scale, most probably due to the social organization of the study species. Overall, our analysis suggests intense small-scale dispersal associated with a large effective population size. High dispersal rates may be imposed by the strong spatiotemporal heterogeneity of habitat quality, which characterizes intensive agroecosystems.

I.1 Contexte

Déterminer le nombre d'unités populationnelles et leurs limites spatiales est un pré-requis indispensable dans la gestion ou la conservation des espèces (Frankham 1995). L'enjeu majeur de l'étude de l'organisation spatiale des populations réside dans la détection de barrières à la dispersion et dans l'identification des contraintes environnementales qui régulent les flux géniques dans, ou entre les populations. Des outils développés récemment avec l'émergence de la génétique paysagère (Manel et al. 2003) permettent aujourd'hui de réaliser des inférences précises sur le nombre d'unités populationnelles et les éléments paysagers ou environnementaux qui les délimitent (Francois et al. 2006; Guillot et al. 2005a). Ces approches individu-centrées permettent de s'affranchir de la définition et de l'échantillonnage *a priori* de populations contrastant ainsi avec les approches plus classiques de génétique des populations.

L'organisation spatiale des populations est directement déterminée par la dispersion des individus qui est elle-même influencée par les propriétés et les éléments qui composent un paysage. Les agro-écosystèmes intensifs tels que la plaine céréalière de Chizé sont des paysages très fragmentés caractérisés par une forte instabilité spatio-temporelle. Celle-ci est due aux pratiques agricoles et à l'assolement qui entraînent des altérations plus ou moins importantes des habitats et donc de leur attractivité pour les organismes vivants. Au-delà de l'échelle fine de la mosaïque dynamique des habitats, un paysage est également composé de macro-éléments (i.e. montagnes, routes, fleuves) stables dans le temps et qui, pour une espèce donnée, peuvent constituer autant de barrières aux flux géniques (Coulon et al. 2006; Gerlach & Musolf 2000; Millions & Swanson 2007).

Il est communément admis que les distances de dispersion sont limitées à quelques centaines de mètres chez ce petit rongeur (Boyce & Boyce 1988b; Jacob 2003; Spitz 1977) et qu'en raison de l'effet destructeur du labour (Jacob 2003) sa présence est au moins périodiquement restreinte aux milieux pérennes. L'hétérogénéité des habitats est suspectée de limiter la dispersion (Delattre et al. 1992). De même nous pouvons faire l'hypothèse que les milieux pérennes jouent un rôle de refuge et de réservoir de recolonisation des cultures annuelles suivant une dynamique de métapopulation de type source – puits (Butet & Leroux 2001). Dans le contexte paysager qui caractérise notre site d'étude (Figure 3), on peut donc attendre une structuration génétique à fine échelle spatiale (Schweizer et al. 2007), et d'autre part détecter parmi les différents macroéléments du paysage des barrières aux flux géniques (Coulon et al. 2006).

Toutefois, sur le site d'étude de Chizé le campagnol des champs est présent dans les cultures annuelles (Tableau 1) (Salamolard et al. 2000) et cela assez rapidement après les semis et jusqu'aux labours qui détruiront les colonies. Ainsi, si la disponibilité temporaire de ces habitats

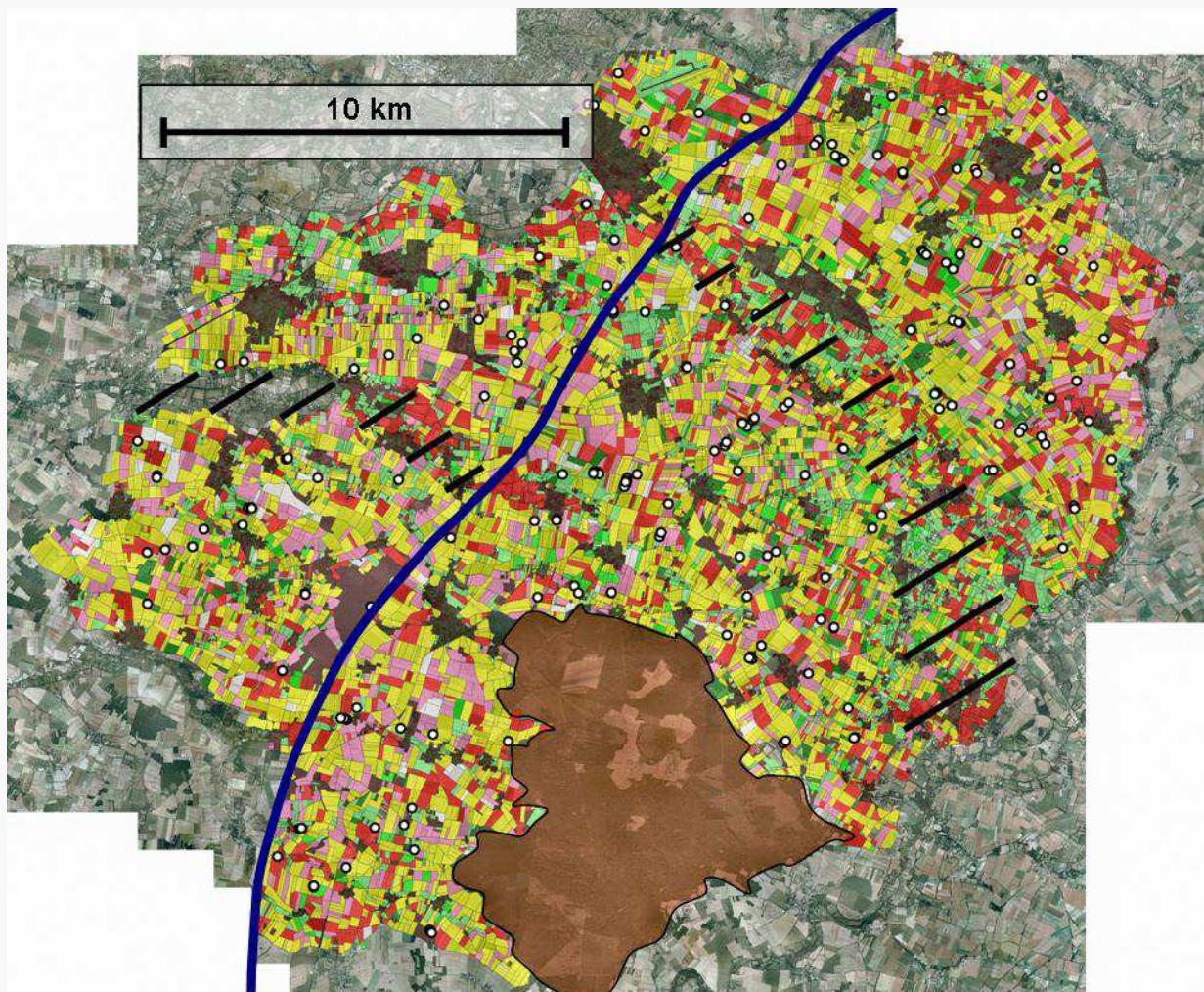


Figure 3, Study site of Chizé, located in the region Poitou Charentes, Western France in springs 2006. Dots correspond to sampling locations (mean = 1.9 common voles per location). A total of 372 voles were trapped in 193 different sampling locations. The blue line indicates the motorway path and the dashed areas correspond to hedged farmlands.

Table 1: Characteristics and proportion of study surface area covered for the main habitats comprising the agricultural matrix. Common vole abundance is expressed in number of captures per 100 traps.

habitat	percentage of surface	Spring Voles Abundance
Perennial	15	1.45
meadows	12	1.42
alfalfa	3	1.59
annual	73	1.28
Ray grass	3	3.13
cereal crops	40	1.58
colza	12	0.99
maize & sunflower	18	0.24
woodland & build-up	12	# 0

est suffisamment longue pour permettre la reproduction et la mise en place d'un flux génique à travers ces milieux, une dispersion plus équilibrée entre les habitats conduirait à une structuration génétique peu marquée et un patron d'IBD. Dans cette hypothèse, et comme il a déjà été montré chez le campagnol terrestre (Berthier et al. 2005), un patron spatial complexe résultant de la conjonction entre IBD et barrières aux flux de gènes peut être attendu.

L'objectif de cette partie est donc de déterminer comment le campagnol des champs est génétiquement structuré et interconnecté dans un agro-écosystème intensif et d'inférer l'influence des caractéristiques de ce paysage et des éléments qui le composent sur la dispersion de ce rongeur. Pour ce faire nous avons dans un premier temps privilégié un échantillonnage et des traitements individu centrés, sur un jeu de données collecté en 2006 (Figure 3).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu compléter et comparer ces approches individu centrées avec des approches plus classiques, basées sur les F -statistiques, pour décrire la structure génétique du campagnol des champs sur la zone d'étude. En 2007 nous avons donc aussi réalisé des piégeages intensifs dans 13 parcelles pérennes pouvant être désignées comme autant de « populations » (Figure 4). Le piégeage de plusieurs colonies dans chaque parcelle nous a également permis d'adopter des approches de F_{ST} hiérarchisés pour tester la structuration génétique à différents niveaux.

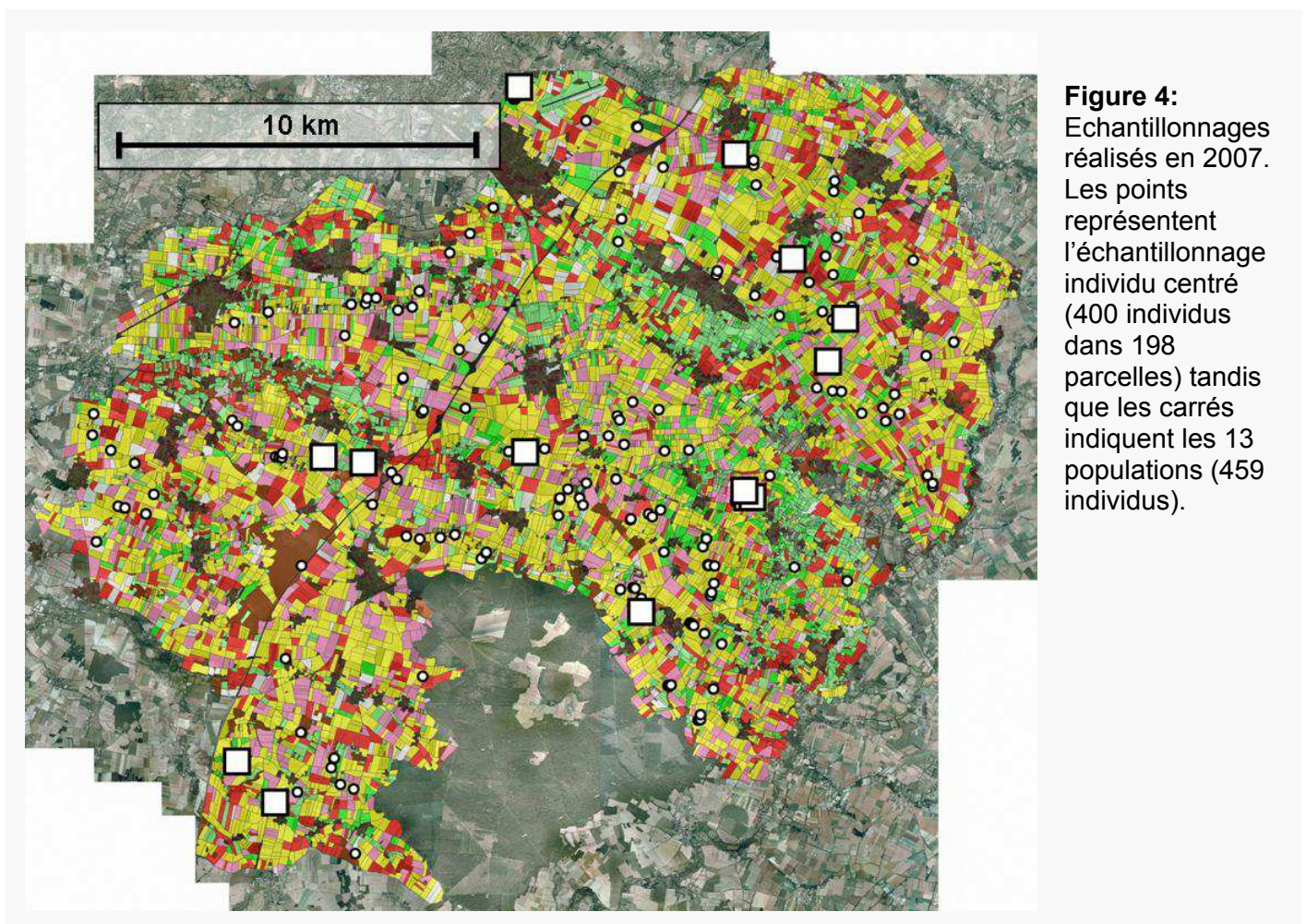


Figure 4: Échantillonnages réalisés en 2007. Les points représentent l'échantillonnage individu centré (400 individus dans 198 parcelles) tandis que les carrés indiquent les 13 populations (459 individus).

I.2 Résultats et discussion

Jeu de données individu centré (2006, manuscrit 1). Sur la base des approches bayésiennes de partitionnement des individus (Francois et al. 2006; Guillot et al. 2005b; Pritchard et al. 2000) nous avons identifié la présence d'un seul groupe, génétiquement homogène, sur les 500 km² de notre site d'étude. Dans le paysage étudié, aucun macroélément, en particulier l'autoroute qui le traverse, n'apparaît constituer une barrière au flux génique. De même les caractéristiques environnementales de cet agro-écosystème (fragmentation de l'habitat et instabilité temporelle) n'entravent pas un flux génique continu à travers cette mosaïque paysagère.

Au regard des distances de dispersion estimées chez ce petit rongeur, cette homogénéité génétique à grande échelle surprend. Notre estimation indirecte (i.e. 88 m pour la distance moyenne parents-progéniture), est comparable aux estimations données dans la littérature. Nous attribuons cette homogénéité génétique à grande échelle à 1) d'importants effectifs efficaces, que nous mesurons indirectement par les forts niveaux d'hétérozygotie ($H_E = 0.88$) et directement par les piégeages (la densité estimée sur le site d'étude est de 10 adultes/ha) et 2) de forts taux de dispersion. Cette interprétation est soutenue par le patron d'isolement par la distance observé sur l'ensemble de la zone d'étude ainsi que par les patrons d'autocorrélation spatiale (figure 5) qui montrent une similarité génétique significative seulement pour de très faibles classes de distances (jusqu'à 2 km). La forte valeur de similarité génétique mesurée dans la première classe de distance suggère la présence de structures sociales (Peakall et al. 2003; Scribner & Chesser 1993).

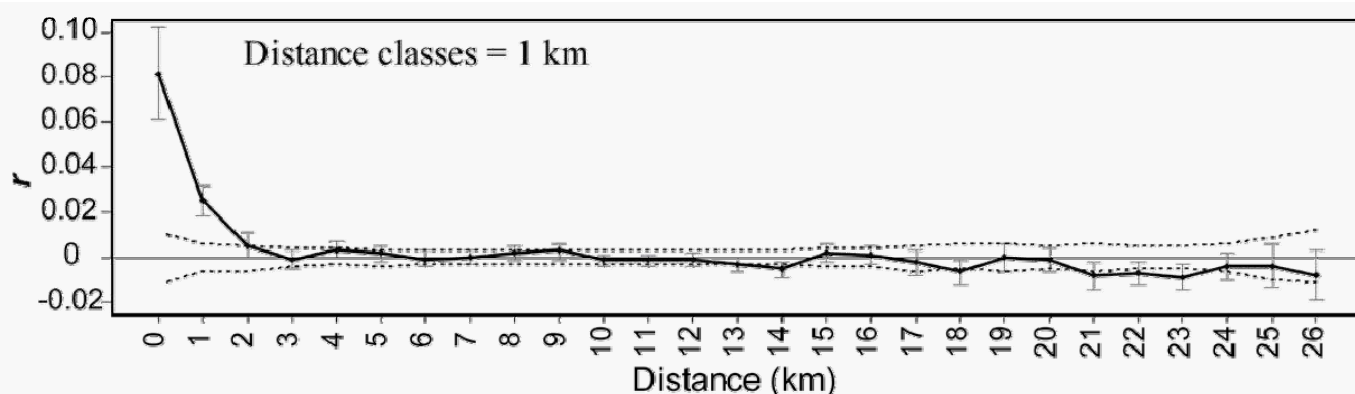


Figure. 5: Correlograms showing the combined genetic correlation (r , Smouse & Peakall 1999) as a function of distance. The first distance class (0 km) represents pairwise comparisons between individuals from the same colony. Envelopes show the estimated 95% CI for the null hypothesis of a random distribution of genotypes determined by 1000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations and error bars bound the 95% CI about r determined by bootstrapping.

Approche populationnelle vs individu centrée (2007). Les 13 « populations » échantillonnées sont caractérisées par de forts niveaux d'hétérozygotie (l'hétérozygotie attendue, H_E , varie entre 0.84 et 0.87) comparable à l'hétérozygotie estimée sur l'ensemble de la zone d'étude avec les piégeages individu centrés ($H_E = 0.87$). Deux de ces 13 « populations » ne sont pas à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (HW) et nous mesurons un déséquilibre global à HW caractérisé par un F_{IS} de 0.018 comparable à celui mesuré par l'approche individu centrée (0.027). Le niveau de différenciation entre ces « populations » est faible (F_{ST} global = 0.017 ± 0.002). Enfin, nous mesurons un patron d'IBD significatif tant avec l'approche populationnelle qu'avec l'approche individu centrée.

Pour tester directement si une structuration sociale dans les colonies est à l'origine d'une structuration génétique à fine échelle spatiale, nous avons considéré deux niveaux hiérarchiques : la colonie et la localité et évalué leur part relative dans l'explication de la variance génétique par un traitement de F_{ST} hiérarchisés (Goudet 2005). Le choix d'utiliser le niveau « colonie » est pertinent car il correspond à la réalité biologique de l'espèce (l'unité de base d'organisation des individus dans l'espace) et permet donc de tester directement l'influence des structures sociales sur la structuration génétique. La parcelle en revanche est l'unité de base d'organisation du paysage. Elle est définie par un milieu et une dynamique temporelle particulier(e) dans la mosaïque d'habitats. Bien que l'effet de ces deux niveaux hiérarchiques soit significatif ($P < 0.001$), la plus grande part de variance est expliquée par le niveau « colonie » (tableau 2). Ce résultat indique que l'organisation sociale de ce petit mammifère est à l'origine d'une structuration génétique marquée à fine échelle spatiale détectée dans cette étude et dans une étude précédente sur le même modèle (Schweizer et al. 2007), et souligne l'importance de tenir compte des structures sociales dans les études de génétique des populations (Sugg et al. 1996).

Var loc	Var col	Var ind	error	$F_{loc/tot}$	$F_{col/loc}$	$F_{ind/col} (F_{IS})$
0.096	0.642	-0.368	8.35	0.011 [0.008-0.014]	0.074 [0.068-0.81]	-0.046 [-0.061- -0.031]

Tableau 2 : Variance components of allelic frequencies and population differentiation estimates overall loci. Ind for individual, col for colonies; Loc for localities and tot for total. Confidence intervals (95%) in brackets.

Des études plus anciennes sur le campagnol des champs suggéraient que dans ces paysages agricoles la dispersion était limitée (Delattre et al. 1996) probablement en raison d'une dynamique de type source-puits entre habitats pérennes et cultures annuelles (Butet & Leroux 2001). Bien que nos résultats ne soient pas directement contradictoires avec ce type de dynamique ils suggèrent néanmoins une importante mobilité entre habitats dans un contexte de grande taille de population. La connectivité et la proximité entre populations ou patches occupés est en effet cruciale dans ces paysages hétérogènes (Gulve 1994). Par ailleurs dans ce type de paysage, les milieux pérennes ne se limitent pas aux prairies et luzernes : les bandes enherbées et bordures de champs ou de routes bien que régulièrement fauchées sont des milieux plus stables que les cultures annuelles. Leur rôle de refuge ou de relais dans le fonctionnement des populations de campagnol des champs, bien que difficile à tester par des approches génétiques, pourrait se révéler tout aussi décisif que celui des cultures pérennes (Briner et al. 2005). Les piégeages réalisés sur le site d'étude de Chizé indiquent que dans ces agro écosystèmes le campagnol des champs est présent dans les cultures d'hivers ou du début du printemps (i.e. céréales et colza) avec des densités comparables aux milieux pérennes. Ces cultures sont ensuite « vidées » par les fauches estivales et surtout par les labours. Nos résultats suggèrent que ces habitats temporaires sont toutefois assez longtemps disponibles pour assurer un flux génique à travers l'ensemble du paysage. Cette hypothèse est soutenue par les caractéristiques du cycle de vie du campagnol : après une courte gestation les individus sont sexuellement mûres en quelques semaines.

Limites des approches génétiques dans la détection de barrières récentes. La zone d'étude de Chizé est traversée par une autoroute, un élément paysager habituellement reconnu pour constituer une barrière à la dispersion et aux flux géniques (Coulon et al. 2006; Epps et al. 2005; Gerlach & Musolf 2000; Keller et al. 2004; Riley et al. 2006). Il apparaît peu probable que la dispersion de ce petit rongeur ne soit pas affectée par cette structure (Orlowski & Nowak 2006). Pourtant nous n'avons pas mis en évidence de rupture de flux de gènes en relation avec cette structure avec les approches bayésiennes de partitionnement des individus. D'autres outils de la génétique paysagère, comme le Wombling, sont spécifiquement dédiés à la détection de ruptures de flux géniques (barbujani & Sokal 1989). Nous avons appliqué ces traitements à notre jeu de données à l'aide du package wombssoft sous **R 2.7.1** (R Development Core Team 2008) sans plus de succès.

Il est en revanche possible que cet élément paysager constitue réellement une barrière à la dispersion mais qu'elle ne puisse pas être détectée pour plusieurs raisons : sa mise en place est trop récente (l'autoroute qui nous intéresse a été construite il y a 25 ans) et/ou les tailles

efficaces de part et d'autre limitent la dérive génétique et donc la mise en place d'une différenciation génétique suffisante de part et d'autre de l'autoroute pour être détectée.

Une approche par simulations informatiques basées sur la théorie de la coalescence nous a permis d'estimer les niveaux de différenciation pour un tel scénario (mise en place d'une barrière hermétique coupant une population ancestrale en 2 sous ensembles) en fonction de ces 2 facteurs : N_E (la taille efficace) et t (temps en nombre de générations depuis la mise en place d'une barrière hermétique).

Les simulations indiquent que même dans le cas extrême d'une complète séparation et isolement de populations caractérisées par des hétérozygoties (et donc des tailles efficaces) proches de celles observées chez le campagnol, de part et d'autre d'une barrière aussi récente que l'autoroute qui traverse la zone d'étude de Chizé, la différenciation entre ces populations serait trop faible pour être détectée, tout au moins avec un nombre de marqueurs microsatellites limité. L'analyse de jeux de données simulés avec les approches bayésiennes de partitionnement des individus confirment ce résultat.

I.3 Conclusion

Nous montrons dans cette étude que la distance est l'unique élément spatial de ce paysage qui limite le flux génique chez le campagnol des champs. Celui-ci n'apparaît pas affecté par la fragmentation des habitats et la dynamique temporelle de cet agro-écosystème. Il semble que la dynamique des populations du campagnol des champs soit assez rapide pour compenser l'effet déstabilisant de la dynamique de perturbation du paysage. Ainsi la disponibilité temporaire de la de certains habitats (i.e. les cultures annuelles dans la mosaïque paysagère) peut être suffisante pour permettre un flux de gène continu et finalement compenser l'apparente fragmentation du paysage (Blaum & Wichmann 2007). De plus, certaines pratiques agricoles comme la fauche pourraient forcer mécaniquement la dispersion des campagnols des champs et ne pas uniquement jouer sur leur survie.

Des patrons génétiques similaires ont été décrits avec des approches méthodologiques différentes (échantillonnage en population ou individu-centré). L'information génétique, lorsqu'elle est résumée au niveau de populations définies *a priori* (sans réalité sous jacente dans le cas du campagnol) n'apparaît pas biaisée par rapport aux traitements plus fins réalisés sans *a priori* sur leur organisation spatiale. Néanmoins son interprétation peut s'avérer plus complexe. En ce sens, il est intéressant de noter qu'une structuration génétique peut dans le cas d'espèces organisées socialement refléter la présence de groupes d'individus apparentés plutôt qu'une limitation du flux génique dans l'espace. Ce travail illustre l'idée que les approches *a priori*

(populationnelles) sont utiles et puissante lorsque l'on a une hypothèse précise à tester. Dans notre étude, l'approche de F_{ST} hiérarchisés nous a permis de confirmer la présence de structures et leur impact sur la structuration génétique à très fine échelle spatiale.

Les simulations informatiques ont été réalisées dans un modèle de population de Wright–Fisher avec donc des hypothèses sous jacentes éloignées de la réalité de cette population continue sous IBD. Toutefois, elles apportent un éclairage intéressant d'un point de vue général, et applicable à notre étude, sur les conditions de mise en place d'une différenciation génétique en relation avec une barrière à la dispersion. Elles montrent les limites des approches génétiques basées sur l'inférence des flux géniques pour la détection de barrières récentes, notamment dans un contexte de grande taille de population.

II) Système d'appariement et évolution de la dispersion biaisée entre les sexes

ARTICLE 3: Sex-biased dispersal patterns depend on the spatial scale in a social rodent

B. Gauffre, E. Petit, S. Brodier, V. Bretagnolle and J. F. Cosson.

Soumis à **Proceedings of the royal society B**

Dispersal is a fundamental process in ecology because it influences the dynamics, genetic structure and persistence of populations. Furthermore, understanding the evolutionary causes of dispersal pattern, particularly when they differ among genders, is still a major question in evolutionary ecology. Using a panel of 10 microsatellite loci, we investigated at different spatial scales the genetic structure and the sex-specific dispersal patterns in the common vole, a colonial small mammal. This study was conducted in an intensive agricultural area of western France. Hierarchical F_{st} analyses, relatedness and assignment tests suggested (1) that females are strongly kin-clustered within colonies and that (2) dispersal is strongly male-biased at a very local scale, while (3) long distance dispersal is not rare and more balanced between genders. We suggest that inbreeding avoidance is likely to be the crucial factor driving male dispersal in this species. Female dispersal appears to be driven by resource competition and most probably leads to the colonization of empty patches. Finally, the large scale of genetic homogeneity observed in this small species may be better understood at the light of these dissimilar dispersal patterns for males and females.

II.1 Contexte

Chez les animaux des biais de dispersion entre les sexes sont fréquemment observés. Par exemple, les mammifères montrent le plus souvent un biais de dispersion en faveur des mâles tandis que chez les oiseaux ce sont les femelles qui généralement dispersent plus (Caizergues & Lambrechts 1999). La probabilité qu'un individu disperse résulte de l'équilibre entre des forces évolutives qui influencent ce comportement (voir introduction). Cet équilibre est lui même directement influencé par l'organisation sociale et le système d'appariement qui vont en fait déterminer la direction du biais de dispersion entre les sexes (Greenwood 1980; Perrin & Goudet 2001).

Greenwood (1980) propose que lorsque les mâles adoptent une stratégie de défense de la ressource, ce qui est généralement le cas chez les oiseaux, la dispersion est biaisée vers les femelles car dans cette stratégie la philopatrie est plus avantageuse pour les mâles. Chez les mammifères en revanche la stratégie dominante est celle d'une compétition des mâles pour l'accès aux femelles. Dans ce cas, la distribution des femelles détermine la dispersion des mâles. Ainsi, les modèles théoriques prédisent donc une dispersion biaisée vers les mâles chez les espèces caractérisées par un système de reproduction polygyne ou de promiscuité (Handley & Perrin 2007), qui est régulièrement vérifié dans les études empiriques (Ji et al. 2001; Williams & Rabenold 2005). La connaissance approfondie de l'organisation sociale et du système d'appariement est donc un pré requis déterminant pour la compréhension des patrons de dispersion biaisés entre les sexes.

Les connaissances actuelles sur l'organisation sociale et le système d'appariement du campagnol des champs indiquent à travers l'observation de groupes de femelles reproductrices dans les colonies un système d'appariement polygyne ou de promiscuité (Boyce & Boyce 1988a) et suggèrent donc une dispersion biaisée vers les mâles qui est généralement la règle chez les espèces du genre *Microtus* (e.g. Aars & Ims 2000). Récemment, une étude phylogéographique du campagnol des champs montre des patrons génétiques congruents avec une dispersion biaisée vers les mâles (Hamilton et al. 2005) mais paradoxalement une autre étude génétique, réalisée à fine échelle spatiale, ne trouve aucune différence entre les patrons de dispersion des mâles et des femelles (Schweizer et al. 2007).

Les recherches empiriques mettent généralement l'accent sur la mise en évidence d'un biais de dispersion entre les sexes plutôt que sur sa quantification. Ces biais peuvent être révélés par différentes techniques qui utilisent soit la comparaison de statistiques estimées à la fois chez les mâles et les femelles (Goudet et al. 2002), soit la comparaison de marqueurs génétiques à différents modes de transmission (Petit et al. 2002). Mais au-delà de différences en terme de

taux de dispersion, les distances de dispersion ou encore le tempo de la dispersion peuvent varier entre les sexes. Plus généralement on peut distinguer deux comportements de dispersion bien distincts : ceux qui conduisent à la colonisation de nouveaux patches d'habitat et ceux qui résultent de la migration entre deux patches déjà occupés par des conspécifiques.

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à la structure d'apparentement entre mâles adultes, femelles adultes et juvéniles dans les colonies dans le but de confirmer ou d'infirmer les connaissances actuelles sur l'organisation sociale chez ce rongeur. Pour ce faire nous avons utilisé différents calculs de probabilités d'apparentement basés sur les fréquences alléliques, dans et entre ces 3 catégories (Tableau 3). Dans un deuxième temps, en utilisant des méthodes directes d'estimation de la dispersion à partir de marqueurs génétiques nous nous sommes attachés à décrire précisément les patrons de dispersion et leurs biais entre les sexes en termes de taux et de distance.

Tableau 3 : A pair of individuals (x and y) can be genetically correlated in two ways. Φ is the probability that a single gene at a locus in x is identical by descent with one in y , and Δ is the probability that both genes in x are identical by descent with those in y . The relatedness between x and y can be expressed as $r = \Phi/2 + \Delta$ (Lynch & Ritland 1999). Here are presented the theoretical values of Φ , Δ and r expected in an outbreeding population for parents and offspring, full-sibs and half-sibs.

	Φ	Δ	r
Parent-offspring	1	0	0.5
Full-sibs	0.5	0.25	0.5
Half-sibs	0.25	0	0.125

II.2 Résultats et discussion

Organisation sociale et système d'appariement. Dans les colonies, les femelles sont très souvent apparentées entre elles et aux juvéniles présents tandis que les mâles ne sont que très rarement apparentés entre eux, aux femelles ou aux juvéniles (Figures 6 et 7). Ce patron indique que dans ce système d'appariement les mâles dispersent presque obligatoirement entre chaque événement de reproduction (dispersion de reproduction). L'immigration de femelles (non apparentées) dans les colonies existantes semble au contraire peu fréquente. La distribution bimodale des apparentements, similaire entre femelles et entre femelles et juvéniles (un mode à 0.5 et un autre légèrement supérieur à 0), montre que les colonies sont composées de femelles apparentées, souvent au premier degré (sœurs ou mères-filles) et de femelles peu ou non apparentées. Cette structure d'apparentement confirme l'organisation des femelles en matriline

(groupes de femelles apparentées coopérant dans l'élevage des jeunes), précédemment suggérée chez le campagnol (Boyce & Boyce 1988a; Boyce & Boyce 1988b). Ce type de structure sociale est répandu chez les mammifères sociaux et les rongeurs (Ishibashi et al. 1997; Johannesen et al. 2000; Pusenius et al. 1998). Dans une telle organisation sociale, les femelles bénéficient de leur coopération pour l'élevage des jeunes (Lambin & Krebs 1993), et pour leur défense en particulier face aux mâles infanticides (Agrell et al. 1998; Ebensperger 1998; Le Galliard et al. 2006). La structure d'apparentement entre juvéniles montre, au contraire de celle des femelles, que ceux-ci sont toujours apparentés entre eux. Ils sont également plus apparentés entre eux qu'aux femelles adultes présentes. Un mécanisme peut rendre compte de cette différence : dans un système polygyne, un mâle qui visite une colonie s'accouple avec plusieurs femelles et ainsi renforce l'apparentement entre les individus de la nouvelle génération qui sinon diminuerait rapidement dans les colonies (entre femelles) au fur et à mesure des générations. Il y aurait ainsi, parmi les juvéniles présents dans la colonie, soit des pleins frères ou sœurs ($r = 0.5$), soit des demi frères ou sœurs ($r = 0.25$ si leurs mères respectives ne sont pas apparentées). En revanche, dans un système de promiscuité, comme décrit chez le campagnol de Pennsylvanie (*Microtus pennsylvanicus*), une espèce américaine écologiquement proche du campagnol des champs, les femelles pourraient activement favoriser la multi-paternité afin d'éviter les mâles infanticides et d'assurer leur reproduction (Berteaux et al. 1999). Dans une telle hypothèse, l'apparentement entre juvéniles devrait être plus faible que l'apparentement entre les femelles adultes et les juvéniles et mode demi-frères ou sœurs ($r = 0.25$) chez les juvéniles devrait être plus important que le mode pleins-frères ou sœurs ($r = 0.5$).

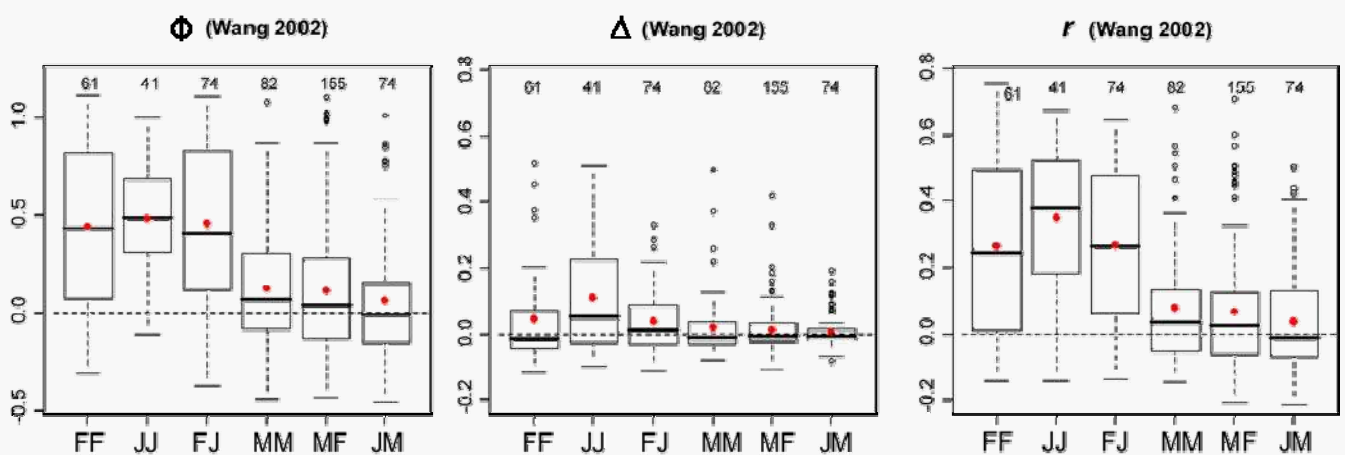


Figure 6 : Boxplots showing pairwise relatedness values (Φ , Δ and r , Wang 2002) among adult females (FF), between adult females and juveniles (FJ), among juveniles (JJ), between adult males and juveniles (MJ), among adult males (MM) and between adult females and adult males (MF) Boxes represent the interquartile range, bars within boxes are median values, whiskers indicate the 10th and 90th percentiles. Red dots indicate mean value. Numbers of pairwise data is also indicated.

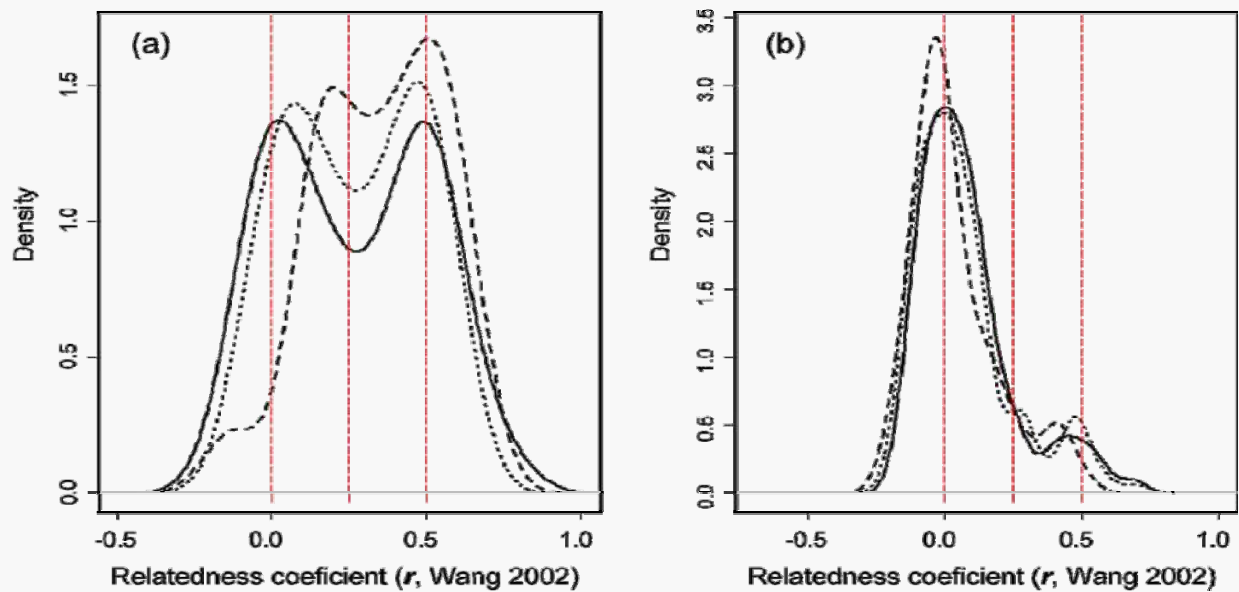


Figure 7. Density plots showing patterns of relatedness **(a)** among females (solid line), among juveniles (dashed line) and between females and juveniles (dotted line) and **(b)** between males (solid line), between males and juveniles (dashed line) and between males and females (dotted line).

Nous disposons d'une quantité importante de femelles gestantes dont nous avons pu extraire les embryons. Connaissant le génotype des mères et ayant accès à celui des embryons nous pouvons déterminer facilement la probabilité d'occurrence effective de multi-paternité dans cette espèce et ainsi trancher entre ces hypothèses et déterminer avec plus de précision le système d'appariement de cette espèce. Il reste possible toutefois que le système d'appariement varie (entre promiscuité et polygynie), au cours du cycle démographique, sous l'effet des importantes variations de densité.

Biais de dispersion entre les sexes. Dans l'hypothèse d'une dispersion biaisée entre les sexes, une structuration génétique plus marquée dans les populations (F_{IS} plus fort) et une plus faible différenciation génétique entre populations (F_{ST} plus faible) sont attendus pour le sexe qui disperse le plus (Goudet et al. 2002). L'analyse de F_{ST} hiérarchisés montre que la différenciation génétique est plus forte pour les mâles entre colonies à l'échelle locale et suggère donc une dispersion biaisée vers les mâles à cette fine échelle spatiale (Tableau 4). De plus, les structures d'apparentement décrites dans les colonies appuient l'hypothèse d'une dispersion biaisée vers les mâles et d'une philopatrie des femelles (ou du moins de leur fidélité à leur premier site de reproduction). Entre localités, la structuration génétique entre les mâles et les femelles n'est pas significativement différente suggérant que la dispersion à plus large échelle est équilibrée entre

les sexes. Ces résultats sont concordants avec une étude précédente réalisée à une échelle spatiale similaire (Schweizer et al. 2007).

Les taux de dispersion à ces différentes échelles spatiales calculés par la comparaison des F_{ST} hiérarchisés estimés sur les adultes (donc après dispersion) aux F_{ST} estimés sur les juvéniles (avant dispersion) (Fontanillas et al. 2004) sont donc globalement biaisés vers les mâles et indiquent des distances de dispersion plus faibles chez les mâles par rapport aux femelles (Tableau 4). D'autre part il apparait que chez les mâles la dispersion est quasiment obligatoire et répétée après chaque évènement de reproduction car ceux-ci ne sont pas apparentés aux juvéniles dans les colonies où ils ont été piégés. En revanche, chez les femelles, la dispersion secondaire semble beaucoup plus rare.

Category	n	Non-hierarchical analysis		Hierarchical analysis			
		F_{ST}	d2	F_{LocTot}	F_{ColLoc}	d2+d1	d1
Juveniles	55	0.047 [0.034-0.058]		0.021 [0.01-0.033]	0.161 [0.129-0.19]		
Males	85	0.027 [0.022-0.034]	0.24 [0.20-0.23]	0.022 [0.017-0.027]	0.036 [0.016-0.062]	0.68 [0.53-1]	0.44 [0.29-0.80]
Females	95	0.025 [0.018-0.033]	0.27 [0.25-0.27]	0.013 [0.004-0.022]	0.085 [0.054-0.113]	0.28 [0.24-0.35]	0.01 [-0.01-0.08]

Table 4. F -statistics and associated dispersal rates in *Microtus arvalis*. In the non hierarchical analysis, F_{ST} quantifies the genetic differentiation among localities. In the hierarchical analysis, F_{LocTot} quantifies the genetic differentiation between localities within the total and F_{ColLoc} the differentiation between colonies within localities. Dispersal rate between localities ($d2$) and total dispersal rate ($d1+d2$), are computed from the non hierarchical and hierarchical sex- and state-specific analyses respectively. Dispersal rate between colonies within localities ($d1$) is derived from the previous estimates. Confidence intervals (95%) are in brackets.

Ces résultats suggèrent que la dispersion chez le campagnol des champs n'a pas les mêmes causes pour les mâles et pour les femelles. En effet, disperser à courte ou longue distance ne résulte pas d'un même mécanisme (Ronce et al. 2001). Il est généralement reconnu que la dispersion à faible distance est suffisante pour éviter la reproduction entre apparentés tandis que la dispersion à plus longue distance permet de coloniser de nouveaux territoires et il est communément admis qu'elle est motivée par la compétition pour la ressource entre apparentés (Lawson Handley & Perrin 2007).

II.3 Conclusion

L'existence de groupes de femelles apparentées a été l'objet d'études expérimentales et théoriques dans le genre *Microtus* (Pusenius et al. 1998) mais la réalité de leur existence dans la nature n'avait jamais été proprement démontrée jusqu'à présent. L'outil génétique s'avère être un moyen très efficace pour décrire l'organisation sociale et faire des inférences sur le système d'appariement dans des espèces coloniales (Ishibashi et al. 1997; Nagy et al. 2007).

Il apparait que chez le campagnol des champs les rôles des mâles et des femelles dans la dispersion sont très différents. Les femelles assurent la colonisation par la fondation de nouvelles colonies tandis que les mâles migrent de façon répétée entre colonies. Dans un tel scénario les femelles assurent la cohésion spatiale de la population et les mâles sa cohésion génétique en entretenant un flux génique important. La complémentarité de ces deux « comportements » de dispersion, et notamment la pression qui s'exerce sur les mâles reproducteurs pour disperser obligatoirement entre chaque événement de reproduction, nous éclaire sur l'absence de forte structuration génétique observée sur l'ensemble du site d'étude.

III) Influence de la densité sur les flux géniques et la dispersion

ARTICLE 4 : Short-term variations in gene flow in a cyclic common vole population

B. Gauffre, T. Cornulier, P. Inchausti, K. Berthier, Y. Chaval, J. F. Cosson and V. Bretagnolle.

En préparation

In populations experiencing demographical changes, gene flow is expected to vary as the result of an unstable balance between the competing processes of genetic drift and migration. The influence of genetic drift would predominate that of migration when population decrease while the reverse would occur during a population increase. Cyclic rodent populations are extreme examples of high demographic instability and then good candidates to test for these general predictions. In this study, the multiannual genetic structure of a cyclic rodent was analyzed using a sample set of 829 common voles trapped over three complete cycles (from 1999 to 2007) and genotyped at 10 microsatellite loci. Gene flow was estimated using genetic diversity and differentiation parameters. We tested the prediction that all genetic parameters vary along time, and that these variations are related with vole densities. Genetic diversities were expected to decrease and genetic differentiation to increase during low numbers, and the reverse was expected during high numbers. Overall the predictions were verified in our dataset with slight but significant temporal variations of all genetic parameters. We conclude that the decrease of gene flow related to genetic drift during low numbers is not fully compensated by eventual change in migration patterns. Symmetrically, gene flow is higher during high numbers, and allows the recovery of genetic diversity as well as the decrease in genetic differentiation. Gene flow analyse do not allow separate estimations for genetic drift and migration because it measures the result of both processes altogether.

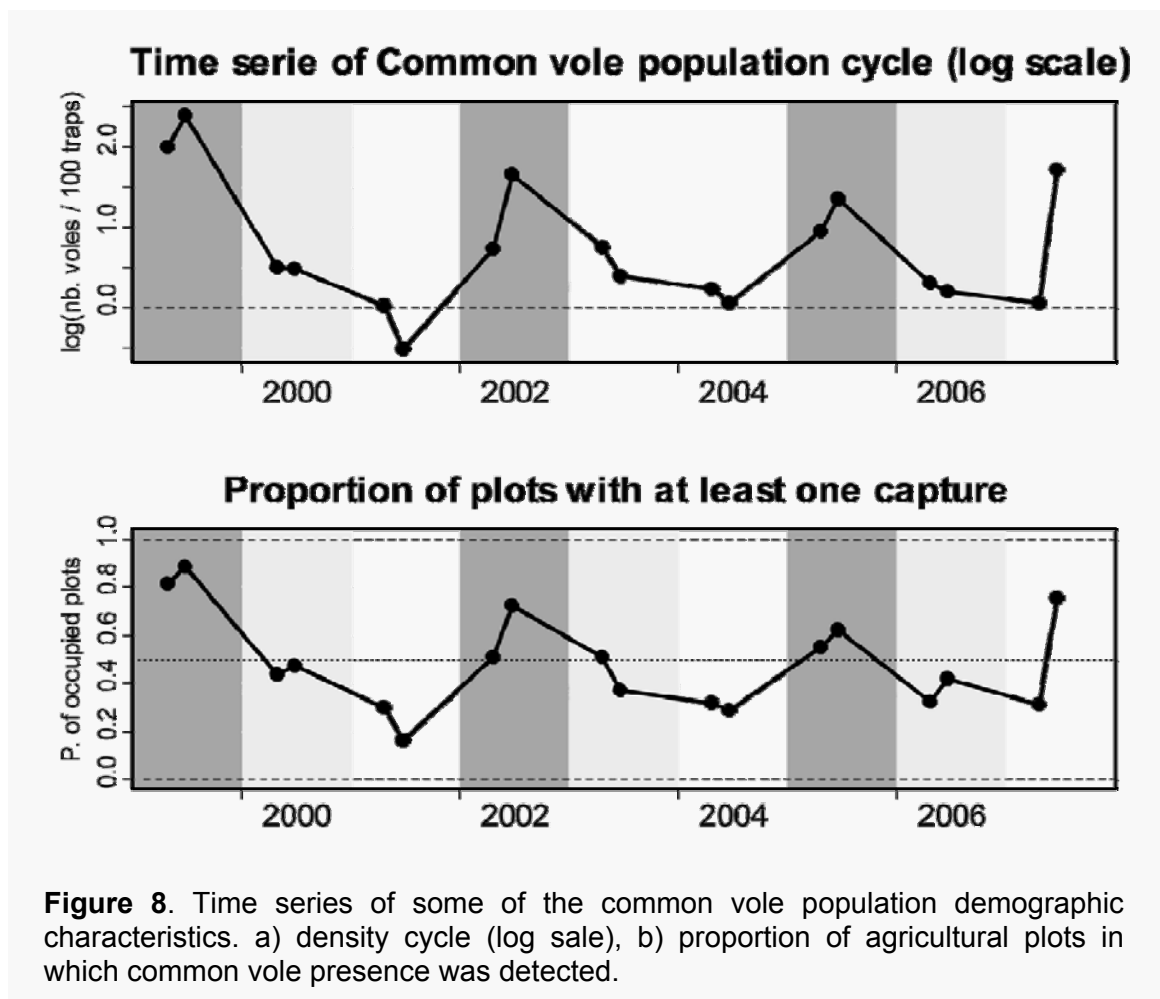
III.1 Contexte

Dans les populations, la diversité génétique neutre est créée par la mutation et perdue par dérive génétique qui est inversement proportionnelle à la taille efficace (Hartl & Clark 1997). La distribution spatiale de cette diversité génétique neutre est régulée par la balance entre dérive génétique et migration (Slatkin 1993; Wright 1931; Wright 1942). Dans les populations en équilibre démographique une situation d'équilibre entre ces forces micro-évolutives est attendue. Lorsqu'une population se trouve en déséquilibre démographique, cet équilibre est rompu et l'une ou l'autre prendra l'avantage (Hutchison & Templeton 1999). Dans le cadre de métapopulations, lorsque la dérive génétique l'emporte sur la migration on observe une diminution de la diversité génétique locale. Inversement, quand la migration l'emporte sur la dérive la diversité génétique dans les populations tend à augmenter (Berthier 2005).

Les espèces cycliques sont des cas extrêmes d'instabilité démographique puisque leurs populations sont soumises à des variations de taille répétées et souvent importantes. D'un point de vue génétique, la récurrence de réductions drastiques des effectifs dans des populations peut avoir des conséquences importantes notamment en terme de maintien de la variabilité génétique (Motro & Thomson 1982; Nei et al. 1975). Pourtant les études réalisées sur des populations cycliques décrivent généralement d'importants niveaux de diversité génétique (Berthier et al. 2005; Ehrich & Jorde 2005; Ehrich et al. 2001b; Ehrich & Stenseth 2001; Plante et al. 1989; Vuorinen & Eskelinen 2005). Deux hypothèses sont évoquées pour rendre compte de ces forts niveaux de diversité génétique : 1) la dérive génétique est trop faible en phase de faible densité pour affecter la diversité génétique (parce que les tailles de population demeurent assez importantes et/ou parce que la durée de ces goulots d'étranglement génétiques est trop courte) et 2) la dérive génétique est compensée par la dispersion (Busch et al. 2007). Dans ce contexte le suivi longitudinal des patrons génétiques des populations cycliques permet de mesurer leurs possibles variations avec la densité et donc en partie de trancher entre ces hypothèses.

La relation entre densité et dispersion n'est pas claire et fait l'objet d'importants débats dans la communauté scientifique. Des études expérimentales sur des rongeurs suggèrent que la dispersion est négativement liée à la densité (Andreassen & Ims 2001; Gundersen et al. 2002; Ims & Andreassen 2005; Lin & Batzli 2001). Dans ces études de dynamique des populations c'est en fait l'immigration et son succès qui se trouvent négativement liée à la densité locale. Les approches de génétiques des populations qui elles se basent sur la description du flux génique dans ou entre les populations tendent à montrer que celui-ci est plus important en fortes densités (Berthier et al. 2006). La contradiction qui semble apparaître entre les approches de dynamique et de génétique des populations n'est en fait qu'apparente.

La principale difficulté quand on s'intéresse à l'influence de la densité sur la dispersion par des approches indirectes de génétique des populations est de distinguer ce qui résulte réellement des variations des paramètres de migration (i.e. la dispersion efficace) de ce qui résulte des variations de l'intensité des effets de la dérive génétique. Car en génétique des populations, c'est justement cet équilibre qui est mesuré et interprété en termes de flux génique. Dans les populations cycliques on s'attend à ce que l'équilibre entre dérive et flux génique varie continuellement avec les densités. Ainsi, il est probable que des variations des taux de dispersion puissent être masquées par des variations plus importantes des effets de la dérive génétique sur la structuration des populations. En faible densité, s'il y a perte de diversité (et augmentation de la structuration) on peut penser que c'est parce que la dérive l'emporte sur la migration. Quoiqu'il en soit la migration ne compense pas la dérive, même si celle-ci est négativement liée à la densité. Si dans l'autre sens, en forte densité la diversité augmente et la structuration diminue, on peut seulement conclure que c'est parce que la migration l'emporte sur la dérive génétique.



Dans le chapitre précédent, nous avons montré que chez le campagnol des champs les patrons de dispersion des males et femelles sont différents et n'obéissent probablement pas aux mêmes déterminants. Ainsi dans cette partie il nous est apparu fondamental de distinguer les deux sexes pour décrire l'influence de la densité sur la dispersion.

III.2 Résultats et discussion

Variation des patrons génétiques avec la densité. La population du site d'étude de Chizé est, pour chaque année d'échantillonnage, caractérisée par une forte diversité génétique, comme il est régulièrement reporté dans des populations cycliques de rongeurs (Berthier 2005; Berthier et al. 2005; Ehrich et al. 2001a; Plante et al. 1989). Dans cette population, les fluctuations de densité sont très rapides dans le temps. Les périodes de faible densité n'excèdent pas 10 générations et les périodes de pullulations sont encore plus courtes (à peine quelques générations). Le tempo et la rapidité de ces changements démographiques expliquent pour partie le maintien d'une forte richesse allélique dans la population. D'autre part, il est important de noter que même en phase de faible densité, celle-ci est relativement importante et la présence du campagnol est rapportée dans tous les types de cultures composant la mosaïque agricole (y compris les cultures annuelles mais dans de plus faibles proportions).

Nous observons néanmoins de faibles variations de diversité génétique (Tableau 5), et des patrons d'IBD (Figure 9, Tableau 5) en relation avec les fluctuations de densité. Ces variations de patron génétique sont congruentes avec celles déjà décrites chez un autre rongeurs à démographie cycliques, dans un suivi sur une plus courte période (Berthier et al. 2006). Ces résultats suggèrent que lorsque les densités sont faibles, l'effet de la dérive génétique l'emporte sur le flux génique et entraînent une diminution de la diversité génétique et une augmentation de la structuration spatiale. Puis, lorsque la densité augmente, la balance entre dérive génétique et migration s'inverse rétablissant un flux génique important qui se traduit par le rétablissement de la diversité génétique et une diminution de la structuration spatiale observés.

Le délai observé entre ces changements de patrons génétiques et les variations de densités s'explique par le fait que la diversité génétique observée à une génération donnée est le fruit de la reproduction de des générations précédentes. D'autre part, il est probable que la dispersion chez le campagnol s'effectue tard dans la saison (Aars & Ims 2000). Notre échantillonnage étant réalisé au printemps il est logiquement le reflet de la dispersion de la saison précédente.

Response variable	Effect	Estimate	Std. error	t-value	P-value
Allelic Richness	intercept	7.94443	0.15131		
	Increase June	0.03638	0.01063	3.424	0.00505**
	Density June Year-1	0.06505	0.02206	2.949	0.01217*
	Month	-0.05375	0.02603	-2.065	0.06127
$\hat{\epsilon}$ -based slope of IBD	intercept	0.0080	0.001		
	Increase June	-0.0004	0.0001	-2.989	0.03 *
	Density June Year-1	-0.0015	0.0003	-5.305	0.003 **

Table 5 Parameter estimates from the most adequate linear model (chosen on the basis of AICc) for the effect of density, growth rate and month of sampling on allelic richness corrected for a minimal sample size of 7 individuals and the slope of the regression of genetic distance ($\hat{\epsilon}$ -based estimate) against the logarithm of geographic distance.

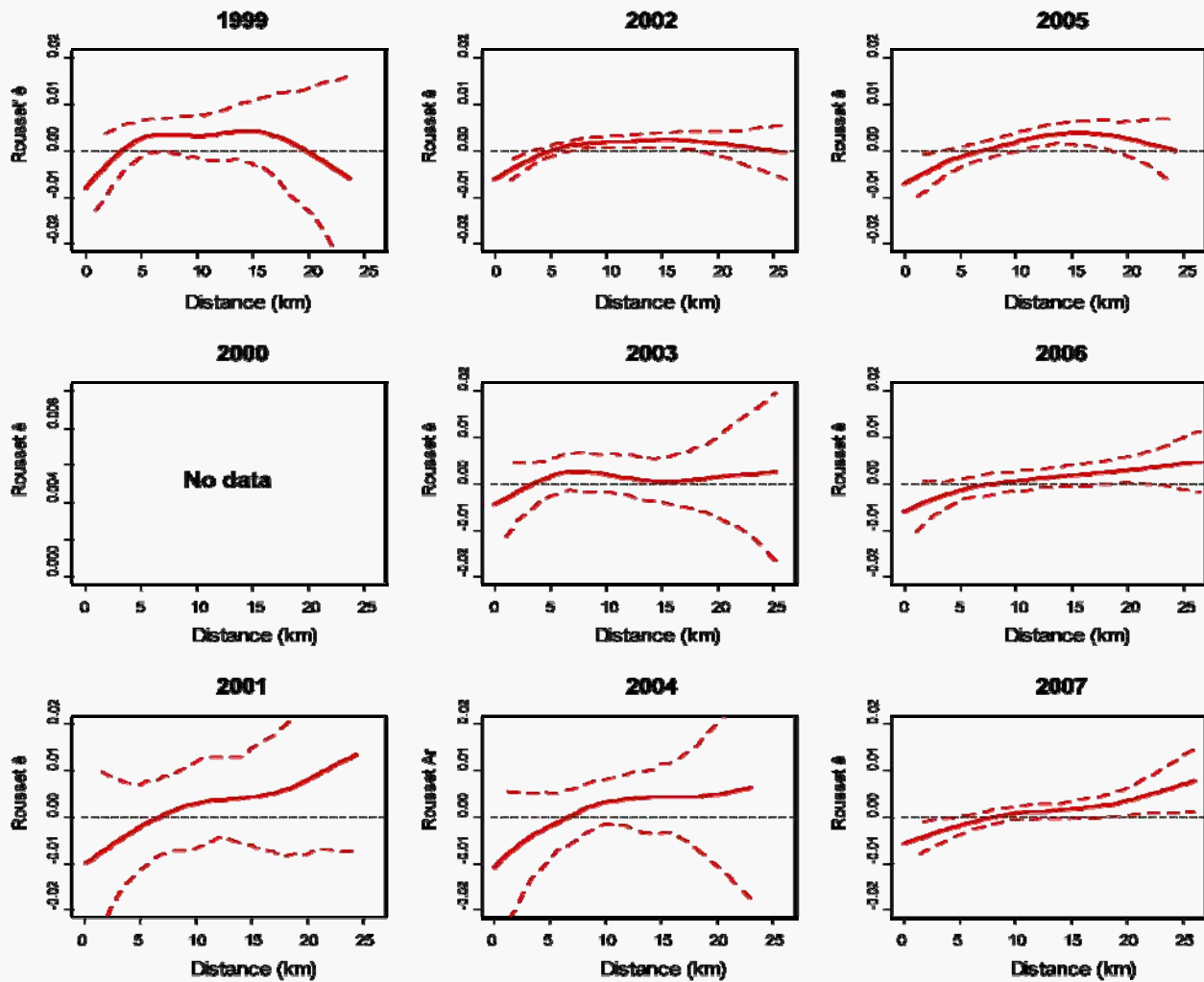


Figure 9. Spline correlogram with 95% bootstrap confidence envelope (dashed lines) for the function relating genetic distance (Rousset's $\hat{\epsilon}$) to geographical (Euclidean) distance between individuals for each year of sampling.

Il est toutefois difficile de conclure sur la relation entre densité et dispersion à la vue de ces résultats bien que l'aplatissement de la pente de l'IBD et la diminution des distances génétiques entre les individus après les phases de pullulation suggèrent la possibilité que les distances de dispersion puissent augmenter avec la densité.

Dispersion et densité dépendance. Pour tenter d'aborder le lien entre dispersion et densité à partir de nos données génétiques nous avons utilisé une approche d'autocorrélation spatiale basée sur un indice d'apparentement (Li et al. 1993). Si elle ne permet pas de réaliser des inférences sur les taux de dispersion cette approche peut toutefois être informative sur les distances de dispersion puisque le patron d'autocorrélation indique jusqu'à quelle distance les individus sont génétiquement plus apparentés qu'au hasard. Cette analyse réalisée sur les adultes, en séparant mâles et femelles, nous permet d'émettre des hypothèses quant à l'influence de la densité sur la dispersion du campagnol des champs. Pour les femelles le patron d'autocorrélation génétique ne change pas avec la densité ce qui est en revanche le cas chez les mâles (Figure 10). Il apparaît que les mâles sont génétiquement apparentés à de plus grandes distances (jusqu'à 5 km) lors des années caractérisées par de fortes densités. Le fait que le patron d'autocorrélation diffère entre mâles et femelles lors des années de pullulation suggère que l'autocorrélogramme ne mesure pas uniquement le flux génique mais également, au moins en partie (et seulement pour les faibles classes de distances), directement la dispersion. Les marqueurs microsatellites, hérités des deux parents, sont redistribués entre les sexes après chaque génération de reproduction. Ils ne devraient donc pas montrer de signature génétique contrastée entre mâles et femelles si l'on se place dans le cadre de l'estimation du flux génique qui intègre la migration au cours des générations. Cela suggère que la dispersion des mâles se fait sur de plus grandes distances lorsque les densités sont élevées. Deux hypothèses, non exclusives, peuvent expliquer ce patron. 1) La colonisation presque complète de l'ensemble des habitats composant la mosaïque paysagère conséquence de l'augmentation des densités fait glisser ce système d'un fonctionnement de type métapopulation (avec des patches plus ou moins isolés) à fonctionnement en population continue qui faciliterait la réalisation de mouvements de dispersion longue distance des mâles, probablement par sauts successifs entre colonies. 2) Une autre conséquence directe de l'augmentation de la densité est la plus forte compétition entre mâles pour l'accès aux femelles. Il est probable, et vérifié dans de nombreuses études (Matthysen 2005), que le succès de l'immigration (i.e. installation et surtout reproduction dans une nouvelle colonie) soit fortement diminué avec la densité. Cela forcerait donc les mâles (qui dispersent obligatoirement pour éviter l'apparentement) à visiter plus de colonies et donc parcourir de plus grandes distances avant de réussir à se reproduire.

Toutefois, en aucun cas ces résultats ne permettent de faire des inférences sur les taux de dispersion et encore moins sur la dispersion efficace des mâles (qui peut être inférieure en forte densité) mais ils suggèrent fortement que les mâles qui dispersent parcourent de plus longues distances lorsque les densités sont élevées.

L'augmentation, avec la densité, de l'apparement entre mâles dans les colonies (Figure 11), suggère au que la proportion de mâles migrants diminue avec l'augmentation de la densité. Ce résultat peut être mis en relation avec la diminution de la proportion de mâles reproducteurs parmi les individus morts et autopsiés (les données « autopsies » ne sont pas présentées dans ce manuscrit) (Inchausti et. al. en révision).

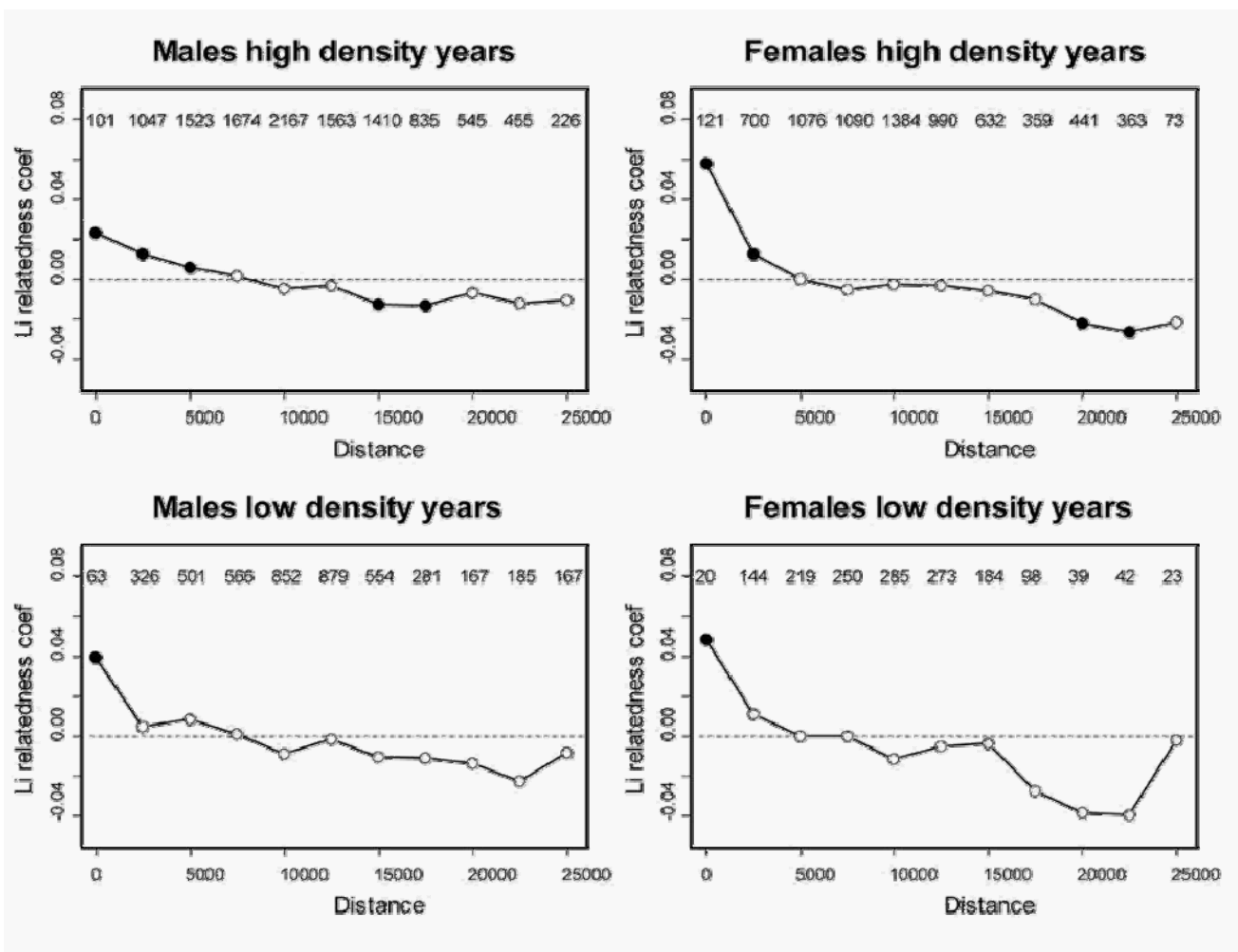


Figure 10. Correlograms showing the Li relatedness coefficient as a function of distance for all 4 combinations of adults males and females in low and high density years. The first distance class (0 km) represents pairwise comparisons between individuals from the same trap line (i.e. agricultural plot). Black dots indicate departure from the 95% CI built for the null hypothesis of a random distribution of genotypes determined by 1000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations.

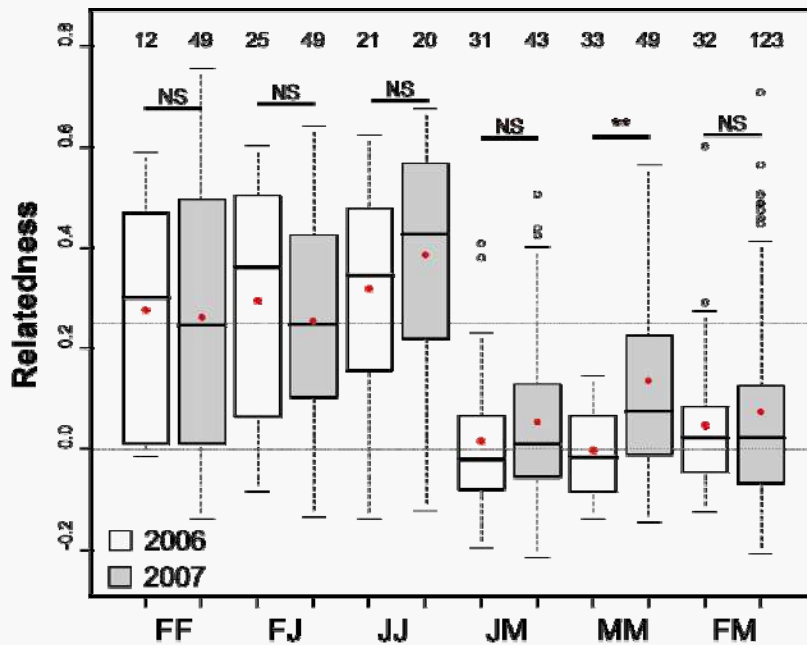


Figure 11. Comparaison de l'apparement intra-colonies pour les différentes catégories (FF, femelles ; FJ, femelles juvéniles ; JJ, juvéniles ; JM, mâles juvéniles ; MM, mâles et FM, femelles mâles) entre 2006 (faible densité) et 2007 (forte densité).

III.3 Conclusion

En phase de pullulation (il faut seulement 2 à 4 mois pour atteindre des densités extrêmes, de l'ordre de 1000 ind/ha) il semble que les rapides changements de densité s'accompagnent d'une transition complète vers un modèle de type population continue. En effet, lors de certaines années de pullulation près de 100% des parcelles piégées sont occupées par les campagnols des champs. Bien que nous n'en détectons pas clairement de signature il est probable que lors des phases de faibles densités ce système soit plus proche d'un modèle de métapopulation avec des dèmes plus ou moins isolés. Nos résultats le suggèrent à travers les variations de la pente de l'IBD et les autocorrélogrammes des mâles. La propre dynamique du paysage (ces dèmes ne pouvant pas être stables dans le temps et l'espace) couplée à la rapidité des fluctuations démographiques qui estompe régulièrement tout signal de différenciation génétique, sont autant d'arguments pour expliquer l'impossibilité de détecter une forte structuration génétique entre dèmes en phase de faible densité, même si ces dèmes sont très peu connectés par la dispersion. L'estimation des flux géniques intègre à la fois les événements de migration présents et passés (Whitlock & McCauley 1999).

D'autre part, l'augmentation des densités a pour conséquence directe une diminution des effets de la dérive génétique. Ainsi, sans que les taux de dispersion varient, il est probable que l'influence du flux génique s'en trouve augmentée. De plus, celui-ci est probablement favorisé par le passage à un système de population continu.

Ainsi, même sans évoquer l'influence de possibles variations des taux de dispersion avec la densité, nous pouvons expliquer le maintien à long terme d'une forte diversité génétique dans

ces populations cycliques par les changements d'occupation de l'espace et les variations, avec la densité, de l'équilibre entre dérive génétique et flux génique.

Toutefois, établir des prédictions claires sur l'évolution des patrons génétiques des populations cycliques avec la densité est un exercice complexe d'autant plus dans le cadre de populations continues (ou périodiquement continues) sous IBD. L'utilisation de simulations informatiques, rendu possible par le développement très récent d'un programme informatique permettant la simulation de données génétiques dans ce contexte d'IBD (Leblois et al. 2008) pourrait s'avérer complémentaire de notre approche empirique, et très utile pour formuler des prédictions.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette thèse a pour objectif de décrire l'influence du paysage et des fluctuations de densité sur les flux géniques dans une « population » cyclique de campagnols des champs évoluant dans un paysage agricole extrêmement perturbé et hétérogène. Nous avons employé des approches directes et indirectes de génétique des populations pour traiter cette problématique et caractériser les patrons de dispersion spécifiques des mâles et des femelles de cette espèce. Ce travail apporte de nombreux éléments permettant de mieux comprendre le rôle de la dispersion dans le fonctionnement des populations cycliques inféodées aux agro-écosystèmes. Il apparaît notamment que les différents facteurs proximaux ou ultimes qui influencent la dispersion interagissent les uns avec les autres et ne peuvent donc pas être dissociés les uns des autres pour comprendre ce système.

Fonctionnement de la population cyclique de campagnol des champs sur le site d'étude de Chizé

L'abondance du campagnol des champs sur la zone d'étude de Chizé est caractérisée par une absence de dépendance spatiale ou temporelle à l'échelle des parcelles qui contraste avec la synchronie mesurée à des échelles plus larges (zone d'étude et régionale) (De Cornulier 2005). L'étude génétique que nous avons entreprise montre que la dispersion interconnecte bien les colonies de campagnols des champs à l'échelle des parcelles. Nous montrons une absence de forte structuration génétique sur l'ensemble de la zone d'étude qu'illustre le patron d'IBD. Ce résultat valide donc que l'absence de corrélation spatiale des l'échelle des parcelles est due aux pratiques agricoles et aux variations de l'assolement plutôt qu'à une limitation de la dispersion entre les parcelles et les différents milieux. La dispersion est un paramètre crucial de la dynamique des populations et des métapopulations dans les paysages fragmentés et instables (Clobert et al. 2001; Hanski & Gaggiotti 2004). Parce qu'il permet d'intégrer les processus d'extinction-recolonisation qui peuvent être induits par la stochasticité environnementale ou démographique le modèle de métapopulation apparaît de façon évidente comme le plus adapté pour appréhender notre système. Chaque parcelle, élément de base de ce paysage, peut être caractérisée par des probabilités d'extinction et de recolonisation elles même déterminées par la culture ou la succession de cultures qu'elle porte. Ainsi dans les cultures annuelles la probabilité d'extinction dans la parcelle est de 1 ! Ce fonctionnement en métapopulation, forcé par la propre dynamique de ce paysage, se traduit chez le campagnol des champs par une très faible structuration génétique. Nous avons montré que de part les capacités de dispersion de cette espèce et probablement aussi sa rapidité à réaliser son cycle de vie, la structuration génétique qui en ressort contraste avec l'apparente fragmentation de la mosaïque agricole. Dans une telle mosaïque d'habitats instables dans le temps et l'espace, la colonisation est l'aspect le plus important de la dispersion.

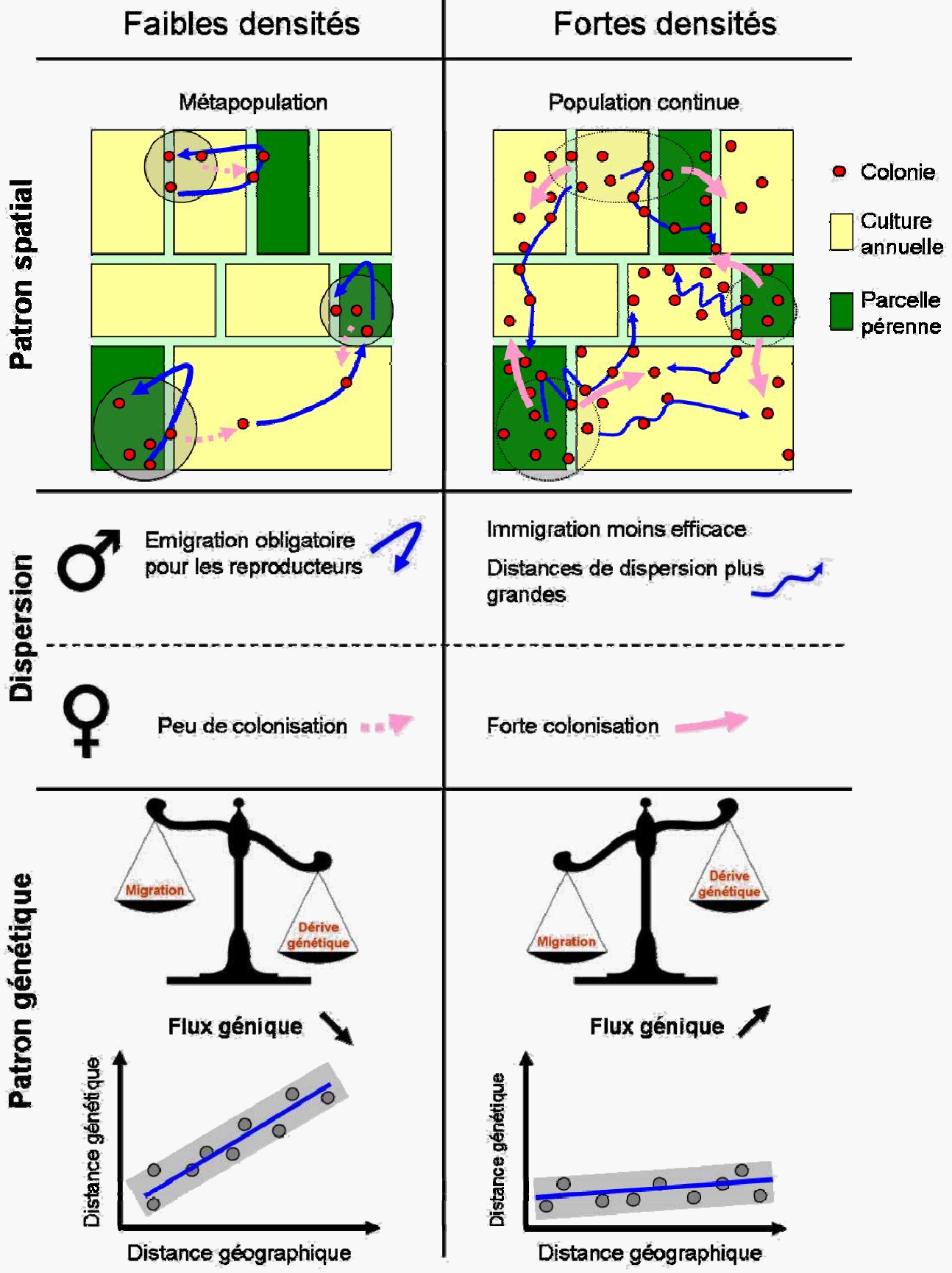
Les femelles colonisent. Il est généralement reconnu que chez les micromammifères coloniaux caractérisés par des systèmes d'appariement polygynes ou de promiscuité (chauves souris, rongeurs) la fondation de nouvelles colonies (donc la colonisation) est assurée par les femelles (Kerth & Petit 2005; Pusenius et al. 1998). C'est l'hypothèse que nous formulons également pour le campagnol des champs à l'appui de nos résultats et des études antérieures sur des espèces biologiquement proches (Andreassen & Ims 2001). L'absence d'apparement dans les colonies entre mâles et juvéniles (donc probablement aucune intervention des mâles dans l'élevage des jeunes) et les biais de sex-ratio en faveur des femelles dans les colonies et en faveur des mâles dans les piégeages en ligne soutient que l'on est bien dans un système

d'appariement très polygyne ou de promiscuité. D'autre part des travaux précédents sur cette espèce suggèrent fortement que ce sont effectivement les femelles qui jouent le rôle de colonisation (Boyce & Boyce 1988a; Boyce & Boyce 1988b). Une bonne connaissance de son système d'appariement et de l'organisation sociale d'une espèce donnée apparaît fondamentale pour appréhender la complexité des déterminants de son patron de dispersion. Dans ce contexte, la description et la compréhension des patrons de dispersion particuliers à chaque sexe est très importante. Ceux-ci peuvent être très différents entre males et femelles et ne pas être déterminés par les mêmes causes ultimes ou contraintes immédiates.

Influence de la densité sur la colonisation des femelles. La densité influence probablement la migration (en tant que mouvement entre patches occupés) et la colonisation (mouvement vers un patch vide) dans des sens opposés (Wade & McCauley 1988). Il est en effet communément admis que l'immigration est négativement liée à la densité dans le patch d'arrivée (Lambin et al. 2001). Ainsi à l'échelle d'une métapopulation, des études expérimentales ont démontré chez d'autres espèces de *Microtus* un plus grand succès de la colonisation dans des patches vides plutôt qu'occupés (Andreassen & Ims 2001). On peut donc s'attendre à ce que la densité n'ait pas le même effet sur la dispersion des individus selon qu'ils soient males ou femelle, migrants ou colonisatrices.

Nous avons mis en relation la proportion de parcelles occupées avec la densité mesurée sur l'ensemble de la zone d'étude (Figure 12). L'augmentation de densité s'accompagne de la colonisation de nouvelles parcelles dans une relation non linéaire et différente selon la culture. Les cultures pérennes (prairies et luzernes) sont caractérisées par une présence constante de campagnols y compris en période de faible densité. Au-delà d'une certaine densité les cultures annuelles prennent le relais et sont colonisées massivement. Si l'on replace ces patrons dans l'espace, ils se traduisent par une expansion spatiale qui seulement au-delà d'un certain seuil de densité se révèle indépendant du type de culture (schémas de synthèse).

En lien avec nos résultats sur les déterminants de la dispersion chez cette espèce cela indique qu'en phase de croissance démographique un nombre croissant de femelles seraient amenées à quitter leur patch natal poussées par la compétition entre apparentés elle-même directement liée à la densité locale. En raison de la dynamique du paysage, les opportunités de coloniser les cultures annuelles « vidées » par les labours de l'hiver sont encore nombreuses. Il est possible que les taux de dispersion des femelles restent inchangés et que seul un plus grand nombre d'individus dans les patches occupés explique la colonisation massive de l'ensemble de la mosaïque agricole. Les données génétiques acquises au cours de cette thèse ne permettent pas de conclure sur ce point.



Schémas de synthèse. Représentation schématique d'une hypothèse de fonctionnement des populations cyclique de campagnol des champs dans les agro-écosystèmes et ses conséquences sur les patrons génétiques observés

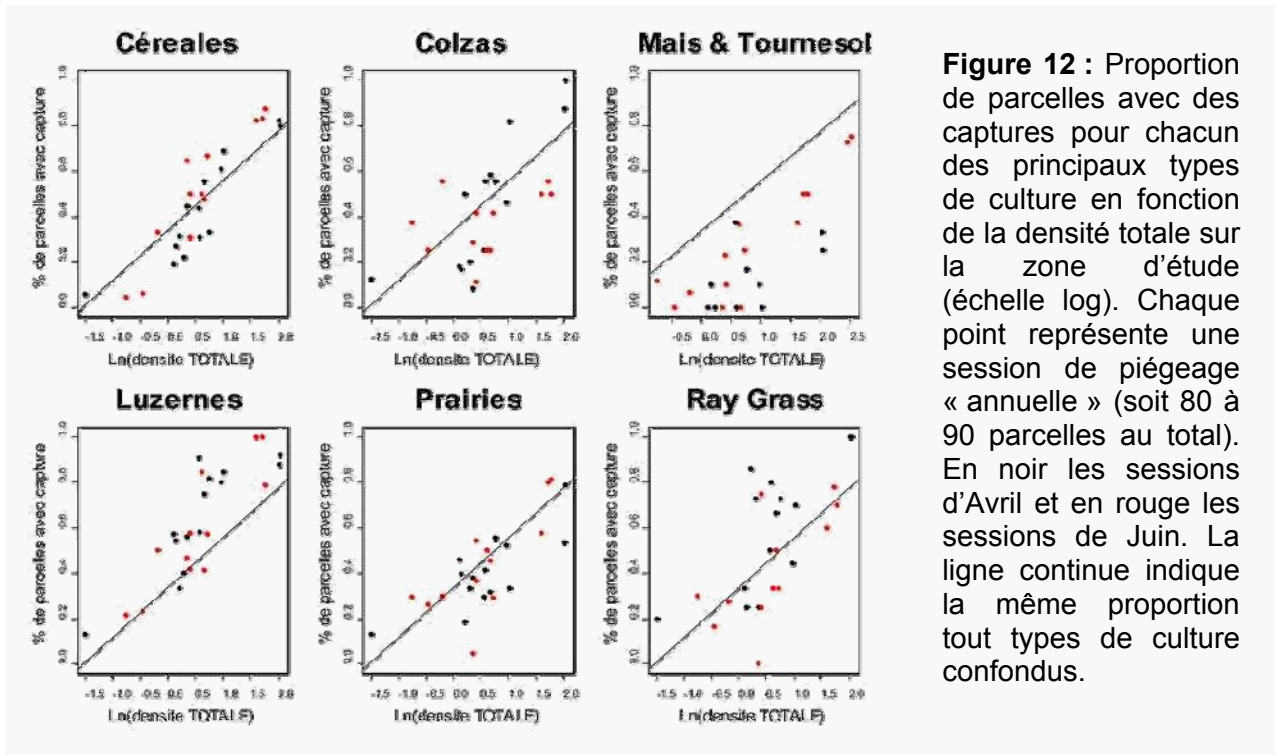


Figure 12 : Proportion de parcelles avec des captures pour chacun des principaux types de culture en fonction de la densité totale sur la zone d'étude (échelle log). Chaque point représente une session de piégeage « annuelle » (soit 80 à 90 parcelles au total). En noir les sessions d'Avril et en rouge les sessions de Juin. La ligne continue indique la même proportion tout types de culture confondus.

Influence de la densité sur la dispersion des mâles. Chez le campagnol des champs, les mâles migrent de façon répétée entre colonies à la recherche d'opportunités de reproduction. D'un point de vue évolutif cette dispersion apparait quasiment obligatoire pour éviter la reproduction entre apparentés. Il est toutefois probable que la dispersion efficace des mâles diminue en période de forte densité parce qu'une plus forte compétition entre mâles limite l'efficacité de la dispersion. La saturation de l'habitat et le coût plus élevé de la dispersion peuvent conduire les individus à ne pas quitter leur site de naissance ou de résidence (Jones 1986; Jones et al. 1988). Certains mâles ne dispersent plus et n'entrent peut être même plus en reproduction (Charbonnel et al. 2008; Lambin et al. 2006). En forte densité l'apparementement entre mâles semble augmenter dans les colonies suggérant une proportion plus importante de mâles philopatrics. A l'appui de cette hypothèse les autopsies réalisées sur les individus capturés morts révèlent une diminution de la proportion de mâles en reproduction lors des périodes de fortes densités (Inchausti et al., en révision). Toutefois, on peut également envisager qu'en raison d'une immigration rendue plus difficile par la plus forte compétition engendrée par l'augmentation des densités les mâles en reproduction soient contraints à une plus grande mobilité pour trouver une opportunité de reproduction. Cela conduirait au final à allonger les distances de dispersion des mâles (facilité par la présence continue de colonies dans le paysage) malgré une dispersion moins efficace.

L'augmentation de la densité conduit au rétablissement du flux génique probablement limité, et dominé par les effets de la dérive, lors des périodes de faible densité. Nous pouvons émettre

l'hypothèse que ce rétablissement du flux génique se fait d'une part grâce à la colonisation massive des femelles et d'autre part grâce à la migration répétée des mâles.

Evolution de la dispersion en réponse à l'instabilité de l'habitat. Peut-on pour autant parler de grandes capacités de dispersion mesurées chez campagnol des champs dans ces milieux agricoles comme une adaptation à cette mosaïque d'habitats instable ? Dans une étude expérimentale sur des métapopulations artificielles de *Caenorhabditis elegans*, l'augmentation du taux de destruction des patches avait pour conséquence une augmentation de mutants au comportement de dispersion accru (Friedenberg 2003). L'agriculture intensive telle qu'elle est réalisée sur le site d'étude, et en Europe de l'Ouest en général, est très récente (années 60). L'évolution rapide du comportement de dispersion demande à la fois la présence de variation génétique héritable pour des traits jouant sur ce comportement et d'une forte sélection jouant sur ces traits (Ronce 2007). Dans notre étude, s'il y a pression de sélection en faveur de plus grandes capacités de dispersion du campagnol des champs elle ne s'exerce pas au niveau d'un ou plusieurs milieux particuliers (culture ou type de cultural) mais à l'échelle du paysage dans son ensemble.

L'hypothèse d'une évolution récente vers de plus grandes capacités de dispersion chez cette espèce en réponse à l'instabilité de ces paysages agricoles nous paraît intéressante mais est difficile à tester. Cette pression de sélection devrait principalement jouer sur les femelles. En effet comme il été vu précédemment, l'évitement de l'apparement conduit à des dispersions natale et de reproduction quasiment obligatoire pour les mâles. Aussi, une évolution de la dispersion des mâles ne pourrait se faire que vers de plus grandes distance de dispersion. Nous avons vu que d'autres pressions évolutives (évitement de l'apparement, compétition entre apparentés) jouent déjà en faveur de la dispersion chez ce petit rongeur. Un moyen de mettre en évidence de plus grandes capacités de dispersion en relation avec l'instabilité de l'habitat serait de comparer les patrons de dispersion dans ce système à ceux d'un système beaucoup moins perturbé (e. g. les systèmes prairiaux du Jura). Toutefois il apparaît que les perturbations engendrées par les pratiques agricoles comme la fauche sont imprévisibles pour un individu et forcent la dispersion plus par une action mécanique qu'à travers des pressions évolutives. D'autre part, la stochasticité démographique (engendrée par la cyclicité et les perturbations dues aux pratiques agricoles chez le campagnol des champs) peut aussi être considérée comme partie intégrante de l'instabilité de l'environnement et jouer en faveur de l'évolution vers de plus grandes capacités de dispersion (Cadet et al. 2003).

Influence de la densité. Pour tester précisément l'influence de la densité sur les patrons de dispersion spécifiques de chaque sexe l'approche hiérarchisée, sexe et statut spécifique développé par Fontanillas et al. (2004) nous apparaît la plus pertinente. Cette approche permet d'estimer directement les taux et distances de dispersion actuels sans se baser sur l'inférence sur du flux génique qui intègre la dispersion présente et la dispersion efficace passée. Parce que les cycles sont synchrones sur l'ensemble de la zone d'étude les biais liés à des fluctuations locales des densités pourront être négligés si une telle approche est réalisée à différentes étapes du cycle.

D'autre part, le suivi bimensuel des patrons génétique caractérisant cette population entre Avril 2007 et Juin 2008 en cours d'analyse permettra de déterminer avec précision le tempo de variation des patrons génétiques avec la densité et de les lier à de possibles effets saisonniers, dépendant du climat ou du calendrier des pratiques agricoles.

Influence du paysage

Dans le système biologique étudié, le paysage (et particulièrement sa dynamique) joue un rôle prépondérant. Le développement d'outils d'analyse adaptés, dans le contexte de la génétique paysagère, nous a permis d'explorer le potentiel effet structurant des différents macroéléments présents sur le site d'étude. Toutefois, la génétique paysagère ne se limite pas à la détection de barrières et à la description de la structuration génétique des populations dans l'espace (Storfer et al. 2007). Elle a aussi pour objet l'exploration de l'effet de certaines variables environnementales sur la structuration spatiale des populations (Foll & Gaggiotti 2006; Gaggiotti et al. 2004; Giordano et al. 2007). L'un des objectifs initiaux de cette thèse était ainsi de mettre en évidence le rôle des milieux pérennes dans le fonctionnement des populations de campagnol des champs.

Identifier le rôle des milieux pérennes. L'hypothèse de départ était une plus forte stabilité des colonies de campagnol des champs dans les milieux pérennes qui joueraient ainsi un rôle de refuge puis de réservoir de recolonisation. Dans le système étudié, l'absence de structuration génétique et les grandes tailles de population efficaces rendent difficile l'exploration du rôle d'un milieu (i.e. type cultural) particulier. Il serait par exemple difficile d'aborder cette question avec des approches du type tests d'assignation en raison des importantes tailles efficaces de populations et du *turn-over* important qui caractérisent les populations de campagnol des champs (forts taux de natalité, de mortalité et de dispersion). Nous pouvions intuitivement attendre une plus forte diversité génétique dans les cultures annuelles car celles ci correspondent

dans l'hypothèse d'une dynamique source-puits à un mélange d'individus provenant de sources génétiquement différenciées. Toutefois, des études théoriques montrent que dans ce type de dynamique de métapopulation il est difficile de distinguer les sources des puits à partir des F -statistiques ou de la comparaison de la diversité génétique (Rousset 1999), particulièrement lorsque les événements d'extinctions et/ou d'échanges entre puits sont fréquents (Gaggiotti 1996). Les patrons de dispersion du campagnol des champs (des mâles notamment) et le renouvellement annuel de près de 80% des habitats (i.e. la proportion de cultures annuelles dans ce paysage) suggèrent qu'il est impossible, à partir d'inférence génétique, de mettre en lumière le rôle précis joué par les milieux pérennes. Nous avons utilisé des traitements récents de génétique du paysage développés pour tester l'effet de facteurs environnementaux sur la différenciation génétique (par le calcul d'un paramètre F_{ST} pour chaque « population » locale, dans notre cas une parcelle) avec le programme GESTE (Foll & Gaggiotti 2005). Nous avons ainsi testé l'âge ou le type de culture comme variable explicative de la différenciation génétique des parcelles. De même la comparaison de l'hétérozygotie entre milieux pérennes et cultures annuelles avec la procédure de permutation implémentée dans le programme FSTAT (Goudet 2001) indique, comme le suggèrent les approches théoriques, qu'il n'y a pas de différence de diversité génétique entre ces milieux. Ces résultats montrent qu'un cadre analytique « métapopulation » bien que séduisant pour décrire ce système, et comme vu précédemment adapté au substrat paysager, est à la fois trop complexe et mal adapté pour réaliser des inférences génétiques sur le fonctionnement de cette population de campagnol des champs.

Les approches qui sont apparues les plus prometteuses dans cette étude sont celles basées sur les indices d'apparement. La comparaison de l'apparement interannuel (entre individus capturés deux années successives dans la même parcelle) dans les parcelles pérennes à celui mesuré dans les parcelles cultivées (i.e. ayant subi un labour) suggère une plus grande stabilité dans les milieux pérennes. Cette observation est particulièrement vraie pour les femelles ce qui est peu surprenant compte tenu de leur plus forte philopatrie. D'autre part, dans les parcelles pérennes, nous avons observé un plus faible apparement entre femelles d'une même colonie après une fauche qu'avant cette pratique agricole. Ce résultat suggère que les pratiques agricoles favorisent la dispersion des femelles par l'immigration de nouvelles femelles suite à une émigration « forcée » et/ou une mortalité accrue.

A travers le suivi précis et le plus exhaustif possible de colonies à une échelle spatiale fine (quelques parcelles), il serait possible de déterminer à travers l'étude de l'apparement entre paires d'individus les patrons de colonisation des cultures annuelles. Bien que de nombreux éléments de cette étude laissent à penser que la colonisation est principalement assurée par les femelles nous ne l'avons pas formellement et directement démontré. En piégeant assez tôt dans

la saison il serait possible de déterminer si les femelles capturées dans les cultures annuelles récemment colonisées sont apparentés ou pas aux femelles des cultures pérennes voisines.

Qu'est ce qu'une population de campagnol des champs ? Une problématique dans laquelle s'inscrit cette thèse est celle du concept de population. En effet, qu'appelle-t-on une population ou unité démographiquement distincte dans les systèmes continus sous IBD ? Aucune définition du concept de population n'apparaît applicable dans ce système. Sur la base de critères évolutifs, une population panmictique forme une entité cohérente au sein de laquelle chaque individu a une chance équivalente de se reproduire avec les membres du sexe opposé. Lorsque les distances de dispersion sont nettement inférieures à l'aire occupée par la population, la probabilité que deux individus se reproduisent diminue avec la distance géographique qui les sépare. Le concept de population s'avère donc inadapté pour les systèmes continus sous IBD (Rousset 1997).

Un suivi de la biodiversité déjà entrepris à une plus large échelle géographique (couvrant l'ensemble du département des deux sèvres), et caractérisée par un maillage spatial régulier (2.5 km entre chaque point d'échantillonnage) nous permettra de conduire une étude de génétique paysagère à plus grande échelle. D'autres éléments structurants du paysage comme des rivières ou de larges zones boisées pourraient de part leur ancienneté (relativement à l'autoroute dont nous avons déjà testé l'effet) correspondre à autant de ruptures des flux géniques et ainsi délimiter de larges unités génétiquement homogènes. A large échelle des zones agricoles plus contrastées pourraient être caractérisées par des patrons d'IBD différents et permettre ainsi de découpler l'effet du paysage de celui de la densité sur la structure génétique spatiale des populations.

Impact de l'intensification agricole sur la biodiversité. A l'échelle de la planète, 40 à 50% de la surface libre de glace est directement exploitée par l'homme qui s'est approprié plus de 60% de la productivité primaire (Lubchenco 1998). L'impact des activités humaines sur la biodiversité s'exprime peut être principalement par les modifications et l'intensification de l'usage des terres (Chapin et al. 2000; Sala et al. 2000), qui affectent tout particulièrement la biodiversité engendrant des taux d'extinction comparables à ceux des cinq grands événements d'extinction du passé géologique (Pimm et al. 1995; Sih et al. 2000). Bien qu'extrêmement variable selon les écosystèmes, cet impact s'est avéré particulièrement fort dans les espaces agricoles (Pain & Pienkowski 1997). Des changements profonds de pratiques agricoles ont en effet entraîné des extinctions locales, régionales et nationales de nombreuses espèces de la faune et la flore Européennes (Pain & Pienkowski 1997). La Politique Agricole Commune (PAC), au

sortir de la deuxième guerre mondiale, a engendré des bouleversements de l'agriculture, non seulement en termes de rentabilité économique (objectif d'autosuffisance alimentaire), mais dans un sens beaucoup plus large incluant le tissu social agricole, de même que les paysages agricoles au sens écologique. La PAC encourage, et contribue à l'évolution des pratiques agricoles, par l'emploi de nouvelles techniques, l'agrandissement des exploitations, la spécialisation sur certains types d'activités comme la céréaliculture ou la production laitière.

Peu d'étude à notre connaissance ne se sont intéressées aux flux géniques pour des espèces animales directement inféodées aux habitats agricoles. Le campagnol des champs est une espèce représentative des espaces agricoles car sa présence détermine celle de prédateurs à forte valeur patrimoniale comme le Busard cendré (Millon & Bretagnolle 2005). Des études précédentes sur la dynamique du campagnol des champs concluent que c'est à l'échelle du paysage que cette dynamique est influencée. (Butet & Leroux 2001; Delattre et al. 1992; Delattre et al. 1996). Les résultats présentés dans cette thèse vont dans ce sens : la structure génétique continue sous IBD qui caractérise le campagnol des champs sur la zone d'étude suggère une connectivité importante de ce paysage. C'est cette connectivité qui influence la dynamique de cette population. Même si leur rôle de refuge (et source de recolonisation) n'a pas été formellement démontré le caractère local de la dispersion chez cette espèce suggère de conserver une certaine proportion de milieux pérennes avec une distribution spatiale homogène dans le paysage. Pour les mêmes raisons une l'augmentation régulière de la taille des parcelles dédiées aux cultures annuelles aurait pour conséquence de diminuer la connectivité du paysage pour cette espèce. De la même façon, l'hétérogénéité globale du paysage doit être favorisée car en raison de l'impact des pratiques agricoles, la mise en place de monoculture sur de vastes étendues pourrait remettre en cause la présence de cette espèce dans le paysage.

Modélisation. Dans ce contexte, en s'appuyant sur les connaissances maintenant précises des patrons de dispersion de cette espèce, la mise en place d'approches de modélisation pourrait permettre de prédire l'évolution de la dynamique des campagnols en relation avec celle des politiques agricoles, et par suite leur impact sur les prédateurs comme le busard cendré (Arroyo et al. 2002; Butet & Leroux 1993; Butet & Leroux 2001). Un modèle individu centré couplé à un modèle de dynamique de paysage a déjà été construit et testé sur le campagnol agreste (Topping et al. 2003). Une approche similaire permettrait de tester les conséquences démogénétiques de l'évolution et des modifications des paysages agricoles sur cette espèce et plus généralement de la biodiversité dans les agro-écosystèmes.

D'autres approches de modélisation permettraient de valider les hypothèses formulées pour expliquer le synchronisme démographique et l'homogénéité génétique de cette population de campagnol des champs dans ce paysage.

Dispersion & synchronie

La dispersion peut elle expliquer la synchronie des cycles ? Le synchronisme des fluctuations d'abondance de populations a été rapporté dans la littérature à des échelles spatiales variables (Koenig 1999). Chez les rongeurs, les cycles peuvent être synchronisés à grande échelle, de l'ordre de 200 km (Kaitala & Ranta 1998), mais d'autres études ont mis en évidence des échelles plus restreintes de quelques kilomètres à quelques dizaines de kilomètres (Berthier et al. 2006; Bjornstad et al. 1999b; Lambin et al. 1998; Mackinnon et al. 2001), parfois associées à des structures sous forme de vagues dynamiques (« periodic travelling waves ») progressant de plusieurs kilomètres par an.

La dispersion, parce qu'elle est généralement restreinte dans l'espace, est souvent invoquée pour expliquer la synchronie à une échelle locale (Berthier 2005; Koenig 1999). Son rôle majeur est reconnu dans les systèmes caractérisés par des vagues dynamiques (Berthier et al. 2006). Plusieurs modèles théoriques couplés à des études empiriques suggèrent que la synchronie induite par la dispersion peut jouer à des échelles plus grandes que la dispersion elle-même (Bjornstad et al. 1999a). Dans le cas des espèces cycliques les prédateurs sont aussi reconnus pour synchroniser la dynamique des populations. Cet effet synchronisant dépend de leur degré de mobilité (Bjornstad et al., 1999a): les prédateurs très mobiles pouvant générer une synchronie d'ordre régionale (Ims et Steen, 1990), alors que les prédateurs résidents affecteraient les populations à l'échelle locale (Steen, 1996 ; Ranta et al., 1997a ; Lambin et al., 1998 ; Petty et al., 2000). Enfin un effet Moran est souvent invoqué pour expliquer une synchronie à grande échelle. Dans ce dernier cas, c'est un forçage environnemental auto corrélé sur un vaste domaine, tel que les variations climatiques (températures, précipitations) ou leur effet sur la végétation qui synchronise les fluctuations de densité (Koenig 1999; Moran 1953). Dans l'hypothèse d'un effet Moran, le patron de synchronie doit être équivalent au patron de corrélation environnementale (Moran, 1953 ; Royama, 1992 ; Ranta et al., 1995). La dispersion se surajoute généralement à cet effet Moran en exacerbant la synchronie à l'échelle locale (Hudson et Cattadori, 1999 ; Ranta et al., 1999 ; Bjornstad et Bolker, 2000). Toutefois, chacun de ces processus (effet Moran, dispersion ou prédateurs) est à lui seul suffisant pour générer le synchronisme (Bjornstad et al. 1999a; Kendall et al. 2000).

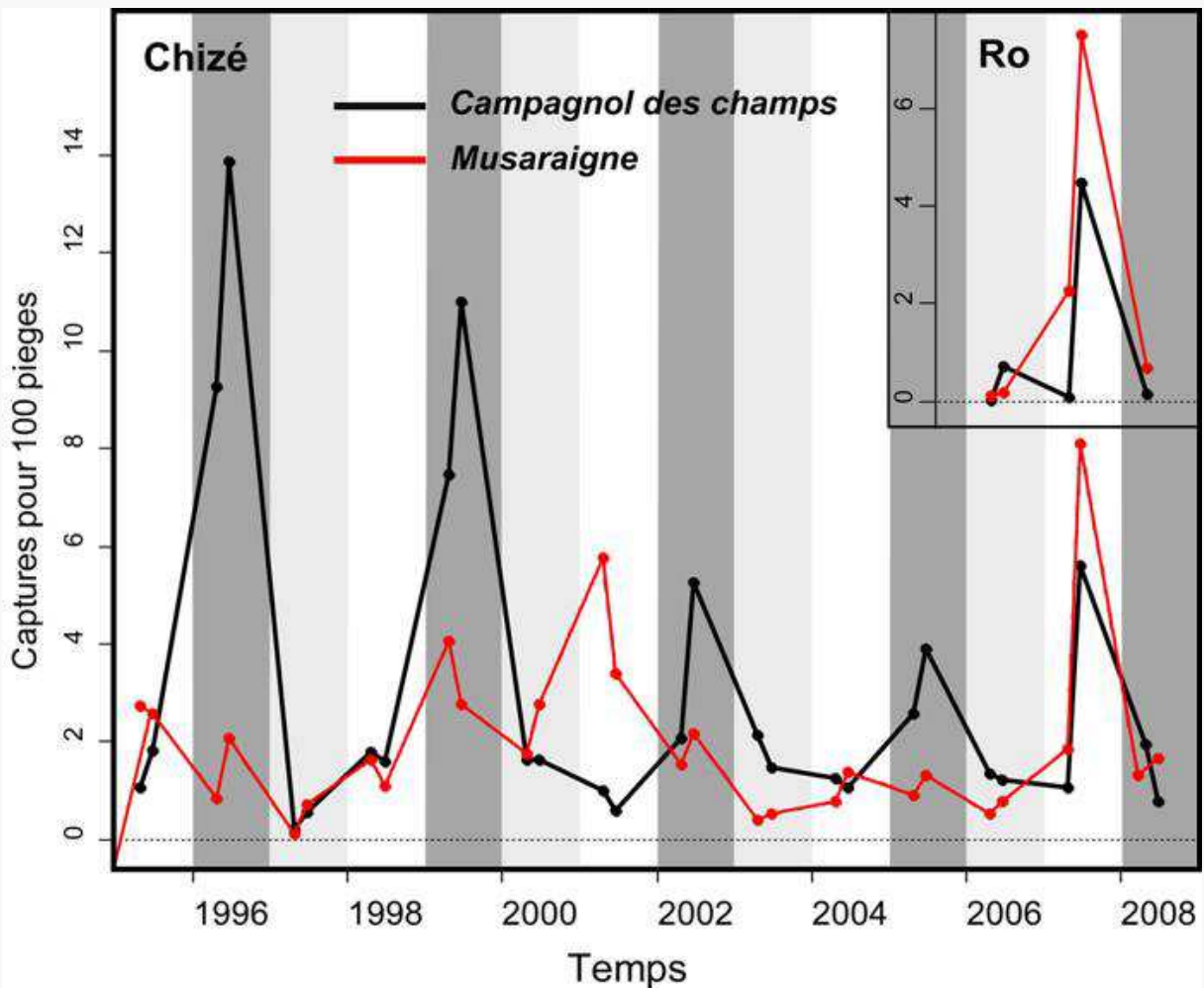


Figure 13. Séries temporelles d'abondance du campagnol des champs et des musaraignes sur le site d'étude de Chizé (panneau principal) et le site d'étude de Rochefort (*Ro*, encart)

La caractérisation de l'échelle spatiale de synchronie constitue une première source d'information sur le processus sous-jacents. Dans le cas du campagnol des champs il apparaît difficile de concevoir que la dispersion puisse être seule responsable de la synchronie observée à une très large échelle spatiale : les suivis longitudinaux des densités de micromammifères effectués à une échelle régionale suggèrent fortement que les fluctuations d'abondance du campagnol des champs sont synchronisées par un effet Moran. Il est particulièrement surprenant de constater la parfaite synchronie qui caractérise la pullulation de campagnol des champs de l'été 2007 (Figure 13), comme les précédentes, entre nos sites de piégeage de Rochefort et de Chizé séparés par environ 60 km. De plus, la même année 2007, des pullulations du campagnol des champs sont rapportées dans des départements de l'ouest ou du sud de la France (Aveyron), et dans des régions de l'ouest de l'Europe (Espagne, Breta comm. pers.). Enfin, il est particulièrement surprenant de noter la synchronie parfaite dans nos deux sites d'étude de la pullulation de Campagnol de champs avec une pullulation de musaraignes (Figure 13) qui ne

sont pourtant pas habituellement soumises à des fluctuations d'abondances aussi marquées que les campagnols des champs. Ce patron de pullulation synchrone entre deux espèces différentes (de part leur biologie ou leurs prédateurs) plaide en faveur d'un synchronisme à grande échelle généré par un effet Moran.

L'hétérogénéité des pratiques agricoles à petite échelle (quelques parcelles) contraste avec leur homogénéité à grande échelle (zone d'étude, région) aussi bien dans l'occupation des sols que dans la phénologie des pratiques agricoles. Il serait intéressant d'évaluer le rôle des pratiques agricoles et de leur saisonnalité, que l'on sait très homogènes au moins à l'échelle régionale, dans la cyclicité voire dans le synchronisme.

BIBLIOGRAPHIE

- Aars, J. & Ims, R. A. 2000 Population dynamic and genetic consequences of spatial density-dependent dispersal in patchy populations. *American Naturalist* **155**, 252-265.
- Agrell, J., Wolff, J. O. & Ylonen, H. 1998 Counter-strategies to infanticide in mammals: costs and consequences. *Oikos* **83**, 507-517.
- Andreassen, H. P. & Ims, R. A. 2001 Dispersal in patchy vole populations: Role of patch configuration, density dependence, and demography. *Ecology* **82**, 2911-2926.
- Angerbjorn, A., Tannerfeldt, M. & Lundberg, H. 2001 Geographical and temporal patterns of lemming population dynamics in Fennoscandia. *Ecography* **24**, 298-308.
- Arroyo, B., Garcia, J. T. & Bretagnolle, V. 2002 Conservation of the Montagu's harrier (*Circus pygargus*) in agricultural areas. *Animal Conservation* **5**, 283-290.
- barbujani, G. & Sokal, R. 1989 Zones of sharp genetic change in Europe are also linguistic boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1816-1819.
- Batzli, G. O. 1992 Dynamics of small mammal populations : a review. In *Wildlife 2001:populations* (ed. D. McCullough & R. Barnett), pp. 831-849: Elsevier.
- Benton, T. G., Lapsley, C. T. & Beckerman, A. P. 2001 Population synchrony and environmental variation: an experimental demonstration. *Ecology Letters* **4**, 236-243.
- Berry, O., Tocher, M. D. & Sarre, S. D. 2004 Can assignment tests measure dispersal? *Molecular Ecology* **13**, 551-561.
- Berteaux, D., Bety, J., Rengifo, E. & Bergeron, J. M. 1999 Multiple paternity in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*): investigating the role of the female. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **45**, 283-291.

- Berthier, K. 2005 Rôle de la dispersion dans le fonctionnement et le maintien à long terme des populations cycliques de rongeurs. Le cas d'*Arvicola terrestris*, rongeur prairial en Franche-Comté. Thèse de doctorat: Université de Franche-Comté.
- Berthier, K., Charbonnel, N., Galan, M., Chaval, Y. & Cosson, J. F. 2006 Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations. *Molecular Ecology* **15**, 2665-2676.
- Berthier, K., Galan, M., Foltete, J. C., Charbonnel, N. & Cosson, J. F. 2005 Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Molecular Ecology* **14**, 2861-2871.
- Bjornstad, O. N. 2000 Cycles and synchrony: two historical 'experiments' and one experience. *Journal of Animal Ecology* **69**, 869-873.
- Bjornstad, O. N., Ims, R. A. & Lambin, X. 1999a Spatial population dynamics: analyzing patterns and processes of population synchrony. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 427-432.
- Bjornstad, O. N., Stenseth, N. C. & Saitoh, T. 1999b Synchrony and scaling in dynamics of voles and mice in northern Japan. *Ecology* **80**, 622-637.
- Blaum, N. & Wichmann, M. C. 2007 Short-term transformation of matrix into hospitable habitat facilitates gene flow and mitigates fragmentation. *Journal of Animal Ecology* **76**, 1116-1127.
- Bohonak, A. J. 1999 Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology* **74**, 21-45.
- Boonstra, R., Krebs, C. J. & Stenseth, N. C. 1998 Population cycles in small mammals: The problem of explaining the low phase. *Ecology* **79**, 1479-1488.
- Bossart, J. L. & Prowell, D. P. 1998 Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 202-206.
- Boyce, C. C. K. & Boyce, J. L. 1988a Population biology of *Microtus arvalis*. I. Lifetime reproductive success of solitary and grouped breeding females. *Journal of Animal Ecology* **57**, 711-722.
- Boyce, C. C. K. & Boyce, J. L. 1988b Population biology of *Microtus arvalis*. II. Natal and breeding dispersal of females. *Journal of Animal Ecology* **57**, 723-736.
- Boyce, C. C. K. & Boyce, J. L. 1988c Population biology of *Microtus arvalis*. III. Regulation of numbers and breeding dispersion of females *Journal of Animal Ecology* **57**, 737-754.
- Briner, T., Nentwig, W. & Airoldi, J. P. 2005 Habitat quality of wildflower strips for common voles (*Microtus arvalis*) and its relevance for agriculture. *Agriculture Ecosystems & Environment* **105**, 173-179.
- Broquet, T., Johnson, C. A., Petit, E., Thompson, I., Burel, F. & Fryxell, J. M. 2006 Dispersal and genetic structure in the American marten, *Martes americana*. *Molecular Ecology* **15**, 1689-1697.

- Busch, J. D., Waser, P. M. & DeWoody, J. A. 2007 Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology* **16**, 2450-2462.
- Butet, A. & Leroux, A. B. A. 1993 Effect of Prey on a Predators Breeding Success - a 7-Year Study on Common Vole (*Microtus-Arvalis*) and Montagus Harrier (*Circus-Pygargus*) in a West France Marsh. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **14**, 857-865.
- Butet, A. & Leroux, A. B. A. 2001 Effects of agriculture development on vole dynamics and conservation of *Montagu's harrier* in western French wetlands. *Biological Conservation* **100**, 289-295.
- Cadet, C., Ferriere, R., Metz, J. A. J. & van Baalen, M. 2003 The evolution of dispersal under demographic stochasticity. *American Naturalist* **162**, 427-441.
- Caizergues, A. & Lambrechts, M. M. 1999 Male "macho" mammals exploiting females versus male "Don Juan" birds exploited by females: the opposite-sex exploitation (OSEX) theory. *Ecology Letters* **2**, 204-206.
- Chapin, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D. U., Lavorel, S., Sala, O. E., Hobbie, S. E., Mack, M. C. & Diaz, S. 2000 Consequences of changing biodiversity. *Nature* **405**, 234-242.
- Charbonnel, N., Chaval, Y., Berthier, K., Deter, J., Morand, S., Palme, R. & Cosson, J. F. 2008 Stress and demographic decline: a potential effect mediated by impairment of reproduction and immune function in cyclic vole populations. *Physiological and Biochemical Zoology* **81**, 63-73.
- Chen, C., Durand, E., Forbes, F. & Francois, O. 2007 Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* **7**, 747-756.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhondt, A. A. & Nichols, J. D. 2001 *Dispersal*. Oxford: Oxford University Press.
- Cornuet, J. M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A. & Solignac, M. 1999 New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**, 1989-2000.
- Coulon, A., Cosson, J. F., Angibault, J. M., Cargnelutti, B., Galan, M., Morellet, N., Petit, E., Aulagnier, S. & Hewison, A. J. M. 2004 Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology* **13**, 2841-2850.
- Coulon, A., Guillot, G., Cosson, J. F., Angibault, J. M. A., Aulagnier, S., Cargnelutti, B., Galan, M. & Hewison, A. J. M. 2006 Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* **15**, 1669-1679.
- Crawford, T. J. 1982 What is a population. In *Evol. Ecol.* (ed. B. Shorrocks), pp. 135-173. Leeds.
- de Cornulier, T. 2005 Composantes de la distribution spatiale d'un prédateur : effets respectifs de l'habitat, des ressources alimentaires et des interactions comportementales. Thèse de doctorat: Université Claude Bernard - Lyon 1.

- Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Musard, P., Toussaint, M., Truchetet, D., Stahl, P., Poule, M. L., Artois, M., Damange, J. P. & Quere, J. P. 1992 Land-Use Patterns and Types of Common Vole (*Microtus-Arvalis*) Population-Kinetics. *Agriculture Ecosystems & Environment* **39**, 153-169.
- Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Quere, J. P. & Fichet, E. 1996 Effect of landscape structure on Common Vole (*Microtus arvalis*) distribution and abundance at several space scales. *Landscape Ecology* **11**, 279-288.
- Dieckmann, U., O'Hara, B. & Weisser, W. 1999 The evolutionary ecology of dispersal. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 88-90.
- Dobly, A. 2005 Scent marking by common voles *Microtus arvalis* in the presence of a same-sex neighbour. *Acta Theriologica* **50**, 343-356.
- Dobly, A. & Rozenfeld, F. M. 2000 Burrowing by common voles (*Microtus arvalis*) in various social environments. *Behaviour* **137**, 1443-1462.
- Dobzhansky, T. & Wright, S. 1943 Genetics of natural populations. X. Dispersal rates in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **28**, 304-340.
- Ebensperger, L. A. 1998 Strategies and counterstrategies to infanticide in mammals. *Biological Reviews* **73**, 321-346.
- Ehrich, D. & Jorde, P. E. 2005 High genetic variability despite high-amplitude population cycles in lemmings. *Journal of Mammalogy* **86**, 380-385.
- Ehrich, D., Jorde, P. E., Krebs, C. J., Kenney, A. J., Stacy, J. E. & Stenseth, N. C. 2001a Spatial structure of lemming populations (*Dicrostonyx groenlandicus*) fluctuating in density. *Molecular Ecology* **10**, 481-495.
- Ehrich, D., Krebs, C. J., Kenney, A. J. & Stenseth, N. C. 2001b Comparing the genetic population structure of two species of arctic lemmings: more local differentiation in *Lemmus trimucronatus* than in *Dicrostonyx groenlandicus*. *Oikos* **94**, 143-150.
- Ehrich, D. & Stenseth, N. C. 2001 Genetic structure of Siberian lemmings (*Lemmus sibiricus*) in a continuous habitat: large patches rather than isolation by distance. *Heredity* **86**, 716-30.
- Elton, C. S. 1924 Periodic fluctuations in the numbers of animals: their causes and effects. *British Journal of Experimental Biology* **2**, 119-163.
- Epps, C. W., Palsboll, P. J., Wehausen, J. D., Roderick, G. K., Ramey, R. R. & McCullough, D. R. 2005 Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep. *Ecology Letters* **8**, 1029-1038.
- Estoup, A. & Angers, B. 1998 Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. *Advances in Molecular Ecology* **306**, 55-86.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. 2003 Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.

- Favre, L., Balloux, F., Goudet, J. & Perrin, N. 1997 Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocivura russula*: Evidence from field data and microsatellite patterns. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **264**, 127-132.
- Foll, M. & Gaggiotti, O. 2006 Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of Populations. *Genetics* **174**, 875-891.
- Foll, M. & Gaggiotti, O. E. 2005 COLONISE: a computer program to study colonization processes in metapopulations. *Molecular Ecology Notes* **5**, 705-707.
- Fontanillas, P., Petit, E. & Perrin, N. 2004 Estimating sex-specific dispersal rates with autosomal markers in hierarchically structured populations. *Evolution* **58**, 886-894.
- Francois, O., Ancelet, S. & Guillot, G. 2006 Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics* **174**, 805-816.
- Frankham, R. 1995 Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* **29**, 305-327.
- Frankham, R. 2005 Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126**, 131-140.
- Friedenberg, N. A. 2003 Experimental evolution of dispersal in spatiotemporally variable microcosms. *Ecology Letters* **6**, 953-959.
- Gaggiotti, O. E. 1996 Population genetic models of source-sink metapopulations. *Theoretical Population Biology* **50**, 178-208.
- Gaggiotti, O. E., Brooks, S. P., Amos, W. & Harwood, J. 2004 Combining demographic, environmental and genetic data to test hypotheses about colonization events in metapopulations. *Molecular Ecology* **13**, 811-825.
- Gandon, S. 1999 Kin competition, the cost of inbreeding and the evolution of dispersal. *Journal of Theoretical Biology* **200**, 345-364.
- Gandon, S. & Michalakis, Y. 2001 Multiple causes of the evolution of dispersal. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols): Oxford University Press.
- Gerlach, G. & Musolf, K. 2000 Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology* **14**, 1066-1074.
- Giordano, A. R., Ridenhour, B. J. & Storfer, A. 2007 The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology* **16**, 1625-1637.
- Goudet, J. 2001 FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3): Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Goudet, J. 2005 HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* **5**, 184-186.
- Goudet, J., Perrin, N. & Waser, P. 2002 Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology* **11**, 1103-1114.
- Greenwood, P. J. 1980 Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* **28**, 1140-1162.

- Gromov, V. S. 2005 Types of spatial and ethological structure of rodent populations. *Zoologicheskyy Zhurnal* **84**, 1003-1014.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & Cosson, J. F. 2005a A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**, 1261-1280.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. 2005b GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* **5**, 712-715.
- Gulve, P. S. 1994 Distribution and Extinction Patterns within a Northern Metapopulation of the Pool Frog, *Rana-Lessonae*. *Ecology* **75**, 1357-1367.
- Gundersen, G., Andreassen, H. P. & Ims, R. A. 2002 Individual and population level determinants of immigration success on local habitat patches: an experimental approach. *Ecology Letters* **5**, 294-301.
- Hamilton, G., Currat, M., Ray, N., Heckel, G., Beaumont, M. & Excoffier, L. 2005 Bayesian estimation of recent migration rates after a spatial expansion. *Genetics* **170**, 409-417.
- Hamilton, W. D. & Mayr, R. M. 1977 Dispersal in stable habitats. *Nature* **269**, 578-581.
- Handley, L. J. L. & Perrin, N. 2007 Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* **16**, 1559-1578.
- Hanski, I. & Gaggiotti, O. 2004 *Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Hanski, I. A. & Gilpin, M. E. 1997 *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution*. New York, USA: Academic Press, New York.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997 *Principles of Population Genetics*. 3. Sunderland, Massachusetts.: Sinauer Associates.
- Haydon, D. & Steen, H. 1997 The effects of large- and small-scale random events on the synchrony of metapopulation dynamics: a theoretical analysis. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **264**, 1375-1381.
- Hedrick, P. W. 2005 *Genetics of populations*. Boston, MA: Jones and Bartlett.
- Heise, S. R. & Rozenfeld, F. M. 2002 Effect of odour cues on the exploratory behaviour of female common voles living in matriarchal groups. *Behaviour* **139**, 897-911.
- Holderegger, R. & Wagner, H. H. 2008 Landscape genetics. *Bioscience* **58**, 199-207.
- Hudson, P. J. & Bjornstad, O. N. 2003 Vole stranglers and lemming cycles. *Science* **302**, 797-798.
- Hutchison, D. W. & Templeton, A. R. 1999 Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.
- Ims, R. A. & Andreassen, H. P. 2000 Spatial synchronization of vole population dynamics by predatory birds. *Nature* **408**, 194-196.

- Ims, R. A. & Andreassen, H. P. 2005 Density-dependent dispersal and spatial population dynamics. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 913-918.
- Ims, R. A., Henden, J. A. & Killengreen, S. T. 2008 Collapsing population cycles. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 79-86.
- Ims, R. A. & Hjermann, D. O. 2001 Condition dependent dispersal. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols). Oxford University Press.
- Ims, R. A. & Yoccoz, N. G. 1997 Studying transfer processes in metapopulations. In *Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution* (ed. I. A. Hanski & M. E. Gilpin). San Diego: Academic press.
- Inchausti, P. & Ginzburg, L. R. 1998 Small mammals cycles in northern Europe: patterns and evidence for a maternal effect hypothesis. *Journal of Animal Ecology* **67**, 180-194.
- Ishibashi, Y., Saitoh, T., Abe, S. & Yoshida, M. C. 1997 Sex-related spatial kin structure in a spring population of grey-sided voles *Clethrionomys rufocanus* as revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* **6**, 63-71.
- Jacob, J. 2003a Body weight dynamics of common voles in agro-ecosystems. *Mammalia* **67**, 559-566.
- Jacob, J. 2003b Short-term effects of farming practices on populations of common voles. *Agriculture Ecosystems & Environment* **95**, 321-325.
- Ji, W., Sarre, S. D., Aitken, N., Hankin, R. K. S. & Clout, M. N. 2001 Sex-biased dispersal and a density-independent mating system in the Australian brushtail possum, as revealed by minisatellite DNA profiling. *Mol Ecol* **10**, 1527-1537.
- Johannesen, E., Andreassen, H. P. & Ims, R. A. 2000 Spatial explicit demography: The effects habitat patch isolation have on vole matriline. *Ecology Letters* **3**, 48-57.
- Johnson, M. L. & Gaines, M. S. 1990 Evolution of Dispersal: Theoretical Models and Empirical Tests Using Birds and Mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**, 449-480.
- Jombart, T., Devillard, S., Dufour, A. B. & Pontier, D. 2008 Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity* **101**, 92-103.
- Jones, A. G. & Ardren, W. R. 2003 Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* **12**, 2511-2523.
- Jones, W. 1986 Survivorship in philopatric and dispersing kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Ecology* **67**, 202-207.
- Jones, W., Waser, P., Elliott, N., Link, N. & Bush, B. 1988 Phylopatry, dispersal, and habitat saturation in the banner-tailed kangaroo rats, *Dipodomys spectabilis*. *Ecology* **69**, 1466-1473.
- Kaitala, V. & Ranta, E. 1998 travelling wave dynamics and self-organization in a spatio-temporally structured population. *Ecology Letters* **1**, 186-192.

- Keller, I., Nentwig, W. & Lurgiader, C. R. 2004 Recent habitat fragmentation due to roads can lead to significant genetic differentiation in an abundant flightless ground beetle. *Molecular Ecology* **13**, 2983-2994.
- Kendall, B. E., Bjornstad, O. N., Bascompte, J., Keitt, T. H. & Fagan, W. F. 2000 Dispersal, environmental correlation, and spatial synchrony in population dynamics. *American Naturalist* **155**, 628-636.
- Kerth, G. & Petit, E. 2005 Colonization and dispersal in a social species, the Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* **14**, 3943-3950.
- Kimura, M. & Weiss, G. H. 1964 The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**, 561-576.
- Koenig, W. D. 1999 Spatial autocorrelation of ecological phenomena. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 22-26.
- Koenig, W. D. 2002 Global patterns of environmental synchrony and the Moran effect. *Ecography* **25**, 283-288.
- Koenig, W. D., Van Vuren, D. & Hooge, P. N. 1996 Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 514-517.
- Lambin, X., Aars, J. & Piertney, S. B. 2001 Dispersal, intraspecific competition, kin competition and kin facilitation: a review of the empirical evidence. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp. 110-122: Oxford University Press.
- Lambin, X., Bretagnolle, V. & Yoccoz, N. G. 2006 Vole population cycles in northern and southern Europe: Is there a need for different explanations for single pattern? *Journal of Animal Ecology* **75**, 340-349.
- Lambin, X., Elston, D. A., Petty, S. J. & MacKinnon, J. L. 1998 Spatial asynchrony and periodic travelling waves in cyclic populations of field voles. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265**, 1491-6.
- Lambin, X. & Krebs, C. J. 1993 Influence of female relatedness on the demography of townsend's vole populations in spring. *Journal of Animal Ecology* **62**, 536-550.
- Lambin, X., Petty, S. J. & MacKinnon, J. L. 2000 Cyclic dynamics in field vole populations and generalist predation. *Journal of Animal Ecology* **69**, 106-118.
- Lawson Handley, L. J. & Perrin, N. 2007 Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* **16**, 1559-1578.
- Le Galliard, J. F., Gundersen, G., Andreassen, H. P. & Stenseth, N. C. 2006 Natal dispersal, interactions among siblings and intrasexual competition. *Behavioral Ecology* **17**, 733-740.
- Le Louarn, H. & Quéré, J.-P. 2003 *Les Rongeurs de France: Faunistique et biologie*. Paris: INRA.

- Leblois, R., Estoup, A. & Rousset, F. 2003 Influence of mutational and sampling factors on the estimation of demographic parameters in a "continuous" population under isolation by distance. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 491-502.
- Leblois, R., Estoup, A. & Rousset, F. 2008 IBDSim: a computer program to simulate genotypic data under isolation by distance. *Molecular Ecology Resources* **9999**.
- Leblois, R., Rousset, F. & Estoup, A. 2004 Influence of spatial and temporal heterogeneities on the estimation of demographic parameters in a continuous population using individual microsatellite data. *Genetics* **166**, 1081-1092.
- Lenormand, T. 2002 Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 183-189.
- Li, C. C., Weeks, D. E. & Chakravarti, A. 1993 Similarity of DNA Fingerprints Due to Chance and Relatedness. *Human Heredity* **43**, 45-52.
- Lidicker, W. Z. & Stenseth, N. C. 1992 To disperse or not to disperse: who does it and why? In *Animal dispersal: small mammals as a model*. (ed. N. C. Stenseth & W. Z. Lidicker), pp. 21-36. London: Chapman and Hall.
- Liebholt, A., Koenig, W. D. & Bjornstad, O. N. 2004 Spatial synchrony in population dynamics. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **35**, 467-490.
- Lin, Y. T. K. & Batzli, G. O. 2001 The influence of habitat quality on dispersal demography, and population dynamics of voles. *Ecological Monographs* **71**, 245-275.
- Lubchenco, J. 1998 Entering the century of the environment: A new social contract for science. *Science* **279**, 491-497.
- Lundberg, P., Ranta, E., Ripa, J. & Kaitala, V. 2000 Population variability in space and time. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 460-464.
- Lynch, M. & Ritland, K. 1999 Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* **152**, 1753-1766.
- Mackinnon, J. L., Petty, S. J., Elston, D. A., Thomas, C. J., Sherratt, T. N. & Lambin, X. 2001 scale invariant spatio-temporal patterns of field vole density. *Journal of Animal Ecology* **70**, 101-111.
- Manel, S., Berthier, P. & Luikart, G. 2002 Detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* **16**, 650-659.
- Manel, S., Gaggiotti, O. E. & Waples, R. S. 2005 Assignment methods: matching biological questions techniques with appropriate. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 136-142.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G. & Taberlet, P. 2003 Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 189-197.
- Matthysen, E. 2005 Density-dependent dispersal in birds and mammals. *Ecography* **28**, 403-416.

- Millions, D. G. & Swanson, B. J. 2007 Impact of natural and artificial barriers to dispersal on the population structure of bobcats. *Journal of Wildlife Management* **71**, 96-102.
- Millon, A. & Bretagnolle, V. 2005 Nonlinear and population-specific offspring sex ratios in relation to high variation in prey abundance. *Oikos* **108**, 535-543.
- Mitchell-Jones, A. J., Amori, G. & Bogdanowicz, W. 1999 *The Atlas of European Mammals*. London: Poyser, T. Poyser, A.D.
- Moran, P. A. P. 1953 The statistical analysis of the Canadian lynx cycle. II. Synchronization and meteorology. *Australian Journal of Zoology* **1**, 291-298.
- Motro, U. & Thomson, G. 1982 On Heterozygosity and the Effective Size of Populations Subject to Size Changes *Evolution* **36**, 1059-1066.
- Nagy, M., Heckel, G., Voigt, C. C. & Mayer, F. 2007 Female-biased dispersal and patrilocal kin groups in a mammal with resource-defence polygyny. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 3019-3025.
- Nathan, R. 2001 The challenges of studying dispersal. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 481-483.
- Nei, M., Marwama, T. & Chakraborty, R. 1975 The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Orlowski, G. & Nowak, L. 2006 Factors influencing mammals roadkills in the agricultural landscape of south-western Poland. *Polish Journal of Ecology* **54**, 283-294.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M. & Estoup, A. 2004 Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**, 55-65.
- Pain, D. J. & Pienkowski, M. W. 1997 *Farming and Birds in Europe. The Common Agricultural Policy and its Implications for Bird Conservation*. London: Academic Press.
- Pannell, J. R. & Charlesworth, B. 2000 Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**, 1851-1864.
- Paradis, E., Baillie, S. R., Sutherland, W. J. & Gregory, R. D. 1998 Patterns of natal and breeding dispersal in birds. *Journal of Animal Ecology* **67**, 518-536.
- Paradis, E., Baillie, S. R., Sutherland, W. J. & Gregory, R. D. 1999 Dispersal and spatial scale affect synchrony in spatial population dynamics. *Ecol Letters* **2**, 114-120.
- Patterson, N., Price, A. L. & Reich, D. 2006 Population structure and eigenanalysis. *Plos Genetics* **2**, 2074-2093.
- Peacock, M. M. 1997 Determining natal dispersal patterns in a population of North American pikas (*Ochotona princeps*) using direct mark-resight and indirect genetic methods. *Behavioral Ecology* **8**, 340-350.

- Peakall, R., Ruibal, M. & Lindenmayer, D. B. 2003 Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* **57**, 1182-1195.
- Perrin, N. & Goudet, J. 2001 Inbreeding, kinship, and the evolution of natal dispersal. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp. 123-141: Oxford University Press.
- Perrin, N. & Mazalov, V. 1999 Dispersal and inbreeding avoidance. *American Naturalist* **154**, 282-292.
- Perrin, N. & Mazalov, V. 2000 Local competition, inbreeding, and the evolution of sex-biased dispersal. *American Naturalist* **155**, 116-127.
- Petit, E., Balloux, F. & Excoffier, L. 2002 Mammalian population genetics: why not Y? *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 28-33.
- Petty, S. J., Lambin, X., Sherratt, T. N., Thomas, C. J., Mackinnon, J. L., Coles, C. F., Davison, M. & Little, B. 2000 Spatial synchrony in field vole *Microtus agrestis* abundance in a coniferous forest in northern England: The role of vole-eating raptors. *Journal of Applied Ecology* **37**, 136-147.
- Pimm, S. L., Russell, G. J., Gittleman, J. L. & Brooks, T. M. 1995 The Future of Biodiversity. *Science* **269**, 347-350.
- Plante, Y., Boag, P. T. & Bradley, N. W. 1989 Microgeographic variation in mitochondrial DNA of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) in relation to population density. *Evolution* **43**, 1522-1537.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Pusenius, J., Viitala, J., Marienberg, T. & Ritvanen, S. 1998 Matrilineal kin clusters and their effect on reproductive success in the field vole *Microtus agrestis*. *Behavioral Ecology* **9**, 85-92.
- R Development Core Team. 2008 R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rannala, B. & Mountain, J. L. 1997 Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9197-9201.
- Riley, S. P. D., Pollinger, J. P., Sauvajot, R. M., York, E. C., Bromley, C., Fuller, T. K. & Wayne, R. K. 2006 A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* **15**, 1733-1741.
- Ronce, O. 2007 How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **38**, 231-253.
- Ronce, O., Olivieri, I., Clobert, J. & Danchin, E. 2001 Perspectives on the study of dispersal evolution. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp. 314-357: Oxford University Press.

- Rousset, F. 1997 Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset, F. 1999 Genetic differentiation within and between two habitats. *Genetics* **151**, 397-407.
- Rousset, F. 2000 Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 58-62.
- Rousset, F. & Raymond, M. 1997 Statistical analyses of population genetic data: New tools, old concepts. *Trends in Ecology & Evolution* **12**, 313-317.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. 1988 Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M. & Wall, D. H. 2000 Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**, 1770-1774.
- Salamolard, M., Butet, A., Leroux, A. & Bretagnolle, V. 2000 Responses of an avian predator to variations in prey density at a temperate latitude. *Ecology* **81**, 2428-2441.
- Schweizer, M., Excoffier, L. & Heckel, G. 2007 Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* **16**, 2463-2473.
- Scribner, K. T. & Chesser, R. K. 1993 Environmental and Demographic Correlates of Spatial and Seasonal Genetic-Structure in the Eastern Cottontail (*Sylvilagus-Floridanus*). *Journal of Mammalogy* **74**, 1026-1044.
- Sih, A., Jonsson, B. G. & Luikart, G. 2000 Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 132-134.
- Slatkin, M. 1977 Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical Population Biology* **12**, 253-262.
- Slatkin, M. 1987 Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Slatkin, M. 1991 Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research* **58**, 167-175.
- Slatkin, M. 1993 Isolation by Distance in Equilibrium and Nonequilibrium Populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Slatkin, M. 1994 Gene flow and population structure. In *Ecological Genetics* (ed. P. L.A. Real, New Jersey), pp. 3-17.
- Slatkin, M. & Barton, N. H. 1989 A Comparison of 3 Indirect Methods for Estimating Average Levels of Gene Flow. *Evolution* **43**, 1349-1368.

- Smouse, P. E. & Peakall, R. 1999 Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* **82**, 561-573.
- Spitz, F. 1977 Le campagnol des champs (*Microtus arvalis* [Pallas]) en Europe. *Bull. OEPP* **7**, 165-175.
- Stacey, P. B., Johnson, V. A. & Taper, M. L. 1997 Migration within metapopulations: the impact upon local population dynamics. In *Metapopulation Biology* (ed. I. Hanski & M. Gilpin), pp. 267-291. London: Academic Press.
- Stenseth, N. C. 1999 Population cycles in voles and lemmings: density dependence and phase dependence in a stochastic world. *Oikos* **87**, 427-461.
- Stenseth, N. C. & Ims, R. A. 1993 Population dynamics of lemmings: temporal and spatial variation - an introduction. In *The Biology of Lemmings* (ed. N. C. Stenseth & I. R. A.), pp. 61-96. London: Academic Press.
- Stenseth, N. C. & Lidicker, W. Z., Jr. 1992 *Animal Dispersal*. London: Chapman & Hall.
- Storfer, A., Murphy, M. A., Evans, J. S., Goldberg, C. S., Robinson, S., Spear, S. F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierling, L. & Waits, L. P. 2007 Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* **98**, 128-142.
- Streiff, R., Ducouso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Gloessl, J. & Kremer, A. 1999 Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* **8**, 831-841.
- Sugg, D. W., Chesser, R. K., Stephen Dobson, F. & Hoogland, J. L. 1996 Population genetics meets behavioral ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 338-342.
- Sumner, J., Rousset, F., Estoup, A. & Moritz, C. 2001 'Neighbourhood' size, dispersal and density estimates in the prickly forest skink (*Gnypetoscincus queenslandiae*) using individual genetic and demographic methods. *Molecular Ecology* **10**, 1917-1927.
- Telfer, S., Piertney, S. B., Dallas, J. F., Stewart, W. A., Marshall, F., Gow, J. L. & Lambin, X. 2003 Parentage assignment detects frequent and large-scale dispersal in water voles. *Molecular Ecology* **12**, 1939-1949.
- Tkadlec, E. & Stenseth, N. C. 2001 A new geographical gradient in vole population dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 1547-1552.
- Topping, C., Ostergaard, S., Pertoldi, C. & Bach, L. A. 2003 Modelling the loss of genetic diversity in vole populations in a spatially and temporally varying environment. *Annales Zoologici Fennici* **40**, 255-267.
- Turchin, P. 2003 Ecology: Evolution in population dynamics. *Nature* **424**, 257-258.
- Turchin, P. & Hanski, I. 2001 Contrasting alternative hypotheses about rodent cycles by translating them into parameterized models. *Ecology Letters* **4**, 267-276.
- Vekemans, X. & Hardy, O. J. 2004 New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* **13**, 921-935.

- Vitalis, R. 2002 Sex-specific genetic differentiation and coalescence times: estimating sex-biased dispersal rates. *Molecular Ecology* **11**, 125-138.
- Vuorinen, J. A. & Eskelinen, O. 2005 Long-term stability of allozyme frequencies in a wood lemming, *Myopus schisticolor*, population with a biased sex ratio and density fluctuations. *Heredity* **94**, 443-447.
- Wade, M. J. & McCauley, E. 1988 Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution* **42**, 995-1005.
- Wang, J. 2004 Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation biology* **18**, 332-343.
- Wang, J. L. 2002 An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* **160**, 1203-1215.
- Waples, R. S. & Gaggiotti, O. 2006 What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**, 1419-1439.
- Watts, P. C., Rousset, F., Saccheri, I. J., Leblois, R., Kemp, S. J. & Thompson, D. J. 2007 Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale* : Odonata : Zygoptera) populations: analysis of 'neighbourhood size' using a more precise estimator. *Molecular Ecology* **16**, 737-751.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Whitlock, M. C. 1992 Temporal fluctuations in demographic parameters and the genetic variance among populations. *Evolution* **46**, 608-615.
- Whitlock, M. C. 2001 Dispersal and genetic properties of metapopulations. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp. 273-282. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Whitlock, M. C. & McCauley, D. E. 1990 Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlations within founding groups. *Evolution* **44**, 1717-1724.
- Whitlock, M. C. & McCauley, D. E. 1999 Indirect measures of gene flow and migration $F_{ST}^{1/(4Nm+1)}$. *Heredity* **52**, 117-125.
- Williams, D. A. & Rabenold, K. N. 2005 Male-biased dispersal, female philopatry, and routes to fitness in a social corvid. *Journal of Animal Ecology* **74**, 150-159.
- Wright, S. 1931 Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright, S. 1942 Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright, S. 1951 The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.

MANUSCRITS

MANUSCRITS DIRECTEMENT LIES AUX RESULTATS PRESENTES DANS CETTE THESE

ARTICLE 1: Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis* 95

B. Gauffre, M. Galan, V. Bretagnolle and J.F. Cosson. **Molecular Ecology Notes** 2007 7, 830-832.

ARTICLE 2: Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape 99

B. Gauffre, A. Estoup, V. Bretagnolle and J.F. Cosson. **Molecular Ecology** 2008 17, 4619-4629.

ARTICLE 3: Sex-biased dispersal patterns depend on the spatial scale in a social rodent 111

B. Gauffre, E. Petit, S. Brodier, V. Bretagnolle and J. F. Cosson. Soumis à **Proceedings of the royal society B**.

ARTICLE 4: Short-term variations in gene flow in a cyclic common vole population 139

B. Gauffre, T. Cornulier, P. Inchausti, K. Berthier, Y. Chaval, J. F. Cosson and V. Bretagnolle. **En préparation**.

ARTICLE 5: **Kinship, dispersal and hantavirus transmission in bank and common voles** 168

Deter J., Chaval Y., Galan M., Gauffre B., Morand S., Henttonen H., Laakkonen J., Voutilainen L., Charbonnel N., Cosson J.F. **Archives of Virology** 2008 153, 435-444.

ARTICLE 6: **Comprehensive cross-amplification of microsatellite multiplex sets across the rodent genus *Microtus*** 179

Ruda M., Ziak D., Gauffre B., Zima J., Martinkova N. **Molecular Ecology Resources** (sous presse).

ARTICLE 1 :

Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole,
Microtus arvalis

PRIMER NOTE

Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*

B. GAUFFRE,* M. GALAN,* V. BRETAGNOLLE† and J. F. COSSON*

*CBGP-INRA, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France, †Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS UPR 1934, FR-79360 Villiers-en-bois, France

Abstract

We isolated and characterized 14 dinucleotide microsatellite loci in the common vole *Microtus arvalis* (Palas). Two multiplex panels both comprising seven loci were developed. Application to a set of 21 individuals allowed clear and easy characterization of allele sizes except for two loci which were then withdrawn from further analyses. The number of alleles ranged from four to 19 per locus with the observed heterozygosity ranging from 0.55 to 0.95. These sets of microsatellite loci provide high throughput capacity for population genetic studies at a minimum cost.

Keywords: common vole, microsatellite, *Microtus arvalis*, multiplex, Rodentia

Received 24 November 2006; revision accepted 8 January 2007

The common vole, *Microtus arvalis* (Palas, 1778), is a small rodent endemic to Europe where it represents probably the most abundant mammal in open grasslands and temperate farmland habitats (Mitchell-Jones *et al.* 1999). In Western France, this rodent shows highly regular population cycles (Lambin *et al.* 2006) that govern the population dynamics of specialist avian and mammalian predators, such as the Montagu's harrier *Circus pygargus* (Salamolard *et al.* 2000), a threatened raptor in France (Thiollay & Bretagnolle 2004). Using a population genetics approach, we aim to assess how farmland landscape features may structure vole populations, dispersal, and ultimately prey availability for raptors along the different density phases of the vole demographic cycle. Because assignment tests, as well as the detection of genetic discontinuities or bottlenecks require a large number of polymorphic markers, we developed microsatellite loci for the common vole. We present here data on the isolation of 14 dinucleotide polymorphic microsatellite markers which were optimized for multiplex polymerase chain reaction (PCR) and genotyping.

Microsatellite screening was performed following Estoup and Turgeon (personal communication, see <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm> for detailed protocol). Genomic DNA was extracted from muscles of a toe from a male of *M. arvalis* captured in Franche-Comté, using silica columns with the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). Total genomic DNA was digested using *RsaI* restriction enzyme (Promega). A 500–900 bp fraction of the digested DNA was selected, purified and ligated to Rsa-21 and Rsa-25 linkers (Rsa-21 (5'–3') CTCTTGCTTACGCGTGGACTA; Rsa-25 (5'–3') phosphate-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAG). The enrichment procedure followed the protocol from Kijas *et al.* (1994) based on streptavidin-coated magnetic particles (Magnesphere, Promega), with slight modifications. The 5'-biotinylated (TC)₁₀ and (TG)₁₀ oligonucleotides were both used as probes. Enrichment products were then amplified with Rsa-21, purified and ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega) then transformed into *Escherichia coli* competent cells (JM109, Promega). A total of 1638 recombinant clones were transferred on Hybond-N nylon membranes (Amersham). Colonies were hybridized at 46.5 °C with the mixture of oligonucleotide probes (CT)₁₀ and (TG)₁₀-labelled with the DIG oligonucleotide tailing kit (Roche). A total of 193 positive clones were detected, 80 of them were sequenced using a dye-terminator cycle sequencing and an automated sequencer (Genome Express). A total of 25 unique sequences containing clear repeated motifs were appropriate for designing primers. We

Correspondance: Bertrand Gauffre, Fax: 33(0)499623345; E-mail: Bertrand.Gauffre@ensam.inra.fr

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

designed pairs of primers using the PRIMER DESIGNER software (version 2.0, Scientific & Educational Software 1990, 1991).

The 25 selected loci were first tested using monolocus PCRs. Fourteen of them provided good quality and polymorphic amplification products and were thus retained for multiplex PCRs. The forward primer of each locus was 5'-end-labelled with a fluorescent dye (FAM, HEX or NED). Type of dye was chosen in order to analyse simultaneously loci of similar allelic size and to avoid overlapping between loci with the same dye. Then, based on size limitations and amplification specificity, we distributed the 14 microsatellites in two sets (Set 1 and Set 2); both containing seven loci amplified in the same PCR (PCR1 for Set 1 and PCR2 for Set 2) and analysed in the same run (Table 1). Amplification of the two PCRs was performed on a Mastercycler ep-gradient-S (Eppendorf) using the Multiplex PCR Kit (QIAGEN). The multiplex's PCR were conducted in 10 µL reaction volume containing the QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (1×) (including *Taq*, dNTPs and 3 mM of MgCl₂ as final concentration), 0.2 µM of each primer, about 50 ng of genomic DNA, and RNase-free water. Both multiplex PCR started with an

initial activation step at 95 °C for 15 min, followed by 34 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 57 °C (PCR1) or 63 °C (PCR2) for 90 s, extension at 72 °C for 60 s and final extension of 60 °C for 30 min. The PCR products were detected using a monocalillary ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems), 0.5 µL the PCR products were mixed with 19 µL ultragrade formamide and 0.5 µL GENESCAN 400-ROX size standard (Applied Biosystems).

We tested the two microsatellite sets on 21 *M. arvalis* trapped on a 2-ha area in central western France (46.11°N, 0.28°W) in May 2006. The 14 microsatellites loci were highly polymorphic, with an observed number of alleles per locus ranging from four to 19 (Table 2). Tests for genotypic disequilibrium and deviations from the Hardy–Weinberg proportions were performed using GENEPOP (Raymond & Rousset 1995). Of the 14 loci, four displayed significant deviations from Hardy–Weinberg expectations ($P < 0.05$; see Table 2). Because of no amplification for some individuals and a large number of homozygotes, we suspected the presence of null allele(s) in high frequency for loci *Ma-42* and *Ma-37* (Table 2). Thus, we decided to

Table 1 Characteristics of the 14 loci isolated in *Microtus arvalis*

	Locus	Primer sequence (5'–3') F, forward; R, reverse	Repeat motif	Size of cloned allele (bp)	Dye	GenBank Accession no.
Set 1	<i>Ma-09</i>	F: CCCTAAGGAATAGCATCTGAG R: GAATGTATGTGGAAGCCAGG	(AC) ₁₈	96	FAM	EF177194
	<i>Ma42</i>	F: TTCCTTGCCTGATGGTAGAG R: CTCCTAAGGATGGCTGCTG	(GT) ₂₄	292	FAM	EF177195
	<i>Ma35</i>	F: AGAGTATGGCTGAGGGTG R: GCCAGAGCAGTGTGATG	(GT) ₁₈	111	HEX	EF177196
	<i>Ma54</i>	F: CGAATATGCTGTCTCACTTCC R: AGATGTCCTGCTGTGTTTCC	(TG) ₃ CG(TG) ₈ CG(TG) ₉	193	HEX	EF177197
	<i>Ma66</i>	F: AAGGCTGGTGGATGTCAGG R: TGCAAGGCAGGATTTCTACC	(TG) ₂₄	254	HEX	EF177198
	<i>Ma88</i>	F: AAGGACGATGAGGACCAACC R: CGGAATGGCAGGACAGC	(GA) ₂₇	133	NED	EF177199
	<i>Ma30</i>	F: TAGAACAAAGCTTGGACCC R: CCTGGCTTAGACAGAGTGG	(TC) ₂₃ (TG) ₁₆	241	NED	EF177200
Set 2	<i>Ma68</i>	F: GACTTTTTCATAGAAATGAGGTTTATG R: TCTGAAGCATAGCAACAATGG	(AC) ₁₀ GC(AC) ₁₂	136	FAM	EF177201
	<i>Ma81</i>	F: TCCTCATATTGAGCTTCTGTCC R: AACTTGCAGGTGACCGAGC	(AC) ₂₁	208	FAM	EF177202
	<i>Ma37</i>	F: TTCAGTGGCTTACCTTCTGG R: ATATGCAAGCTCTCAGCTCC	(AC) ₂₁ TA(CA) ₂	283	FAM	EF177203
	<i>Ma25</i>	F: GATGAACAAAGGTTAATTCAG R: ATCAGGCAGCTCACAGCTC	(GT) ₁₄ (GA) ₁₁	138	HEX	EF177204
	<i>Ma29</i>	F: ACACCAACTATCCCCTCGAGAC R: GTTTGGGGAATGCAAGG	(CA) ₈ TA(CA) ₉ CC(CA) ₂	233	HEX	EF177205
	<i>Ma36</i>	F: CAGGCTAGCTGGATAGGTCA R: ACAAGTTGTCCTGGATTAAGTATG	(CT) ₁₆ (CA) ₁₂	293	HEX	EF177206
	<i>Ma75</i>	F: CTACCTTCCCTCACCCAGAC R: GGTGAAGATCCTCTGTCAT	(TG) ₁₂ CG(TG) ₆	277	NED	EF177207

Table 2 Characteristics of the 14 microsatellite loci: number of alleles (A), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities with deviation from Hardy–Weinberg proportions (P)

Locus	A	Size range	H_O/H_E	P
Ma09	10	78–102	0.95/0.87	0.827
Ma25	19	146–187	0.95/0.96	0.81
Ma29	11	216–246	0.91/0.91	0.375
Ma30	18	228–272	0.81/0.93	0.003*
Ma35	10	110–132	0.81/0.86	0.29
Ma36	18	280–346	0.87/0.92	0.197
Ma37	13	242–288	0.55/0.86	0.000*
Ma42	11	286–328	0.25/0.87	0.000*
Ma54	11	170–206	0.81/0.82	0.301
Ma66	9	229–269	0.86/0.9	0.909
Ma68	13	112–138	0.76/0.91	0.329
Ma75	10	261–297	0.9/0.86	0.318
Ma81	4	181–189	0.62/0.59	0.598
Ma88	9	125–145	0.67/0.85	0.048*

remove them from our analysis. Then, without these two loci, the population did not show any significant departure from the H-W proportions over all loci ($P = 0.12$). None of the 66 pairs of loci exhibited significant genotypic disequilibrium. The observed heterozygosity over all loci was 0.81 and expected heterozygosity was 0.87.

Further studies using the two sets of microsatellite loci should allow a better understanding on how landscape features can structure this rodent population.

Acknowledgements

This study is supported by ECOGER (funded by INRA) and AGRIPOPEs (funded by CNRS). B.G. is supported by a PhD grant provided by the ACI ECCO. We thank Jean-François Martin for constructive comments on this manuscript.

References

- Kijas J, Fowler J, Garbett C, Thomas M (1994) Enrichment of microsatellites from citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques*, **16**, 657–662.
- Lambin X, Bretagnolle V *et al.* (2006) Vole population cycles in northern and southern Europe: is there a need for different explanations for single pattern? *Journal of Animal Ecology*, **75** (2), 340–349.
- Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W *et al.* (1999) *The Atlas of European Mammals*. T. Poyser, A. D. Poyser, London.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Salamolard M, Butet A *et al.* (2000) Responses of an avian predator to variations in prey density at a temperate latitude. *Ecology*, **81** (9), 2428–2441.
- Thiollay J-M, Bretagnolle V (2004) *Rapaces Nicheurs de France: Distribution, Effectifs et Conservation*. Delachaux & Niestlé, Paris.

ARTICLE 2 :

Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape

Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape

B. GAUFFRE,* A. ESTOUP,* V. BRETAGNOLLE† and J. F. COSSON*

*INRA, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montpellier-sur-Lez cedex, France, †CNRS, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, 79360, Beauvoir sur Niort, France

Abstract

Gene flow in natural populations may be strongly influenced by landscape features. The integration of landscape characteristics in population genetic studies may thus improve our understanding of population functioning. In this study, we investigated the population genetic structure and gene flow pattern for the common vole, *Microtus arvalis*, in a heterogeneous landscape characterised by strong spatial and temporal variation. The studied area is an intensive agricultural zone of approximately 500 km² crossed by a motorway. We used individual-based Bayesian methods to define the number of population units and their spatial borders without prior delimitation of such units. Unexpectedly, we determined a single genetic unit that covered the entire area studied. In particular, the motorway considered as a likely barrier to dispersal was not associated with any spatial genetic discontinuity. Using computer simulations, we demonstrated that recent anthropogenic barriers to effective dispersal are difficult to detect through analysis of genetic variation for species with large effective population sizes. We observed a slight, but significant, pattern of isolation by distance over the whole study site. Spatial autocorrelation analyses detected genetic structuring on a local scale, most probably due to the social organisation of the study species. Overall, our analysis suggests intense small-scale dispersal associated with a large effective population size. High dispersal rates may be imposed by the strong spatio-temporal heterogeneity of habitat quality, which characterises intensive agroecosystems.

Keywords: clustering methods, computer simulation, gene flow, landscape genetics, microsatellites, spatial genetic structure

Received 4 June 2008; revisions received 24 August 2008; accepted 1 September 2008

Introduction

The environmental features characterising the mosaic of habitats that make up a landscape can either restrict or promote movements of individuals in natural populations and consequently the extent of genetic connectivity (Taylor *et al.* 1993). Establishing the genetic structure of populations and the pattern of gene flow in relation to landscape characteristics thus provides information on population functioning, which may be critically important for management and conservation decisions (Palsboll *et al.* 2007). For instance, when habitat is highly fragmented, genetic drift and mutation may lead to an overall patchy pattern of genetic variability (Rousset 2003). Small and isolated populations

suffer from restricted dispersal and reduced genetic diversity (Frankham 2005). Over the past few years, many studies in the rapidly expanding field of landscape genetics (Manel *et al.* 2003; Storfer *et al.* 2007 for reviews), have been carried out to detect landscape and environmental features that may influence gene flow and hence shape the genetic structure of populations (Castric *et al.* 2001; Spear *et al.* 2005; Giordano *et al.* 2007; Dionne *et al.* 2008).

Because they limit biases due to the sampling of population units defined a priori (Manel *et al.* 2003), recently developed Bayesian clustering methods based on individual genotypes are particularly powerful in the identification of gene flow barriers — a major focus of landscape genetics research (Guillot *et al.* 2005a; Francois *et al.* 2006). Among physical barriers that may reduce genetic connectivity (such as rivers or mountains), anthropogenic features (e.g. roads) have been repeatedly shown to slow animal dispersal (Coulon

Correspondence: Bertrand Gauffre, Fax: +33 4 99 62 33 45; E-mail: gauffre@supagro.inra.fr

et al. 2006; Gerlach & Musolf 2000; Riley *et al.* 2006). Additionally, because dispersal is generally restricted in space for many species, continuous spatial patterns of genetic differentiation with geographical distance have been theoretically predicted (Rousset 2000) and empirically verified in many natural populations (Broquet *et al.* 2006; Elmer *et al.* 2007). Extremely complex spatial patterns have been reported for some landscapes, resulting from the conjunction of both discrete barriers to dispersal and isolation by distance (IBD; e.g. Berthier *et al.* 2005).

The spatial organisation of populations is thus greatly influenced by the pattern of dispersal. On the other hand, the latter has been found to be considerably influenced by the environmental characteristics of the landscape. In particular, experimental studies suggest that spatial and temporal random environmental variations favour the evolution of increased dispersal propensity (Johnson & Gaines 1990; Clobert *et al.* 2001). Although numerous empirical studies have addressed patterns of gene flow in spatially heterogeneous landscapes (Diffendorfer 1998; Lin & Batzli 2001; Kreuzer & Huntly 2003; Morris & Diffendorfer 2004), only a few were concerned with landscapes that vary both in space and time (Denno *et al.* 1996; Tattersall *et al.* 2004). Agroecosystems represent an extreme and perhaps unique example of such spatio-temporal variability. Agricultural landscapes are by nature highly fragmented, providing to natural populations a patchwork of habitats of varying quality depending on species characteristics and life history. Additionally, land use and agricultural practices (i.e. harvesting, mowing and ploughing) introduce further temporally asynchronous alterations of habitat quality and suitability. Therefore, agroecosystems offer an ideal experimental-like setting to study the consequences of spatio-temporal variability on gene flow in natural populations. It remains difficult, however, to establish predictions on population spatial structure and pattern of gene flow in such highly variable ecosystems (see Diffendorfer 1998).

We carried out a landscape genetics study to investigate the spatial pattern of genetic variation in the common vole *Microtus arvalis* – a small-sized rodent abundant in crop areas in Western Europe (Mitchell-Jones *et al.* 1999; Salamolard *et al.* 2000) – over a large, intensively cultivated study area (c. 500 km²). This model is important for conservation concerns because it represents a key resource in the trophic chain in agroecosystems (Lambin *et al.* 2006; Ims *et al.* 2008). Although the common vole was thought to be restricted to meadows, perennial crops and edge habitats (e.g. floral strips) in intensively cultivated areas, it has been found at high density in cereal fields or rapeseed (see Salamolard *et al.* 2000). Short-term effects of farming practices on common vole population dynamics and demographic parameters have been investigated (Jacob 2003; Jacob & Hempel 2003). Harvesting, mowing and mulching do not destroy nest sites (common vole build and inhabit

subterranean burrows), but potentially eliminate a substantial proportion of the local population by direct killing or increased risk of predation due to reduced vegetation height and cover. No dispersive movement appears to be associated with these activities (Jacob & Hempel 2003). Ploughing, which destroys common vole burrows, seems to be the only agricultural practice likely to eradicate common vole (Jacob 2003).

Dispersal distances are suspected to be short (a few hundred metres) in common vole (Spitz 1977b; Boyce & Boyce 1988a; Jacob 2003). However, the complexity of the processes involved in common vole population dynamics makes it difficult to predict the resulting pattern of genetic variation. In contrast to the above theoretical predictions, dispersal in common voles seems to be slowed in heterogeneous and highly disrupted landscapes (Delattre *et al.* 1992). Indeed, one study demonstrated small-scale genetic structuring among small and isolated populations (Schweizer *et al.* 2007). We would expect that less variable or more permanent habitats (e.g. grasslands) may provide refuge from where temporary habitats (e.g. annuals crops) are seasonally colonised. If refuge habitats are not connected by dispersal (directly or through reproduction in temporary habitats), strong genetic structuring is likely to prevail among isolated units (resulting from source-sink dynamics). However, balanced dispersal dynamics is more likely to result if temporary habitats allow breeding to occur and if human-associated perturbations cause individual movements. Therefore, the temporal instability of habitat quality may actually enhance effective dispersal and lead to low-level genetic differentiation between habitats, whether permanent or not. Landscape features, such as narrow and continuous zones of unfavourable habitats (hedged farmland, woodland, urbanised areas) or roads, are likely to result in further genetic discontinuities, as previously described for other rodent species (Gerlach & Musolf 2000; Orłowski & Nowak 2006).

The main aim of this study was to assess the pattern of gene flow in such spatially and temporally varying environments. We also analysed whether obvious habitat disruptions (a motorway in our case) produced significant spatial structuring of genetic variation. To this end, and in contrast to classical population genetics analyses relying on the a priori delineation and definition of population units, we used recent methodological and conceptual developments based on georeferenced individual genetic data.

Materials and methods

Study area

The study site is located in central-western France (Région Poitou-Charentes, 46°11'N, 0°28'W) and covers 500 km² of an agricultural landscape (Fig. 1). It is dominated by

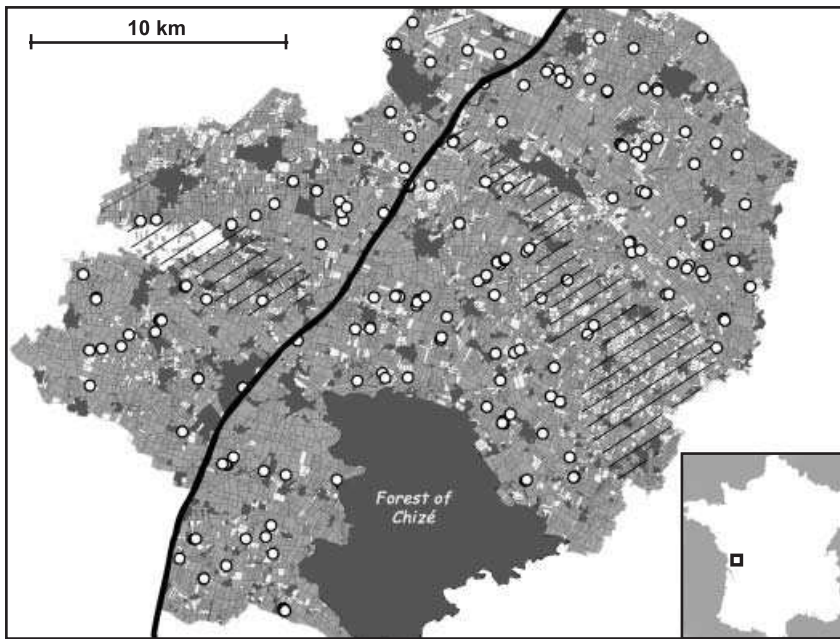


Fig. 1 Study site of Chizé, located in the region Poitou Charentes, Western France. Dots correspond to sampling locations (mean = 1.9 common voles per location); black zones indicate permanent unfavourable habitats (woodland and build-up); grey, annual crops; and white, perennial habitats. A total of 372 voles were trapped in 193 different sampling locations for 155 different agricultural plots. The black line indicates the motorway path and the dashed area corresponds to hedged farmland.

Table 1 Characteristics and proportion of study surface area covered for the main habitats comprising the agricultural matrix. Intensity and timing of main agricultural practices are also given. Common vole abundance is expressed in number of captures per 100 traps.

Habitat		Percentage of surface	Mowing (temporary disturbance)	Ploughing (destruction of colonies)	Spring common vole abundance
Perennial	Meadows	12	2 (spring and summer)	None	1.42
	Alfalfa	3	3–4 (spring and summer)	None	1.59
Annual	Ray grass	3	1–2 (spring)	1 (spring)	3.13
	Cereal crops	40	1 (July)	1 (summer or winter)	1.58
	Colza	12	1 (June)	1 (summer or winter)	0.99
	Maize/sunflower	18	1 (September)	1 (spring)	0.24
Woodland/build-up		12	None	None	≈ 0

intensive agricultural system including cereals, colza and spring-sown crops with temporal instability and varied vole abundance (Table 1). The study site is crossed by a motorway built in 1981 and has a network of unfavourable areas for common vole (urbanised zones, hedged farmland and woodland) as this species is known to be restricted to open habitats (Delattre *et al.* 1992). All these landscape features are likely to decrease dispersal rates.

Tissue sampling

Genetic sampling and estimation of common vole abundance were carried out during monthly trapping sessions from April to July 2006. A total of 90 trap lines in April and June, and 20 trap lines in May and July were set in different habitats, with the number of traps in each habitat proportionate to the landscape covered. Each trap line consisted of a 100-m transect with 51 live traps without bait spaced every 2 m, which was surveyed for 24 h. Common voles

were also directly trapped in their colonies during the same period. Location of captured voles was recorded with a precision of 10 m. A total of 372 common voles were trapped in 193 different sampling locations corresponding to 155 agricultural plots.

Genetic analyses

Genomic DNA was extracted from tissue samples (toe or ear clipping) using the Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems) and following the manufacturer's 'DNA purification from solid tissue' protocol. Genotyping was carried out using two polymerase chain reaction (PCR) multiplex sets comprising 14 microsatellites loci isolated from *M. arvalis* (Gauffre *et al.* 2007) and one (MSMM6) adapted from a locus isolated in *Microtus montebelli* (Ishibashi *et al.* 1999). For detailed information about the sets and PCR conditions, see Gauffre *et al.* (2007). We used an ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) and

Table 2 Number of alleles (A), expected heterozygosity (H_E) (Nei 1987), and observed heterozygosity (H_O), and P values for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) exact tests, computed over the entire sampled area. Two loci, Ma36 and Ma68, significantly deviate from HWE

Locus	A	H_E	H_O	HWE P value
Ma09	18	0.88	0.88	0.066
Ma25	44	0.96	0.94	0.287
Ma29	17	0.91	0.88	0.250
Ma36	38	0.94	0.93	0.028
Ma54	25	0.88	0.86	0.056
Ma66	24	0.91	0.87	0.501
Ma68	17	0.87	0.78	0.006
Ma75	20	0.89	0.86	0.584
Ma81	20	0.63	0.63	0.224
MSMM6	18	0.88	0.86	0.207
All loci	24	0.88	0.85	0.007

PCR profiles were analysed using GeneScan and Genotyper software. For some loci, PCR amplification was difficult and an observed excess of homozygotes was detected regardless of the geographical scale of sampling. We used the program Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004) to test for the most probable causes of this observation, including various genotyping errors (e.g. short allele dominance) and the presence of null alleles. We excluded two loci (Ma30 and Ma42) that failed to amplify for some individuals and for which the general excess of homozygotes was observed for most allele size classes indicating a presence of null alleles. Two other loci (Ma35 and Ma88) were also excluded due to poor quality PCR profiles of some alleles (confounded in the stutter of shorter alleles). Our final data set thus included genotypes obtained at 10 microsatellite loci (Table 2).

Statistical analyses

We tested for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using the exact test in GenePop 4.0 (Rousset 2008). Deviation from HWE was quantified by estimating and testing the significance of the F_{IS} value using a permutation procedure (10 000 permutations) in Genetix 4.05.2 (Belkhir 2004). Expected (H_E ; Nei 1987) and observed (H_O) heterozygosity levels were also calculated using GenePop 4.0. We tested linkage disequilibrium (LD) between loci using the G -test implemented in GenePop 4.0 followed by a false discovery rate (FDR) correction for multiple tests (Benjamini & Hochberg 1995) with a nominal level of 5%. We ran 10 independent tests using (for each test) the default conditions specified in the program. For each run, we recorded the number of pairs of loci showing significant LD as well as the identity of the concerned loci.

Assessing genetic structure with clustering methods. The motorway and two zones of hedged farmland coupled with urbanised or forested areas were identified as linear barriers that had the potential to considerably reduce common vole dispersal. Therefore, we estimated the number of genetic clusters (K) and the spatial location of breaks in gene flow delineating such clusters within the studied area using Bayesian assignment approaches implemented in Structure 2.2 (Pritchard *et al.* 2000), Geneland 2.0.10 (Guillot *et al.* 2005b) and TESS 1.1 (Francois *et al.* 2006). The three Bayesian methods used allow statistical inferences to be made for individual multilocus genetic data. Subdivision of the data into clusters in the Bayesian methods is done by maximising HWE and minimising LD. Structure bases its inference on genetic data alone, whereas Geneland and TESS explicitly incorporate spatial organisation information for genotyped individuals. We followed the recommendations of the authors of these methods to address the problem of genetic structure, which can include populations with a low level of differentiation. For Structure, we assumed an admixture model with correlated allele frequencies (Falush *et al.* 2003). The number of populations (K) is a fixed parameter of this model. Five independent runs for $K = 1$ to 10 were carried out each with a Markov chain Monte Carlo (MCMC) of 500 000 iterations following a burn-in of 100 000 iterations. For each K , we calculated the mean posterior probability over its runs. We then used this mean value to estimate the posterior probability of each K using the formula given by Pritchard & Wen (2003). For Geneland, we used the Dirichlet model of allele frequencies and long MCMC runs to ensure convergence of the chain (Guillot *et al.* 2005a, b). Ten independent runs with 500 000 MCMC iterations (thinning = 50) were performed allowing K to vary from 1 to 10. The maximum rate of the Poisson process was fixed at 500, the maximum number of nuclei in the Poisson–Voronoi tessellation at 300, and the potential error for spatial coordinates at 50 m. K was inferred from the modal value of the run with the highest likelihood. TESS was run with the Dirichlet model of allelic frequencies and the interaction parameter (Ψ) fixed at 0.6, as described by Chen *et al.* (2007). We ran 10 replicates of 10 independent MCMC chains with 12 000 sweeps and a burn-in period of 2000 sweeps. K was then inferred from the modal value of the replicate with the highest likelihood.

Detection of recent linear barrier to gene flow. We tested for genetic differentiation among individuals across the motorway. We used GenePop 4.0 to estimate pairwise F_{ST} values and assess their significance with permutations in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001). Calculating F_{ST} on a priori-defined populations may lead to erroneous conclusion (Manel *et al.* 2003). We thus processed the latter analysis on five arbitrary partitions of the study area into two continuous spatial units independently of any landscape element.

Finally, we also adopted an approach without a priori spatial information using the above Bayesian clustering methods with the number of populations fixed at two. The inferred spatial delineation between the two populations was then compared to that of the motorway.

We then used computer simulations with our own program based on coalescence theory to simulate genetic data under a simple model of one ancestral population splitting into two completely isolated populations. Demographic parameters included the split time corresponding to the age of the motorway expressed as number of common vole generations (G) and the effective common vole population size (N_e), which were assumed to be identical for each population. Simulations were run for same sample size as our real data set (i.e. one population with 98 individuals and one with 274) and for 10 microsatellite loci, assuming a generalised stepwise mutational model with a maximum number of continuous allelic states set to 60 and the parameter of the geometric distribution of allelic mutation size fixed at 0.22 (Estoup *et al.* 2002). The mutation rate was fixed at 5×10^{-4} , as widely assumed for microsatellite loci (Goldstein & Schlötterer 1999). Pairwise F_{ST} and H_E were calculated for each simulated data set. The level of uncertainty for the value of G was assessed using the rationale that the motorway was built 25 years before our sampling and the number of common vole generations per year is between 1.5 and 3.5 (JP Quéré, personal communication). Thus, in our simulations, we considered values of G between 37 and 88. H_E was used instead of N_e , because the range was unknown and the parameters are related (Hartl & Clark 1997). In the real data set, H_E was found to be 0.88 (SD = 0.08). We ran 50 000 simulations with G randomly drawn in a uniform distribution bounded between 37 and 88, and N_e drawn in a uniform distribution bounded between 100 and 20 000. We then selected those simulated data sets for which H_E was between 0.80 and 0.96 (i.e. 30 000 of the 50 000 simulated data sets), and computed an F_{ST} distribution from these sub-data sets. Ten of these sub-data sets were randomly chosen and analysed with Structure, Geneland and TESS using a similar approach as above and using the same individual geographical location as in our real sample. We also tested the differentiation between the two populations for each of the 10 data sets using GenePop 4.0.

Assessing the scale of genetic differentiation. We determined IBD by testing the correlation between pairwise genetic distances (a_r , Rousset 2000) and the logarithm of geographical distances using GenePop 4.0. The linear relationship of these variables is expected to hold best at distances greater than the mean parent–offspring dispersal distance (σ) and to progressively deviate from linearity at distances larger than 10 to 15* σ (Rousset 2000; Leblois *et al.* 2003). Thus, we excluded pairwise distances between individuals separated by less than 250 m, as the latter was roughly estimated

from literature (Boyce & Boyce 1988b; Spitz 1977b). To visualise the relationship between pairwise genetic and geographical distances for this large data set, we fit a spline correlogram (Chambers & Hastie 1992) with a 95% bootstrap confidence envelope, using R (R Development Core Team 2007), evaluated for 50 points with a target of 7 degree of freedom. To calculate an indirect estimate of σ from our genetic data, we used the inverse of the slope to determine the neighbourhood size ($4D\pi\sigma^2$), where D is the effective density in the population (Rousset 2000). Since the ideal sampling area is $10\sigma \times 10\sigma$ for this calculation, we used the slope value given by regression between 250 m and 2500 m. D was independently estimated to be 1000 individuals/km². The latter value was inferred from trapping data (Table 1) by calculating the overall density of adults using Spitz's (1977a) conversion indices with weighed adult common vole densities in each habitat as a proportion of the studied area covered.

Finally, the spatial pattern of genetic variation was investigated using spatial autocorrelation analyses which assess the genetic similarity between pairs of individuals at different distance classes, thus providing results on the scale at which spatial patterns occur. We adopted the approach developed by Smouse & Peakall (1999) using GenAlEx (Peakall & Smouse 2006) and ran two different analyses using 500-m and 1-km distance class sizes. Each distance class (except distance classes above 25 km) included more than 350 pairwise genotypic data. Significant deviation of spatial autocorrelation patterns from the random distribution of genotypes was tested by plotting the 95% null hypothesis confidence intervals estimated by 1000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations. Although distance and rate of dispersal influence the shape of the correlogram, it is difficult to directly translate spatial autocorrelation diagrams into dispersal patterns (Aars *et al.* 2006). However, the correlogram should flatten out at the scale where dispersal is not connecting 'subpopulations' (Aars *et al.* 2006).

Results

Genotypic data revealed high levels of genetic diversity at all 10 microsatellite loci (Table 2). The number of alleles per locus ranged between 17 and 44. Expected heterozygosity for each locus ranged from 0.63 to 0.96, with an average value of 0.88 for all loci. Observed heterozygosity ranged from 0.63 to 0.94, with an average value of 0.85 for all loci. There was a significant overall heterozygosity deficit in the total sample ($P = 0.007$) with a low (0.032) but significant global F_{IS} value ($P < 0.001$) that could be related with some spatial structure in our data. We found that the number of pairs of loci showing significant LD was unstable among the 10 independent runs of GenePop, varying from zero to four pairs of loci depending on the run. Moreover, the loci

Table 3 Results of individual-based Bayesian clustering analyses. For Geneland and TESS, the 10 runs were ranked by decreasing value of likelihood (in the log scale) and the K value estimated for each run is presented. In Structure, K is fixed from 1 to 10 and runs are ranked by decreasing value of likelihood

Geneland		TESS		Structure	
Likelihood	K	Likelihood	K	Likelihood	K
-18034.7	2	-18049.9	4	-18452.1	1
-18063.3	2	-18056.8	4	-18721.2	2
-18080.0	2	-18077.7	4	-19311.1	3
-18111.1	2	-18080.8	4	-19640.9	4
-18130.1	2	-18089.2	3	-20026.2	5
-18133.6	2	-18092.4	4	-20267.2	6
-18137.7	2	-18102.5	4	-20287.5	7
-18140.6	2	-18104.1	3	-20536.5	8
-18143.2	2	-18104.6	3	-20912.3	9
-18159.3	2	-18108.9	3	-20771.3	10

involved in the significant tests were most of the time different in the 10 runs. We hence did not find any evidence for strong and stable LD in our data set. Again, this LD pattern most probably results from genetic structure within the study area rather than from physical linkage between loci.

Genetic clustering

Results of the clustering analyses are summarised in Table 3. The estimated logarithm of likelihood for data analysed with Structure was highest for $K = 1$ and the posterior probability of having only one population was 1. For $K > 1$, none of the 372 individuals could be assigned to a given cluster as each individual had a similar probability of belonging to each cluster. Geneland inferred the presence of two populations; however, one, turned out to be a 'ghost' population corresponding to a population to which none of the sampled individuals had been assigned. TESS inferred four clusters from the highest likelihood run; however, over 85% of individuals fell into a single cluster and the individuals assigned to the other three clusters were randomly distributed across the study site, without spatial coherency.

Barrier effect on gene flow

The level of genetic differentiation between individuals sampled across the motorway was low, but significant ($F_{ST} = 0.0018$, $P < 0.01$). However, the five arbitrary subdivisions of the data set into two spatially coherent samples also gave significant F_{ST} values of the same order of magnitude (F_{ST} range = 0.002 to 0.0045). Therefore, we suspected that the genetic differentiation was not directly

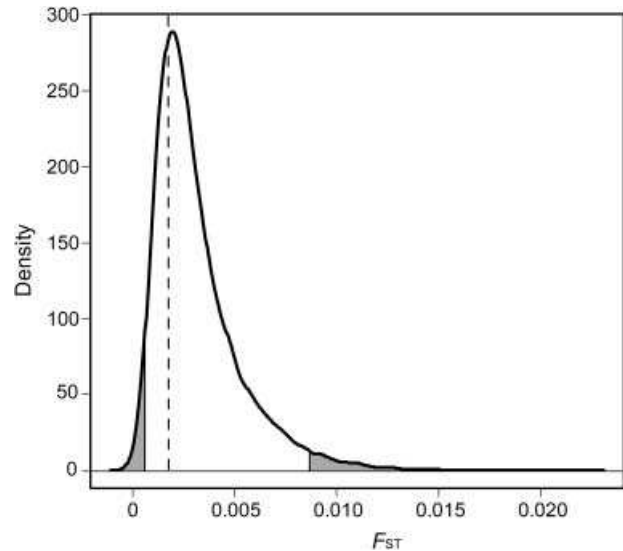


Fig. 2 Density distribution of F_{ST} values for simulated data sets under a simple model of one ancestral population splitting into two completely isolated populations. Data sets have been simulated using a parameter setting reflecting the actual case of a motorway splitting the studied common vole population (splitting time between 37 and 88 generations and mean heterozygosity between 0.80 and 0.96; see text for details). Grey areas represent the 2.5% and 97.5% quantiles. Dotted line indicates the F_{ST} value observed in the real common vole data set ($F_{ST} = 0.0018$).

associated with the motorway. Geneland assigned all individuals to one population (with a probability of membership > 0.99) and TESS assigned 339 individuals to the first population and 33 to the second, with the individuals assigned to this second being randomly distributed across the study site.

We ran computer simulations under the extreme conditions of no effective dispersal across a recent anthropogenic barrier to assess trends in the genetic data and methods to identify recent barriers to gene flow such as the motorway. When using parameter values for H_E and G close to those of our real data set, the mean F_{ST} value of the simulations was 0.0031, the mode was 0.0019 and the 2.5% and 97.5% quantiles were 0.0006 and 0.0087, respectively (Fig. 2). The modal value of the simulation set (0.0019) was thus very close to the observed value (0.0018) in our real data set. Both STRUCTURE and Geneland inferred a single cluster of individuals for each of the 10 randomly selected simulated data sets, for which F_{ST} values ranged from 0.0005 to 0.005. TESS inferred higher values of K (between 4 and 8), although similar to the estimation K in the real data set, with most individuals assigned to a single population and other individuals randomly distributed over the entire study area. We found significant genetic differentiation in all but one of these simulated data sets, using approximated Fisher's exact tests between the two sides of the motorway.

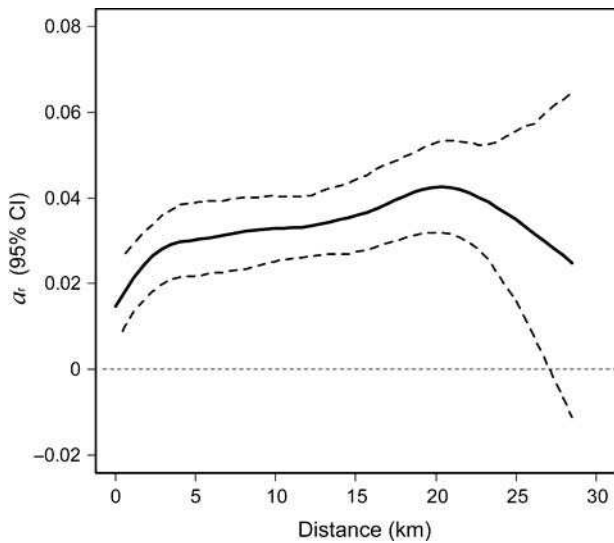


Fig. 3 Spline correlogram with 95% bootstrap confidence envelope (dashed lines) for the function relating genetic distance (Rousset's a_r) to geographical (Euclidean) distance between individuals.

Our simulation study highlights the difficulties involved in identifying recent barriers to gene flow for species with a high level of heterozygosity, and thus, probably for those with a large effective population size. We cannot draw firm conclusions about the exact impact of the motorway on common vole gene flow in this study area.

Spatial scale of genetic differentiation

The observed genetic differentiation across the motorway was similar to all arbitrary subdivisions of the studied landscape, suggesting that factors other than the motorway may underlie the genetic structure. A significant pattern of IBD was observed among individuals in the study area

($P = 0.005$). The spline correlogram (Fig. 3) illustrates that genetic differentiation among individuals was substantial (mean $a_r = 0.033$), and increased with increasing geographical distance. Limiting the IBD analysis to minimum and maximum distances of 0.25 and 2.5 km (1σ and 10σ , as recommended by Rousset 2000) resulted in a significant positive slope. As expected from theoretical studies, the slope computed with distances between 1σ and 10σ was two times higher than the slope estimated over the entire study area (i.e. 0.01 and 0.0048, respectively). Using this value of the slope and assuming a density of 1000 adult common voles per km^2 in the area of study, we estimated an indirect dispersal distance of 88 m (95% CI: 76–110 m).

The spatial genetic autocorrelation analysis displayed positive genetic correlation values (r) for the first distance classes (zero and 1 km), and negative and significant r -values only for certain classes above 12 km (Fig. 4). Genetic similarities between individuals decreased between distance classes 0 km and 2 km and then flatten out. For distances greater than 2 km, we observed a tendency for a slight decrease in similarity with distance, consistent with the IBD pattern previously described. Setting distance class sizes to 500 m did not change overall relationships but demonstrated patterns of genetic similarity on a smaller scale (up to 1 km). In contrast to the pattern usually observed for rodent populations under IBD (Berthier *et al.* 2005; Aars *et al.* 2006), we did not observe a clear shift toward negative r -values at larger distance classes but rather a slight decreasing trend of r -values with increasing distance classes. We suggest that this pattern could be the consequence of large effective population size.

Discussion

We demonstrate that, in a large 500 km^2 area with spatial heterogeneity and temporal instability, gene flow in a small rodent population is not sufficiently limited to result in a

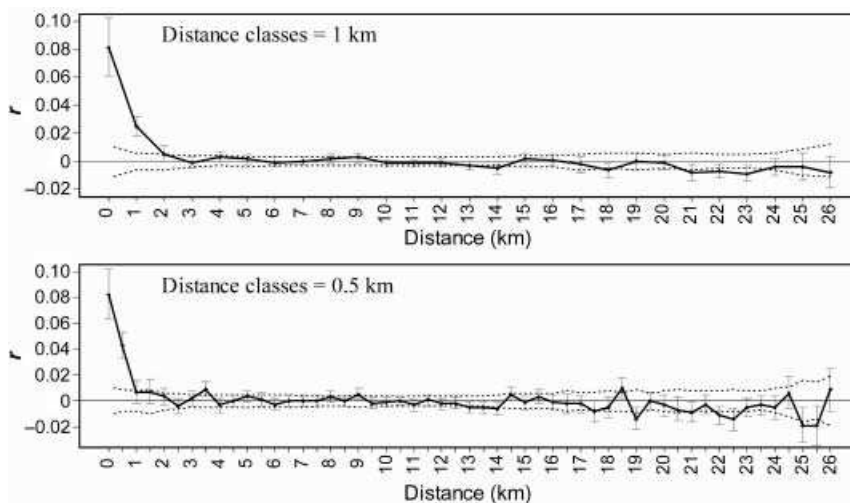


Fig. 4 Correlograms showing the combined genetic correlation (r) as a function of distance. The first distance class (0 km) represents pairwise comparisons between individuals from the same colony. Envelopes show the estimated 95% CI for the null hypothesis of a random distribution of genotypes determined by 1000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations and error bars bound the 95% CI about r determined with 1000 bootstrap trails within the set of comparisons for a specific distance class.

strong genetic structure. Rather, we observed a slight, but significant, IBD pattern shaping the roughly homogeneous genetic structure of the studied common vole population. A commonly proposed model for the spatial structure of common vole populations in heterogeneous landscapes such as agricultural mosaics is a source-sink dynamics between permanent and temporary habitats (Butet & Leroux 2001). Our findings do not contradict this model but suggest that if such dynamics exists, it occurs in the context of large effective population sizes and high movement rates among the different types of habitats constituting the agricultural matrix.

The combination of high dispersal rates with high densities may explain the observed spatial pattern of genetic variation, despite the presence of very local substructures (mainly due to the social organisation of the species) and the relatively short individual dispersal distances. Our results for dispersal are consistent with empirical measures of movement distances (Spitz 1977b; Jacob 2003) and predictions of the limited dispersal ability of these small rodents (van de Zande *et al.* 2000; Heckel *et al.* 2005). For example, direct observations suggest that short-range natal dispersal of females is frequent and occurs over distances of 50 to 160 m (Boyce & Boyce 1988a). We obtained a short distance estimate of 88 m for the mean parent-offspring dispersal distance (σ), derived from the inverse of the IBD regression slope. Although this method relies on numerous assumptions (Rousset 2000; Leblois *et al.* 2003; Vekemans & Hardy 2004), it provides valuable information about dispersal, especially when using highly polymorphic microsatellite markers (Leblois *et al.* 2003). The slope of the correlogram obtained from spatial autocorrelation analysis flattens out after the 2-km distance class (1 km when defining 500-m distance classes), confirming small-scale dispersal. An informative result in terms of effective population size (N_e) was the high level of heterozygosity in the population (mean $H_O = 0.85$). This value was higher than those observed in previous microsatellite-based genetic studies on rodents (Ehrich *et al.* 2001; Berthier *et al.* 2005; Aars *et al.* 2006; Brouat *et al.* 2007; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2007). Heterozygosity is lost through genetic drift at the rate of one-half N_e per generation; thus, the level of heterozygosity in a population at a given time is a good indicator of its past and present demography (Hartl & Clark 1997). The high level of heterozygosity observed in our study therefore suggests that the population is characterised by a large N_e and hence large densities, which we estimated from trap data at 1000 adults per km².

Previous studies on common vole biology have suggested that genetic diversity and gene flow should be low in heterogeneous agricultural landscapes (Delattre *et al.* 1992; Topping *et al.* 2003). So far, these predictions have been at least partly supported by a recent study in Switzerland (Schweizer *et al.* 2007), which concluded that *Microtus arvalis*

populations were genetically structured at a fine spatial scale (< 2 km). As reported for other socially organised species (Scribner & Chesser 1993), we suggest that this genetic structuring at a small geographical scale is due to the social structure (i.e. related individuals clustered in colonies) rather than to a low level of effective small-scale dispersal between isolated subpopulations. In line with this, the strong positive autocorrelation observed in our data set only for the first distance class, which includes individuals originating from the same colony, supports this interpretation. The lower level of heterozygosity observed in the study of Schweizer *et al.* (2007) than in our study, mean $H_O = 0.77$ vs. 0.85 reflects a smaller effective population size. The latter account, at least partly, for the occurrence of greater genetic differentiation between close sampling sites in Schweizer's study.

Interpopulation proximity and connectivity are crucial for population persistence in heterogeneous landscapes (Gulve 1994). A patchy distribution of suitable habitats is expected to create a patchy genetic structure, especially for species with dispersal limited in space. It was therefore surprising to find such large-scale genetic homogeneity given the small-scale dispersal abilities of this small rodent and the patchy distribution of perennial habitats in the landscape (Fig. 1). Common voles were trapped in every habitat of our studied area. In particular, spring densities were found to be high in cereals crops (covering 40% of the study site), despite the fact that ploughing eradicates common voles annually (Jacob 2003). Common voles are characterised by a short life cycle and high reproductive capacities. They produce several generations each year, as young common voles are able to reproduce at only 3 weeks of age (Toussaint 1990) and breeding can occur throughout the year when climatic and nutritional conditions allow sexual activity in winter (Le Louarn & Quéré 2003). Given this rapid reproductive cycle and short, but frequent dispersal events, cereal crops appear to be suitable habitats with sufficient time for gene flow to occur. This highlights the potential role of temporary suitable habitats for facilitating gene flow and mitigating the apparent spatial fragmentation (Blaum & Wichmann 2007). Borders and floral strips also play a major role in the population dynamics of *M. arvalis* (Briner *et al.* 2005) and can enhance the overall landscape connectivity. Additionally, the disturbance caused by mowing (substantial increase in predation risk), which occurs in every habitat (perennials and annuals) with different timing and intensity, is likely to cause some movement to adjacent fields where the cover is higher (Jacob & Brown 2000). This would thus artificially enhance dispersal in common vole populations.

We did not identify any of the linear landscape features, such as the motorway or the unfavourably hedged farmlands coupled with permanent areas (forested and urbanised), as obvious barriers to gene flow, using individual-based

Bayesian clustering methods. However, our analysis demonstrates a potential bias when searching for breaks in gene flow in a landscape. The calculation of F_{ST} between a priori-defined populations for a landscape element such as a motorway can lead to a pre-emptive conclusion that it is an effective barrier to gene flow. In our study, we observed that other arbitrary partitions of our data set resulted in similar and significant F_{ST} values. Therefore, the significant differentiation across the motorway in our study was more likely to be due to the overall IBD pattern, although some recent studies have demonstrated that patterns of genetic divergence in terrestrial animals correlate with various elements present in the landscape, such as roads and motorways (Gerlach & Musolf 2000; Keller *et al.* 2004; Coulon *et al.* 2006). Roads may be quasi-impenetrable barriers even for large and highly mobile mammals like bobcats, coyotes (Riley *et al.* 2006) and ungulates (Coulon *et al.* 2006). Reasoning for common vole genetic structure to be not affected by the motorway is thus challenging. One possible reason is that dispersal may indeed be unaffected. There are two studies documenting road crosses by common voles. Orłowski & Nowak (2006) surveyed a road network (15 roads) with different traffic volumes (350–10 500 cars per 24 h) located in an agricultural landscape of southwestern Poland. The most frequently killed group of mammals was small rodents (40%), with the common vole accounting for the largest proportion among them (26%). The major factor affecting mortality rate was the daily vehicle traffic volume. Van Wieren & Worm (2001) studied how mammals used a wildlife overpass across a motorway in central Netherlands using track counts. They concluded that wildlife overpasses can be an effective means of connecting habitats for small mammals. However, given that there was no wildlife overpass in our study site and the high mortality risk associated with crossing a motorway with substantial traffic, it is unlikely that dispersal is not affected by such a barrier.

Computer simulation provided another explanation for our findings. Given the large population size of the studied common vole population, the motorway may simply be too recent to allow genetic differentiation to become sufficiently high to be detected through F -statistics or clustering methods. Additional simulations show that in the extreme case of complete isolation of two populations characterised by heterozygosity levels (i.e. effective sizes) similar to those observed in our study, more than 200 generations (i.e. 80 years in the case of *M. arvalis*) would be required to reach F_{ST} values > 0.01 . The latter value is often mentioned as a threshold to confidently detect an effective barrier to gene flow using Bayesian clustering methods (e.g. Chen *et al.* 2007).

In conclusion, our study shows that only geographical distance tends to limit common vole gene flow in this agricultural landscape. Gene flow might not be affected by habitat fragmentation because common vole population

dynamics is faster than the perturbation dynamics of the landscape inhabited, hence mitigating the temporary suitability of most habitats (i.e. crops). Spatio-temporal variation in habitat quality resulting from land use favours increased dispersal propensity, and thus, should be a crucial determinant of such spatially extended populations. The exact effect of each habitat type on genetic variation over space and time and of agricultural practices on dispersal remains to be studied using specific sampling strategies. Social structure should also be explicitly accounted for in further sampling to test its likely effect on the structuring of genetic variation.

Acknowledgements

We thank Eric Petit, Raphael Leblois and three anonymous referees for constructive comments on the manuscript and Thomas Cornulier for comments on an earlier draft and help in statistical treatments. We thank Steve Augiron, Alexandre Villers, Mirabelle Gouat, Maxime Galan and Camille Fontaine for help in trapping voles. This work was supported by INRA (ECOGER national program), and B. Gauffre received a grant from ACI ECCO.

References

- Aars J, Dallas JF, Piertney SB *et al.* (2006) Widespread gene flow and high genetic variability in populations of water voles *Arvicola terrestris* in patchy habitats. *Molecular Ecology*, **15**, 1455–1466.
- Belkhir K (2004) *Genetix, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B: Methodological*, **57**, 289–300.
- Berthier K, Galan M, Foltete JC, Charbonnel N, Cosson JF (2005) Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Molecular Ecology*, **14**, 2861–2871.
- Blaum N, Wichmann MC (2007) Short-term transformation of matrix into hospitable habitat facilitates gene flow and mitigates fragmentation. *Journal of Animal Ecology*, **76**, 1116–1127.
- Boyce CCK, Boyce JL (1988a) Population biology of *Microtus arvalis*. II. Natal and breeding dispersal of females. *Journal of Animal Ecology*, **57**, 723–736.
- Boyce CCK, Boyce JL (1988b) Population biology of *Microtus arvalis*. III. Regulation of numbers and breeding dispersion of females. *Journal of Animal Ecology*, **57**, 737–754.
- Briner T, Nentwig W, Airoldi JP (2005) Habitat quality of wildflower strips for common voles (*Microtus arvalis*) and its relevance for agriculture. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **105**, 173–179.
- Broquet T, Ray N, Petit E, Fryxell JM, Burel F (2006) Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landscape Ecology*, **21**, 877–889.
- Brouat C, Loiseau A, Kane M, Ba K, Duplantier JM (2007) Population genetic structure of two ecologically distinct multimammate rats: the commensal *Mastomys natalensis* and the wild *Mastomys erythroleucus* in southeastern Senegal. *Molecular Ecology*, **16**, 2985–2997.

- Butet A, Leroux ABA (2001) Effects of agriculture development on vole dynamics and conservation of *Montagu's harrier* in western French wetlands. *Biological Conservation*, **100**, 289–295.
- Castric V, Bonney F, Bernatchez L (2001) Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution*, **55**, 1016–1028.
- Chambers JM, Hastie TJ (1992) *Statistical Models in S*. Chapman and Hall, London.
- Chen C, Durand E, Forbes F, Francois O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747–756.
- Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichols JD (2001) *Dispersal*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF *et al.* (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology*, **15**, 1669–1679.
- Delattre P, Giraudoux P, Baudry J *et al.* (1992) Land-use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population-kinetics. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **39**, 153–169.
- Denno RE, Roderick GK, Peterson MA *et al.* (1996) Habitat persistence underlies intraspecific variation in the dispersal strategies of planthoppers. *Ecological Monographs*, **66**, 389–408.
- Diffendorfer JE (1998) Testing models of source-sink dynamics and balanced dispersal. *Oikos*, **81**, 417–433.
- Dionne M, Caron F, Dodson JJ, Bernatchez L (2008) Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: the interaction of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, **17**, 2382–2396.
- Ehrich D, Jorde PE, Krebs CJ *et al.* (2001) Spatial structure of lemming populations (*Dicrostonyx groenlandicus*) fluctuating in density. *Molecular Ecology*, **10**, 481–495.
- Elmer KR, Davila JA, Loughheed SC (2007) Applying new inter-individual approaches to assess fine-scale population genetic diversity in a Neotropical frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *Heredity*, **99**, 506–515.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 1591–1604.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587.
- Francois O, Ancelet S, Guillot G (2006) Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics*, **174**, 805–816.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**, 131–140.
- Gauffre B, Galan M, Bretagnolle V, Cosson JF (2007) Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 830–832.
- Gerlach G, Musolf K (2000) Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology*, **14**, 1066–1074.
- Giordano AR, Ridenhour BJ, Storfer A (2007) The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology*, **16**, 1625–1637.
- Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Goudet J (2001) *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, **170**, 1261–1280.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005b) Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 712–715.
- Gulve PS (1994) Distribution and extinction patterns within a Northern metapopulation of the pool frog, *Rana lessonae*. *Ecology*, **75**, 1357–1367.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. 3. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Heckel G, Burri R, Fink S, Desmet JF, Excoffier L (2005) Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole, *Microtus arvalis*. *Evolution*, **59**, 2231–2242.
- Ims RA, Henden JA, Killengreen ST (2008) Collapsing population cycles. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 79–86.
- Ishibashi Y, Yoshinaga Y, Saitoh T *et al.* (1999) Polymorphic microsatellite DNA markers in the field vole *Microtus montebelli*. *Molecular Ecology*, **8**, 163–164.
- Jacob J (2003) Short-term effects of farming practices on populations of common voles. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **95**, 321–325.
- Jacob J, Brown JS (2000) Microhabitat use, giving-up densities and temporal activity as short- and long-term anti-predator behaviors in common voles. *Oikos*, **91**, 131–138.
- Jacob J, Hempel N (2003) Effects of farming practices on spatial behaviour of common voles. *Journal of Ethology*, **21**, 45–50.
- Johnson ML, Gaines MS (1990) Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 449–480.
- Keller I, Nentwig W, Largiadier CR (2004) Recent habitat fragmentation due to roads can lead to significant genetic differentiation in an abundant flightless ground beetle. *Molecular Ecology*, **13**, 2983–2994.
- Kraaijeveld-Smit FJL, Lindenmayer DB, Taylor AC, MacGregor C, Wertheim R (2007) Comparative genetic structure reflects underlying life histories of three sympatric small mammal species in continuous forest of south-eastern Australia. *Oikos*, **116**, 1819–1830.
- Kreuzer MP, Huntly NJ (2003) Habitat-specific demography: evidence for source-sink population structure in a mammal, the pika. *Oecologia*, **134**, 343–349.
- Lambin X, Bretagnolle V, Yoccoz NG (2002) Vole population cycles in northern and southern Europe: Is there a need for different explanations for single pattern? *Journal of Animal Ecology*, **75**, 340–349.
- Le Louarn H, Quéré J-P (2003) *Les Rongeurs de France: Faunistique et Biologie*. INRA, Paris.
- Leblois R, Estoup A, Rousset F (2003) Influence of mutational and sampling factors on the estimation of demographic parameters in a 'continuous' population under isolation by distance. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 491–502.
- Lin YTK, Batzli GO (2001) The influence of habitat quality on dispersal demography, and population dynamics of voles. *Ecological Monographs*, **71**, 245–275.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 189–197.
- Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W (1999) *The Atlas of European Mammals*. Poyser, T. Poyser, A.D., London.
- Morris DW, Diffendorfer JE (2004) Reciprocating dispersal by habitat-selecting white-footed mice. *Oikos*, **107**, 549–558.
- Nei N (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

- Orlowski G, Nowak L (2006) Factors influencing mammal roadkills in the agricultural landscape of south-western Poland. *Polish Journal of Ecology*, **54**, 283–294.
- Palsboll PJ, Berube M, Allendorf FW (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 11–16.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288–295.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Pritchard JK, Wen W (2003) *Documentation for Structure Software: Version 2*. Available from: <http://pritch.bsd.uchicago.edu>.
- R Development Core Team (2008) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at: <http://www.R-project.org>.
- Riley SPD, Pollinger JP, Sauvajot RM *et al.* (2006) A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology*, **15**, 1733–1741.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 58–62.
- Rousset F (2003) Effective size in simple metapopulation models. *Heredity*, **91**, 107–111.
- Rousset F (2008) GenePop'007: a complete re-implementation of the GenePop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- Salamolard M, Butet A, Leroux A, Bretagnolle V (2000) Responses of an avian predator to variations in prey density at a temperate latitude. *Ecology*, **81**, 2428–2441.
- Schweizer M, Excoffier L, Heckel G (2007) Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology*, **16**, 2463–2473.
- Scribner KT, Chesser RK (1993) Environmental and demographic correlates of spatial and seasonal genetic structure in the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*). *Journal of Mammalogy*, **74**, 1026–1044.
- Smouse PE, Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, **82**, 561–573.
- Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, **14**, 2553–2564.
- Spitz F (1977a) Développement d'un modèle de prévision des pullulations du campagnol des champs. *Bulletin OEPP*, **7**, 341–347.
- Spitz F (1977b) Le campagnol des champs (*Microtus arvalis* [Pallas]) en Europe. *Bulletin OEPP*, **7**, 165–175.
- Storfer A, Murphy MA, Evans JS *et al.* (2007) Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity*, **98**, 128–142.
- Tattersall FH, Macdonald DW, Hart BJ, Manley W (2004) Balanced dispersal or source-sink — do both models describe wood mice in farmed landscapes? *Oikos*, **106**, 536–550.
- Taylor PD, Fahrig L, Henein K, Merriam G (1993) Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*, **68**, 571–573.
- Topping C, Ostergaard S, Pertoldi C, Bach LA (2003) Modelling the loss of genetic diversity in vole populations in a spatially and temporally varying environment. *Annales Zoologici Fennici*, **40**, 255–267.
- Toussaint M (1990) Le campagnol des champs, *Microtus arvalis*. *La Défense Des Végétaux*, **260**, 22–31.
- 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.
- van Wieren SE, Worm PB (2001) The use of a motorway wildlife overpass by large mammals. *Netherlands Journal of Zoology*, **51**, 97–105.
- van de Zande L, van Apeldoorn RC, Blijdenstein AF *et al.* (2000) Microsatellite analysis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Molecular Ecology*, **9**, 1651–1656.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, **13**, 921–935.

Bertrand Gauffre is a PhD student interested in population biology and more particularly in the inference of dispersal (and factors influencing this behaviour) from genetic data. Arnaud Estoup's current research mainly focuses on evolutionary biology of invasive species. Vincent Bretagnolle research focuses on the conservation, ecology and behaviour of wildlife with particular emphasis on birds. J.F. Cosson is mainly interested in population genetics of fluctuating populations in relation with landscape ecology.

ARTICLE 3 :

Sex-biased dispersal patterns depend on the spatial scale in a social
rodent

1 ***Sex-biased dispersal patterns depend on the***
2 ***spatial scale in a social rodent***

3
4 B. GAUFFRE^{*1}, E. PETIT^{2,3}, S. BRODIER⁴, V. BRETAGNOLLE⁴ and J. F. COSSON¹

5
6 ¹ INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus
7 international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France

8 ² INRA UMR BIO3P (INRA / Agrocampus Ouest / Univ. Rennes 1), Domaine de la
9 MOTTE, 35653 Le Rheu Cedex France

10 ³ UMR ECOBIO (Université Rennes 1 / CNRS), Campus de Beaulieu, 35042 Rennes
11 cedex, France

12 ⁴ CNRS, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, 79360, Beauvoir sur Niort, France

13
14 * **Corresponding author:** Bertrand Gauffre

15 INRA-EFPA, Centre de Biologie et de Gestion des Populations CBGP, Campus
16 International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France.

17 E mail: gauffre@supagro.inra.fr

18 Fax : +33 4 99 62 33 45

19
20 **Running title:** Sex-specific dispersal patterns in voles

21
22 **Keywords:** genetic analyses, dispersal distances, natal and breeding dispersal,
23 colonization, female kin clusters, *Microtus arvalis*

24 **Abstract**

25 Dispersal is a fundamental process in ecology because it influences the dynamics,
26 genetic structure and persistence of populations. Furthermore, understanding the
27 evolutionary causes of dispersal pattern, particularly when they differ among
28 genders, is still a major question in evolutionary ecology. Using a panel of 10
29 microsatellite loci, we investigated at different spatial scales the genetic structure and
30 the sex-specific dispersal patterns in the common vole, a colonial small mammal.
31 This study was conducted in an intensive agricultural area of western France.
32 Hierarchical F_{ST} analyses, relatedness and assignment tests suggested (1) that
33 females are strongly kin-clustered within colonies and that (2) dispersal is strongly
34 male-biased at a very local scale, while (3) long distance dispersal is not rare and
35 more balanced between genders. We suggest that inbreeding avoidance is likely to
36 be the crucial factor driving male dispersal in this species. Female dispersal appears
37 to be driven by resource competition and most probably leads to the colonization of
38 empty patches. Finally, the large scale of genetic homogeneity observed in this small
39 species may be better understood at the light of these dissimilar dispersal patterns
40 for males and females.

41 **Introduction**

42 Dispersal refers to the movement of an organism from its birth place to its first
43 breeding site (natal dispersal) or from one breeding site to another (breeding
44 dispersal). Dispersal plays a fundamental role in population biology and conservation
45 because it influences the dynamics, the genetic structure and the persistence of
46 populations (Clobert et al. 2001). From a metapopulation perspective, two types of
47 dispersive movements are distinguished: colonization (i.e. settlement in an empty
48 patch) and migration *sensu stricto* (when an individual immigrates into an occupied
49 patch), that differ in their respective consequences for the metapopulation dynamics
50 (Hanski & Gaggiotti 2004). Birds and mammals have long been recognised to exhibit
51 strong gender-biased dispersal patterns. In mammals for instance, males usually
52 disperse more frequently than females (Greenwood 1980), and males were
53 suggested to be the dispersing sex while females are the colonizing sex (Kerth &
54 Petit 2005). Much recent research has focused on understanding the determinants of
55 sex-biased dispersal (for a recent review, Lawson Handley & Perrin 2007) and four
56 alternative hypotheses were stressed to account for sex-biased dispersal: avoidance
57 of inbreeding, local mate competition, local resource competition, and cooperative
58 behaviour among kin. Dispersal is sex-biased when the balance among these
59 evolutionary forces differs among genders. This balance is in turn influenced by the
60 mating system (Perrin & Goudet 2001). In particular, when males defend female
61 resources and compete for access to females, dispersal is expected to be male-
62 biased because females benefit more than males from staying on their natal patch
63 (Greenwood 1980).

64 Dispersal may vary in rate (the proportion of philopatric *versus* migrant individuals),
65 distance between two successive settlements, and timing (natal *versus* breeding

66 dispersal). All three aspects may have evolved independently or in concert, and may
67 be controlled by different or related proximate factors (Ims & Hjermann 2001). While
68 most studies so far focused only on dispersal rates, dispersal distances may also
69 differ between genders and provide interesting clues to ultimate causes of sex-biased
70 dispersal (Murrell et al. 2002; Rousset & Gandon 2002) because the reasons for long
71 distance and short distance dispersal are likely to be very different (Ronce et al.
72 2001). In turn, knowledge on the timing of dispersal, whether an animal disperses or
73 remains philopatric and if it disperses, whether it disperses once in its life (*i.e.* natal
74 dispersal followed by breeding site fidelity) or displays secondary dispersal (*i.e.*
75 breeding dispersal), should be very informative for understanding ultimate and
76 proximate causes of dispersal. Therefore all three aspects of dispersal (rate, distance
77 and timing) are likely to vary with sex, but to our knowledge very few studies have
78 actually investigated differences between sexes in dispersal distances (Douadi et al.
79 2007; Fontanillas et al. 2004), and even less have addressed the issue of sex-
80 differences in the timing of dispersal. The development of indirect, genetic methods
81 over the last few years yet give access to these poorly known aspects of dispersal
82 (Lawson Handley & Perrin 2007)

83 In this study we investigated the sex-specific dispersal pattern in the common vole,
84 *Microtus arvalis*. This Eurasian rodent lives in subterranean burrows in open
85 agricultural land, grazed pastures and meadows, and breeds in colonies (Mitchell-
86 Jones et al. 1999). In agricultural landscapes, colonies are usually distributed in
87 patches due to the fragmented nature of landscape as well as the heterogeneous
88 distribution of permanent or semi-permanent habitats (*i.e.*, grasslands). Observation
89 of groups of breeding females in burrows indicates a polygynous or promiscuous
90 mating system (Boyce & Boyce 1988a) consistent with the male-biased dispersal

91 patterns reported for other similar *Microtus* species (e.g. Aars & Ims 2000). However,
92 information on the dispersal pattern is incomplete for the common vole and
93 somewhat contradictory: genetic analyses at a large geographical scale suggested a
94 male-biased gene flow (Hamilton et al. 2005), whereas local instantaneous measures
95 of immigration rates were not significantly higher for males than for females
96 (Schweizer et al. 2007). Analyses of genetic structures that were carried out in
97 different parts of its distribution range revealed a highly structured pattern at a fine
98 spatial scale (Schweizer et al. 2007) on one hand, but a weakly structured pattern at
99 a large spatial scale (Gauffre et al. 2008) on the other hand. Our poor understanding
100 of dispersal patterns in natural populations of common vole contrasts sharply with the
101 huge amount of experimental work and knowledge cumulated about dispersal cues
102 on common vole and other related *Microtus* species (Stenseth & Lidicker 1992).

103 We thus aimed at describing accurately and quantitatively the dispersal pattern (rate,
104 distance and timing) of both sexes in a natural common vole population, using
105 molecular tools. To this end, we performed a hierarchical sampling design: most
106 individuals within colonies, several colonies per locality, and several localities in the
107 landscape. This spatially explicit design allowed 1) to explore the sex specific pattern
108 of genetic variation at the different spatial scales at which we suspected dispersal to
109 occur and 2) to use recently developed state- and sex-specific hierarchical analysis
110 of the genetic variation (Fontanillas et al. 2004) to infer sex-specific dispersal rates at
111 the different spatial scales. Our goal was to determine the evolutionary forces driving
112 these sex-specific dispersal patterns. Moreover, we hypothesize that this knowledge
113 could help to resolve the apparent paradox of contrasting dispersal patterns gained
114 from different and independent studies for the common vole.

115

116 **Materials and methods**

117 ***Sampling strategy***

118 The study was conducted in central-western France (Région Poitou-Charentes,
119 46·11° N, 0·28° W) in a 500 km² intensive agricultural area from May to July 2007.
120 214 common voles were trapped using 100 m-long trap lines (51 traps spaced every
121 2 m) surveyed for 24 hours (trap line sampling) and 304 more voles were trapped
122 directly in 105 vole colonies using traps disposed in front of the burrows (colony
123 sampling). Animals were weighted, sexed and their reproductive status checked. A
124 very small piece of ear (<1 mm²) was collected for genetic analyses. Individuals
125 heavier than 14 g were considered as adults. Voles were located using a GPS
126 system with a precision of 5 m. Colonies sampled in the same locality were
127 separated by 175 m (15 to 600 m). The 10 localities were separated by on average
128 12.7 km (1.5 to 23.5 km).

129 ***DNA conservation and genotyping***

130 Samples were stored in 95 % ethanol. DNA extraction was carried out using a
131 standard Chelex protocol. DNA was amplified using the polymerase chain reaction
132 and genotyped with a multiplex panel of 10 microsatellites (Gauffre et al. 2008) in a
133 genotyper ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied biosystems). Genotypes were
134 determined using GENESCAN and GENOTYPER (Applied Biosystems). All voles
135 were sexed using molecular typing (Bryja & Konecny (2003).

136 ***Genetic analyses***

137 *Estimating sex-related differences in local dispersal*

138 Sex- and age-related differences in dispersal rates and timing were first investigated
139 at the local scale (i.e. within localities) using the “colony” sampling. We performed

140 relatedness analyses at (1) the intra-colony scale (*i.e.* individuals trapped in the same
141 colony) and (2) the locality scale (excluding pairs from the same colony). At the
142 colony scale, the mean pairwise relatedness is expected to be higher among
143 individuals of the philopatric and less dispersing sex than between those of the most
144 dispersing sex, because individuals of the most dispersing sex, by definition, are less
145 likely to remain in the vicinity of their relatives. At larger scales, differences in mean
146 relatedness should cancel out.

147 We applied the program SPAGeDI 1.2.f (Hardy & Vekemans 2002) to calculate inter-
148 individual relatedness using the Li coefficient corrected for sample size. This
149 estimator shows a high accuracy (low bias) combined with a high precision (low
150 variance) compared to others (Vekemans & Hardy 2004). Relatedness estimation
151 relies on reference allelic frequencies and we used those calculated over the entire
152 data set for these calculations. Using SPAGeDI we tested in each category whether
153 individuals were more related in the colonies than random by permuting, in each
154 locality independently, individuals among colonies. To combine results across
155 localities we used Fisher's method of combining probabilities by summing $-2\ln(p)$
156 across datasets. Because $-2\ln(p)$ is chi-square distributed with 2 degree of freedom,
157 the sum is chi-square distributed with $2n$ degrees of freedom, where n is the number
158 of datasets.

159 Because the pair-wise data are non-independent, we could not directly compare
160 relatedness values between the different categories (male vs. female, juvenile vs
161 male, etc) using usual statistical tests (Prugnolle & de Meeus 2002). We thus applied
162 the procedure of Coulon et al. (2006) which consists in generating 1000 random
163 resampling sets without replacement such that each individual occurs only once in a
164 given resampled set. The difference of mean relatedness Δ_i between the two

165 categories tested is then calculated for each resampling set. Under the null
166 hypothesis, Δ_i should follow a normal distribution centred on 0; under the alternative
167 hypothesis (i.e. category-biased dispersal) Δ_i should be significantly different from 0.
168 We made no a priori on the sign of the difference and thus computed two-sided tests.

169 *Sex-specific differences in local versus long distance dispersal*

170 The relative proportion of local versus long distance dispersal for each gender
171 separately was quantified using the procedure of Fontanillas et al. (2004). The
172 method consists in comparing juvenile (pre-dispersal state) versus adult (post-
173 dispersal state) genetic structures, and local versus large genetic structures, for each
174 sex separately using hierarchical F-statistics. We based this analysis on the “colony”
175 sampling. Colonies, the finest hierarchical level, were nested in the localities
176 (superior hierarchical level) and movements between colonies within localities
177 referred to local dispersal, while movements between localities referred to long-
178 distance dispersal. At the time of sampling, colonies were patchily distributed in the
179 landscape. Each locality thus corresponded to one of such patch. Each locality
180 extended over several hundred square-meters which roughly corresponds to the
181 scale of genetic similarity between individuals as inferred using autocorrelation
182 analyses (Gauffre et al. 2008). The genetic method of Fontanillas et al. (2004)
183 requires sampling to be as exhaustive as possible at the most local scales. We
184 therefore tried to sample all individuals within each colony, and all the colonies within
185 a locality. However, because the signal used in this method is the contrast in gene
186 frequencies between pre- and post-dispersal individuals, we excluded individuals
187 weighting between 12 and 16 g because they are a mix of pre- and post-dispersal
188 individuals (they represent noise in statistical terms). We also excluded colonies in
189 which only one individual was trapped. This amounts to 235 common voles from 70

190 colonies (on average, 7 colonies per locality, range 4-12) including 95 adult females
191 (F), 85 adult males (M) and 55 juveniles (J). Within each colony, an average of 1.34 J
192 (range 0-5), 1.95 F (range 0-7), and 1.57 M (range 0-9) were trapped.

193 The following notations were used: d_1 refers to the dispersal rate between colonies
194 within localities (short-distance dispersal) while d_2 refers to the dispersal rate
195 between localities (i.e. long-distance dispersal); Loc stands for locality; Col refers to
196 colony and Tot to total. Accordingly, F_{LocTot} is the correlation of genes within locality
197 relative to the total; F_{ColLoc} is the correlation of genes within colony relative to locality.
198 When computed in a fully hierarchical setting, F_{LocTot} and F_{ColLoc} deliver an estimate
199 for d_1+d_2 . F_{LocTot} can also be computed without taking into account the colony level
200 (non hierarchical setting). This yields an estimate for d_2 (Fontanillas et al. 2004), and
201 will thus be referred to as F_{ST} . The 95% confidence intervals (95%CI) of the different
202 F -statistics were obtained by bootstrapping over loci. Bootstrapped variance
203 components were also used to compute 95% confidence intervals for dispersal rates.
204 Calculations were performed with the package HierFstat (Goudet 2005) for the
205 statistical software R 2.7.1 (R Development Core Team 2008).

206 *Detection of first generation migrants*

207 Finally, we evaluated the proportion of first generation migrants within each locality,
208 and for each gender separately, using assignment tests. For each individual we
209 computed its likelihood to belong to the population where it was sampled (i.e. the L_h
210 statistic) as recommended when all source for immigrants have not necessarily been
211 sampled (Paetkau et al. 2004), using the frequency method of Paetkau et al. (1995).
212 The probability for an individual to be resident was then assessed using a Monte
213 Carlo resampling procedure. Computations were performed using the program
214 GENECLASS 2.0 (Piry et al. 2004). Individuals with a probability of less than 0.05

215 were excluded as resident. Difference between males and females in the number of
216 migrants was tested using Fisher-exact tests.

217

218 **Results**

219 A total of 511 common voles were caught, 59% of which came from colony trapping
220 scheme; overall, 77% of trapped animals were adults. The adult sex ratio (% of
221 males) of caught animals was female-biased in the colony sampling (0.45, n=174),
222 but male-biased in the trap line sampling (0.55, n=222), a difference that was just
223 significant (K χ^2 test, $P = 0.045$). In addition, the proportion of juveniles was
224 significantly higher in the colony sampling (K χ^2 test, $P = 0.019$).

225 *Sex- and age-related local dispersal: comparison within and between breeding*
226 *colonies*

227 Across the 10 localities, the relatedness among and between M, F and J (fig. 1)
228 showed strong variations within colonies (from 0.38 for relatedness among J to 0.07
229 for M/J relatedness) while it was homogeneous and low at the inter-colonies scale
230 (from 0.03 for relatedness among J to 0.011 for M/J relatedness). The combined
231 probabilities of the permutation tests (performed in each locality independently)
232 indicated that whatever the category considered, pairs of individuals originating from
233 the same colony were significantly more related than random (Fig. 1). However
234 details of these permutation tests showed that in most localities, M were not more
235 related to each other or to J than random (tests were significant at 5% level in 2/7
236 localities for M, 3/10 for M/J pairs and 4/10 for M/F pairs). Conversely in almost all
237 localities F and J were more related in the colonies than expected at random (tests
238 were significant at 5% level in 8/10 localities for F, all for J and 7/9 for F/J pairs).

239 Social structure and sex-biased dispersal were then investigated by comparing
240 within-colony pairwise relatedness for different sex and age categories. Results of
241 these tests indicate that F were significantly more related than M (mean relatedness
242 among F = 0.26, mean relatedness among M = 0.12, $P < 0.001$) and more related to
243 J than M (mean F/J relatedness = 0.21, mean M/J relatedness = 0.06, $P < 0.001$).

244 *Sex-specific differences in local versus long distance dispersal*

245 The fully hierarchical analysis indicated that the colony level explained the major part
246 of molecular variation. The genetic differentiation was lower between localities (F_{LocTot}
247 = 0.018 and 0.011 for M and F respectively) than between colonies among localities
248 (F_{ColLoc} = 0.047 and 0.097 for M and F respectively) (Table 2). The non hierarchical
249 analysis showed that F_{ST} values (differentiation among localities) did not differ
250 significantly among genders ([0.022-0.034] for M and [0.018-0.033] for F) and, as a
251 result, d_2 (long distance dispersal) estimators did not differ significantly among sexes
252 (24% for M vs 27% for F). Conversely, when comparing 95%CI, d_1+d_2 (total
253 dispersal) appeared significantly male-biased because in the hierarchical analysis
254 F_{ColLoc} values (differentiation among colonies within localities) were significantly
255 higher in females. Consequently, d_1 were also significantly male-biased (see Table
256 2). Thus, an estimate of 68% of adult males was immigrant, 44% stemming from
257 other colonies within the same locality (local dispersal) and 24% from other localities
258 (long distance dispersal). In contrast, female dispersal among localities (27%) was
259 the only significant parameter, dispersal among colonies inside a locality being close
260 to zero (1%).

261 *First generation immigrants*

262 Assignment tests conducted over adults within localities allowed the detection of 54
263 immigrants (34 M and 20 F) at the 0.05 probability level, and 17 immigrants (13 M
264 and 4 F) at the 0.01 probability level (Figure 2). Among them, the relative proportion
265 of M was significantly higher (76% at the 0.01 probability level, Fisher test, P-value =
266 0.026; and 63% at the 0.05 probability level, P-value = 0.04).

267

268 **Discussion**

269 We demonstrated that dispersal patterns are different for males and females in the
270 common vole, and that this sex-biased dispersal is scale-dependant. Dispersal rates
271 are strongly male-biased at short distances whereas long distance dispersal is not
272 rare and affects males and females in similar proportions. Genders also differ in the
273 timing of dispersal. Males migrate continuously from colonies to colonies, while
274 females may disperse just once and thus being involved in new colony foundation.

275 *Indirect estimates of dispersal patterns*

276 Although dispersal rates and distances are among the most important aspects of an
277 organism's life history, gathering quantitative estimates in natural populations is
278 notoriously difficult. Much has been done in the recent years to develop population
279 genetic approaches (Lawson Handley & Perrin 2007). Methods relying on uni-
280 parentally inherited markers (i.e. Y chromosomes for males and mtDNA for females
281 in mammals), although theoretically powerful, are not well suited at small
282 geographical scales because of the low genetic polymorphism of the uni-parentally
283 transmitted genome (see Aars et al. 1998; Ishibashi et al. 1997 for voles). At first
284 glance, bi-parentally inherited markers might seem useless because genes
285 transmitted by one sex are redistributed between sexes of the next generation.

286 However, just after the dispersal phase, the genetic structure assessed from
287 individuals of the more dispersing sex should be slightly less pronounced than the
288 one assessed from individuals of the less dispersing sex, because the next
289 reproduction event has not yet mixed male and female alleles (Goudet et al. 2002;
290 Prugnolle & de Meeus 2002). Within this framework, powerful methods coming from
291 different theoretical fields were developed such as hierarchical F -statistics
292 (Fontanillas et al. 2004), relatedness comparisons (Coulon et al. 2006) and
293 assignment procedures (Paetkau et al. 2004). All three methods were applied here
294 and gave consistent results. We wish to emphasize that these three methods
295 measure instantaneous dispersal, which is dispersal over one generation rather than
296 historical rates of dispersal (Prugnolle & de Meeus 2002). This is particularly
297 important because most vole populations usually display fluctuating or cyclic
298 population dynamics (Lambin et al. 2006). Moreover, even though underlying
299 assumptions of the hierarchical F -statistics, among which is island structure,
300 unrealistic in many situations, the method was found to be robust to departures from
301 this hypothesis (Fontanillas et al. 2004). This is also important because vole
302 populations usually display isolation by distance genetic patterns (Berthier et al.
303 2006; Gauffre et al. 2008).

304 *Kin clustering in females*

305 In the colonies, females and juveniles were strongly related to each other indicating
306 that females are organized in matrilineal (ie groups of related breeding females) also
307 called kin clusters. In polygynous mammals, social structures are widespread and
308 cooperative behaviours generally involve females. The building of social bonds
309 among members of one sex is known to act against dispersal in this sex, since
310 individuals benefit from kin cooperation to breed, acquire and defend resource

311 (Lawson Handley & Perrin 2007). Thus kin cooperation among females has the
312 potential to induce female-biased philopatry in polygynous mating systems. Sociality
313 within female kin groups has been described in several species and kin clusters in
314 females seem to be often associated with defence against aggressive unfamiliar
315 conspecifics, in particular against infanticidal males in *Microtus* species (Agrell et al.
316 1998; Ebensperger 1998; Le Galliard et al. 2006). However, although suggested both
317 from theoretical as well as experimental work (see above references), the reality of
318 female kin clusters in natural populations of voles has seldom been demonstrated
319 (but see Ishibashi et al. 1997). Our work bridges this gap between theoretical,
320 experimental and empirical studies and strengthens the view that kin clusters of
321 philopatric females are a basic component of the social structure in natural *Microtus*
322 populations.

323 *Sex-specific patterns of dispersal*

324 It is often assumed that natal dispersal is performed before individuals reach
325 adulthood. Yet individuals may undergo secondary dispersal (i.e. breeding dispersal)
326 later in life. In this study, males appeared highly mobile and subject to breeding
327 dispersal as they were not related with the juveniles inside their colony: males
328 trapped in a colony at the peak of the breeding season were not the fathers of the
329 progeny present in the colony at the same time. Given the fast life cycle of this
330 species (gestation lasts 3 weeks and individuals reach sexual maturity after few
331 weeks of age); it means that males migrate frequently from colonies to colonies. By
332 contrast, the relatedness analysis suggests a low occurrence of immigration of
333 females in extant colonies because females are highly related among each other and
334 with the juveniles inside the colonies. This is consistent with field experiments
335 showing that immigrating microtine females face strong aggressive behaviour (as

336 indicated by the frequency of wounding) from residents when attempting to settle into
337 an occupied colony (Smith & Batzli 2006). We thus conclude that female dispersal
338 between colonies is probably rare and/or ineffective.

339 In polygynous mammals, males are thought not to maintain territories and move as
340 so-called “floaters” between several female territories in order to mate as often as
341 possible, thus male-biased dispersal is expected. In our study, short-distance
342 dispersal refers to very local movements, i.e. at the scale of several hectares,
343 between one or few adjacent agricultural plots, and the so called long-distance
344 dispersal corresponds to movements beyond this scale. Altogether, our data
345 revealed that the dispersal rate of males (68%) was two times higher than that of
346 females (28%). Yet, when taking into account the spatial scale, a different picture
347 emerged. Dispersal was strongly male-biased at a very local scale while it appeared
348 to be more balanced at a larger scale (not significantly different between males and
349 females). In a previous study on sex specific dispersal distance in shrews
350 (Fontanillas et al. 2004) a symmetric dispersal pattern was inferred (females were
351 found to disperse locally and both sexes at long distance). Mating systems are
352 different between these two species (monogamy for shrews, polygyny for common
353 voles). Therefore, the difference in sex specific dispersal pattern of these two models
354 is consistent with the hypothesis that mating system influences the direction of sex-
355 biased dispersal. Genetic assignments conducted at the inter-locality scale confirmed
356 this trend with a significant bias toward males. The dispersal bias obtained from the
357 two methods can however not directly be compared unless the sex-ratio is balanced
358 because the assignment method counts the number of migrants while the *F*-statistics
359 analyses estimate dispersal rates. Hence, a male biased sex-ratio could also explain
360 why the number of male migrants exceeds the number of female migrants even if

361 dispersal rates were equal in males and females. Our line-trapping procedure
362 showed male-biased sex ratio while the colony trapping nevertheless revealed a
363 female-biased sex-ratio. This can be explained by differences in mobility between
364 sexes at the time of the sampling and illustrates that sex-ratio differences are difficult
365 to measure in nature (Bryja et al. 2005). What is striking, though, is that both a
366 method which results depends on sex-ratio (the detection of first-generation
367 migrants) and a method that does not depend on this parameter (hierarchical F -
368 statistics) show a male-bias that lies around 70% of dispersal achieved by males.
369 Overall, these patterns strongly support our findings that dispersal is male-biased in
370 the common vole.

371 There is increasing evidence that short- and long-distance dispersal events rely on
372 different mechanisms (Ronce et al. 2001). Short distance dispersal is probably
373 sufficient for avoiding inbreeding or kin competition, whereas dispersal over longer
374 distance might function to colonize new territory or escape crowding (Lawson
375 Handley & Perrin 2007). The pattern of dispersal estimated for males, again with the
376 evidence of frequent breeding dispersal, suggests that male dispersal is essentially
377 driven by inbreeding avoidance in the common vole. Local mate competition among
378 related males needs further exploration. In some cases related males (full sibs) were
379 found in the same colony, which may be the signature of parallel dispersal (see
380 Lawson Handley & Perrin 2007 for some examples in mammals).

381 By contrast, females appeared to be essentially philopatric with no or few movements
382 between colonies within localities. Yet long-distance dispersal (beyond the locality
383 scale) was not rare. We suggest that female dispersal behaviour mostly translates
384 into the colonization of empty patches through new colony foundation. This assertion
385 is also supported by demographic studies of *Microtus* populations. Boyce and Boyce

386 (1988b) argue that common vole females may eventually disperse after their first
387 fecundation to colonize empty habitats without the stress to find a mate. In
388 experimental populations, the presence of immigrant females attempting to settle in
389 colonies depressed the weaning success of resident females, and the fitness of
390 dispersing females into colonies occupied by unrelated matriline was low (Lambin &
391 Krebs 1993; Lambin & Yoccoz 1998). We argue that the proximate causes of female
392 dispersal in voles would result from local resource competition among relatives in
393 response to crowding conditions or colonization opportunities. Accordingly, it is a
394 general feature that distances travelled to colonize newly opened habitats are larger
395 than those travelled to avoid interactions with relatives (Ronce et al. 2001).

396 *Landscape and demographic influences*

397 Dispersal is a crucial life history trait of individual organisms in patchy landscapes
398 with profound consequences for the dynamics of metapopulations (Clobert et al.
399 2001; Hanski & Gaggiotti 2004). Agricultural landscapes are by nature highly
400 fragmented with a patchwork of habitats of varying quality. Additionally, land use and
401 agricultural practices (i.e. harvesting, mowing and ploughing) introduce further
402 temporally asynchronous alterations of habitat quality and suitability. There are
403 theoretical reasons why dispersal may provide adaptation to ephemeral habitats
404 (Ronce 2007) because dispersal allows tracking patches of favourable habitat and
405 escape from deteriorating local conditions. Local disturbances generate patches with
406 underexploited resources allowing dispersers to escape from overcrowding.
407 Dispersal is also known to be influenced by demography and density dependence is
408 still a matter of considerable debate in the dynamics of vole populations. There is a
409 general agreement that immigration rates are negatively density-dependant in small
410 mammals (Lambin et al. 2001). At the metapopulation level, immigrants are also less

411 successful at colonizing a patch with high densities than those with low densities
412 (Gundersen et al. 2002). Long-term data sets showed that recruitment was strongly
413 negatively-related to density in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*) either through
414 a reduction in immigration or reduced survival in nestlings (Reed & Slade 2008). In
415 accordance with the above experimental studies, our empirical data strengthen the
416 role of females in the colonization process within natural populations. As a result
417 females allow the spatial cohesion of the metapopulation over a large spatial scale.
418 Males, in turn, as obligatory dispersers, warrant a strong gene flow (which is possible
419 thanks to female colonizations) in the metapopulation through small scale but intense
420 migration among colonies.

421 Our work was conducted during a phase of increasing density which could have
422 enhanced females to emigrate and settle further than their native agricultural plot. If
423 both migration and colonization are truly mediated by local density, we can thus
424 postulate that effective dispersal in common vole should vary in distance and rate
425 along the demographic cycle; (1) distance: from mainly local during low densities to
426 larger scaled when density increases and (2) rates: decreasing with increasing
427 density for males (due to higher competition) and, because density influences
428 migration and colonization in opposite manners, increasing with density for females.
429 Clearly this issue needs to be examined using long-term genetic data sets in this
430 cyclic vole population.

431

432

433

434

435 **Acknowledgements**

436 We thank Julien Foucaud and Audrey Sternalski for helpful comments on draft of the
437 manuscript and Maxime Galan, Alexandre Villers and Olivier Fontaine for help in
438 trapping voles. This work was supported by INRA (ECOGER national program), and
439 Bertrand Gauffre received a grant from ACI ECCO.

440

For Review Only

441 **References**

- 442
- 443 Aars, J. & Ims, R. A. 2000 Population dynamic and genetic consequences of spatial density-
444 dependent dispersal in patchy populations. *American Naturalist* **155**, 252-265.
- 445 Aars, J., Ims, R. A., Liu, H. P., Mulvey, M. & Smith, M. H. 1998 Bank voles in linear habitats
446 show restricted gene flow as revealed by mitochondrial DNA (mtDNA). *Molecular*
447 *Ecology* **7**, 1383-9.
- 448 Agrell, J., Wolff, J. O. & Ylonen, H. 1998 Counter-strategies to infanticide in mammals: costs
449 and consequences. *Oikos* **83**, 507-517.
- 450 Berthier, K., Charbonnel, N., Galan, M., Chaval, Y. & Cosson, J. F. 2006 Migration and
451 recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole
452 populations. *Molecular Ecology* **15**, 2665-2676.
- 453 Boyce, C. C. K. & Boyce, J. L. 1988a Population biology of *Microtus arvalis*. I. Lifetime
454 reproductive success of solitary and grouped breeding females. *Journal of Animal*
455 *Ecology* **57**, 711-722.
- 456 Boyce, C. C. K. & Boyce, J. L. 1988b Population biology of *Microtus arvalis*. II. Natal and
457 breeding dispersal of females. *Journal of Animal Ecology* **57**, 723-736.
- 458 Bryja, J. & Konecny, A. 2003 Fast sex identification in wild mammals using PCR
459 amplification of the Sry gene. *Folia Zoologica* **52**, 269-274.
- 460 Bryja, J., Nesvadbova, J., Heroldova, M., Janova, E., Losik, J., Trebaticka, L. & Tkadlec, E.
461 2005 Common vole (*Microtus arvalis*) population sex ratio: biases and process
462 variation. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **83**, 1391-
463 1399.
- 464 Clobert, J., Danchin, E., Dhondt, A. A. & Nichols, J. D. 2001 *Dispersal*. Oxford: Oxford
465 University Press.
- 466 Coulon, A., Cosson, J. F., Morellet, N., Angibault, J. M., Cargnelutti, B., Galan, M.,
467 Aulagnier, S. & Hewison, A. J. M. 2006 Dispersal is not female biased in a resource-
468 defence mating ungulate, the European roe deer. *Proceedings of the Royal Society B-*
469 *Biological Sciences* **273**, 341-348.
- 470 Douadi, M. I., Gatti, S., Levrero, F., Duhamel, G., Bermejo, M., Vallet, D., Menard, N. &
471 Petit, E. J. 2007 Sex-biased dispersal in western lowland gorillas (*Gorilla gorilla*
472 *gorilla*). *Molecular Ecology* **16**, 2247-2259.
- 473 Ebensperger, L. A. 1998 Strategies and counterstrategies to infanticide in mammals.
474 *Biological Reviews* **73**, 321-346.
- 475 Fontanillas, P., Petit, E. & Perrin, N. 2004 Estimating sex-specific dispersal rates with
476 autosomal markers in hierarchically structured populations. *Evolution* **58**, 886-894.
- 477 Gauffre, B., Estoup, A., Bretagnolle, V. & Cosson, J. F. 2008 Spatial genetic structure of a
478 small rodent in a heterogeneous landscape. *Molecular Ecology* **17**, 4619-4629.
- 479 Goudet, J. 2005 HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics.
480 *Molecular Ecology Notes* **5**, 184-186.
- 481 Goudet, J., Perrin, N. & Waser, P. 2002 Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally
482 inherited genetic markers. *Molecular Ecology* **11**, 1103-1114.
- 483 Greenwood, P. J. 1980 Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals.
484 *Animal Behaviour* **28**, 1140-1162.
- 485 Gundersen, G., Andreassen, H. P. & Ims, R. A. 2002 Individual and population level
486 determinants of immigration success on local habitat patches: an experimental
487 approach. *Ecology Letters* **5**, 294-301.
- 488 Hamilton, G., Currat, M., Ray, N., Heckel, G., Beaumont, M. & Excoffier, L. 2005 Bayesian
489 estimation of recent migration rates after a spatial expansion. *Genetics* **170**, 409-417.

- 490 Hanski, I. & Gaggiotti, O. 2004 *Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations*.
 491 Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- 492 Hardy, O. J. & Vekemans, X. 2002 Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial
 493 genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**,
 494 618-620.
- 495 Ims, R. A. & Hjernann, D. O. 2001 Condition dependent dispersal. In *Dispersal* (ed. J.
 496 Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols). Oxford University Press.
- 497 Ishibashi, Y., Saitoh, T., Abe, S. & Yoshida, M. C. 1997 Sex-related spatial kin structure in a
 498 spring population of grey-sided voles *Clethrionomys rufocanus* as revealed by
 499 mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* **6**, 63-71.
- 500 Kerth, G. & Petit, E. 2005 Colonization and dispersal in a social species, the Bechstein's bat
 501 (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* **14**, 3943-3950.
- 502 Lambin, X., Aars, J. & Piertney, S. B. 2001 Dispersal, intraspecific competition, kin
 503 competition and kin facilitation: a review of the empirical evidence. In *Dispersal* (ed.
 504 J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp. 110-122: Oxford
 505 University Press.
- 506 Lambin, X., Bretagnolle, V. & Yoccoz, N. G. 2006 Vole population cycles in northern and
 507 southern Europe: Is there a need for different explanations for single pattern? *Journal*
 508 *of Animal Ecology* **75**, 340-349.
- 509 Lambin, X. & Krebs, C. J. 1993 Influence of female relatedness on the demography of
 510 townsend's vole populations in spring. *Journal of Animal Ecology* **62**, 536-550.
- 511 Lambin, X. & Yoccoz, N. G. 1998 The impact of population kin-structure on nestling survival
 512 in Townsend's voles, *Microtus townsendii*. *Journal of Animal Ecology* **67**, 1-16.
- 513 Lawson Handley, L. J. & Perrin, N. 2007 Advances in our understanding of mammalian sex-
 514 biased dispersal. *Molecular Ecology* **16**, 1559-1578.
- 515 Le Galliard, J. F., Gundersen, G., Andreassen, H. P. & Stenseth, N. C. 2006 Natal dispersal,
 516 interactions among siblings and intrasexual competition. *Behavioral Ecology* **17**, 733-
 517 740.
- 518 Mitchell-Jones, A. J., Amori, G. & Bogdanowicz, W. 1999 *The Atlas of European Mammals*.
 519 London: Poyser, T. Poyser, A.D.
- 520 Murrell, D. J., Travis, J. M. J. & Dytham, C. 2002 The evolution of dispersal distance in
 521 spatially-structured populations. *Oikos* **97**, 229-236.
- 522 Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. & Strobeck, C. 1995 Microsatellite analysis of
 523 population-structure in canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**, 347-354.
- 524 Paetkau, D., Slade, R., Burden, M. & Estoup, A. 2004 Genetic assignment methods for the
 525 direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of
 526 accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**, 55-65.
- 527 Perrin, N. & Goudet, J. 2001 Inbreeding, kinship, and the evolution of natal dispersal. In
 528 *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp. 123-141:
 529 Oxford University Press.
- 530 Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. 2004
 531 GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant
 532 detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.
- 533 Prugnolle, F. & de Meeus, T. 2002 Inferring sex-biased dispersal from population genetic
 534 tools: a review. *Heredity* **88**, 161-165.
- 535 R Development Core Team. 2008 R: a language and environment for statistical computing.
 536 Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- 537 Reed, A. W. & Slade, N. A. 2008 Density-dependent recruitment in grassland small
 538 mammals. *Journal of Animal Ecology* **77**, 57-65.

- 539 Ronce, O., Olivieri, I., Clobert, J. & Danchin, E. 2001 Perspectives on the study of dispersal
540 evolution. In *Dispersal* (ed. J. Clobert, E. Danchin, A. A. Dhondt & J. D. Nichols), pp.
541 314-357: Oxford University Press.
- 542 Rousset, F. & Gandon, S. 2002 Evolution of the distribution of dispersal distance under
543 distance-dependent cost of dispersal. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 515-523.
- 544 Schweizer, M., Excoffier, L. & Heckel, G. 2007 Fine-scale genetic structure and dispersal in
545 the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* **16**, 2463-2473.
- 546 Smith, J. E. & Batzli, G. O. 2006 Dispersal and mortality of prairie voles (*Microtus*
547 *ochrogaster*) in fragmented landscapes: a field experiment. *Oikos* **112**, 209-217.
- 548 Stenseth, N. C. & Lidicker, W. Z., Jr. 1992 *Animal Dispersal*. London: Chapman & Hall.
- 549 Vekemans, X. & Hardy, O. J. 2004 New insights from fine-scale spatial genetic structure
550 analyses in plant populations. *Molecular Ecology* **13**, 921-935.
- 551
- 552

For Review Only

569 **Table 1** Details of sex and reproductive state of the sampled common voles for the
 570 two sampling strategies separately. Sex ratio is proportion of males.

571

Sampling	Stage	Number trapped	Sex-Ratio	% of reproductive adults
Trap Lines	Adults	174	0.55	0.82
	Juveniles	36	0.44	
Colonies	Adults	222	0.45	0.73
	Juveniles	79	0.49	

For Review Only

Table 2. F -statistics and associated dispersal rates in *Microtus arvalis*. In the non hierarchical analysis, F_{ST} quantifies the genetic differentiation among localities. In the hierarchical analysis, F_{LocTot} quantifies the genetic differentiation between localities within the total and F_{ColLoc} the differentiation between colonies within localities. Dispersal rate between localities ($d2$) and total dispersal rate ($d1+d2$), are computed from the non hierarchical and hierarchical sex- and state-specific analyses respectively. Dispersal rate between colonies within localities ($d1$) is derived from the previous estimates. Confidence intervals (95%) are in brackets.

Category	n	Non-hierarchical analysis		Hierarchical analysis			
		F_{ST}	$d2$	F_{LocTot}	F_{ColLoc}	$d1+d2$	$d1$
Juveniles	55	0.047 [0.034-0.058]		0.021 [0.01-0.033]	0.161 [0.129-0.19]		
Males	85	0.027 [0.022-0.034]	0.24 [0.20-0.23]	0.022 [0.017-0.027]	0.036 [0.016-0.062]	0.68 [0.53-1]	0.44 [0.29-0.80]
Females	95	0.025 [0.018-0.033]	0.27 [0.25-0.27]	0.013 [0.004-0.022]	0.085 [0.054-0.113]	0.28 [0.24-0.35]	0.01 [-0.01-0.08]

553 **Figure captions**

554

555 **Figure 1.** Boxplots showing pairwise relatedness values among adult females (FF),
556 between adult females and juveniles (FJ), among juveniles (JJ), between adult males
557 and juveniles (MJ), among adult males (MM) and between adult females and adult
558 males (MF), trapped in the same colony **(a)** and trapped in the same locality, but not
559 the same colony **(b)**. Boxes represent the interquartile range, bars within boxes are
560 median values, whiskers indicate the 10th and 90th percentiles. Dots indicate mean
561 value. Numbers of pairwise data is also indicated. In the first graph the combined p-
562 value of the permutations tests of individuals among colonies is also provided (*:
563 $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$).

564

565 **Figure 2.** Proportion of adult females and adult males detected as first generation
566 migrants for different probability thresholds. Result of the Fisher test for sex
567 differences in the proportion of migrant is indicated (NS: not significant, *: $P < 0.05$).

568

Figure 1

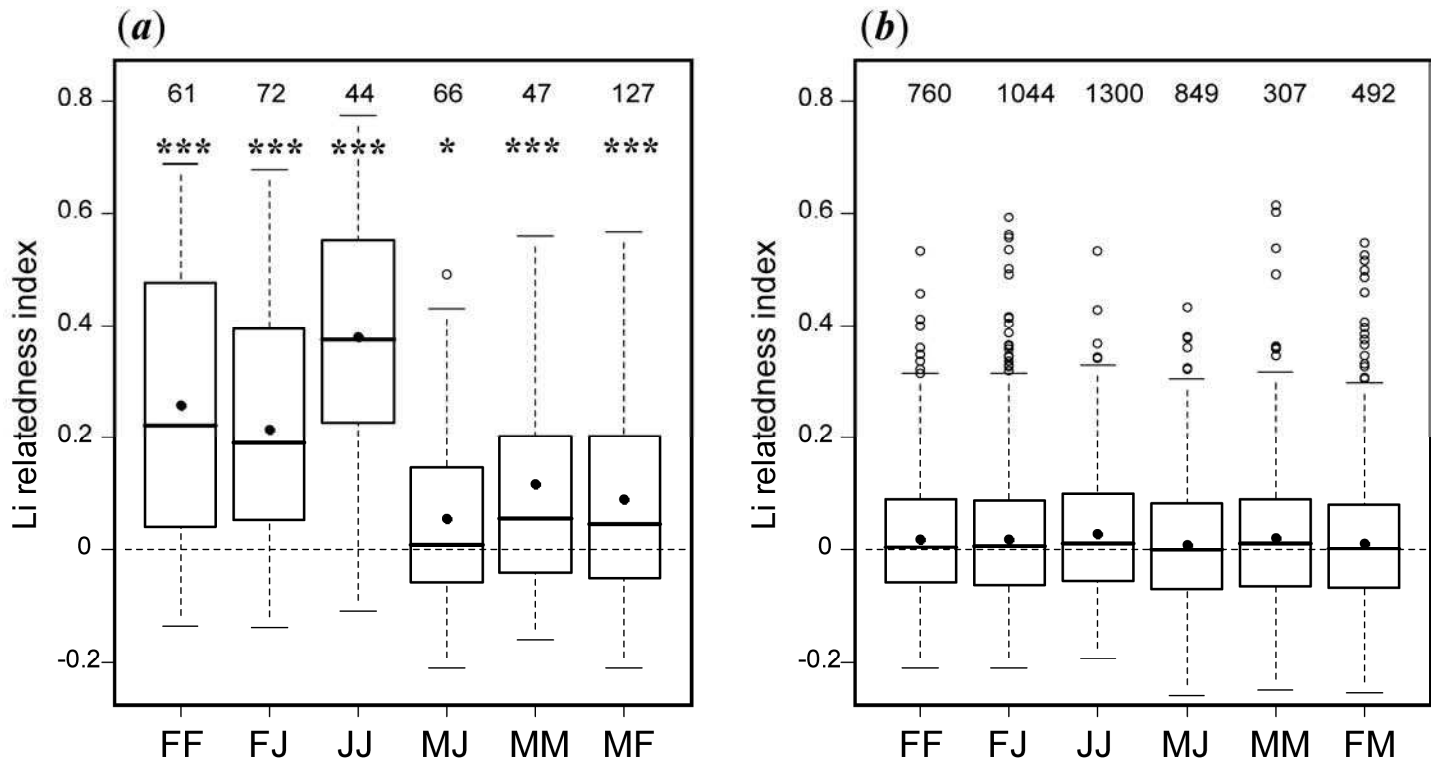
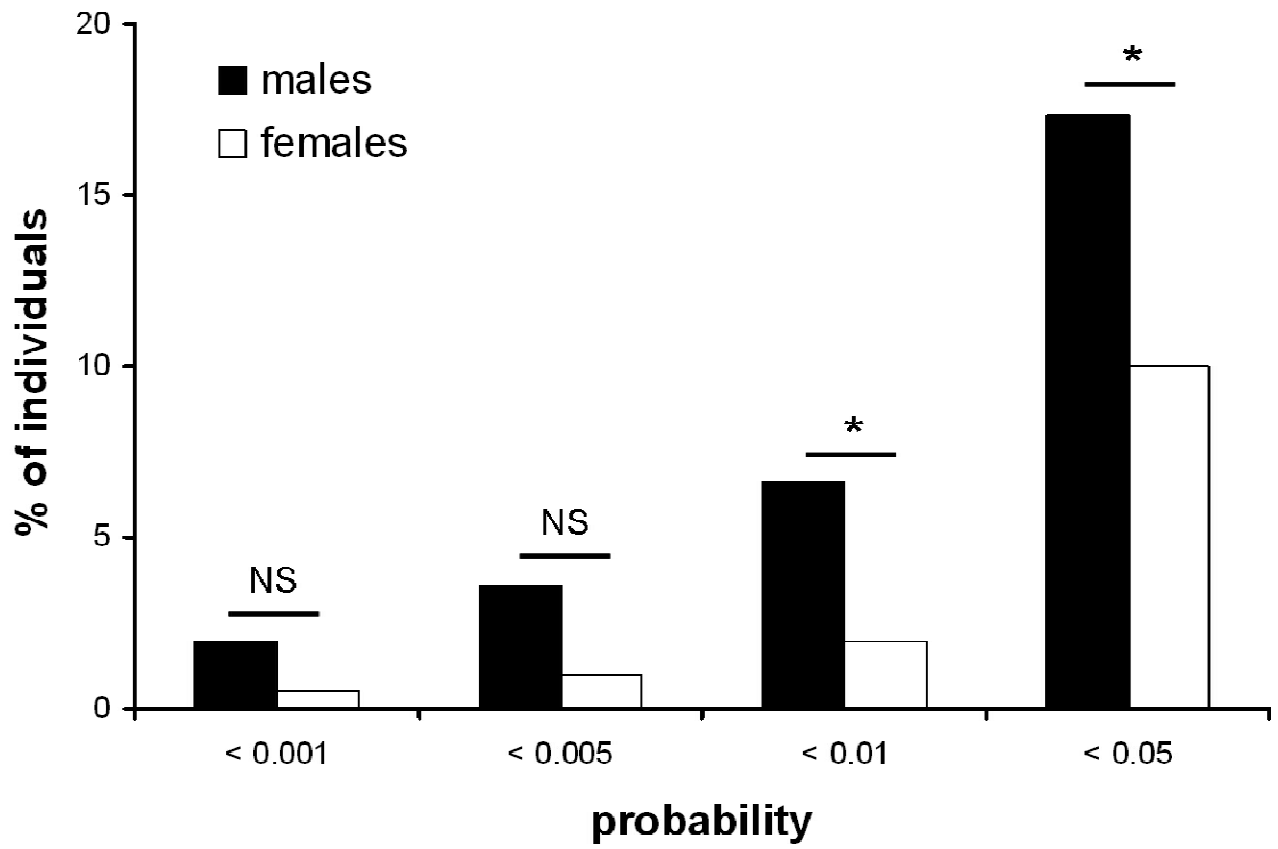


Figure. 2



Only

ARTICLE 4:

Short-term variations in gene flow in a cyclic common vole population

Short-term variations in gene flow in a cyclic common vole population

B. GAUFFRE¹, T. CORNULIER², P. INCHAUSTI², K. BERTHIER³, Y. CHAVAL¹, J. F. COSSON¹ and V. BRETAGNOLLE²

¹ INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France

² CNRS, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, 79360, Beauvoir sur Niort, France

³ School of Biological Sciences University of Sydney The Macleay Building A12 Sydney, NSW 2006 Australia

V. Bretagnolle and J.F. Cosson have contributed equally.

* **Corresponding author:** Bertrand Gauffre

INRA-EFPA, Centre de Biologie et de Gestion des Populations CBGP, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France.

E mail: gauffre@supagro.inra.fr

Fax : +33 4 99 62 33 45

Keywords: Gene flow, cyclic rodent populations, genetic diversity, migration, spatial genetic structure, *Microtus arvalis*

Abstract

In populations experiencing demographical changes, gene flow is expected to vary as the result of an unstable balance between the competing processes of genetic drift and migration. The influence of genetic drift would predominate that of migration when population decrease while the reverse would occur during a population increase. Cyclic rodent populations are extreme examples of high demographic instability and then good candidates to test for these general predictions. In this study, the multiannual genetic structure of a cyclic rodent was analyzed using a sample set of 829 common voles trapped over three complete cycles (from 1999 to 2007) and genotyped at 10 microsatellite loci. Gene flow was estimated using genetic diversity and differentiation parameters. We tested the prediction that all genetic parameters vary along time, and that these variations are related with vole densities. Genetic diversities were expected to decrease and genetic differentiation to increase during low numbers, and the reverse was expected during high numbers. Overall the predictions were verified in our dataset with slight but significant temporal variations of all genetic parameters. We conclude that the decrease of gene flow related to genetic drift during low numbers is not fully compensated by eventual change in migration patterns. Symmetrically, gene flow is higher during high numbers, and allows the recovery of genetic diversity as well as the decrease in genetic differentiation. Gene flow analyse do not allow separate estimations for genetic drift and migration because it measures the result of both processes altogether.

Introduction

The neutral genetic diversity of natural populations and its spatial architecture both result from microevolutionary processes including mutation, migration and genetic drift. However, over small time-scales the influence of mutation can be neglected. Thus, the diversity and spatial patterns of the neutral genetic variation are mainly regulated by the interplay between local genetic drift and migration (Slatkin 1993; Wright 1931; Wright 1942), which are both related to effective population size (N_E). Many features of a species' ecology are effectively subsumed in N_E , including sex ratio, unequal individual contributions to breeding and population census size (Hartl & Clark 1997). The interplay between genetic drift and migration is expected to tend toward equilibrium under demographically stable conditions. This property allowed the development of very popular population genetics methods allowing the derivation of migration estimates through gene flow analyses within the classical framework of the Wright-Fisher (WF) model (Wright 1931) or the more recent isolation-by-distance (IBD) model (Rousset 1997; Rousset 2000). In the WF model, the gene flow measures the product of N_E and the migration rate (m). In the IBD model, it measures the product of effective density (D_E) and the mean parent offspring-dispersal distance (σ). In both models gene flow is a product of a parameter directly related with the strength of the genetic drift (N_E or D_E) and another directly related with migration (m or σ). If accurate estimates of N_E or D_E can be yielded through independent data (from census data or population dynamics estimates) gene flow measures may therefore produce valuable estimates of migration. Inferred values then correspond to estimates at the migration-drift equilibrium.

Many natural populations greatly vary in size along space or time, and therefore strongly depart from the migration-drift equilibrium. This has important consequences on gene flow estimates and on the exact meaning of these estimates. It is now widely accepted that contemporary patterns of genetic diversity reflect both the past and the present-time population dynamics (Whitlock & McCauley 1999). Simulation studies (Leblois et al. 2006; Leblois et al. 2004) validated these theoretical considerations and actually demonstrated that IBD populations are characterised by a strong inertia in the loss of genetic diversity. This translates in a low degree of precision on the demographic parameters (D_E or σ) estimated using indirect methods based on genetic markers. For very recent change (ie. less than 10 generations) estimates are biased toward past demographic values and are thus likely to be intermediate between past

and real-time values. Altogether these works demonstrated that gene flow is highly sensitive to high demographic instability in the short time, and thus unlikely to reach equilibrium values in such systems. In that sense they strengthen the view of Hutchinson and Templeton (1999) that gene flow in demographical instability should oscillate with time as a result of the temporal variation in genetic drift intensity, higher during low numbers and lower during high numbers. Moreover the prediction remains true even if migration does not vary with density or, to a certain extent, is slightly inversely correlated with density, because gene flow in highly demographically unstable populations will be mainly influenced by the strong variation in density. Within this conceptual view, gene flow should decrease during low numbers and increase during high numbers. If we take into account the inertia inherent in population genetics, time variations in gene flow intensity should be slightly time-lagged.

Cyclic populations are extreme cases of temporal variation in census size in that their numbers are subject to huge periodic changes. Many populations of microtine rodents undergo 3-7 year cycles with 10 to 100-fold changes in population density (e.g., voles and lemmings, Stenseth 1999). It has long been hypothesised that the regular demographic bottlenecks experienced during low phases should translate in strong genetic drifts and then result in low genetic diversities in the long term (Ehrich & Jorde 2005). However, all recent works using highly variable markers revealed that cyclic rodent populations generally have high level of genetic diversity (Ehrich et al. 2001; Plante et al. 1989). Several hypotheses can explain this paradox. One is that populations would not be affected (or only slightly) by genetic drift during low density periods, possibly because N_E or D_E remains sufficiently high and/or because the duration of these periods is short. This will be referred as the “no drift” (ND) hypothesis. Another is that genetic drift experienced by populations would be counterbalanced by the effect of intense immigration reestablishing gene flow and thus genetic diversity. Immigration can be contemporary to the low densities (negative-density dependence) or time-lagged toward the increasing density demographic phase (positive-growth dependence). These will be referred as the “drift plus migration” (DM) hypothesis and the “drift plus time-lagged migration” (DTLM) hypothesis respectively. The DM hypothesis is supported by empirical and experimental demographic studies which demonstrated that dispersal is negatively density-dependant in vole populations (Andreassen & Ims 2001; Ims & Andreassen 2005). Yet a recent longitudinal population genetics study conducted from the low densities to the high densities in a cyclic vole gave more support to the DTML hypothesis (Berthier et al. 2006). Up to

now, only very few empirical studies have investigated temporal changes in gene flow in cyclic rodent populations (Berthier et al. 2006; Berthier et al. 2005; Gileva & Rakitin 2006; Plante et al. 1989) and none of them clearly addressed these hypotheses. Within this framework, ND and DM hypotheses have a similar prediction which is “no temporal variation in gene flow”. Alternatively, DTLM hypothesis should be testable among the two others because it should obligatory verify the two following predictions: first, gene flow should be variable with time; second gene flow should be positively correlated with N_E or D_E (in the frame of the HW or IBD models respectively). For the second prediction, a time-lag is expected.

Here we use as a study model the common vole *Microtus arvalis*, a small sized rodent that shows large cyclic spatio-temporal variation in abundance in Western European agro-ecosystems (Lambin et al. 2006). This colonial microtine rodent has several generations per year since young can reproduce at the age of a few weeks (Le Louarn & Quéré 2003). In this species, dispersal most likely occurs during late summer or fall (Aars & Ims 2000) and is male biased (Hamilton et al. 2005, Gauffre et al. submitted). The multiannual genetic structure of this cyclic rodent was analyzed using a sample set of 829 common voles trapped over three complete cycles (from 1999 to 2007) within an intensive farmland in central-western France. Voles were genotyped at 10 hypervariable microsatellite loci. This vole population was already documented to be shaped by an IBD pattern over the whole study area (Gauffre et al. 2008). Gene flow was thus estimated using genetic diversity (allelic richness, expected and observed heterozygosities) and genetic differentiation (mean pairwise genetic distances and the slope of the isolation by distance) parameters. First, we tested if temporal variations in vole numbers translate into variations in gene flow within the studied population, and if these variations are related with vole densities. Following the ND and DM hypotheses genetic diversities were not expected to vary substantially with time or density. Alternatively, following the DTLM hypothesis genetic diversities were expected to decrease and genetic differentiation to increase during low numbers, and the reverse was expected during high numbers. Second, we aimed at testing for a mechanism underlying the fluctuations of gene flow patterns by investigating sex-dependant spatial genetic patterns in response to the density fluctuations. To that aim we tentatively used autocorrelation analyses to contrast sex-specific gene flow according to spatial scale and density. Because migration is male-biased in the common vole, we expected male gene flow to display higher variation with density than female gene flow.

Material & Methods

Study area and sample collection

The study area covers about 450 km² of an intensive farmland in central-western France (Région Poitou-Charentes, 46.11° N, 0.28° W). Land use in the study site consists primarily of a complex mosaic of annual crops containing cereals (42% of total agricultural area), rapeseed (13%), oleaginous (27%), semi-perennial meadows (14%) and few other miscellaneous crops. Genetic sampling and estimation of vole abundance were carried out in two trapping sessions (April and June) per year between April 1999 and June 2007 using a total of 90 trap lines in each trapping session. In each trapped field, a line of 51 live traps, placed at 2m intervals, was left for 24 hours. Selection of fields was stratified to maintain a constant representation of each major class of land use. GPS coordinates were used to record the location of captured voles on a GIS of the study site, with a precision of c.10 m. Each captured animal was sexed, weighted and checked for reproductive status and a small piece of ear was collected for genetic analyses. In total, 829 voles were sampled (see details in Table 1). Spatial locations of individuals sampled in each session are indicated in. (Figure s1, supplementary materials)

Common vole demography

In western France the common vole has a clear cyclic dynamics with a 3-yr. period, 100-fold amplitude Fig. 1a) that is synchronous over hundreds of km² (Lambin et al. 2006). For each trapping session, population density was estimated as the mean number of captures for 100 traps at the study site weighted by the number of fields sampled for each main crop type. Mean values of 1.5 of the index of vole abundance correspond to a geometric mean density of approximately 104 common voles/ha over the whole study site (Lambin et al. 2006). The yearly population growth rate was estimated as the logarithmic ratio of the estimated population density into two consecutive years (June density estimates, Fig 1b). Because of its importance for describing common vole metapopulation dynamics, we also calculated an index of occupancy as the proportion of the fields sampled wherein at least one vole was captured for each trapping session separately (Fig. 1c).

Microsatellite genotyping

Tissue samples were stored in 95 % ethanol prior to DNA extraction; which was carried out using a standard Chelex protocol. DNA was amplified using the polymerase chain

reaction and genotyped with a multiplex panel of 10 microsatellites (see details in Gauffre et al. 2008; Gauffre et al. 2007) using an automated sequencer ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied biosystems). Genotypes were determined using GENESCAN and GENOTYPER softwares (Applied Biosystems). To assess the repeatability of methods, ten individual genotypes were repeated at random for each year separately. This procedure indicated 100 % replicability of the genotyping. Detailed analyses of genotypic linkage disequilibrium using the G-test in GENEPOP 4.0 (Rousset 2008) previously demonstrated that our loci are not physically linked (Gauffre et al 2008).

Statistical analyses

Genetic diversities

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each locus, and for all loci considered together, was tested for each trapping session by exact tests using the Markov chain method in GENEPOP 4.0. Deviation from HWE was quantified by estimating the F_{IS} calculated according to Weir & Cockerham. We used the Benjamini & Hochberg's (1995) false discovery rate approach (FDR) to account for multiple testing. Genetic variation was estimated over all loci and for each sampling session by calculating the unbiased expected (H_e ; Nei 1987) and the observed (H_o) heterozygosities using GENETIX 4.05.2 (Belkhir 2004). We used the rarefaction procedure implemented in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001) to estimate the allelic richness (A) in the different trapping sessions by estimating the expected number of alleles in subsamples of seven individuals (14 genes), i.e. the smallest number of individuals typed for a locus in a sample.

Genetic differentiation

IBD was analysed for each year (pooling April and June sampling sessions) by testing the correlation between pairwise genetic distances between individuals (\hat{a} statistic Rousset 2000; or \hat{e} statistic Watts et al. 2007), and the logarithm of their geographical distances using Mantel tests in GENEPOP 4.0. The linear relationship between these variables is expected to hold best at distances greater than the mean parent-offspring dispersal distance (σ) and to progressively deviate from linearity at distances larger than 50 times σ (Rousset 2000; Vekemans & Hardy 2004). We thus excluded pairwise comparisons between individuals separated by less than 250 m (Gauffre et al. 2008). Many arguments discussed in Watts et al. (2007) make the use of the \hat{e} statistics more

accurate than the classical \hat{a} statistics (Rousset 2000) in our population. First, the \hat{e} -based analysis is less dependent on past demographic events than the \hat{a} -based one (see table 7 in Leblois et al. 2004; Watts et al. 2007). Second \hat{e} alleviates limitation of the \hat{a} -based estimator in estimating spatial patterns in relatively mobile species. Unless dispersal is much localised, the \hat{e} -based estimate of the slope has lower mean square error even if its estimate of the slope tends to be much more downward biased than the \hat{a} -based estimate because divergence between the most distant individuals is underestimated with the \hat{e} statistics. Finally, \hat{e} -based estimator has higher IBD testing power. IBD slopes were compared among years using confidence intervals calculated in GENEPOP 4.0. Because the differentiation among individuals is also informative with regards to temporal variations of gene flow, we also computed the mean pairwise genetic distance between individuals (excluding pairs separated by less than 250 m) for each year separately.

Sex-biased specific dispersal patterns were explored using spatial correlation analyses. We estimated inter-individual relatedness by computing the Li coefficient (Li et al. 1993) that is thought to be more accurate than Moran's I (Rousset 2007) using the program SPAGeDI 1.2.f (Hardy & Vekemans 2002). The first distance class corresponded to individuals sampled on the same trap line (i.e. same agricultural plot), whereas subsequent classes were defined every 2,500m. Allelic frequencies calculated over each year separately were used to compute pairwise relatedness among individuals trapped in the same year. Significant deviation of spatial correlation patterns from the random distribution of genotypes was estimated using 1,000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations of their sampling year. Correlograms were computed for each sex and for year separately, and then data in the high density years (2002, 2005 and 2007) on one hand, and data in the low density years (2001, 2003, 2004 and 2006) on the other hand were pooled for each sex separately.

Testing the effect of demography on the genetic parameters

We used two separate linear models to test the effect of density on the genetic diversity (A parameters), and on the genetic differentiation (IBD slope), respectively, using the statistical software **R 2.7.1** (R Development Core Team 2008). The explanatory variables tested were: (1) the vole density during the current session (N_t); (2) the vole density during the previous year (June estimates, N_{t-1}); (3) the yearly population growth rate; and (4) the seasonal effect (i.e. month of sampling, April or June). To take into

account of the effect of potential bias linked to temporal variation in the spatial distribution of our genetic samplings, we also included in the GLM analyses the proportion of the studied area represented in the genetic sampling, and the clustering of sampled individuals (i.e. number of individuals per trap line) for each session separately. Linear models with different combination of explanatory variables were compared using AICc and the simplest model, that is having the lowest AICc, was retained. Models with a difference in AICc < 2 were considered equally adequate (Burnham & Anderson 2004).

Results

Genetic diversities

After FDR correction four sampling sessions (April 2001, April and June 2005, and June 2007) displayed a significant heterozygote deficiency, always associated with positive F_{IS} values (from 0.039 to 0.09, Table 1). Allelic richness ranged from 7.6 (June 2001) to 8.2 (April 2002, see Fig. 2).

IBD testing

A significant IBD pattern was observed for seven years over eight (Table 3). In year 2003, failed to detect a significant IBD. In other years, slopes ranged from 0.0002 to 0.0067. The mean pairwise genetic distance between individuals ranged from from 0.00037 (year 2006) to 0.00547 (year 2001).

Linear models

For allelic richness (A) as response variable, a model including the yearly population growth rate, the previous vole density and the season, had the lowest AICc. This model was thus considered as the most appropriate model for our data (Table s1, supplementary materials). The April sessions were characterised by a higher allelic richness than the June sessions, except in 1999 and 2005 (Fig. 2). This was most probably related with family effects occurring in the samplings during the reproductive season. Whether the vole population was increasing, decreasing or remaining stable was also important. A was positively related with yearly population growth rates and previous densities.

The slope of the IBD regression substantially varied with time (Fig 3). GLM analyses yielded to the selection of the model including the yearly population growth rate, and

the previous vole density (Table s1, supplementary materials). The slope of the IBD regression was negatively related to these two demographic parameters.

Sex-specific autocorrelation analyses.

The spatial genetic correlation analysis (Fig. 4) displayed a positive and significant relatedness for the first distance classes (i.e. same agricultural plot) for males and females and low and high density. Relatedness coefficient in females decreased rapidly up to 5 km distance class and then flattened out, Patterns in low and high density years were very similar. Conversely, genetic correlation in males showed an area of significant positive genetic similarity extended up to 5km and a low relatedness value (i.e. 0.023) for individuals trapped in the same field (distance class = 0) in the high density years, while these values were roughly similar to that of females (i.e. 0.04) in the low density years. We thus verified higher variations of correlation parameters from the high to the low densities, for males than for females. The relatedness value for the first distance class was nearly two times lower in high in respect to low density years for males. This pattern indicates that males appear to move longer distances in high density years. As usually reported for populations under IBD (Aars et al. 2006; Berthier et al. 2005 are two examples in rodents), the genetic similarity decreased with increasing distance classes, mostly within the null hypothesis confidence interval, with no further trends Vekemans & Hardy (2004). This pattern appeared to be more marked for males than for females.

Discussion

We document for the first time, substantial changes in the genetic patterns along several complete demographic cycles in a vole population. This study provides a quasi-experimental situation with a huge gradient of population density, allowing a thorough exploration of both direct and time-lagged effects of density on population genetic diversity and differentiation. Our analyses strongly support the DTLM hypothesis to the detriment of ND and DM hypotheses. First, we had confident evidences of gene flow variation related with density in our vole population, with higher gene flow in high densities and lower gene flow in low densities. Second, the statistical link between population genetics parameters and population growth rates (positive correlation) is another argument in favour to the DTLM hypothesis. Our results are thereafter discussed in relation with temporal change in the spatial pattern of vole distribution

along the demographic cycle, from isolated demes in low densities to continuous population under IBD in high densities. We tentatively conclude that gene flow would be temporarily slowed during low densities, both as a result of the predominant effect of local drift, and of the decrease of local immigration in remnant (and isolated) demes due to extensive vole extinction in most agricultural plots. Thereafter, gene flow would be enhanced during demographic increase, both as a result of low or no local drift in remnant demes (increasing in density), and of the reestablishment of immigration between those previously isolated demes through intense colonization. We thus suggest that the predominant microevolutionary processes leading to the temporal variation in gene flow are both the temporal variation in the strength of the local genetic drift, high in low densities and low in high densities, and the temporal variation in the local extinction/recolonization of agricultural plots.

Limitations and further steps in gene flow analyses of cyclic vole populations

It is important to underline that gene flow analyses do not allow separate estimations for genetic drift and migration in populations departing from the migration-drift equilibrium. This is because gene flow measures the result of both processes altogether. The inability of separating genetic drift and migration is a common limitation in population genetics modelling, and is even more pregnant in highly demographically instable populations. Simulation studies using, for instance the recently delivered software programs IBDSim (Leblois et al. 2008) would probably be a useful approach to explore our ability to separate the effects of both microevolutionary processes (drift and migration) using gene flow parameters (diversities and differentiation) within an IBD framework. Analytical approach being probably out of reach given the complexity of mathematical developments required. Moreover simulation studies could allow finer predictions to be formulated and tested using empirical data such as ours.

Moreover, because of the regular change in vole distribution in the landscape during demographic cycles, from small isolated demes at low densities, to a continuous one under isolation-by-distance at high densities, a multi-scale approach would probably greatly enhance our understanding. Under such a conceptual framework, we could expect that variation in population genetics parameters should vary depending on the spatial scale of observation (see Leblois et al. 2006 for such an approach in the simplest situation of one habitat contraction). For instance, local variation in genetic diversities should be more important at the local scale than at the large scale (see

Berthier et al. 2006, for a support with empirical data in a cyclic vole). We thus need to contrast local and large spatial scales in further analyses. Likewise, the microevolutionary effects of mutation was voluntarily discarded in our present work although this would need to be thoroughly evaluated because, mutation events is likely to increase with population size, and could be a nonnegligeable source of allelic richness increase in our cyclic populations given the huge population sizes displayed during high densities (up to more than 1,000 voles per ha).

Actual knowledge gained from the present study

Despite the above limitations, our analysis gave stimulating indications that gene flow actually varies along the demographic cycle in vole populations. The GLM approach pointed out several demographic factors which confidently explain the multiannual variation of the genetic diversities and differentiation. These are the time-lagged density, the yearly population growth rate and the seasonal effect. The latter one is probably due to the seasonal timing of dispersal in this species. Dispersal in common vole is known to occur more intensively late in the season whereas reproduction is intense soon in spring (Aars & Ims 2000). Thus we argue that the seasonal decrease in genetic variation would result from an increasing sampling of related individuals during the breeding season.

Furthermore, we predicted, and verified from the genetic data, a variation regarding the slope in the IBD pattern. This variation can be interpreted as the result of an unstable balance between migration and genetic drift in population in migration-drift disequilibrium (Hutchison & Templeton 1999). When the vole population experiences low densities, genetic drift appears to be more influencing than migration, thus increasing genetic differentiation among individuals as well as the slope of the regression. Symmetrically, when density increases, genetic drift would be strongly weakened and/or counterbalanced by the homogenising effect of migration. Why migration become more intense during population increase requires further research. We can either propose that migration parameters (either rate or distance or both) actually increase during population growth. However we suspect that our observations need not obligatory increase in migration rates and/or distances. Variation in vole distribution within the landscape could alternatively play a prominent role.

At the metapopulation level, experiments have demonstrated higher colonization success for *Microtus* species in empty patches compared with patches already occupied by conspecifics. Immigrants are also less successful at settling in a patch with high densities than in those with low densities. Landscape dynamics also greatly influences the dynamics of metapopulations, particularly in agricultural areas (Gauffre et al. 2008). They are naturally highly fragmented shaping a patchwork of habitats of unequal attractiveness as agricultural practices lead to temporal alterations in habitat quality and suitability. Regarding common vole dynamics low disturbances caused by mowing could artificially enhance emigration (but also mortality risks) while ploughing of annuals crops (that covers more than 80% of our studied area) eradicates common voles from agricultural plots by direct killing or destruction of colonies. We suggest that vole populations in this particular landscape dynamics are mainly influenced by the migration and colonization processes. Considering a metapopulation dynamics both, migration and colonisation processes can be inversely influenced by the local density. We previously suggested that females are the main actors in the colonization process in the common vole (Gauffre et al submitted). The males are more involved in the spread of the genes among the colonies through repeated and quasi-compulsory migration events. Hence, at the light of the autocorrelation analyses, we can postulate that male migration in common vole vary in distance along the demographic cycle. It appears to be mainly local during low densities because of the patchiness distribution of common vole in the landscape. But when density increases, males appear to disperse longer distance (up to 5km males are significantly and positively related to each others). We argue that when local density increase females are constraint to colonize more intensively (due to the increase of the local competition) the plots surrounding their natal patch. As a result, almost all the agricultural matrix is occupied (as evidenced in Fig. 1 c) and male, even if they disperse less frequently or less efficiently (because of an increased competition) can then move over longer distances.

When dealing with density dependent dispersal, it is therefore important to distinguish migration of males between occupied patches from colonization performed by females to (re)colonize empty patches. If negative density-dependent immigration should be the rule in voles (Andreassen & Ims 2001) local density may also enhance emigration of females toward empty areas (Aars & Ims 2000). Thus, as a consequence of density increase, we expect not only local increase of density in occupied patches but also an increasing colonization of new patches which would have for consequence a

modification of the population spatial structure (from isolated demes to continuous populations). Since migration and colonization are sex specific in the common vole we expected, and verified, that the demographic fluctuations actually have different consequences on males and females dispersal patterns and translates in different genetic patterns.

References

- Aars, J., Dallas, J. F., Piertney, S. B., Marshall, F., Gow, J. L., Telfer, S. & Lambin, X. 2006 Widespread gene flow and high genetic variability in populations of water voles *Arvicola terrestris* in patchy habitats. *Molecular Ecology* **15**, 1455-1466.
- Aars, J. & Ims, R. A. 2000 Population dynamic and genetic consequences of spatial density-dependent dispersal in patchy populations. *American Naturalist* **155**, 252-265.
- Andreassen, H. P. & Ims, R. A. 2001 Dispersal in patchy vole populations: Role of patch configuration, density dependence, and demography. *Ecology* **82**, 2911-2926.
- Belkhir, k. 2004 GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Montpellier (France): Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. 1995 Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **57**, 289-300.
- Berthier, K., Charbonnel, N., Galan, M., Chaval, Y. & Cosson, J. F. 2006 Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations. *Molecular Ecology* **15**, 2665-2676.
- Berthier, K., Galan, M., Foltete, J. C., Charbonnel, N. & Cosson, J. F. 2005 Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Molecular Ecology* **14**, 2861-2871.
- Burnham, K. P. & Anderson, D. R. 2004 Multimodel inference - understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods & Research* **33**, 261-304.
- Ehrich, D. & Jorde, P. E. 2005 High genetic variability despite high-amplitude population cycles in lemmings. *Journal of Mammalogy* **86**, 380-385.
- Ehrich, D., Jorde, P. E., Krebs, C. J., Kenney, A. J., Stacy, J. E. & Stenseth, N. C. 2001 Spatial structure of lemming populations (*Dicrostonyx groenlandicus*) fluctuating in density. *Molecular Ecology* **10**, 481-495.
- Gauffre, B., Estoup, A., Bretagnolle, V. & Cosson, J. F. 2008 Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. *Molecular Ecology* **17**, 4619-4629.
- Gauffre, B., Galan, M., Bretagnolle, V. & Cosson, J. F. 2007 Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 830-832.

- Gileva, E. A. & Rakitin, S. B. 2006 Factors of maintaining chromosome polymorphism in common vole *Microtus arvalis* Pallas, 1779: Reduced fertility and meiotic drive. *Russian Journal of Genetics* **42**, 498-504.
- Goudet, J. 2001 FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3): Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hamilton, G., Currat, M., Ray, N., Heckel, G., Beaumont, M. & Excoffier, L. 2005 Bayesian estimation of recent migration rates after a spatial expansion. *Genetics* **170**, 409-417.
- Hardy, O. J. & Vekemans, X. 2002 Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997 *Principles of Population Genetics*. 3. Sunderland, Massachusetts.: Sinauer Associates.
- Hutchison, D. W. & Templeton, A. R. 1999 Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.
- Ims, R. A. & Andreassen, H. P. 2005 Density-dependent dispersal and spatial population dynamics. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 913-918.
- Lambin, X., Bretagnolle, V. & Yoccoz, N. G. 2006 Vole population cycles in northern and southern Europe: Is there a need for different explanations for single pattern? *Journal of Animal Ecology* **75**, 340-349.
- Le Louarn, H. & Quéré, J.-P. 2003 *Les Rongeurs de France: Faunistique et biologie*. Paris: INRA.
- Leblois, R., Estoup, A. & Rousset, F. 2008 IBDSim: a computer program to simulate genotypic data under isolation by distance. *Molecular Ecology Resources* **9999**.
- Leblois, R., Estoup, A. & Streiff, R. 2006 Genetics of recent habitat contraction and reduction in population size: does isolation by distance matter? *Molecular Ecology* **15**, 3601-3615.
- Leblois, R., Rousset, F. & Estoup, A. 2004 Influence of spatial and temporal heterogeneities on the estimation of demographic parameters in a continuous population using individual microsatellite data. *Genetics* **166**, 1081-1092.
- Li, C. C., Weeks, D. E. & Chakravarti, A. 1993 Similarity of DNA Fingerprints Due to Chance and Relatedness. *Human Heredity* **43**, 45-52.
- Nei, N. 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.

- Plante, Y., Boag, P. T. & Bradley, N. W. 1989 Microgeographic variation in mitochondrial DNA of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) in relation to population density. *Evolution* **43**, 1522-1537.
- R Development Core Team. 2008 R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rousset, F. 1997 Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset, F. 2000 Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 58-62.
- Rousset, F. 2008 GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Slatkin, M. 1993 Isolation by Distance in Equilibrium and Nonequilibrium Populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Stenseth, N. C. 1999 Population cycles in voles and lemmings: density dependence and phase dependence in a stochastic world. *Oikos* **87**, 427-461.
- Vekemans, X. & Hardy, O. J. 2004 New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* **13**, 921-935.
- Watts, P. C., Rousset, F., Saccheri, I. J., Leblois, R., Kemp, S. J. & Thompson, D. J. 2007 Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale* : Odonata : Zygoptera) populations: analysis of 'neighbourhood size' using a more precise estimator. *Molecular Ecology* **16**, 737-751.
- Whitlock, M. C. & McCauley, D. E. 1999 Indirect measures of gene flow and migration $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$. *Heredity* **52**, 117-125.
- Wright, S. 1931 Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright, S. 1942 Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.

Legends of figures

Figure 1. Time series of some of the common vole population demographic characteristics. a) density cycle (log sale), b) proportion of agricultural plots in which common vole presence was detected and c) population growth rate ($\log(N_t/N_{t-1})$).

Figure 2. Time series of the allelic richness corrected for a minimal sample size of 7 individuals corresponding to the sampling of June 2001.

Figure 3. Time series of the slope of the regression of genetic distance (computed with the $\hat{\theta}$ -based estimator) against $\log(\text{geographical distance})$.

Figure 4. Correlograms showing the L_i relatedness coefficient as a function of distance for all 4 combinations of adults males and females in low and high density years. The first distance class (0 km) represents pairwise comparisons between individuals from the same trap line (i.e. agricultural plot). Black dots indicate departure from the 95% CI built for the null hypothesis of a random distribution of genotypes determined by 1000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations.

Table 1 Characteristics of the sampling sessions including sample size (N), allelic richness corrected for sample size of 7 individuals (A), observed (H_o) and unbiased estimates of expected (H_E) heterozygosities, intrapopulation fixation indices (F_{IS}), probability associated with the rejection of the Hardy-Weinberg Equilibrium; significant probabilities after FDR corrections are indicated in italics (HWE (P)).

Sampling session	N ind (Mfield)	Ind per field	P study site	A	H_o	H_E	F_{IS}	HWE (P)
April 1999	24 (7)	3.43	2/8	7.871	0.820	0.876	0.066	0.5691
June 1999	65 (17)	3.82	2/8	8.0053	0.865	0.877	0.013	0.4634
April 2001	29 (17)	1.71	6/8	7.9613	0.798	0.875	0.09	<i>0.0014</i>
June 2001	7 (6)	1.17	5/8	7.6	0.871	0.875	0.004	0.9291
April 2002	58 (25)	2.32	8/8	8.2147	0.852	0.879	0.032	0.0814
June 2002	85 (42)	2.02	8/8	8.0005	0.849	0.875	0.029	0.035
April 2003	46 (30)	1.53	8/8	8.0439	0.838	0.875	0.042	0.278
June 2003	19 (16)	1.19	6/8	7.9758	0.852	0.881	0.029	0.173
April 2004	29 (17)	1.71	6/8	7.8913	0.826	0.873	0.055	0.263
June 2004	30 (14)	2.14	5/8	7.6824	0.823	0.859	0.041	0.245
April 2005	71 (30)	2.37	8/8	7.8476	0.832	0.866	0.039	<i><0.001</i>
June 2005	58 (26)	2.23	6/8	7.9343	0.809	0.870	0.071	<i><0.001</i>
April 2006	49 (25)	1.96	8/8	8.077	0.866	0.876	0.011	0.215
June 2006	53 (31)	1.71	7/8	7.9293	0.843	0.875	0.037	0.023
April 2007	52 (25)	2.08	8/8	7.9538	0.872	0.864	-0.01	0.487
June 2007	154 (60)	2.56	8/8	7.873	0.829	0.868	0.045	<i><0.001</i>

Table 2 Parameter estimates from the most adequate linear model (chosen on the basis of AICc) for the effect of density, growth rate and month of sampling on allelic richness corrected for a minimal sample size of 7 individuals.

Response variable	Effect	Estimate	Std. error	t-value	P-value
Allelic Richness	intercept	7.94443	0.15131		
	Increase June	0.03638	0.01063	3.424	0.00505**
	Density June Year-1	0.06505	0.02206	2.949	0.01217*
	Month	-0.05375	0.02603	-2.065	0.06127-

Table 3 Isolation-by-distance (IBD) characteristics for adult data: summary statistics for regression analyses of estimates of genetic distance (\hat{e} -based estimator) against geographic distance for pairs of individuals, probability (IBD P), intercept, slope and mean inter-individual distance (for pairs separated by distance over 250m) calculated for each year.

Sampling year	N	Estimator	IBD P	Intercept	Slope (95 % IC)	Mean <i>dist</i>
1999	89	\hat{e}	0.002	-0.0294	0.0036 [0.0011 - 0.0059]	0.00197
2001	39	\hat{e}	0.014	-0.0427	0.0053 [-0.0031 - 0.0143]	0.00547
2002	163	\hat{e}	< 0.001	-0.0307	0.0035 [0.002 - 0.0059]	0.00062
2003	64	\hat{e}	0.538	-0.0003	0.0002 [-0.0048 - 0.0061]	0.00176
2004	58	\hat{e}	0.003	-0.0588	0.0067 [0.0019 - 0.02]	0.00185
2005	129	\hat{e}	< 0.001	-0.0366	0.0042 [0.0027 - 0.0064]	0.00153
2006	112	\hat{e}	0.044	-0.0105	0.0012 [0.0004 - 0.0023]	0.00037
2007	225	\hat{e}	< 0.001	-0.0286	0.0032 [0.0019 - 0.0043]	0.0004

Table 4 Parameter estimates from the most adequate linear model (chosen on the basis of AICc) for the effect of density and growth rate on the slope of the regression of genetic distance ($\hat{\epsilon}$ -based estimate) against the logarithm of geographic distance.

Response variable	Effect	Estimate	Std. error	t-value	P-value
$\hat{\epsilon}$ -slope	intercept	0.0080	0.001		
	Increase June	-0.0004	0.0001	-2.989	0.03 *
	Density June Year-1	-0.0015	0.0003	-5.305	0.003 **

Figure 1

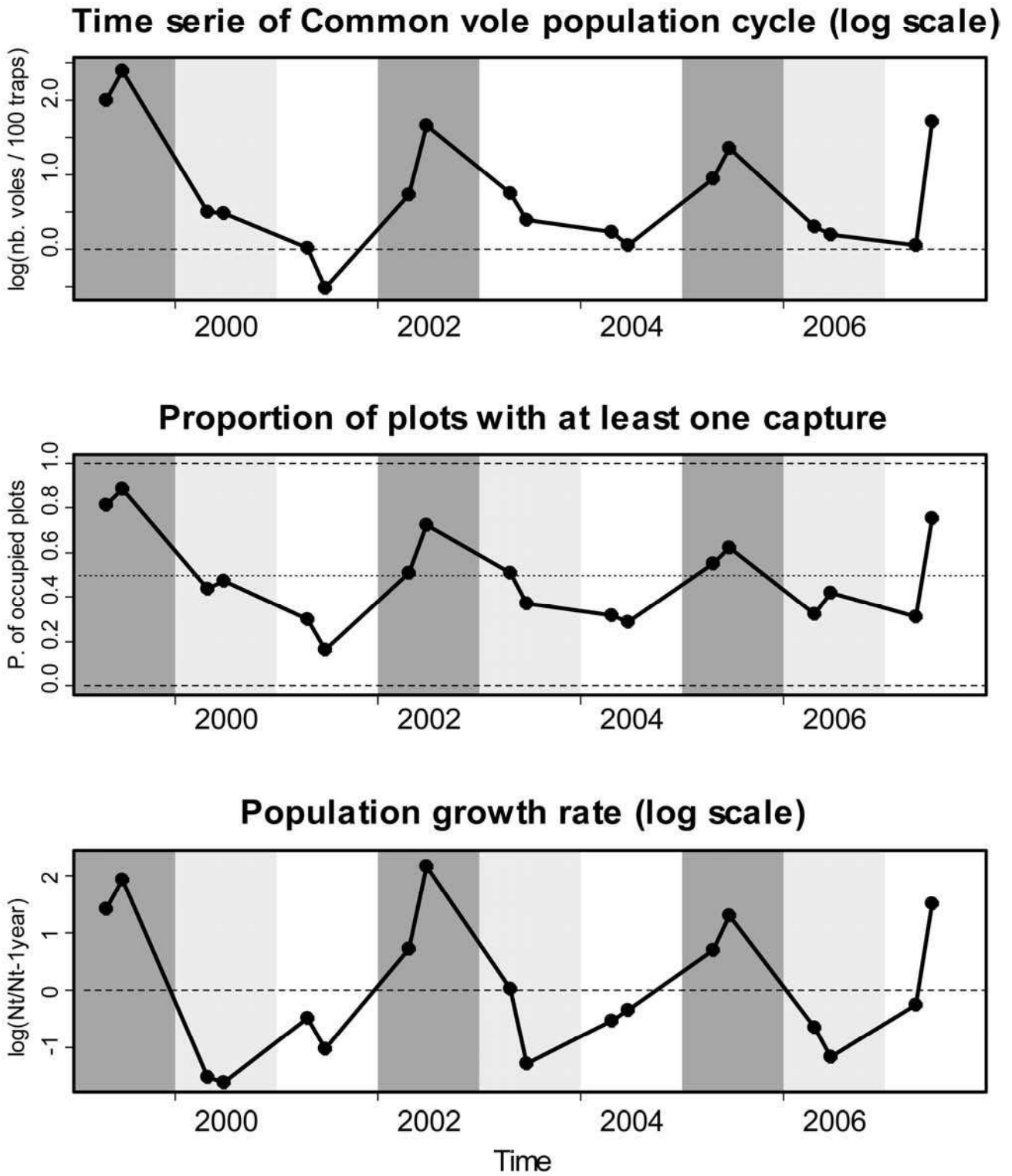


Figure 2

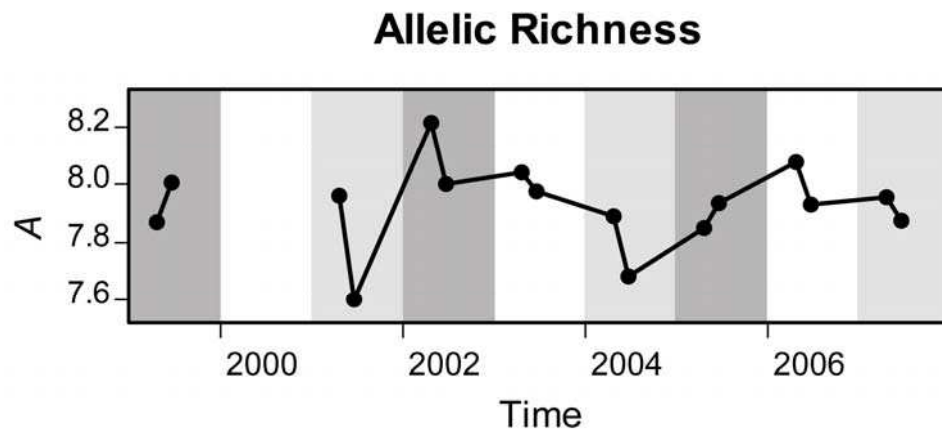


Figure 3

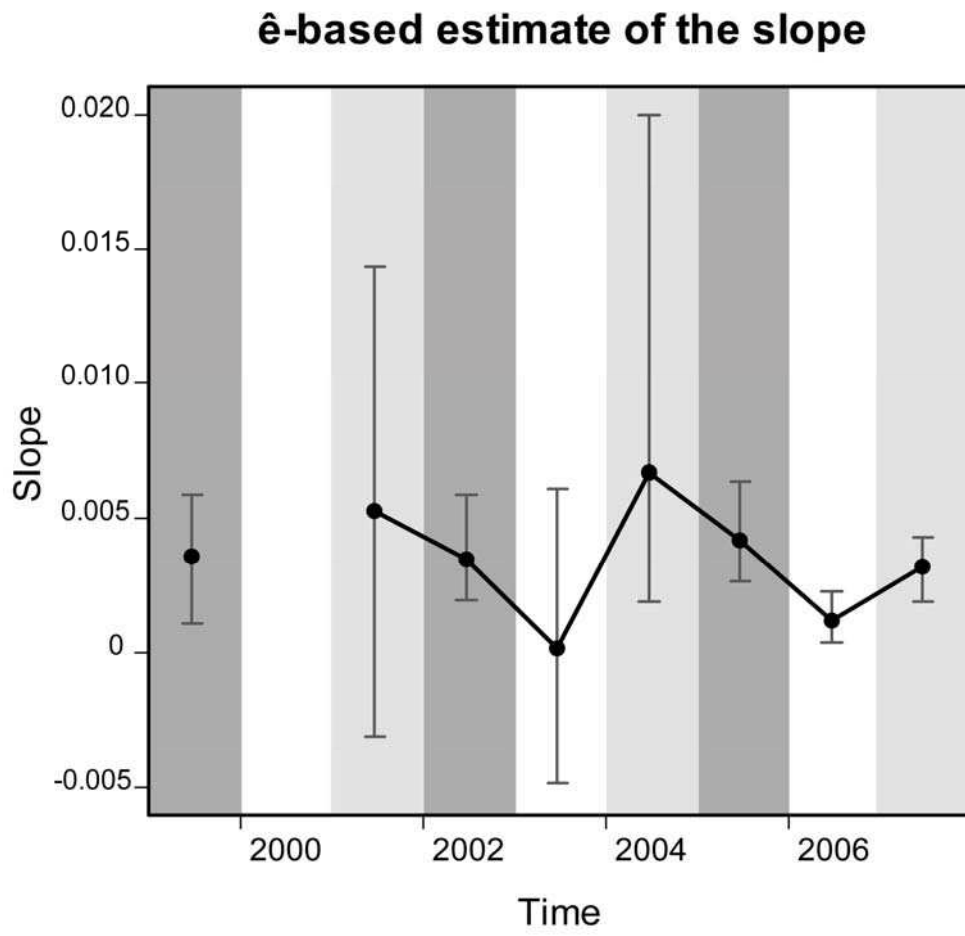
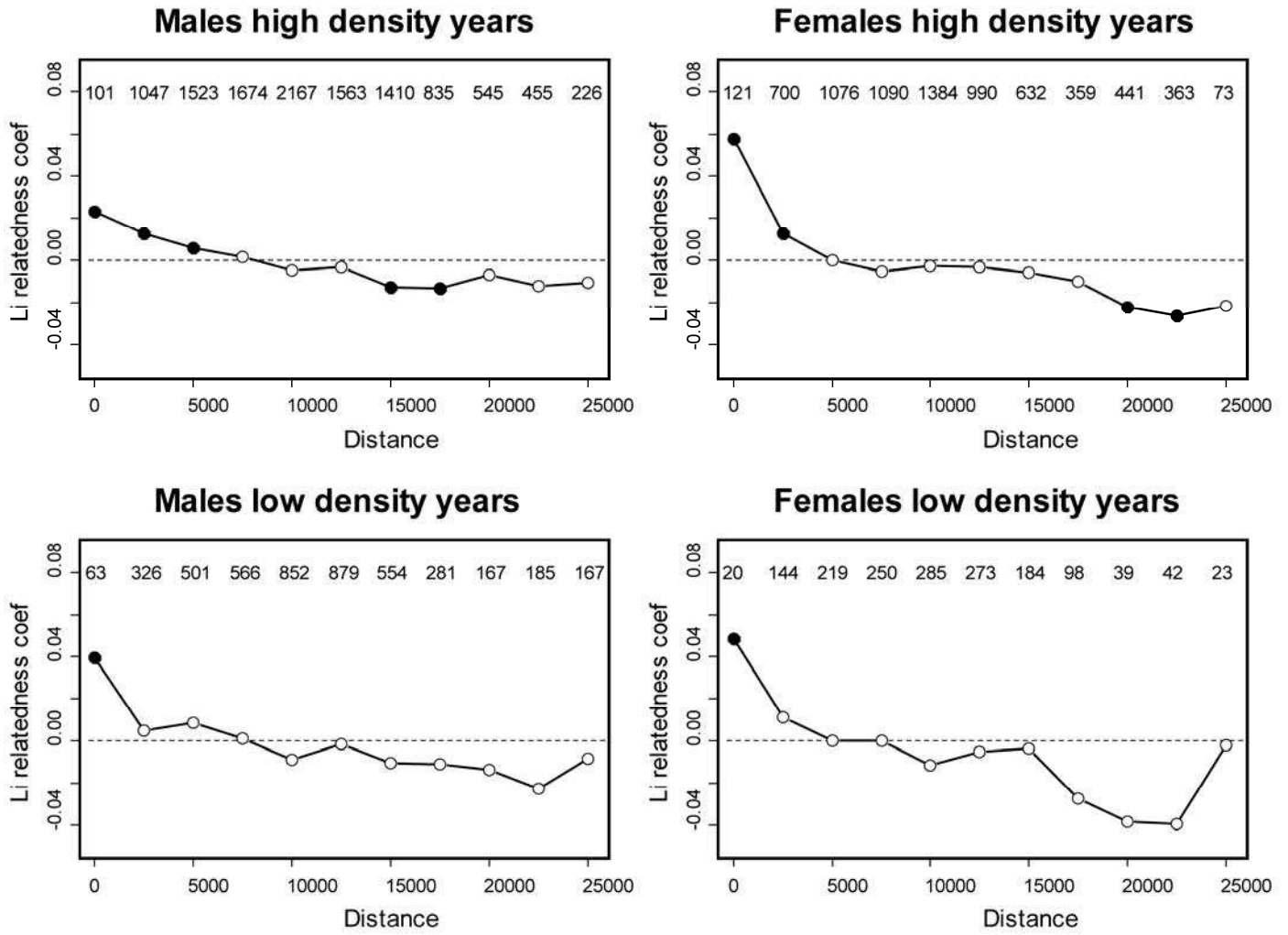
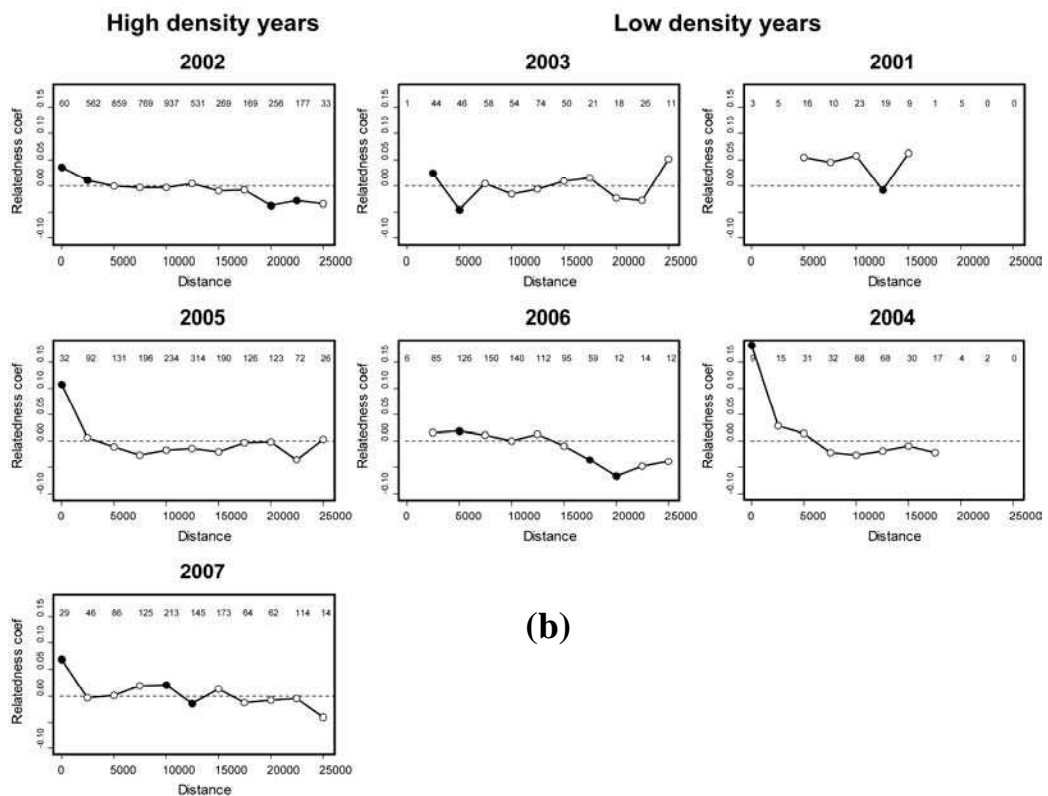
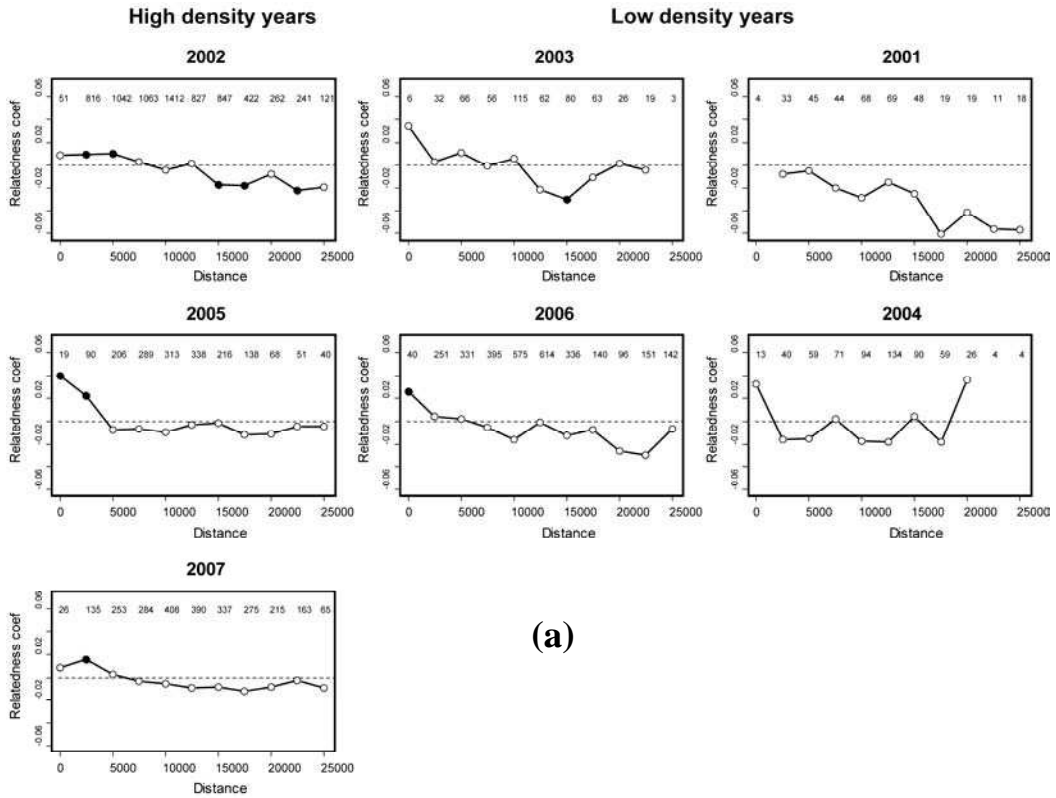


Figure 4



SUPPLEMENTARY MATERIALS

Annexe 1. Correlograms showing the Li relatedness coefficient as a function of distance for adults males **(a)** and adult females **(b)** each year of sampling. The first distance class (0 km) represents pairwise comparisons between individuals from the same trap line (i.e. agricultural plot). Black dots indicate departure from the 95% CI built for the null hypothesis of a random distribution of genotypes determined by 1000 random permutations of individual genotypes among the geographical locations.



ARTICLE 5 :

Kinship, dispersal and hantavirus transmission in bank and common voles

Kinship, dispersal and hantavirus transmission in bank and common voles

J. Deter · Y. Chaval · M. Galan · B. Gauffre ·
S. Morand · H. Henttonen · J. Laakkonen ·
L. Voutilainen · N. Charbonnel · J.-F. Cosson

Received: 27 August 2007 / Accepted: 26 November 2007 / Published online: 11 December 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Hantaviruses are among the main emerging infectious agents in Europe. Their mode of transmission *in natura* is still not well known. In particular, social features and behaviours could be crucial for understanding the persistence and the spread of hantaviruses in rodent populations. Here, we investigated the importance of kin-clustering and dispersal in hantavirus transmission by combining a fine-scale spatiotemporal survey (4 km²) and a population genetics approach. Two specific host-hantavirus systems were identified and monitored: the bank vole *Myodes*, earlier *Clethrionomys glareolus*—Puumala virus and the common vole *Microtus arvalis*—Tula virus. Sex, age and landscape characteristics significantly influenced the spatial distribution of infections in voles. The absence of temporal stability in the spatial distributions of viruses suggested that dispersal is likely to play a role in virus propagation. Analysing vole kinship from microsatellite

markers, we found that infected voles were more closely related to each other than non-infected ones. Winter kin-clustering, shared colonies within matrilineages or delayed dispersal could explain this pattern. These two last results hold, whatever the host-hantavirus system considered. This supports the roles of relatedness and dispersal as general features for hantavirus transmission.

Introduction

Hantaviruses (genus *Hantavirus*) are specific rodent-borne viruses belonging to the family *Bunyaviridae*, many of which cause more or less severe illness in humans [64]. Each hantavirus is carried by a specific rodent species, and transmission to other species (including humans) is a dead end for the virus [37, 52]. Among members of the genus *Hantavirus* present in Europe, Puumala virus (PUUV) is associated to the bank vole *Myodes glareolus*, and Tula virus (TULV) is carried by the common vole *Microtus arvalis*. Dobrava virus (DOBV) is found in the yellow-necked mouse in southeastern Europe up to the German–Czech border, and Saaremaa virus in the striped field mouse *A. agrarius* in Eastern Europe [64]. The Seoul virus has recently been detected in brown rats, *Rattus norvegicus*, in urban areas [21]. PUUV is the causative agent of Nephropathia epidemica, a mild form of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), and DOBV causes a severe form of HFRS. Thousands of human cases are diagnosed in Europe annually. By contrast, TULV is believed to be non-pathogenic for humans [64], although a suspected human case has been reported [59]. Despite the diagnosis of several hundreds of cases of HFRS in humans and seropositive rodents [50, 64], hantaviruses have only recently

N. Charbonnel and J.-F. Cosson have contributed equally.

J. Deter (✉) · Y. Chaval · M. Galan · B. Gauffre ·
N. Charbonnel · J.-F. Cosson
Centre de Biologie et de Gestion et des Populations (CBGP),
INRA EFPA, Campus International de Baillarguet, CS 30016,
34988 Montferrier sur lez, France
e-mail: deter@supagro.inra.fr

S. Morand
Institut des Sciences de l'Evolution, CNRS, CC064,
Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 05, France

H. Henttonen · J. Laakkonen · L. Voutilainen
Vantaa Research Unit, Finnish Forest Research Institute,
PO Box 18, 01301 Vantaa, Finland

J. Laakkonen
Department of Virology, Haartman Institute,
University of Helsinki, PO Box 21, 00014 Helsinki, Finland

been isolated and characterized in bank and common voles in France [53].

Several studies have been conducted on hantavirus dynamics in rodent populations in Europe in the past few years [2, 15, 16, 47, 71]. Most of these studies have focused on the examination of risk factors associated with individual (sex, age and sexual activity), population (density) or environmental (habitat) characteristics. Adult males are generally more commonly infected than females and juveniles or subadults for behavioural and/or physiological reasons [2, 33, 45]. Seroprevalence in rodents seems to be either density- (with a delay, see [11]) or habitat-dependant [16, 47, 48, 71].

The understanding of hantavirus transmission in rodents has improved, although important unknowns remain [40]. Hantavirus transmission is believed to be horizontal only [5, 14, 64]. Juveniles born to an infected female are protected against hantavirus infection for 2–3 months because of the transfer of maternal antibodies [2, 32, 44]. Moreover, voles and mice generally start to disperse away from their natal site before that limit [22]. Hantavirus transmission from mother to progeny in the pre-dispersal period is thus unlikely. However, high densities may lead to a delay of sexual maturation and consequently of bank vole dispersal [8, 54, 66]. In this particular case, voles may remain in their natal site until the next spring and get infected from their mother after the disappearance of maternal antibodies.

Horizontal transmission can be both direct and indirect. PUUV is secreted in urine, faeces and saliva, and animals probably get infected through aerosols in the environment and/or from antagonistic interactions [16]. Another possible mode of direct transmission is rarely discussed and might be associated with the social behaviours of rodents. Complex social systems are observed in burrows and colonies (see a review for voles in [4] and [69]). In temperate climates, bank voles tend to cluster during winter for thermodynamic reasons [9]. Female common voles establish in matrilineal colonies, especially at high densities [6, 7]. These features, as well as the delayed settlement associated with high densities and social constraints, may increase contacts in shared burrows and favour virus transmission between relatives.

The possibility of indirect transmission through contaminated environment, burrows or runways was recently suggested [57], then experimentally confirmed [31]. In this case dispersers could face a greater risk of being infected because they cross several adult vole territories and explore a greater area than at any other stage of their life. The particular attention they pay to urine-mediated scent mark deposits when looking for a territory probably enhances their risk of becoming infected [13]. Modelling has suggested that dispersal is an essential feature for understanding the persistence and dynamics of

hantaviruses in rodent populations. Hantaviruses do not persist in a metapopulation if rodent dispersal is set to zero [57], but there is a lack of field data relating dispersal and transmission in wild rodents.

Despite the development of powerful genetic tools to document relatedness and dispersal in wild rodent populations (e.g. [3, 24, 27]), little consideration has been given to the analysis of their respective impact in virus propagation and persistence. In this paper, we report a short-term survey of the dynamics of hantaviruses in a rodent community in the East of France. Using a combination of spatial and genetic analyses, we searched for patterns relating hantavirus transmission and rodent behaviours. We tested the two non-exclusive hypotheses of a higher transmission rate during dispersal and/or between relatives due to specific social structures involving kin-clustering and delayed settlement.

Materials and methods

Rodent sampling and specific abundance

The rodent community was surveyed in a four-km² area equally covered with wooded meadows and forests (man-made spruce or semi-natural forests) near Mignovillard (6°13'N, 46°8'E; Jura, France). Five species were monitored. The fossorial water vole *Arvicola scherman* (earlier *terrestris*) and the common vole *Microtus arvalis* prevail in grassy lands, whereas the bank vole *Myodes glareolus*, the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* and the wood mouse *Apodemus sylvaticus* inhabit wooded areas. *Apodemus* individuals were identified to species following the molecular test developed by Michaux et al. [42].

Rodents were surveyed between September 2004 and April 2006 in spring, summer and autumn. Trap-lines were used for the sampling of all species except *A. scherman*, which is mostly subterranean [61, 62]. For each session, twenty 100 m-lines of 34 INRA live-traps separated by 3-m intervals, were equally set between open (nine lines in meadows and hedges) and wooded (five lines in forests and six lines in meadows bordering forests) areas for three consecutive nights. Traps were checked twice a day. Traps were fitted out with dormitory boxes and baited with hay and a piece of apple. The relative abundance of these four rodent species was determined using the trapping success, i.e. the number of animals trapped per trap-night [62]. Note that common voles were also trapped directly in colonies located near the trap-lines when the number captured was fewer than 30. These animals were not considered in abundance estimations. The fossorial water vole was sampled directly in colonies found in the meadows surrounding trap-lines using modified BTS live-traps. No

more than two animals per colony were kept. Traps were checked every two hours until the sampling of approximately 35 animals per session. The abundance of the fossorial water vole was estimated following the index surface method described by Giraudoux et al. [18]. This estimate is highly correlated to abundance calculated using capture-recapture studies [18].

Hantavirus detection

Rodents were sacrificed by cervical dislocation as recommended by Mills et al. [43]. Animals were sexed and weighted, and their age was estimated using eye lens mass [28, 39]. Pregnant females were too few to be considered. Animals were dissected: lungs and hearts were removed and conserved in RNA later at -20°C . Before conserving, blood samples were taken from the heart or the thoracic cavity on a 1-cm² Whatman[®] blotting paper. Blood samples were screened for IgG anti-hantavirus antibodies using an IgG immunofluorescence assay (IFA) as described earlier by Kallio-Kokko et al. [30]. The molecular identification of hantavirus responsible for these infections has been published elsewhere [53].

Testing the influence of spatial, environmental and individual factors

For each species and trapping session, seroprevalence was calculated, and 95% confidence intervals were estimated using the bootstrap procedure in Quantitative Parasitology v3.0 [56]. Specific seroprevalence levels were compared between trapping sessions using contingency tables [70].

We performed logistic regressions to determine the factors that best explained the hantavirus infection status for each rodent species. The dependent variable was the presence or absence of antibodies in a vole. We included environmental (landscape surrounding the line: open vs. wooded areas) and individual (age, sex) factors as explanatory variables. Combining sexual maturity and eye lens mass allows for the classification of individuals as juveniles, subadults and adults. However we had too few juveniles or subadults to include such a distinction. We used the Akaike's Information Criterion (AIC) for model selection [10, 29]. Models with a difference of AIC < 2 compared to the model with the lowest AIC were selected. Significance of explanatory factors was determined using deletion testing, with the significance of a term determined by the log-likelihood ratio test [41]. Finally, we used the sum of squares to test model fit (F -statistic).

We investigated the variation in spatial distribution of seropositive rodents through time. Assuming an important

role of rodent dispersal in hantavirus transmission, we expected the distribution (trap line) of positive cases at session t to be independent of the distribution of positive cases at session $t-1$. This null hypothesis was tested using Chi-square tests for each species and each pair of trapping sessions. Statistical analyses were all performed using GENSTAT (v7.0, VSN International Ltd).

Testing the influence of kinship and dispersal

Genetic analyses based on microsatellite loci were only conducted on rodent species found to carry a hantavirus, namely *M. arvalis* and *M. glareolus*.

Microsatellite typing

DNA was extracted from tissue samples using a Puregene DNA Purification Kit[®] (Gentra Systems) according to manufacturer's instructions. Genetic variation of common voles was assessed using 13 microsatellite loci. Eleven were developed specifically for the common vole [17], one was adapted from *A. scherman* (AV13 [63]) and another from the field vole (MSMM6 [25]). PCR conditions are detailed by Gauffre et al. [17]. Seven microsatellite loci were analysed for bank voles. MSCg-4, MSCg-9, and MSCg-15 were described by Gockel et al. [19], LIST3-001, LIST3-003 and LIST3-005 (called ₍₂₎) by Barker et al. [1] and MSCRB5 by Ishibashi et al. [23]. Amplifications were performed for bank voles in a 25- μl reaction mixture containing 12.5 μl Qiagen multiplex PCR kit[®], 7.5 μl H₂O, 2.5 μl of DNA solution and 2.5 μl of a 100- μl primer mix including 4 μl of List3-001, 2 μl of all the other primers and 82 μl of water. All primers were 100 μM and labelled with fluorescent dyes. After denaturation at 95°C for 15 min, the PCR was carried out for ten cycles under the following conditions: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 64°C for 90 s (minus 1°C per cycle) and extension at 72°C for 1 min, then for 20 cycles using similar conditions except the temperature of annealing, which was fixed at 54°C . A final 10-min extension step was carried out at 72°C . PCR was performed on an Eppgradient[®] thermocycler (Eppendorf). Loci were genotyped using an ABI PRISM[®] 310 automated sequencer (Applied Biosystems). Alleles were scored manually using ABI PRISM[®] Genotyper[®] 2.5 (Applied Biosystems).

Genetic analyses

All genetic analyses were performed independently for *M. arvalis* and *M. glareolus*. We first checked that the

M. arvalis and *M. glareolus* whole samples conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), considering each locus separately and over all loci. This provides information about the reliability of the microsatellite loci used (absence of null alleles) and about the panmictic status of the two populations sampled. We used exact tests and Markov chain methods implemented in GENEPOP v3.3 [55]. Corrections for multiple tests were applied using the sequential Bonferroni approach. We investigated relatedness coefficients for all pairs of individuals within a vole species and the spatial pattern of relatedness using SPAGeDI v1.2 [20]. Relationship coefficients between individuals were estimated over all microsatellite loci as the proportion of genes in one individual with alleles identical to those of a reference individual. We followed Li et al. [38] and applied the sample size correction defined by Wang [67]. This estimator shows a high accuracy (low bias) combined with a high precision (low variance) compared to others [65]. We performed a Jackknife procedure to provide a standard error of the multilocus estimates.

We calculated the mean values of these pairwise coefficients considering two groups per species: hantavirus-seropositive voles and hantavirus-seronegative ones. Permutation of individuals between these groups permitted the null hypothesis of a similar mean relatedness between infected and non-infected voles to be tested. We considered the alternative hypothesis of a higher mean relatedness between infected rodents than between non-infected ones. This will provide information on the influence of vole kinstructuring in hantavirus transmission. Finally, we investigated the spatial pattern of genetic relatedness between individuals, i.e. how kinship between individuals is related to the distance separating them, using spatial autocorrelation analyses. A significant decrease of mean relatedness with geographic distance (isolation by distance pattern) will suggest restricted vole dispersal in space within the studied area.

Finally, the genetic differentiation between successive trapping sessions was analysed to check for temporal population homogeneity. High temporal differentiation would indicate important gene flow from surrounding non-sampled areas. The estimator θ of F_{ST} [68] was calculated over all loci. Tests for genotypic differentiation were performed using exact tests and Markov chain methods in GENEPOP v3.3. We also implemented assignment tests to detect recent immigrants using the frequency method and the statistic L_h in GeneClass v2.0 [51]. This approach is recommended when source populations for immigrants have not been sampled [49]. The probability for an individual to be a resident was assessed using the Monte Carlo resampling procedure. Individuals were considered immigrants when their probability to be resident was less than 0.01.

Results

We captured 546 rodents: 128 bank voles, 158 common voles, 134 fossorial water voles, 82 yellow-necked mice and 43 wood mice. Most of the captures were done in 2005: 96 bank voles, 97 common voles, 104 fossorial water voles, 73 yellow-necked mice and 23 wood mice. The bank vole exhibited high abundance levels in 2005 and then declined in spring 2006. The common vole and the fossorial water vole abruptly decreased in abundance from autumn 2004 to spring 2005 and then remained at very low abundance levels (Fig. 1). *Apodemus* species exhibited more stable abundances with a marked seasonal pattern (Fig. 1). Among the 546 rodents, 11 common voles and 11 bank voles were hantavirus-seropositive. No hantaviral antibodies were detected in any of the three other species. Molecular analyses revealed that hantavirus sequences recovered from the bank vole belonged to Puumala virus (PUUV) while those from the common vole belonged to Tula virus (TULV) [53]. PUUV seroprevalence ranged from 0 to 50% (Table 1). No statistical differences were found between the three sessions in 2005 (contingency table, $\chi^2_{0.05,2} = 2.374$, $P = 0.305$). TULV seroprevalence ranged from 0 to 19.4% (Table 1), with significantly higher levels observed in autumn 2005 (contingency table—comparison with summer, $\chi^2_{0.05,1} = 4.753$, $P = 0.029$).

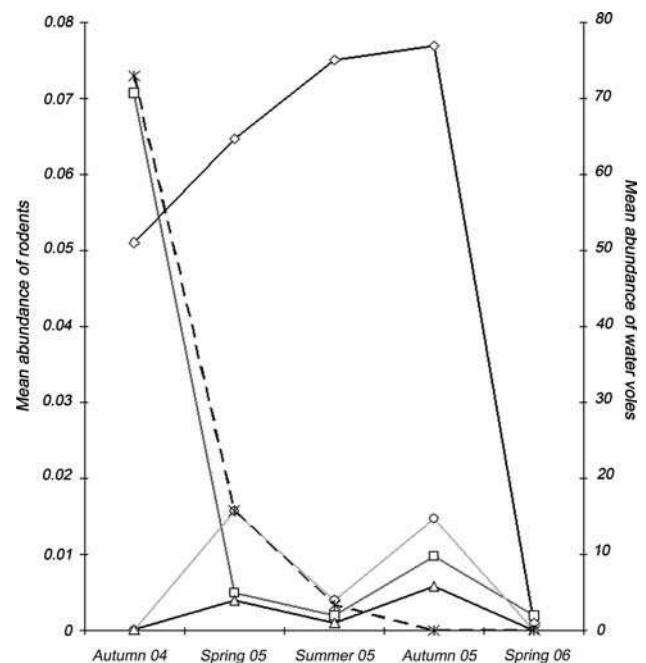


Fig. 1 Mean abundance (number of rodents per trapping effort) of rodents: bank voles (black line, diamond), common voles (grey line, square), yellow-necked mice (grey line, circle) and wood mice (black line, triangle), and mean abundance (in percentage of positive intervals) of water voles (broken black line, cross) in Mignovillard between autumn 2004 and spring 2006

Table 1 Field data per species and trapping session

Species	Trapping session	Number of rodents sampled Male/female	Number of seropositive rodents Male/female	Seroprevalence
Bank vole	Autumn 2004	22/14	0/0	0
	Spring 2005	16/14	2/0	6.70 [0.81–22.08]
	Summer 2005	17/15	1/4	15.60 [6.36–30.09]
	Autumn 2005	17/16	0/4	11.80 [4.11–24.94]
	Spring 2006	1/1	1/0	50.00 [2.53–97.47]
Common vole	Autumn 2004	20/12	0/0	0
	Spring 2005	16/12	2/0	7.28 [0.81–20.83]
	Summer 2005	14/19	1/1	6.08 [0.64–17.88]
	Autumn 2005	23/13	4/3	19.49 [4.11–33.34]
	Spring 2006	21/20	0/0	0
Fossorial water vole	Autumn 2004	18/12	0/0	0
	Spring 2005	23/13	0/0	0
	Summer 2005	18/17	0/0	0
	Autumn 2005	21/15	0/0	0
	Spring 2006	0/0	0/0	0
Yellow-necked mouse	Autumn 2004	8/3	0/0	0
	Spring 2005	16/20	0/0	0
	Summer 2005	8/7	0/0	0
	Autumn 2005	12/18	0/0	0
	Spring 2006	0/2	0/0	0
Wood mouse	Autumn 2004	7/9	0/0	0
	Spring 2005	6/5	0/0	0
	Summer 2005	2/2	0/0	0
	Autumn 2005	6/6	0/0	0
	Spring 2006	0/0	0/0	0

The numbers of rodents sampled and of hantavirus-seropositive animals are shown for both sexes. Seroprevalence is given in percentage with the 95% confidence interval in brackets

Influence of environmental, individual and spatial factors

The spatial location of seropositive voles is displayed per sampling session and species in Figs. 2 and 3. Note that seropositive voles have been observed near the village. The analysis of factors that might affect the hantavirus-seroprevalence revealed that the sex strongly influenced PUUV-seroprevalence in bank voles ($t = 2.62$, $P = 0.006$, total model: deviance $_{0.05, 1} = 3.15$, $P = 0.006$), whereas both age ($t = -2.64$, $P = 0.008$) and landscape ($t = -2.19$, $P = 0.028$) significantly explained TULV-seroprevalence in common voles (Total model: deviance $_{0.05, 2} = 5.44$, $P = 0.001$). Seroprevalence levels were higher in male (mean seroprevalence = 17.39%) than in female bank voles (mean seroprevalence = 6%). TULV-seropositive common voles were mainly older voles (mean seroprevalence = 15% for voles older than 20 days compared to 3% for younger ones), and in forested areas (mean seroprevalence = 19.05%) than in open areas (mean seroprevalence = 69.21%).

In both host-virus systems, statistical analyses revealed strong variations in the spatial distribution of infected voles

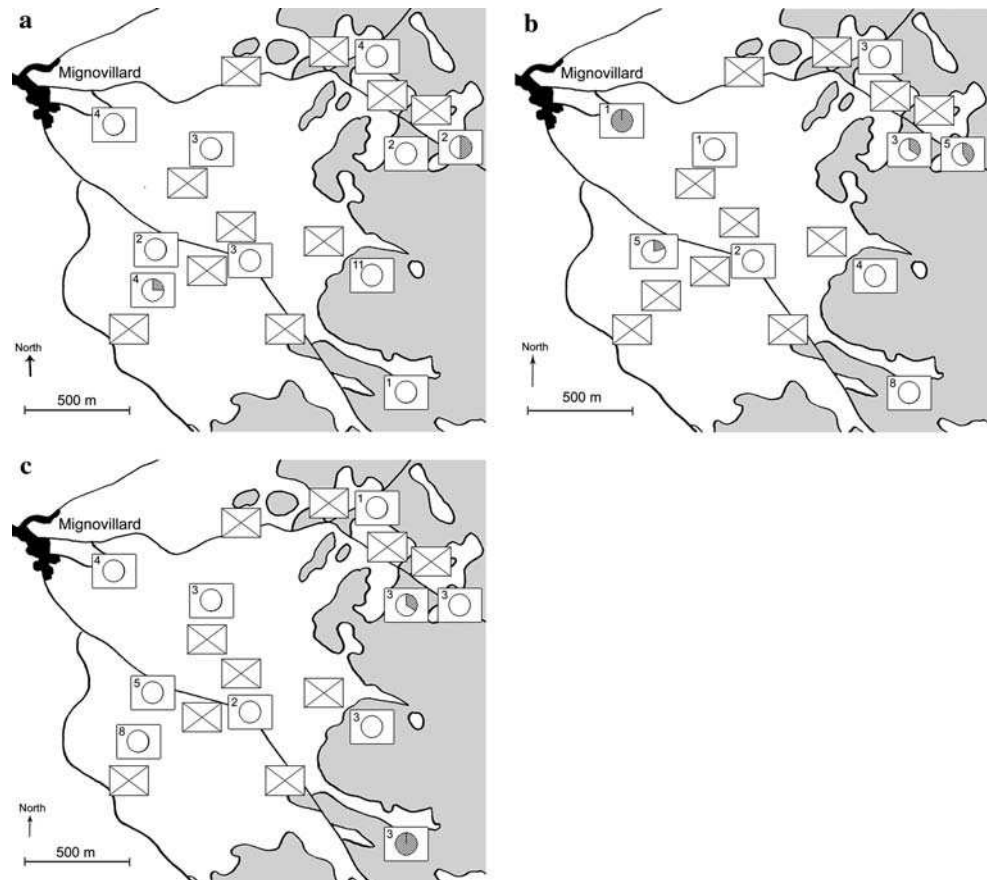
through time. Indeed, the location of seropositive cases at time t did not depend on that at time $t-1$, (PUUV spring-summer: $P = 0.051$, summer-autumn: $P = 0.239$; TULV spring-summer: not enough data, summer-autumn: $P = 0.083$).

Influence of kinship and dispersal

The genetic analyses were undertaken for animals sampled in 2005 only, as no individual was hantavirus-seropositive in autumn 2004 and only one was seropositive in spring 2006 (Table 1). For all the trapping sessions, the single-locus and multilocus probability tests showed an absence of departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Considering both bank and common voles, the mean relatedness between seropositive individuals was significantly higher than the mean relatedness between seronegative ones (Table 2).

Spatial autocorrelations of pairwise relatedness revealed that voles caught in the same locations were significantly more genetically related than expected (bank voles

Fig. 2 Spatial and temporal expansion of PUUV-seropositive *Myodes glareolus* in the study site in spring **a** summer **b** and autumn **c** 2005. Landscape is described as village (black), roads (black lines), grassy land with hedges (white area) and wooded land (grey area). Squares indicate the location where trap-lines were set. Numbers and diagrams, respectively, correspond to the number of voles trapped and the seroprevalence (hatched) per line. A crossed square indicates no rodents caught in the line



$P = 0.002$; common voles $P = 0.006$). No pattern of isolation by distance was detected over the study site, regardless of which vole species were considered.

The genetic differentiation estimated between two successive sampling sessions was very low, and exact tests indicated that F_{ST} -values were not significant, regardless of which species were considered (range of F_{ST} estimates [0.0019; 0.0047], $P > 0.05$). The assignment procedure revealed only one recent migrant (probability of being a resident = 0.008), which was a seronegative bank vole. All other individuals were considered residents.

Discussion

Our study documents the presence of voles infected with hantaviruses in the French Jura, a region 450 km away from the Ardennes region, the known hot spot for HFRS in France (INVS data). Bank voles in this study site exhibit seroprevalence levels similar to those observed in the Ardennes epidemic region (ranging from 0 to 18% for PUUV [50]). Moreover, our data suggest a real risk for human health because of the capture of PUUV-seropositive bank voles close to human settlements. Incidentally, 36 human cases were reported in Jura during the bank vole outbreak of 2005 [26].

Dispersal in hantavirus transmission

Our results support the role of vole dispersal and mobility in hantavirus transmission. First, seropositive animals appeared randomly over all of the study area. Second, sex influenced the risk of PUUV infections in bank voles. Actually, adult males are often the most frequently infected animals in a population during the breeding season [34]. This has been observed for PUUV infections in bank voles from France [58], the foothills of the Ural mountains [2] and Sweden [46]. More intensive mobility and dispersal activity of young maturing males compared to reproducing females was proposed as an explanation by Bernshtein [2], referring to [33]. Moreover, during the reproductive season, breeding males travel over more female territories and frequently visit “excretory points” and shelters of other animals, increasing their risk of acquiring infection. However, immunological differences between breeding males and females in response to infection could also explain this sex effect (for sex-specific immunological pathways of *Seoul* hantavirus infection, see [35, 36]). Third, old voles were more TULV-seropositive than younger ones. Young, immature voles have probably not dispersed yet, whereas territories occupied by older ones are continually visited by

Fig. 3 Spatial and temporal expansion of TULV-seropositive *Microtus arvalis* in the study site in spring **a** summer **b** and autumn **c** 2005. The landscape is described as in Fig. 2. Squares indicate the location where trap-lines were set. Numbers and diagrams, respectively, correspond to the number of voles trapped and the seroprevalence (hatched) per line. A crossed square indicates no rodents caught in the line

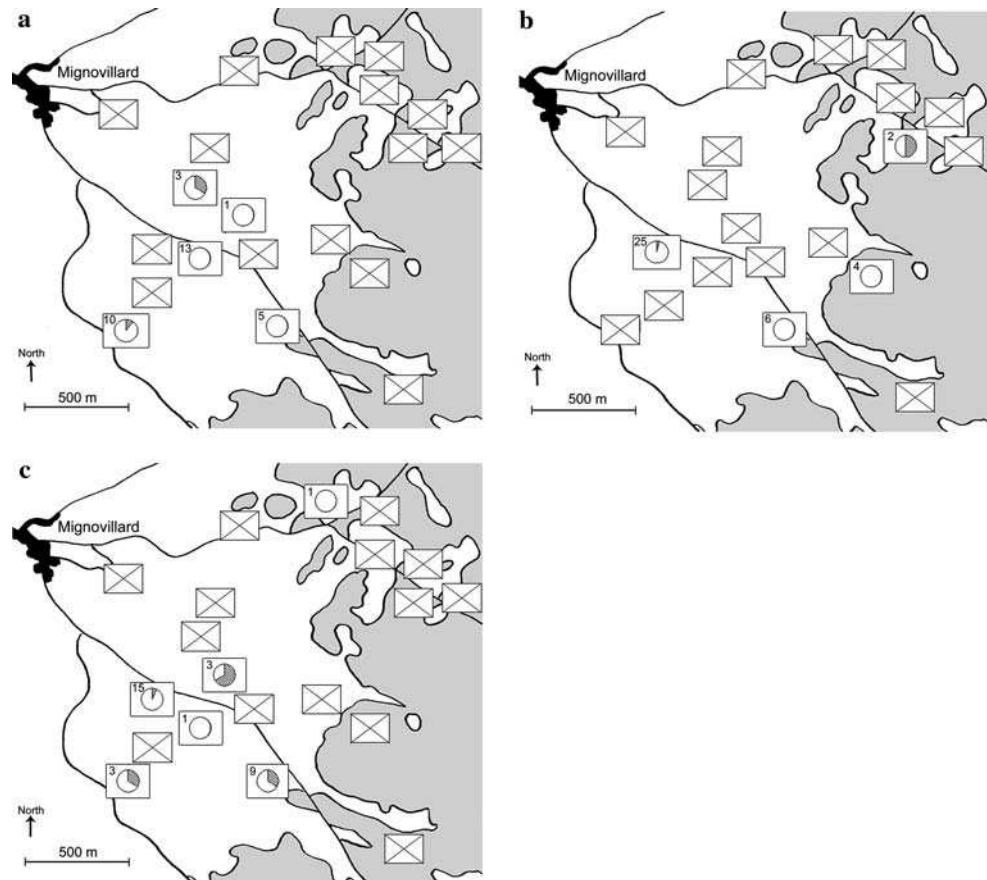


Table 2 Mean pairwise relatedness (\pm standard error) among hantavirus-seropositive and seronegative rodents

	Number of rodents genotyped	Mean pairwise relatedness	H
Bank voles			
Infected	11	0.0494 ± 0.0306	$P < 0.0001$
Non-infected	82	-0.0085 ± 0.0079	
Common voles			
Infected	10	0.0120 ± 0.0233	$P = 0.0198$
Non-infected	79	0.0007 ± 0.0019	

Probabilities are presented for the following hypothesis H: mean relatedness among infected rodents is higher than mean relatedness among non-infected ones (one-sided permutation test)

dispersers. Alternatively, this age effect could also be explained without referring to dispersal as older voles have been exposed to viruses longer than younger ones, and settled males could suffer from immunosuppression due to high levels of sex hormones and corticosterone associated with breeding [45].

The detection of seropositive voles immigrating in the surveyed area would have confirmed the role of dispersal in hantavirus transmission. Our study did not succeed in

identifying such individuals. This highlights the importance of choosing an appropriate spatial scale in such genetic and epidemiological studies. Genetic analyses, which revealed no departure from Hardy–Weinberg equilibrium and no pattern of isolation by distance over the study site, indicate that the spatial scale covers a smaller area than that corresponding to the whole panmictic population. The genetic differentiation between voles sampled and those coming from surrounding areas might thus be too weak to allow the detection of immigrants. Such geographically extended populations have already been described during outbreaks of fossorial water voles using genetic studies [3]. Moreover, both bank and common voles have considerable dispersal ability. Distances covered can reach more than 2–3 km for the bank vole (Henttonen, unpublished data), and 50–160 m in the case of short-range natal dispersal but occasionally up to 400 m within a few days for the common vole [6, 60]. The 4-km² area is thus too small to properly monitor an entire common or bank vole population and consequently, HFRS risks. Determining the appropriate geographical scale for such studies is now essential and this could be achieved by estimating the surface over which individual isolation by distance would be significant.

Kinship in hantavirus transmission

To our knowledge, this study is the first one revealing that PUUV and TULV are preferentially transmitted among relatives in vole species. This topic has already been tackled for PUUV in the grey-sided vole, *M. rufocanus bedfordiae* [27], but these authors did not find any evidence for closer relatedness among infected voles. Their result must, however, be considered cautiously as they used a very restricted dataset (only three seropositive animals). Several specific behaviours may result in higher hantavirus transmission between relatives. The simplest case concerns cohorts born to infective mothers and delaying their maturity and dispersal during high densities, which holds for our study site. Young are no longer protected by maternal antibodies and can be infected in their natal site by their mother. Alternatively, cohorts born to non-infected mothers, thus not protected by maternal antibodies, may get infected during the pre-dispersal period if their colony is visited by infected voles [6, 7]. Finally, related individuals might become infected once adults if they remain in the same colony, for common voles [6, 7], or after dispersal during winter kin-clustering, for bank voles [8].

On the other hand, higher transmission rates between relatives could have a completely different, non-behavioural origin. Relatives could be more prone to infection because of their similar genetic background, particularly in genes involved in hantavirus susceptibility. Recently, Deter et al. [12] pointed out associations between class II major histocompatibility complex (MHC) haplotypes and PUUV infections in bank voles. Some of these factors are likely to be involved in the susceptibility of bank voles to hantavirus infections. More studies are required to disentangle the effects of behaviours and genetic background in the higher hantavirus transmission rates between relatives in these two vole species.

Conclusion

We reported the presence of two hantavirus serotypes in French wild rodents and demonstrated the influence of dispersal and relatedness in hantavirus transmission for two vole species that have different ecologies and social behaviours. The results were consistent among both host-pathogen systems, suggesting that they are general features for hantavirus transmission modes within rodent populations. This study thus provides new essential information to include in mathematical models aimed at providing a better understanding of viral and rodent dynamics [57, 58]. The future challenge for emerging diseases will consist of linking ecology and modelling to predict the risks for human health.

Acknowledgments We thank Sylvain Piry, Florian Holon, Audrey Scala and Josef Bryja for assistance with the field work. We are very grateful to Valérie Deffontaine for lending microsatellites primers and the protocol for the bank vole. We also thank Johan Michaux for lending primers for *Apodemus* identification. This work was financed by a grant from the Ministry of Research and supported financially by the Institut National de la Recherche Agronomique, the region Franche-Comté and the DIREN Franche-Comté. Our work was also partially funded by EU grant GOCE-2003-010284 EDEN and is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0069 (<http://www.eden-fp6project.net>).

References

1. Barker FS, Helyar SJ, Kemp SJ, Begon M (2005) Highly polymorphic microsatellite loci in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Mol Ecol Notes* 5:311–313
2. Bernshtein AD, Apekina NS, Mikhailova TV, Myasnikov YA, Khlyap LA, Korotkov YS, Gabrilovskaya IN (1999) Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch Virol* 144:2415–2428
3. Berthier K, Charbonnel N, Galan M, Chaval Y, Cosson J-F (2006) Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations. *Mol Ecol* 15:2665–2676
4. Boonstra R, Krebs CJ, Gaines MS, Johnson ML, Craine ITM (1987) Natal philopatry and breeding systems in voles (*Microtus* spp.). *J Anim Ecol* 56:655–673
5. Botten J, Mirowsky K, Ye CY, Gottlieb K, Saavedra M, Ponce L, Hjelle B (2002) Shedding and intracage transmission of Sin Nombre hantavirus in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model. *J Virol* 76:7587–7594
6. Boyce CCK, Boyce JL (1988) Population biology of *Microtus arvalis*. I. Lifetime reproductive success of solitary and grouped breeding females. *J Anim Ecol* 57:711–722
7. Boyce CCK, Boyce JL (1988) Population biology of *Microtus arvalis*. III. Regulation of numbers and breeding dispersion of females. *J Anim Ecol* 57:737–754
8. Bujalska G (1988) Life history consequences of territoriality in the bank vole. In: Boyce MS (ed) *Evolution of life histories: theories and patterns from mammals*. Yale University Press, Edmonton, pp 75–90
9. Bujalska G (1990) Social system of the bank vole *Clethrionomys glareolus*. In: Tamarin R, Ostfeld R, Pugh S, Bujalska G (eds) *Social system and population cycles in Voles*. ALS-Verlag, Birkhauser, Basel, pp 155–167
10. Burnham KP, Anderson DR (1998) *Model selection and inference: a practical information-theoretic approach*. Springer, New York
11. Davis S, Calvet E, Leirs H (2005) Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5:305–314
12. Deter J, Bryja J, Chaval Y, Galan M, Henttonen H, Laakkonen J, Voutilainen L, Vapalahti O, Vaheri A, Ribas Salvador A, Morand S, Cosson J-F, Charbonnel N (2007) Association between the DQA MHC class II gene and Puumala virus infection in *Myodes glareolus*, the bank vole. *Inf Genet Evol* (in press)
13. Dobby A (2001) Movement patterns of male common voles (*Microtus arvalis*) in a network of Y junctions: role of distant visual cues and scent marks. *Can J Zool* 79:2228–2238
14. Dohmae K, Nishimune Y (1995) Protection against hantavirus infection by dams immunity transferred vertically to neonates. *Arch Virol* 140:165–172
15. Escutenaire S, Chalon P, Verhagen R, Heyman P, Thomas I, Karelle-Bui L, Avsic-Zupanc T, Lundkvist Å, Plyusnin A,

- Pastoret P-P (2000) Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res* 67:91–107
16. Escutenaire S, Chalon P, De Jaegere F, Karelle-Bui L, Mees G, Brochier B, Rozenfeld F, Pastoret PP (2002) Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala virus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg Infect Dis* 8:930–936
 17. Gauffre B, Galan M, Bretagnolle V, Cosson J-F (2007) Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*. *Mol Ecol Notes* 7:830–832
 18. Giraudoux P, Pradier B, Delattre P, Deblay S, Salvi D, Default R (1995) Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta Theriol* 40:77–96
 19. Gockel J, Harr B, Schlotterer C, Arnold W, Gerlach G, Tautz D (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) and *Clethrionomys glareolus* (Rodentia, Cricetidae). *Mol Ecol* 6:597–599
 20. Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2:618–620
 21. Heyman P, Plyusnina A, Berny P, Cochez C, Artois M, Zizi M, Pirmay JP, Plyusnin A (2004) Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *R. norvegicus* captured in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:711–717
 22. Innes DGL, Millar JS (1994) Life-histories of *Clethrionomys* and *Microtus* (Microtinae). *Mamm Rev* 24:179–207
 23. Ishibashi Y, Saitoh T, Abe S, Yoshida MC (1997) Cross species amplification of microsatellite DNA in Old World microtine rodents with PCR primers for the gray-sided vole, *Clethrionomys rufocanus*. *Mammal Study* 22:5–10
 24. Ishibashi Y, Saitoh T, Abe S, Yoshida MC (1998) Kin-related social organization in a winter population of the vole *Clethrionomys rufocanus*. *Res Popul Ecol* 40:51–59
 25. Ishibashi Y, Yoshinaga Y, Saitoh T, Abe S, Iida H, Yoshida MC (1999) Polymorphic microsatellite DNA markers in the field vole *Microtus montebelli*. *Mol Ecol* 8:163–164
 26. IVS IdVS (2005) Recrudescence des infections à Hantavirus, Nord-Est de la France. Point au http://www.invssantefi/presse/2005/le_point_sur/hantavirus_121005/indexhtml (Accessed 12 October 2005)
 27. Iwasa MA, Kariwa H, Cui B-Z, Lokugamage K, Lokugamage N, Hagiya T, Mizutani T, Takashima I (2004) Modes of hantavirus transmission in a population of *Clethrionomys rufocanus* bedfordiae inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Arch Virol* 149:929–941
 28. Jánová E, Heroldová M, Nesvadbová J, Bryja J, Tkadlec E (2003) Age variation in a fluctuating population of the common vole. *Oecologia* 137:527–532
 29. Johnson JB, Omland KS (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 19:101–108
 30. Kallio-Kokko H, Laakkonen J, Rizzoli A, Tagliapietra V, Cattadori I, Perkins SE, Hudson PJ, Cristofolini A, Versini W, Vapalahti O, Vaheri A, Henttonen H (2006) Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy. *Epidemiol Infect* 134:830–836
 31. Kallio ER, Klingström J, Gustafsson E, Manni T, Vaheri A, Henttonen H, Vapalahti O, Lundkvist A (2006) Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J Gen Virol* 87:2127–2134
 32. Kallio ER, Poikonen A, Vaheri A, Vapalahti O, Henttonen H, Koskela E, Mappes T (2006) Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:2771–2776
 33. Khlyap LA, Albov SA, Serbenyuk MA, Zagarujko NV (1989) Ecologo-ethological preconditions of infections transmission among bank voles by their excreta. In: XII All-Union
 34. Klein S (2005) Host factors mediating sex differences in viral infection. *Genet Med* 2:197–207
 35. Klein SL, Cemetich A, Hilmer S, Hoffman EP, Scott AL, Glass GE (2004) Differential expression of immunoregulatory genes in male and female Norway rats following infection with *Seoul virus*. *J Med Virol* 74:180–190
 36. Klein SL, Zink MC, Glass GE (2004) *Seoul virus* infection increases aggressive behaviour in male Norway rats. *Anim Behav* 67:421–429
 37. Klingstrom J, Heyman P, Escutenaire S, Sjolander KB, De Jaegere F, Henttonen H, Lundkvist A (2002) Rodent host specificity of European hantaviruses: evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J Med Virol* 68:581–588
 38. Li CC, Weeks DE, Chakravarti A (1993) Similarity of DNA finger-prints due to chance and relatedness. *Heredity* 43:45–52
 39. Martinet L (1966) Détermination de l'âge chez le campagnol des champs (*Microtus arvalis*) par la pesée du cristallin. *Mammalia* 30:425–430
 40. McCaughey C, Hart CA (2000) Hantaviruses. *J Med Microbiol* 49:587–599
 41. McCullagh P, Nelder J (1989) Generalized linear models. Chapman and Hall, New York
 42. Michaux JR, Kinet S, Filippucci M-G, Libois R, Besnard A, Catzeffis F (2001) Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae: Rodentia). *Mol Ecol Notes* 1:260–263
 43. Mills JN, Childs J, Ksiazek TG, Peters CJ, Velleca WM (1995) Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta
 44. Miyamoto H, Kariwa H, Araki K, Lokugamage K, Hayasaka D, Cui BZ, Lokugamage N, Ivanov LI, Mizutani T, Iwasa MA, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I (2003) Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients in far eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype. *Arch Virol* 148:1543–1556
 45. Nelson RJ, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ (eds) (2002) Seasonal patterns of stress, immune function, and disease. Cambridge University Press, Cambridge
 46. Olsson GE, White N, Ahlm C, Elgh F, Verlemyr AC, Juto P, Palo RT (2002) Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg Infect Dis* 8:924–929
 47. Olsson GE (2003) *Nephropathia Epidemica* and Puumala virus occurrence in relation to bank vole (*Clethrionomys glareolus*) dynamics and environmental factors in Northern Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå
 48. Olsson GE, White N, Hjältén J, Ahlm C (2005) Habitat factors associated with bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and concomitant hantavirus in northern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5:315–323
 49. Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 13:55–65
 50. Penalba C, Gallempoix JM, Lanoux P (2001) Epidémiologie des infections à hantavirus en France. *Médecine et Maladie Infectieuses* 31(Suppl 2):272–284
 51. Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95:536–539
 52. Plyusnin A (2002) Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch Virol* 147:665–682

53. Plyusnina A, Deter J, Charbonnel N, Cosson J-F, Plyusnin A (2007) Puumala and Tula hantaviruses in France. *Virus Res* (in press)
54. Prévot-Julliard A-C, Henttonen H, Yoccoz NG, Stenseth NC (1999) Delayed maturation in female bank voles: optimal decision or social constraint? *J Anim Ecol* 68:684–697
55. Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered* 86:248–249
56. Rosà R, Rizzoli A, Ferrari N, Pugliese A (2006) Models for host–macroparasite interactions in micromammals. In: Morand S, Krasnov BR, Poulin R (eds) *Micromammals and macroparasites from evolutionary study to management*. Springer, Tokyo, pp 319–348
57. Sauvage F, Langlais M, Yoccoz NG, Pontier D (2003) Modelling hantavirus in fluctuating populations of bank voles: the role of indirect transmission on virus persistence. *J Anim Ecol* 72:1–13
58. Sauvage F (2004) La synergie entre dynamique des populations réservoirs de campagnols roussâtres et excrétion du hantavirus Puumala : mise en évidence du mécanisme d'émergence de la néphropathie épidémique humaine Lyon. Université Claude Bernard—Lyon 1, Lyon, p 225
59. Schultze D, Lundkvist A, Blauenstein U, Heyman P (2002) *Tula* virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:304–306
60. Somsook S, Steiner HM (1991) Zur grosse des Aktionsraumes von *Microtus arvalis* (Pallas, 1779). *Z Saugetierkd* 56:200–206
61. Spitz F (1974) Démographie du campagnol des champs *Microtus arvalis* en vendée. *Annales de Zoologie - Ecologie Animale* 6:259–312
62. Spitz F, Le Louarn H, Poulet A, Dassonville B (1974) Standardisation des piégeages en ligne pour quelques espèces de rongeurs. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 28:564–578
63. Stewart WA, Piernney SB, Dallas JF (1998) Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in the water vole, *Arvicola terrestris*. *Mol Ecol* 7:1258–1259
64. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A (2003) Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3:753–754
65. Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol* 13:921–935
66. Verhagen R, Leirs H, Verheyen W (2000) Demography of *Clethrionomys glareolus*, Belgium. *Pol J Ecol* 48:113–123
67. Wang J (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160:1203–1215
68. Weir BS, Cockerman CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370
69. Wolff JO, Sherman PW (2007) *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. University Press, Chicago
70. Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, 4th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River
71. Zeier M, Handermann M, Bahr U, Rensch B, Muller S, Kehm R, Muranyi W, Darai G (2005) New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention—a review. *Virus Genes* 30:157–180

ARTICLE 6 :

Comprehensive cross-amplification of microsatellite multiplex sets
across the rodent genus *Microtus*.

**Comprehensive cross-amplification of microsatellite multiplex sets
across the rodent genus *Microtus***

M. Rudá*†, D. Žiak†, B. Gauffre‡, J. Zima* and N. Martínková*

*Institute of Vertebrate Biology, Academy of Science of the Czech Republic, v.v.i., Květná 8, 603
65 Brno, Czech Republic, †Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius
University, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovakia, ‡CBGP-INRA, Campus International
de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France

Keywords: microsatellite, STR, cross-amplification, *Microtus*, *Arvicolinae*

Correspondence: Miroslava Rudá, fax: +420 568 423 121, email: mira.ruda@gmail.com

Running title: Microsatellites for voles

Abstract

We developed four multiplex panels comprising 19 microsatellite loci and tested their amplification in 21 rodent species important for agricultural and conservation management (*Microtus*, *Arvicola*, *Chionomys*). On average 17.6 loci amplified per species. Number of alleles ranged from one to 19 per locus. We report an additional locus polymorphic in 15 vole species.

The rodent genus *Microtus* comprises more than 60 extant species distributed throughout Holarctic, many of them abundant and easy to sample. As such, voles have become effective model organisms for studies on evolution (Jaarola *et al.* 2004), phylogeography (Conroy & Neuwald 2008), speciation (Castiglia *et al.* 2008), population biology (Ratkiewicz & Borkowska 2006), behaviour (Ophir *et al.* 2008) or emerging diseases (Deter *et al.* 2008). Analysis of polymorphic microsatellite loci often plays an important role in such studies. Here, we have assembled four multiplex sets comprising 19 microsatellite loci and tested them for cross-species amplification in 19 *Microtus* species. Additionally, these sets were tested in two species of the closely related genera *Arvicola* and *Chionomys*.

Total genomic DNA was isolated from ethanol-stored tissue samples using DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) following manufacturer's protocol. Four sets of primers were established from previously known microsatellite loci identified for *Microtus arvalis* (Gauffre *et al.* 2007, Walser & Heckel 2008), *M. montebelli* (Ishibashi *et al.* 1999), *M. oeconomus* (Van de Zande *et al.* 2000) and *Myodes rufocanus* (Ishibashi *et al.* 1995) (Arvicolinae, Rodentia) and with an additional locus, Ma78, developed as in Gauffre *et al.* (2007), which has not been published until now (Genbank Accession number: FJ214059). These loci were organized into multiplex sets that maximize number of loci suitable for simultaneous analysis with no allele overlap between loci marked with the same dye (Table 1). Primer concentration was optimized for *M. tatricus*. We applied these multiplex sets to 2–5 individuals per species, with the exception of *M. tatricus* ($n = 91$) and *M. felteni* ($n = 1$). The dataset of *M. tatricus* will be used for a population genetics study with special aim at Tatra vole social system and included samples from Romania (Muntii Calimani, $n = 1$) and Slovakia (Veľká Fatra, $n = 5$, High Tatra Mts., $n = 8$, Western Tatra Mts., $n = 77$). The Western Tatra population was sampled over 30 years, and samples from 2003-2004 were used here for population genetics analyses ($n = 23$). The *M. felteni* sample represents a rare and endangered species from Balkan – an area of endemism and biodiversity hotspot. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) were computed in Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

HWE was calculated with 1 million steps in the Markov chain and 100000 dememorisation steps. LD was performed for 10000 permutations and 10 random initial conditions. Presence of null alleles was tested in Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) using default settings. Significance level was corrected for multiple tests using the Bonferroni correction.

PCR amplification was performed using the Multiplex PCR Kit (QIAGEN) on a Mastercycler egradient S cycler (Eppendorf). The multiplex PCR contained 1x multiplex mix (including HotStarTaq DNA polymerase, multiplex PCR buffer with 3 mM MgCl₂, dNTP mix), primer mix (see concentrations in Table 1) and 3 ng genomic DNA. Amplification started with an initial activation step at 95 °C for 15 min, followed by 30 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 57 °C for 90 s, extension at 72 °C for 60 s and final extension at 60 °C for 30 min. Subsequently, the PCR products were mixed with formamide and GeneScan 500-LIZ (sets 1, 2) or 500-ROX (sets 3, 4) size standards (Applied Biosystems), respectively according to manufacturer's recommendations. After 5 min denaturation followed by rapid cooling, PCR products were detected on an ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), and the fragment length was estimated in Genemapper 3.7 software.

On average, 17.57 (SD = 1.36) loci amplified for each species, with average number of alleles per locus being 3.7 (SD = 0.63; Table 2). The repeat sequence of the new locus Ma78 (Table 1) was (GT)₁₆(GC)₈(GT)₂. The locus exhibited nine alleles in *M. tatricus* ($n = 91$), with observed heterozygosity $H_O = 0.48$ and expected heterozygosity $H_E = 0.51$ ($P = 0.77$, $n = 23$) in the target population. Locus Ma25 significantly deviated from HWE (Table 1), and the excess of homozygotes can be attributed to presence of null alleles. LD analysis showed that pairs of loci Mar003/Mar076, Ma36/Ma68 and Mar063/Ma09 are in linkage disequilibrium ($P < 0.05$ after Bonferroni correction) in *M. tatricus*. The first two pairs of loci have been tested for LD previously in *M. arvalis* without significant results (Gauffre *et al.* 2007, Walser & Heckel 2008). Our results might be a consequence of reduced diploid chromosome number in *M. tatricus* ($2N = 32$)

compared to *M. arvalis* (2N = 46; Zima & Král 1984). The loci that amplified in all tested species were MSMM2, MSMM6, Ma09, Ma54 and Ma81. Interestingly, locus Ma54 was duplicated in all species belonging to subgenus *Terricola* (cf. Jaarola *et al.* 2004) with the exception of *M. brachycercus* and *M. savii*. We suppose that this gene duplication arose in the ancestor of *Terricola* and secondarily, a mutation in primer site of one gene copy reversed the signal of this duplication in *M. brachycercus* and *M. savii*. Locus Ma75 was found only in subgenus *Microtus sensu stricto* (*M. arvalis*, *M. dogramacii*, *M. guentheri*, *M. kirgisorum*, *M. obscurus* and *M. transcaspicus*) and *M. majori* of uncertain taxonomic position (Jaarola *et al.* 2004).

We hope this test of readily available microsatellite loci will inspire further studies of population structure, mating systems, phylogeography or adaptive evolution of microtine rodents.

References

- Castiglia R, Annesi F, Aloise G, Amori G (2008) Systematics of the *Microtus savii* complex (Rodentia, Cricetidae) via mitochondrial DNA analyses: Paraphyly and pattern of sex chromosome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 1157-1164.
- Conroy CJ, Neuwald JL (2008) Phylogeographic study of the California vole, *Microtus californicus*. *Journal of Mammalogy*, **89**, 755-767.
- Deter J, Chaval Y, Galan M *et al.* (2008) Kinship, dispersal and hantavirus transmission in bank and common voles. *Archives of Virology*, **153**, 435-444.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Gauffre B, Galan M, Bretagnolle V, Cosson JF (2007) Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 830-832.
- Ishibashi Y, Saitoh T, Abe S, Yoshida MC (1995) Polymorphic microsatellite DNA markers in the grey red-backed vole *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*. *Molecular Ecology*, **4**, 127-128.
- Ishibashi Y, Yoshinaga Y, Saitoh T, *et al.* (1999) Polymorphic microsatellite DNA markers in the field vole *Microtus montebelli*. *Molecular Ecology*, **8**, 163-164.
- Jaarola M, Martínková N, Gündüz İ *et al.* (2004) Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 647-663.

- Ophir AG, Phelps SM, Bess Sorin A, Wolff JO (2008) Social but not genetic monogamy is associated with greater breeding success in prairie voles. *Animal Behaviour*, **75**, 1143-1154.
- Ratkiewicz M, Borkowska A (2006) Genetic structure is influenced by environmental barriers: empirical evidence from the common vole *Microtus arvalis* populations. *Acta Theriologica*, **51**, 337-344.
- Van de Zande L, Van Apeldoorn RC, Blijdenstein AF *et al.* (2000) Microsatellite analysis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Molecular Ecology*, **9**, 1651-1656.
- 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.
- Walser B, Heckel G (2008) Microsatellite markers for the common vole (*Microtus arvalis*) and their cross-species utility. *Conservation Genetics*, **9**, 479-481.
- Zima J, Král B (1984) Karyotypes of European mammals. *Acta Societatis Naturalis Brno*, **18(8)**, 1-62.

Acknowledgements

We are grateful to our colleagues and friends for providing samples. Comments of Alison Surridge helped to improve the manuscript. Miroslava Rudá and David Žiak were supported by VEGA 1/3264/2006 and student grant 32-VŠ from Orange, Natália Martínková by Grant Agency of the Academy of Science of the Czech Republic (KJB600930610)

Table 1 Primer concentrations in the multiplex sets, sequences and accession numbers of the microsatellite loci; observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity is reported for *M. tatricus* from Western Tatra population trapped between 2003-2004 ($n = 23$). The significance level of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P) was corrected for multiple tests.

Locus name	Conc. (μ M)	Primer sequence (5' - 3')	Dye	Accession No.	H_O/H_E	P
SET1						
Mar003 ¹	1.6	F: GGAGATACAAGGCCCAAACA R: TGGCATTAGATGACCTGTGG	FAM	EF666981	0.91/0.89	ns
Mar012 ¹	0.8	F: TTTGCTCAATTCTCTCATAAAAGG R: TGTCATGGATTGGGCATACA	VIC	EF666982	0.61/0.62	ns
Mar063 ¹	1.0	F: GCCTGGACACAACCAAACCTT R: GGCTATGGGCAGCTCCTG	VIC	EF666986	0.83/0.87	ns
Mar076 ¹	0.7	F: TCACCAGGACCTACTGAGCA R: GCCAGCTTCATTTCAAGAGG	PET	EF666987	0.52/0.63	ns
Moe02 ²	0.4	F: CATCTGATGAGTCCCTGAGG R: GCAACCTTCTTCTGACTTTTAC	NED	AF268903	0.17/0.16	ns
SET2						
MSCR5 ³	0.6	F: GGTGGTGTGGTTCATTTAGG R: CGTCTGGGTTTTACATCTGA	NED	D37836	monomorphic	
Mar049 ¹	0.9	F: GGAAATGCCTGTTTGTATGAGA R: TGTGATGTGGGAACCAGAGA	NED	EF666984	0.91/0.86	ns
Mar080 ¹	0.7	F: ATGGATCATTCCGTTCTGT R: AACCTTCAGCCCAAACCATT	VIC	EF666988	0.74/0.76	ns
MSMM2 ⁴	0.9	F: TAACCACAACCCCTCCAACCTG R: TCATTTGGAGTTGCTGAGAAC	PET	AB016153	0.74/0.77	ns
SET3						
Ma09 ⁵	0.6	F: CCCTAAGGAATAGCATCTGAG R: GAATGTATGTGGAAGCCAGG	FAM	EF177194	0.70/0.84	ns
Ma54 ⁵	1.2	F: CGAATATGCTGTCTCACTTCC R: AGATGTCCTGCTGTGTTCC	HEX	EF177197	*	*
Ma78 ⁶	0.7	F: CCTGAACAATGGCAAAACAC R: AGGAAGCTAGTTGGAAGGATG	HEX	FJ214059	0.48/0.51	ns
MSMM6 ⁴	0.7	F: TACAAATCTATCCTCTGACCTC R: TACAAAGCCATTGTTCCCTGCT	FAM	AB016157	0.09/0.09	ns
SET4						
Ma25 ⁵	1.0	F: GATGAACAAAGGTTAATTCCAG R: ATCAGGCAGCTCACAGCTC	HEX	EF177204	0.49/0.82	0.01
Ma36 ⁵	0.7	F: CAGGCTAGCTGGATAGGTCA R: ACAAGTTGTCCTGGATTAAGTATG	HEX	EF177206	0.91/0.89	ns
Ma68 ⁵	0.8	F: GACTTTTTTCATAGAATGAGGTTTTAG R: TCTGAAGCATAGCAACAATGG	FAM	EF177201	0.74/0.86	ns
Ma75 ⁵	0.7	F: CTACCTTCCCTCACCCAGAC R: GGTGAAGATCCTCTCTGCAT	NED	EF177207	*	*
Ma81 ⁵	0.9	F: TCCTCATATTGAGCTTCTGTCC R: AACTTGCAGGTGACCGAGC	FAM	EF177202	0.91/0.87	ns
Ma88 ⁵	0.9	F: AAGGACGATGAGGACCAACC R: CGGAATGGCAGGACAGC	NED	EF177199	0.61/0.49	ns

1 – Walser & Heckel 2008, 2 – Van de Zande *et al.* 2000, 3 – Ishibashi *et al.* 1995, 4 – Ishibashi *et al.* 1999, 5 – Gauffre *et al.* 2007, 6 – this study, * - data not available, see text for details, ns – not significant

Table 2 Cross-species amplification of 19 microsatellite loci, allele ranges and number of alleles (in parentheses) in each species

Species/Locus	Ma09	Ma25	Ma36	Ma54	Ma68	Ma75	Ma78	Ma81	Ma88	Mar003
<i>Ater</i> (n = 3)	80 (1)	173 (1)	266-286 (3)	182-188 (2)	118 (1)	255-262 (2)	-	185-195 (3)	110-135 (2)	-
<i>Cniv</i> (n = 3)	70-118 (3)	131-187 (5)	283-307 (3)	186-207 (4)	118 (1)	262-338 (4)	272 (1)	185-191 (2)	121-155 (3)	144 (1)
<i>Magr</i> (n = 5)	82-104 (6)	135-211 (6)	288-333 (5)	168-174 (3)	120-128 (3)	-	272-296 (5)	185-203 (4)	127-141 (3)	126-173 (6)
<i>Marv</i> (n = 3)	84-110 (4)	175-183 (3)	307-327 (3)	188-218 (5)	122-134 (4)	280-314 (5)	284-314 (5)	193-213 (4)	96-135 (6)	128-177 (6)
<i>Mbav</i> (n = 2)	92-94 (2)	155-167 (3)	331-343 (2)	176-196 (*)	116-142 (3)	-	278-288 (2)	197-217 (3)	123-142 (4)	151-168 (3)
<i>Mbra</i> (n = 2)	94-108 (4)	149-163 (4)	312-370 (4)	184-207 (4)	114-124 (3)	-	282-306 (3)	199-203 (2)	125-141 (4)	156-177 (3)
<i>Mdog</i> (n = 4)	82-88 (3)	175-199 (6)	274-283 (5)	182-207 (2)	108-124 (5)	276-288 (5)	294-312 (5)	195-205 (4)	110-137 (3)	169-177 (3)
<i>Mfel</i> (n = 1)	82 (1)	145 (1)	325-335 (2)	168-190 (*)	116 (1)	-	-	213-217 (2)	127 (1)	151-154 (2)
<i>Mgre</i> (n = 5)	74-104 (7)	-	288-327 (6)	182-199 (6)	106-118 (2)	282-305 (2)	272-298 (5)	181-207 (7)	107-127 (3)	126-174 (7)
<i>Mgun</i> (n = 5)	86-102 (6)	135-181 (4)	264-310 (7)	176-199 (7)	116-126 (5)	264-276 (3)	274-290 (3)	199-219 (6)	117-145 (4)	160-182 (4)
<i>Mkir</i> (n = 4)	82-92 (3)	121-129 (3)	288-308 (3)	186-198 (4)	108-118 (4)	186-312 (4)	264-278 (4)	183-205 (4)	107-125 (5)	151-162 (3)
<i>Mlie</i> (n = 3)	94-104 (3)	149-167 (4)	335-345 (3)	176-205 (*)	128-138 (3)	-	272 (1)	193-211 (5)	135-140 (4)	151-168 (4)
<i>Mmaj</i> (n = 5)	84-114 (7)	131-155 (4)	310-337 (6)	182-226 (*)	118-134 (2)	268 (1)	286-312 (6)	185-207 (5)	121-145 (6)	147-165 (4)
<i>Mmul</i> (n = 3)	80-94 (5)	153-171 (5)	288-329 (6)	184-201 (*)	120-132 (3)	-	274-278 (2)	187-215 (6)	123-135 (4)	154-160 (4)
<i>Mobs</i> (n = 2)	92-108 (3)	163-189 (4)	286-316 (4)	190-210 (3)	122-132 (4)	280-282 (2)	278 (1)	195-209 (4)	129-135 (3)	128-137 (4)
<i>Moec</i> (n = 2)	86-106 (2)	163-167 (2)	352-359 (2)	196-212 (4)	-	-	290-298 (3)	227 (1)	-	151-156 (2)
<i>Msav</i> (n = 4)	98-108 (6)	149-167 (4)	-	194 (1)	108-126 (5)	-	294-306 (3)	199-203 (3)	129-142 (5)	162-187 (2)
<i>Msub</i> (n = 4)	76-100 (7)	143-145 (2)	304-314 (4)	170-218 (*)	108-132 (5)	-	284-316 (7)	189-213 (4)	133-142 (4)	160-162 (2)
<i>Mtat</i> (n = 91)	86-104 (10)	158-184 (13)	280-344 (19)	171-223 (*)	106-136 (14)	-	278-316 (9)	179-219 (16)	60-66 (2)	136-174 (15)
<i>Mtho</i> (n = 2)	102 (1)	145-163 (2)	312-318 (2)	184-205 (*)	104 (1)	-	298 (1)	205 (1)	123-140 (2)	164-166 (2)
<i>Mtra</i> (n = 5)	84-108 (4)	155-187 (6)	288-325 (5)	186-214 (7)	116-134 (4)	282-288 (4)	272-300 (3)	185-207 (3)	125-135 (4)	158-173 (4)

Table 2 – continued

Species/Locus	Mar012	Mar049	Mar063	Mar076	Mar080	MSCR5	MSMM2	MSMM6	MSMoe02
<i>Ater</i> (n = 3)	74-78 (3)	-	267 (1)	207-255 (4)	394-409 (5)	-	173-188 (5)	145-165 (3)	-
<i>Cniv</i> (n = 3)	80-84 (2)	228-236 (3)	273-291 (3)	-	204 (1)	123 (1)	163-188 (4)	145-161 (5)	151-168 (5)
<i>Magr</i> (n = 5)	74-78 (3)	231-285 (6)	283-299 (5)	92 (1)	166-196 (4)	123 (1)	163-185 (3)	147-163 (4)	140-142 (2)
<i>Marv</i> (n = 3)	80-124 (6)	210-256 (6)	286-305 (5)	116-132 (5)	204-229 (5)	139-159 (6)	167-206 (6)	147-175 (5)	155-178 (5)
<i>Mbav</i> (n = 2)	95-99 (3)	228-236 (3)	291-293 (2)	112-124 (3)	201-224 (3)	127 (1)	169 (1)	150 (1)	142 (1)
<i>Mbra</i> (n = 2)	84-87 (2)	227-244 (4)	273-293 (3)	116-124 (4)	211-219 (3)	-	187-199 (4)	150 (1)	142 (1)
<i>Mdog</i> (n = 4)	87-97 (3)	231-253 (6)	279-290 (4)	111-118 (4)	204-211 (3)	120 (1)	204-210 (3)	145-153 (2)	-
<i>Mfel</i> (n = 1)	91 (1)	208-228 (2)	286-295 (2)	105 (1)	-	129 (1)	175-182 (2)	145-150 (2)	144 (1)
<i>Mgre</i> (n = 5)	126 (1)	224-253 (7)	-	105-121 (4)	237-243 (4)	123-131 (5)	167-193 (8)	141-158 (4)	155-176 (5)
<i>Mgun</i> (n = 5)	85-91 (4)	204-272 (8)	279-295 (6)	111-126 (4)	203-209 (3)	120-125 (2)	203 (1)	150-159 (5)	-
<i>Mkir</i> (n = 4)	85-93 (5)	201-217 (2)	272 (1)	100-109 (4)	209-218 (2)	135-162 (3)	169-173 (2)	141 (1)	144-158 (5)
<i>Mlie</i> (n = 3)	93-102 (3)	228-236 (4)	283-305 (4)	105-118 (2)	198-203 (3)	127-129 (2)	169-193 (3)	150 (1)	142-144 (2)
<i>Mmaj</i> (n = 5)	75 (1)	212-240 (6)	267-297 (6)	108-115 (2)	204-227 (6)	127-144 (7)	179-195 (6)	143 (1)	168-176 (4)
<i>Mmul</i> (n = 3)	93-97 (3)	201-231 (3)	286-291 (4)	118-124 (4)	197-213 (4)	125-127 (2)	169-199 (6)	150 (1)	142-146 (3)
<i>Mobs</i> (n = 2)	89-102 (2)	200-217 (3)	273-295 (4)	103-116 (4)	213-218 (2)	155-167 (3)	185-203 (3)	135-150 (2)	127-140 (3)
<i>Moec</i> (n = 2)	-	247-259 (3)	281-299 (4)	135-164 (4)	213-229 (3)	129-133 (3)	185-193 (2)	135-163 (2)	148-171 (3)
<i>Msav</i> (n = 4)	85-87 (2)	227-229 (2)	273-288 (2)	112-122 (3)	193-219 (7)	-	184-193 (3)	150-152 (2)	142 (1)
<i>Msub</i> (n = 4)	102-104 (2)	228-240 (3)	288-299 (2)	116-132 (2)	199-218 (3)	125-127 (2)	163-185 (3)	143 (1)	-
<i>Mtat</i> (n = 91)	65-95 (10)	201-257 (15)	281-311 (13)	92-130 (9)	165-231 (16)	125-129 (3)	168-196 (11)	143-149 (3)	139-153 (6)
<i>Mtho</i> (n = 2)	85-87 (2)	199-201 (2)	273-279 (2)	105 (1)	211-219 (2)	125-127 (2)	184-187 (3)	150 (1)	142 (1)
<i>Mtra</i> (n = 5)	93-95 (2)	231-283 (4)	277-309 (5)	109-124 (3)	209-215 (2)	120-131 (3)	185-193 (3)	135-196 (2)	158-173 (3)

Ater – *Arvicola terrestris*, *Cniv* – *Chionomys nivalis*, *Magr* – *Microtus agrestis*, *Marv* – *M. arvalis*, *Mbav* – *M. bavaricus*, *Mbra* – *M. brachycercus*, *Mdog* – *M. dogramacii*, *Mfel* – *M. felteni*, *Mgre* – *M. gregalis*, *Mgun* – *M. guntheri*, *Mkir* – *M. kirgisorum*, *Mlie* – *M. liechtensteini*, *Mmaj* – *M. majori*, *Mmul* – *M. multiplex*, *Mobs* – *M. obscurus*, *Moec* – *M. oeconomus*, *Msav* – *M. savii*, *Msub* – *M. subterraneus*, *Mtat* – *M. taticus*, *Mtho* – *M. thomasi*, *Mtra* – *M. transcaspicus*, * - number of alleles omitted because of gene duplication for this marker in *Terricola* species