



The evolutive dynamic of the bank vole (*Myodes glareolus*) : Spatial structure of the morphometric variations

Ronan Ledevin

► To cite this version:

Ronan Ledevin. The evolutive dynamic of the bank vole (*Myodes glareolus*) : Spatial structure of the morphometric variations. Paleontology. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. English. NNT : 2010LYO10196 . tel-00832801

HAL Id: tel-00832801

<https://theses.hal.science/tel-00832801>

Submitted on 11 Jun 2013

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.

THESE

Présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 2010

Par

M. Ronan LEDEVIN

La dynamique évolutive du campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) : structure spatiale des variations morphométriques

Jury

Rapporteurs :

M. J.-C. AUFFRAY : Directeur de Recherche (Université de Montpellier II)

M. A. CARDINI : Lecturer (Università di Modena e Reggio Emilia)

Examineurs :

Mme D. PONTIER : Professeur des Universités (Université de Lyon I)

M. J. R. MICHAUX : Chercheur Qualifié (Université de Liège, en accueil au CBGP de Montpellier)

Directeur de Thèse :

Mme S. RENAUD : Chargé de Recherche (Université de Lyon I)

THESE

Présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 2010

Par

M. Ronan LEDEVIN

La dynamique évolutive du campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) : structure spatiale des variations morphométriques

Jury

Rapporteurs :

M. J.-C. AUFFRAY : Directeur de Recherche (Université de Montpellier II)

M. A. CARDINI : Lecturer (Università di Modena e Reggio Emilia)

Examineurs :

Mme D. PONTIER : Directeur de Recherche (Université de Lyon I)

M. J. R. MICHAUX : Chercheur Qualifié (Université de Liège, en accueil au CBGP de Montpellier)

Directeur de Thèse :

Mme S. RENAUD : Chargé de Recherche (Université de Lyon I)

*« S'il fallait tenir compte des services rendus à la science,
la grenouille occuperait la première place. »*

-Claude Bernard-

J'aimerais associer les campagnols à cette citation,
ayant joué le premier rôle dans cette thèse.
Malheureusement pour eux...

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été rendue possible en grande partie grâce au soutien de nombreuses personnes que j'aimerais ici remercier.

Tout d'abord un grand merci à Sabrina Renaud qui m'a pris en main dès mon Master 1 et que je n'ai depuis cessé d'embêter ! En cinq ans son travail d'encadrante a toujours été formidable et c'est grâce à cela que j'ai pu en arriver là. Ce manuscrit est le résultat d'une collaboration que j'ai beaucoup apprécié, où Sabrina m'a guidé pas après pas (avec beaucoup de patience et de diplomatie !). Merci pour toutes les discussions, scientifiques ou non, que nous avons eu durant ces dernières années. J'espère que tu y as pris autant de plaisir que moi !

Je tiens également à remercier les trois membres de mon comité de pilotage, qui ont joué un rôle très important tout au long de ma thèse. Johan R. Michaux, qui a toujours été là pour répondre à mes questions et qui a ce don d'animer de façon incroyable les discussions scientifiques que nous avons pu avoir au CBGP. Toute ma gratitude va à Jean-Pierre Quéré, qui grâce à son travail de terrain et son expérience a fourni une quantité impressionnante de matériel et une meilleure compréhension de l'écologie des campagnols. Merci enfin à Christelle Tougard, avec qui j'ai beaucoup apprécié discuter tout au long de ma thèse. Merci pour sa gentillesse et l'intérêt qu'elle a montré pour les différentes études que j'ai pu entreprendre.

J'aimerais remercier les membres du jury, qui ont accepté avec gentillesse d'être présents à ma soutenance et de juger des résultats de cette thèse : Mme Dominique Pontier, M. Jean-Christophe Auffray, M. Andrea Cardini et M. Johan R. Michaux.

Un merci particulier à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à cette thèse en fournissant des données, des idées, ou du matériel : Valérie Deffontaine Deurbroeck, qui a fait un travail de fond mémorable sur la phylogéographie du campagnol et sans qui cette thèse n'aurait jamais été initiée ; Heikki Henttonen, qui a eu la gentillesse de partager avec moi ses connaissances sur le campagnol roussâtre et sa collection impressionnante de petites bêtes finlandaises. L'étude sur les campagnols de Suède n'aurait pu s'effectuer sans Gert Olsson, qui a piégé les animaux et a fourni toutes les données utiles aux analyses. Sur la même étude, merci à Bernard Lehanse qui a réalisé toutes les analyses génétiques. Merci à Elodie Renvoisé pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir à chacune de nos rencontres. Merci à Abel Prieur de m'avoir formé à la restauration d'objets et pour nos nombreuses discussions.

Différentes personnes m'ont accueilli lors de mon bref séjour à l'université de Bristol. Ayant « crashé » leurs deux principaux ordinateurs d'étude, ils se souviendront de « l'espion français venu détruire leurs données ». Merci à Emily Rayfield, Daniela Schmidt, Aude Caromel, et Jen Bright (qui avec beaucoup d'humour m'a fait découvrir les joies de la morphométrie 3D).

La bonne réalisation de cette thèse doit aussi beaucoup à l'encadrement et au soutien de mon laboratoire et de l'école doctorale. Merci à Christophe Lécuyer de m'avoir accueilli dans l'UMR PEPS et à Anne-Marie Bodergat dans l'équipe AME. Une grande partie de mes frais ont été couverts grâce à eux et je les en remercie. Merci à Bruno Sent, toujours là pour aider au bon déroulement des enseignements. Merci aussi à Jean-Pierre Flandrois, directeur de l'école doctorale E2M2 et qui a toujours répondu à mes questions avec une rapidité effarante.

Un merci tout particulier à ma chère Dominique Barbe, qui a toujours été là pour moi, et qui s'apprête bientôt à imprimer ce manuscrit. J'ai beaucoup aimé nos discussions et les cafés partagés. Merci de ta bonne humeur et de toute l'aide que tu apportes aux étudiants.

Ce travail de thèse doit beaucoup à tous mes proches et amis qui m'ont soutenu, encouragé et fait rire. Bref, qui ont rendu ces trois dernières années très vivantes et agréables. Un grand

merci à toute la bande du « café du R4 », coutume locale qui doit être perpétrée et farouchement défendue puisque participant grandement à la bonne ambiance sur le lieu de travail. Au moment où j'écris ces mots, j'entends que le café de 10h vient d'ailleurs de commencer !

Merci à Fabienne pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son soutien. Je remercie également Nath', toujours là quand il faut et prête à rire de toutes les blagues qui fusent à l'heure du café. Blagues souvent attribuables à Fabienne, mais qui est largement concurrencée par Vincent ! Merci aussi à Gildas, toujours motivé par de nouvelles collaborations et à Claude pour sa bonne humeur (et son encadrement lors de mon monitorat !).

Une petite pensée pour les « compagnons de galère » avec qui j'ai passé pas mal d'heures sur les chaises de la fac, Mathieu et Raph'. Je ne compte plus les blagues « pas drôles mais bon, on va rire quand même ! » Dernière en date, rapport au rongeurs : « Est-ce que la petite souris passe chez le mulot quand il perd une dent ? » Raphaël (2010). Réponse : Non, mais Ronan oui...

Merci à toute la bande qui a égayé mes soirées : Estelle et Jerem (qui m'a fait aussi découvrir d'autres bêtes que les campagnols, plus grosses et plus méchantes : les crocos !), Toto et Pompon (pas très très bons au jorky ball je dois avouer... mais de supers potes !), Vincent (parti dire bonjour aux estoniens pour trois ans), Julien et Anne-Sabine avec qui j'ai passé de très bons moments et qui sont partis pour faire des thèses d'enfer ! Merci à Alex pour nos discussions philosophiques, où je n'ai finalement pas beaucoup de choses à dire vu mes faibles connaissances dans le domaine... Merci à Junior et Peggy, couple exemplaire toujours prêt à aller boire un verre, Baptiste, le rugbyman à l'épaule précieuse ;) et François, punching-ball attitré de Vincent et toujours là pour aider. Enfin un grand merci à Gatsby pour sa gentillesse.

Merci à Damien et Aurore, qui ont aussi égayé mes soirées mais d'une autre façon, par ordinateur interposé ! Vous êtes des geeks extra ;) Merci aux maîtres de chiens que je retrouve tous les soirs sur la pelouse de la Fac. Les moments passés avec eux sont vraiment sympas : Julien, Jiechen, JC, Isa, Lionel, Charlotte, Andreane, Lionel, Lila.

Pour finir, j'aimerais exprimer tous mes remerciements à mes proches, qui m'ont supporté sans broncher (ou presque) non pas trois ans, mais... beaucoup plus !

Merci tout d'abord à mes parents, fantastiques, qui ont fait tout ce qu'ils pouvaient pour moi. Ils ont joué un rôle moteur tout au long de mon cursus et cette thèse est une façon pour moi de les remercier de tout ce qu'ils ont toujours fait. Merci d'y avoir cru jusqu'au bout.

Une pensée toute particulière à ma sœur Morgane et mon frère Brendan. Eux aussi sont vraiment des personnes formidables et adorables. Je les vois grandir et évoluer avec grand plaisir (tant que Brendan reste plus petit que moi, faut pas charrier !). Merci à Lucas de supporter ma sœur, maintenant que tu l'as, tu la gardes ! Merci à Jacques, Aurélie et Laetitia, une belle famille qui en fait rêver plus d'un !

Finalement, j'aimerais remercier particulièrement Amandine, qui partage ma vie depuis plus de huit ans et qui a toujours été là pour moi. Elle a encaissé les hauts et les bas que j'ai connus au cours de cette thèse sans se plaindre, toujours prête à me soutenir. J'ai eu une chance folle de la rencontrer, et je ne suis pas prêt de la lâcher ! Merci !

Grâce à elle j'ai pu faire la connaissance d'une petite boule de poil, Gaïa, qui est la meilleure des chiennes. Devenue la mascotte du laboratoire, quand les gens rentraient dans mon bureau ils disaient d'abord bonjour à Gaïa, puis se tournaient vers moi. C'est dire son capital sympathie ! Et puis elle m'a permis de m'aérer les idées de force, même dans les moments un peu difficiles.

Sommaire

Introduction	11
1. Influence des changements climatiques du Quaternaire sur l'évolution des espèces eurasiennes	13
1.1 La phylogénie moléculaire, un outil « classique » des études biogéographiques	13
1.2 La morphologie, un objet d'étude complémentaire	14
2. Les campagnols comme modèle d'étude	16
2.1 La diversification des Arvicolinae au cours du Quaternaire	16
2.2 Le campagnol roussâtre <i>Myodes glareolus</i> comme modèle de réponse biogéographique aux fluctuations du Quaternaire	17
3. Méthode d'étude de la forme : l'outil morphométrique	18
4. Structure et objectifs de la thèse	19
Chapitre 1 : Apport de la morphométrie à l'étude de l'histoire évolutive du campagnol roussâtre	25
1.1. A l'échelle de l'Europe	27
1.1 Histoire évolutive du campagnol roussâtre: une perspective morphométrique (Publication 1)	27
1.2. Le cas particulier de deux lignées du pourtour méditerranéen	45
1.2.1 Une lignée relique de campagnol roussâtre illustre l'histoire biogéographique de la région Pyrénéenne (Publication 2)	45
1.2.2 Identification d'une population de campagnol roussâtre endémique du promontoire du Gargano (Italie) (Etude de cas 1)	63
1.3. Etude d'un carrefour majeur inter- et intra-spécifique : la Fennoscandinavie (Etude de cas 2)	77
Chapitre 2 : Pourquoi une telle variabilité du patron dentaire chez <i>Myodes glareolus</i> ?	95
2.1. L'influence considérable de l'effet d'usure	97
2.1.1 Variations saisonnières du contour de la molaire: Un effet de l'usure? (Publication 3)	97
2.2. Interprétation evo-devo de la variation du patron dentaire de la UM3	111
2.2.1 Quels processus contribuent à la variation de forme de la dent ? (Publication 4)	111
Chapitre 3 : Patron de variation de la mandibule : signature de l'environnement, des lignées ou de la structure d'âge ?	137
3.1. Structure d'âge des populations et patron de variation de la mandibule (Etude de cas 3)	139
Conclusion	163

Introduction

1. Influence des changements climatiques du Quaternaire sur l'évolution des espèces eurasiennes

Le Quaternaire (environ 2.5 millions d'années – Présent) a été marqué par des fluctuations climatiques extrêmes, alternant entre périodes glaciaires et périodes interglaciaires. Ces alternances seraient liées à la quantité d'énergie reçue par la Terre au cours des saisons d'après la Théorie de Milankovitch (Milankovitch, 1941) suivant trois paramètres astronomiques : la précession (~23 000 ans), l'obliquité (~41 000 ans) et l'excentricité (~100 000 ans) (Imbrie, 1993).

La dernière glaciation, dont le maximum glaciaire s'est terminé il y a environ 19 000 ans (Yokoyama et al., 2000), a vu l'Europe et l'Amérique du Nord être recouvertes d'une couche de glace de 2 à 3km d'épaisseur, descendant respectivement jusqu'au nord de l'Allemagne, des Pays-Bas et de l'Angleterre ainsi que jusqu'à New York (Berger, 2005). Cette période, caractérisée par des fluctuations spectaculaires de température (pouvant atteindre des variations de 10-12°C en quelques années, Hewitt, 1996), a eu un impact déterminant sur les espèces végétales et animales en affectant d'une part la biodiversité (Walther et al., 2002 ; Qian & Ricklefs, 2008), et d'autre part leur distribution géographique (Taberlet et al., 1998 ; Hewitt, 2004).

L'un des grands enjeux de ces dernières décennies pour les disciplines s'intéressant à l'histoire évolutive des espèces a été de mieux appréhender les mécanismes de mise en place et de maintien de la biodiversité dans un contexte où les contraintes imposées par les variations environnementales induisent des changements rapides. Pour ce faire diverses méthodes existent, notamment la phylogéographie qui permet comme nous allons le voir de retracer les processus de mise en place de la biodiversité des populations au cours du temps.

1.1 La phylogénie moléculaire, un outil « classique » des études biogéographiques

La phylogéographie est le champ d'étude étudiant les processus gouvernant les distributions géographiques de lignées généalogiques, principalement au niveau intra-spécifique (Avice, 1998). Elle se situe au carrefour de nombreuses disciplines micro- et macro-évolutives (génétique moléculaire, génétique des populations, éthologie, démographie, paléontologie, géologie, géographie historique, etc.) (Avice, 2000). Depuis sa naissance en 1987, des progrès fulgurants ont été réalisés tant au niveau des techniques d'analyse moléculaire qu'au niveau du traitement statistique de ces résultats, permettant ainsi la

considération de nouvelles hypothèses visant à comprendre comment les populations ont réagi et se sont adaptées aux bouleversements environnementaux du passé.

La phylogéographie cherchant à caractériser la diversité génétique « intra-spécifique », elle permet de retracer les différents événements évolutifs composant l'histoire d'une lignée (sélection, hybridation, flux géniques etc.) en se basant principalement sur deux marqueurs. Le premier et le plus couramment utilisé afin d'étudier le polymorphisme des populations est l'ADN mitochondrial (ADNmt), molécule circulaire de petite taille (15 à 20 kilobases) présentant de nombreux avantages pour les études phylogéographiques. Premièrement, l'ADNmt est présent en de multiples copies dans les cellules somatiques, facilitant son analyse. De plus le taux d'évolution des gènes mitochondriaux est rapide et particulièrement adapté à l'étude de différenciations s'étant déroulées au cours des derniers 5 à 10 millions d'années (Brown et al., 1979). Finalement, la transmission de l'ADNmt se faisant de façon maternelle, le taux de recombinaison est très faible et permet des reconstructions phylogénétiques fiables de la lignée maternelle (Bagley & Gall, 1998). Malgré ces nombreux avantages, l'ADNmt présente également des inconvénients comme la présence de copies de gènes non-fonctionnelles (Bensasson et al., 2001), ou encore de différents haplotypes mitochondriaux au sein des cellules (Rockas et al., 2003). De plus, des études ont montré que l'ADNmt pouvait être sous sélection (MacRae & Anderson, 1988) alors qu'il est généralement considéré comme un caractère à évolution neutre. Face à ces problèmes, l'utilisation en plus du marqueur mitochondrial de marqueurs nucléaires (ADNn) peut être intégrée aux études phylogéographiques (Steppan et al., 2005). Les microsatellites constituent les seconds marqueurs les plus utilisés pour l'étude de la structuration intra-spécifique des espèces. Le choix du marqueur nucléaire est primordial et doit répondre à différents critères (être sélectivement neutre, polymorphe, déterminer la variation d'un seul locus etc.). Cependant, la considération de l'ADNn en parallèle de l'ADNmt présente aussi des inconvénients comme l'augmentation non négligeable des coûts de manipulation ainsi que la nécessité de développer des marqueurs appropriés en fonction de la problématique.

1.2 La morphologie, un objet d'étude complémentaire

Les caractères phénotypiques comme les dents ou le squelette sont particulièrement utiles lors d'études s'intéressant à l'histoire évolutive des espèces, apportant de nombreuses informations concernant les processus évolutifs affectant les organismes. De plus, il est possible de considérer les processus évolutifs et les facteurs agissant sur les espèces dans leur

dimension temporelle en intégrant du matériel fossile aux études faites dans l'actuel. Outre le phénomène de divergence neutre conduisant au fil du temps à des divergences entre populations et à des différenciations morphologiques, différents facteurs vont participer à la variation phénotypique.

Tout d'abord, des facteurs développementaux interviennent. Au cours des dernières années, différentes études ont montré qu'à partir d'un génotype, de fines modifications des voies développementales pouvaient engendrer différents patrons de forme. Cela a par exemple été montré pour les rides palatines de la souris, qui se mettent en place de façon séquentielle de l'avant vers l'arrière et dont le nombre peut varier selon de petites variations développementales (Pantalacci et al., 2008). Dans le cas des dents de mammifères des mécanismes similaires ont été mis en évidence concernant la taille et le nombre de cuspides qui pouvaient être profondément modifiés par de petites variations intervenant dans les paramètres développementaux déterminant l'espacement inter-cuspides (Jernvall, 2000). A une échelle développementale plus grande, c'est toute la taille de la rangée dentaire qui semble être fortement déterminée par une cascade développementale polarisée de la première molaire vers la dernière (Kavanagh et al., 2007; Renvoisé et al., 2009).

Outre le développement, que ce soit à l'échelle de l'organisme, des populations ou des espèces, l'environnement va jouer un rôle important en conditionnant les pressions de sélections auxquelles ils sont soumis. Ainsi des différences écologiques ou des phénomènes d'isolement géographique (du fait de barrières géographiques, de longues distances, etc.) vont participer à la variation phénotypique.

L'une des problématiques de ma thèse sera ainsi d'essayer de comprendre comment émerge cette variation morphologique intra-spécifique en intégrant à la fois la différenciation génétique, le développement et l'environnement. Pour ce faire, le campagnol roussâtre a été choisi comme modèle d'étude pour les raisons énoncées ci-dessous.

2. Les campagnols comme modèle d'étude

2.1 La diversification des Arvicolinae au cours du Quaternaire

La sous-famille des Arvicolinae (Gray, 1821) incluant les campagnols et les lemmings est apparue il y a environ 5 millions d'années au Pliocène inférieur, dérivant des Cricetidae ancestraux même si leur origine phylogénétique précise reste mal connue (Chaline et al., 1999). Ils se sont diversifiés durant ce laps de temps à travers tout l'hémisphère nord en 37 genres, dont 28 existent encore de nos jours regroupant 126 espèces (McKenna & Bell, 1997; Carleton & Musser, 2005). Cette grande diversité actuelle et fossile (Kowalski, 2001 ; Carleton & Musser, 2005) en font des outils biostratigraphiques précis permettant de dater les sédiments quaternaires.

L'étude de l'histoire évolutive des Arvicolinae repose principalement sur deux piliers : la morphologie des molaires et la phylogénie moléculaire. Les dents correspondent aux restes les mieux conservés dans le registre fossile (l'émail étant le tissu le plus résistant du squelette) et les Arvicolinae présentent une grande diversité de patrons dentaires. De ce fait, les principaux critères diagnostiques entre genres reposent sur des critères comme l'épaisseur de l'émail, le nombre de cuspides (aussi appelés triangles), la présence ou non de racine dentaire etc. Au niveau des espèces les différences sont beaucoup plus ténues, leur temps de divergence étant souvent relativement récent. L'emploi de méthodes d'analyse plus fines comme la morphométrie (présentée dans la partie 3 de cette introduction) est donc nécessaire pour les discriminer précisément (Escudé et al., 2008). Outre la morphologie, l'étude de la diversification des Arvicolinae a aussi été réalisée d'un point de vue moléculaire en se basant sur l'ADN mitochondrial (Conroy & Cook, 1999 ; Jaarola et al., 2004 ; Tougaard et al., 2008).

Sur la base des données morphologiques et génétiques, deux périodes de radiation explosives ont été identifiées. La première se serait déroulée en Amérique du Nord et en Europe. Les estimations concernant la date de divergence sont cohérentes entre les analyses morphologiques (5-6 millions d'années, Chaline et al., 1999) et les analyses moléculaires (5.7 ± 0.6 millions d'années, Conroy & Cook, 1999). La seconde phase de radiation, ayant vu apparaître les campagnols modernes en Eurasie et Amérique du Nord, se serait quant à elle produite il y a 2 millions d'années selon le registre fossile (Chaline & Graf, 1988). Les estimations moléculaires sont elles moins précises, la datant entre 3.5 ± 0.95 et 1.6 millions d'années (Conroy & Cook ; 1999).

Finalement, outre leur utilité en biostratigraphie, l'extension holarctique des Arvicolinae et leur présence dans divers habitats les rendent très utiles dans des études visant à reconstituer les paléoenvironnements durant le Quaternaire (Montuire et al., 1997). En effet, la distribution des campagnols et lemmings est contrôlée par des paramètres environnementaux tels que la température, les précipitations ou la couverture végétale (Kowalski, 1971). En affectant ces paramètres, les fluctuations climatiques du Quaternaire ont engendré des vagues de migration et des alternances entre phases de fragmentation du milieu et phases de ré-expansion (Chaline et al., 1999). De ce fait, considérer la diversité des Arvicolinae dans le registre fossile a permis de mieux caractériser les variations climatiques passées en terme de température, de précipitation ou de couverture végétale comme ça a été le cas dans le karst de Gigny (Chaline et al., 1995).

*2.2 Le campagnol roussâtre *Myodes glareolus* comme modèle de réponse biogéographique aux fluctuations du Quaternaire*

Le campagnol roussâtre appartient au genre *Myodes*, le terme *Clethrionomys* ayant été abandonné pour question d'antériorité dans la révision taxonomique de Wilson & Reeder (2005). Plusieurs aspects font du campagnol roussâtre un bon modèle dans une étude visant à caractériser à la fois l'impact que l'environnement peut avoir sur la biodiversité et les différentes sources de variations affectant la taille et la forme de caractères phénotypiques.

Cette espèce est tout d'abord commune et largement représentée en région paléarctique occidentale. Elle est trouvée majoritairement dans des habitats forestiers et possède un régime alimentaire à dominance végétarienne (feuilles vertes, bourgeons, glands, écorces, baies etc.) mais incluant également des champignons et des insectes (Le Louarn & Quéré, 2003). Le fait qu'il soit inféodé au milieu forestier implique que des variations climatiques comme celles observées durant le Quaternaire vont fortement perturber son aire de répartition (Gerlach & Musolf, 2000), une régression des milieux boisés étant observée en période de glaciation (Petit et al., 2001). Ceci a eu pour conséquence une histoire phylogéographique complexe de cette espèce comme le montre l'identification de plusieurs lignées méditerranéennes et continentales (Deffontaine et al., 2005). Le campagnol roussâtre offre donc un vaste champ d'étude permettant de tester si une différenciation phénotypique a accompagné la différenciation des populations suggérée par les analyses de l'ADNmt (Deffontaine et al., 2005).

Cette espèce présente aussi des avantages « pratiques ». Puisqu'étant commune, sa capture est relativement facile dans le cadre de missions d'échantillonnage. De plus, il est l'hôte du virus Puumala (Hantavirus), qui provoque des milliers de cas de fièvre hémorragique à syndrome rénal chez l'homme (Sauvage et al., 2003). De nombreuses études traitant de son écologie sont ainsi disponibles, nous fournissant un bagage important de données au sujet de son comportement, sa reproduction, sa mobilité, etc. (Escutenaire et al., 2002 ; Sauvage et al., 2003).

Finalement, depuis des décennies la présence de deux morphotypes a été décrite sur la troisième molaire supérieure du campagnol roussâtre, sans trouver d'explication à leur déterminisme (Bauchau & Chaline, 1987). Il s'agit des patrons *simplex* (présentant trois cuspidés linguales) et *complex* (en présentant quatre). Les récents progrès réalisés concernant la compréhension du développement dentaire, dont certaines études réalisées sur le genre *Microtus*, proche de *Myodes* (Jernvall et al., 2000 ; Renvoisé et al., 2009), sont susceptibles de nous éclairer sur l'origine de ces deux patrons de forme. En effet l'étude des voies de développement conduisant à la mise en place de la rangée dentaire, et à plus petite échelle de la dent, a permis de montrer que de petites variations du système pouvaient engendrer l'addition ou la suppression de cuspidés (Jernvall, 2000).

3. Méthode d'étude de la forme : l'outil morphométrique

Si la différenciation entre genres est relativement simple en se basant sur des caractères discrets et biométriques simples, différencier les espèces nécessite des méthodes d'analyse de la morphologie plus pointues visant à quantifier précisément la morphologie (Escudé et al., 2008). Ma thèse s'intéressant à des variations de forme à l'échelle intra-spécifique, l'utilisation de telles méthodes s'est avérée primordiale.

Les méthodes d'analyses morphométriques sont des outils d'analyse de forme puissants permettant de quantifier des différences très fines. Les deux méthodes les plus couramment employées sont la méthode des points repères (Bookstein, 1991) et l'analyse de contour (Kuhl & Giardina, 1982). Dans le cas de formes complexes où les points de repère potentiels sont situés sur le contour, comme la mandibule ou les molaires de campagnol, l'analyse de contour par la transformée de Fourier elliptique (TFE) apparaît comme particulièrement appropriée (Navarro et al., 2004).

Dans le cadre de ma thèse, je resterais dans le cas simple de contours bidimensionnels. Un tel contour est décrit empiriquement par les coordonnées cartésiennes de points

échantillonnés le long du contour. Le rôle de la transformée de Fourier est d'en offrir une approximation par une série de Fourier. Le contour des objets mesurés est défini comme une suite de fonctions trigonométriques de longueur d'onde décroissante, les harmoniques, pondérées par des coefficients de Fourier correspondant à des variables de forme. Il est possible, à condition d'ajouter suffisamment de termes, de décrire de manière exacte la fonction empirique de départ et par conséquent d'en avoir une description mathématique en terme de coefficients de Fourier (comparables de contour en contour). Ces coefficients de Fourier sont ensuite analysés grâce à des outils de statistiques multivariées (par exemple des analyses en composante principale, analyses discriminantes etc.). Ces analyses permettent de tester des différences, d'investiguer des facteurs possibles de différenciation et d'obtenir des représentations graphiques claires exprimant la variabilité morphologique sur quelques axes synthétiques. Ces mêmes axes peuvent ensuite être représentés en fonction de différents paramètres univariés (taille, poids, latitude, longitude etc.).

3. Structure et objectifs de la thèse

Trois chapitres structurent cette thèse.

Le premier chapitre a d'abord pour objectif de déterminer si la structuration intra-spécifique mise en évidence par les études phylogéographiques chez le campagnol roussâtre (Deffontaine et al., 2005) s'est accompagnée d'une différenciation morphologique. Ceci permettrait d'une part d'estimer l'impact des variations climatiques du Quaternaire sur l'évolution des patrons de différenciation phénotypiques, et d'autre part de mieux caractériser les mécanismes de recolonisation du milieu lors des phases de déglaciation.

Afin d'aborder ces problématiques, le choix du caractère a d'abord été considéré, différentes possibilités pouvant être envisagées comme l'étude du crâne, de la mandibule et des molaires. Dans un premier temps j'ai choisi de m'intéresser aux dents car si un signal phylogéographique émerge de leur étude morphologique, une ouverture vers le registre fossile serait alors possible, introduisant la dimension temporelle aux études réalisées sur des spécimens actuels. Cependant, des différences pouvant aussi intervenir entre les dents, j'ai comparé à l'échelle de l'Europe les patrons de variations de trois molaires : les première et troisième molaires supérieures (UM1 et UM3) ainsi que la première molaire inférieure (LM1). La UM1 et la LM1 ont été choisies car elles sont couramment utilisées en paléontologie et biogéographie (Kitahara, 1995; Chaline *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; Martin et al., 2006 ; Tougaard *et al.*, 2008). La UM3 a de plus été considérée car quelques études systématiques et

évolutives l'ont précédemment utilisée (Kaneko, 1992 ; Barnosky, 1993). De plus, comme précédemment énoncé cette dent présente une variation intra-spécifique connue mais non expliquée (Bauchau & Chaline, 1987).

Lors des deux études suivantes, je me suis intéressé au cas particulier de deux populations de campagnol roussâtre situées dans le Pays-Basque (France) et au Mont Gargano (Italie), identifiées sur la base de l'ADN mitochondrial comme deux nouvelles lignées. L'étude de la morphologie permettra d'observer deux cas d'évolution rapide dans des contextes géographiques et historiques particuliers, mettant en évidence deux exemples où une sélection directionnelle associée à des phénomènes d'isolement engendre une importante divergence morphologique.

Finalement une dernière étude terminera ce chapitre en s'intéressant cette fois à une zone carrefour entre les lignées mitochondriales continentales, observée en Fennoscandinavie. L'étude de ces zones de contact du point de vue du phénotype dentaire permettra de nous donner une idée des processus agissant au niveau d'une zone de mélange entre lignées et de voir si une cohérence entre les résultats obtenus avec l'ADNmt et la morphologie émerge.

Le second chapitre a pour objectif de déterminer l'influence que peuvent avoir deux facteurs sur la variation de la morphologie dentaire. Une première étude traite de l'effet de l'usure sur le contour des dents, et par voie de conséquence de l'effet de la structure d'âge des populations qui entraîne selon la période de piégeage des assemblages de degrés d'usure différents. Ceci soulève le problème des méthodes d'échantillonnage des spécimens en conditions naturelles lors d'études biogéographiques. En effet le plus souvent chaque localité est échantillonnée une fois, à une période de l'année qui n'est pas forcément la même entre toutes les localités. Si des différences de structures d'âge comme celles observées chez le campagnol roussâtre (Tkadlec & Zejda, 1998) influencent l'analyse morphologique, alors il faudrait soit reconsidérer les méthodes de piégeage, soit trouver un proxy permettant de nous affranchir de cet effet dans les analyses.

Une seconde étude s'intéresse dans ce second chapitre à l'existence des différents morphotypes observés sur la troisième molaire supérieure et cités plus tôt (*simplex-complex*). En m'appuyant sur de récentes avancées en biologie du développement j'essaierais de fournir une explication à ce patron dont le déterminisme n'a jusque là pas été expliqué.

Finalement, dans un troisième chapitre je reviendrais sur le cas de la mandibule mise de côté au premier abord. L'objectif de cette étude sera dans un premier temps d'essayer de

caractériser les variations morphologiques de la mandibule à l'échelle de l'Europe afin de regarder si une structure cohérente similaire à celle observée sur les molaires émerge des patrons de différenciation. Je testerais aussi l'existence de relations entre des variables telles que la latitude ou la longitude et la taille ou la forme afin de déterminer l'influence de paramètres environnementaux sur la mandibule. En effet, l'étude de la mandibule par rapport à celle des molaires peut nous renseigner sur des processus évolutifs différents puisqu'elle est sujette à un remodelage osseux permanent, modifiant sa morphologie en fonction des pressions de sélections liées à l'environnement et à l'écologie des organismes considérés. A l'aide d'un second jeu de données à l'échelle d'une population de Franche-Comté je m'intéresserais comme pour la UM3 à l'influence de la structure d'âge des populations. Suite au remodelage osseux ayant lieu tout au long de la vie des animaux, une différenciation entre jeunes et vieux individus est à attendre. Finalement, afin de voir si la variation intra-population liée à la structure d'âge se retrouve à une échelle plus grande, j'ai combiné ce jeu de données à celui de l'Europe.

Le phénotype étant le résultat de l'influence combinée de différents facteurs, l'étude des variations morphométriques du campagnol roussâtre s'effectuera par conséquent grâce à une approche prenant en compte à la fois la différenciation génétique, le développement des organismes, le rôle de l'environnement et celui des traits d'histoire de vie. La mise en regard des différents paramètres permettra ainsi de mieux appréhender la dynamique évolutive du campagnol roussâtre.

Références

- Avice, J. C. 1998 The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**, 371–379.
- Avice, J. C. 2000 Phylogeography: the history and formation of species. *Harvard University Press, Cambridge*, 1-464.
- Bagley, M. J. & Gall, G. A. E. 1998 Mitochondrial and nuclear DNA sequence variability among populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology* **7**, 945-961.
- Barnosky, A. D. 1993 Mosaic evolution at the population level in *Microtus pennsylvanicus*. *Morphological change in Quaternary mammals of North America*, 24-58.
- Bauchau, V. & Chaline, J. 1987 Variabilité de la troisième molaire supérieure de *Clethrionomys glareolus* (Arvicolidae, Rodentia) et sa signification évolutive. *Mammalia* **51**, 587-598.
- Bensasson, D., Zhang, D.-X., Hartl, D. L. & Hewitt, G. M. 2001 Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 314-321.
- Berger, A. 2005 Les causes astronomiques des grandes variations du climat au Quaternaire. *Comptes rendus Palevol* **5**, 21-26.
- Bookstein, F. L. 1991 Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. *Cambridge University Press*, 1-435.
- Brown, W. M., George, J. M. & Wilson, A. C. 1979 Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 1967-1971.
- Carleton, M. D. & Musser, G. G. 2005 Superfamily Muroidea. *Baltimore: Johns Hopkins University Press*, 894-1531.
- Chaline, J., Brunet-Lecomte, P., Montuire, S., Viriot, L. & Courant, F. 1999 Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Annales Zoologici Fennici* **36**, 239-267.
- Chaline, J. & Graf, J.-D. 1988 Phylogeny of the Arvicolidae (Rodentia): Biochemical and Paleontological Evidences. *Journal of Mammalogy* **69**, 22-33.
- Chaline, J., Brunet-Lecomte, P. & Campy, M. 1995 The last glacial/interglacial record of rodent remains from the Gigny karst sequence in the French Jura used for palaeoclimatic and palaeoecological reconstructions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, palaeoecology* **117**, 229-252.
- Conroy, C. J. & Cook, J. A. 1999 MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *Journal of Mammalian Evolution* **6**, 221-245.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J. B. & Michaux, J. R. 2005 Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* **14**, 1727-1739.
- Escudé, E., Montuire, S., Desclaux, E., Quéré, J.-P., Renvoisé, E. & Jeannet, M. 2008 Reappraisal of "chronospecies" and the use of *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) for biochronology. *Journal of Archaeological Science* **35**, 1867-1879.
- Escutenaire, S., Chalon, P., De Jaegere, F., Karelle-Bui, L., Mees, G., Brochier, B., Rozenfeld, F. & Pastoret, P.-P. 2002 Behavioral, physiologic and habitat influences on the dynamics of *Puumala virus* infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases* **8**, 930-936.
- Gerlach, G. & Musolf, K. 2000 Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology* **14**, 1066-1074.
- Gray, J. 1821 On the natural arrangement of vertebrate animals. *London medical Repository* **15**, 296-310.
- Hewitt, G. M. 1996 Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt, G. M. 2004 A climate for colonization. *Heredity* **92**, 1-2.
- Imbrie, J., Berger, A., Boyle, E. A., Clemens, S. C., Duffy, A., Howard, W. R., Kukla, G., Kutzbach, J., Martinson, D. G., McIntyre, A., Mix, A. C., Molino, B., Morley, J. J., Peterson, L. C., Pisias, N. G., Prell, W. L., Raymo, M. E., Shackleton, N. J. & Toggweiler, J. R. 1993 On the

- p>structure and origin of major glaciation cycles. 2. The 100 000 years cycles.
- Paleoceanography*
- 8**
- , 699-735.
- Jaarola, M. & Searle, J. B. 2004 A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe. *Heredity* **92**, 228-234.
- Jernvall, J. 2000 Linking development with generation of novelty in mammalian teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 2641-2645.
- Jernvall, J., Keränen, S. V. E. & Thesleff, I. 2000 Evolutionary modification of development in mammalian teeth: Quantifying gene expression patterns and topography. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 14444-14448.
- Kaneko, Y. 1992 Identification and Morphological Characteristics of *Clethrionomys rufocanus*, *Eothenomys shanseius*, *E. inez* and *E. eva* from the USSR, Mongolia, and Northern and Central China. *Journal of Mammalian Society of Japan* **16**, 71-95.
- Kavanagh, K. D., Evans, A. R. & Jernvall, J. 2007 Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* **449**, 427-432.
- Kitahara, E. 1995 Taxonomic status of Anderson's red-backed vole on the Kii peninsula, Japan, based on skull and dental characters. *Journal of Mammalian Society of Japan* **20**, 9-28.
- Kowalski, K. 1971 Variation and speciation in fossil voles. *Symposium of the Zoological Society of London* **26**, 149-161.
- Kowalski, K. 2001 Pleistocene rodents of Europe. *Folia Quaternaria* **72**, 3-389.
- Kuhl, F. P. & Giardina, C. R. 1982 Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* **18**, 259-278.
- Le Louarn, H. & Quéré, J. P. 2003 Les rongeurs de France. *INRA, Paris*, 1-256.
- Luo, J., Yang, D., Suzuki, H., Wang, Y., Chene, W.-J., Campbell, K. L. & Zhang, Y.-P. 2004 Molecular phylogeny and biogeography of oriental voles: genus *Eothenomys* (Muridae, Mammalia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3**, 349-362.
- MacRae, A. F. & Anderson, W. W. 1988 Evidence for non-neutrality of mitochondrial DNA haplotypes in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **120**, 485-494.
- Martin, R. A., Crockett, C. P. & Marcolini, F. 2006 Variation of the schmelzmuster and other enamel characters in molars of the primitive Pliocene vole *Ogmodontomys* from Kansas. *Journal of Mammalogical Evolution* **13**, 223-241.
- McKenna, M. C. & Bell, C. J. 1997 Classification of mammals above species level. *Columbia University Press, New York*.
- Milankovitch, M. M. 1941 Canon of Insolation and the Ice-Age Problem. *Beograd: Koniglich Serbische Akademie. [English translation by the Israel program for Scientific]*.
- Montuire, S., Michaux, J., Legendre, S. & Aguilar, J.-P. 1997 Rodents and climate. 1. A model for estimating past temperatures using arvicolids (Mammalia, Rodentia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, palaeoecology* **128**, 187-206.
- Navarro, N., Zararain, X. & Montuire, S. 2004 Effects of morphometric descriptor change on statistical classification and morphospaces. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**, 243-260.
- Pantalacci, S., Sémon, M., Martin, A., Chevret, P. & Laudet, V. 2009 Heterochronic shifts explain variations in a sequentially developing repeated pattern: palatal ridges of muroid rodents. *Evolution and Development* **11**, 422-433.
- Petit, R. J., Brewer, S., Bordacs, S., Burge, K., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csaikl, U. M., Dam, B. v., Deans, J. D., Espinel, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Glaz, I., Goicoechea, P. G., Jensen, J. S., König, A. O., Lowe, A. J., Madsen, S. F., Matyas, G., Munro, R. C., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., de Vries, S. G. M., Ziegenhagen, B., de Beaulieu, J.-L. & Kremer, A. 2002 Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* **156**, 49-74.
- Qian, H. & Ricklefs, R. E. 2008 Global concordance in diversity patterns of vascular plants and terrestrial vertebrates. *Ecology Letters* **11**, 547-553.
- Renvoisé, E., Evans, A. R., Jebrane, A., Labruere, C., Laffont, R. & Montuire, S. 2009 The evolution of mammal tooth patterns: new insights from a developmental prediction model. *Evolution* **63**, 1327-1340.

- Rokas, A., Ladoukakis, E. & Zouros, E. 2003 Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 411-417.
- Sauvage, F., Langlais, M., Yoccoz, N. G. & Pontier, D. 2003 Modelling hantavirus in fluctuating populations of bank voles: the role of indirect transmission on virus persistence. *Journal of Animal Ecology* **72**, 1-13.
- Steppan, S. J., Adkins, R. M., Spinks, P. Q. & Hale, C. 2005 Multigene phylogeny of the Old World mice, Murinae, reveals distinct geographic lineages and the declining utility of mitochondrial genes compared to nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 370-388.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G. & Cosson, J.-F. 1998 Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Tkadle, E. & Zejda, J. 1998 Small rodent population fluctuations: The effects of age structure and seasonality. *Evolutionary Ecology* **12**, 191-210.
- Tougaard, C., Brunet-Lecomte, P., Fabre, M. & Montuire, S. 2008 Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**, 309-323.
- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J.-M., Hoegh-Guldberg, O. & Bairlein, F. 2002 Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389-395.
- Wilson, D. E. & Reeder, D. M. 2005 Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference. *The John Hopkins University Press. Baltimore, Maryland* **1-2**, 1-2142.
- Yokoyama, Y., Lambeck, K., De Deckler, P., Johnston, P. & Fifield, L. K. 2000 Timing of the Last Glacial Maximum from observed sea-level minima. *Nature* **406**, 713-716.

Chapitre 1

Apport de la morphométrie à l'étude de l'histoire évolutive du campagnol roussâtre

1.1 A l'échelle de l'Europe

Publication 1

Histoire évolutive du campagnol roussâtre: une perspective morphométrique

Ronan Ledevin, Johan R. Michaux, Valérie Deffontaine,
Heikki Henttonen et Sabrina Renaud

Biological Journal of the Linnean Society
Vol. **100**, 681-694 (2010)

Avant-propos

Cette première étude a été possible grâce à une étroite collaboration avec Valérie Deffontaine Deurbroeck, qui a réalisé une thèse de doctorat sur la phylogéographie du campagnol roussâtre, et Johan R. Michaux, chercheur qualifié de l'Université de Liège en accueil au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP). Ce dernier, en plus de l'encadrement de la thèse de Valérie a largement contribué à cette étude en apportant des idées et interprétations permettant de replacer mes résultats morphométriques dans un contexte plus global. Les données obtenues par l'étude de l'ADN mitochondrial permettant l'attribution des spécimens étudiés en morphométrie aux différentes lignées proviennent de la thèse de doctorat de Valérie Deffontaine Deurbroeck. Finalement, les spécimens provenant de Finlande nous ont été prêtés par Heikki Henttonen, Professeur au « Finnish Forest research Institute (Metla) ».

Dans cette étude la comparaison de plusieurs caractères morphologiques (première et troisième molaires supérieures, première molaire inférieure) a été réalisée.

L'influence de paramètres comme le dimorphisme sexuel ou la latitude a pu être testée. Outre l'influence possible de ces paramètres, la structuration biogéographique du campagnol roussâtre a ensuite été investiguée du point de vue de la différenciation phénotypique, permettant dans cette première approche de mieux comprendre les grands patrons de différenciation émergeant à l'échelle de l'Europe. Finalement, une lignée particulière issue de l'introggression de l'espèce *M. rutilus* au sein de populations de *M. glareolus* a pu être caractérisée du point de vue du phénotype, ouvrant de nouvelles portes quant à l'étude des processus d'hybridation inter-spécifique.

Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective

RONAN LEDEVIN^{1*}, JOHAN R. MICHAUX^{2,3}, VALÉRIE DEFFONTAINE^{4,5}, HEIKKI HENTTONEN⁶ and SABRINA RENAUD¹

¹Paléoenvironnements et Paléobiosphère, UMR 5125, CNRS, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France

²Université de Liège, B22, Boulevard du Rectorat, 4000 Liège, Belgium

³Centre de Biologie et de Gestion des Populations, UMR 1062, Campus international Agropolis de Baillarguet, 34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France

⁴Zoogeography Research Unit, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

⁵Present address: Unit of Animal Genomics; GIGA-R; University of Liège; 4000 Liège, Belgium

⁶Finnish Forest Research Institute, Vantaa Research Unit, PO Box 18, FI-01301 Vantaa, Finland

Received 22 November 2009; revised 20 January 2010; accepted for publication 20 January 2010

The bank vole experienced a complex history during the Quaternary. Repeated isolation in glacial refugia led to the differentiation of several lineages in less than 300 000 years. We investigated if such a recent differentiation led to a significant divergence of phenotypic characters between European lineages, which might provide insight into processes of intraspecific differentiation. The size and shape of the first and third upper molars, and first lower molar, of bank voles genetically attributed to different lineages were quantified using an outline analysis of their occlusal surface. The three teeth present similar trends of decreasing size towards high latitudes. This trend, the inverse of Bergmann's rule, is interpreted as the result of a balance between metabolic efficiency and food availability, favouring small body size in cold regions. Molar shape appeared to differ between lineages despite genetic evidence of suture zones. A mosaic pattern of evolution between the different teeth was evidenced. The analysis of such phenotypic features appears as a valuable complement to genetic analyses, providing a complementary insight into evolutionary processes, such as selective pressures, that have driven the differentiation of the lineages. It may further allow the integration of the paleontological dimension of the bank vole phylogeographic history. © 2010 The Linnean Society of London, *Biological Journal of the Linnean Society*, 2010, **100**, 681–694.

ADDITIONAL KEYWORDS: biogeography – *Clethrionomys* – Fourier analysis – molars – shape – size.

INTRODUCTION

Most of the species from the Northern Palaearctic and Nearctic regions have a complex genetic structure shaped by repeated isolations of populations during the Quaternary (e.g. Hadly *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 2002). The accumulation of genetic divergence through time between populations led to the differentiation of lineages within species (Hewitt, 2000) if the isolation was prolonged, and/or if the contraction

and expansion of populations were repeated in the same regions through successive climatic stages (Carstens & Knowles, 2007). Evidence of lineage differentiation during the Quaternary period was found in a wide range of species from large mammals like the brown bear (Sommer & Benecke, 2005) to small mammals like the field vole (Jaarola & Searle, 2004), mostly using molecular analyses based on the variations in mitochondrial DNA (mtDNA) (e.g. Avise, 2000). Expectations regarding the phenotypic differentiation among these phylogeographic lineages are balanced. Significant phenotypic differences between genetic lineages were found in a wide range of taxa

*Corresponding author.
E-mail: ronan.ledevin@pepsmail.univ-lyon1.fr

from mammals to insects (Good *et al.*, 2003; Garnier *et al.*, 2005). In contrast, many species present a morphological homogeneity contrasting with a pronounced intraspecific genetic divergence (e.g. Austin *et al.*, 2002; Jockusch & Wake, 2002). Such discrepant patterns of genetic and phenotypic differentiation might result from differences in selection regimes. Genetic markers are often considered as neutral regarding the differentiation of phylogeographic lineages. In contrast, adaptation to similar environments can lead to phenotypic convergence or promote stabilizing selection despite genetic divergence (Rychlik, Ramalhinho & Polly, 2006), and inversely, competition for resources or habitat shift may lead to a significant phenotypic differentiation despite reduced genetic differences (Caumul & Polly, 2005; Renaud, Chevret & Michaux, 2007).

The present paper investigates if phenotypic characters combined with genetic analyses might allow us to decipher the evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus* (Schreber, 1780), formerly known as *Clethrionomys glareolus* (Wilson & Reeder, 2005). This arvicoline rodent is associated with forest habitats and suffered repeated isolation and expansion phases during the Quaternary. This shaped a complex intraspecific genetic structure (Kotlík *et al.*, 2006; Deffontaine *et al.*, 2005, 2009). The first question to be addressed is whether or not phenotypic characters have diverged according to this genetic structure. If such morphological differentiation is evidenced, then questions about the processes of phenotypic differentiation may be addressed: did the morphological divergence between lineages occur as a result of the accumulation of genetic differences, or did selective processes contribute to the observed pattern of morphological differentiation?

To answer these questions the size and shape of the first upper molar (UM1), the third upper molar (UM3), and the first lower molar (LM1) were selected as relevant characters to be considered. These teeth were chosen because UM1 and LM1 are the most widely used teeth in paleontological and biogeographic studies (Kitahara, 1995; Chaline *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; Martin, Crockett & Marcolini, 2006; Tougard *et al.*, 2008). We added UM3 because a few studies have used it for systematic purposes (Kaneko, 1992) and evolutionary studies (Barnosky, 1993), and because this tooth displays a large intraspecific variation (Bauchau & Chaline, 1987; Guérécheau *et al.*, 2010).

The patterns of morphological differentiation in the bank vole molars were investigated based on specimens from Europe and Russia, covering most of the documented lineages. The shape of the teeth was quantified by Fourier analyses of their occlusal surface outline. The emerging pattern of morphologi-

cal differentiation was compared with the phylogeographic structure based on previous mtDNA analyses (Deffontaine *et al.*, 2005).

MATERIAL AND METHODS

MATERIAL

Molecular analyses

Among the published sequences in GenBank, we selected specimens matching our own sampling to provide a phylogenetic reconstruction to be compared with the morphological data set. A total of 75 mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*) haplotype sequences previously published were downloaded from the GenBank database, and were used for the genetic analyses (accession numbers: AJ867979, AF367074, AF367079, AF367080, AF367081, AF367082, AF367083, AF367084, AF429781, AF429782, AF429783, AF429784, AF429785, AF429786, AF429787, AF429788, AF429789, AF429790, AJ639661, AJ639708, AY062900, AY062901, AY062902, AY062903, AY062904, AY062905, AY062906, AY062907, AY185786, AY185800, VYD021, VYD023, VYD024, VYD029, VYD033, VYD034, VYD041, VYD042, VYD043, VYD051, VYD052, VYD053, VYD055, VYD057, VYD058, VYD076, VYD077, VYD092, VYD123, VYD124, VYD125, VYD128, VYD145, VYD146).

These haplotypes correspond to 154 *M. glareolus* specimens (one sequence corresponding to one or more specimens) from different European and Russian regions (Fig. 1): Spain (Navarre, Granollers), France (Py Mantet, Montpellier, Bourdeilles, St-Aignan), Belgium (Dalhem, Liège), Italy (Pietraporzio, Trentino, Chiuse della Verna, Lucreti Mountains), Germany (Konstanz, Gera, Parchim), Sweden (Batskarsnas), Austria (Titole, Ost Tirol, Karnten, Salzburg), Hungary (Zala, Nagycsany), Romania (Timisoara, Moneasa, Targu Mures, Zarnesti, Bacau, Maramures), Lithuania (Alytus, Zemaitijos National Park), Poland (Pulawy, Bialowieza), Russia (Novgorod, Samara, Omsk, Novosibirsk), and Finland (Pallasjärvi). These specimens are distributed into five *M. glareolus* lineages (Ural, Western and Eastern European, Spanish, and Italian). Two northern red-backed voles (*Myodes rutilus* Pallas, 1779) and two grey red-backed voles (*Myodes rufocanus* Sundevall, 1846), available in the GenBank database (respectively, AB072223 and AB072224, and AF429815 and AF429816), were used as out-groups in the phylogenetic reconstruction.

Morphometric analyses

A total of 145 bank voles (*M. glareolus*) were sampled in 15 localities in Europe and Russia (Fig. 1; Table 1).

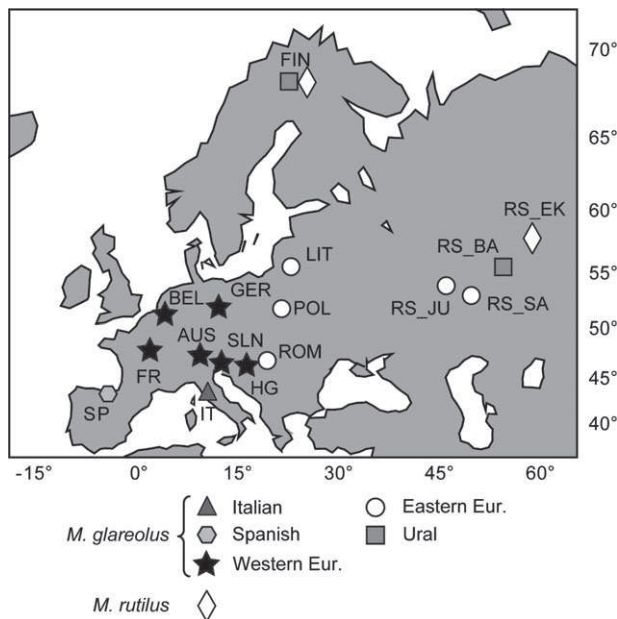


Figure 1. Geographic distribution of the bank vole (*Myodes glareolus*) samples and genetic lineages. This study includes five bank vole mitochondrial lineages: the Spanish, Italian, Western European, Eastern European, and Ural groups. The symbols correspond to species and lineages within *M. glareolus*.

A total of 79 specimens were genetically attributed to a lineage, documenting five of the known mtDNA phylogroups (Fig. 2): the Spanish, Italian, Western European, Eastern European, and Ural lineages. Localities where mtDNA analyses evidenced the co-occurrence of several lineages were discarded from our sampling to avoid mixing lineages that might blur any morphometric differentiation between them. In localities without evidences of mixing, all available specimens were considered, including those that were not genetically identified. For each animal three morphological characters were considered, when intact: UM1, UM3, and LM1. For comparison purposes, 31 specimens of the related red vole (*M. rutilus* Pallas, 1779) were included in the study.

PHYLOGENETIC RECONSTRUCTIONS

We used MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall, 1998) to determine the most suitable model of DNA substitution for the *cyt b* data set studied. Phylogenetic reconstructions were performed using the maximum likelihood criterion (ML; Felsenstein, 1981) implemented in PHYML (Guindon & Gascuel, 2003). Phylogenetic trees were rooted with *cyt b* sequences from two northern red-backed voles (*M. rutilus*) and two grey red-backed voles (*M. rufocanus*). The robustness of the tree was assessed by bootstrap support (BP) (1000 random pseudoreplicates).

Table 1. Sampling localities with their label and country of origin. The lineage of most specimens was genetically identified, and the number of first upper (UM1), third upper (UM3), and first lower (LM1) molars measured is indicated

Species	Country	Locality	Label	Lineage	Number of measured features		
					UM1	UM3	LM1
<i>Myodes glareolus</i>	Austria	Pfunds, Ventetal, Zemmatal	AUS	W	11	16	13
	Belgium	Blégne, Dahlem, Liège, Virelles	BEL	W	23	24	22
	Finland	Pallasjärvi	FIN	UR	11	12	12
	France	Loiret	FR	W	2	2	2
	Germany	Langenberg	GER	W	3	3	3
	Hungary	Bak	HG	W	4	4	3
	Italy	Tuscany	IT	IT	10	10	10
	Lithuania	Alytus	LIT	E	4	4	4
	Poland	Lublin	POL	E	3	9	5
	Romania	Sovata	ROM	E	9	9	9
	Russia	Bashkiria	RS_BA	UR	25	25	23
	Russia	Zhiguli	RS_JU	E	4	4	4
	Russia	Ozerki	RS_SA	E	7	8	7
	Slovenia	Delnice, Livek	SLN	W	3	3	2
	Spain	Asturias	SP	SP	12	12	12
<i>Myodes rutilus</i>	Finland	Pallasjärvi	RUT_FIN	–	24	27	24
	Russia	Shigaevo	RUT_EK	–	4	4	4
			Total		159	176	173

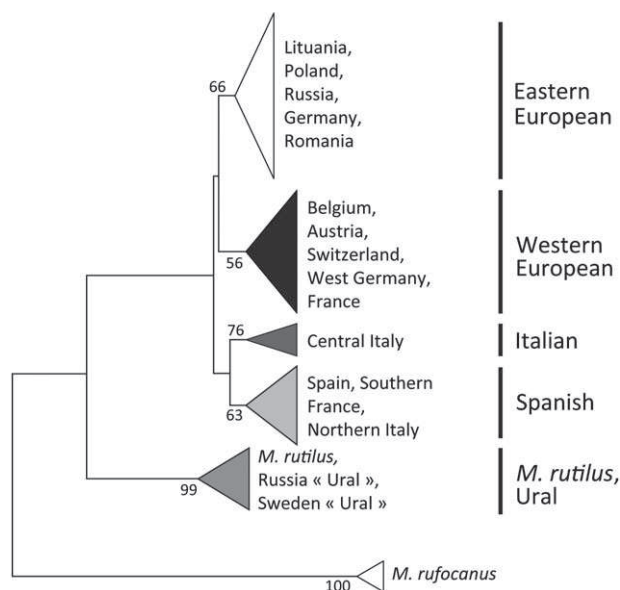


Figure 2. Simplified maximum-likelihood tree summarizing the genetic relationships among the *Myodes glareolus* studied, and based on 154 specimens coming from different European and Russian regions.

Mean sequence divergences among the four main *M. glareolus* (Western, Eastern, Spanish, and Italian) genetic lineages were calculated in MEGA v.4 (Tamura *et al.*, 2007), using the corrected K2P distance matrix (Kimura, 1981), as proposed by MODELTEST 3.0. The Ural group was not considered in this analysis as it displays *M. rutilus* mtDNA.

SHAPE ANALYSIS

Landmark-based morphometrics (Bookstein, 1991) and outline analysis (Renaud *et al.*, 1996) are among the most widely used methods to quantify morphological divergence. For molars with complex shapes, such as those of bank voles (Fig. 3), the elliptic Fourier transform (EFT) appears to be the most appropriate method to describe them (Navarro, Zatarain & Montuire, 2004). The occlusal surface of the molars was considered with the labial side to the right, for upper as well as lower molars. The starting point was defined as the minimum of curvature between the first and second anterior labial triangles (Fig. 3). When a molar was damaged or missing, a mirror image of the opposite tooth was measured.

For each molar, 64 points at equally spaced intervals along the outline were sampled and analysed by an EFT using EFAwin software (Ferson, Rohlf & Koehn, 1985). This method is based on the separate Fourier decomposition of the incremental changes of the x and y coordinates as a function of the cumulative length along the outline (Kuhl & Giardina, 1982).

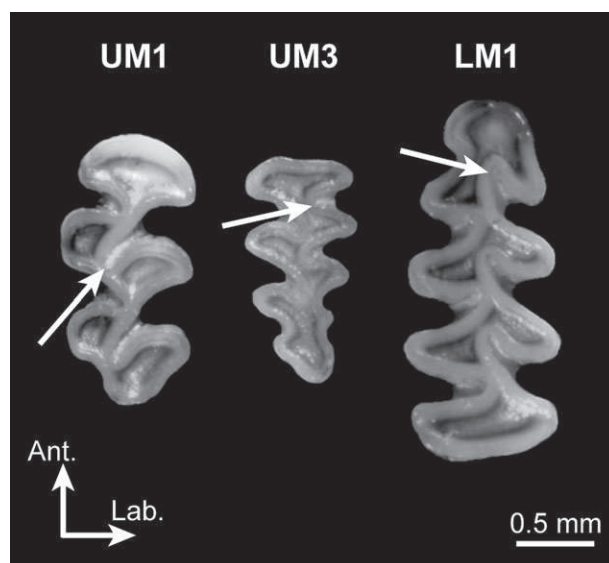


Figure 3. Occlusal surface of the first upper molar (UM1), third upper molar (UM3), and first lower molar (LM1) of the bank vole (*Myodes glareolus*), represented with the labial side to the right. The starting point of the outline of each tooth is indicated by an arrow.

Using this method the outline is approximated by a sum of trigonometric functions of decreasing wavelength: the harmonics. Each harmonic is weighted by four Fourier coefficients defining an ellipse: A_n , B_n , C_n and D_n . The first harmonic ellipse corresponds to the best-fitting ellipse to the outline, and its area can be considered as a reliable size estimator. It was used to standardize the Fourier coefficients for size differences. The major axis of the first harmonic ellipse was taken as new x -axis to adjust the orientation of the outline (Rohlf, 1990). As coefficients A_1 , B_1 and C_1 correspond to residuals after standardization (Crampton, 1995), they were not included in the subsequent statistical analysis. The coefficient D_1 still retains information about the elongation of the outline (Michaux, Chevret & Renaud, 2007). Hence, it was included in the statistical analyses.

Using a Fourier analysis, the higher the rank of the threshold harmonic, the more detailed is the description of the outline. The number of harmonics selected for the analysis should take into consideration the level of measurement error occurring during the data acquisition and the information content of each harmonic. The shapes of the UM1 (Fig. 4A), UM3 (Fig. 4B), and LM1 (Fig. 4C) of one specimen were measured ten times, and the measurement error was calculated for each harmonic. The content of information of each harmonic (Fig. 4) provides an estimation of the amount of shape information described by that harmonic (Crampton, 1995), calculated as follows: the

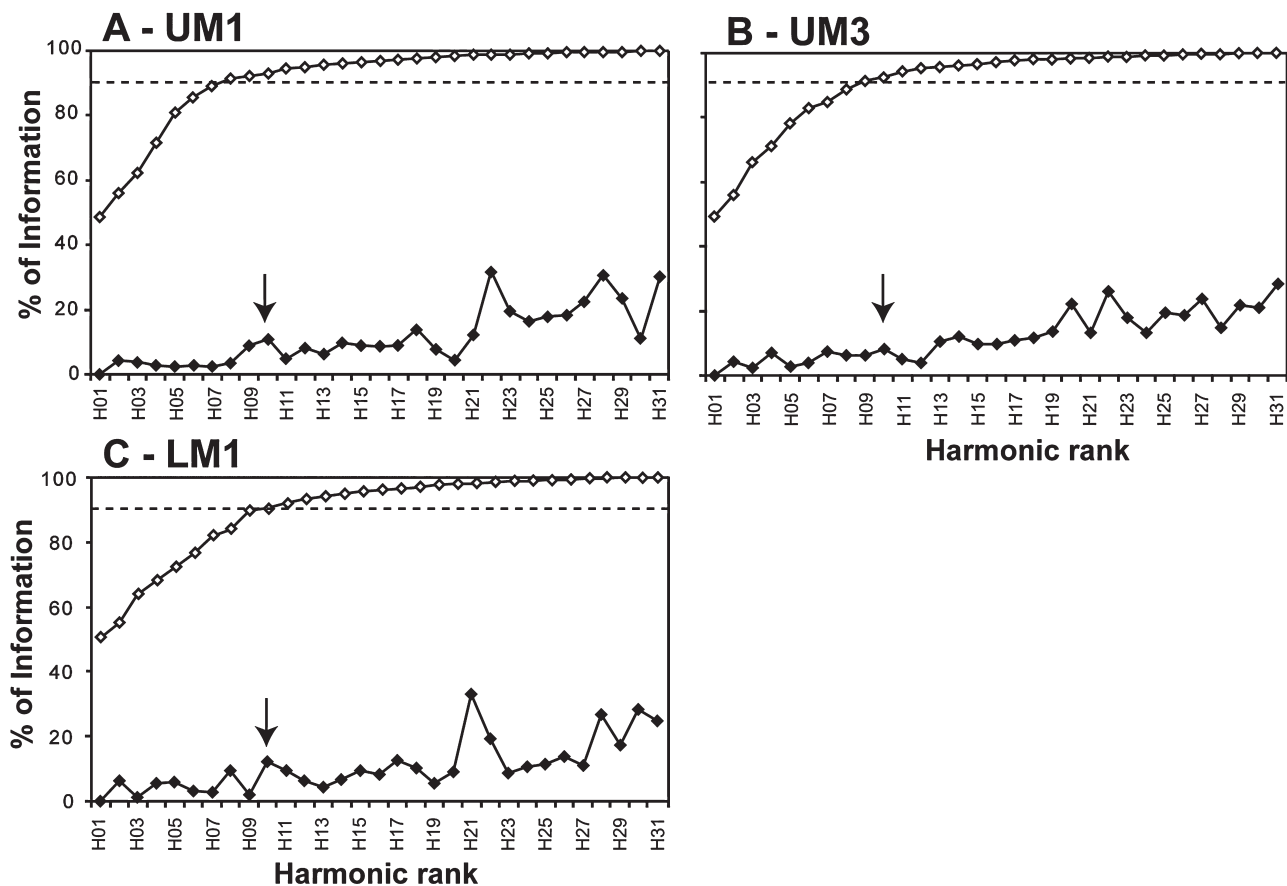


Figure 4. Measurement error (black diamonds) and information content (white diamonds) as a function of the harmonic rank for (A) the first upper molar (UM1), (B) the third upper molar (UM3), and (C) the first lower molar (LM1). The measurement error corresponds to the coefficient of variation of the harmonic amplitude for one specimen measured ten times. The percentage of information corresponds to the contribution of each harmonic (amplitude %) to the total of information (i.e. the sum of all harmonic amplitudes = 100%). For the three molars, considering the first ten harmonics provides more than 90% of the information content (dotted lines), and a measurement error of less than 15%, which was thus chosen as the common threshold.

amplitude of each harmonic n [$=\sqrt{(A_n^2 + B_n^2 + C_n^2 + D_n^2)}$] is cumulated over the total range of harmonics, and the information brought by each harmonic is then estimated as the percentage of this sum represented by the amplitude of rank n . For the three teeth used here, more than 90% of the information content is reached by considering the first ten harmonics, in agreement with previous studies on arvicoline molars (Marcolini, 2006), showing that considering this set of harmonics offers a good compromise between measurement error (less than 15%), the number of variables, and information content. Therefore, a data set of 37 variables (40 Fourier coefficients minus A_1 , B_1 , and C_1) was retained for subsequent analyses.

A visualization of shape changes can be provided by the reconstruction of outlines using the inverse Fourier method (Rohlf & Archie, 1984).

STATISTICAL ANALYSIS

The size of the three molars, estimated by the square root of the 2D outline area, was investigated using univariate statistics. Unfortunately the body size was not available for comparison. Inter- and intraspecific differences in size as well as the occurrence of sexual dimorphism were tested by analyses of variance (ANOVA) completed by Student's t -tests for pairwise differences.

Multivariate analyses were used to investigate the shape of the molars, estimated by the set of 37 Fourier coefficients. Multivariate analyses of variance (MANOVA) were performed on these variables to minimize the influence of intragroup variation, and to evidence the patterns of among-group differentiation on a few synthetic canonical shape axes. Pairwise comparisons between lineages were also performed

using a Hottelling T^2 test (test considered: Wilks' Lambda). Finally, multivariate regressions were performed between size and shape to test for an allometric effect.

Statistics were performed using Systat v.11 and NTsys-pc 2.1 (Rohlf, 2000).

RESULTS

PHYLOGENETIC ANALYSES

The ML tree is presented Figure 2. The ML analyses were performed using the K2P model estimated using MODELTEST 3.0, with the proportion of invariable sites set to 0.52 and with a gamma distribution shape parameter of 0.69. As previously observed (Deffontaine *et al.*, 2005), the studied *M. glareolus* sequences are divided into five main lineages. The Eastern and Western European groups (bootstrap/BP values: 66 and 56%, respectively) associate animals from: (1) Russia, Germany, Romania, Lithuania, and Poland; and (2) Belgium, Austria, Switzerland, Germany, and France, respectively. Two other groups correspond to the Mediterranean peninsular lineages (Spanish and Italian, BP values: 63 and 76%, respectively). Finally, some bank vole sequences from Russia and Sweden are closer to red-backed vole sequences than to other *M. glareolus* sequences forming the previously described bank vole 'Ural group' (Deffontaine *et al.*, 2005). The Western and Eastern European lineages seem to be more closely related as compared with the two Mediterranean peninsular populations, which are associated together. However, these relationships do not have strong support (BP < 50) and should be taken with caution, as the four lineages are genetically so close that it is difficult to precisely define their relationships. The levels of genetic divergence among the four European lineages summarized in Table 2 evidence such difficulties, as these results suggest the Western European group is more closely related to the Mediterranean peninsular populations (1.01% K2P distance) than to the Eastern lineage (1.34%). A similar result was already observed in Deffontaine *et al.* (2005) on the basis of a more complete data set.

Table 2. Mean sequence divergence among genetic lineages calculated in MEGA v.4 (Tamura *et al.*, 2007), using the corrected K2P distance matrix. The Ural group was not considered in this analysis as it displays red vole mitochondrial DNA

	#WESTERN	#ITALIAN	#SPANISH
#ITALIAN	0.0101		
#SPANISH	0.0105	0.0073	
#EASTERN	0.0134	0.0155	0.0165

In contrast, the low levels of genetic divergence (0.73%) between the Italian and Spanish groups tend to confirm a close relationship between them.

SEXUAL DIMORPHISM IN MOLAR SIZE AND SHAPE

Molar size and shape differences between males and females were tested in 25 specimens trapped in the same Russian locality of Bashkiria (Table 1). No sexual dimorphism was evident on UM1 (ANOVA: $P = 0.462$), UM3 ($P = 0.280$), or LM1 size ($P = 0.060$). No evidence of sexual dimorphism in molar shape was found (MANOVA: $P_{UM1} = 0.654$, $P_{UM3} = 0.748$, and $P_{LM1} = 0.606$). Therefore, males and females were pooled together in the subsequent analyses.

INTERSPECIFIC MORPHOLOGICAL DIFFERENCES

Significant size differences between *M. glareolus* and *M. rutilus* were found for the three molars ($P < 0.001$), with the molars of *M. rutilus* being smaller than those of *M. glareolus* (Fig. 5). The two species further differ in shape ($P < 0.001$). The level of interspecific difference was compared with variation among *M. glareolus* specimens by performing an analysis including the *M. rutilus* sample and the five *M. glareolus* lineages as groups. In all cases, the two species differ along the first axis (Fig. 6). The molars of *M. rutilus* were characterized by a larger anterior part of UM1, a more developed posterior lingual triangle on UM3, and a shorter anterior part and less marked triangles on LM1.

The intraspecific differences within *M. glareolus* emerge along the second canonical axis, which represents from half to a third of the variation expressed by the first axes (Fig. 6). The molar shape of the Ural lineage is clearly associated with other *M. glareolus* lineages, and is particularly close to the Eastern European lineage.

To investigate the intraspecific differences that emerged from this analysis in more detail, further analyses were performed on bank vole samples alone.

INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF *M. GLAREOLUS*

Size differences among lineages

Differences in molar size among lineages were investigated (Table 3). Size is significantly different between lineages in most of the cases ($P < 0.01$). The Eastern European and Ural lineages are the least differentiated, only showing a weak size difference in UM3 and LM1 ($P = 0.012$ and $P = 0.020$, respectively). By contrast, the Western European and Spanish groups show a high differentiation in UM3 size ($P = 0.003$), but not in UM1 ($P = 0.164$) and LM1 ($P = 0.474$). These differences among lineages corre-

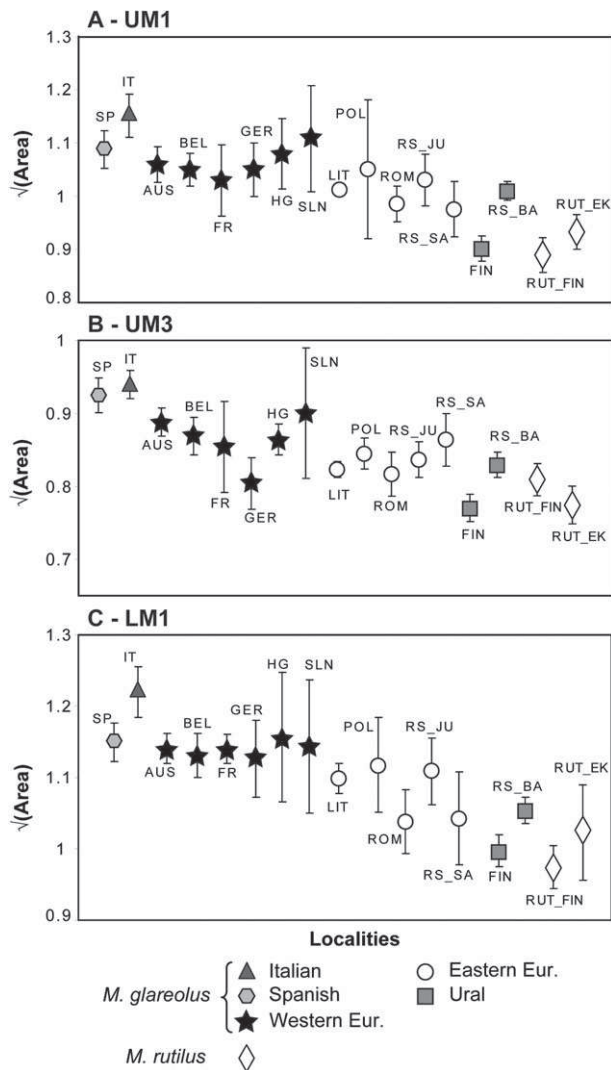


Figure 5. Geographical differences in the size of the occlusal surface of (A) the first upper molar (UM1), (B) the third upper molar (UM3), and (C) the first lower molar (LM1). The square-root of the two-dimensional outline area is used as the size estimator. Each dot corresponds to the mean of a geographical group $\pm$ the confidence interval. The symbols correspond to species and to lineages within *Myodes glareolus*.

spond to an overall decrease in molar size from Mediterranean peninsulas (Spanish or Italian groups) to northernmost localities, where a convergence between the Ural lineage and *M. rutilus* was observed (ANOVA, UM1, $P = 0.750$; UM3, $P = 0.760$; LM1, $P = 0.236$; Fig. 5). This is confirmed by a significant and negative relationship between molar size and latitude ($P < 0.001$).

Patterns of shape differentiation

Since interlineage differences are tenuous compared with intragroup variability, a canonical analysis was

Table 3. Two-by-two tests (Student's *t*-tests) of size differences between lineages for the first upper (UM1), third upper (UM3), and first lower (LM1) molars

	UM1	UM3	LM1
E_W	0.001***	0.004**	< 0.001***
E_IT	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
E_SP	< 0.001***	< 0.001***	0.001***
E_UR	0.146	0.012*	0.020*
W_IT	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
W_SP	0.164	0.003**	0.474
W_UR	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
IT_SP	0.030*	0.373	0.005**
IT_UR	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
SP_UR	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***

Probabilities are given with significance thresholds (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). E, Eastern European group; W, Western European group; IT, Italian group; SP, Spanish group; UR, Ural group.

performed on the Fourier coefficients of each molar to focus on differences among lineages that were significant in the three molars ($P < 0.001$). The patterns of differentiation were visualized on the first three canonical axes (Fig. 7). Even if the grouping variable corresponds to the lineages, the average value per locality has been represented. Clear patterns of shape differentiation emerge on the three teeth, supported by two-by-two comparisons between lineages (Table 4).

The analysis of UM1 evidenced a segregation of the Spanish and Italian lineages from the other groups (Fig. 7A) along the first and second shape axes, respectively (CA1 = 45.6% and CA2 = 22.4% of the among-group variance). The Italian lineage is close to the Eastern European group along CA1, but is clearly differentiated along CA2. The Spanish lineage differentiates in the CA1–CA2 plane, with the shape tending to be more similar to the Western European group than to the others, but still with a significant divergence ($P = 0.008$; Table 3). The Eastern European and Western European groups weakly differentiate along the first and third shape axes (CA3 = 19.2%) with a low level of divergence ($P = 0.012$). The Ural group, being close to the Eastern European lineage in morphospace, still differentiates along CA1 from the other lineages, and is significantly different from the other groups. Finally, despite its extreme average position along CA2, the Italian lineage is only weakly differentiated from the other groups ($P < 0.05$ or non significant), possibly because of its limited sample size. The differences observed on the reconstructed outlines are tenuous. The main regions of variation are the re-entrant

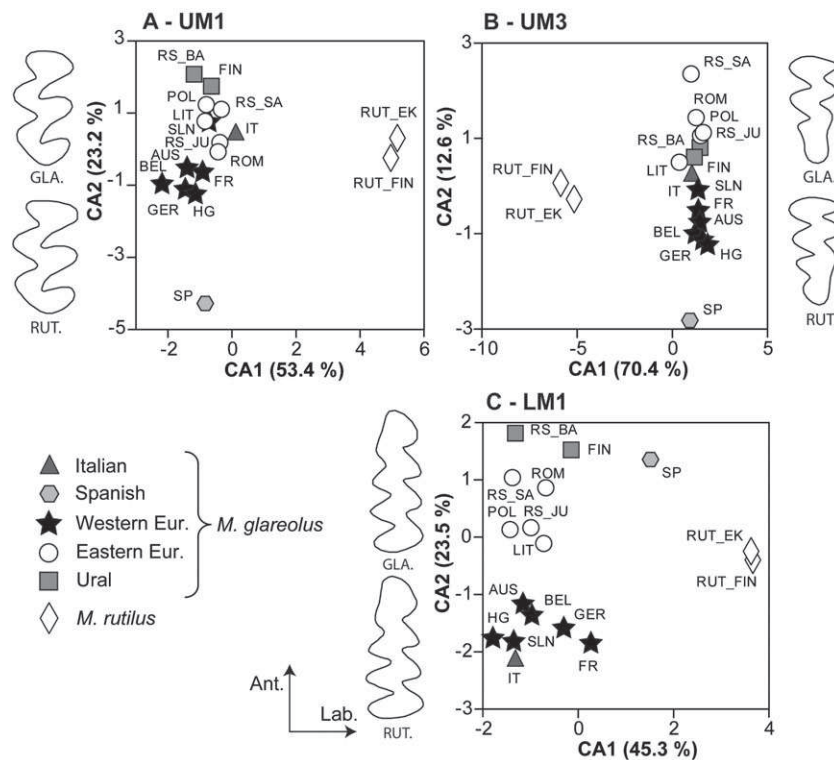


Figure 6. Shape differences between *Myodes rutilus* and *Myodes glareolus*. The variations are displayed on the first two axes of a canonical analysis on the Fourier coefficients of the molar outline. The grouping variable used for the analysis includes six groups: the five lineages of *Myodes glareolus* and the sample of *Myodes rutilus*. To have a better representation of the intraspecific variability, each dot corresponds to the mean by localities. Reconstructed outlines visualize the difference between the two species.

Table 4. Two-by-two tests of shape differences between lineages for the first upper (UM1), third upper (UM3), and first lower (LM1) molars

	UM1		UM3		LM1	
	FCs	Res.	FCs	Res.	FCs	Res.
E_W	0.012*	0.027*	< 0.001***	< 0.001***	0.024*	0.503
E_IT	0.447	0.215	0.205	0.121	0.091	0.231
E_SP	0.005**	0.0002***	0.066	0.028*	0.151	0.060
E_UR	0.006**	0.076	0.033*	0.111	0.098	0.247
W_IT	0.027*	0.040*	0.146	0.007**	0.036*	0.027*
W_SP	0.008**	0.004**	0.007**	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
W_UR	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***	0.018*
IT_SP	0.471	0.361	0.527	0.337	0.434	0.602
IT_UR	0.030*	0.072	0.017*	0.216	0.030*	0.430
SP_UR	< 0.001***	0.003**	0.003**	0.034*	0.029*	0.009**

Shape was estimated by the set of Fourier coefficients (FCs), and differences were tested using a Hottelling T^2 test. To test the occurrence of an allometric effect on the shape of the molars, a multivariate regression was performed. The two-by-two tests were performed on the residuals (Res) and compared with the previous results. Probabilities are given with significance thresholds (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). E, Eastern European group; W, Western European group; IT, Italian group; SP, Spanish group; UR, Ural group.

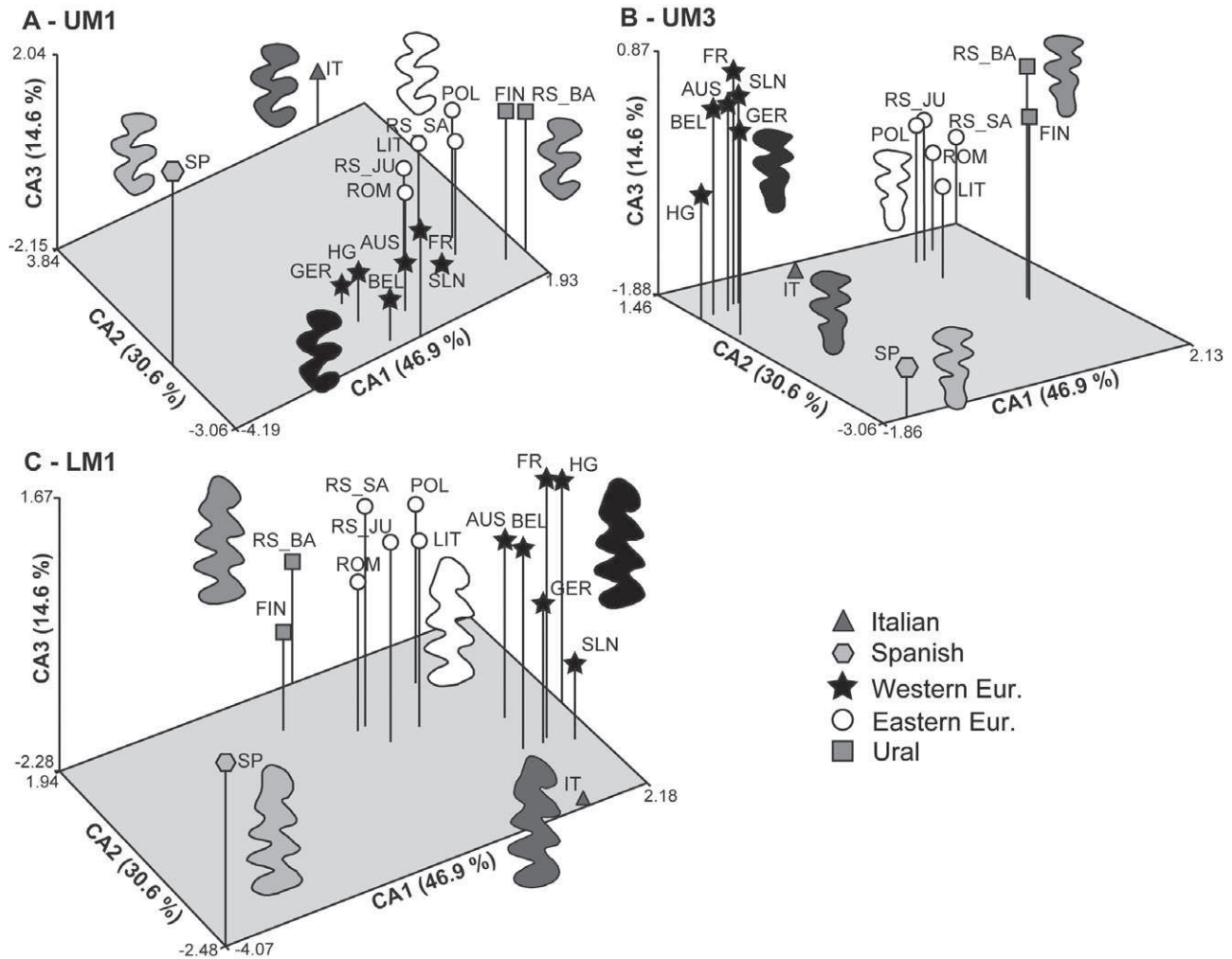


Figure 7. Shape variations of (A) the first upper molar (UM1), (B) the third upper molar (UM3), and (C) the first lower molar (LM1) within *Myodes glareolus*, displayed on the first three axes of a canonical analysis of the Fourier coefficients, the grouping variable being the five lineages of *Myodes glareolus*. Each symbol corresponds to the mean of a geographical group. Reconstructed outlines visualize the mean shape of each lineage.

angles between each triangle, the size of the triangles and the posterior part of the molar, which is more or less rounded (Fig. 7A).

Compared with the results obtained from UM1, similar patterns are observed in UM3 (Fig. 7B), but the probabilities are in general less significant (Table 4). The Mediterranean lineages also show the most pronounced differentiation, but this time the Spanish group segregates along the second shape axis (CA2 = 30.6%), with a clear differentiation from the Western European ($P = 0.007$) and Ural lineages ($P = 0.003$), corresponding to a broader posterior part of the Spanish UM3. The first axis (CA1 = 46.9%) mainly represents the differentiation between the Western and the Eastern European lineages (Table 4; $P < 0.001$), which present a lengthened posterior part.

The Italian lineage has an intermediate position between these two groups along CA1, but differentiates along the third axis (CA3 = 14.6%). The Ural lineage is close to the Eastern European lineage, but slightly differentiates along the CA2–CA3 plane ($P = 0.033$).

As for UM1 or UM3, LM1 shapes of the peninsular lineages are the most differentiated (Fig. 7C). They diverge along the first shape axis (CA1 = 46.2%) for the Spanish lineage and along the second and third shape axes (CA2 = 32.8% and CA3 = 14.2%) for the Italian lineage. The Spanish LM1 is characterized by a slight flattening of its anterolingual part, and the Italian LM1 is characterized by a more rounded posterior part. The Italian group is the closest to the Western European lineage, but is still significantly

different (Table 4; $P = 0.036$). The Eastern and Western European lineages are weakly differentiated ($P = 0.024$) on the CA1–CA2 plane. The Ural lineage is close to the Eastern European lineage but slightly shifted along CA1. Overall, the analysis of LM1 evidences weaker among-lineage differentiation than in UM1 and UM3. However, LM1 is the only tooth supporting the Western-Spanish differentiation ($P < 0.001$).

Possible effect of an allometric component on the size and shape differentiation patterns

Our results indicate that the Spanish, Italian, and Ural lineages were clearly divergent from the other lineages in shape, but were also the most divergent in size. The possible influence of an allometric component on the shape differentiation of these lineages was tested using a multivariate regression between size and shape variables. It was significant for the three molars ($P < 0.001$). However, canonical analyses performed on residuals showed very similar results to those obtained on raw Fourier coefficients (Table 4). Thus, the patterns of shape differentiation were not attributable to allometric effects.

DISCUSSION

A GEOGRAPHICAL TREND IN SIZE

The best-known trend in biogeography is Bergmann's rule (Bergmann, 1847) stating that warm-blooded animals tend to increase in size in cold environments, with larger animals obtaining a smaller surface-to-volume ratio and thereby improving heat conservation in a cold climate. Yet, some groups tend to depart from this general trend, especially carnivores (Meiri, Dayan & Simberloff, 2004) and small mammals (Meiri & Dayan, 2003). Assuming that molar size can be considered a proxy for body size at the interpopulation scale of variation, as suggested in wood mice (Renaud & Michaux, 2007), our data evidenced that the bank vole may be a further exception to Bergmann's rule. This trend emerged between lineages, with Mediterranean groups tending to be larger than northern ones. Several factors may contribute to this apparently surprising trend. First, predators such as stoats (Erlinge, 1987) and pine martens (Zalewski, 2005) also tend to become smaller towards high latitudes, possibly as an adaptation to winter conditions including snow cover. Being one of the main prey of these predators, the concomitant decrease in size of bank voles may be an adaptive response to predation pressure, with bank voles finding shelters in burrows narrower than their predators (Sundell & Norrdahl, 2002). The size decrease is particularly

marked in the Ural lineage, strikingly converging towards the size of the northern red-backed vole *M. rutilus*. High-latitude environments are characterized by low primary production and low food availability, especially in winter (Yom-Tov & Geffen, 2006), so a smaller body size may represent an adaptation to reduce the total energy requirement (Ellison *et al.*, 1993). Furthermore, as mtDNA is involved in metabolic activity, the introgression of *M. rutilus* mtDNA in the Ural lineage might be of selective advantage, by allowing bank voles to display a metabolism similar to that of their cold-adapted relative. An association between the occurrence of *M. rutilus* mitochondrial DNA, smaller body size, and reduced basal metabolic rate has been recently evidenced in Finnish bank voles (Boratynski, Koskela & Mappes, 2009), supporting the interpretation of a complex adaptation to cold conditions in the Ural lineages through evolutionary trade-offs between metabolic rate and body size.

INTER- AND INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION

Molars of arvicoline rodents have long been recognized for their taxonomic value at the interspecific level (e.g. Kaneko, 1992; Kitahara, 1995; Chaline *et al.*, 1999). In the arvicoline genus *Myodes*, 12 species are currently recognized (Wilson & Reeder, 2005) in which differentiation occurred during the second pulse of the arvicoline radiation, around 2.6 Mya (Chaline *et al.*, 1999; Conroy & Cook, 1999). The obvious morphological differentiation observed in the present study between *M. glareolus* and *M. rutilus* confirms that this time span has been long enough for important differences in molar shape to accumulate between species (e.g. Renvoisé *et al.*, 2009). The existence of intraspecific differences among lineages of *M. glareolus* was less expected because of their recent divergence time, estimated to 250–300 Kya (Deffontaine *et al.*, 2005). Furthermore, genetic analyses pointed to a low divergence of the lineages (maximum 1.6% genetic differentiation; Table 2). Cases of morphological differentiation in an even shorter time span are known, but they usually correspond to peculiar conditions such as small, isolated populations in insular conditions (Renaud & Millien, 2001) or fragmented populations as a result of anthropization (Mikulová & Frynta, 2001). The context of divergence between bank vole lineages is very different, as they came into contact regularly during interglacial periods, allowing for significant gene flow between large populations. In a similar context, evidences of molar shape differentiation among wood mice (*Apodemus sylvaticus*) lineages were found, with the level of differentiation being low, however, despite a date of divergence of around 1 Mya

(Renaud & Michaux, 2007). Compared with the wood mouse, the bank vole lineages present an even more recent date of divergence, and it is thus remarkable that we evidenced a significant difference between lineages in the shape of all molars considered. Yet in agreement with the low genetic divergence, the morphological differentiation is tenuous and of the same order of magnitude than local sources of variation within populations (Guérécheau *et al.*, 2010). The question of the processes leading to this differentiation will be addressed in the following sections.

MOSAIC EVOLUTION BETWEEN MORPHOLOGICAL CHARACTERS

Many studies have considered patterns of differentiation in arvicoline molars, but usually each study focused on a single tooth (e.g. Marcolini, 2006; Tougard *et al.*, 2008). An originality of this study was to consider several teeth, and compare their patterns of differentiation. As the different molars share a similar genetic background involved in the dental row development (Kavanagh, Evans & Jernvall, 2007), they cannot be considered as independent characters, and a concerted evolution among molars is expected. Accordingly, many similarities were observed between the patterns of shape differentiation among teeth. The Spanish and Italian lineages were always the most divergent groups. The Eastern and Western European groups were generally close to each other at the centre of the morphological space, and finally the Ural lineage was closely related to the Eastern European lineage. These results complement our interpretation of the phylogenetic reconstructions that present relatively low bootstraps.

However, even if common features emerged from the patterns of shape differentiation of the three teeth, some discrepancies also occurred. Depending on the molar, the Italian lineage appeared to be close either to the Eastern European group (UM1), the Western European group (LM1), or intermediate between the two groups (UM3). The differentiation between the Western and Eastern European lineages was most pronounced on the UM3. These discrepancies between the patterns of differentiation of the three teeth suggest that a mosaic evolution occurred, despite the overall concerted evolution. This may be because of slightly different evolutionary rates for the different characters, as previously observed in rodent teeth (Barnosky, 1993). It suggests a more pronounced divergence of UM1, mainly during the Ural lineage differentiation, whereas UM3 diverged faster than the other teeth between Western and Eastern European groups, and LM1 diverged faster than the other teeth between Western and Spanish lineages.

MOLAR SHAPE PROVIDING HINTS ABOUT BANK VOLE PHYLOGEOGRAPHIC HISTORY

The Mediterranean lineages as sources of endemism

For a long time the Mediterranean peninsulas were considered as the main refugia and sources of northward recolonization for temperate forest species during the Quaternary period (Lugon-Moulin & Hausser, 2002; Sommer & Benecke, 2005). An alternative view is to consider these regions as zones of endemism (Bilton *et al.*, 1998). Considering the Mediterranean peninsulas as sources of recolonization would lead to the expectation of the Western and Eastern European molar shapes being close to the Italian and Spanish ones. On the contrary, our results present a marked divergence of the peninsular lineages from the Western and Eastern European groups, thus bringing support to the second hypothesis of Mediterranean endemism. In agreement, genetic analyses showed that the two Mediterranean lineages were independent compared with the other populations from Western and Eastern Europe. Furthermore, the lack of shape similarities between the Italian and Spanish lineages, despite a low degree of genetic divergence (0.73% K2P distance; Table 2), evidenced the absence of parallel evolution, even if they share similar Mediterranean environments. It suggests that molar shape in the two groups differed rather by accumulation of neutral differences in isolated populations than by parallel adaptation to their environments.

Western and Eastern European lineages

During the Quaternary period, repeated cooling and fluctuations of ice sheets caused shifts in species distribution (Bilton *et al.*, 1998; Hewitt, 2000). Whereas bank vole populations were isolated in refugia during glacial periods, leading to a differentiation between lineages, the deglaciation phases induced an expansion with two possible scenarios. The lineages might have been isolated by geographical barriers, decreasing their dispersal ability and leading to endemism, as illustrated by the Mediterranean lineages. Alternatively, lineages might have come into contact, with gene flow in suture zones swamping out the differentiation accumulated during glaciation phases. The Western and Eastern lineages in bank voles appear to be relevant to this last case. Given the genetic evidence, their suture zone ranges over a thousand kilometres in Central Europe, with the occurrence of Eastern mtDNA in Germany and the occurrence of Western mtDNA as far as Romania (Deffontaine *et al.*, 2005). The morphometric results, however, point to a weak but significant differentiation between the two lineages, in agreement with the level of genetic divergence larger than between the

endemic Mediterranean lineages (1.34% K2P distance between Eastern and Western lineages vs. 0.73% between Spanish and Italian lineages). This suggests that despite extensive mixing nowadays, the repeated isolations during glaciation periods were important enough to shape the pattern of differentiation still observed today.

Ural lineage

The distinctiveness of the Ural lineage is that it has *M. rutilus* mtDNA despite the fact that its overall morphology, and all nuclear markers investigated so far, are typical of the bank vole (Tegelström, 1987; Potapov *et al.*, 2007; Henttonen & Kaikusalo, pers. com.). In agreement, the molar shape of the Ural group is clearly related to other bank voles. Moreover, the Eastern European lineage is morphologically close to the Ural group, supporting the Eastern European group as the closest relative of the Ural lineage, as suggested on the basis of molecular analyses (Defontaine *et al.*, 2005). The introgression of *M. rutilus* mtDNA within a bank vole lineage is likely to have resulted from hybridization between the two species, a process that can still occur *in natura* and in laboratory experiments (Osipova & Soltin, 2006; Potapov *et al.*, 2007). Despite the possibility of hybridization between the two species, hybrids were not evidenced in our data: all specimens clearly shared typical bank vole morphology, whereas modern hybrids would have been expected to be morphologically intermediate between parental forms (e.g. Albertson & Kocher, 2005). The absence of such intermediate hybrid shapes suggests that either hybridization is very rare in the wild, or that hybrids are strongly counter-selected compared with parental species (Arnold & Hodges, 1995). Hence, the occurrence of *M. rutilus* mtDNA within the Ural bank vole might be the result of an ancient hybridization process, as observed in the mountain hare (Melo-Ferreira *et al.*, 2005). Our data on size suggest another, non-exclusive scenario. The convergence in size between Ural *M. glareolus* and *M. rutilus* was interpreted to be the result of a selective advantage of an *M. rutilus*-like size together with *M. rutilus* mtDNA in a northern environment. This does not exclude the occurrence of a disruptive selection favouring either the *M. rutilus* or the *M. glareolus* phenotype for features coded by nuclear DNA. A selection of the red vole mtDNA might therefore occur without much introgression of the nuclear genome (Potapov *et al.*, 2007).

As a conclusion, morphometric analyses can complement phylogenetic analyses. Two scenarios of post-glacial expansion were evidenced depending on the lineage: endemism of the Mediterranean lineages, characterized by a high morphological interlineages divergence, and a differentiation between the Western

and Eastern European lineages despite a low genetic divergence and a large area of sympatry.

Moreover, if the Ural lineage was defined on the basis of mtDNA, molecular analyses based on mtDNA were not able to describe its history because of an introgression from *M. rutilus* to *M. glareolus*. In this context, morphological data efficiently complemented genetic data, and confirmed the introgression of *M. rutilus* mtDNA into an otherwise *M. glareolus* genome. They also suggested the Eastern group as its closest relative and hence provide insight into the temporal dynamics that led to the emergence of the complex Ural lineage.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Jean-Pierre Quéré and Pascale Chevret for their great support and critical comments on this manuscript, and Christelle Tougard, Elodie Renvoisé, and an anonymous reviewer for their useful comments. We are very grateful to R. Libois, C. Nieberding, T. Basillo, V. Ivashkina, J. Niemimaa, L. Popa, R. Rosoux, and O. Osipova for their contribution to the sampling work. This work benefited from the support of the GDR 2474 'Morphométrie et Evolution des Formes', from the Rhône-Alpes Emergence programme, and from the Belgian FRS-FNRS.

REFERENCES

- Albertson RC, Kocher TD. 2005. Genetic architecture sets limits on transgressive segregation in hybrid cichlid fishes. *Evolution* **59**: 686–690.
- Arnold ML, Hodges SA. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 67–71.
- Austin JD, Lougheed SC, Neidrauer L, Chek AA, Boaga PT. 2002. Cryptic lineages in a small frog: the post-glacial history of the spring peeper, *Pseudacris crucifer* (Anura: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**: 316–329.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press, 1–464.
- Barnes I, Matheus P, Shapiro B, Jensen D, Cooper A. 2002. Dynamics of Pleistocene Population Extinctions in Beringian Brown Bears. *Science* **295**: 2267–2270.
- Barnosky AD. 1993. Mosaic evolution at the population level in *Microtus pennsylvanicus*. In: Martin RA, Barnosky AD, eds. *Morphological change in Quaternary mammals of North America*. Cambridge University Press, 24–58.
- Bauchau V, Chaline J. 1987. Variabilité de la troisième molaire supérieure de *Clethrionomys glareolus* (Arvicolidae, Rodentia) et sa signification évolutive. *Mammalia* **51**: 587–598.

- Bergmann C. 1847.** Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger Studien* **3**: 595–708.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, Searle JB. 1998.** Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London* **265**: 12919–12926.
- Bookstein FL. 1991.** *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1–414.
- Boratynski Z, Koskela E, Mappes T. 2009.** The effect of mtDNA introgression on phenotype – body mass and basal metabolic rate. 12th Congress European Society for Evolutionary Biology. Abstract with program, 24–36 poster.
- Carstens BC, Knowles LL. 2007.** Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology* **16**: 619–627.
- Caumul R, Polly PD. 2005.** Phylogenetic and environmental components of morphological variation : skull, mandible and molar shape in marmots (*Marmota*, Rodentia). *Evolution* **59**: 2460–2472.
- Chaline J, Brunet-Lecomte P, Montuire S, Viriot L, Courant F. 1999.** Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Annales Zoologici Fennici* **36**: 239–267.
- Conroy CJ, Cook JA. 1999.** MtDNA Evidence for Repeated Pulses of Speciation Within Arvicoline and Murid Rodents. *Journal of Mammalian Evolution* **6**: 221–245.
- Crampton JS. 1995.** Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia* **28**: 179–186.
- Deffontaine V, Ledevin R, Fontaine MC, Quéré JP, Renaud S, Libois R, Michaux JR. 2009.** A relict bank vole lineage highlights the biogeographic history of the Pyrenean region in Europe. *Molecular Ecology* **18**: 2489–2502.
- Deffontaine V, Libois R, Kotlík P, Sommer R, Nieberding C, Paradis E, Searle JB, Michaux JR. 2005.** Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* **14**: 1727–1739.
- Ellison GTH, Taylor PJ, Nix HA, Bronner GN, McMahon JP. 1993.** Climatic adaptation of body size among pouched mice (*Saccostomus campestris*: Cricetidae) in the southern African subregion. *Global Ecology and Biogeography Letters* **3**: 41–47.
- Erlinge S. 1987.** Why do European stoats *Mustela erminea* not follow Bergmann's rule? *Holarctic Ecology* **10**: 33–39.
- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368–376.
- Ferson S, Rohlf FJ, Koehn R. 1985.** Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic Zoology* **34**: 59–68.
- Garnier S, Magniez-Jannin F, Rasplus J-Y, Alibert P. 2005.** When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 269–280.
- Good JM, Demboski JR, Nagorsen DW, Jack S. 2003.** Phylogeography and Introgressive Hybridization: Chipmunks (Genus: *Tamias*) in the Northern Rocky Mountains. *Evolution* **57**: 1900–1916.
- Guérécheau A, Ledevin R, Henttonen H, Deffontaine V, Michaux JR, Chevret P, Renaud S. 2010.** Seasonal variation in molar outline of bank voles: An effect of wear? *Mammalian Biology* **75**: 311–319.
- Guindon S, Gascuel O. 2003.** A simple fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696–704.
- Hadly EA, Kohn MH, Leonard JA, Wayne RK. 1998.** A genetic record of population isolation in pocket gophers during Holocene climatic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 6893–6896.
- Hewitt GM. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907–913.
- Jaarola M, Searle JB. 2004.** A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe. *Heredity* **92**: 228–234.
- Jockusch E, Wake DB. 2002.** Falling apart and merging: diversification of slender salamanders (Plethodontidae: Batrachoseps) in the American West. *Biological Journal of the Linnean Society* **76**: 361–391.
- Kaneko Y. 1992.** Identification and Morphological Characteristics of *Clethrionomys rufocanus*, *Eothenomys shanensis*, *E. inez* and *E. eva* from the USSR, Mongolia, and Northern and Central China. *Journal of Mammalian Society of Japan* **16**: 71–95.
- Kavanagh KD, Evans AR, Jernvall J. 2007.** Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* **449**: 427–432.
- Kimura M. 1981.** Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **78**: 454–458.
- Kitahara E. 1995.** Taxonomic status of Anderson's red-backed vole on the Kii peninsula, Japan, based on skull and dental characters. *Journal of Mammalian Society of Japan* **20**: 9–28.
- Kotlík P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, Searle JB. 2006.** A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**: 14860–14864.
- Kuhl FP, Giardina CR. 1982.** Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* **18**: 259–278.
- Lugon-Moulin N, Hausser J. 2002.** Phylogeographical structure, postglacial recolonization and barriers to gene flow in the distinctive Valais chromosome race of the common shrew (*Sorex araneus*). *Molecular Ecology* **11**: 785–794.
- Luo J, Yang D, Suzuki H, Wang Y, Chene W-J, Campbell KL, Zhang Y-P. 2004.** Molecular phylogeny and biogeography of oriental voles: genus *Eothenomys* (Muridae, Mammalia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3**: 349–362.

- Marcolini F. 2006.** Fourier analysis applied to *Mimomys* (Arvicolidae, Rodentia, Mammalia) first Lower molar – bio-chronological implications. *Mathematical Geology* **38**: 667–678.
- Martin RA, Crockett CP, Marcolini F. 2006.** Variation of the schmelzmuster and other enamel characters in molars of the primitive Pliocene vole *Ogmodontomys* from Kansas. *Journal of Mammalian Evolution* **13**: 223–241.
- Meiri S, Dayan T. 2003.** On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography* **30**: 331–351.
- Meiri S, Dayan T, Simberloff D. 2004.** Carnivores, biases and Bergmann's rule. *Biological Journal of the Linnean Society* **81**: 579–588.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC. 2005.** Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* **14**: 2459–2464.
- Michaux J, Chevret P, Renaud S. 2007.** Morphological diversity of Old World rats and mice (Rodentia, Muridae) mandible in relation with phylogeny and adaptation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **45**: 263–279.
- Mikulová P, Frynta D. 2001.** Test of character displacement in urban populations of *Apodemus sylvaticus*. *Canadian Journal of Zoology* **79**: 794–801.
- Navarro N, Zatarain X, Montuire S. 2004.** Effects of morphometric descriptor change on statistical classification and morphospaces. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**: 243–260.
- Osipova OV, Soktin AA. 2006.** Bank and red vole hybridization under experimental conditions. *Doklady Biological Sciences* **410**: 381–383.
- Posada D, Crandall KA. 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817–818.
- Potapov SG, Illiarionova NA, Andreeva TA, Baskevitch MI, Okulova NM, Lavrenchenko LA, Orlov VN. 2007.** Transfer of Mitochondrial Genome of the Northern Red-backed Vole (*Clethrionomys rutilus*) to the Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*) in Northwestern Europe. *Doklady Biological Sciences* **417**: 435–438.
- Renaud S, Chevret P, Michaux J. 2007.** Morphological vs. molecular evolution: ecology and phylogeny both shape the mandible of rodents. *Zoologica Scripta* **36**: 525–535.
- Renaud S, Michaux JR. 2007.** Mandibles and molars of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* (L.): integrated latitudinal signal and mosaic insular evolution. *Journal of Biogeography* **34**: 339–355.
- Renaud S, Michaux J, Jaeger J-J, Auffray J-C. 1996.** Fourier analysis applied to *Stephanomys* (Rodentia, Muridae) molars: nonprogressive evolutionary pattern in a gradual lineage. *Paleobiology* **22**: 255–265.
- Renaud S, Millien V. 2001.** Intra- and interspecific morphological variation in the field mouse species *Apodemus argenteus* and *A. speciosus* in the Japanese archipelago: the role of insular isolation and biogeographic gradients. *Biological Journal of the Linnean Society* **74**: 557–569.
- Renvoisé E, Evans AR, Jebrane A, Labruère C, Laffont R, Montuire S. 2009.** Evolution of mammal tooth patterns : new insights from a developmental prediction model. *Evolution* **63**: 1327–1340.
- Rohlf FJ. 1990.** Fitting curves to outlines. In: Rohlf FJ, Bookstein FL, eds. *proceedings of the michigan morphometrics workshop*. Spec. Publ. 2. University of Michigan Museum of Zoology: Ann Arbor, 169–176.
- Rohlf FJ. 2000.** *NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software.
- Rohlf FJ, Archie JW. 1984.** A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology* **33**: 302–317.
- Rychlik L, Ramalhinho G, Polly PD. 2006.** Response to environmental factors and competition: skull, mandible and tooth shapes in Polish water shrews (*Neomys*, Soricidae, Mammalia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **44**: 339–351.
- Sommer RS, Benecke N. 2005.** The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. *Mammal Review* **35**: 156–164.
- Sundell J, Norrdahl K. 2002.** Body size-dependent refuges in voles: an alternative explanation of the Chitty effect. *Annales Zoologici Fennici* **39**: 325–333.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596–1599.
- Tegelström H. 1987.** Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*). *Journal of Molecular Ecology* **24**: 218–227.
- Tougard C, Brunet-Lecomte P, Fabre M, Montuire S. 2008.** Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**: 309–323.
- Wilson DE, Reeder DM. 2005.** Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference, Vol. 1–2. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press, 1–2142.
- Yom-Tov Y, Geffen E. 2006.** Geographic variation in body size: the effects of ambient temperature and precipitation. *Oecologia* **148**: 213–218.
- Zalewski A. 2005.** Geographical and seasonal variation in food habits and prey size of European pine martens. In: Harrison DJ, Fuller AK, Proulx G, eds. *Martens and fishers (martes) in human-altered environments*. Springer Science & Business Media: Springer-Verlag, 77–98.

1.2.1 Le cas particulier de deux lignées du pourtour méditerranéen

Publication 2

Une lignée relique de campagnol roussâtre illustre l'histoire biogéographique de la région Pyrénéenne

Valérie Deffontaine, Ronan Ledevin, Michaël C. Fontaine, Jean-Pierre Quéré, Sabrina Renaud, Roland Libois et Johan R. Michaux

Molecular Ecology
Vol. **18**, 2489-2502 (2009)

Avant-propos

L'article présenté dans cette partie est à nouveau le résultat d'une collaboration avec Valérie Deffontaine Deurbroeck et Johan R. Michaux, qui ont initié cette étude et réalisé les analyses moléculaires. Le matériel en provenance du Pays-Basque a été piégé et préparé par Jean-Pierre Quéré, ingénieur de recherche et responsable des collections au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP, Montpellier).

Au cours de cette étude j'ai réalisé l'analyse morphométrique des spécimens du Pays-Basque et les ai replacés dans un contexte européen en prenant comme jeu de données de référence les individus appartenant aux différentes lignées mitochondriales présentées dans la première publication (Chapitre 1.1).

Cela a permis de mettre en évidence la particularité morphologique de cette population endémique qui est apparue suite à des phases d'isolations successives au cours du Quaternaire. Les données acquises sur la UM3 associées à l'étude moléculaire basée sur l'ADNmt supporteraient ainsi l'hypothèse de l'occurrence d'un refuge glaciaire très localisé, situé au niveau du Pays-Basque. Cependant, en dépit de la nette différenciation de la dent, celle-ci présente une forme intermédiaire entre les individus appartenant aux lignées mitochondriales Espagnole et Ouest européenne ce qui traduirait l'existence d'échanges entre ces différentes populations.

A relict bank vole lineage highlights the biogeographic history of the Pyrenean region in Europe

VALÉRIE DEFFONTAINE,*†‡ RONAN LEDEVIN,§MICHAËL C. FONTAINE,†¶** JEAN-PIERRE QUÉRÉ,†SABRINA RENAUD,§ROLAND LIBOIS* and JOHAN R. MICHAUX†,††

*Unité de recherches zoogéographiques, University of Liège, Bât. B22, Boulevard du Rectorat, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium, †INRA, UMR 1064 CBGP, Campus international de Baillarguet, CS30016, F-34988 Montferrier sur Lez cedex, France, ‡Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Glasgow, Graham Kerr Building, Room 314, University Avenue, G128QQ Glasgow, UK, §UMR 5125 PEPS, CNRS, Université Lyon 1, Campus de la Doua, Bâtiment Géode, 69622 Villeurbanne Cedex, France, ¶MARE Center, Laboratory for Oceanology, University of Liège, Bât. B6c, Allée de la Chimie, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium, **Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, Bât. 360, Orsay, France, ††Laboratoire de génétique des microorganismes, University of Liège, Bât. B22, Boulevard du Rectorat, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium

Abstract

The Pyrenean region exhibits high levels of endemism suggesting a major contribution to the phylogeography of European species. But, to date, the role of the Pyrenees and surrounding areas as a glacial refugium for temperate species remains poorly explored. In the current study, we investigated the biogeographic role of the Pyrenean region through the analyses of genetic polymorphism and morphology of a typical forest-dwelling small mammal, the bank vole (*Myodes glareolus*). Analyses of the mitochondrial cytochrome b gene and the third upper molar (M^3) show a complex phylogeographic structure in the Pyrenean region with at least three distinct lineages: the Western European, Spanish and Basque lineages. The Basque lineage in the northwestern (NW) Pyrenees was identified as a new clearly differentiated and geographically localized bank vole lineage in Europe. The average M^3 shape of Basque bank voles suggests morphological differentiation but also restricted genetic exchanges with other populations. Our genetic and morphological results as well as palaeo-environmental and fossils records support the hypothesis of a new glacial refugium in Europe situated in the NW Pyrenees. The permissive microclimatic conditions that prevailed for a long time in this region may have allowed the survival of temperate species, including humans. Moreover, local differentiation around the Pyrenees is favoured by the opportunity for populations to track the shift of the vegetation belt in altitude rather than in latitude. The finding of the Basque lineage is in agreement with the high level of endemic taxa reported in the NW Pyrenees.

Keywords: bank vole, Basque country, glacial refugia, mitochondrial DNA, molar morphology, phylogeography, Pyrenees

Received 2 September 2008; revised 8 January 2009; accepted 22 January 2009

Introduction

Survival of European temperate species during the glacial periods of the Pleistocene was conditioned by the ability of populations to track favourable habitats. Southern Europe and its three Mediterranean peninsulas have thus been

traditionally considered as core areas for the survival of temperate plants and animals, by offering a southern way to escape to from the prevailing steppic and cold conditions (Taberlet *et al.* 1998). Southern differentiation of temperate but also cold-adapted species were driven by the presence of major geographic barriers (Mediterranean sea, Pyrenees, Alps), environmental heterogeneities and fragmentation of temperate forests and shrubby ecosystems during glacial and interglacial events (Blondel 1995; García-Barros *et al.* 2002). It is now well established that each Mediterranean

Correspondence: Valérie Deffontaine, Fax: +32(0)71354072; E-mail: vdeffontaine@ulg.ac.be

peninsula formed multiple glacial refugia instead of a single broad one (the concept of 'refugia within refugia', Gómez & Lunt 2007). This idea is consistent with the identification of multiple mitochondrial DNA (mtDNA) lineages evidenced for many Iberian and Italian species (Paulo *et al.* 2001; Allegrucci *et al.* 2005; Vila *et al.* 2005; Bella *et al.* 2007; Terrab *et al.* 2008). Many lineages have been described in the Iberian peninsula, and the location of the corresponding glacial refugia was recently reviewed by Gómez & Lunt (2007). These authors compared the phylogeographic patterns of Iberian species and reported seven putative Iberian glacial refugia for terrestrial taxa: in southern Spain, along the Spanish Mediterranean coast, in central Spain, in central Portugal and also in mountain areas such as in the Cantabrians and in the Pyrenees.

Phylogeographic studies, palaeontological and palynological records have provided compelling evidences that mountain areas such as the Carpathians and Pindus mountains in the Balkan region served as glacial refugia for temperate species and cold-tolerant species (Willis *et al.* 2000; Tzedakis *et al.* 2002; Babik *et al.* 2004; Deffontaine *et al.* 2005; Kotlík *et al.* 2006; Sommer & Nadachowski 2006; Schmitt & Haubrich 2008). However, the role of the Pyrenees and surrounding areas as a glacial refugium for temperate species remains poorly explored to date, despite its classification as a major regional unit of endemism (García-Barros *et al.* 2002). This mountain range has an east–west orientation and peaks at around 2000 m. It is mostly regarded as a barrier to postglacial re-colonization or as a postglacial contact zone of lineages rather than as a glacial refugium (see reviews by Hewitt 1999 and Guillaume *et al.* 2000, as well as Hewitt 2000). The Pyrenees were logically designed as a putative refugium region for cold-adapted species such as the bird *Tetrao urogallus* (Duriez *et al.* 2006), the plants *Pinus sylvestris* and *Plantago media* (Sinclair *et al.* 1999 and Soranzo

et al. 2000, both as cited by Gómez & Lunt 2007) and the mountain-forest butterfly *Erebia euryale* (Schmitt & Haubrich 2008). However, only two mammalian phylogeographic studies have addressed this issue. In humans, González *et al.* (2006) demonstrated an ancestral mitochondrial subhaplogroup inside the Basque population located in the northwestern (NW) Pyrenees. Another study conducted on Iberian populations of the field vole (*Microtus agrestis*) using the mtDNA cytochrome b (*cyt b*) marker evidenced two southern, highly differentiated phylogroups related to central Portugal and northern Spain glacial refugia (Jaarola & Searle 2004). More surprising was the Pyrenean phylogeography of the bushcricket (*Ephippiger ephippiger*). This species is locally distributed in Western Europe, and the examination of mitochondrial gene polymorphisms suggested that some populations could have survived the glacial stages in the lower regions of the Pyrenean valleys (Spooner & Ritchie 2007). In this framework, what was the biogeographic role of the Pyrenean area for other temperate species during the climatic fluctuations of the Pleistocene? Was the mountain range predominantly a geographic barrier for re-colonizing lineages isolated in other refugia, or was it a zone of survival in a mosaic landscape, leading to a high local endemism today?

We addressed this question by more thoroughly investigating bank vole populations in this area. This species is particularly well appropriate to disentangling the role of Pyrenean mountains in this context by being a typical temperate forest species. The rodent has a wide distribution range in Europe and Russia and is currently found in the northern part of the Iberian, Italian and Balkan peninsulas (Shenbrot & Krasnov 2005). Its distribution range in the Iberian peninsula encompasses the northern and southern parts of the Pyrenees as well as the Cantabrians, but it does not spread farther to the south (Blanco 1998; Fig. 1a). In the

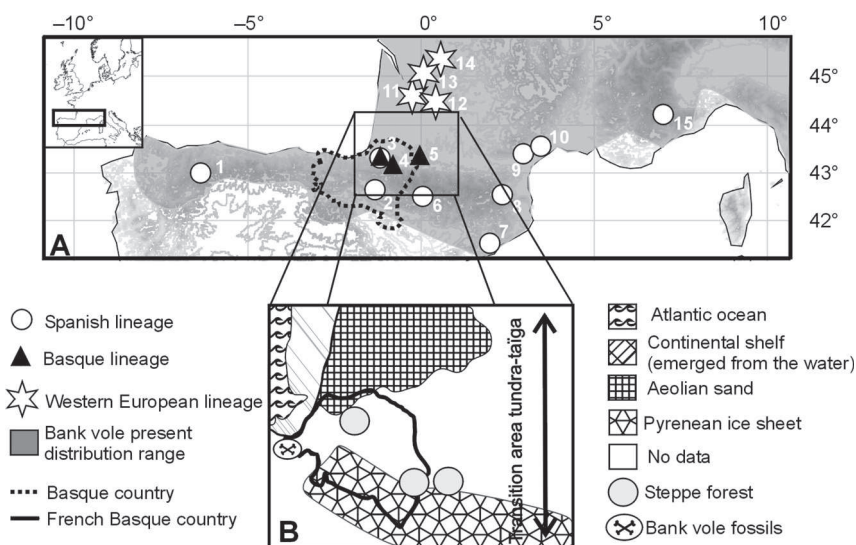


Fig. 1 (A) Distribution of the bank vole (*Myodes glareolus*) sampled around the Pyrenees and the groups revealed by the genetic and morphological analyses. The numbers refer to the localities analysed: 1, Spain, Asturias; 2, Spain, Navarre; 3, France, Armendarits; 4, France, Lantabat; 5, France, Ponson de Bat; 6, France, Néouvielle; 7, Spain, Granollers; 8, France, Py Mantet; 9, France, Hérépian; 10, France, Montpellier; 11, France, Saint Aignan; 12, France, Cadouin; 13, France, Paussac; 14, France, Bourdeilles; 15, Italy, Pietraporzio. (B) Palaeo-environmental reconstruction of the Pyrenean region during the last glacial maximum (18 000 years ago) (adapted from Antoine *et al.* 1999). See text for details and references.

past, the species was classified under the genus *Clethrionomys*, but more recently it has been argued that *Myodes* should take precedence (Wilson & Reeder 2005). Previous phylogeographic studies have shown a high level of polymorphism in mtDNA genome in Europe for this species, with the presence of four continental lineages (Western European, Eastern European, Ural and Carpathian) and three Mediterranean lineages (Iberian, Italian and Balkan) (Deffontaine *et al.* 2005; Kotlík *et al.* 2006). These bank vole lineages started to diverge during the Upper Pleistocene (~300 000 years ago) inside several glacial refugia. The present study focuses on the bank vole populations associated with the Iberian region and investigates the biogeographic role of the Pyrenean region in the complex phylogeographic history of this species.

Materials and methods

Samples

The genetic polymorphism of the mtDNA *cyt b* gene was analysed for 292 bank voles sampled throughout Europe (Supporting information, Table S1). Two hundred and thirty-eight sequences were obtained from previous published studies (Conroy & Cook 1999; Dekonenko *et al.* 2003; Cook *et al.* 2004; Deffontaine *et al.* 2005; Essbauer *et al.* 2006; Kotlík *et al.* 2006). We did not include in the analyses partial published sequences of *cyt b*. The 54 new sequences of bank voles *cyt b* used here originated from 17 localities including five sampling points in the Pyrenean massif or its foothills (Armendarits, Ponson de Bat, Py Mantet, Navarre, Néouvielle; Fig. 1a), six in surrounding regions of the Pyrenees (Asturias, Granollers, Montpellier, Herepian, Cadouin, Saint Aignan; Fig. 1a) and six in several regions of the eastern part of the bank vole distribution range (Romania, Russia). The morphological analyses were conducted on 113 bank vole skulls from 15 Eurasian localities including Pyrenean and Iberian localities (Supporting information, Table S2).

Laboratory procedures

Total genomic DNA was extracted from ethanol-preserved tissues using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). The *cyt b* gene was analysed using the primers and protocols published in Deffontaine *et al.* (2005) that produced unambiguous results. A single strand was sequenced on ABI 3700 automated DNA sequencer (PE, Applied Biosystems, CA) using the manufacturer's protocol. The sequences were aligned using the Clustal W algorithm (Thompson *et al.* 1994) in BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall 1999). We have checked the dataset for pseudogenes by looking for stop codons in the translated *cyt b* sequences using DNASP 4.0 (Rozas *et al.* 2003).

Phylogenetic and phylogeographic analyses

First, a haplotype data file was generated using MACCLADE 3.07 (Maddison & Maddison 1992). Phylogenetic reconstructions were performed by a distance method using the neighbour-joining algorithm (NJ, Saitou & Nei 1987) in PAUP 4.0b10 (Swofford 2000) and by the maximum-likelihood criterion (ML & Felsenstein 1981) implemented in the PHYLML program (Guindon & Gascuel 2003). Three northern red-backed vole sequences (*Myodes rutilus*, GenBank Accession nos AB072224, AF272638, AY309428, Cook *et al.* 2001, 2004; Iwasa *et al.* 2002) and two grey red-backed vole sequences (*M. rufocanus*, GenBank Accession nos AF429815, AF429816; Dekonenko *et al.* 2003) were also included in the dataset. *M. rufocanus* was used as outgroup in the phylogenetic reconstructions. Using alternative outgroups (Kotlík *et al.* 2006; Lebedev *et al.* 2007) did not improve the results shown here. The program MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall 1998) was used to determine the most suitable substitution model for the *cyt b* dataset studied. The robustness of the trees was assessed by bootstrap re-sampling (BS) (10 000 random replications for NJ and ML analyses; Felsenstein 1985). A Bayesian phylogeny reconstruction approach (Yang & Rannala 1997; Huelsenbeck *et al.* 2001) was also used, implemented in MRBAYES 2.01 (Huelsenbeck *et al.* 2001). Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling was performed with five chains run for 1 000 000 iterations, using default model parameters as starting values. Bayesian posterior probabilities (BPP) were obtained from the 50% majority rule consensus of trees sampled every 20 generations, discarding the trees obtained before the chains reached stationary distribution ('burn-in', empirically determined by checking of likelihood values). We used the approximate likelihood-ratio test (aLRT) implemented in ALRT PHYLML to test the branches support (Guindon & Gascuel 2003; Anisimova & Gascuel 2006). The aLRT statistics assesses whether a branch provides a significant gain in likelihood, in comparison with the hypothesis corresponding to the second-best nearest-neighbour interchange (NNI) configuration around the branch of interest. We examined two support options [Shimodaira Hasegawa (SH)-like support and Chi-squared-based support] and analysed 100 data sets using the TN93 model of evolution. We chose the tree with the higher log-likelihood value.

Second, and for the sake of clarity, the genetic structure of Pyrenean populations was examined using a smaller dataset (49 individuals) that encompassed samples from the localities underlined in bold in the Supporting information, Table S1. A spatial analysis of molecular variance was conducted using the program SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002) for two to five groups. The two localities Pietraporzio and Cadouin were left out of the SAMOVA analyses because these regions were represented only by a single specimen. We selected the partition that maximized the among-group

genetic variance (ϕ_{CT}). A network of haplotypes was constructed using the median-joining method (MJ, NETWORK 4.5 program; Bandelt *et al.* 1999). A post-processing calculation (the 'MP' calculation option) was applied in NETWORK 4.5 to eliminate superfluous (non-parsimonious) links of the network (Polzin & Daneshmand 2003). The demographic history of the newly defined bank vole lineage was inferred using a pairwise mismatch distribution analysis between individuals in ARLEQUIN 3.1. The mismatch distribution was calculated under a model of population growth–decline: multimodal distributions would be consistent with demographic stability while sudden expansion would generate a unimodal pattern (Slatkin & Hudson 1991). We tested the smoothness of the observed pairwise differences distribution with the null hypothesis of population expansion using the sum of squared deviation (SSD) (Excoffier *et al.* 2005) and the raggedness statistic (r) (Harpending 1994). We also calculated Fu's F_s statistic (Fu 1997), which is considered as a powerful statistical test to detect the population demographic expansion. These statistical tests and their significance were evaluated by 1000 random permutations in ARLEQUIN 3.1. Haplotype (h) and nucleotide (π) diversities (Nei 1987) and their standard deviations ($\pm$ SD; Tajima 1993) were estimated using DNASP 4.0. We specifically carried out these analyses on the lineages defined around the Pyrenees.

We used the McDonald–Kreitman test (McDonald & Kreitman 1991) in DNASP 4.0 to test whether our *cyt b* dataset departed significantly from neutral expectations. A Fisher's exact test was conducted to determine whether the ratio of synonymous to non-synonymous substitutions differed between two categories: polymorphisms that are variable within bank vole species and a Tien Shan red-backed vole (*Myodes centralis*) species and polymorphisms that distinguish these two species (i.e. fixed differences). We chose *M. centralis* instead of *M. rutilus* or *M. rufocanus* because this species displayed a sufficient amount of non-synonymous substitutions compared to the bank vole to perform the exact test (Kotlík *et al.* 2006).

Molecular clock analyses

We conducted a likelihood-ratio test (LRT) in PAUP 4.0b10 to test if the data violate the assumption of a constant molecular clock. We also used the program RRTREE to test if different substitution rates are present among phylogenetically defined *cyt b* lineages (Robinson *et al.* 1998). Under the assumption of a molecular clock, the times of bank vole lineage differentiation were estimated using the genetic divergences among lineages. An individual matrix of genetic distances (in percentage K₃P) was calculated in PAUP 4.0b10. The within- and between-lineage divergences and their SDs were calculated in Microsoft Office Excel 2003. We used the formula of Edwards (1997) to correct the

K₃P genetic divergences for ancestral polymorphism. As calibration point, we used the separation time between *M. glareolus* and *M. rutilus* estimated at 2.5 million years ago (Mya) based on palaeontological records (Lebedev *et al.* 2007).

Morphological analyses

A morphological marker was also used as an alternative means to evidence a possible phenotypic variation in the bank vole populations. Bank vole skulls were analysed for the third upper molar (M^3) that varies within *M. glareolus* (Bauchau & Chaline 1987).

For each animal, the two-dimensional outline of the left M^3 (or the mirror image of the right M^3) was digitized, sampling the coordinates of 64 points at equal curvilinear distance using the image analysing software OPTIMAS 6.5. Only mature specimens with complete eruption of the M^3 were considered.

The molars of the arvicoline rodents are composed of successive triangles leading to a complex shape. The Elliptic Fourier transform is an adequate method to describe such outlines (Navarro *et al.* 2004). This method is based on the separate Fourier decompositions of the incremental changes of the x - and y -coordinates as a function of the cumulative length along the outline (Kuhl & Giardina 1982). Any harmonic corresponds to four coefficients: A_n and B_n for x , and C_n and D_n for y , defining an ellipse in the xy -plane. The coefficients of the first harmonic, describing the best-fitting ellipse of any outline, are used to standardize the size and orientation of the object. These coefficients therefore correspond to residuals after standardization and should not be included in following statistical analyses (Crampton 1995; Renaud *et al.* 1996). However, the information about the minor axis of the ellipse, corresponding to its elongation and hence to the general elongation of the object, should still be contained in the residuals coefficients, namely the coefficient D_1 .

A visual inspection showed that the overall shape of the M^3 was adequately described retaining the coefficients of the first 10 harmonics, in agreement with previous studies on arvicoline teeth (Navarro *et al.* 2004). The shape of each M^3 was thus described by 37 variables: nine harmonics (10 retained minus the first) per four coefficients, plus the coefficients D_1 .

These variables were standardized for size variation and contained shape information only. Due to their large number, a multivariate analysis was necessary to reveal the main patterns of morphological differentiation to emerge. A principal component analysis (PCA), including all the specimens, was performed on the variance–covariance matrix of the 37 Fourier coefficients in order to evidence the patterns of morphological differentiation without using the information about mtDNA lineages or populations.

The significance of the difference among the Western European, Eastern European, Spanish and Basque lineages was further tested using a multivariate analysis of variance (Manova). Using a discriminant analysis on the same data set, the specimens from the Basque locality Lantabat and those from the bank vole from Armendarits displaying a Spanish mtDNA have been attributed to one of the four documented lineages. This attribution is based on the Mahalanobis distance of each specimen to the group mean of each lineage that allows the calculation of probabilities for group membership.

Results

Phylogenetic and phylogeographic analyses

A total of 239 *cyt b* haplotypes (including 25 new haplotypes) was identified among the 294 *Myodes* sp. specimens. Some sequences published in GenBank were found to be identical to others. Out of the 994 base pairs (bp), 243 were variable and 175 parsimony-informative. The average transitions/transversions ratio was equal to 8.16 and the base composition was of 25% of T, 30% of C, 31% of A and 14% of G. No stop codons were found in the translation of the *cyt b* sequences used in this study supporting the absence of pseudogenes in our dataset.

Phylogenetic trees were rooted with *cyt b* sequences of *Myodes rufocanus* that provided the best supported phylogenies for the present bank vole *cyt b* dataset. By choosing a more distant monophyletic outgroup, we ensured that basal clades of *Myodes glareolus* phylogeography were resolved. The hierarchical likelihood ratio tests (HLRTS) and the Akaike information criterion (AIC) conducted in MODELTEST 3.0 respectively pointed the K₃P (K81) model of substitution (Kimura 1981) and the transitional model (TIM) of substitution as the best suited model for the present dataset. The TIM model is not an available option for model substitution in the available programs of phylogenetic reconstructions, and the K₃P model (already used in previous publications) was preferred for this reason. The proportion of invariable sites was equal to 0.49 and the gamma distribution shape parameter to 0.74. The Bayesian tree presents the relationship between the bank vole haplotypes (Fig. 2). We did not observed any differences in the clades' support values using another model of evolution (Hasegawa–Kishino–Yano model from Hasegawa *et al.* 1985, suggested in Kotlík *et al.* 2006). The bank vole lineages previously described by Deffontaine *et al.* 2005 (Spanish, Italian, Balkan, Western European, Eastern European) and by Kotlík *et al.* 2006 (Carpathian) were grouped together in a major monophyletic clade (BS: 71, 62 and BPP: 0.78). These lineages have delimited distribution range in Spain and southern France (Spanish lineage), in Italy (Italian lineage), in the Balkan and Turkey (Balkan lineage), in Western

Europe, Eastern Europe and in northern Italy (Western lineage), in Eastern Europe and Russia (Eastern lineage), and in the Carpathians (Carpathian lineage). The bank voles from the Ural lineage clustered together with the haplotypes of *M. rutilus*. This particularity was described by Tegelström (1987) and Deffontaine *et al.* (2005) as a case of unidirectional introgression of the northern red-backed vole mtDNA into bank voles from northern Europe and the Ural mountains. A new lineage clustered apart from the others and included bank voles from the French Basque country and surrounding regions (Fig. 2). This lineage, called 'Basque' lineage, had a basal position in the phylogenetic trees compared to other bank vole lineages and was highly supported (BS: 92, 76 and BPP: 0.88). The aLRT analysis supported the monophyly of the Basque lineage and its basal position in the phylogenetic tree (support values for the SH and $\chi^2 \geq 0.95$). The position of the Basque lineage in the different tree reconstructions was stable (basal to other bank vole lineages) unlike the other bank vole lineages (Spanish, Italian, Balkan, Western European, Eastern European). The support values for these lineages were slightly lower than those previously reported in Deffontaine *et al.* (2005). This may have resulted from the higher number of sequences used in this study, which introduced a lot of polymorphisms and hid the synapomorphies, especially in a shallow phylogeny. The absence of strong monophyly of the Carpathian lineage and its inclusion in the Eastern European lineage was an unexpected result in our analysis. Kotlík *et al.* (2006) defined this lineage as monophyletic and close to the Western European lineage. But these authors used a sample that mainly focused on the Carpathians. It might be possible that some genetic relationships between the bank voles from the Carpathians and those from the other parts of the distribution range in Europe and Russia were missed in their study.

Population structure and diversity in the Pyrenean region

Only samples from the Pyrenean region were considered for population structure analysis and haplotype network reconstructions. The SAMOVA analysis evidenced three populations around the Pyrenean region ($\phi_{CT} = 84.26\%$) corresponding to the clustering of the following localities: [Armendarits, Ponson de Bat], [Néouvielle, Py Mantet, Montpellier, Navarre, Asturias, Granollers] and [Bourdeilles]. The locality of Armendarits (see Fig. 1a) carries animals with haplotypes from the Basque and Spanish lineages and might correspond to the contact zone between the two lineages. The MJ analysis evidenced three differentiated groups (separated by at least eight mutations) around the Pyrenees. They correspond to the Basque, Spanish and Western European lineages (Fig. 3).

The genetic features of the new bank vole Basque lineage were compared to those previously identified in Deffontaine

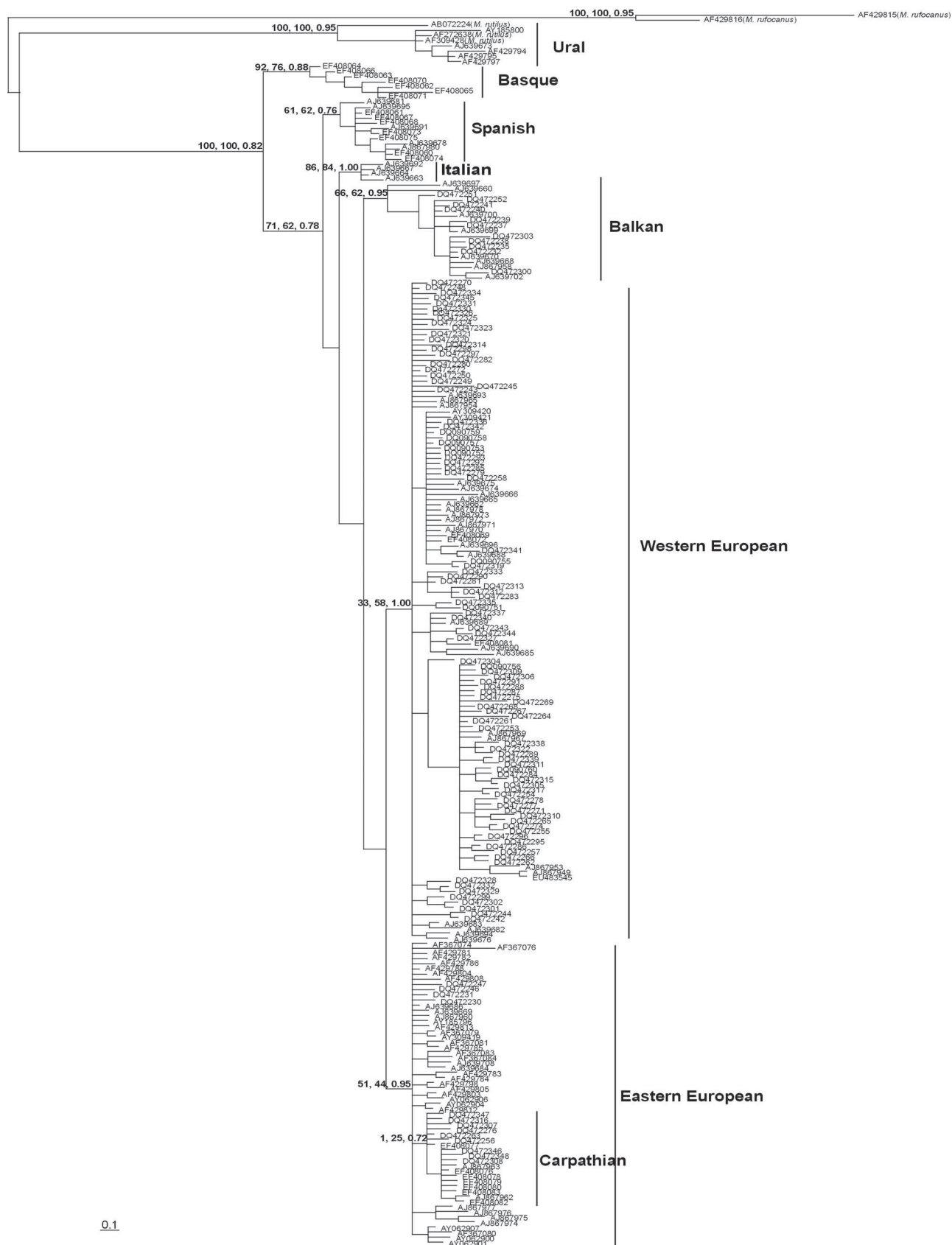


Fig. 2 Bayesian phylogenetic tree of the 239 *Myodes* mtDNA haplotypes. Bootstrap values (BS, in %) obtained using the neighbour-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) analyses, as well as Bayesian posterior probabilities (BPP) are shown for the major phylogroups. See Supporting information, Table S1, for the haplotype designations.

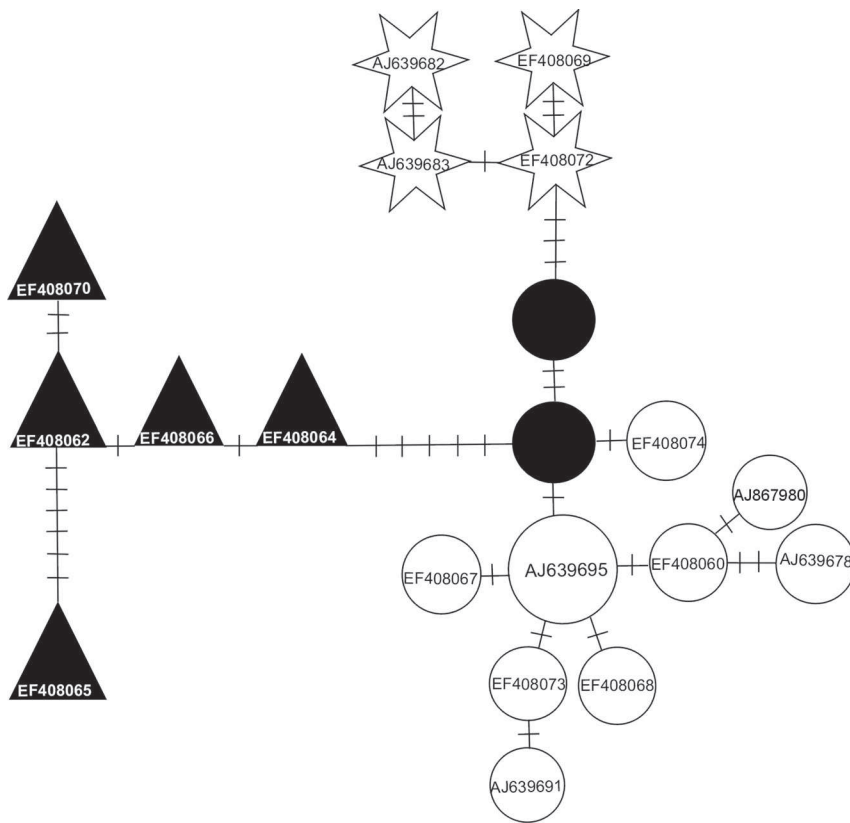


Fig. 3 Median Joining Tree of the bank vole haplotypes (*Myodes glareolus*) from the Pyrenean region. Numbers of mutations between haplotypes are indicated on branches. The median vectors are indicated by black dots. See Supporting information, Table S1, for the haplotypes designations.

et al. (2005). The mismatch distribution analysis, with unimodal distributions, supported the hypothesis of population expansion for the Western European, Eastern European and Italian lineages. The Balkan, Spanish and Basque lineages, on the other hand, displayed multimodal distributions suggesting long-term population stability (Fig. 4, in Deffontaine *et al.* 2005). In parallel, the raggedness index r of the Basque lineage was greater than 0.05 which is consistent with constant population size ($r = 0.098$, probability = 0.69; Harpending *et al.* 1993). The SSD calculation was not very informative and did not support any departure from the null hypothesis of a population in expansion (SSD = 0.03, probability = 0.45). The Fu's F_s statistic, which is sensitive to demographic expansion, showed no negative values for the Basque lineage, similarly suggesting demographic stability (Fu's $F = 0.72$, probability = 0.68). The Basque lineage displayed a nucleotide genetic diversity of $\pi = 0.24 \pm 0.16\%$ and a haplotype genetic diversity of $h = 0.705 \pm 0.112$. These values are similar to those reported in Deffontaine *et al.* (2005) for the Spanish ($\pi = 0.21 \pm 0.05\%$, $h = 0.758 \pm 0.08$) and the Italian lineages ($\pi = 0.18 \pm 0.04\%$, $h = 0.786 \pm 0.110$). The mean genetic distance of the Basque lineage to the other lineages ($0.92\% \pm 0.30$) highlighted a rather large genetic divergence inside the shallow phylogeny of the species, which was of the same order of magnitude as those of the other bank vole lineages (Deffontaine *et al.*

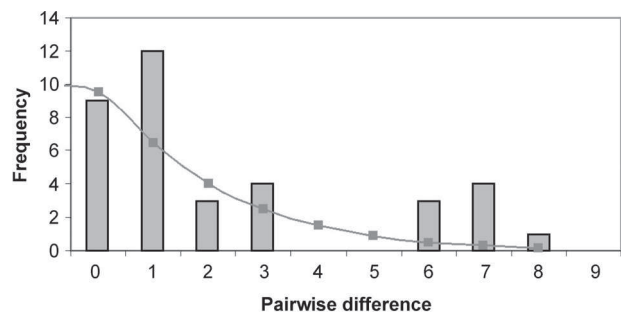


Fig. 4 Mismatch distribution analysis of the bank vole (*Myodes glareolus*) Basque lineage.

2005). This would correspond to a time of genetic differentiation not later than during the late Pleistocene. Finally, the McDonald–Kreitman test showed no significant departure of the present bank vole *cyt b* dataset to the neutral expectation.

Time of lineages differentiation

The LRT showed no significant differences between the likelihoods of the models with and without molecular clock constraints ($\chi^2 = 0.0212$, d.f. = 1, probability = 0.884). The RRTREE test was also not significant for all pairs of

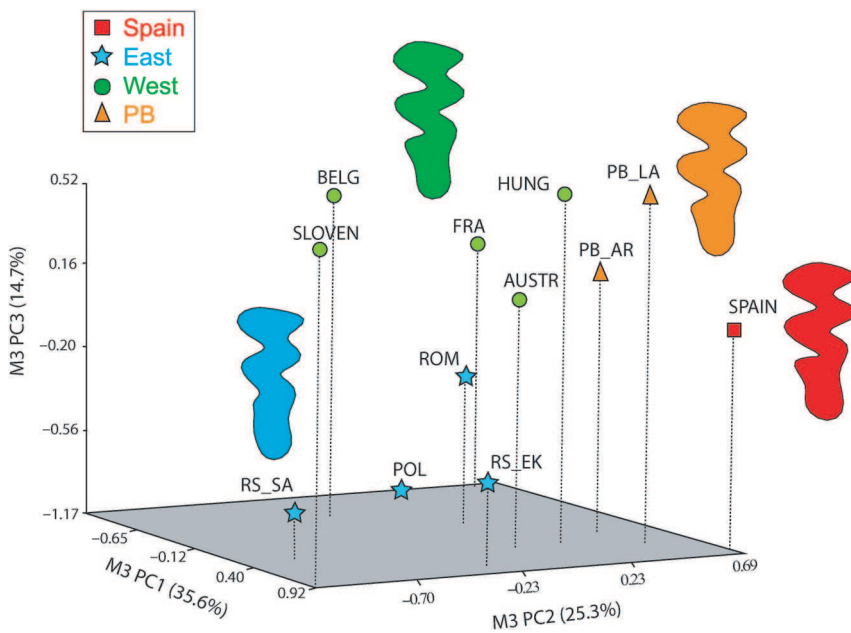


Fig. 5 Morphological variation of the third upper molar (M^3) of the bank vole (*Myodes glareolus*) in Europe, estimated by the first three principal components of a principal component analysis on the Elliptic Fourier coefficients of the outline of the third upper molars (M^3). Average values per locality are represented, with symbols indicating the genetic lineage dominating this locality. No mixing has been evidenced in the selected western, eastern and Spanish localities, but the Basque locality Armendarits [PB_LA], dominated by the Basque lineage, includes a 'Spanish' specimen. No genetic identification is available for the specimens of the other Basque locality Landabat [PB_LA]. Reconstructed outlines on the top visualize the average shape of the main groups. See Supporting information, Table S2, for samples designations.

lineages compared ($P > 0.2$), suggesting the absence of rate heterogeneity among them and the clock-like evolution of the present dataset. The molecular clock was estimated at $4.3 \pm 0.24\%$ [4.54–4.06] K_3P distance per million years (My). This estimate made use of the most recent calibration date in the *Myodes* phylogeny and is higher than those reported in Deffontaine *et al.* (2005), which was 3.6% K_3P distance per My. Times of lineage differentiation were calculated on the basis of this new evolution rate. Therefore, the separation time between all lineages and between the Basque lineage and the other bank vole lineages were estimated to have been during the Upper Pleistocene (between 0.19 and 0.56 Mya, excluding the Ural lineage, and between 0.46 and 0.56 Mya, respectively).

Morphological analyses

A first morphometric analysis relied on descriptive multivariate statistics, using a PCA to display the principal axes of morphological variation of the M^3 . Fig. 5 shows the morphospace corresponding to the first three principal components of a PCA on the Fourier coefficients (accounting for 74% of the total morphological variance). The intra-populational morphological variance was important and, for visualization purpose, only average values per locality were displayed. Localities containing the Western European and Eastern European lineages scattered over a large range of variation but shared similar values along PC1 and PC2 while being differentiated along PC3 (the Eastern lineage corresponding to lower scores on PC3). The Spanish lineage, sampled at a single locality (Asturias) was isolated on the plane defined by PC1 and PC2. It was characterized by

high PC1 and PC2 scores. Two localities were sampled in the Basque area (Armendarits and Landabat). In Armendarits, genetic analyses revealed that most specimens (6/7) shared a Basque mtDNA haplotype, whereas one single specimen displayed a Spanish mtDNA. The average M^3 shape from this locality appeared as intermediate between the one from the Spanish locality, from Asturias, and the one from the Western group. The average value from the other Basque locality, Landabat, was very close to Armendarits, suggesting that both are dominated by the Basque lineage, although no suitable materials were available to allow for genetic identification of the specimens of Landabat and some specimens of Armendarits.

Moving beyond descriptive approach, the morphometric difference between lineages was tested using a MANOVA. The sample included 49 specimens from the Western European groups, 33 from the Eastern European group, 12 from the Spanish locality (Asturias) and the 12 specimens from Armendarits expected to belong to the Basque lineage. The difference in M^3 between lineages was highly significant (Wilks' Lambda $P < 0.0001$). The robustness of the result was confirmed by high percentages of correct reattribution, using a discriminant analysis of the specimens, to the initial groups (82% for the Western European group; 96% for the Eastern European group; 92% for the Spanish locality; 100% for the Basque sample).

Using this data set and the discriminant analysis, the specimens from Landabat and the 'Spanish' specimen from Armendarits were attributed to the reference groups, in order to get an individual-based estimate of their relatedness based on M^3 morphology. Five out of seven specimens from Landabat were attributed to the Basque group, one to the

Spanish and one to the Western European group. In most of the cases (6/7), this attribution relied on a high probability (> 0.85). Furthermore, the Armendarits individual with a Spanish mtDNA was attributed to the Basque group (probability = 0.96).

Discussion

The bank vole phylogeography in the Pyrenees and surrounding regions

The present phylogenetic and morphological results demonstrate the existence of a new, well-differentiated bank vole population, geographically localized in the French Basque country (Armendarits and Lantabat localities) and in the French department of the Atlantic Pyrenees (Ponson de Bat locality): the 'Basque' lineage. According to this new finding, the Pyrenean region and central France house at least three bank vole lineages: (i) the Western European lineage that currently extends in northern and central parts of France but does not reach the Pyrenees; (ii) the Spanish lineage that currently encompasses the Cantabrian mountains, the southern part of the Pyrenees, the eastern Pyrenees and southern France and NW Italy along the Mediterranean coast; and (iii) the new Basque lineage that is currently surrounded by the Atlantic Ocean and the Western European and Spanish lineages (Fig. 1a). Although these lineages cover different geographic areas, they cannot be considered completely allopatric. First, one mtDNA contact zone was found in the Basque locality of Armendarits. Second, the M^3 shape of Basque bank voles appears as intermediate between the Spanish and the Western European ones, suggesting morphological differentiation but also genetic exchanges between populations.

These lineages seem to have different demographic histories. The Western European lineage differentiated 0.25–0.30 Mya and re-colonized Western Europe at the end of the last glaciation from a refugium situated in central Europe. This scenario was suggested on the basis of the decreasing nucleotide diversity gradient from central European populations to more northern populations (Deffontaine *et al.* 2005). On the other hand, the Spanish and Basque lineages display low values of haplotype and nucleotide diversity. These results contrast with the high genetic diversity of the Balkan lineage reported in Deffontaine *et al.* (2005). The low levels of genetic diversity of the former lineages can be explained by the small effective population sizes of these geographically restricted lineages and/or by severe population bottlenecks during the glaciations (Avice 2000). Indeed, during the glaciations, the Spanish peninsula underwent more arid and cold climatic events than the Balkan peninsula (Petit *et al.* 2003; Pinho *et al.* 2007), leading to the disappearance of many forest habitats suitable for the bank vole. Other temperate species, like the lizard

Podarcis bocagei, also showed a loss of genetic diversity in northern Spain (Pinho *et al.* 2007). Despite its low levels of genetic diversity, the Basque lineage represents the most differentiated bank vole mtDNA lineage described to date. These results are reminiscent of a previous study on human populations that identified a Basque mtDNA lineage as the oldest lineage in Europe (González *et al.* 2006).

What can the history of this bank vole Basque lineage tell us about the survival of temperate species during past climatic changes?

Insight into the Basque lineage's phylogeographic history

A previous phylogeographic study on bank voles has shown that globally shallow gene trees are likely the result of strong population bottlenecks during the Quaternary glaciations (Deffontaine *et al.* 2005). The bank vole phylogeography is associated with 'Category III' as defined by Avice (2000), which corresponds to closely related but geographically localized haplotypes. The multiple modes of the mismatch distribution and other statistics regarding demographic history suggest that the Basque population size would have remained stable for a long time compared to the Spanish and 'continental' lineages during these strong climatic fluctuations. Moreover, the complete lineage sorting of a maternal germ line and the emergence of reciprocal monophyly suggest a long-term isolation of populations (Avice 2004). However this hypothesis must be confirmed by other genetic markers. The basal position of the Basque lineage may suggest that it could be at the source of the radiation of all other bank vole lineages in Europe. However, this is not very likely given that the Basque haplotypes are geographically restricted to one area and are not paraphyletic in the different phylogeographic reconstructions (Parker & Kornfield 1997). It is also unlikely that the Basque lineage was a remainder of an old extinct lineage in Western Europe with a formerly larger distribution area, because Basque-like haplotypes were only found in the western part of the Pyrenees.

Hypothesis of a glacial refugium in the NW Pyrenees

The discovery of a bank vole lineage in the Basque region supports the hypothesis of glacial refugia for temperate species around the Pyrenees. We cannot totally rule out that the Basque individuals could be migrants from another glacial refugium where populations subsequently went extinct or that were not sampled in the present study. However, several arguments support the hypothesis of a glacial refugium in the NW Pyrenees where this lineage is currently distributed.

First, palaeo-environmental studies document that forest habitats were available for bank voles during the glaciations in the vicinity of the Pyrenees (Fig. 1b). Flint (1971)

and Brown & Gibson (1983) reported the presence of steppe-tundra in the northern part of the Pyrenees during the Quaternary glaciations, whereas Williams *et al.* (1998) indicated that the southern boundary of permafrost was in southern France. In the Aquitaine basin, in southwestern France, tundra formation was reported during the last glacial maximum (LGM, Drucker *et al.* 2003). In another study, Antoine *et al.* (1999) showed that the region situated between the Aquitaine basin and the French Basque country (to the southwestern of the 'Landes') was covered by aeolian sand and thus was inappropriate for forest-dwelling species (Fig. 1b). In the Pyrenees, the geological records of the last glaciation showed that piedmont glaciers reached the Aquitaine basin in the Pau and Ossau valleys, thus at c. 60 km west to Basque locality of Armendarits (Fig. 1b) (Pallás *et al.* 2006). The retreat of these Pyrenean ice sheets began before the LGMs (24 400 years before present for the Ossau glacier). The re-colonization of pine and temperate forests, however, was reduced by a phase of climate aridity during the following 14 000 years (Andrieu 1987). On the basis of this information and despite the lack of palaeo-environmental data for the French Basque country, we can hypothesize that this region was likely sand- and ice-free during the LGMs and that the proximity with the Atlantic Ocean would have brought a certain amount of humidity during the aridity phase mentioned above. Indeed, the French Basque country has an ideal geographic position in Europe to allow the development of a mosaic of habitats comprising forests.

Second, the NW Pyrenees are considered as a refuge region for many plants and animals species (García-Barros *et al.* 2002). For example, this region contains many archaeological records which highlight the presence of humans for at least the last 28 000 years (González *et al.* 2006). The current oldest European deciduous forests (like the Iraty forest and the Sare forest) are situated in the NW Pyrenees (Bourquin-Mignot & Girardclos 2001). These forests are known to shelter relict populations of species commonly found in central European deciduous forests, such as the woodpecker *Dendrocopos leucotos lilfordi* and the beetle *Eledonoprius armatus* (Kompantseva & Tschigel 2000; Grangé 2001; Gorman 2004). However, it is clear that the old deciduous and coniferous forests observed nowadays in the NW Pyrenees do not correspond to the location of the forested glacial refugia. Indeed, during the LGM, several valleys at the east of the French Basque country were glaciated (see above). Vegetation records indicated that the major part of the Pyrenean massif was covered by steppic vegetation at an altitude of approximately 400 m (Antoine *et al.* 1999). Most of our study sites in the mountain were situated at an altitude between 900 m and 1500 m and was likely glaciated or steppic during the LGM. The major part of the Pyrenean mountains were thus not suitable habitat for temperate species during glaciations. In the case of

Pyrenean mountains and bank voles, the glacial refugia would not have been situated at fairly high altitude but in the Basque foothills, close to the Atlantic ocean, at an altitude below 400 meters. This hypothesis is supported by the discovery of bank vole fossils dated back to the LGM (radiocarbon datings from 12 310 to 16 200 years ago (Peman 1985) in the Basque country near the Atlantic shoreline and at an altitude of only 230 meters (Fig. 1b). A recent study on the Pyrenean lineages of the bushcricket and of the mountain forest butterfly arrived at the same conclusion, that populations would have survived in the lower regions of the valleys during recent glaciations (Spooner & Ritchie 2007; Schmitt & Haubrich 2008). The valley systems offer a diversity of persisting, local, favourable microclimatic conditions and habitats and provide the populations with the opportunity to track the shift of the vegetation in altitude. Those factors would have enhanced the local survival and differentiation of lineages and populations. The phylogeography of the bank vole includes at least three examples of this: the Ural, Carpathian and Basque lineages are distributed in the vicinity of, respectively, the Urals, the Carpathians and the western Pyrenean region.

Post-glacial expansion through the Pyrenees

Previous demographic analyses showed that several bank vole lineages (Western European, Eastern European, Spanish and Italian) experienced post-glacial expansion after the LGM (Deffontaine *et al.* 2005). The lineages meet in suture zones where, generally, gene flow occurs. The average M^3 shape of Basque bank voles appears as intermediate between the Spanish lineage and that of the Western European group, suggesting restricted genetic exchanges between populations. In the reviews by Hewitt (1999, 2000), the Pyrenees are considered as one of the main suture zones in Europe. In the western part of the Pyrenees, two bank vole lineages were identified: the Basque lineage on the northern slope and the Spanish lineage on the southern slope. We hypothesize that the growth of the ice cap and steppe during glaciations has decreased the gene flow between the two lineages, promoting their differentiation.

The geographic distribution of the Basque lineage suggests that it did not contribute to the recolonization of the entire Pyrenees and of northern Europe. One possible explanation is that the north-south orientation of the Pyrenean ridges may have blocked the expansion of the Basque vole population to the east. Alternatively, it is possible that the development of marshes after the deposits of aeolian sand in the southwestern Landes region could have blocked the northward expansion of the Basque vole population during the warming in the Holocene. These marshes were drained by humans in the 18th century by extensive planting of maritime pines (*Pinus pinaster*) (Sargos 2004). A third possible explanation is that the local adaptation of Basque

vole population to the Basque foothills environment may have prevented their expansion in less suitable habitats. Further studies using a larger sampling from the French Basque country and surrounding populations will provide a more detailed picture of the expansion processes of the Basque lineage and gene flow with other populations.

Conclusions

Our study strongly suggests a differentiated bank vole population in Europe, geographically localized in the NW part of the Pyrenean region. Genetic methods (mtDNA polymorphism) and morphological analyses (M^3 shape differentiation) highlight the singular phylogeographic history of the bank vole Basque population. Many phylogeographic studies assume that glacial refugia for temperate forest species were mainly located in southern Mediterranean peninsulas. Our study suggests a potential glacial refugium for a temperate forest species in mountain foothills and points to the biogeographic importance of the NW Pyrenees. Our results also provide another piece in the puzzle regarding the palaeo-environments of Western Europe during cold climatic phases by suggesting that the French Basque country was situated in the transition area between the steppe-tundra and mixed coniferous-deciduous biotopes, where forest-dwelling species were able to survive.

Finally, we hope that the discovery of this Basque lineage will draw close attention to the potential phylogeographic significance of this area. Other lineages may be discovered in the future inside the phylogeography of relict forest species of the Basque area (woodpeckers, beetles). This source of genetic diversity may be important for the conservation of species biodiversity in Europe.

Acknowledgements

We thank Dr R. Biek for his scientific comments and his help with improving the English grammar of the manuscript. The authors are grateful to Pr. G. Jalut, Dr M. Anisimova, Dr S.J.E. Baird, Dr O. Gascuel, M. Dao, B. Dumont, F. Santos, J.-L. Grangé and L. Soldati for their help or comments. We thank all persons who provided new tissue samples of bank voles: F. Catzefflis, J. Cassaing, C. Feliu, J. Goüy de Bellocq, E. Magnanou, C. Nieberding, M.G. Ramalhinho and R. Rosoux. We thank four anonymous referees for their helpful suggestions. This publication has been funded under the EU 6th Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration, Priority 1.1.6.3. Global Change and Ecosystems (European Commission, DG Research, GOCE-CT-2003-010284 EDEN) and is officially catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0140 and as a MARE publication n°164. The content of this paper does not represent the official position of the European Commission and is entirely the responsibility of the authors. This work was also funded by the Belgian FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique, 'crédit de fonctionnement' discerned to V. Deffontaine). V. Deffontaine and M.C. Fontaine were supported by a Belgian research fellowship from the FRS-FNRS ('mandat Aspirant'). The Postdoctoral fellowship

of Valérie Deffontaine at the University of Glasgow was funded by the Human Frontier Science Program (grant No. ST-0086/2007-C) and the Wellcome Trust Value in People Award.

References

- Allegrucci G, Todisco V, Sbordoni V (2005) Molecular phylogeography of Dolichopoda cave crickets (Orthoptera, Rhaphidophoridae): a scenario suggested by mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 153–164.
- Andrieu V (1987) Le paléo-environnement du piémont nord-pyrénéen occidental de 27 000 B.P. au Postglaciaire: la séquence de l'Estarrès (Pyrénées-Atlantiques, France) dans le bassin glaciaire d'Arudy. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences de Paris*, **304**, 103–108.
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology*, **55**, 539–552.
- Antoine P, de Beaulieu JL, Bintz P *et al.* (1999) *La France Pendant les Deux Derniers Extrêmes Climatiques. Variabilité Naturelle Des Environnements*. Andra/CNF-INQUA co edition, France.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Babik W, Branicki W, Sandera M *et al.* (2004) Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology*, **13**, 1469–1480.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Bauchau V, Chaline J (1987) Variabilité de la troisième molaire supérieure de *Clethrionomys glareolus* (Arvicolidae, Rodentia) et sa signification évolutive. *Mammalia*, **51**, 587–598.
- Bella JL, Serrano L, Orellana J, Mason PL (2007) The origin of the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 568–576.
- Blanco JC (1998) *Mamíferos de España*, Volume 2. In: *Cetáceos, Artiodáctilos, Roedores Y Lagomorfos de la Península Ibérica, Baleares Y Canarias* (ed. Yravedra J), pp. 1–457. Editorial Planeta, Barcelona.
- Blondel J (1995) *Biogéographie: Approche Écologique et Évolutive*. Editions Masson, Paris.
- Bourquin-Mignot C, Girardclos O (2001) Construction d'une longue chronologie de hêtres au pays basque: la forêt d'Iraty et le Petit Age Glaciaire. *Sud-Ouest Européen. Revue de Géographie Des Pyrénées et Du Sud-Ouest*, **11**, 59–71.
- Brown JH, Gibson AC (1983) *Biogeography*. C.V. Mosby Company, Saint Louis, MO.
- Conroy CJ, Cook JA (1999) MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *Journal of Mammalian Evolution*, **6**, 221–245.
- Cook JA, Bidlack AL, Conroy CJ *et al.* (2001) A phylogeographic perspective on endemism in the Alexander Archipelago of southeast Alaska. *Biological Conservation*, **97**, 215–227.
- Cook JA, Runck AM, Conroy CJ (2004) Historical biogeography at the crossroads of the northern continents: molecular phylogenetics of red-backed voles (Rodentia: Arvicolinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**, 767–777.
- Crampton JS (1995) Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia*, **28**, 179–186.

- Deffontaine V, Libois R, Kotlík P *et al.* (2005) Beyond the Mediterranean peninsulas: Evidence of Central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, **14**, 1727–1739.
- Dekonenko A, Yakimenko V, Ivanov A *et al.* (2003) Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infection, Genetics and Evolution*, **3**, 245–247.
- Drucker DG, Bocherens H, Billiou D (2003) Evidence of shifting environmental conditions in Southwestern France from 33 000 to 15 000 years ago derived from carbon-13 and nitrogen-15 natural abundances in collagen of large herbivores. *Earth and Planetary Science Letters*, **216**, 163–173.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Duriez O, Sacht JM, Ménoni E *et al.* (2006) Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mounts? *Conservation Genetics*, **8**, 513–526.
- Edwards SV (1997) Relevance of microevolutionary processes to higher level molecular systematics. In: *Avian Molecular Evolution and Systematics* (ed. Mindel PP), pp. 251–278. Academic Press, New York.
- Essbauer S, Schmidt J, Conraths FJ *et al.* (2006) A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. *Epidemiology and Infection*, **134**, 1333–1344.
- 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.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary tree from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, **17**, 368–376.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783–791.
- Flint RF (1971) *Glacial and Quaternary Geology*. John Wiley and Sons, New York.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- García-Barros E, Gurrea P, Lucíañez MJ *et al.* (2002) Parsimony analysis of endemism and its application to animal and plant geographical distributions in the Ibero-Balearic region (western Mediterranean). *Journal of Biogeography*, **29**, 109–124.
- Gómez A, Lunt DH (2007) Refugia within refugia: Patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: *Phylogeography of Southern European Refugia* (ed. Weiss S, Ferrand N), pp. 155–188. Springer Publishers, Dordrecht.
- González AM, García O, Larruga JM, Cabrera VM (2006) The mitochondrial lineage U8a reveals a Paleolithic settlement in the Basque country. *BMC Genomics*, **7**, 124–130.
- Gorman G (2004) *Woodpeckers of Europe: A Study of the European Picidae*. Ed. Bruce Coleman, London.
- Grangé JL (2001) Le pic à dos blanc *Dendrocopos leucotos lilfordi* dans les Pyrénées françaises. *Ornithos*, **8**, 8–17.
- Guillaume CP, Heulin B, Arrayago MJ, Bea A, Braña F (2000) Refuge areas and suture zones in the Pyrenean and Cantabrian regions: geographic variation of the female MPI sex-linked alleles among oviparous populations of the lizard *Lacerta* (*Zootoca*). *Vivipara. Ecography*, **23**, 3–10.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696–704.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment, editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, 591–600.
- Harpending H, Sherry ST, Rogers AR, Stoneking M (1993) The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology*, **34**, 483–496.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160–174.
- Hewitt GM (1999) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Huelsensbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, **294**, 2310–2314.
- Iwasa MA, Kartavtseva IV, Dobrotvorsky AK *et al.* (2002) Local differentiation of *Myodes rutilus* in northeastern Asia inferred from mitochondrial gene sequences. *Mammalian Biology*, **67**, 157–166.
- Jaarola M, Searle JB (2004) A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe. *Heredity*, **92**, 228–234.
- Kimura M (1981) Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **78**, 454–458.
- Kompantseva TV, Tschigel DS (2000) New data on the distribution and biology of *Eledonoprius armatus* (Panzer, 1799) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Russian Entomological Journal*, **9**, 139–141.
- Kotlík P, Deffontaine V, Mascheretti S *et al.* (2006) A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **103**, 14860–14864.
- Kuhl FP, Giardina CR (1982) Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*, **18**, 259–278.
- Lebedev VS, Bannikova AA, Tesakov AS, Abramson NI (2007) Molecular phylogeny of the genus *Alticola* (Cricetidae, Rodentia) as inferred from the sequence of the cytochrome b gene. *Zoologica Scripta*, **36**, 547–563.
- Maddison DR, Maddison WP (1992) *Macclade 3.07*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA.
- McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*, **14**, 114–116.
- Navarro N, Zararain X, Montuire S (2004) Effects of morphometric descriptor change on statistical classification and morphospaces. *Biological Journal of the Linnean Society*, **83**, 243–260.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Pallás R, Rodés A, Braucher R *et al.* (2006) Late Pleistocene and Holocene glaciation in the Pyrenees: a critical review and new evidence from ¹⁰Be exposure ages, south-central Pyrenees. *Quaternary Sciences Review*, **25**, 2937–2963.
- Parker A, Kornfield I (1997) Evolution of the mitochondrial DNA control region in the mbuna (*Cichlidae*) species Flock of Lake Malawi, East Africa. *Journal of Molecular Evolution*, **45**, 70–83.

- Paulo OS, Dias C, Bruford MW *et al.* (2001) The persistence of Pliocene populations through the Pleistocene climatic cycles: evidence from the phylogeography of an Iberian lizard. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **268**, 1625–1630.
- Peman E (1985) Aspectos climaticos y ecologicos de los Micro-mamíferos del yacimiento de Eralla. *Munibe*, **37**, 49–57.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL *et al.* (2003) Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563–1565.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2007) Contrasting patterns of population subdivision and historical demography in three western Mediterranean lizard species inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, **16**, 1191–1205.
- Polzin T, Daneshmand SV (2003) On steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, **31**, 12–20.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817–818.
- Renaud S, Michaux J, Jaeger JJ, Auffray JC (1996) Fourier analysis applied to *Stephanomys* (Rodentia, Muridae) molars: non-progressive evolutionary pattern in a gradual lineage. *Paleobiology*, **22**, 255–265.
- Robinson M, Gouy M, Gautier C, Mouchiroud D (1998) Sensitivity of the relative-rate test to taxonomic sampling. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1091–1098.
- Rozas J, Sánchez-De I, Barrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496–2497.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.
- Sargos J (2004) *Histoire de la Forêt Landaise. Du Désert À L'âge D'or*. Edition L'horizon chimérique, Bordeaux.
- Schmitt T, Haubrich K (2008) The genetic structure of the mountain forest butterfly *Erebia euryale* unravels the late Pleistocene and postglacial history of the mountain coniferous forest biome in Europe. *Molecular Ecology*, **17**, 2194–2207.
- Shenbrot GI, Krasnov BR (2005) *An Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae)*. Pensoft Publisher, Sofia.
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, **129**, 555–562.
- Sommer RS, Nadachowski A (2006) Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review*, **36**, 251–265.
- Spooner LJ, Ritchie MG (2007) An unusual phylogeography in the bushcricket *Ephippiger ephippiger* from Southern France. *Heredity*, **97**, 398–408.
- Swofford DL (2000) *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453–464.
- Tajima F (1993) Measurement of DNA polymorphism. In: *Mechanisms of Molecular Evolution* (eds Takahata N, Clark AG), pp. 37–59. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tegelström H (1987) Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Molecular Evolution*, **24**, 218–227.
- Terrab A, Schönswetter P, Talavera S, Vela E, Stuessy TF (2008) Range-wide phylogeography of *Juniperus thurifera* L., a presumptive keystone species of western Mediterranean vegetation during cold stages of the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**, 94–102.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Tzedakis PC, Lawson IT, Frogley MR *et al.* (2002) Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science*, **297**, 2044–2047.
- Vila M, Vidal-Romani JR, Björklund M (2005) The importance of time scale and multiple refugia: incipient speciation and admixture of lineages in the butterfly *Erebia tiraria* (Nymphalidae). *Molecular Ecology*, **36**, 249–260.
- Williams M, Dunkerley D, De Deckker P, Kershaw P, Chappel J (1998) *Quaternary Environments*. Oxford University Press, New York.
- Willis KJ, Rudner E, Sümegi P (2000) The full-glacial forests of Central and Southeastern Europe. *Quaternary Research*, **53**, 203–213.
- Wilson DE, Reeder DM (2005) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Yang Z, Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 717–724.

This work is part of the PhD thesis of Valérie Deffontaine on the phylogeography of the bank vole under the supervision of Professor Roland Libois. Research interests of Dr Valérie Deffontaine focus on the phylogeography and population genetics of several terrestrial species and their pathogens. Ronan Ledevin is a PhD student working on the evolution of *M. glareolus*, combining phylogeography and palaeontology by using a morphometric perspective. Dr Michaël C. Fontaine's research interests focus on the processes shaping the genetic diversity and determining the patterns of distribution in marine and terrestrial species. Jean-Pierre Quéré is a mammalogist working on the identification, distribution and ecology of small mammals of the Palaearctic. Dr Sabrina Renaud is an expert in morphometric methods; her research focuses on pattern and processes of morphological evolution. Prof. Roland Libois has conducted ecological research on European rodents and threatened species for nearly three decades.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1 Geographic origins, latitude (in decimal degree North), longitude (in decimal degree East), total number of animals per locality (N) and GenBank Accession nos of *Myodes glareolus* samples used in the molecular analyses. Accession nos refer to some published studies (Conroy & Cook 1999; Dekonenko *et al.* 2003; Cook *et al.* 2004; Deffontaine *et al.* 2005; Kotlík *et al.* 2006; Essbauer *et al.* 2006). Accession numbers with asterisk refers to

new haplotypes published in the present study. In bold: the samples selected to build the dataset on bank voles from the Pyrenean region.

Table S2 Geographic locations, latitude (in decimal degree North), longitude (in decimal degree East), codes, genetic lineage and total number of animals per locality (N) of *Myodes glareolus* third upper molars used in the morphological analyses.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

1.2.2 Le cas particulier de deux lignées du pourtour méditerranéen

Etude de cas 1

Identification d'une population de campagnol roussâtre endémique du promontoire du Gargano (Italie)

Avant-propos

Comme dans les cas précédents, cette étude résulte à nouveau d'une collaboration avec Valérie Deffontaine Deurbroeck et Johan R. Michaux qui l'ont initié. Michaël Fontaine (Université Paris-Sud, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution) a de plus contribué aux analyses génétiques. L'idée de l'analyse morphométrique des campagnols roussâtre du Gargano a été initiée en 2005 dans le cadre du Master de Bruno Dumont, encadré par Johan R. Michaux et Roland Libois (Université de Liège, Unité de recherches zoogéographiques). Cependant, l'analyse n'a pas pu aboutir pour des raisons techniques. Au cours de ma thèse j'ai donc pris les mesures et effectué les analyses afin de poursuivre cette étude qui a été présentée dans la thèse de Valérie Deffontaine Deurbroeck (2008). Cette étude est actuellement en cours de rédaction, Valérie Deffontaine Deurbroeck en étant le premier auteur. La partie présentée dans ma thèse reprend des parties de ce manuscrit, mais axe l'étude sur les résultats que j'ai obtenus sur la morphologie. La rédaction est en anglais puisque mes résultats doivent être intégrés à l'article en cours de préparation.

L'objectif de cette étude est de caractériser une population de campagnol roussâtre endémique au promontoire du Gargano, identifiée d'après l'ADN mitochondrial comme une nouvelle lignée. Ce promontoire est situé en Italie du sud-est et abrite une forêt tempérée décidue qui s'est retrouvée par le passé isolée du continent. Je vais présenter ici l'étude de la forme de la troisième molaire supérieure, utilisée comme marqueur de différenciation intra-*M. glareolus*. Dans la partie précédente nous avons vu qu'elle permettait de différencier une population locale de campagnol roussâtre dans le Pays-Basque, caractérisée par une signature morphologique particulière résultant de son histoire évolutive comprenant des phases d'isolation prolongées au cours du Quaternaire. Dans le cas du Gargano l'échelle géographique est encore plus locale et la date de divergence estimée de cette population semble être quatre fois plus récente que celle du Pays-basque. L'étude de cette lignée mitochondriale du point de vue morphométrique constitue donc un challenge visant à déterminer si une différenciation morphologique a pu se mettre en place durant ce laps de temps suite aux conditions géographiques et historiques particulières observées dans cette région.

Introduction

In this study, we investigated the phylogeographic history of the bank vole (*Myodes glareolus*) in Italy. The distribution range of the bank vole is largely homogenous from Western Europe to Russia except in the Italian peninsula, where bank vole populations are currently fragmented in three areas corresponding to the Central Apennines, the Southern Apennines, and the Gargano promontory (Fig. 1). Bank voles from Gargano live in an unfragmented deciduous forest of 11 000 hectares (between 270m and 830m of altitude) located on the Eastern-North part of the Gargano promontory (max. altitude of 1055 m). This forest called the '*foresta umbra*' is considered as a relict place for deciduous trees in the arid regions of Southern Italy and constitutes a spot in the distribution range of the bank vole (Fig. 1). The Gargano promontory is inserted between the Adriatic Sea and the Apulian plain and is characterised by a very complex paleogeographic history. This mountainous area was transformed in a true island during the marine transgression at the beginning of the Pliocene (5.3 Mya; Freudenthal, 1976). During that time of isolation many species evidenced extreme evolution of their phenotype, making the Pliocene endemic fauna of Gargano a typical example of evolution in a context of insularity. For example, the biggest insectivora of the world (the giant hedgehog *Deinogalerix*, Freudenthal, 1972) and a representative of a new family of ruminants (*Hoplitomerys*, Leinders, 1984) were both found in Gargano. Regarding rodents species, the genus *Microtia* also displayed insular gigantism (Parra-Millien et al., 1999).

The marine regression of the Pleistocene allowed the colonisation of continental species in the Gargano promontory and led to the extinction of most of the insular endemics. However, a peculiar geodynamic situation maintained the Gargano promontory in a relative isolation since it is surrounded by the Bradanic Trough, a basin formed by the flexural subsidence of a subducting plate. During the Middle and Late Pleistocene, sediments progressively invaded the Bradanic Trough, indicating the presence of water masses that probably isolated the Gargano forest from the Apennines forests (Tropeano et al., 2002). The Gargano promontory has thus a long history of isolation of its small deciduous forest, the typical habitat of the bank vole. Populations in the vicinity of the Gargano promontory constitute good candidates to point out and scale a mainland local glacial refuge.

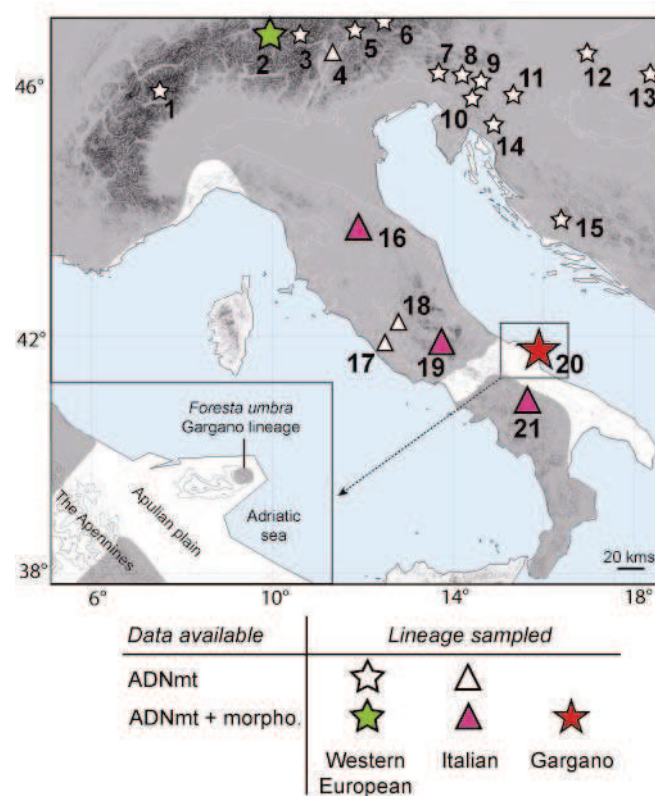


Figure 1. Map of Italy showing the sampling locations of the bank voles (the symbols in colour indicating localities included in the morphometric analysis), the mountainous areas and the distribution of the Western European lineage, Italian lineage and Gargano population. The insert focuses on the Gargano promontory area in Southern Italy. It shows the location of the *Foresta umbra* and relief in that area. The grey zone corresponds to the bank vole distribution range following Shenbrot & Krasnov (2005). 1. Arolla. 2. Pfunds. 3. Ventetal. 4. Trento. 5. Oberhaus. 6. Heiligenblut. 7. Livek. 8. Delnice (Slovenia). 9. Ljubjana. 10. Gotenisk mountains. 11. Pohorje mountains. 12. Zala. 13. Pecs. 14. Delnice (Croatia). 15. Gračac. 16. Chiusi della Verna. 17. Roma region. 18. Lucretili mountains. 19. Abruzzi. 20. Gargano. 21. Vulture mountains.

Material and Methods

Sampling of the morphometric study

Morphometric analyses were performed on 132 bank voles (Table 1). Twenty-two bank voles were sampled from four localities in Italy including the Gargano promontory (N = 12; Fig. 1). All specimens were also analysed genetically. While several prospects were realized in the Gargano region, *M. glareolus* was only found in the *foresta umbra*.

Country	Locality	Code on Fig. 1	Code on Fig. 6	Genetic lineage	Number of measured UM3
Austria	Pfunds,	2	AUS_PF	Western	4
	Zemmtal (Tirol)		AUS_TI	Western	8
	Ventetal		AUS_VE	Western	4
Belgium	Virelles, Liège	3	BELG	Western	24
Slovenia	Rut		SLOVEN	Western	3
Hungary	Zala (Bak)		HG_BA	Western	4
France	Loiret		FR_LO	Western	2
	Lantabat		PB_LA	Basque	7
	Armendarits		PB_AR	Basque	11
Poland	Pulawy (Lublin)		POL_LU	Eastern	9
Romania	Targu Mures (Sovata)		ROM	Eastern	9
Russia	Samara		RS_SA	Eastern	6
	Ekaterinburg		RS_EK	Eastern	7
Italy	Tuscany (Chiusi della Verna)	16	IT_TO	Mediterranean	6
	Vulture mountains	21	IT_VU	Mediterranean	2
	Abbruze	19	IT_AB	Mediterranean	2
	Gargano	20	GARG	Gargano	12
Spain	Asturia		SP_AS	Mediterranean	12

Table1. Sampling localities with their labels and country of origin. The lineage evidenced in each locality is indicated for morphometric study as well as the number of specimens measured (UM3).

Morphometric analysis

The third upper molar (UM3) was used to evidence a possible phenotypic variation between bank vole populations. The outline analysis is described in the Chapter 1.1 (Ledevin et al., 2010). Due to the large number of variables resulting of the outline analysis, a multivariate analysis was necessary to evidence the main patterns of morphological differentiation.

A canonical analysis (CA) was performed on this data set in order to display inter-group differences on a few synthetic axes. The grouping variable considered was the locality of trapping, hence not including any *a priori* information about membership to a genetic lineage. The significance of the differences between groups was tested using a multivariate analysis of variance (MANOVA). Finally, the area of the molar outline provided a size estimate. Differences among groups were tested using an analysis of variance.

Results

Summary of the phylogeographic analysis

A maximum likelihood phylogenetic tree based on the mitochondrial DNA *cyt b* was generated to present the relationships between the bank vole *cyt b* haplotypes (Fig. 2, method detailed in Deffontaine et al., 2005). Most of the previous lineages described were recovered: the Basque lineage, the Balkan lineage, the Western and Eastern European lineages and the Ural lineage (Deffontaine et al., 2005, 2009). The only discrepancy with previous studies arises from the Spanish and Italian lineages which group together in a single Western Mediterranean lineage. This can be explained by the low level of genetic differences between these two lineages and indicate the need of more variable genetic markers to decipher the lineages structure in that area. The new samples from Italy carried haplotypes that belong to the Western Mediterranean lineage, except those from the Gargano promontory (*foresta umbra*). Haplotypes from these voles all grouped together into a highly supported monophyletic lineage named ‘Gargano’ which divergence was estimated during the last glacial periods of the Quaternary (70 000 years).

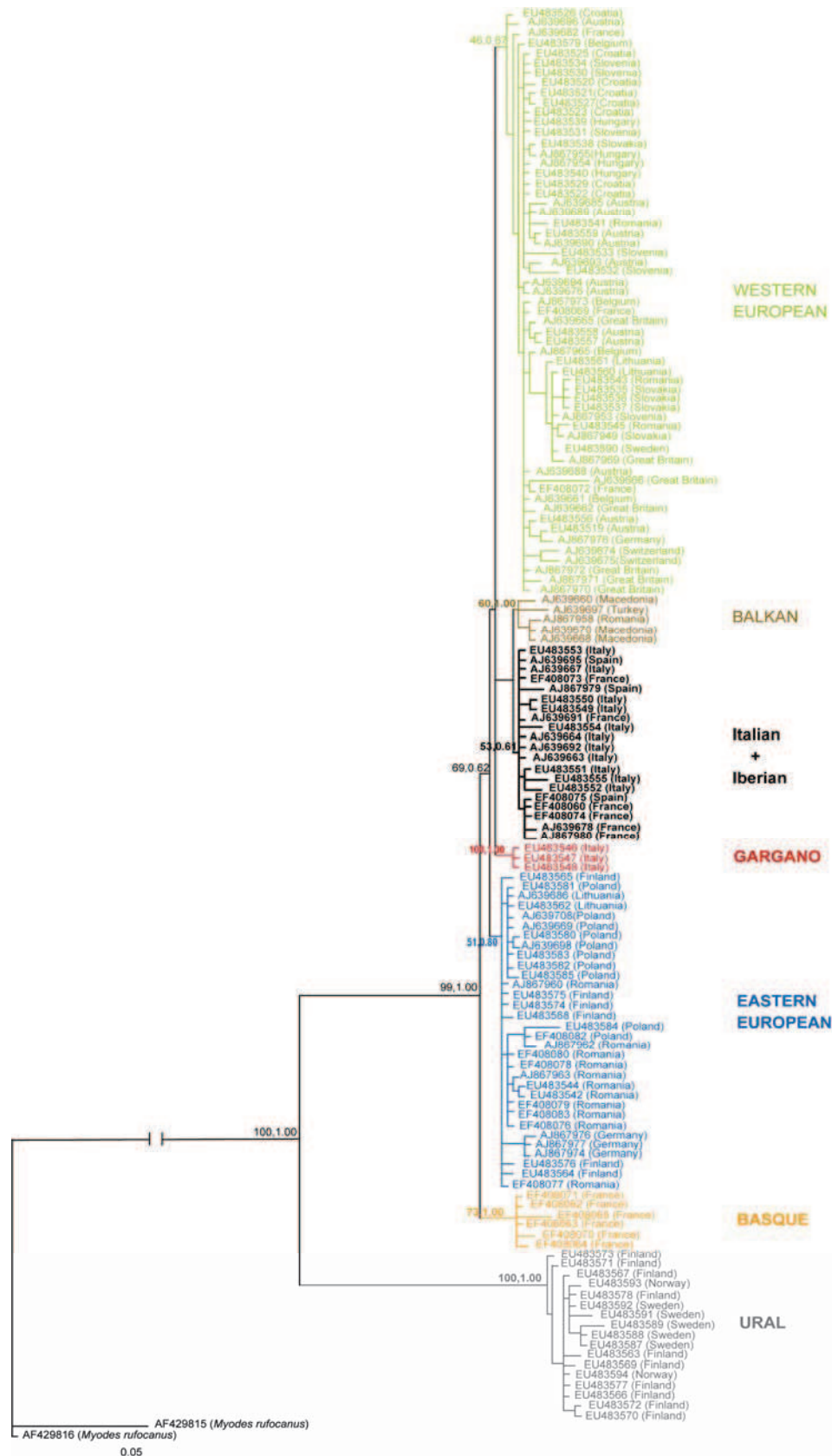


Figure 2. Maximum likelihood (ML) tree of the 144 *Myodes* cyt *b* haplotypes. Bayesian analysis gave the same haplotypes connections (data not shown). Bootstrap values (%) of the ML analyses and Posterior Probabilities of the Bayesian analysis are shown on the branches of the tree. Slash marks mean that the branch was middle cut.

Patterns of UM3 morphological differentiation

The pattern of morphological differentiation was globally congruent with the differentiation observed on the genetic data. The UM3 shape showed a significant differentiation between geographic groups (MANOVA: $P < 0.001$) that can be displayed on the first three canonical axes totalising 51.8% of the inter-group variance (Fig. 3A). Groups corresponding to the Western and European lineages tended to segregate along the first axis. A pole emerged along the second axis, isolating Italian and Basque samples, and the Gargano promontory as the most divergent along this axis. Noteworthy, the Spanish group strongly departs from this group and isolates along the first axis, in discrepancy with the clustering of Italian and Spanish samples into a Western Mediterranean clade based on genetic data. Spanish and Basque samples share low scores along the third axis, while the Italian samples are characterized by a large variability along this axis. Overall, the Gargano sample appears as one of the most divergent in this morphospace.

The molars from Gargano are characterised by a wide occlusal surface with deeply indented triangles; the anterior lobe is particularly well developed (Fig. 3B). Italian, Iberian and Basque samples also share relatively wide molars, whereas the Eastern European group is characterised by slender, smoothly undulating molars.

This morphometric analysis was completed by considering variations in molar size (Fig. 3C). All Mediterranean samples, including Gargano, share a large UM3 size compared with Western and Eastern European samples. Gargano teeth are not significantly different in molar size from other Italian samples (Gargano vs. Italy: $P = 0.280$) and are only slightly smaller than Iberian molars ($P = 0.012$). In contrast Gargano molars are markedly larger than those from the continental lineages (Gargano vs. Western European $P = 0.008$; Gargano vs. Eastern European $P < 0.001$). Central and Southern Italy are not significantly different in size ($P = 0.456$) and differences in shape could not be tested because of the limited sample size.

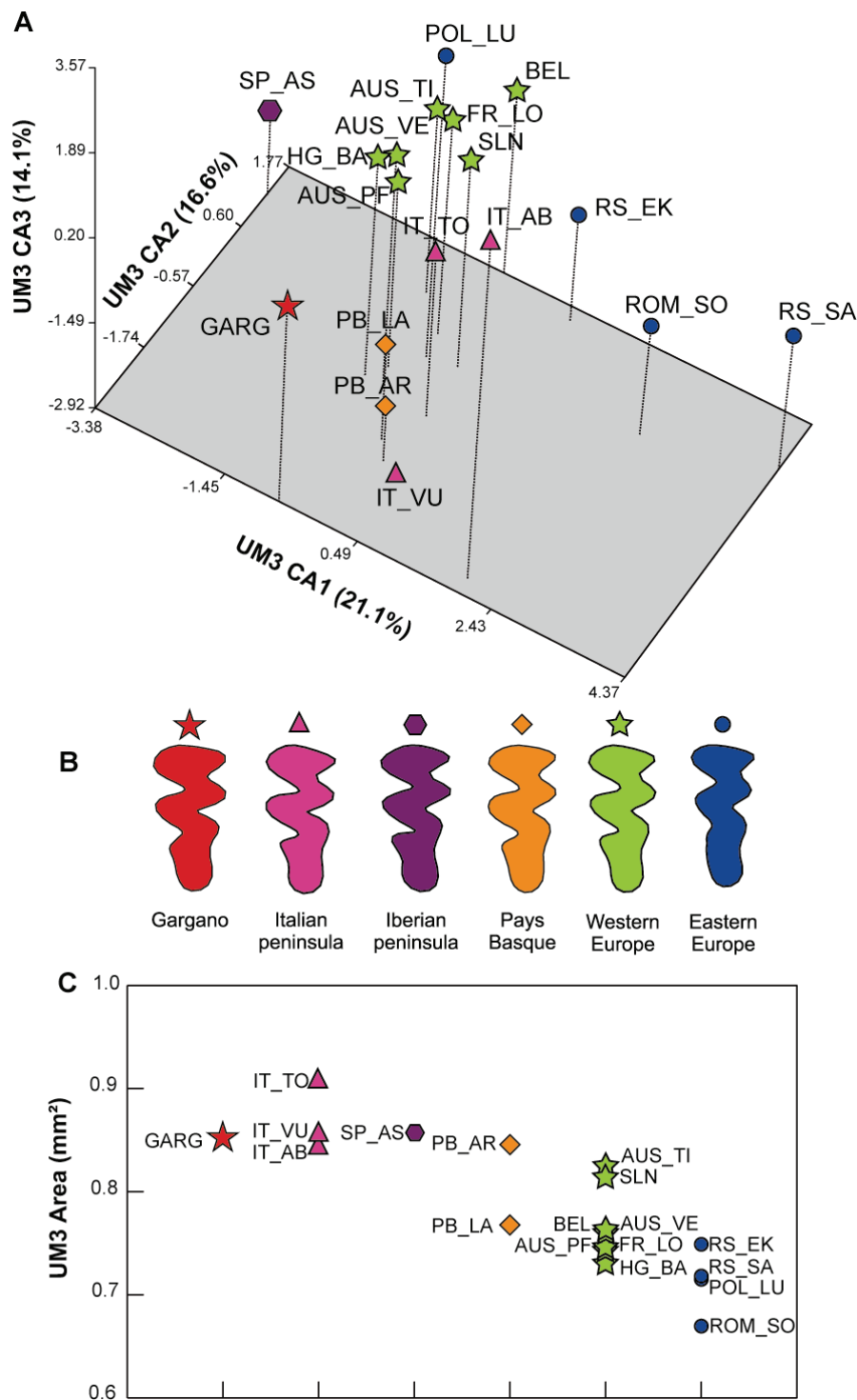


Figure 3. Morphological variation of the third upper molar (UM3) of the bank vole (*Myodes glareolus*). (A) Shape differentiation on the first three canonical axes (CA) based on the coefficients of the outline analysis of the occlusal surface. Each dot corresponds to an average value per geographic group; symbols correspond to larger geographic grouping largely corresponding to the genetic lineages. (B) Reconstructed outlines visualizing the average UM3 shape of the different geographic groups. Anterior part up, labial side to the right, lingual side to the left. (C) Variation in molar size, estimated by the area of the 2D outline of the occlusal surface. Each dot corresponds to an average value per group.

Discussion

Gargano as a refuge in refuge

The classic view in biogeography is that European temperate mammals adapted and survived to the Quaternary glaciations inside the Mediterranean peninsulas where favourable habitat persisted throughout the Pleistocene climatic variations (Hewitt, 1999). The Italian peninsula is one of this supposed major refuge zone. This interpretation is corroborated by fossil records from the last glacial maximum indicating the persistence there of temperate species (Sommer & Nadachowski, 2006) and by the evidence of Italian phylogeographic lineages for several species (Hewitt, 1999; Nieberding et al., 2004; Vettori et al., 2004; Canestrelli et al., 2008; Ursenbacher et al., 2008).

The present study showed however that the Italian peninsula harboured complex and structured glacial refugia at least for some forest dwelling species like the bank vole. At least two distinct bank vole lineages were recorded in Italy, as evidenced by the differentiation in molar shape and the complete lineage sorting of mtDNA haplotypes. A further population structure might exist in bank voles from Italy as suggested by the differentiation of the molar shape between Central and Southern Italy (Fig. 3). This structure might correspond to the disconnected forest blocks on the two mountain ranges of Central and Southern Apennines. Further testing this Italian structure would require additional samples for both genetic and morphometric analyses.

Microevolutionary processes in an island-like refuge

The molecular analyses estimated the Gargano lineage divergence during the last glacial periods of the Quaternary (70 000 years). On such insular-like conditions, microevolutionary processes are known to occur faster than on mainland (Millien, 2006). Both chance and adaptation participate to the insular divergence (Berry, 1973; 1996). Chance includes founder effect and subsequent small population size and possible bottlenecks. On the other hand, insular conditions often trigger ecological shifts that in turn select for divergent morphologies compared with the continent (e.g. Renaud & Auffray, 2010). Both ranges of processes are not mutually exclusive and the gene flow breakdown characteristics of insular conditions may favour adaptation to local conditions (Lenormand, 2002). Hence, we wondered what microevolutionary processes actually characterised the history of the Gargano bank vole populations in its island-like conditions.

Random processes including founder effect and drift likely occurred, as documented by the low genetic diversity (data not shown). The corresponding morphological divergence indeed occurred quite fast and markedly, bank voles from Gargano being characterized by an important morphological differentiation of their molar shape. The divergence of the Gargano population however occurred in a time span three time shorter than the Basque lineage (Deffontaine et al., 2009) whose molars are included within the range of the mainland morphospace (Fig. 3A). This points indeed to an accelerated morphological evolution, although it remains of moderate importance compared with other cases of rodent evolution in true islands in even shorter time span (e.g. Berry, 1964; Davis, 1983; Renaud & Auffray, 2010).

The most marked accelerations of morphological evolution are often related to directional selection driving a rapid divergence (Renaud et al., 2007). Considering the molars as the morphological feature of interest, the occurrence of such directional selection should involve a shift in diet of the animals. Despite the uniqueness of the *foresta umbra*, it seems unlikely that the bank voles underwent there a profound shift in their habitat, remaining associated to a forest environment similar to the one experienced in Italian mainland. Accordingly, Gargano's molars do not display an extreme divergence and despite their typical features, they share many traits in size and shape with other Mediterranean groups rather suggesting a common adaptation to these climatic conditions.

As a conclusion, using morphometrics we characterized an endemic population which is of importance in the understanding of the processes shaping the intra-specific variation. Furthermore, this study challenges the common view in conservation biology of habitat fragmentation as a factor of risk for a population. The example of Gargano's bank voles carries a more positive view for long-time survival of small populations, even in mammals.

References

- Berry, R. J. 1964 The evolution of an island population of the house mouse. *Evolution* **18**: 468-483.
- Berry, R. J. 1973 Chance and change in British long-tailed field mice (*Apodemus sylvaticus*). *Journal of Zoology, London* **170**:351-366.
- Berry, R. J. 1996 Small mammal differentiation on islands. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London B* **351**:753-764.
- Canestrelli, D., Cimmaruta, R. & Nascetti, G. 2008 Population genetic structure and diversity of the Apennine endemic stream frog, *Rana italica* – insights on the Pleistocene evolutionary history of the Italian peninsular biota. *Molecular Ecology* **17**, 3856-3872.
- Davis, S. J. M. 1983 Morphometric variation of populations of house mice *Mus domesticus* in Britain and Faroe. *Journal of Zoology, London* **199**: 521-534.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J. B. & Michaux, J. R. 2005 Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of Central European glacial refugium for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* **14**, 1727-1739.
- Deffontaine, V., Ledevin, R., Fontaine, M. C., Quéré, J.-P., Renaud, S., Libois, R. & Michaux, J. R. 2009 A relict bank vole lineage in the French Basque country highlights the biogeography history of Pyrenean mountains in Europe. *Molecular Ecology* **18**, 2489-2502.
- Freudenthal, M. 1972 *Deinogalerix koenigswaldi* nov. gen., nov. spec., a giant insectivore from the Neogene of Italy. *Scripta Geologica* **14**, 1-11.
- Freudenthal, M. 1976 Rodent stratigraphy of some Miocene fissure fillings in Gargano (prov. Foggia, Italy). *Scripta Geologica* **37**, 1-20.
- Hewitt, G.M. 1999 Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Ledevin, R., Michaux, J. R., Deffontaine, V., Henttonen, H. & Renaud, S. 2010 Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**, 681-694.
- Leinders, J. 1984 Hoplitomerycidae fam. nov. (Ruminantia, Mammalia) from Neogene fissure fillings in Gargano, Italy. Part 1. *Scripta Geologica* **70**, 1-51.
- Lenormand, T. 2002 Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:183-189.
- Millien, V. 2006 Morphological evolution is accelerated among island mammals. *PLoS Biology* **4**, 1863-1868.
- Nieberding, C., Morand, S., Libois, R. & Michaux, J. R. 2004 A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **1**, 2559-2568.
- Parra-Millien, V., Bocherens, H. & Jaeger, J.-J. 1999 The skull of *Microtia*, an extinct burrowing murine rodent of the late Neogene Gargano palaeoisland. *Lethaia* **32**, 89-100.
- Renaud, S. & Auffray, J.-C. 2010 Adaptation and plasticity in insular evolution of the house mouse mandible. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **48**, 138-150.
- Renaud, S., Chevret, P. & Michaux, J. R. 2007 Morphological vs. molecular evolution: ecology and phylogeny both shape the mandible of rodents. *Zoologica Scripta* **36**:525-535.
- Shenbrot, G. I. & Krasnov, B. R. 2005 *An atlas of the geographic distribution of the Arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae)*. Sofia: Pensoft Publisher, 1-350.
- Sommer, R. & Nadachowski, A. 2006 Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review* **36**: 251-265.
- Tropeano, M., Sabato, L. & Pieri, P. 2002 Filling and cannibalization of a foredeep: the Bradanic Trough, Southern Italy. *Geological Society, London, Special Publications* **191**: 55-79.
- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L. & Mayer, M. 2008 Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**: 1116-1128.
- Vettori, C., Vendramin, G. G., Anzidei, M., Pastorelli, R., Paffetti, D. & Giannini, R. 2004 Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1-9.

1.3 Etude d'un carrefour majeur inter- et intra-spécifique : la Fennoscandinavie

Etude de cas 2

Etude d'un carrefour majeur inter- et intra-spécifique : la Fennoscandinavie

Avant-propos

Cette étude s'intègre dans un réseau de collaborations internationales. Les spécimens piégés en Suède ont été fournis par Gert Olsson, chercheur associé à l'Université suédoise des Sciences Agricoles. Ceux de Finlande ont été fournis par Heikki Henttonen, Professeur au « Finnish Forest research Institute (Metla) ». Les analyses moléculaires (ADN mitochondrial et ADN nucléaire) ont été réalisées par Bernard Lehanse, étudiant de Master à l'Université de Liège, en accueil au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP) de Montpellier. Ses travaux ont été encadrés par Johan R. Michaux qui a initié l'étude. Le détail des résultats génétiques et des interprétations est disponible dans son mémoire, Lehanse (2010).

L'analyse des populations de Fennoscandinavie présentée ici va d'abord s'intéresser à deux zones de contact entre lignées mitochondriales, l'une située en Finlande entre la lignée Oural et la lignée Est européenne, et l'autre située en Suède entre la lignée Oural et la lignée Ouest européenne. Jusqu'à maintenant j'ai réalisé les études morphométriques sur des localités ne présentant pas d'évidences de contact. Cette étude permettra donc premièrement de voir si les zones de contact se traduisent par une différence morphologique, et deuxièmement d'avoir accès à de nouvelles informations qui fourniront un aperçu de la dynamique des lignées mitochondriales au niveau d'une zone de mélange.

Finalement, si la Fennoscandinavie représente un carrefour entre différentes lignées mitochondriales de campagnol roussâtre, il s'agit aussi d'un point de rencontre entre cette espèce et une espèce nordique, le campagnol de la taïga *M. rutilus*. La lignée Oural se caractérise d'ailleurs par la présence de l'ADN mitochondrial de *M. rutilus* au sein de populations de campagnol roussâtre, issue de phénomènes d'hybridation entre les deux espèces.

L'étude morphométrique permettra donc d'étudier deux types de zones de contact : (1) entre lignées définies sur la base de leur ADN mitochondrial et (2) entre deux espèces de campagnols.

Introduction

Dans cette partie, nous allons voir un autre aspect des études phylogéographiques s'intéressant d'une part aux mélanges entre lignées pouvant exister au sein d'une espèce et d'autre part aux phénomènes d'hybridation entre espèces proches.

Comme cela a été présenté dans les parties précédentes, différentes lignées ont été définies sur la base de l'ADN mitochondrial chez le campagnol roussâtre (Deffontaine et al., 2005) et une signature morphologique a pu être retrouvée pour ces lignées permettant d'étudier leur structuration biogéographique à l'échelle de l'Europe (Chapitre 1 - Publication 1, Ledevin et al., 2010).

Dans ces précédentes études aucune zone de contact entre les lignées mitochondriales n'a été prise en considération afin de ne pas augmenter la variabilité au sein du jeu de données morphologique. Il n'était donc jusque là pas possible d'accéder à la dynamique de ces lignées au niveau des zones de mélange. Cette étude va dans un premier temps s'intéresser à des populations de *Myodes glareolus* piégées en Fennoscandinavie où deux zones de contact entre lignées mitochondriales ont été identifiées en Suède et en Finlande (Fig. 1 ; Jaarola et al., 1999 ; Deffontaine et al. 2005). La zone située en Suède correspond à une zone de contact entre les lignées mitochondriales Ouest européenne (au sud) et Oural (au nord), tandis que la zone située en Finlande correspond à une zone de contact entre les lignées Est européenne (au sud) et Oural (au nord). En étudiant la forme de la troisième molaire supérieure, il sera donc possible de voir si les zones de contact entre lignées définies sur la base de l'ADNmt sont retrouvées d'un point de vue morphologique ou si la relative simplicité des patrons de différenciation inter-lignées observée grâce à l'étude de l'ADNmt masque une réalité plus complexe. L'utilisation d'un marqueur phénotypique permettra en effet de détecter des phénomènes de mélange non observables d'après l'étude de l'ADNmt, où aucune recombinaison n'est possible.

Outre deux exemples de mélange entre lignées mitochondriales, la Suède et la Finlande présentent au nord un deuxième type de zone de contact, mettant cette fois deux espèces en contact: *M. glareolus* au sud, et *M. rutilus* au nord (Fig. 1). Les cas d'hybridations naturelles, bien que désormais considérés comme communs chez de nombreux organismes (10% des espèces animales semblant être impliquées dans des cas d'hybridation interspécifique, Mallet et al., 2005), ont été historiquement largement sous-estimés et mis à l'écart des études évolutives car remettant en question le concept d'« espèce biologique ». Ainsi les populations hybrides étaient considérées comme des impasses évolutives pour les espèces et il n'était par conséquent pas nécessaire de les considérer lors des études traitant de la

conservation de la biodiversité (O'Brien & Mayr, 1991; Rhymer & Simberloff, 1996).

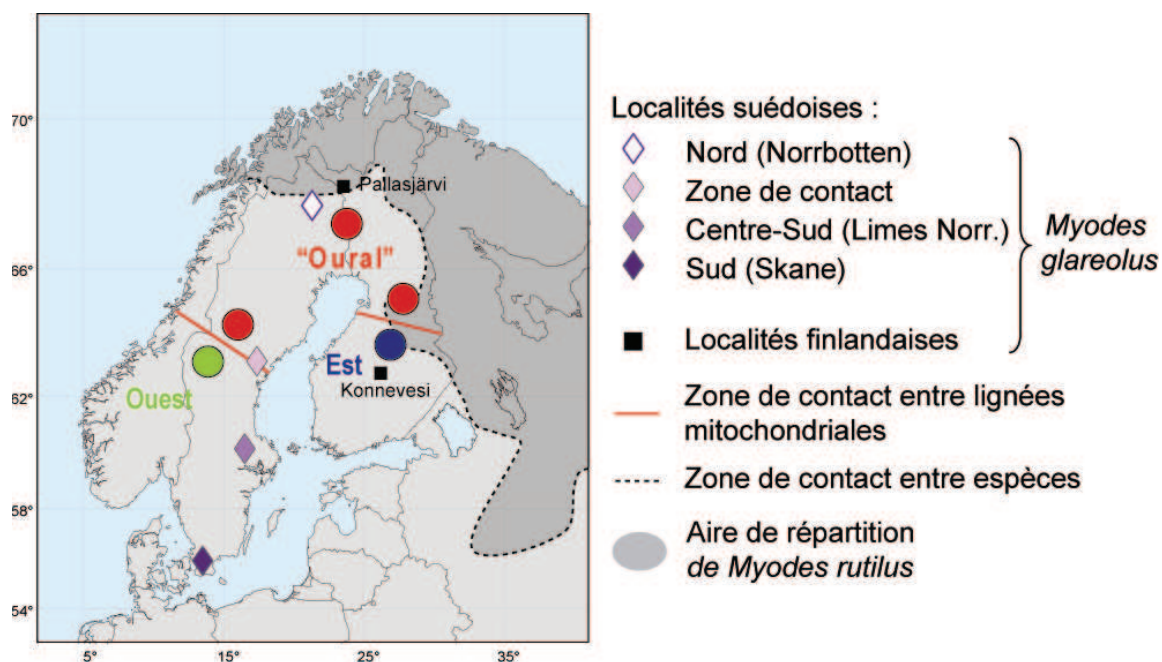


Figure 1. Carte de la Fennoscandinavie présentant les quatre zones d'échantillonnage suédoises (Nord, Zone de contact, Centre-sud et Sud) ainsi que les deux localités de Finlande ajoutées à l'analyse. Les deux zones de contact entre les trois lignées mitochondriales sont représentées ainsi que la zone de contact entre l'espèce *M. glareolus* et l'espèce *M. rutilus*.

Malgré tout un nombre croissant d'études a montré ces dernières années que les processus d'hybridation devaient être considérés comme une force évolutive importante. Entre autre, les hybrides étant caractérisés par des recombinaisons d'allèles issus des deux espèces parentales (Rieseberg et al., 1999), il est possible qu'ils succèdent aux espèces parentales dans le cas de changements environnementaux entraînant des processus de sélection en leur faveur (Harrison, 1993). D'autre part, si l'ADNmt ne se recombine pas, des transferts peuvent s'effectuer d'une espèce à l'autre. Des cas d'introggression du génome mitochondrial d'une espèce arctique au sein d'une espèce tempérée chez le saumon (Doiron et al., 2002) et le lièvre (Melo-Ferreira et al., 2005) ont ainsi été observés. Le génome mitochondrial contribuant à la production énergétique des cellules (Gerber et al., 2001; Ballard & Whitlock, 2004), ce type d'hybridation favoriserait l'adaptation de l'espèce tempérée à des milieux plus froids.

Chez le campagnol roussâtre, il a été montré que des populations nordiques de campagnol roussâtre portaient l'ADNmt de l'autre espèce (Tegelström et al., 1987; Deffontaine et al., 2005) malgré le fait que leur morphologie dentaire (Chapitre 1.1 - Ledevin et al., 2010) soit clairement du type *Myodes glareolus*. L'étude de Deffontaine et al. (2005) a

permis de mieux caractériser ce phénomène en introduisant le terme de « lignée Oural », s'étendant du nord de la Fennoscandinavie jusqu'au sud de l'Oural. Actuellement l'origine de cette lignée reste encore incertaine et deux hypothèses ont été proposées par Deffontaine-Deurbroeck (2008) dans sa thèse de doctorat. (1) Elle pourrait être issue d'un cas d'hybridation ponctuelle ayant eu lieu au sein d'un refuge situé au sud de l'Oural, expliquant son nom actuel de « lignée Oural » (Abramson et al., 2009). (2) Le phénomène d'hybridation entre les deux espèces serait plus fréquent et se produirait régulièrement au niveau de la zone de contact existant entre les deux espèces.

Cette étude présente deux objectifs. Le premier est d'étudier les patrons de différenciation morphologique du campagnol roussâtre en Suède afin de déterminer si la zone de contact identifiée dans le centre du pays par l'ADNmt trouve une expression phénotypique. Le second objectif est d'essayer d'éclaircir la question de l'origine de la lignée Oural en se penchant sur le cas de l'hybridation entre les deux espèces. Quatre populations suédoises et une finlandaise ont été considérées (Fig. 1) d'un point de vue morphométrique et moléculaire. L'analyse d'un marqueur nucléaire (microsatellites) a été intégrée à cette étude afin d'établir une comparaison avec les résultats de l'analyse morphologique. Je présenterais donc une brève synthèse des résultats génétiques obtenus par Lehanse (2010) sur l'ADNmt (cyt. *b*) et l'ADNn (microsatellites). L'étude morphométrique, mise en regard des analyses génétiques, nous offre ainsi l'opportunité de mieux comprendre la structuration du campagnol roussâtre en Scandinavie et d'essayer de déterminer si l'introggression entre *Myodes glareolus* et *Myodes rutilus* est le résultat d'une hybridation ponctuelle passée, où si ce phénomène se produit régulièrement au niveau de la zone de contact entre les deux espèces.

Matériel et Méthodes

Échantillonnage

Pour cette étude un total de 192 campagnols roussâtres et de 25 campagnols de la taïga ont été considérés. Parmi les 192 spécimens, 70 ont été piégés dans quatre régions différentes de Suède: Sud (Skane, N=10), Centre-sud (Limes Norrlandicus, N=20), zone de contact entre lignées mitochondriales Ouest européenne et Oural (N=20) et Nord (Norrbotten, N=20) (Fig. 1). Au niveau de la zone de contact, le piégeage a été réalisé sous forme de deux transects perpendiculaires à la zone de contact en question. Dans le but de replacer ces échantillons dans un contexte biogéographique plus global et de considérer toutes les lignées mitochondriales susceptibles de se rencontrer au niveau de la

Fennoscandinavie, 112 spécimens analysés dans l'étude des lignées à l'échelle européenne (Chapitre 1.1 - Ledevin et al., 2010) et identifiés comme appartenant aux lignées Est (N=33) et Ouest (N=52) européennes ainsi qu'à la lignée Oural de Finlande (N=12) et de Russie (N=25) ont été intégrés au jeu de données.

Dans le cas des analyses moléculaires réalisées sur le matériel suédois, Lehanse (2010) a considéré les mêmes spécimens que pour l'analyse morphologique (N=70) en ajoutant cependant des spécimens au niveau de la zone de contact (N=132). De plus cinq spécimens supplémentaires provenant de la région de Konnevesi en Finlande ont également été intégrés.

Analyse de forme de la UM3 et traitement statistique des données

Pour chaque spécimen le contour 2D de la UM3 gauche a été numérisé et une analyse de contour (TFE) a été réalisée comme décrite dans le Chapitre 1.1 (Ledevin et al., 2010).

Des analyses multivariées ont été utilisées pour l'étude de forme de la molaire, chaque contour étant décrit par un jeu de 37 variables. Une analyse en composante principale (ACP) basée sur une matrice de corrélation a été réalisée. Les deux premiers axes synthétiques résultant de cette analyse ont été représentés afin d'étudier les patrons de différenciation inter- et intra-spécifique.

En complément, une analyse de variance multivariée (MANOVA) a été réalisée sur les mêmes variables afin de minimiser l'influence de la variation intra-groupe et de mettre en évidence les patrons de différenciation inter-groupes sur des axes synthétiques canoniques de forme. Les différences de forme ont été testées statistiquement en utilisant le test Hotelling T^2 (test considéré: Wilks' Lambda). Les individus testés ont été de plus réattribués aux différentes lignées mitochondriales selon la matrice de reclassification afin de déterminer la ou les lignées dominantes au sein de chaque localité. Les traitements statistiques ont été réalisés sur le logiciel Systat 11.

Résultats

Analyse morphométrique

Différenciation inter-spécifique et identification des individus suédois

Dans un premier temps une ACP a été réalisée et la totalité des individus *Myodes*

glareolus et *Myodes rutilus* a été représentée sur les deux premiers axes principaux (PC1= 34.4% et PC2= 15.0% de la variance totale) (Fig. 2A). Une nette opposition est observée entre les deux espèces le long de l'axe 1, l'axe 2 représentant plutôt la variation intra-spécifique de chaque espèce. Si l'on s'intéresse aux populations suédoises, les spécimens appartiennent majoritairement au nuage de variabilité du campagnol roussâtre. Seul un individu appartenant à la localité nordique de Norrbotten ne s'intègre pas au nuage et tend à se rapprocher légèrement des *Myodes rutilus* le long de l'axe 1.

Une analyse discriminante réalisée sur les deux espèces à l'exception des individus suédois confirme la différenciation entre *Myodes glareolus* et *Myodes rutilus* (test du Wilks' Lambda, $P < 0.001$). Afin de déterminer statistiquement l'espèce à laquelle sont réattribués les spécimens suédois, ceux-ci n'ont pas été intégrés à l'analyse discriminante, permettant de les réattribuer *a posteriori* à l'une ou l'autre des espèces. 100% des individus suédois ont été attribués au campagnol roussâtre.

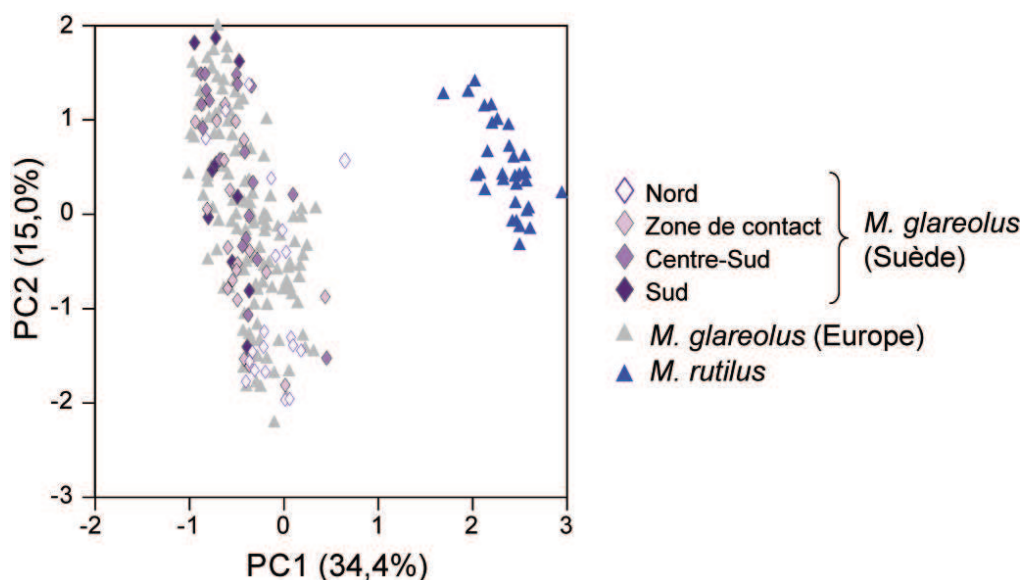


Figure 2. Différences de forme de la UM3 entre *Myodes glareolus* et *Myodes rutilus* représentée sur les deux premiers axes d'une analyse en composante principale réalisée sur les coefficients de Fourier. Le nuage de variation des trois lignées continentales de *Myodes glareolus* (Est/Ouest européennes et Oural) est représenté en grisé. Chaque point représenté correspond à un individu suédois (losanges) ou à un *Myodes rutilus* (triangle).

Patrons de différenciation morphologique des spécimens suédois

Les spécimens suédois étant identifiés comme appartenant au campagnol roussâtre, je suis ensuite passé à l'échelle intra-spécifique afin d'étudier la structuration morphologique des populations suédoises.

A une échelle si fine, la variation intra-spécifique est trop importante pour permettre l'émergence d'un patron de différenciation clair sur la base d'une ACP. Par conséquent, dans

cette partie je me suis basé uniquement sur l'interprétation de résultats obtenus grâce à une analyse canonique qui permet de se concentrer sur l'étude de différences entre groupes. Malgré tout, même dans ce cas la variation intra-population est assez importante par rapport à la différenciation inter-population. Par souci de lisibilité, les graphiques présentés dans cette partie ne représenteront pas la totalité des individus, mais les moyennes par groupe.

Une analyse discriminante a été réalisée avec pour variable de groupement les lignées validées précédemment (Chapitre 1.1 - Ledevin et al., 2010), sans prise en compte des individus suédois dans le calcul. Une différence significative existe entre les lignées Est européenne, Ouest européenne et Oural (Wilks' Lambda, $P < 0.001$), ce qui est en accord avec les résultats précédemment présentés dans cette thèse. Visuellement cette différenciation entre les lignées ressort dans l'espace morphologique composé des deux premiers axes canoniques (Fig. 3, CA1 = 75,2% et CA2 = 24,8% de la variance totale), la lignée Ouest européenne se différenciant des deux autres lignées le long de l'axe 1. Les lignées Est européenne et Oural se différencient quant à elle le long de l'axe 2. Les individus suédois n'ayant pas participé au calcul des axes, ils ont été projetés dans l'espace morphologique. Les trois populations du sud de la Suède (Skane), du centre-sud (Limes Norrlandicus) et de la zone de contact présentent clairement une morphologie proche des spécimens de la lignée Ouest européenne avec de plus une importante ressemblance de forme entre les deux premières, situées les plus au sud de la Suède. La population la plus nordique présente elle une morphologie intermédiaire entre la lignée Oural et la lignée Est européenne, en étant toutefois plus proche de cette dernière.

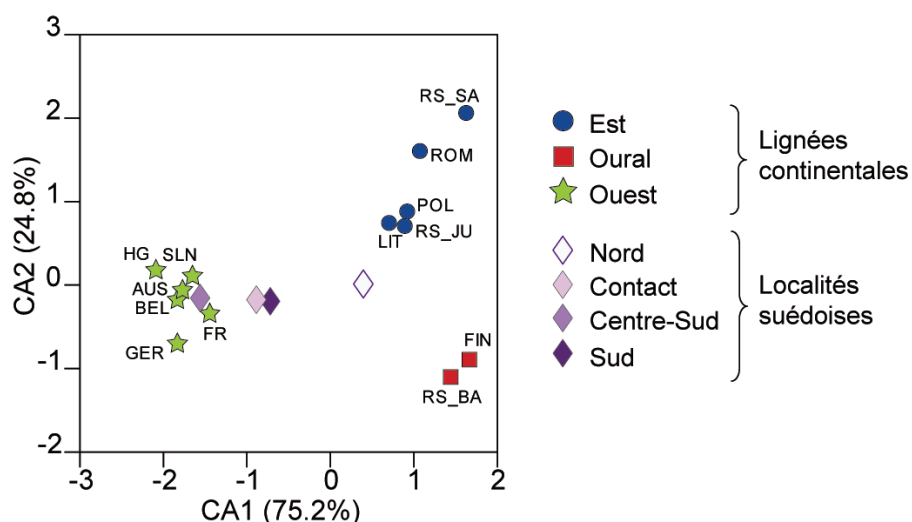


Figure 3. Variations de forme de la troisième molaire supérieure au sein de *Myodes glareolus* représentées sur les deux premiers axes d'une analyse canonique des coefficients de Fourier. La variable de groupement correspond aux lignées mitochondriales. Les individus suédois n'ont pas participé au calcul et ont été projetés *a posteriori* sur les axes. Chaque point correspond à la moyenne d'une localité.

Si on s'intéresse maintenant aux résultats de la reclassification des individus suédois au sein des trois lignées mitochondriales (Tableau 1), on se rend compte qu'une majorité d'individus est attribuée à la lignée Ouest européenne au sud (70% et 85% au sud et centre-sud respectivement) et au niveau de la zone de contact (75%). La population nordique présente des résultats plus balancés et serait dominée par des individus de la lignée Est européenne (40%) avec une part non négligeable d'individus associés aux lignées Ouest européenne (35%) et Oural (25%).

Régions suédoises	Total individus/région	Réattributions au sein des lignées continentales		
		Ouest Eur.	Est Eur.	Oural
Sud	10	7 (=70%)	2 (=20%)	1 (=10%)
Centre-sud	20	17 (=85%)	2 (=10%)	1 (=5%)
Contact	20	15 (=75%)	2 (=10%)	3 (=15%)
Nord	20	7 (=35%)	8 (=40%)	5 (=25%)

Tableau 1. Attributions des individus suédois à l'une des trois lignées continentales (Ouest et Est européenne et Oural) suite à une analyse discriminante réalisée avec comme variable de groupement les lignées mitochondriales (individus suédois non inclus dans le calcul). Le nombre d'individu par région est indiqué. Pour chaque région, le pourcentage de spécimens suédois attribués aux trois lignées est donné.

Sur la base de la morphologie, les populations suédoises présentent donc une structuration mettant en évidence une dominante de la lignée Ouest européenne dans le sud du pays mais aussi au niveau de la zone de contact. Au nord la situation semble plus complexe, un mélange entre les lignées Est et Ouest européennes et Oural semblant intervenir en proportions relativement similaires. Concernant la lignée Oural, celle-ci ne domine aucune des populations étudiées malgré une présence de plus en plus marquée du sud vers le nord (Passant de 5 à 10% au sud, à 25% au nord).

Comparaison avec les analyses moléculaires : résumé des résultats de Lehanse (2010)

Les données génétiques basées sur l'ADNmt différencient bien les lignées Est et Ouest européennes et la lignée Oural (Fig. 4A). Les spécimens du nord de la Suède présentent clairement un ADNmt du type *M. rutilus* alors que ceux de la zone de contact et des deux localités du sud se regroupent avec les spécimens présentant un ADNmt de type Ouest européen. Concernant la localité du sud de la Finlande, les spécimens présentent un ADNmt de type Est européen.

L'étude de l'ADNn (microsatellites) met en évidence quatre groupes géographiques distincts (Fig. 4B). Une bonne résolution est observée, les spécimens appartenant à la lignée mitochondriale Est européenne (spécimens finlandais de référence) se groupant ensemble, de même que ceux de la lignée Ouest européenne (localité sud et centre-sud de Suède). La zone de contact présente quant à elle un patron particulier, qui est interprété comme un mélange au niveau du génome entre lignées Est et Ouest européennes.

Finalement, des résultats plus contrastés sont observés pour les spécimens identifiés comme appartenant à la lignée mitochondriale Oural trouvée au nord de la Suède (Norrbotten). Ils se répartissent entre deux groupes distincts : le premier correspondrait à la lignée Est européenne alors que le second présente une signature inédite qui correspondrait à des exemples d'hybrides interspécifiques *M. glareolus*/*M. rutilus*.

Discussion

Mise en évidence d'une structure complexe des populations suédoises

L'étude de l'ADNmt a mis en évidence un patron de différenciation des lignées Est européenne, Ouest européenne et Oural très clair (Fig. 4A), avec la confirmation de l'existence de deux zones de contact : la première localisée en Suède entre la lignée Ouest européenne et la lignée Oural (Jaarola et al. 1999, Abramson et al. 2009), et la seconde en Finlande entre la lignée Est européenne et la lignée Oural (Tegelström, 1987 ; Deffontaine et al., 2005).

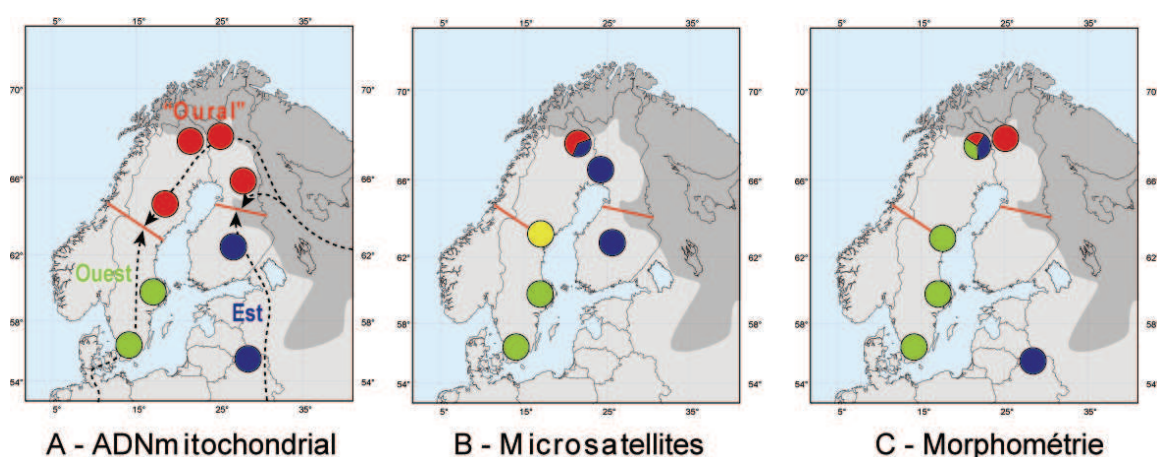


Figure 4. Résumé des résultats obtenus sur les différents marqueurs. Les lignées continentales sont représentées en couleur (Ouest européenne = vert ; Est européenne = bleu ; Oural = rouge). La lignée non-déterminée par les microsatellites au niveau de la zone de contact est représentée en jaune. L'aire de répartition de *M. rutilus* est indiquée au nord en gris.

Cependant, la considération de deux nouveaux marqueurs complexifie ce patron. L'étude de la forme de la UM3 et des microsattellites concorde dans un premier temps avec les résultats de l'ADNmt, les lignées Est et Ouest européennes étant bien différenciées notamment dans les zones méridionales de la Fennoscandinavie (Fig. 4B et C). La présence de la lignée Ouest européenne dans le sud de la Suède peut ainsi s'expliquer par des facteurs historiques. En effet, suite au dernier maximum glaciaire qui s'est terminé il y a environ 19 000 ans (Yokoyama et al., 2000), la recolonisation de la Fennoscandinavie par le campagnol roussâtre s'est effectuée par deux routes spécifiques dont la première à s'ouvrir fut celle passant par le sud (Jaarola et al., 1999). La mise en place de ponts successifs a permis le passage de populations provenant d'Europe de l'ouest, expliquant ainsi l'occurrence de cette lignée au sud de la Suède.

A l'opposé, la congruence des trois marqueurs est nettement moins évidente au niveau de la zone de contact située en Suède ainsi qu'au nord. Concernant les spécimens de la zone de contact, ils présentent un génome nucléaire résultant possiblement d'un mélange très localisé entre les lignées Est et Ouest européennes (Fig. 4B). Cependant, les résultats morphologiques ne fournissent pas d'argument en faveur de cette hypothèse, cette population présentant une signature de type Ouest européenne. Concernant le nord de la Suède (Norrbotten), cette région est dominée exclusivement par la lignée mitochondriale Oural. Or, les microsattellites comme la morphologie de la UM3 ont mis en évidence une structure plus complexe de cette région. Ainsi, les microsattellites identifieraient une partie des spécimens comme similaires à ceux de la lignée mitochondriale Est européenne tandis que les autres présenteraient une signature inédite. Dans le cas de la UM3 des spécimens présentant des morphologies de type lignées mitochondriales Ouest européenne, Est européenne et Oural y sont observés. D'après ces résultats, cette région correspondrait donc à un carrefour intra-spécifique important où des phénotypes et des génomes appartenant aux trois « lignées mitochondriales continentales » se rencontrent. Cette zone de contact était masquée sur l'ADNmt par le fait que l'haplotype *rutilus* semble fortement sélectionné dans les environnements nordiques car susceptible de donner un avantage aux spécimens le comportant. Au final, les patrons de différenciation observés sur les différents marqueurs ne sont pas si différents mais expriment une contribution variable des génomes de différentes origines. Par exemple, la morphologie favorise l'idée d'une forte contribution de la lignée Ouest européenne jusqu'au nord de la Suède, bien au-delà de la zone de contact mise en évidence sur l'ADNmt.

Finalement nos résultats mettant en avant une zone de contact au nord de la Fennoscandinavie chez le campagnol roussâtre sont cohérents avec des études similaires

réalisées sur d'autres types d'organismes comme le chabot commun (Kontula & Väinölä, 2004) ou la vipère berus (Carlsson et al., 2004). Il s'agirait donc bien d'une région charnière pour l'étude des processus de recolonisation de la Fennoscandinavie en période de recouvrement postglaciaire, faisant la jonction entre les deux routes de recolonisation du nord, l'une passant par le Danemark (sud), l'autre passant par la Russie et la Finlande (nord-est).

Dynamique temporelle et origine de la lignée Oural

En regard de la complexité observée dans le nord sur la base de la morphologie et des microsatellites, et sachant qu'à Norrbotten tous les spécimens présentaient le même ADNmt de type *M. rutilus* (Fig. 4A), la définition de la lignée Oural comme proposée par Deffontaine et al. (2005) n'apparaît plus adaptée puisque visiblement paraphylétique (issue de l'hybridation de *M. rutilus* avec la lignée Ouest européenne d'une part et Est européenne d'autre part).

Cependant, l'existence d'une lignée hybride *M. glareolus*/*M. rutilus* (terminologie proposée par Lehanse, 2010) n'en est pas obligatoirement remise en question. En effet que ce soit sur le marqueur morphologique et possiblement les microsatellites, une signature particulière de cette lignée émerge. Les microsatellites ont mis en évidence dans la localité de Norrbotten un patron inédit ne correspondant à aucune autre population. L'hypothèse la plus probable serait d'expliquer cette observation par l'introgression d'une faible part du génome nucléaire de *M. rutilus* au sein de *M. glareolus* (Lehanse, 2010). Cette hypothèse est pour l'instant impossible à confirmer sans analyses moléculaires complémentaires sur des individus identifiés comme de « purs » *Myodes rutilus*, mais les résultats obtenus sur la forme de la UM3 permettent de fournir un argument supplémentaire en ce sens. En effet, l'étude qui a été réalisée a montré qu'un individu se démarquait du nuage de variation de *M. glareolus*, se décalant vers le nuage de variation de *Myodes rutilus*. Cet individu provenait justement de la localité de Norrbotten et malgré le fait qu'il soit tout de même attribué à l'espèce *Myodes glareolus*, l'écart vers l'autre espèce pourrait traduire ce phénomène d'hybridation actuelle suspectée par l'analyse des microsatellites. Si des cas d'hybridation inter-spécifique ont déjà été observés dans des populations en conditions contrôlées (Osipova & Soltis, 2006, 2008), mon étude mettrait ici en évidence un cas rare d'hybridation *in natura*. Ceci invaliderait donc l'hypothèse d'une hybridation inter-spécifique qui se serait passée ponctuellement dans un refuge au sud de l'Oural (Deffontaine Deurbroeck, 2008).

Conclusion

Mes résultats, combinés à l'analyse de marqueurs nucléaires, ont permis de mettre en évidence une structure complexe au sein des populations suédoises de campagnol roussâtre non détectée par l'ADNmt (Deffontaine et al., 2005). Cette structure s'explique par le processus de recolonisation de la Fennoscandinavie qui s'est effectué par le sud et le nord-est (Jaarola et al., 1999), aboutissant notamment à la mise en contact au nord de la Suède de : (1) deux espèces de campagnol, et (2) trois lignées de campagnol roussâtre (Est et Ouest européennes et Oural).

Cette étude ouvre de nouvelles portes quant à l'explication de l'origine de la troisième lignée observée en Suède, la lignée Oural. Jusque là considérée comme le résultat d'une hybridation ancienne et ponctuelle au sein d'un refuge glaciaire situé dans le sud de l'Oural (Deffontaine Deurbroeck, 2008 ; Osipova & Soltin, 2006, 2008), l'identification d'un individu présentant un patron dentaire intermédiaire entre *M. glareolus* et *Myodes rutilus* laisse penser que des phénomènes d'hybridation inter-spécifique actuels ont lieu le long de la zone de contact entre les deux espèces. Suite à ces observations, Lehanse (2010) propose de renommer la lignée Oural en « Lignée hybride *M. glareolus*/*M. rutilus* », correspondant mieux à son histoire évolutive. La redéfinition de cette lignée ne remet pas en question les études que j'ai réalisées au cours de cette thèse puisque cette lignée hybride présente une signature retrouvée grâce à l'étude morphologique.

Références

- Abramson, N. I., Rodchenkova, E. N. & Kostygov, A. Y. 2009 Genetic variation and phylogeography of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Arvicolinae, Rodentia) in Russia with special reference to the introgression of the mtDNA of a closely related species, red-backed vole (*Cl. rutilus*). *Russian Journal of Genetics* **45**, 533-545.
- Ballard, J. W. O. & Whitlock, M. C. 2004 The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.
- Carlsson, M., Söderberg, L. & Tegelström, H. 2004 The genetic structure of adders (*Vipera berus*) in Fennoscandia: congruence between different kinds of genetic markers. *Molecular Ecology* **13**, 3147-3152.
- Deffontaine-Deurbroeck, V. 2008 Histoire évolutive du campagnol roussâtre (*Myodes (Clethrionomys) glareolus*) en Eurasie. *Thèse de Doctorat*, Université de Liège, 1-190.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J. B. & Michaux, J. R. 2005 Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* **14**, 1727-1739.
- Doiron, S., Bernatchez, L. & Blier, P. U. 2002 A comparative mitogenomic analysis of the potential adaptative value of Arctic Charr mtDNA introgression in Brook Charr populations (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1902-1909.
- Gerber, A. S., Loggins, R., Kumar, S. & Dowling, T. E. 2001 Does non-neutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Annual Review of Genetics* **35**, 539-566.
- Harrison, R. G. 1993 Hybrid zones and the evolutionary process. *Oxford University Press, New York*, 1-374.
- Jaarola, M., Tegelström, H. & Fredga, K. 1999 Colonization history in Fennoscandian rodents. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 113-127.
- Kontula, T. & Väinölä, R. 2004 Molecular and morphological analysis of secondary contact zones of *Cottus gobio* in Fennoscandia: geographical discordance of character transitions. *Biological Journal of the Linnean Society* **81**, 535-552.
- Ledevin, R., Michaux, J. R., Deffontaine, V., Henttonen, H. & Renaud, S. 2010 Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**, 681-694.
- Lehanse, B. 2010 Étude génétique d'une zone de contact en Suède entre deux lignées de campagnols roussâtres, *Myodes glareolus*. *Mémoire de Master, Université de Liège*, 1-76.
- Mallet, J. 2005 Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 229-237.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Suchentrunk, F., Ferrand, N. & Alves, P. C. 2005 Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* **14**, 2459-2464.
- O'Brien, S. J. & Mayr, E. 1991 Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science* **251**, 1187-1188.
- Osipova, O. V. & Soltin, A. A. 2006 Bank and red vole hybridization under experimental conditions. *Doklady Biological Sciences* **410**, 381-383.
- Osipova, O. V. & Soltin, A. A. 2008 Experimental simulation of ancient hybridization between bank and red voles. *Doklady Biological Sciences* **420**, 169-171.
- Rhymer, J. M. & Simberloff, D. 1996 Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Rieseberg, L. H., Archer, M. A. & Wayne, R. K. 1999 Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* **83**, 363-372.
- Tegelström, H. 1987 Transfer of Mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*). *Journal of Molecular Ecology* **24**, 218-227.
- Yokoyama, Y., Lambeck, K., De Deckler, P., Johnston, P. & Fifield, L. K. 2000 Timing of the Last Glacial Maximum from observed sea-level minima. *Nature* **406**, 713-716.

Résumé du Chapitre 1

Le premier chapitre de cette thèse s'est intéressé à la structuration intra-spécifique mise en évidence chez le campagnol roussâtre à l'échelle de l'Europe en se basant sur l'étude des molaires.

Deux faits marquants en lien avec la dynamique de recolonisation postglaciaire du milieu ont dans un premier temps été mis en évidence : (1) l'endémisme des lignées méditerranéennes, caractérisé par une forte différenciation morphologique des lignées Espagnole et Italienne, (2) la différenciation des lignées continentales Ouest et Est européennes malgré une faible divergence génétique (ADNmt) et un fort recouvrement entre leurs aires de répartition. Une signature particulière de la lignée Oural (issue de l'hybridation de *M. glareolus* avec *M. rutilus*) a de plus été observée.

Les deux études suivantes de ce chapitre m'ont permis de caractériser morphologiquement deux nouvelles lignées de campagnol roussâtre identifiées sur la base de l'ADN mitochondrial: la lignée Basque et la lignée Gargano. Ces deux études mettent en avant l'existence de micro-zones refuges à proximité de la péninsule espagnole et au sein même de la péninsule italienne, montrant qu'une complexité importante existe au sein des classiques refuges glaciaires méditerranéens. D'un point de vue phénotypique cela se traduit par des divergences marquées de ces populations, liées à leur histoire évolutive ponctuée de phases d'isolement.

Finalement, dans une troisième partie je me suis intéressé à des populations de Fennoscandinavie, véritable carrefour de voies de recolonisation au nord de l'Europe. Deux zones de contact entre lignées mitochondriales ont été étudiées et ont permis de mettre en évidence une complexité non détectée par l'ADNmt. Finalement, l'origine de la lignée Oural définie à l'origine sur la base de l'ADNmt a été précisée grâce aux analyses de forme et aux analyses moléculaires (microsatellites) réalisées par Bernard Lehanse (mémoire de Master). L'occurrence d'un individu présentant une morphologie intermédiaire entre les deux espèces ayant été observée soutient l'hypothèse que cette lignée serait le résultat de phénomènes d'hybridation actuels ayant lieu le long de la zone de contact entre *M. glareolus* et *M. rutilus*.

Malgré un signal de différenciation inter-lignées relativement robuste, mes résultats ont révélé une variabilité intra-spécifique importante qui participe à brouiller les patrons de différenciation biogéographique. Le chapitre suivant a pour objectif de déterminer l'origine de cette variabilité.

Chapitre 2

Pourquoi une telle variabilité du patron dentaire chez *Myodes glareolus* ?

2.1.1 L'influence considérable de l'effet d'usure

Publication 3

Variations saisonnières du contour de la molaire: Un effet de l'usure?

Aurélie Guérécheau, Ronan Ledevin, Heikki Henttonen, Valérie Deffontaine, Johan R. Michaux, Pascale Chevret et Sabrina Renaud

Mammalian Biology
Vol. **75**, 311-319 (2010)

Avant-propos

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Master d'Aurélié Guérécheau (Ecole Normale Supérieure de Lyon), sous la supervision de Pascale Chevret (Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon / Université de Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive) et de Sabrina Renaud. Les individus considérés correspondent à ceux du jeu de données européen de référence que j'ai utilisé lors des précédentes études de ce chapitre, ils sont donc tous génotypés. De nouveaux spécimens de Finlande ont été fournis par Heikki Henttonen.

Les individus finlandais considérés dans cette analyse ont été piégés dans la même localité à des périodes de temps différentes, au printemps et à l'automne, offrant l'opportunité dans cette analyse préliminaire de tester l'influence de la période de capture sur les études morphométriques. En effet le campagnol roussâtre présente une dynamique démographique saisonnière marquée, entraînant des fluctuations démographiques au cours de l'année. Ainsi selon la période de piégeage, la structure d'âge des populations va changer et induire des assemblages de dents de degrés d'usure différents qui peuvent perturber les patrons de différenciation morphologique des dents.

L'influence de la structure d'âge, si elle s'avère importante lors d'études à l'échelle européenne, serait donc une source de variabilité non négligeable des études biogéographiques. Lors des campagnes de piégeage, l'échantillonnage est en effet basé en général sur une seule capture par localité à un instant « t », qui n'est pas forcément comparable entre localités.

ORIGINAL INVESTIGATION

Seasonal variation in molar outline of bank voles: An effect of wear?

Aurélie Guérécheau^{a,b}, Ronan Ledevin^a, Heikki Henttonen^c, Valérie Deffontaine^{d,e},
Johan R. Michaux^{d,e}, Pascale Chevret^b, Sabrina Renaud^{a,*}

^aPaléoenvironnement et Paléobiosphère UMR 5125, CNRS, Université de Lyon, Université Lyon 1, 2 rue Dubois, Campus de la Doua, F-69622 Villeurbanne, France

^bMolecular Zoology, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

^cFinnish Forest Research Institute, Vantaa Research Centre, POB 18, FIN-01301 Vantaa, Finland

^dUniversité de Liège, B22, Boulevard du Rectorat, 4000 Liège, Belgium

^eCBGP, Campus international Agropolis de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montpellier-sur-Lez Cedex, France

Received 8 January 2009; accepted 19 March 2009

Abstract

Morphometric characters can be of use for elucidating the evolutionary history of species by providing an insight into the selective pressure related to the character of interest, and by allowing integration of fossil specimens. This potential interest of phenotypic characters, however, depends on how much other sources of variation, such as the life-history of the animal, may blur an evolutionary signal. For instance, age structure varies along the year, causing in turn various assemblages of wear stages in the teeth sampled at a given place and time. In this context, we investigated the season of trapping as potential source of variation in the size and shape of the molar occlusal surface of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*.

The size and shape of the occlusal surface of the third upper molar was quantified using outline analysis in 60 bank voles from Finland, trapped at the same study site in successive spring and autumn. The occlusal surface clearly differed in size and shape between the two seasons of trapping. Using 3D imaging as a visual support, we interpret this difference as the result of differential wear. The population in autumn is dominated by young specimens with unworn teeth whereas spring populations are composed of old animals with worn down molars. The range of seasonal variation in tooth size and shape appears to be of the same order of magnitude as biogeographic variation, demonstrating that differential wear may have a strong impact on biogeographic and evolutionary studies. Yet, beyond the effect of trapping season, a biogeographic signal still emerged, related to the genetic lineages evidenced in other studies. In consequence, morphometric characters such as size and shape of molar occlusal surfaces appear as valuable tracers of biogeographic differentiation, but future studies should take seasonal variations into account for more robust interpretation.

© 2009 Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde. Published by Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Morphometrics; Rodentia; Arvicolinae; *Myodes*; Biogeography

*Corresponding author. Tel.: +33 4 72 44 83 77; fax: +33 4 72 43 18 88.

E-mail address: Sabrina.Renaud@univ-lyon1.fr (S. Renaud).

Introduction

Bank voles (*Clethrionomys* [proposed to be renamed as *Myodes*; Wilson and Reeder, 2005; however, this change being so far not widely established we kept the former name in the subsequent text] *glareolus*; Arvicolinae, Rodentia) are forest rodents present in all Europe, extending eastwards as far as Siberia. Genetic studies based on mitochondrial DNA showed the existence of several phylogeographic groups (Deffontaine et al. 2005) including Mediterranean lineages (Italy and Spain), and several lineages in central, western and northern Europe (Fig. 1). The differentiation of these phylogroups is the consequence of successive fragmentation of their habitats during glacial cycles, leading to repeated isolation of populations in various refugia (Deffontaine et al. 2005; Kotlík et al. 2006). Among these lineages, the Ural group is characterised by a mitochondrial DNA (mtDNA) similar to the mtDNA of the congeneric vole species, the red vole *Clethrionomys rutilus* (Fig. 1B) despite a *glareolus* nuclear DNA

(Tegelström 1987; Deffontaine et al. 2005). The occurrence of a *rutilus* mtDNA within a *glareolus* lineage has been attributed to an introgression of red vole mtDNA into bank vole, probably due to a hybridization event (Tegelström 1987; Deffontaine et al. 2005; Potapov et al. 2007).

The differentiation of these lineages occurred during the Pleistocene glacial cycles and molecular clock analyses estimate the time of this divergence as ~300 000 yrs. This is recent regarding the geological time scale. Ongoing morphometric studies nevertheless suggest that this phylogeographic differentiation may already have lead to significant phenotypic expression on the occlusal shape of upper molars (Ledevin et al. 2007). Such a result is promising for integrating paleontological data into phylogeographic studies, since teeth are the best conserved material in fossil deposits for small mammals such as voles. Another striking feature of these analyses, however, was the importance of the within-lineage variation. This raised the question of the source of such a variability interfering with the signal of phylogeographic differentiation.

Phylogeographic studies are based on samples trapped at various periods over the distribution area of the species, each locality being usually sampled once at a given date depending on trapping campaigns. Hence, seasonal and interannual variations in the population structure might underlie the important within-lineage variation observed on the third upper molar occlusal shape. As a first step to assess the sources of phenotypic variation, we focused on differences that may occur depending on the season of trapping and hence, on the age of the voles. First, differential reproduction success during summer and/or survival during harsh winter periods may constitute selective events shifting the composition of the population. Second, the age structure of the populations changes through the year, due to the seasonal reproduction periods (Tkadlec and Zejda 1998). In northern bank voles, breeding lasts from spring to autumn; hence animals trapped in spring are old, overwintered animals whereas trapping in autumn samples a variety of age classes, from relatively old to young animals born in summer.

Teeth get worn with the increasing age of the animal. The associated shape change of the 2D crown outline has been shown to be limited to old age classes in the wood mouse (Renaud 2005). However, wood mice are characterized by low-crowned molars, whereas voles display high-crowned, hypsodont teeth (Tesakov 1996). Many voles even display ever-growing teeth, although *Clethrionomys* presents an intermediate stage: molars are first unrooted at the beginning of the post-natal ontogeny, with subsequent apparition of oral and aboral roots that will grow all along the life of the animal (Lowe 1971). It seems that wear, and hence indirectly

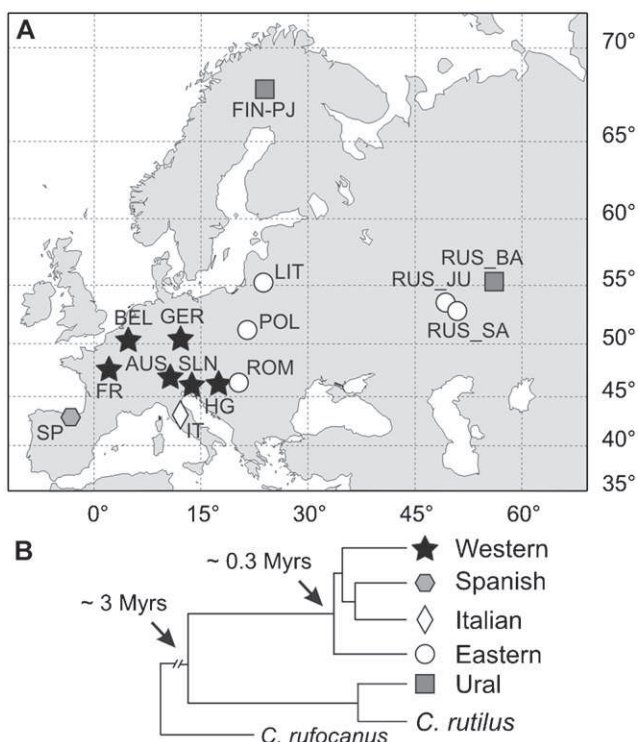


Fig. 1. Geographic sampling and phylogeographic background in bank voles. (A) Geographic localization and lineage attribution of the bank voles considered in the present study. The FIN_PJ locality corresponds to the studied area (Pallasjärvi, Finland). (B) Simplified tree representing the relationships among the Western, Eastern and Ural lineages, based on a neighbour-joining analysis of mtDNA haplotypes. Note that the Ural mtDNA is similar to the mtDNA of *Clethrionomys rutilus*. (after Deffontaine et al. 2005).

age, may affect the shape of the occlusal surface in bank voles (Borodin et al. 2006), and such an effect has been further proven to be of significant importance in some hypsodont mammals (Bair 2007).

As a first attempt to evaluate the occurrence of morphological difference in M3 occlusal shape due to season of trapping, samples composed of animals trapped at three successive time periods (spring 2000, spring 2001 and autumn 2001) in the same locality (Pallasjärvi, Finland) were considered. Using 2D outline analysis, the size and shape of the occlusal surface were quantified and compared among these samples. Finally, to evaluate how much such difference might interfere with geographic patterns, the amount of morphological variance caused by seasonal differences was compared with the range of phylogeographic variation (Ledevin et al. 2007).

Material and methods

Material

Bank voles were snap-trapped at Pallasjärvi, Finland (Fig. 1A), at three different periods: spring 2000, spring 2001 and autumn 2001. Sex was known for all spring animals. Autumn animals were non-breeding sub-adults for which sexual differences should not appear. Heads were preserved in 95%-ethanol and manually cleaned before the morphometric analysis. 20 individuals from

each group were analysed (10 males and 10 females when the sex was known).

In order to compare the seasonal variation of morphology with the phylogeographic signal, these animals were compared with bank voles from different European localities sampling most of the known lineages (Table 1; Fig. 1A), including a further sample from Pallasjärvi (12 specimens from autumn 2001). Bank voles at Pallasjärvi belong to Ural mtDNA clade, and the contact zone with the Eastern lineage in Finland and Western lineage in Sweden is more than 400 km south from Pallasjärvi.

All adult and sub-adult animals with completely erupted third molar were considered.

Data acquisition

Two kinds of morphometric analyses can be used to compare tooth shape: landmark-based methods and outline analysis. In bank voles, most landmarks would correspond to maxima and minima of curvature, whereas the outline of the occlusal surface efficiently describes the complex shape composed of neighbouring triangles (Navarro et al. 2004). For this analysis, the occlusal surface of the left third upper molar (M3), or a mirrored image of the right M3 if the left molar was damaged, was considered for each animal. The 2D outline of the occlusal surface was digitized as the external outline of the enamel ridge delimiting the crown. This 2D outline provided a good description of the occlusal surface of the molar since it was nearly flat

Table 1. Groups considered for seasonal differences at Pallasjärvi (Season) and geographic variations (Geography), with the number of specimens measured for the M3 occlusal surface (Nb.).

	Label	Country	Locality	Lineage	Nb.
Season	Spring 00	Finland	Pallasjärvi	Ural	10 ♀ + 10 ♂
	Spring 01	Finland	Pallasjärvi	Ural	10 ♀ + 10 ♂
	Autumn 01	Finland	Pallasjärvi	Ural	20
Geography	LIT	Lithuania	Alytus	East	4
	POL	Poland	Lublin	East	8
	ROM	Romania	Sovata	East	9
	RUS_JU (1)	Russia	Zhiguli mountains	East	4
	RUS_SA (2)	Russia	Ozerki	East	8
	RUS_BA	Russia	Bashkiria	Ural	25
	FIN_PJ	Finland	Pallasjärvi	Ural	12
	IT	Italy	Tuscany	Italy	10
	SP	Spain	Asturias	Spain	12
	AUS	Austria	Pfunds, Ventetal, Zemmtal	West	16
	BEL	Belgium	Blégne, Dalhem, Liège, Virelles	West	24
	FR	France	Loiret	West	2
	GER	Germany	Langenberg	West	3
	HG	Hungary	Bak	West	4
	SLN	Slovenia	Delnice, Livek	West	3

“Label” indicates the abbreviation used on the Figures; country and locality of trapping are mentioned as well as the phylogeographic lineage the specimens belong to.

in bank voles. A drawback is that the occlusal surface is directly affected by wear along the life of the animal. Unfortunately the vertical sides of the Arvicoline tooth prevent focusing at the base of the crown, a procedure that allows limiting the effect of wear in morphometric analyses of murine teeth (Renaud 2005).

The starting point was defined at the minimum between the first and the second anterior labial triangles. The OPTIMAS software (version 6.5) was used to extract the area enclosed by the outline, considered as an estimate of the tooth size, and the coordinates of 64 points at equal curvilinear distance on the outline.

Outline analyses

In order to quantify the shape of the molar, the 64 points along the outline were analysed by an Elliptic Fourier Transform (EFT), using the EFAwin software (Ferson et al. 1985). Such an analysis has been shown to efficiently describe variation in molar shape of Arvicoline rodents (Navarro et al. 2004).

Using this method, the outline is approximated by a sum of trigonometric functions of decreasing wavelength, the harmonics. Each harmonic is weighted by 4 coefficients A_n , B_n , C_n , D_n , and corresponds to an ellipse in the x,y plane. The first ellipse (defined by the coefficients A_1 , B_1 , C_1 , and D_1) contains information about the size, position and rotation of the molar, and has been used to standardize the outline data. Hence, the first three coefficients were not retained for the statistical analysis, as they correspond to residuals after standardization (Crampton 1995; Renaud et al. 1996). The fourth one, D_1 , corresponding to the minor axis of the ellipse, contains information about the elongation of the molar and was conserved in the analysis (Michaux et al. 2007).

Two different criteria are important to determine the rank of the last harmonic to be considered: the measurement error and the information content of each harmonic. A study on Arvicoline teeth suggested retaining 10 harmonics (Marcolini 2006).

In order to visualize the morphological changes between groups, average Fourier coefficients for each group were calculated, and the corresponding outline was reconstructed using an inverse Fourier method (Rohlf and Archie 1984) and the NTSYS software.

Statistical analyses

The differences in molar area between groups were tested by an analysis of variance (ANOVA). The shape of each molar was described by 37 Fourier coefficients (the last coefficient of the first harmonic, and 4 coefficients for each of the 9 subsequent harmonics). The difference in molar shape between seasonal groups

was tested by a MANOVA performed on the Fourier coefficients, and the associated Wilks' Lambda test.

The main patterns of shape variation among the three Pallasjärvi samples were expressed on synthetic shape axes obtained by a principal component analysis (PCA) on the Fourier coefficients. A PCA can be computed based on two different matrices: correlation or variance-covariance matrix. The analysis of the correlation matrix was used here because it is more sensitive to localized changes in the outline, as the Fourier coefficients are weighted for the analysis. A PCA on the variance-covariance matrix would have given more importance to the information of the first harmonics and to global shape differences (Michaux et al. 2007).

To further evaluate the importance of the seasonal differences compared with geographic differentiation, a PCA including both the seasonal samples from Pallasjärvi and the localities documenting geographic variation was performed. The existence of differences among lineages on the principal axes was tested by ANOVA on the principal scores.

Statistical analyses were performed using SYSTAT v.11 software and the R software ({R Development Core Team} 2008).

3D imaging

In order to further investigate the impact of progressive wear on the shape of the M3 occlusal surface, 3D images of the molar row were acquired for one specimen showing limited wear (PJS01-34, trapped in spring 2001). Data acquisition was performed using a μ CT-scanner, with slices spaced from 20 μ m and a final pixel size of 45 μ m (tomography performed by Voxcan, Lyon, France). Based on the 3D reconstruction, successive slices of the upper molar row were performed parallel to the occlusal surface, providing a visual approximation of the effect of progressive wear on the 2D shape of the occlusal surface.

Results

Influence of the trapping season on the size of the M3 occlusal surface

A possible sexual dimorphism of the molar area was tested and showed no difference between males and females in the pooled sample of springs 2000 and 2001 (ANOVA: $P = 0.964$), allowing to pool males and females together for subsequent analyses.

A significant difference in molar size between the three trapping seasons at Pallasjärvi was evidenced (ANOVA: $P < 0.001$). Animals trapped in spring 2000

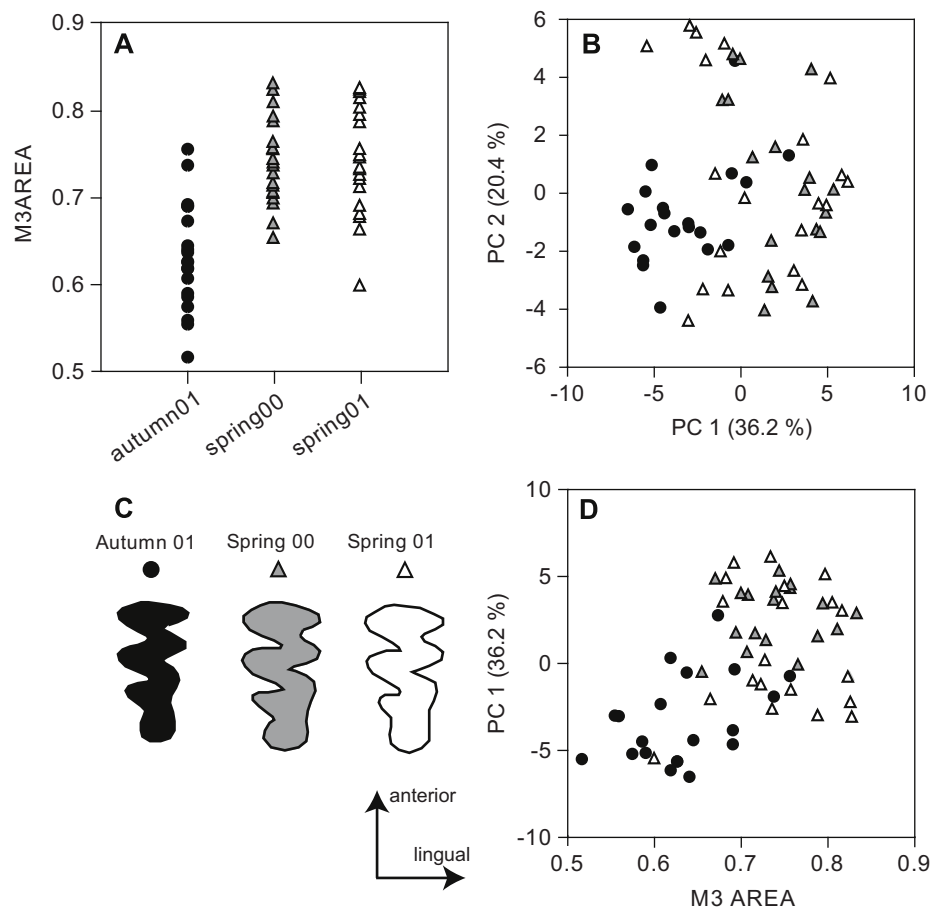


Fig. 2. Seasonal differences in the size and shape of the occlusal surface of third upper molars. (A) Size differences of M3 occlusal surface between spring and autumn populations. The area of the 2D outline is considered as the size estimator of the occlusal surface. Each dot corresponds to a single tooth. (B) Shape difference between seasons, displayed on the first two synthetic axes obtained by a PCA on the Fourier coefficients of the molar outlines. Each dot corresponds to a single tooth. (C) Reconstructed average outlines for each season of trapping, exemplifying the shape differences of the M3 occlusal surface involved. (D) Relation between the area of the teeth and the main axis of variation determined by the first principal component of the PCA.

and in spring 2001 have M3 occlusal surface of similar size (spring 2000 vs. spring 2001: $P = 0.912$), covering the same range of variation, in contrast to animals trapped in autumn 2001 (Fig. 2A) when smaller M3 occlusal surfaces occur in the population (spring vs. autumn animals: $P < 0.001$). Hence, the spring groups are not a mere sub-sample of the autumn one, despite an overlap in the size distribution.

Influence of the trapping season on the shape of the M3 occlusal surface

A test of sexual dimorphism of the molar shape showed no difference between males and females in springs 2000 and 2001 (MANOVA on the Fourier coefficients, Wilks' lambda $P = 0.100$). Males and females of each season were thus considered together.

A significant difference exists between the three groups of Pallasjärvi (MANOVA on the Fourier coefficients, Wilks' Lambda $P = 0.008$), showing that the M3 shape depends on the trapping season. The two spring samples display similar M3 shape ($P = 0.597$), differing from the autumn sample ($P = 0.003$). Accordingly, in the first principal plane of the PCA on the Fourier coefficients (PC1, 36.2% of the total variance, and PC2, 20.4%) the two spring populations overlap whereas they segregate from the autumn group (Fig. 2B). The average reconstructed outlines (Fig. 2C) show that the M3 occlusal surface in spring populations (composed of old, overwintered animals) has larger triangles in its foremost part, the posterior lobe being apparently shortened because of a backwards shift of the lingual posterior triangle. The labial posterior zone in contrast appears as straighter and longer, providing an elongated impression. In contrast the average outline corresponding to the autumn group (dominated by

young animals born in the summer) has compact, acute triangles in the foremost part of the tooth, but a short, undulated back-part.

Finally, an overall relationship seems to exist between the size and the shape of the M3 occlusal surface (Fig. 2D). Both spring samples cluster together towards large size and high PC1 scores without displaying a clear size/shape trend. In contrast the autumn group displays a wider size and shape distribution and hence, a size/shape relationship seems to emerge within this sample. The few autumn specimens with the largest occlusal surface cluster within the range of the spring samples, pointing to a common size/shape relationship in all the three Pallasjärvi samples (Fig. 2D).

3D imaging

The 3D image of a relatively unworn upper molar row (Fig. 3A) clearly shows that the posterior border of the tooth is not straight but tilted. Hence, progressive wear will affect the 2D outline of the occlusal surface by moving along this curved surface. This is exemplified by three successive slides mimicking progressive wear down the crown (Fig. 3B). The occlusal plane indeed shows a shortened and roundish back-part of the M3 typical of the autumn outline. By going down from 120 and then 320 μm , the back-part of the M3 extends and becomes more elongated in its labial posterior part,

corresponding to the reconstructed average outlines and to the observed increasing size of the occlusal surface of the spring populations.

Phylogeographic versus seasonal variability in M3 occlusal surface size and shape

The difference due to seasonal variation in the area of M3 occlusal surface is of the same order of magnitude as differences observed between distant localities in the Western lineage or between lineages such as Ural and Eastern lineages (Fig. 4A). Only the Italian and Spanish groups display a size clearly outside the range of variation covered by the seasonal variations at Pallasjärvi.

Regarding the shape of the M3 occlusal surface, the first principal plane of the PCA including all localities and the seasonal groups at Pallasjärvi expresses a large within-lineage variation without clear biogeographic structure (Fig. 4B). Except for the Spanish lineage shifted towards negative PC1 values (PC1: 29% of the total variance), the range of the different lineages overlap, leading to a weak inter-lineage differentiation on this axis (ANOVA among lineages on PC1: $P = 0.036$; without the Spanish lineage $P = 0.781$). Along the same PC1 axis, the seasonal groups at Pallasjärvi are dramatically opposed, with spring samples plotting towards positive values whereas autumn

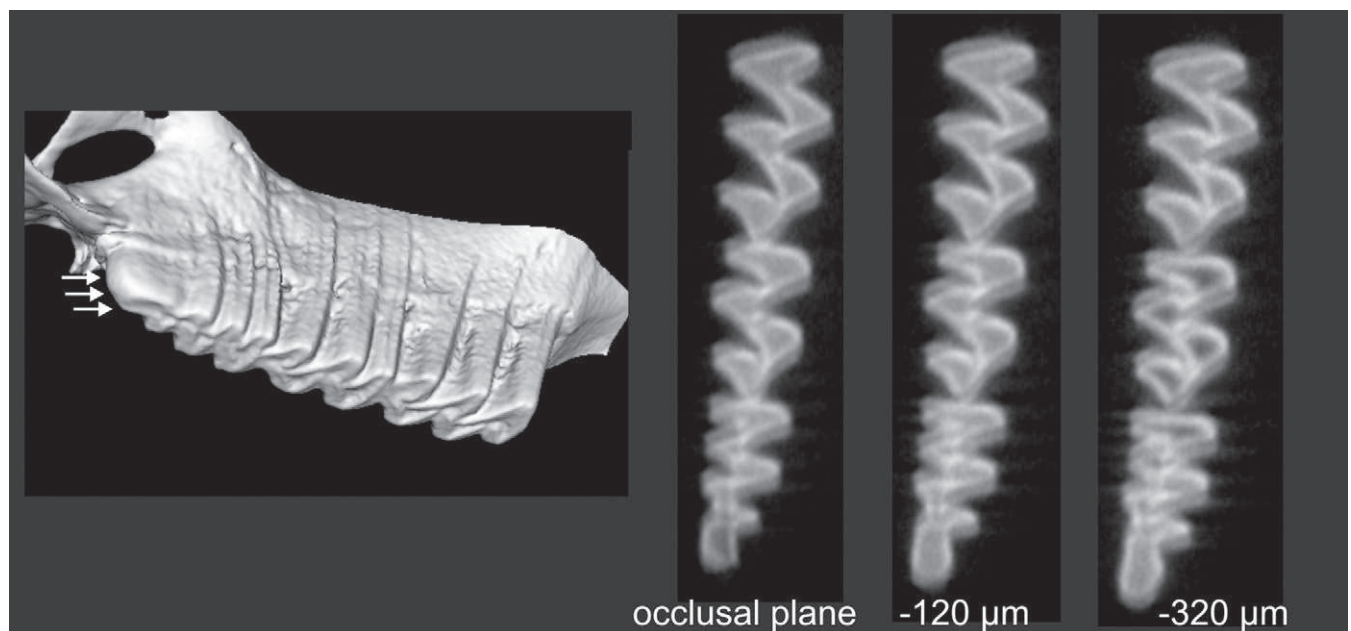


Fig. 3. 3D Image of an upper molar row and slices down the occlusal surfaces mimicking progressive wear. Left, a specimen from the autumn population 2001 with a high crown was selected for a μCT -scan, with slices spaced from 20 μm and a final pixel size of 45 μm (tomography performed by Voxcan, Lyon, France). Right, based on the 3D reconstruction, successive slices of the upper molar row were performed parallel to the occlusal surface, providing a visual approximation of the effect of progressive wear on the 2D shape of the occlusal surface.

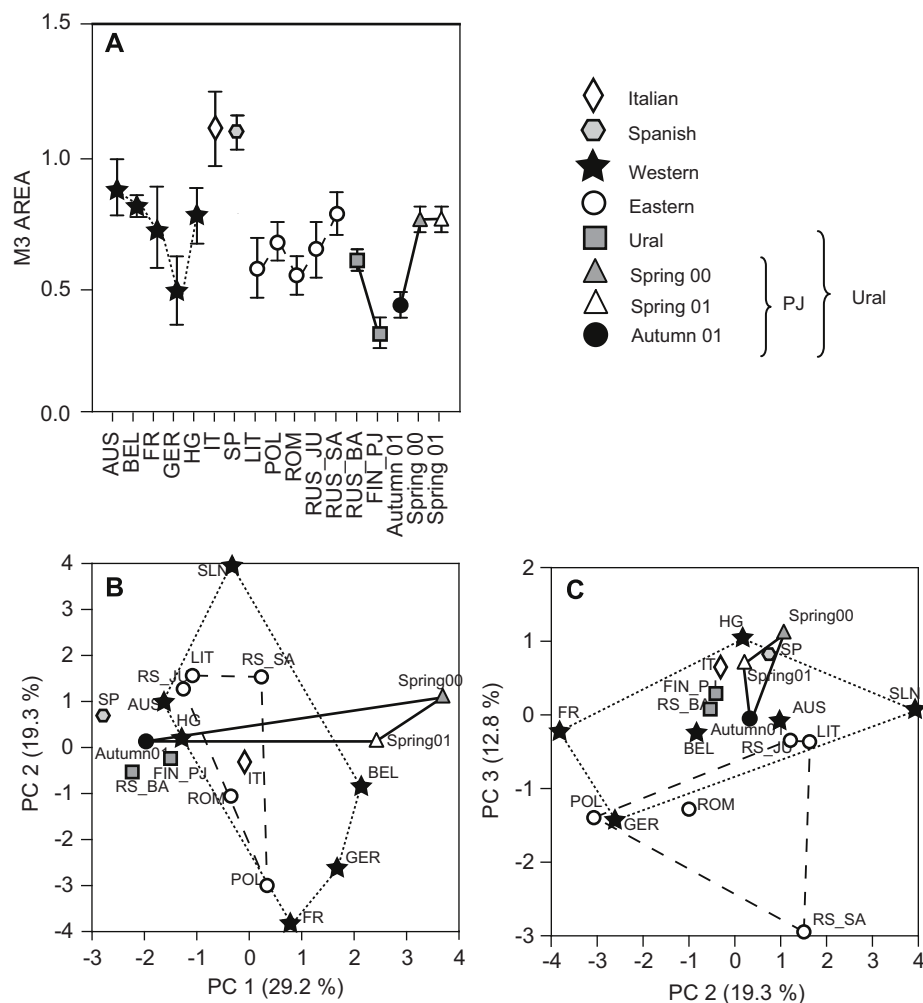


Fig. 4. Seasonal and phylogeographic variations of the shape and size of the M3 occlusal surface. Seasonal replicates at Pallasjärvi were considered together with localities sampling the geographic variation across northern Europe. (A) Size of the M3 occlusal surface, estimated by area of its 2D outline. Mean value and confidence interval of the molar area are represented for the different localities and the three seasonal replicates at Pallasjärvi. (B) and (C) Shape variation of the M3 occlusal surface, represented on synthetic shape axes obtained by a PCA on the Fourier coefficients. Each dot represents an average value per sample; symbols correspond to the lineage or season of trapping for Pallasjärvi samples. (B) First principal plane, PC1 vs. PC2. (C) Second principal plane, PC2 vs. PC3.

samples plots towards negative scores. This suggests that this axis is heavily influenced by temporal variability occurring within a given area, corresponding at Pallasjärvi to a difference between spring and autumn populations.

No phylogeographic structure emerge on the subsequent second axis (PC2, 19% of variance; ANOVA among lineages: $P = 0.773$) but geographic differences are displayed on the third axis (PC3, 13% of variance; ANOVA among lineages: $P < 0.001$). This corresponds mainly to a segregation of the Eastern lineage vs. all other groups along this axis (Fig. 4C). Noteworthy, the different seasonal samples of Pallasjärvi cluster together, and are close to the other Ural samples along this axis. Thus, inter-lineage differences emerge on this morpho-

space, by discarding the large intra-group variability characteristic of the first principal axis.

Discussion

Our study demonstrated that the size and shape of the molar occlusal surface, here the third upper molar, varies significantly in a given population of bank voles depending on the trapping season. Such an effect is not negligible compared with biogeographic differences and may thus interfere with the attempt of tracing short-term evolutionary processes based on such phenotypic characters.

Several, non-mutually exclusive hypotheses may contribute to explain such seasonal variations in the estimate of size and shape of the M3 occlusal surface. First, this may be a mere consequence of differences in age structure documented in a population at different times of the year, leading to measures of the occlusal surface on teeth worn at a different degree. The difference observed between spring and autumn samples at the same location would correspond to a difference between worn teeth observed in spring samples, composed of old, overwintered animals, and less worn teeth in autumn samples, when young animals born during summer dominate. Several evidences support this hypothesis. In the size/shape morphospace (Fig. 2C), a gradient seems to lead from small, variable autumn M3 samples to larger, less variable spring samples. This may correspond to mixed autumn populations composed of rather young animals with unworn teeth, and some older animals that overlap with the spring population exclusively composed of old, overwintered animals with worn teeth. In agreement, the tentative attempt to mimic progressive wear by successive slides down the crown on a 3D model of an unworn M3 provided significant size and shape variation of the occlusal surface that match the expected pattern based on seasonal differences. These variations would be due to a pyramidal backpart of the M3, leading to an increased occlusal surface and a change in its shape when the tooth crown is worn down.

The second hypothesis to explain seasonal differences in a population involves differential selection along the seasonal life cycle. For some reason, directly related or not to the morphology of the occlusal surface, specimens with a larger occlusal surface and larger foremost triangles on the M3 might better survive winter, whereas specimens with a reduced occlusal surface might better reproduce in summer. Only population genetics analyses may validate or discard this hypothesis (Ishibashi et al. 1997) and such a study is currently under way. Considering, however, the importance of variation in the occlusal surface only related to different degree of wear, makes the first hypothesis the most straightforward candidate to explain the seasonal differences observed.

Our results suggest that wear, and hence indirectly age, affect the outline of the occlusal surface. This variation is far from negligible compared with differentiation among lineages, being of the same order of magnitude and even emerging as the first order signal of a multivariate analysis including samples covering both seasonal and geographic variations. It may therefore interfere with tracing biogeographic history from teeth remains. Taking wear into consideration, however, may allow discarding this effect and improve the value of teeth as phylogeographic markers. Further effects may contribute to the important phenotypic variation in bank voles. We considered seasonal variations, but this

species is characterised by important multi-annual fluctuations in population density (at Pallasjärvi Henttonen 2000; Tkadlec and Stenseth 2001). These fluctuations have been attributed to various factors including predation (at Pallasjärvi Henttonen et al. 1987; Lambin et al. 2000; Hanski et al. 2001; Korpimäki et al. 2005), competition (Hansen et al. 1999), or seasonality (Tkadlec and Zejda 1998; Saitoh et al. 2003). All might influence the phenotypic characteristics of the population, directly through differential selection or indirectly through changes in the age structure and the related wear stages. Further studies are required to evaluate the importance of these sources of variation compared with geographic patterns.

Acknowledgements

We thank Vincent Laudet for his support and Jean-Pierre Quéré for stimulating discussions, as well as A.V. Borodin and an anonymous reviewer for their helpful comments. This study has been supported by the ANR “Quenottes” and GDR 2474 “Morphométrie et Evolution des Formes”.

References

- Bair, A.R., 2007. A model of wear in curved mammal teeth: controls on occlusal morphology and the evolution of hypsodonty in lagomorphs. *Paleobiology* 33, 53–75.
- Borodin, A.V., Davydova Yu, A., Elkina, M.A., 2006. Dental characters in voles of the genus *Clethrionomys* Tilesius, 1850 in Visimsky Natural Reserve. *Ecological Studies in Visimsky Natural Reserve, Ekaterinburg* 1, 77–85 (in Russian).
- Crampton, J.S., 1995. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia* 28, 179–186.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J.B., Michaux, J.R., 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* 14, 1727–1739.
- Ferson, S., Rohlf, J.F., Koehn, R.K., 1985. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic Zoology* 34, 59–68.
- Hansen, T., Stenseth, N., Henttonen, H., Tost, J., 1999. Interspecific and intraspecific competition as causes of direct and delayed density dependence in a fluctuating vole population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 986–991.
- Hanski, I., Henttonen, H., Korpimäki, E., Oksanen, L., Turchin, P., 2001. Small rodent dynamics and predation. *Ecology* 82, 1505–1520.
- Henttonen, H., 2000. Long-term dynamics of the bank vole *Clethrionomys glareolus* at Pallasjärvi, northern Finnish taiga. In: Bujalska, G., Hansson, L., (Eds.), *Bank vole*

- biology: Recent advances in the population biology of a model species. *Polish Journal of Ecology* 48 (Suppl.), 87–96.
- Henttonen, H., Oksanen, T., Jortikka, A., Haukisalmi, V., 1987. How much do weasels shape microtine cycles in the northern Fennoscandian taiga? *Oikos* 50, 353–365.
- 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.
- Kotlik, P., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J.R., Searle, J.B., 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103 (40), 14860–14864.
- Korpimäki, E., Oksanen, L., Oksanen, T., Klemola, T., Norrdahl, K., Banks, P.B., 2005. Vole cycles and predation in temperate and boreal zones of Europe. *Journal of Animal Ecology* 74, 1150–1159.
- 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.
- Ledevin, R., Deffontaine, V., Michaux, J.R., Henttonen, H., Renaud, S., 2007. Morphometrics of the molars as a marker of recent phylogeographic events in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Hystrix Italian Journal of Mammalogy (n.s.) Suppl.* 116.
- Lowe, V.P.W., 1971. Root development of molar teeth in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Animal Ecology* 40, 49–61.
- Marcolini, F., 2006. Fourier analysis applied to *Mimomys* (Arvicolidae, Rodentia, Mammalia) first lower molars biochronological implications. *Mathematical Geology* 38, 667–678.
- Michaux, J., Chevret, P., Renaud, S., 2007. Morphological diversity of old world rats and mice (Rodentia, Muridae) mandible in relation with phylogeny and adaptation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45, 263–279.
- Navarro, N., Zatarain, X., Montuire, S., 2004. Effects of morphometric descriptor changes on statistical classification and morphospaces. *Biological Journal of the Linnean Society* 83, 243–260.
- Potapov, S.G., Illarionova, N.A., Andreeva, T.A., Baskevich, M.I., Okulova, N.M., Lavrenchenko, L.A., Orlov, V.N., 2007. Transfer of mitochondrial genome of the northern redbacked vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*) in Northwestern Europe. *Doklady Akademii Nauk* 417, 139–141.
- {R_Development_Core_Team}, 2008. R: a language and environment for statistical computing.
- Renaud, S., 2005. First upper molar and mandible shape of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) from northern Germany: ageing, habitat and insularity. *Mammalian Biology* 70, 157–170.
- Renaud, S., Michaux, J., Jaeger, J.-J., Auffray, J.-C., 1996. Fourier analysis applied to *Stephanomys* (Rodentia, Muridae) molars: nonprogressive evolutionary pattern in a gradual lineage. *Paleobiology* 22 (2), 255–265.
- Rohlf, F.J., Archie, J.W., 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology* 33 (3), 302–317.
- Saitoh, T., Stenseth, N.C., Viljugrein, H., Kittilsen, M.O., 2003. Mechanisms of density dependence in fluctuating vole populations: deducing annual density dependence from seasonal processes. *Population Ecology* 45, 165–173.
- Tegelström, H., 1987. Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*). *Journal of Molecular Evolution* 24, 218–227.
- Tesakov, A., 1996. Evolution of bank voles (*Clethrionomys*, Arvicolinae) in the late Pliocene and early Pleistocene of Eastern Europe. *Acta Zoologica Cracovica* 39, 541–547.
- Tkadle, E., Stenseth, N., 2001. A new geographical gradient in vole population dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences (Serie B)* 268, 1547–1552.
- Tkadle, E., Zejda, J., 1998. Small rodent population fluctuations: the effects of age structure and seasonality. *Evolutionary Ecology* 12, 191–210.
- Wilson, D., Reeder, D., 2005. *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

2.2.1 Interprétation evo-devo de la variation du patron dentaire de la UM3

Publication 4

Quels processus contribuent à la variation de forme de la dent ?

Ronan Ledevin, Jean-Pierre Quéré et Sabrina Renaud

Accepté avec révisions mineures : *PLoS ONE*

Avant-propos

Cette étude a pu être réalisée grâce à plusieurs campagnes de piégeage réalisées par Jean-Pierre Quéré en Franche-Comté, à des années différentes ainsi qu'à des saisons différentes (Printemps et Automne).

Dans cet article, je me suis dans un premier temps intéressé plus en détail à la variabilité de la UM3 liée à des effets de structure d'âge de population. Le poids du cristallin (meilleur estimateur d'âge connu chez les campagnols) étant disponible pour chaque individu, des informations directes concernant la structure d'âge de la population étaient accessibles. J'ai ainsi pu aller plus loin dans les observations et interprétations relatives à la question de l'âge.

Dans un second temps, je me suis penché sur un second type de variation apparaissant lors de l'analyse de forme : le polymorphisme de forme de la UM3 de *Myodes glareolus* avec la présence des patrons *simplex* et *complex*. L'étude de forme de la dent, couplée à l'étude de taille, a permis de proposer un modèle expliquant ces patrons dentaires en se basant sur les dernières avancées réalisées en biologie du développement. En effet, il s'avère que de fines modulations des séquences développementales peuvent produire d'importants changements morphologiques sans impliquer pour autant de modifications génotypiques notables.

Les conséquences de ce résultat concernant les processus d'évolution à long terme ont ensuite été investiguées en considérant l'échelle inter-spécifique en plus de l'échelle intra-spécifique.

Morphometrics as an insight into processes beyond tooth shape variation in a bank vole population

Ronan Ledevin^{1*}, Jean-Pierre Quéré², Sabrina Renaud¹

¹ Paléoenvironnements et paléobiosphère UMR5125; CNRS; Université Lyon 1; 69622 Villeurbanne, France

² INRA, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex

* Corresponding author:

“Paléoenvironnements et Paléobiosphère”, UMR 5125 CNRS Université Lyon 1

Bâtiment Géode, 2 rue Dubois, Campus de la Doua

F-69622 Villeurbanne, France

Tél : +33 (0)4 72 43 26 59

E-mail : ronan.ledevin@pepsmail.univ-lyon1.fr

Abstract

Phenotype variation is a key feature in evolution, being produced by development and the target of the screening by selection. We focus here on a variable morphological feature: the third upper molar (UM3) of the bank vole, aiming at identifying the sources of this variation. Size and shape of the UM3 occlusal surface was quantified in successive samples of a bank vole population. The first source of variation was the season of trapping, due to differences in the age structure of the population in turn affecting the wear of the teeth. The second direction of variation corresponded to the occurrence, or not, of an additional triangle on the tooth. This intra-specific variation was attributed to the space available at the posterior end of the UM3, allowing or not the addition of a further triangle.

This size variation triggering the shape polymorphism is not controlled by the developmental cascade along the molar row. This suggests that other sources of size variation, possibly epigenetic, might be involved. They would trigger an important shape variation as side-effect by affecting the termination of the sequential addition of triangles on the tooth.

Keywords : evo-devo, molar, evolution, *Myodes glareolus*, *Clethrionomys*, Arvicolidae.

Introduction

Genetic networks, developmental pathways and environmental influences interact to produce, from a set of genotypes in a population, a phenotypic variation that is the target of the screening by natural selection. The variation in a population can therefore increase or impede response to selection, depending on whether or not it is correlated to the change under selection (Steppan et al., 2005). How development might channel variations from genetic or environmental origin into a preferred direction of phenotypic variation will therefore condition the capacity of a population to evolve, or evolvability (Jernvall, 2000; Beldade et al., 2002). Analysing the patterns of phenotypic variation in a population may bring light onto the developmental constraints underlying this variation (e.g. Renaud et al., 2009), and in turn on the role that such processes might play over evolutionary time scale.

The dentition of the bank vole, *Myodes glareolus* (formerly known as *Clethrionomys glareolus*) offers a challenging case to apply such quantitative methods to unravel the processes underlying phenotypic variation. This arvicoline species is known to display an important variation regarding the morphology of its third upper molar (UM3) (Bauchau & Chaline, 1987; Guérécheau et al., 2006). In arvicoline teeth, cusps correspond to successive triangles (Fig. 1) which number varied along the evolution of the group (Kaneko et al., 1998; Chaline et al., 1999). In some species the number of cusps is fixed whereas in other a polymorphism exists regarding the number of cusps on certain molars (e.g. Markova et al., 2010). Exemplifying this case, the UM3 of *M. glareolus* displays from three to four triangles on its lingual side (Fig. 1A, B) whereas close relatives such as *M. rufocanus* and *M. rutilus* display three or four triangles, respectively. We therefore quantified size and shape of the UM3 in a population of *Myodes glareolus* documenting the tooth polymorphism, and attempted to identify the processes involved in this variation by mobilising the recent breakthroughs regarding dental development (e.g. Jernvall, 2000; Salazar-Ciudad & Jernvall, 2004; Kassai et al., 2005; Kavanagh et al., 2007).

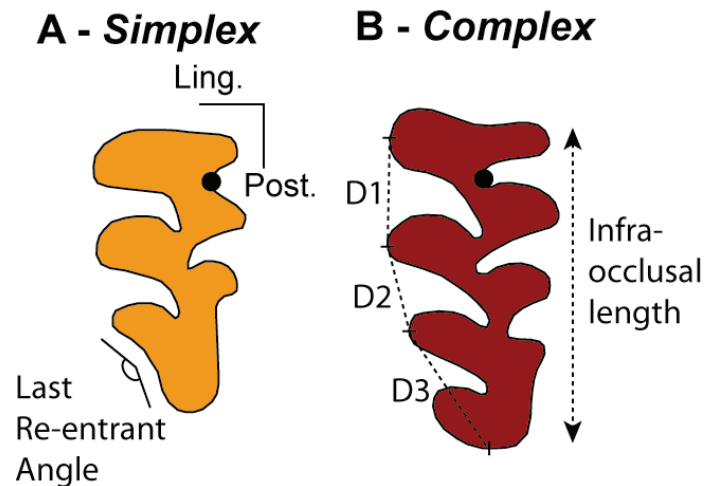


Figure 1. Examples of extreme morphologies of bank vole third upper molars in occlusal view. Measurements collected for this study are also presented. (A) A *simplex* molar characterised by three lingual triangles. (B) A *complex* tooth with four lingual triangles. Univariate measurements are: D1, the distance from the tips of the first to the second triangles; D2, the distance from the second to the third triangle; D3, the distance from the tip of the third triangle to the posterior end of the tooth; Infra-occlusal length, the total length of the tooth measured two millimetres under the occlusal surface on the labial side of the tooth; the last re-entrant angle, angle measuring the degree of indentation of the posterior part of the tooth. The overall shape of the tooth is quantified by the 2D outline of the occlusal surface, schematically represented here for each of the tooth. The starting point (black dot) is located at the most re-entrant point between the first and second anterior labial triangles.

Material and Methods

Study approval

This experimentation was supported by an authorization given by the French government to the co-author JPQ (n° 34-107). It allows the experimentation on living vertebrates (rodents).

Material

A total of 103 bank voles were trapped in the same locality of Franche-Comté (surroundings of Levier, France, 6°12E, 46°58N), sampled at four successive periods of time: spring 1986 (14 specimens), autumn 1989 (27 specimens), spring 1995 (33 specimens) and

autumn 1995 (29 specimens) (Giraudoux et al., 1994). The dry eye lens was weighted for each specimen and used as age estimator (Kozakiewicz, 1976).

In order to compare the pattern of variation of the UM3 of *M. glareolus* with species that do not display a dental polymorphism for this tooth, 15 specimens of *M. rutilus* from Pallasjärvi (Finland, 24°11'E, 68°01'N) and 11 specimens of *M. rufocanus* from the Altaï (Baihaba, Xinjiang, China, 86°78'E, 48°69'N; Giraudoux et al., 2008) were further considered. The specimens of *M. glareolus* and *M. rufocanus* are housed at the CBGP (Montpellier, France). The specimens of *M. rutilus* are part of the collection of H. Henttonen (Finnish Forest Research Institut, Vantaa, Finland).

Size and shape univariate measurements

The length of the UM3 was measured on the labial side two millimetres below the occlusal surface in order to minimize wear effect (Fig. 1B). In order to investigate how the variation of the UM3 is conditioned by the previous teeth, the length of the first (UM1) and second (UM2) upper molars was measured as well.

The occurrence or not of an additional triangle on the lingual side of the tooth was quantified by the last re-entrant angle (Fig. 1A). To identify how much the anterior triangles influenced the polymorphism of the posterior part of the tooth, the distance from the first to the second (D1) and from the second to the third triangles (D2) were measured. The posterior part, with or without an additional triangle, was measured as the distance from the third triangle to the posterior end of the tooth (D3) (Fig. 1B).

Outline analysis of the UM3 occlusal surface

In order to quantify the overall variation in tooth shape, the 2D outline of the UM3 occlusal surface was investigated. The elliptic Fourier transform (EFT) appears as appropriate to describe such complex shape characteristics of arvicoline teeth (Navarro et al., 2004).

For each molar, 64 points at equally spaced intervals along the outline were sampled using Optimas v.6.5 and analyzed by an EFT using the EFAwin software (Ferson et al., 1985). This method is based on the separate Fourier decompositions of the incremental changes of the *x-y* coordinates as a function of the cumulative length along the outline (Kuhl & Giardina, 1982). The outline is approximated by a sum of trigonometric functions of decreasing wavelength, the harmonics. Each harmonic is weighted by four Fourier

coefficients (FCs) defining an ellipse in the x, y plane: A_n, B_n, C_n and D_n . The first harmonic ellipse corresponds to the best-fitting ellipse to the outline and its area was used to standardize the FCs for size differences. The major axis of the first harmonic ellipse was taken as new x -axis to adjust the orientation of the outline (Rohlf, 1990). Since the coefficients A_1, B_1 and C_1 correspond to residuals after standardization (Crampton, 1995; Renaud et al., 1996), they were not included in the subsequent statistical analysis. The coefficient D_1 still retains information about the elongation of the outline (Renaud et al., 2007). Hence, it was included in the statistical analyses. Ten harmonics were considered in this study, being the best compromise between the amount of measurement error and the information content of each harmonic (Ledevin et al., 2010). Therefore a dataset of 37 variables (40 FCs minus A_1, B_1 and C_1) was retained for subsequent analyses.

A visualization of shape changes of the molar occlusal surface was provided by reconstruction of outlines using the inverse Fourier method (Rohlf & Archie, 1984).

Statistical analyses

Differences in univariate parameters were tested using analyses of variance (ANOVA); their relationships with each other were investigated using linear univariate and multivariate regressions.

The set of shape variables (FCs) describing the occlusal surface of the UM3 was investigated using multivariate statistics. A Principal Component Analysis (PCA) on the 37 FCs allowed expressing the main directions of variation on synthetic shape axes. It was performed on the correlation matrix in order to balance the importance given to the FCs of the successive harmonics. These synthetic shape axes summarizing the main patterns of variations, and they were investigated using the same protocols as the other univariate parameters. Two PCAs were performed, one focusing on the intra-population variation of *M. glareolus*, and the other including specimens of the related species *M. rutilus* and *M. rufocanus*.

Results and Discussion

Wear effect as primary source of variation of the molar occlusal surface

The analysis of the UM3 shape variation provided a balanced contribution on the first two principal axes (PC1 = 27.0% of total variance and PC2 = 22.7%). The first axis clearly opposes spring to autumn samples (Fig. 2A). This trend was further confirmed by two-by-two tests on scores along PC1, showing that no difference separates either spring or autumn samples along PC1 (ANOVA: Sp86 vs. Sp95: $P = 0.079$; Au89 vs. Au95: $P = 0.079$). In contrast spring and autumn populations are significantly different along PC1 (Sp86-Au89; Sp86-Au95; Sp95-Au89: $P < 0.001$; Sp95-Au95: $P = 0.022$). The reconstructed outlines (Fig. 2B) show that this trend opposes teeth with a large and round forepart, characteristic of spring populations, to teeth with a straight and compressed forepart and a straight and long posterior part, typical of autumn populations.

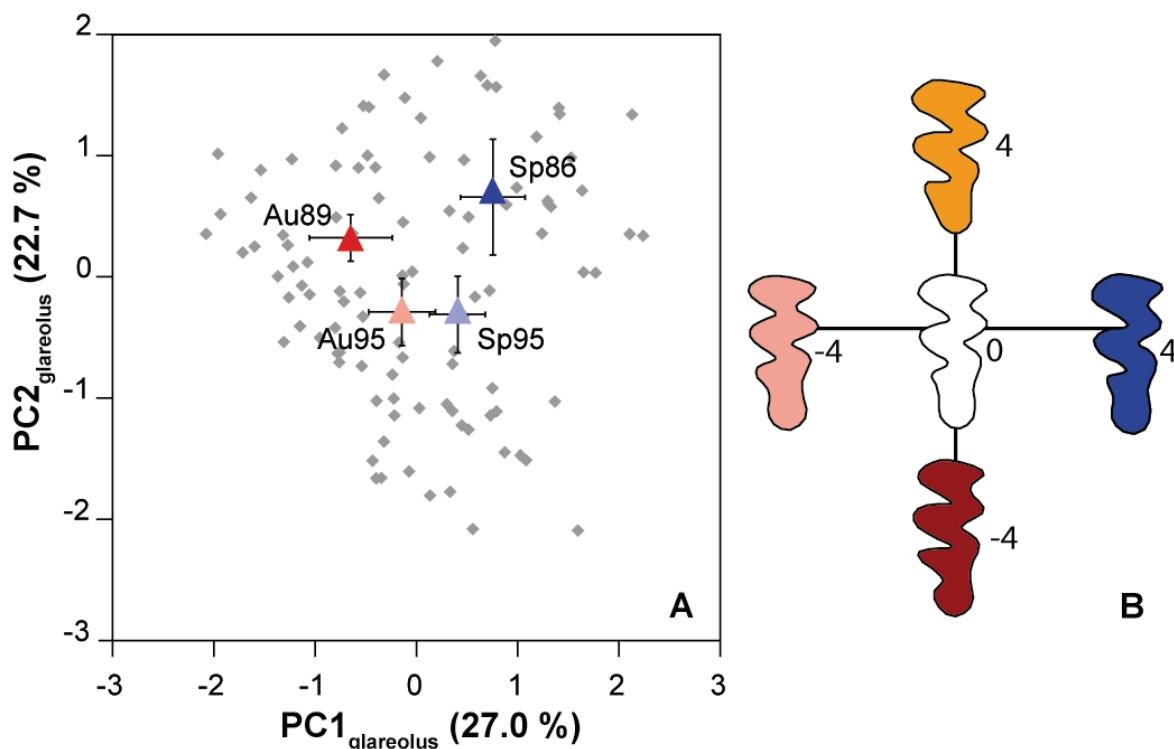


Figure 2. Shape variation of the third upper molar in the bank vole. (A) Shape variation of the third upper molar in the bank vole, represented on the first two principal axes of a PCA on the Fourier coefficients of the molar outline. Each grey dot corresponds to a specimen; the mean (+/- the confidence interval) of the four successive periods of trapping have been superimposed to the total variation (red triangles = Autumn, blue triangles = Spring). (B) Reconstructed outlines visualising shape variations along the first and second axes.

These results are in agreement with previous data on a Finnish bank vole population that evidenced an important effect of the trapping season (Guérécheau et al., 2010). The reason of this effect was hypothesized to be due to different age structure in spring and autumn populations, leading to different wear stages of the tooth dominating at different time periods of the year. Progressive wear down the crown was shown to impact the shape of the occlusal surface (Guérécheau et al., 2010) in a similar way to the one characterizing the present trend along PC1. Our data set allows testing this hypothesis in a more direct way: eye lenses were weighted in our populations and provide a direct estimate of the age of each animal (Kozakiewicz, 1976). This age estimator shows dramatic variations from autumn to spring (Fig. 3). Autumn populations are dominated by young animals born in spring and summer (Liénard, 2003) whereas spring populations are exclusively composed of old, overwintered animals. The significant relationship between this age estimator and the shape of the UM3 occlusal surface, estimated by scores on PC1 ($R^2 = 0.277$, $P = 0.001$) further validates the hypothesis that population dynamics, by affecting the wear stage dominating each sample, heavily contributes to the variation in occlusal shape in this species.

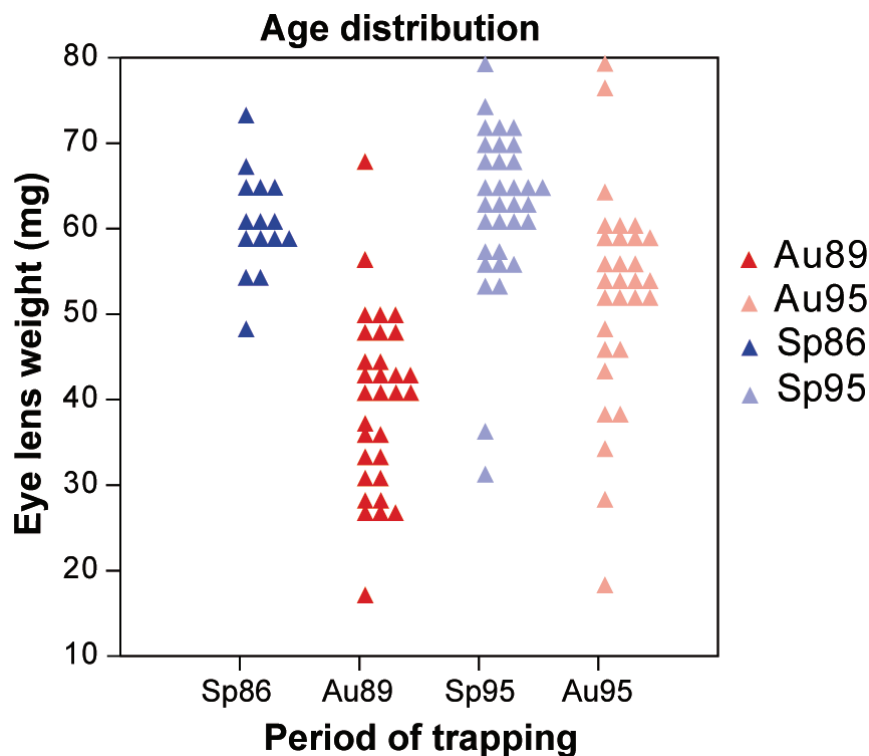


Figure 3. Differences in age distribution. Dot density diagram representing differences in age distribution between the successive periods of trapping. The eye lens weight (mg) was used as age estimator. Symbols correspond to the season of trapping (red triangles = Autumn, blue triangles = Spring).

This result may appear surprising since wear has been demonstrated of little importance on 2D outline of the tooth in other rodents such as mice (e.g. Renaud, 2005; Renaud et al., 2009). This discrepancy regarding sensitivity of the outline shape to wear is due to the different geometry of the cusps. The bulged cusps in murine teeth allow focusing down the crown when analyzing its 2D outline, a place affected by wear only late in life; in contrast the vertical sides of the triangles on the arvicoline teeth force to consider the shape of the occlusal surface, directly affected by wear.

This source of variance related to population dynamics may appear as both an advantage and a drawback, depending on the scopes of morphometric analysis of tooth shape. It is a drawback if trying to analyze evolutionary or biogeographic patterns, by introducing a contingent factor related to the time of trapping for each sample (e.g. Ledevin et al., 2010). It is challenging, on the other hand, by opening the way to study some aspects of population dynamics on past samples. Regarding this perspective, the morphological closeness of the two samples from 1995 challenges some further analyses. It may either be due to a genetic relatedness, sampling two directly successive generations of bank voles, and this would suggest the occurrence of a dynamics of genetic changes through time, either due to drift or selective effects. Alternatively, being so close in time, the two generations documented in Sp95 and Au95 might have experienced related environmental and/or demographic conditions during growth (Tkadlec & Zejda, 1998), leading to a close morphological signature.

To conclude on this first-order morphological signal, it appears as related to intra-annual, and possibly inter-annual, population dynamics. As such, it is not directly relevant either to genetic variations or developmental processes during the formation of the tooth. It rather corresponds to a superimposed signature of wear during late life that may blur other, more intrinsic sources of variations.

Intra-population variation in UM3 shape: modulation of an unchanged developmental pathway?

Focusing on the second axis of variation (PC2) allows discarding the variation of the tooth superimposed by wear during late life. This axis opposes teeth with three lingual triangles to teeth with an additional triangle, suggesting that this axis may correspond to the polymorphism described in the bank vole (Bauchau & Chaline, 1987). We confirmed this interpretation by evidencing a correlation between scores on PC2 and the re-entrant angle on the posterior part of the tooth quantifying the occurrence of a fourth lingual indentation ($R^2 =$

0.525, $P < 0.001$). This polymorphism was first described by its two end-members, the morph with three triangles being named *simplex* and the morph with four triangles *complex* (Jeannet, 1978; Bauchau & Chaline, 1978); considering the occurrence or not of a triangle, together with this clear-cut terminology, suggested a discrete variation (Contoli et al., 1992). Our results rather show a continuous range of variation between the two characteristic end-members. They further suggest that the typical and most obvious polymorphism, corresponding to the fourth lingual indentation, may go together with other concerted changes of the occlusal surface, since the reconstructed outlines point to other morphological trends along PC2 such as a broader vs. narrower anterior part of the tooth (Fig. 2B).

Developmental data have shown that triangles in arvicoline teeth, in the same way than cusps in murine molars (Jernvall et al., 2000), are sequentially determined along a mesio-distal and temporal sequence. Activation-inhibition mechanisms control spacing and timing in such a sequential addition (Jernvall, 2000). The first cusp to develop, corresponding at this ontogenetic stage to an epithelial signaling center (a.k.a enamel knot), is surrounded by an inhibitory field and the next cusp will only develop outside this field. The spacing of the cusps, here the triangles, are thus likely determined by the range of this inhibitory field; the phenotypic output on the adult tooth can be estimated as the distance between successive triangles. The first way to achieve an additional triangle on the UM3 would thus involve an alteration of the inhibitory field: the shorter the spacing between successive triangles, the more triangles are likely to develop for a tooth of equivalent size. An alternative is to vary the posterior termination of the sequential addition, without changing the spacing between triangles.

A change of the spacing would affect the distance between the first triangles, hence D1+D2. A change in the termination of the sequential addition would lead to a variation in the posterior part of the tooth, hence D3. Therefore, the chance to develop an additional lingual triangle (quantified by lower scores on PC2) would increase with a decrease of (D1+D2), or an increase of D3. Whatever the process, PC2 should thus be related to (D1+D2)-D3 and this is indeed the case ($R^2 = 0.303$, $P < 0.001$; Fig. 4A). Yet, PC2 is not related to D1+D2 ($R^2 = 0.003$; $P = 0.561$) but is related to D3 ($R^2 = 0.355$, $P < 0.001$).

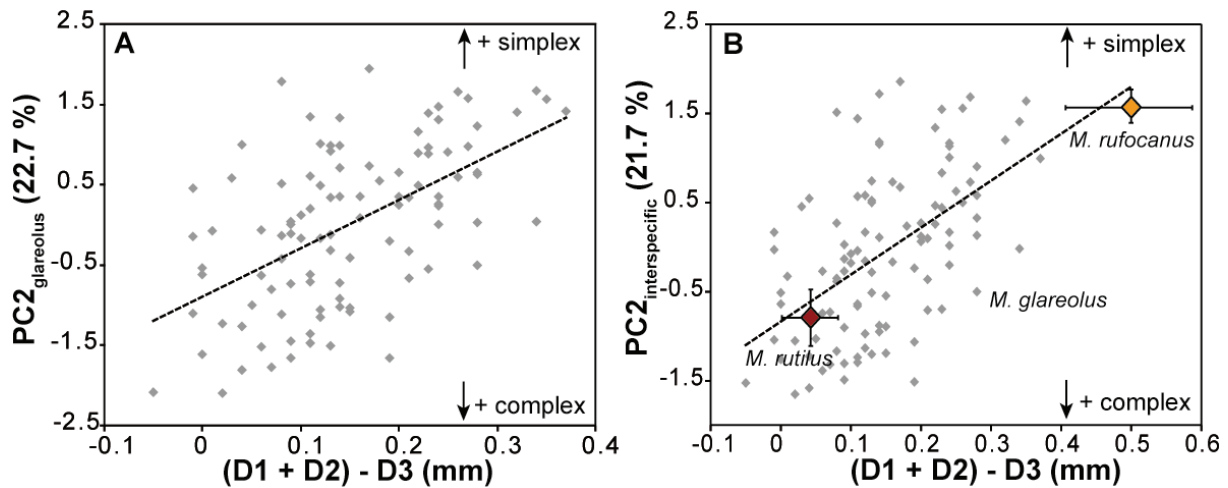


Figure 4. Relationship between overall shape of the tooth and local variations in tooth dimensions. At the intraspecific (A) and interspecific (B) scale. The second synthetic shape axis PC2 is taken as an estimator of the *simplex-complex* variation. It is compared to a combination of the inter-triangles distances (D1+D2)-D3: the smaller (D1+D2), the shorter the spacing between the first triangles; the higher D3, the longer the posterior part of the tooth. Both mechanisms can contribute to the formation of the additional triangle typical of *complex* teeth, leading to a correlation between PC2 and (D1+D2)-D3.
 (A) Variation within the bank vole *M. glareolus*. (B) To include variation at a higher evolutionary scale, specimens of *M. rufocanus* (*simplex* UM3) and of the *M. rutilus* (*complex* UM3) have been added to the intra-specific variation of the bank vole. The shape axis PC2 was recalculated on the basis of the new dataset.

This suggests that the mechanism involved in the occurrence of an additional triangle is not related to a change in the spacing of the triangles, but rather to a change in the termination of the process of sequential addition of the triangles (Fig. 5A). Such a mechanism is known to produce intra-specific variation in other morphological features, e.g. the number of palatal ridges in some muroid rodents (Pantalacci et al., 2009). A slight change in the timing of the termination or in the size of the field where the sequential addition takes place (here the dental lamina) can easily achieve a marked phenotypic output by overriding the threshold necessary to the formation of an additional sequential feature. Interestingly, such a variation can occur without changing the basic properties of the developmental process, by slight modulations of the developmental pathway that might even be of epigenetic origin. This challenges the traditional view of the *simplex-complex* polymorphism as due to a supposed, if not identified, genetic variation (Bauchau & Chaline, 1987).

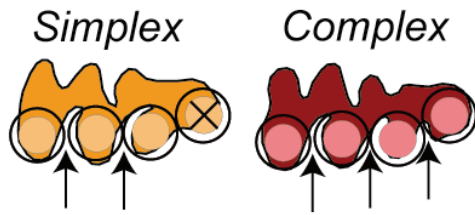
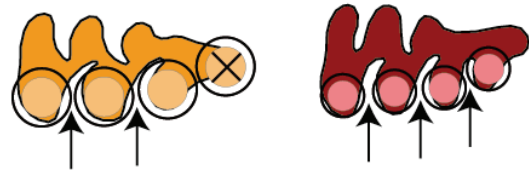
A - Intra-population variation***M. glareolus*****B - Inter-specific variation*****M. rufocanus******M. rutilus***

Figure 5. Schematic representation of the evo-devo model proposed to explain the polymorphism in the UM3 shape. The formation of each triangle is controlled by a signalling centre (coloured circle) surrounded by an inhibitory field (black circle); the subsequent triangle can only develop outside this inhibitory field. (A) Intra-population variation in the bank vole is not related to a change in the spacing of the triangles (hypothesized as related to a change in the dimension of the inhibitory field during the tooth development), but to the termination of the process towards the posterior end of the tooth: an additional triangle will form if enough space is available. (B) In contrast, differences between species such as *M. rufocanus* and *M. rutilus* are related to a change in the spacing of the triangles.

Different processes at work on different evolutionary scales?

The *simplex-complex* variation of the UM3 also occurs at a higher taxonomic level between related species. Whereas this feature is variable in the bank vole, it is fixed in other species. We wondered if this inter-specific variation occurred without change in the underlying developmental process, as in the case of the intra-specific variation within the bank vole, or if the developmental process itself could be affected at this evolutionary scale.

We thus performed another analysis of the tooth shape variation (Fig. 4B), including together with the bank vole samples a set of Northern red-backed voles (*M. rutilus*) displaying a *complex* morphology with four lingual triangles, and of Grey red-backed voles (*M. rufocanus*) displaying a *simplex* morphology (Fig. 5B). The scores of the bank voles on this new “inter-specific” PC2 are highly correlated to their scores on the former “intra-specific” PC2 ($R^2 = 0.951$, $P < 0.001$) showing that direction of PC2 is comparable in the two analyses. This “inter-specific” PC2 is, as previously, related to either a shortening of the spacing between successive cusps, or a lengthening of the posterior part (correlation with (D1+D2)-D3: $R^2 = 0.431$, $P < 0.001$). The balance between the two processes, however, is changed when compared with the intra-specific variation of the bank vole alone. PC2 is still related to D3 ($R^2 = 0.329$, $P < 0.001$) due to the massive sampling of the intra-population variation of the bank

vole. Newly, however, PC2 is also related to a change in the spacing of the triangles (correlation with D1+D2: $R^2 = 0.199$, $P < 0.001$).

These results point to the fact that different mechanism may underlie a similar phenotypic variation, depending on the evolutionary scale considered (Fig. 5). A change in the spacing of the successive triangle is involved in the inter-specific variation that is not involved in the intra-specific variation. Changing the spacing of the triangles requires changing the intrinsic properties of the sequential development of the cusps, probably underlain by some genetic differences. The three species of bank voles diverged a few million years ago (~4 My for *M. rufocanus* and ~3 My for *M. glareolus* – *M. rutilus*; Matson & Baker, 2001; Deffontaine et al., 2005), a time span long enough to accumulate such differences in the basic properties of the sequential development of the triangles.

In contrast, the intra-specific variation in the bank vole seems rather to depend on modulation of an unchanged developmental process. The process could be related either to a postponing the termination of the sequential addition of the cusps, or a more elongated dental lamina without changes in the developmental timing. Both are hardly distinguishable based on their phenotypic output on the formed tooth: they both correspond to a slightly longer posterior part of the UM3 (here quantified by D3). We attempted to investigate, as the next step, the possible cause of this variation triggering the *simplex-complex* polymorphism, by investigating patterns of UM3 size variation.

UM3 size weakly canalised by the cascade along the tooth row

Teeth do not develop independently along the tooth row. Another process of sequential addition, controlled by a balance of activation and inhibition, is at work in the development of the successive molars. Developmental evidences on murine rodents suggested a cascade where the first molar inhibits the second and the second the third, the activation-inhibition balance remaining stable at each step of the process. This leads to a cascade mainly controlled by the size of the first molar (Kavanagh et al., 2007). This cascade seems to control molar proportions in many taxa (Polly, 2007), although arvicanine rodents emerge as an exception. The pattern of sequential addition in this group seems to be modified from the second to the third tooth, leading to a third molar both controlled by the first and second teeth (Renvoisé et al., 2009).

According to these models of development, the crucial variation at the posterior end of the UM3 in the bank voles might be triggered by changes much earlier in the development

and involving the size of the first and/or second molars. We thus tested this hypothesis by considering how the sizes of the different teeth were related (Fig. 6).

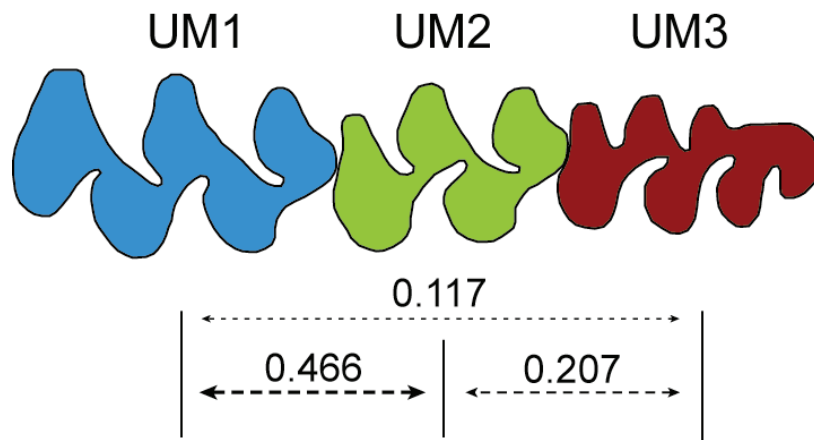


Figure 6. Relationships between upper molar size. Schematic representation of the relationships between the size of the molars along the upper molar row of the bank vole. Relationships are represented as arrows, the thickness of the arrow being proportional to the strength of the relationship indicated by R^2 coefficients.

As expected in both models, the sizes of the three teeth are correlated with each other ($P < 0.001$). The strength of the relationship, however, varies greatly depending on the teeth. The first and second molars appear to be highly correlated, their relationship explaining almost 50% of the UM2 variation (UM1-UM2: $R^2 = 0.466$). In contrast, the size of the UM3 is much less strongly related to the other teeth; its relationship with UM2 explains only about 20% of its variation and even less regarding its relationship with UM1 (UM2-UM3: $R^2 = 0.207$; UM1-UM3: $R^2 = 0.117$). This weak relationship to the UM1 is confirmed by a multiple regression model showing a significant relationship of UM3 size with UM2 but not with UM1 (UM3 vs. UM1 and UM2: $R^2 = 0.209$, UM1: $P = 0.662$, UM2: $P = 0.001$). This is in agreement with the cascade model specific to arvicoline rodents (Renvoisé et al., 2009) but this raises a few comments.

First, the model was based on inter-specific relationships and we evidence here that a similar process seems at work on an intra-specific scale. The percentage of variance explained, however, is much less for intra- than inter-specific variation: more that 90% of UM3 size variation is explained by the inter-teeth cascade at the inter-specific scale (Renvoisé et al., 2009), whereas only 20% are explained regarding intra-specific variation in the bank vole. This suggests that considering inter-specific variation probably buffers other sources of variation occurring at an intra-specific scale.

Second, both cascade models were developed based on data on the lower molar row. We provide here evidences that similar processes are at work on the upper molar row. This undermines the argument for a specific model for arvicolines: the predominant role of the second molar was attributed to the hypermolarization of the first lower molar (Jernvall et al., 2000; Salazar-Ciudad & Jernvall, 2002). Our results rather suggest that the pivotal role of the UM2 in the cascade might characterise the developmental pathway of arvicolines independently of the hypermolarisation of the first lower molars. By conferring a certain independence for the evolution of the first molar, this change in the cascade might have been the key, rather than the consequence, of the hypermolarisation process.

Regarding the mechanisms controlling the size of the UM3, our results provide balanced evidences. The size of the UM3 is partly controlled by a developmental cascade along the tooth row, but this cascade explains only a minor proportion of the UM3 size variation, and hence presumably not the variation triggering the *simplex-complex* polymorphism. This evidences a lower canalisation of the third molar compared to the first teeth of the molar row, a result repeatedly found in rodents, arvicolines (Laffont et al., 2009) as well as murines (Renaud et al., 2009), and up to large mammals (Natsume et al., 2008). The position of the third molars at the end of the molar row makes it prone to cumulate any changes, genetic or epigenetic, occurring former in the development of the molar row. Developing later, it might also vary in response to other cues than the former teeth, including non-genetic influences. The marked phenotypic polymorphism might hence be the by-product of another variation, determining the size of the molar row and/or the timing of termination of the sequential addition of cusps. The range of candidate factors includes epigenetic factors, such as maternal health, that have been documented to affect tooth size (Garn & Osborne, 1979; Cowley et al., 1989). Maternal health and body size may in turn be affected by many factors according to the complex bank vole ecology: variations in abiotic environment and nutritional quality (Dempsey & Townsend, 2001), population dynamics and density-dependent factors (Koskela, 1998; Oksanen et al., 2007). Such a complex and subtle interplay of mechanisms underlying the variation in the shape of the third upper molar of the bank vole may explain why no clear geographic pattern emerges regarding this variation (Ledevin et al., 2010). It also provides a challenging scenario explaining the evolvability of this tooth through evolution, although the developmental processes at work may vary depending on the evolutionary scale considered.

Concluding remarks

Main directions of phenotypic variance are suggested to constitute “lines of least resistance” to evolution (Schluter, 1996), by representing morphologies more frequently produced in a population due to genetic or developmental factors, and hence more easy to screen by selection or to randomly sample by drift. Yet, their meaning for long-term evolution depends on the degree of heritability of the phenotypic variation.

The present study provides contrasted evidences in this respect. The first direction of variance corresponds to the degree of wear of the tooth, and hence appears as a signal superimposed to the intrinsic variance by contingent factors during the late life of the animals. These factors are likely conditioned by local life-history traits.

The second direction of intra-population variance seems to be produced by variation during the development. Yet, the developmental process, corresponding to a sequential addition of triangles, is not modified; rather, the variation in tooth shape seems to be due to variations in the termination of the process. The shape polymorphism would thus occur as a side-effect of variation in the posterior elongation of the tooth. Such a feature may be heritable, and possibly itself under selective pressure, or be of epigenetic origin and related to life-history traits. The frequent interpretation of dental variation as a result of selection for efficient food processing (e.g. Guthrie, 1971; Markova et al., 2010) would be dramatically challenged if the tooth polymorphism would be of epigenetic origin.

Yet, the processes involved may be different at a higher evolutionary level. Inter-specific differences in tooth shape seem related to a change in developmental process, namely in the spacing between successive triangles. Such a modification is likely heritable and supports adaptive scenarios of dental shape evolution.

The combination of several processes generating a similar direction of morphological variation might be a key of the remarkable evolvability of tooth shape among population and species in arvicoline rodents (Chaline et al., 1999).

Acknowledgments

This study has been supported by the ANR “Quenottes” and the program Rhône-Alpes Emergence. Altai samples were collected in the framework of the French-Chinese Programme of Advanced Research: Pra E95-01. We would like to thank Heikki Henttonen for providing the sample from Finland.

References

- Bauchau, V. & Chaline, J. 1987 Variabilité de la troisième molaire supérieure de *Clethrionomys glareolus* (Arvicolidae, Rodentia) et sa signification évolutive. *Mammalia* **51**, 587-598.
- Beldade, P., Koops, K. & Brakefield, P. M. 2002 Developmental constraints *versus* flexibility in morphological evolution. *Nature* **416**, 844-847.
- Chaline, J., Brunet-Lecomte, P., Montuire, S., Viriot, L. & Courant, F. 1999 Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Annales Zoologici Fennici* **36**, 239-267.
- Contoli, L., Amori, G. & Nazzaro, C. 1992 Tooth diversity in Arvicolidae (Mammalia, Rodentia): Ecochorological factors and speciation time. *Hystrix* **4**(2), 1-15.
- Cowley, D. E., Pomp, D., Atchley, W. R., Eisent, E. J. & Hawkins-Brown, D. 1989 The impact of maternal uterine genotype on postnatal growth and adult body size in mice. *Genetics* **122**, 193-203.
- Crampton, J. S. 1995 Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia* **28**, 179-186.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J. B. & Michaux, J. R. 2005 Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of Central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* **14**, 1727-1739.
- Dempsey, P. J. & Townsend, G. C. 2001 Genetic and environmental contributions to variation in human tooth size. *Heredity* **86**, 685-693.
- Ferson, S., Rohlf, F. J. & Koehn, R. 1985 Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic Zoology* **34**, 59-68.
- Garn, S. M. & Osborne, R. H. 1979 The effect of prenatal factors on crown dimensions. *American Journal of Physical Anthropology* **51**, 665-678.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Quéré, J.-P. & Damange, J. P. 1994 Distribution and kinetic of rodent populations in mid-altitude mountains in agricultural land abandonment. *Acta Œcologica* **15**, 385-400.
- Giraudoux, P., Zhou, H. X., Quéré, J.-P., Delattre, P., Raoul, F., Deforet, T., Scheiffler, R., Mamuti, W., Voloubouef, V. & Craig, P. 2008 Small mammal assemblages and habitat distribution in the northern Junggar basin, Xinjiang, China : a pilot survey. *Mammalia* **72**, 309-319.
- Guérécheau, A., Ledevin, R., Henttonen, H., Deffontaine, V., Michaux, J. R., Chevret, P. & Renaud, S. 2010 Seasonal variation in molar outline of bank voles: An effect of wear? *Mammalian Biology* **75**, 311-319.
- Guthrie, R. D. 1971 Factors regulating the evolution of microtine tooth complexity. *Zeitschrift für Säugetierkunde* **36**, 37-54.
- Jeannet, M. 1978 L'hypsodontie chez les campagnols et les autres mammifères. *Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* **5**, 206-213.
- Jernvall, J. 2000 Linking development with generation of novelty in mammalian teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 2641-2645.

- Jernvall, J., Keränen, S. V. E. & Thesleff, I. 2000 Evolutionary modification of development in mammalian teeth: Quantifying gene expression patterns and topography. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 14444-14448.
- Kaneko, Y., Nakata, K., Saitoh, T., Stenseth, N. C. & Bjornstad, O. N. 1998 The biology of the vole *Clethrionomys rufocanus*: a review. *Researches on Population Ecology* **40**, 21-37.
- Kassai, Y., Munne, P., Hotta, Y., Penttilä, E., Kavanagh, K. D., Ohbayashi, N., Takada, S., Thesleff, I., Jernvall, J. & Itoh, N. 2005 Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* **309**, 2067-2070.
- Kavanagh, K. D., Evans, A. R. & Jernvall, J. 2007 Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* **449**, 427-432.
- Koskela, E., Juutistenaho, P., Mappes, T. & Oksanen, T. A. 2000 Offspring defence in relation to litter size and age: experiment in the bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Evolutionary Ecology* **14**, 99-109.
- Kozakiewicz, M. 1976 The weight of eye lens as the proposed age indicator of the bank vole. *Acta Theriologica* **21**, 314-316.
- Kuhl, F. P. & Giardina, C. R. 1982 Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* **18**, 259-278.
- Laffont, R., Renvoisé, E., Navarro, N., Alibert, P. & Montuire, S. 2009 Morphological modularity and assessment of developmental processes within the vole dental row (*Microtus arvalis*, Arvicolinae, Rodentia). *Evolution and Development* **11**:3, 302-311.
- Ledevin, R., Michaux, J. R., Deffontaine, V., Henttonen, H. & Renaud, S. 2010 Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**, 681-694.
- Liénard, E. 2003 Contribution à l'étude des carnivores sauvages comme sentinelles de la fièvre hémorragique à syndrome rénal, *Ecole Vétérinaire de Nantes, Nantes*, 1-145.
- Markova, A. K., Malygin, V., Montuire, S., Nadachowski, A., Quéré, J.-P. & Ochman, K. 2010 Dental variation in sibling species *Microtus arvalis* and *M. rossiaemeridionalis* (Arvicolinae, Rodentia): between-species comparisons and geography of morphotype dental patterns. *Journal of Mammalian Evolution* **17**, 121-139.
- Matson, C. W. & Baker, R. J. 2001 DNA sequence variation in the mitochondrial control region of red-backed voles (*Clethrionomys*). *Molecular Biology and Evolution* **18**, 23-35.
- Natsume, A., Koyasu, K., Oda, S.-I., Nakagaki, H., Kawai, T. & Hanamura, H. 2008 Tooth size variability and relevance of numerical variation in the Japanese serow. *Archives of Oral Biology* **53**, 95-98.
- Navarro, N., Zararain, X. & Montuire, S. 2004 Effects of morphometric descriptor change on statistical classification and morphospaces. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**, 243-260.
- Oksanen, T. A., Koivula, M., Koskela, E. & Mappes, T. 2007 The cost of reproduction induced by body size at birth and breeding density. *Evolution* **61**, 2822-2831.
- Pantalacci, S., Sémon, M., Martin, A., Chevret, P. & Laudet, V. 2009 Heterochronic shifts explain variations in a sequentially developing repeated pattern: palatal ridges of muroid rodents. *Evolution and Development* **11**, 422-433.
- Polly, P. D. 2007 Development with a bite. *Nature* **449**, 413-415.
- Renaud, S. 2005 First upper molar and mandible shape of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) from northern Germany: ageing, habitat and insularity. *Mammalian Biology* **70**, 157-170.
- Renaud, S., Chevret, P. & Michaux, J. 2007 Morphological vs. molecular evolution: ecology and phylogeny both shape the mandible of rodents. *Zoologica Scripta* **36**, 525-535.
- Renaud, S., Michaux, J., Jaeger, J.-J. & Auffray, J.-C. 1996 Fourier analysis applied to *Stephanomys* (Rodentia, Muridae) molars: nonprogressive evolutionary pattern in a gradual lineage. *Paleobiology* **22**, 255-265.
- Renaud, S., Pantalacci, S., Quéré, J.-P., Laudet, V. & Auffray, J.-C. 2009 Developmental constraints revealed by co-variation within and among molar rows in two murine rodents. *Evolution and Development* **11**, 590-602.

- Renvoisé, E., Evans, A. R., Jebrane, A., Labruere, C., Laffont, R. & Montuire, S. 2009 The evolution of mammal tooth patterns: new insights from a developmental prediction model. *Evolution* **63**, 1327-1340.
- Rohlf, F. J. 1990 Fitting curves to outlines. In "Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop." (F. J. Rohlf & F. L. Bookstein, eds.), Vol. 2, pp. 169-176. The University of Michigan Museum of Zoology.
- Rohlf, F. J. & Archie, J. W. 1984 A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology* **33**, 302-317.
- Salazar-Ciudad, I. & Jernvall, J. 2002 A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 8116-8120.
- Salazar-Ciudad, I. & Jernvall, J. 2004 How different types of pattern formation mechanisms affect the evolution of form and development. *Evolution and Development* **6**, 6-16.
- Schluter, D. 1996 Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* **50**, 1766-1774.
- Steppan, S. J., Adkins, R. M., Spinks, P. Q. & Hale, C. 2005 Multigene phylogeny of the Old World mice, Murinae, reveals distinct geographic lineages and the declining utility of mitochondrial genes compared to nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**, 370-388.
- Tkadlec, E. & Zejda, J. 1998 Small rodent population fluctuations: The effects of age structure and seasonality. *Evolutionary Ecology* **12**, 191-210.

Résumé du Chapitre 2

Le second chapitre a tout d'abord mis en évidence l'influence considérable de l'effet d'usure sur les patrons de différenciation de forme de la troisième molaire supérieure. En effet, il a été montré qu'une population échantillonnée à des périodes différentes présentait des différences de forme de même ampleur que les patrons de divergence biogéographiques. Ces variations traduisent des assemblages de dents de degrés d'usure différents liés à des différences de structure d'âge entre les populations de printemps et les populations d'automne.

Dans une seconde partie je me suis intéressé à l'origine des formes *complex/simplex* décrites sur la UM3 depuis des années mais jamais expliquées, participant à la grande variabilité de cette dent. En m'appuyant sur les dernières avancées en biologie du développement, j'ai pu proposer un modèle expliquant comment le polymorphisme de formes observé sur la UM3 peut être produit par de fines modulations des séquences développementales sans modification majeure de ces séquences.

Finalement, si jusqu'à maintenant ce sont les dents qui ont été le centre d'intérêt de ma thèse, dans le Chapitre 3 je me suis intéressé à un caractère connu comme étant soumis à de fortes pressions de sélection liées au régime alimentaire, la mandibule. J'essaierais de déterminer le ou les facteurs participant à la variation de taille et de forme de ce caractère très variable.

Chapitre 3

**Patron de variation de la mandibule :
signature de l'environnement, des
lignées ou de la structure d'âge ?**

3.1 Structure d'âge des populations et patron de variation de la mandibule

Etude de cas 3

Patron de variation de la mandibule : signature de l'environnement, des lignées ou de la structure d'âge ?

Avant-propos

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Jean-Pierre Quéré. La capture des spécimens en Franche-Comté ainsi que la préparation du matériel ostéologique ont été réalisées par ses soins comme énoncé dans le Chapitre 2.2.

L'intérêt de cette étude, composant le Chapitre 3, est de se pencher sur le cas d'un autre caractère impliqué dans la mastication, la mandibule. Deux échelles de variations ont été considérées : celle de l'Europe, et celle d'une population de Franche-Comté. Il a donc été possible dans un premier temps de déterminer si un patron de structuration biogéographique émergeait. Ensuite, grâce au second jeu de données le changement d'échelle permettra de tester en intra-population la possible influence d'un facteur s'étant avéré important lors de l'étude de la molaire : la structure d'âge des populations. En effet, la mandibule est soumise à des variations de formes liées à des phénomènes de remodelage osseux intervenant tout au long de la vie des animaux. Il est donc possible que les vieux individus présentent une morphologie différente des jeunes. Finalement l'intégration du jeu de données de Franche-Comté au jeu de données européen permettra de voir si cet effet d'âge participe à la variation observée dans l'étude réalisée à grande échelle.

Comme dans le cas de la molaire, la prise en compte de la structure d'âge dans les études biogéographiques apparaît comme importante malgré le fait qu'elle soit en général négligée. Comme expliqué dans le Chapitre 2.1, lors des campagnes de piégeage la capture des spécimens s'effectue en général une seule fois par localité, échantillonnant une seule période de l'année qui n'est pas forcément comparable de localité en localité.

Introduction

Au cours des travaux présentés dans cette thèse les dents ont été jusqu'à privilégiées. Cependant, un autre caractère lié à la mastication pourrait être pertinent dans l'étude des processus évolutifs affectant le phénotype : la mandibule.

Ce caractère est soumis à de fortes pressions de sélection liées au régime alimentaire, et plus que l'histoire phylogénétique, c'est cet aspect qui va structurer la différenciation de forme de la mandibule au sein d'un groupe écologiquement diversifié comme les rongeurs murinés (Michaux et al., 2007). À l'opposé, dans le cas de groupes présentant des préférences écologiques similaires la mandibule aura tendance à se différencier entre les espèces parallèlement à la différenciation génétique neutre (Renaud et al., 2007). Ces deux phénomènes peuvent ainsi contribuer à faire de la mandibule un marqueur de différenciation inter-genres (Cardini, 2003) voire inter-spécifique (Taylor & Groves, 2003 ; Gündüz et al., 2007). La différenciation de la mandibule en fonction de l'alimentation peut aussi en faire un marqueur de l'écologie du groupe étudié. En effet, des études sur le rat géant fossile *Canariomys* (Firmat et al., 2010) ou sur les singes *Cebus* (Daegling, 1992) ont montré tout l'intérêt de la mandibule dans des études s'intéressant au régime alimentaire, sa forme générale et sa structure osseuse étant largement influencées par le type de nourriture ingéré. Ces patrons de différenciation résultent de processus sélectifs qui se sont produits à l'échelle de multiples générations, sur plusieurs millions d'années d'évolution.

Même si l'on se place à une échelle intra-spécifique, différentes échelles de temps sont à considérer. Des processus évolutifs impliquant une pression de sélection sur les populations en fonction de leur écologie existent (Ozaki et al., 2007 ; Renaud & Auffray, 2010), mais des phénomènes agissant à l'échelle même des individus sont aussi à prendre en considération, comme le remodelage osseux agissant tout au long de la vie de l'animal en fonction de son âge et de sa nutrition.

Dans cette étude, je vais étudier les variations de taille et de forme de la mandibule du campagnol roussâtre afin de déterminer l'influence que peuvent avoir des variations de la structure d'âge des populations sur le patron biogéographique. Deux jeux de données seront présentés. Le premier traitera des variations morphologiques de la mandibule à l'échelle de l'Europe et le second à l'échelle d'une population de Franche-Comté en s'intéressant particulièrement à la structure d'âge des populations. Dans un troisième temps ces deux jeux

de données seront considérés ensemble afin de déterminer l'influence des variations intra-population sur un jeu de données plus vaste, celui de l'Europe.

Matériel et Méthodes

Matériel étudié

Un total de 327 campagnols roussâtres a été considéré dans cette étude, regroupés en deux jeux de données. Le premier, à l'échelle de l'Europe, regroupe 133 spécimens présentés dans la publication 1 (Fig. 1, Ledevin et al., 2010) et échantillonnant les lignées mitochondriales majeures : Espagnole (N = 9), Italienne (N = 10), Ouest européenne (N = 48), Est européenne (N = 32) et Oural (N = 34). Les lignées secondaires (Gargano et Basque) n'ont pas été considérées.

Le second jeu de données regroupe 194 spécimens piégés en Franche-Comté (France, Fig. 1), des collections du CBGP de Montpellier et capturés par Jean-Pierre Quéré. Ils ont été échantillonnés au cours de quatre périodes différentes : Printemps et Automne 1995 (Pr95 et Au95), Printemps 1986 (Pr86) et Automne 1989 (Au89). Pour chacun de ces spécimens le poids du cristallin est disponible, fournissant un critère d'estimation de l'âge. De plus, chaque spécimen considéré présentait une troisième molaire supérieure émergée, indiquant que tous étaient sevrés.

Finalement une analyse globale intègre les deux jeux de données précédents, et regroupe donc un total de 327 spécimens.

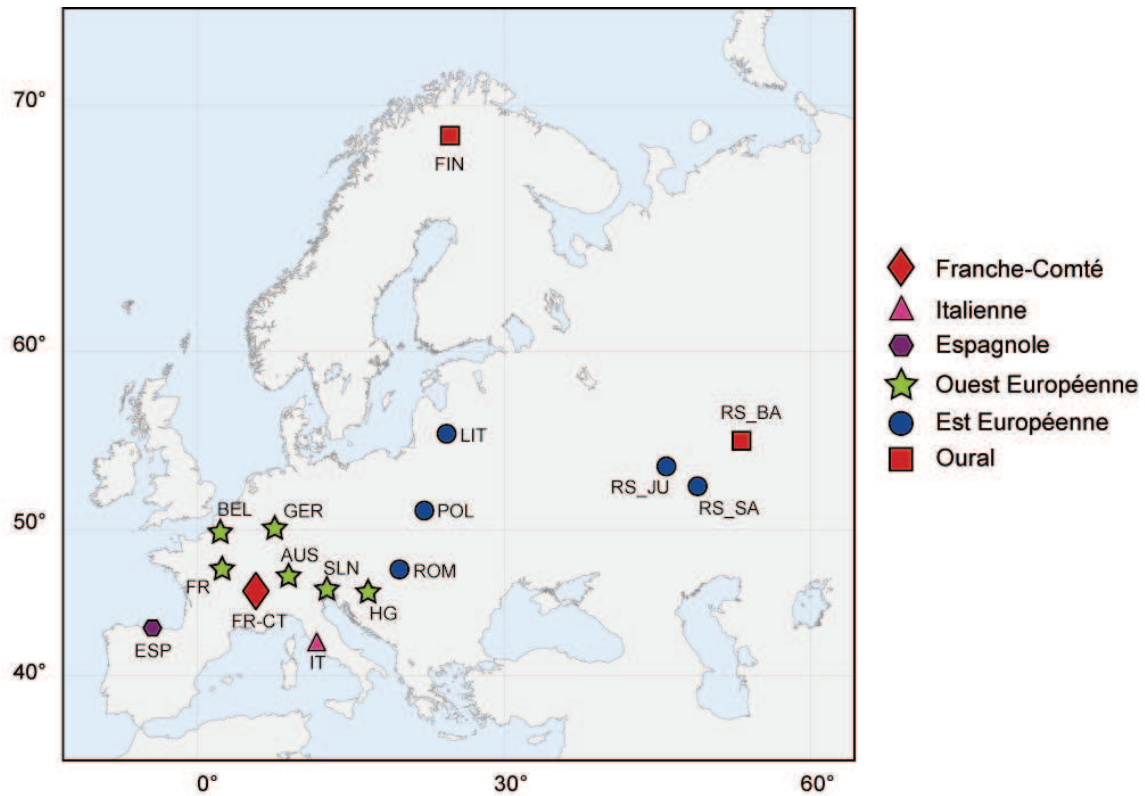


Figure 1. Distribution géographique des localités de piégeage. Les symboles correspondent aux cinq lignées génétiques échantillonnées (Espagnole, Italienne, Ouest et Est européennes, Oural).

Etude du contour de la mandibule

Comme la forme de la molaire, la morphologie de la mandibule peut être approximée par son contour 2D, fournissant des informations sur la forme des processus impliqués dans l'insertion des muscles et de la région alvéolaire portant les incisives et molaires. L'étude du contour apparaît appropriée pour décrire les différences morphologiques intra-spécifiques chez le campagnol roussâtre. Le contour de la mandibule correspond à sa projection, posée à plat côté labial vers l'opérateur lors de la prise de vue. Les dents pouvant manquer, seul l'os est considéré. La mandibule gauche a été mesurée, ou une image miroir de la droite si la gauche était manquante ou cassée. Le point de départ du contour a été défini à la jonction supérieure entre l'incisive et l'os (partie antérieure du diastème). Comme pour les dents, la méthode de la transformée de Fourier elliptique a été appliquée (détail dans le Chapitre 1.1, Ledevin et al., 2010), la seule différence étant la réduction du nombre d'harmoniques à 7 au lieu de 10 pour les molaires. Cela a pour avantage de diminuer le nombre de variables à 25 au lieu de 37, tout en conservant une bonne approximation du contour (estimation visuelle).

Finalement, comme pour la molaire des contours moyens ont été reconstitués en utilisant la transformée de Fourier inverse (Rohlf and Archie, 1984).

Analyses statistiques

Les variations de taille de la mandibule ont été étudiées en utilisant la racine carrée de l'aire du contour de la mandibule comme estimateur. Des statistiques univariées ont été réalisées afin de tester l'existence de différences de taille entre lignées ou classes d'âge différentes. Des régressions linéaires simples ont de plus été réalisées afin de tester les relations existantes entre la taille et des facteurs comme la latitude ou la longitude.

Des analyses multivariées ont ensuite été utilisées afin d'analyser les variations de forme. Des analyses en composantes principales ont été réalisées afin de résumer l'information sur quelques axes synthétiques permettant d'observer les patrons de différenciation morphologique. Afin de tester statistiquement l'existence de différences de forme entre groupe, des analyses discriminantes ont été effectuées (test considéré : Wilks' Lambda). Ce type d'analyse fourni de plus deux types de reclassifications permettant d'estimer la robustesse des groupes testés : une matrice de reclassification classique et une matrice de reclassification Jackknifed permettant de générer des sous-échantillonnages artificiels à partir de l'échantillonnage complet.

Finalement, afin de tester l'existence d'une relation entre taille et forme (allométrie) une régression multiple multivariée a été réalisée (Monteiro, 1999). Les coefficients de Fourier ont ainsi été considérés comme des variables dépendantes et comparés à la variable de taille considérée indépendante. Les résidus après régression peuvent ensuite être considérés comme de nouvelles variables d'où l'information relative à la taille a été ôtée. De nouvelles reclassifications ont ainsi pu être réalisées sur la base de ces variables exemptes de la taille.

Résultats et Discussion

La mandibule, témoin de la structure biogéographique du campagnol roussâtre ?

L'environnement, un facteur majeur de variation de la taille

Les variations de taille de la mandibule, estimée par la racine carrée de l'aire, ont été étudiées à l'échelle de l'Europe entre les cinq lignées majeures identifiées au sein du campagnol roussâtre (Italienne, Espagnole, Ouest et Est européennes et Oural) (Fig. 2A). Une différence significative est observée (ANOVA : $P < 0.001$). Les différences de taille ont ensuite été testées deux à deux entre les lignées (test t de Student). Des différences inter-lignées significatives sont globalement observées (Tableau 1) excepté entre les lignées Oural et Est européenne ($P = 0.078$). Les lignées méditerranéennes sont peu différenciées ($P = 0.019$).

	IT	ESP	O	E
ESP	$P = 0.019$			
O	$P < 0.001$	$P < 0.001$		
E	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P = 0.001$	
OUR	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P = 0.078$

Tableau 1 : Différences de taille testées deux à deux entre les lignées génétiques. Test considéré : analyse de variance (ANOVA). Seuils de significativité : $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$.

Une diminution de taille étant observée des lignées du sud de l'Europe vers les lignées du nord, j'ai donc testé l'existence d'une relation entre la taille de la mandibule et la latitude à l'aide d'une régression linéaire sur l'ensemble des individus (Fig. 2B). Une probabilité significative a été obtenue ($P < 0.001$; $R^2 = 0.403$) confirmant une décroissance de taille vers les hautes latitudes. Cette relation pourrait être tirée par la position extrême de la localité finlandaise. Si ces spécimens sont retirés de l'analyse, la probabilité obtenue est toujours significative ($P < 0.001$; $R^2 = 0.387$).

La taille de la mandibule a ensuite été considérée en relation avec la longitude (graphique non présenté). Une relation significative est à nouveau obtenue ($P < 0.001$; $R^2 = 0.152$), même si le R^2 est largement inférieur à celui obtenu pour la latitude. Lorsqu'une régression à deux facteurs est réalisée, on obtient un $R^2 = 0.409$, $P < 0.001$ pour la latitude et

$P = 0.236$ pour la longitude, indiquant une influence majeure de la latitude dans ce jeu de données.

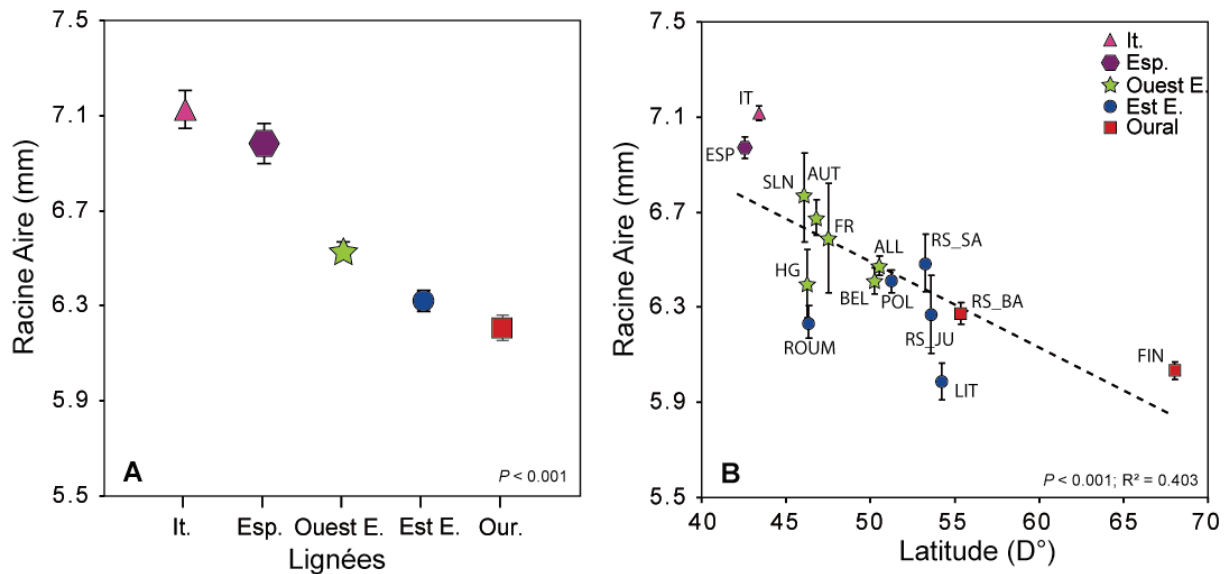


Figure 2. (A) Différences de tailles entre les moyennes des lignées mitochondriales échantillonnées en Europe. La taille est estimée par la racine de l'aire de la mandibule. Test réalisé : analyse de variance (ANOVA) sur l'ensemble des individus. (B) Variations de taille en fonction de la latitude, test considéré : régression linéaire. Chaque point correspond à la moyenne d'une localité. Pour les deux graphiques, les symboles correspondent aux lignées mitochondriales et l'intervalle de confiance autour de la moyenne est représenté.

La taille de la mandibule (Renaud & Michaux, 2007) ou d'une partie de la mandibule comme la longueur du diastème (Blois et al., 2008) est fréquemment utilisée comme proxy de la taille corporelle des animaux, souvent non disponible. Mes résultats sur ce caractère suggèrent donc une décroissance de la taille des basses vers les hautes latitudes à l'inverse de la règle de Bergman (Bergman, 1847). Ce patron est concordant avec celui observé dans le Chapitre 1.1 (Ledevin et al., 2010) où les variations de taille de la dent avaient été investiguées. Par conséquent, les explications avancées, interprétant la taille de la dent comme indicative de la taille corporelle, se trouvent corroborées ici par un patron congruent observé sur la taille de la mandibule. Cette baisse de taille avait été attribuée à une adaptation du campagnol roussâtre vers les hautes latitudes selon différents facteurs possibles : diminution de la pression de prédation en circulant dans des galeries inaccessibles aux prédateurs plus gros (Sundell & Norrdhal, 2002), diminution des besoins énergétiques dans des environnements plus pauvres en nourriture (Ellison et al., 1993) ou encore une diminution du taux métabolique basal (Boratinsky et al., 2009).

Analyse de forme

Une analyse en composante principale a été réalisée sur l'ensemble du jeu de données européen. Une très grande variabilité étant observée, les moyennes par localités ont été représentées plutôt que la totalité des individus afin d'améliorer la lisibilité (Fig. 3). Malgré un fort chevauchement toujours observé, une analyse discriminante réalisée sur les lignées mitochondriales confirme qu'une différence significative existe (Wilks' Lambda : $P < 0.001$). On retrouve ainsi visuellement les deux localités de la lignée Oural proches à la fois dans le plan PC1-PC2 (Fig. 3A) et dans le plan PC2-PC3 (Fig. 3B). L'Espagne et l'Italie sont toujours divergentes mais dans des directions opposées le long de l'axe 2. Les lignées Est et Ouest quant à elle présentent une variation très importante, masquant l'émergence d'un patron de différenciation clair (Fig. 3A).

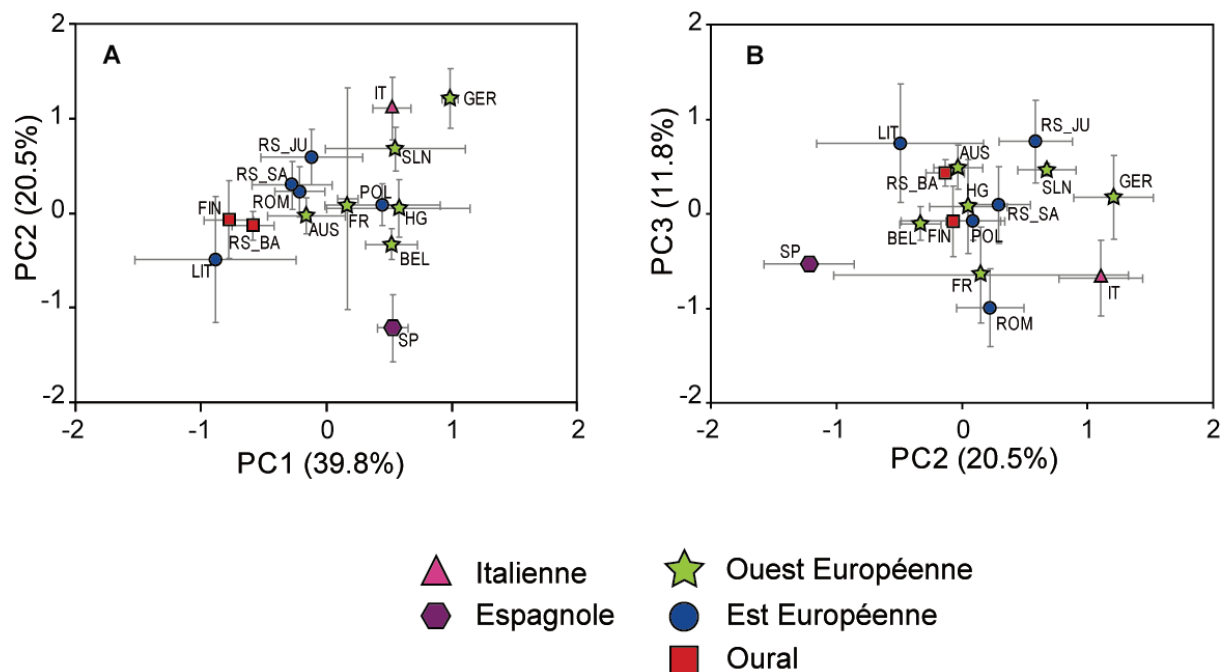


Figure 3. Variations de forme de la mandibule du campagnol roussâtre à l'échelle européenne, représentées sur les trois premiers axes principaux d'une ACP réalisée sur les coefficients de Fourier. Chaque point correspond à la moyenne d'une localité ($\pm$ l'intervalle de confiance autour de la moyenne) et le symbole à la lignée génétique représentée. (A) Différenciation de forme dans le plan PC1- PC2. (B) Différenciation de forme dans le plan PC2- PC3.

Afin de tester la robustesse de cette différenciation deux types de reclassifications ont été réalisés (Tableau 2), permettant d'estimer le degré d'erreur de reclassification des individus au sein des lignées sur la base de la forme de la mandibule. Les meilleures

reclassifications d'après la première matrice concernent les trois lignées extrêmes : Espagnole (100%), Italienne (90%) et Oural (78%). Lorsque la méthode de classification Jackknifed est considérée les résultats apparaissent comme moins robustes, la lignée Italienne tombant à 40% et la lignée Oural passant à 74%. Seule la lignée Espagnole présente un pourcentage élevé de 100%. Finalement, concernant les lignées Est et Ouest européennes les pourcentages sont faibles quelque soit le type de reclassification utilisé.

Classification matrix		Jackknifed classification matrix	
Lignées	%correct	Lignées	%correct
E	69	E	47
IT	90	IT	40
OUR	78	OUR	74
SP	100	SP	100
W	69	W	48
Total	75	Total	56

Tableau 2. Pourcentages de reclassifications correctes des individus au sein des lignées génétiques. Le calcul est réalisé sur les coefficients de Fourier issus de l'analyse de contour. Deux méthodes sont présentées, la reclassification classique et la reclassification Jackknifed.

D'après ces reclassifications, les lignées extrêmes d'un point de vue taille sont les mieux reclassifiées. Nous avons donc testé si un effet allométrique existait à l'aide d'une régression multiple multivariée entre la taille de la mandibule et les coefficients de Fourier. Une relation significative a été observée ($P < 0.001$; $R^2 = 0.609$) témoignant effectivement d'un effet allométrique. Pour essayer de s'affranchir de cet effet, les résidus après régression ont été considérés comme nouvelles variables et de nouvelles reclassifications ont été réalisées (Tableau 3). Seule l'Espagne conserve son taux de 100% de reclassifications correctes, indiquant que sa divergence de forme n'est pas uniquement due à un effet allométrique. Les autres lignées ne présentent pas de résultats plus robustes.

Classification matrix		Jackknifed classification matrix	
Lignées	%correct	Lignées	%correct
E	69	E	44
IT	90	IT	40
OUR	76	OUR	56
SP	100	SP	100
W	71	W	52
Total	75	Total	53

Tableau 3. Pourcentages de reclassifications correctes des individus au sein des lignées génétiques. Le calcul est réalisé sur les résidus calculés après régression multiple multivariée entre la variable de taille de la mandibule et les variables de forme. Deux méthodes sont présentées, la reclassification classique et la reclassification Jackknifed.

Finalement, comme pour la taille l'influence de la latitude et de la longitude sur les deux premiers axes ont été testées (graphiques non présentés). Seul PC1 présente une relation significative avec la latitude ($P = 0.001$) avec cependant une forte dispersion ($R^2 = 0.084$). PC2 n'est pas corrélé significativement à la latitude ($P = 0.210$). Concernant la longitude, les deux axes présentent une corrélation significative (PC1 : $P = 0.006$, $R^2 = 0.057$; PC2 : $P = 0.004$, $R^2 = 0.061$), avec toujours une forte dispersion. Afin de prendre en compte l'ensemble des dimensions composant l'espace des formes défini par les coefficients de Fourier, une régression multiple multivariée a été réalisée entre les 25 coefficients et la latitude ($P < 0.001$; $R^2 = 0.458$) ainsi que la longitude ($P < 0.001$; $R^2 = 0.588$). Il en résulte cette fois deux relations significatives avec des R^2 beaucoup plus élevés que dans le cas de régressions linéaires simples. La longitude semble de plus avoir une influence plus importante que la latitude au contraire des résultats obtenus sur la taille. Cependant, leur influence reste peu marquée sur les premiers axes de l'analyse en composante principale et doit probablement s'exprimer sur des axes supportant un plus faible pourcentage de la variance totale.

La mandibule a largement été utilisée dans le cas d'études réalisées à l'échelle inter-spécifique, témoignant de nets signaux de différenciation (Cardini, 2003, Monteiro et al., 2005, Caumul & Polly, 2005). La variation intra-spécifique a aussi été abordée (Racz et al., 2005 ; Ozaki et al., 2007). Nos résultats montrent que les patrons de différenciation biogéographiques au sein du campagnol roussâtre n'émergent que très peu de l'étude de forme de la mandibule. Les pourcentages de reclassification sont bas et ni la divergence inter-lignées, ni des gradients géographiques n'apparaissent clairement dans l'espace

morphologique, masqués par la variation intra-groupe. Seule la divergence de la population espagnole semble particulièrement robuste, les individus étant parfaitement identifiés de part leur forme. Cette observation pourrait s'expliquer par des conditions climatiques et géographiques locales particulières. En effet, la région des Asturies où les spécimens ont été piégés est connue pour présenter un relief escarpé avec des altitudes variant entre le niveau de la mer et 2640 m sur une distance de 40 km seulement (Benavides et al., 2007). Cette région, cernée par l'océan Atlantique au nord et la cordillère Cantabrique au sud présente de ce fait des fluctuations saisonnières très marquées du taux de précipitations (Marquínez et al., 2003), offrant des conditions propices au développement de la végétation et des faunes associées. La région des Asturies serait de plus au même titre que le Pays Basque un exemple de refuge glaciaire très localisé au sein de la péninsule Ibérique (Vialatte et al., 2008). La forte différenciation de la population espagnole au sein de mon jeu de données pourrait de ce fait être un témoin de l'histoire complexe de cette région malgré la faible différenciation observée entre lignées mitochondriales, mettant en avant un cas d'évolution rapide non détectée par les analyses moléculaires.

Suite à cette étude visant à analyser les patrons de différenciation morphologiques de la mandibule à l'échelle de l'Europe, je vais considérer un second jeu de données qui s'intéressera aux variations de la mandibule à l'échelle intra-population.

La structure d'âge, facteur majeur de variation intra-populations

Le poids du cristallin étant disponible, et correspondant au meilleur indicateur d'âge connu, des classes d'âge ont été définies arbitrairement sur la base de ce paramètre. Les poids des cristallins mesurés vont de 17 mg pour le plus jeune spécimen à 74 mg pour le plus vieux, et cinq classes ont été définies (A < 35 mg, B < 45mg, C < 55mg, D < 65mg et E < 75mg). Tous les individus considérés sont sevrés (dernière molaire émergée). Les variations de taille et de forme ont été investiguées selon ces classes d'âges.

Variations morphologiques de la mandibule

La taille de la mandibule a été représentée en fonction des différentes classes d'âge (Fig. 4). Une croissance rapide est observée entre les classes A et C (classes A et B étant significativement différentes, $P < 0.001$ ainsi que B et C, $P < 0.001$). Un pallier est ensuite

atteint (classes C et D non différentes, $P = 0.437$). Suite à ce pallier une légère augmentation de taille est observée (classes D et E légèrement différentes, $P = 0.012$).

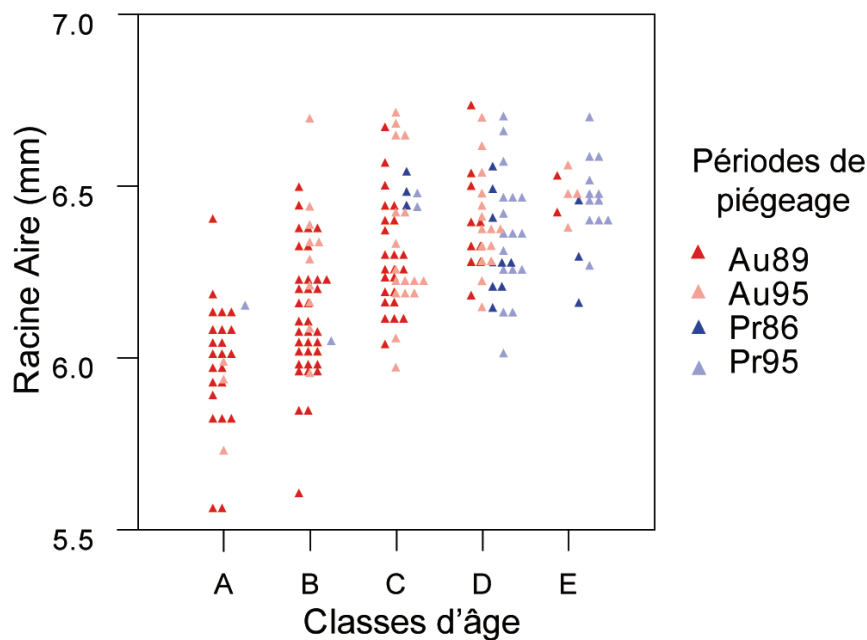


Figure 4. Représentation des variations de taille de la mandibule en fonction des cinq classes d'âge. Chaque point représente un individu et chaque symbole correspond à sa période de piégeage.

Mes résultats mettent donc en évidence le fait que la taille définitive de la mandibule est loin d'être atteinte au moment du sevrage puisqu'elle continue d'augmenter de façon conséquente dans des assemblages d'individus tous sevrés (c'est-à-dire ayant au minimum 28 à 30 jours, période où les molaires sont toutes émergées, Liénard, 2003). Cela suggère que le campagnol roussâtre présente un mode de croissance différent de celui observé chez d'autres rongeurs comme les murinés dont par exemple la souris (Zelditch et al., 2003), qui atteint 80% de sa taille définitive à la fin du sevrage (20^{ième} jour de croissance) et 95% lors de la maturité sexuelle (45^{ième} jour). Dans certains cas extrêmes de mammifères précoces comme *Trichomys aperoides* (Monteiro et al., 1999), la stabilisation intervient même au moment de la naissance si ce n'est avant. Dans le cas du campagnol roussâtre, le sevrage intervient plus tard que pour la souris (28-30^{ième} jour de croissance), ce qui n'affecte cependant pas mon étude qui ne considère que la période post-sevrage. Concernant par contre l'âge de la maturité sexuelle chez le campagnol roussâtre, celle-ci n'est pas fixe et des phénomènes de décalage de l'arrivée à maturité peuvent avoir lieu en fonction de différents paramètres comme la densité de population ou la période de naissance (printemps ou automne) (Prévot-Julliard et al., 1999). Dans le premier cas, des densités trop importantes entraîneraient un manque de

territoires libres pour les jeunes sub-adultes, paramètre nécessaire à l'initiation de la reproduction et entraînant par conséquent un décalage de la maturité sexuelle. Dans le second cas, la gestation demandant beaucoup d'énergie, certains individus choisiraient à l'approche de l'hiver de retarder l'arrivée de la maturité sexuelle afin d'avoir des chances de survie plus importantes au cours des périodes froides de l'année. Dans les deux cas, un décalage de la maturité sexuelle pourrait ainsi expliquer la croissance prolongée du campagnol roussâtre par rapport à la souris, conduisant à une poursuite plus marquée de l'augmentation de la taille après le sevrage.

Outre l'influence de la dynamique de croissance sur la taille de la mandibule, les variations de forme ont été étudiées. Une analyse en composante principale a été réalisée et les deux premiers axes principaux ont été représentés (PC1 = 40.8% et PC2 = 19.8%, Fig. 5A). Contrairement à l'Europe j'ai choisi de représenter la totalité des individus dans l'espace morphologique. Une importante variabilité étant à nouveau observée, les ellipsoïdes de confiance (95%) ont été représentés pour chacune des cinq classes d'âge. Il apparaît une nette différenciation des classes d'âge le long de l'axe 1 malgré un chevauchement entre les classes A et B (ANOVA : $P = 0.824$) et entre les classes D et E ($P = 0.474$). La classe C est intermédiaire et se différencie significativement de B ($P < 0.001$) et de D ($P = 0.006$).

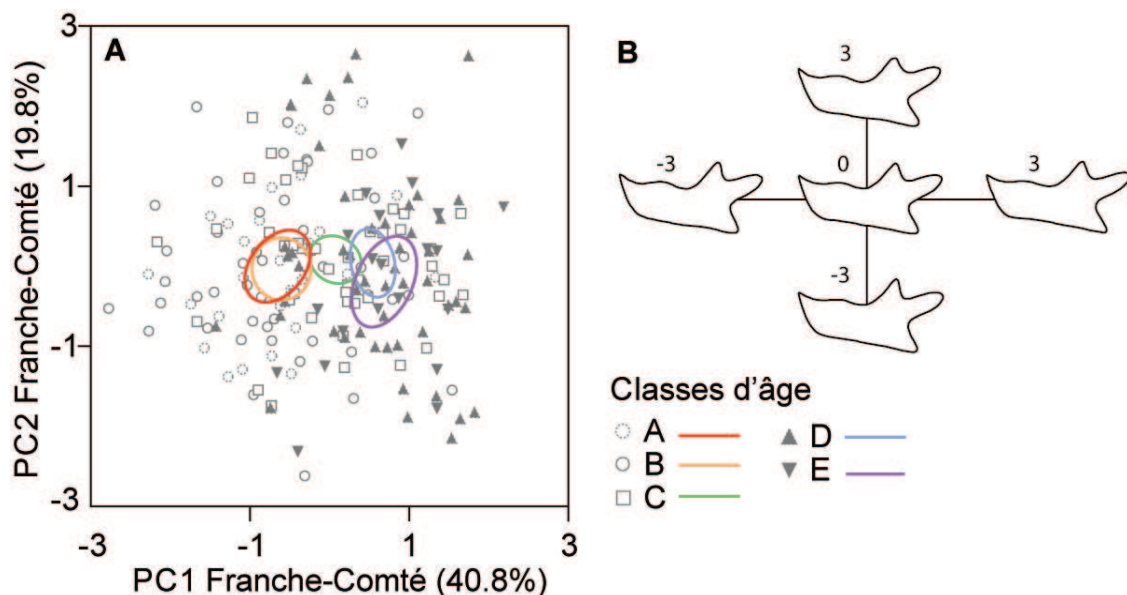


Figure 5. (A) Variations de forme de la mandibule du campagnol roussâtre à l'échelle d'une population de Franche-Comté. Les deux premiers axes d'une analyse en composante principale (ACP) réalisée sur les coefficients de Fourier sont représentés. Chaque point correspond à un individu et chaque symbole à la classe d'âge à laquelle il est attribué. Les ellipsoïdes de confiance (95%) sont représentés pour chaque classe.

Afin de visualiser les changements de forme sur la mandibule les contours reconstitués ont été réalisés le long des axes. Le long de l'axe 1 on observe des apophyses plus marquées chez les vieux individus (Fig. 5B, valeurs positives de l'axe). La partie alvéolaire semble se modifier aussi en se creusant chez les individus plus âgés, mais la comparaison visuelle entre deux mandibules réelles (Fig. 6) tendrait plutôt à montrer qu'il s'agirait d'un allongement de la partie postérieure de la mandibule, donnant l'impression de creusement. Finalement, la variabilité expliquée par l'axe 2 est commune à toutes les classes d'âge et implique aussi des modifications des apophyses (Fig. 5B). Elle reste cependant non identifiée pour l'instant.

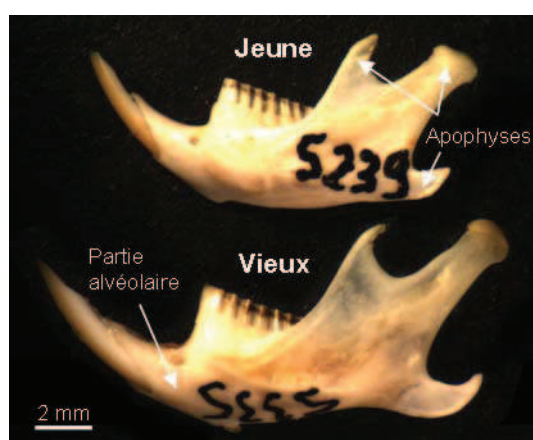


Figure 6. Photo représentant les mandibules gauches d'un individu jeune (en haut) et d'un individu vieux (en bas). La partie alvéolaire et les apophyses (zones d'insertions musculaires) sont indiquées par des flèches.

Dans l'étude sur la variation morphologique de la souris *Mus musculus domesticus*, Renaud & Auffray (2010) ont proposé que la structure d'âge des populations pouvait être un facteur contribuant à la variation de forme au même titre que le type de nourriture ingéré. L'analyse de la population de campagnol roussâtre de Franche-Comté confirme cette hypothèse, la différenciation entre classes d'âge se retrouvant clairement le long de l'axe 1 de l'ACP.

La forme de la mandibule changerait donc bien avec l'âge (Huja & Beck, 2007), ce qui n'est pas surprenant au regard des nombreuses études qui ont mis en avant une relation importante entre la croissance osseuse de la mandibule et le remodelage qui intervient tout au long de la vie de l'animal (Lightfoot & German, 1998 ; Bresin et al., 1999 ; Renaud et al., 2010). Cependant, l'étude de Zelditch et al. (2003) a montré chez les murinés que les changements liés à l'âge étaient importants durant les premières semaines de vie des animaux, mais tendaient à se stabiliser assez rapidement (95% de la forme adulte étant atteints au moment de la maturité sexuelle chez la souris). Des rythmes de croissance différents entre les souris et les campagnols pourraient expliquer que dans ce dernier cas des modifications de

formes notoires soient observées au cours de la croissance tardive alors que les modifications post-sevrage semblent plus limitées chez les murinés (Zelditch et al., 2003 ; Renaud, 2005).

Importance de la période de capture pour les études biogéographiques

Afin de mieux comprendre l'influence que peuvent avoir ces résultats pour les études s'intéressant à des campagnols piégés *in natura*, la répartition des classes d'âge en fonction des périodes de capture ont été étudiées (Fig. 7). En effet il a été observé que la structure d'âge des populations changeait au cours de l'année en fonction des périodes de reproduction saisonnières (Tkadlec & Zejda, 1998).

J'ai ainsi observé une majorité de campagnols appartenant aux classes d'âge D et E au sein des populations de printemps (88% pour Pr95 et 80% pour P86) alors que les populations d'automne apparaissent plus hétérogènes. Au95 présente ainsi une majorité d'individus appartenant à la classe C (37%), puis 31% à la classe D et 24% de jeunes (classes A et B). Les très vieux (classe E) sont représentés à hauteur de 8%. La population Au89 présente quant à elle une majorité de jeunes (classes A et B, 62%). La classe C est représentée à hauteur de 25% et les classes D et E de 11% et 2% respectivement.

Les résultats obtenus sur la mandibule concordent donc avec ce qui avait été mis en évidence sur la molaire (Chapitre 2.1 – Guérécheau et al., 2010), montrant que les populations de printemps présentaient une majorité de vieux individus alors que les populations automnales étaient composées d'une majorité de jeunes. D'importantes variations de taille et de forme de la mandibule ayant été observées selon les classes d'âges, qui elles-mêmes varient en fonction des périodes d'échantillonnage, la prise en compte de ce paramètre lors des campagnes de capture apparaît comme primordiale.

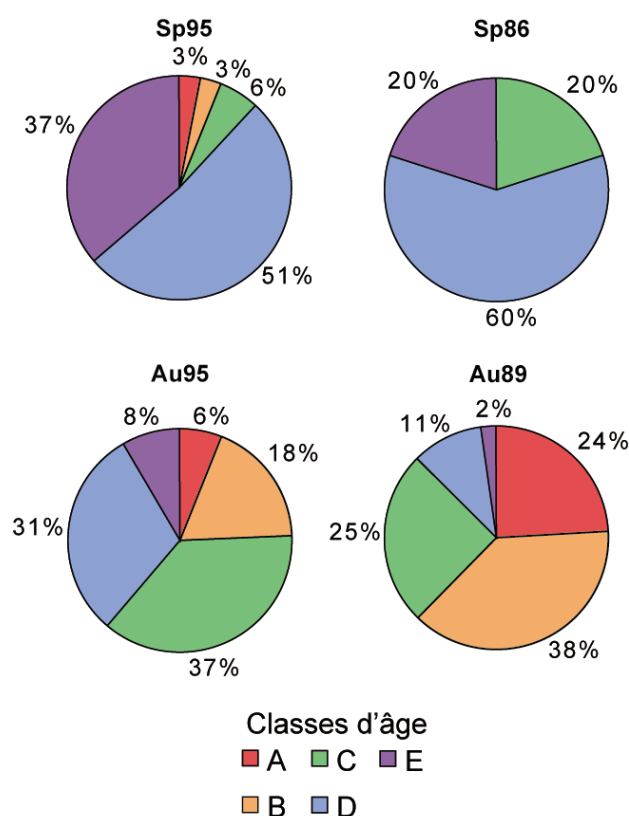


Figure 7. Pourcentage des différentes classes d'âges au sein des quatre périodes de piégeage : Printemps 1995 (Pr95), Printemps 1986 (Pr86), Automne 1995 (Au95) et Automne 1989 (Au89).

La structure d'âge des populations, une composante non négligeable de la variation à l'échelle biogéographique

Afin de déterminer si la variabilité liée à la structure d'âge des populations pouvait contribuer à la forte variation observée à une échelle géographique plus grande, les spécimens de Franche-Comté ont été ajoutés aux spécimens européens (Fig. 8). Les spécimens de Franche-Comté ont été moyennés pour chaque classe d'âge.

On observe ainsi qu'une nette différenciation des classes existe le long de l'axe 1 (PC1 = 39.8% de la variance totale), avec à nouveau les deux classes A et B superposées et D et E très proches également (Fig. 8A). Dans le plan composé de l'axe 2 (PC2 = 19.7%) et de l'axe 3 (PC3 = 11.7%) (Fig. 8B), les classes d'âge ont tendance à se regrouper à l'exception de E qui se différencie le long de l'axe 3. La différenciation entre classes d'âges apparaît comme étant d'un ordre de grandeur similaire à la différenciation observée entre les lignées mitochondriales sur l'axe 1. Un effet allométrique étant à nouveau observé ici, les résidus issus d'une régression multiple multivariée entre la taille et la forme de la mandibule ont à nouveau été calculés et analysés. Malgré cela la séparation des classes d'âge le long de PC1 est toujours observée (graphique non présenté). Ce serait donc bien lié à des changements de forme au cours de la vie de l'animal et pas directement à une augmentation de la taille.

La structure d'âge des populations participe donc largement à la variation même à une échelle aussi vaste que celle de l'Europe. Le patron de différenciation observé à l'échelle européenne sur la mandibule est ainsi très similaire avec ce qui a été précédemment observé sur la molaire (Chapitre 2.2 - Guérécheau et al., 2010) où une nette opposition entre populations de printemps et d'automne était observée. Cependant, en comparaison de la dent (Chapitre 1.1 - Ledevin et al., 2010), le signal phylogénétique sous-jacent apparaît comme complètement brouillé sur la mandibule.

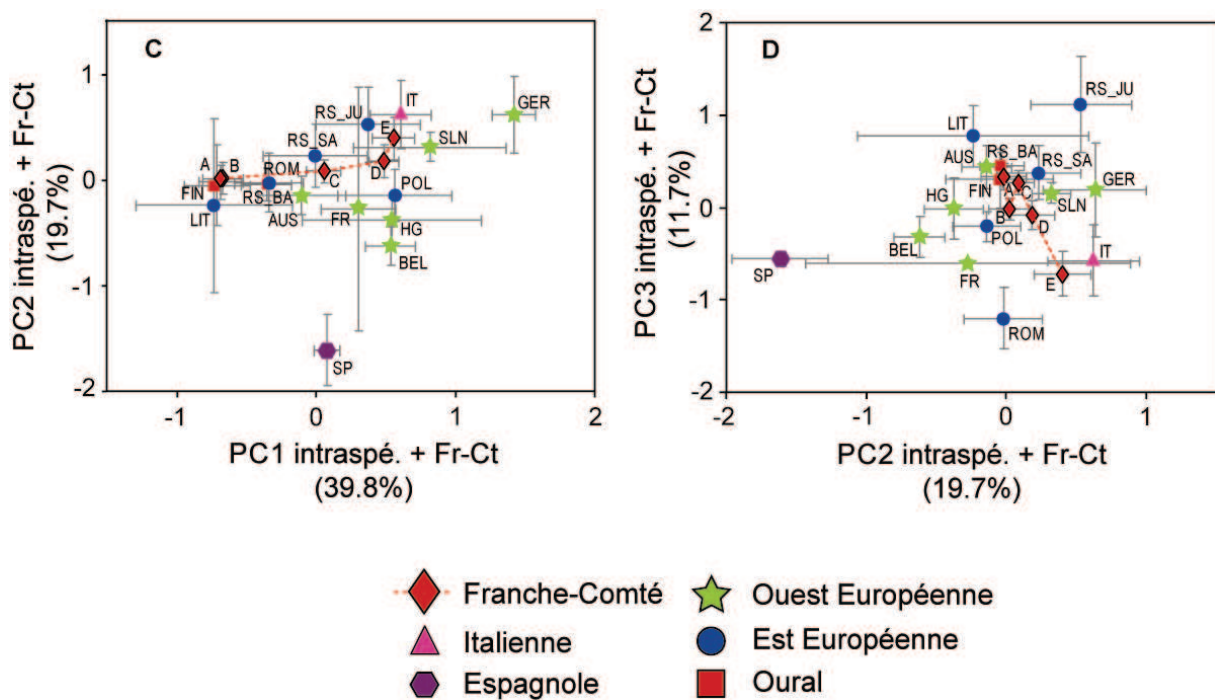


Figure 8. Variations de forme de la mandibule du campagnol roussâtre à l'échelle européenne et incluant les spécimens de Franche-Comté. Les trois premiers axes principaux d'une ACP réalisée sur les coefficients de Fourier sont représentés. Chaque point correspond à la moyenne d'une localité ($\pm$ l'intervalle de confiance autour de la moyenne) et le symbole à la lignée mitochondriale représentée (pour le jeu de donnée européen) ou à une classe d'âge (pour le jeu de données Franche-Comté). (A) Différenciation de forme dans le plan PC1-PC2. (B) Différenciation de forme dans le plan PC2-PC3.

Conclusion

Cette étude a permis de mieux caractériser la variation morphologique de la mandibule du campagnol roussâtre, montrant dans un premier temps que contrairement à la molaire (Deffontaine et al., 2009 ; Ledevin et al., 2010) il ne s'agissait pas d'un marqueur pertinent dans le cas d'études visant à étudier la structuration biogéographique de cette espèce. En effet,

nous avons pu mettre en évidence le fait que la structure d'âge des populations influence considérablement à la fois la taille et la forme de la mandibule, masquant presque complètement le signal phylogénétique.

Cependant, si ce résultat s'applique dans le cas du campagnol roussâtre, il ne peut pas être généralisé à d'autres modèles sans connaître au préalable leur mode de croissance. En effet Zelditch et al. (2003) ont montré en comparant deux rongeurs présentant des rythmes de croissance différents que l'impact de la croissance tardive sur la morphologie allait varier selon le mode de croissance. Ainsi dans certains cas comme la souris ou le mulot, qui présentent un taux de croissance rapide, les modifications associées à des phénomènes de croissance tardive liés à l'âge influenceront peu la mandibule (Renaud, 2005) alors que dans le cas du campagnol elles semblent largement non négligeables.

Références

- Benavides, R., Montes, F., Rubio, A. & Osoro, K. 2007 Geostatistical modelling of air temperature in a mountainous region of Northern Spain. *Agricultural and Forest Meteorology* **146**, 173–188.
- Blois, J. L., Feranec, R. S. & Hadly, E. A. 2008 Environmental influences on spatial and temporal patterns of body-size variation in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Journal of Biogeography* **35**, 602–613.
- Bergmann, C. 1847 Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Gottinger Studien* **1**, 595-708.
- Boratynski, Z., Koskela, E. & Mappes, T. 2009 The effect of mtDNA introgression on phenotype - body mass and basal metabolic rate.
- Bresin, A., Kiliadis, S. & Strid, K.-G. 1999 Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *European Journal of Oral Sciences* **107**, 35-44.
- Cardini, A. 2003 The geometry of the marmot (Rodentia: Sciuridae) mandible: phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Biology* **52**, 186-205.
- Caumul, R. & Polly, P. D. 2005 Phylogenetic and environmental components of morphological variation: skull, mandible and molar shape in marmots (*Marmota*, Rodentia). *Evolution* **59**, 2460-2472.
- Daegling, D. J. 1992 Mandibular morphology and diet in the genus *Cebus*. *International Journal of Primatology* **13**, 545-570.
- Deffontaine, V., Ledevin, R., Fontaine, M. C., Quéré, J.-P., Renaud, S., Libois, R. & Michaux, J. R. 2009 A relict bank vole lineage highlights the biogeographic history of the Pyrenean region in Europe. *Molecular Ecology* **18**, 2489–2502.
- Ellison, G. T. H., Taylor, P. J., Nix, H. A., Bronner, G. N. & McMahon, J. P. 1993 Climatic adaptation of body size among pouched mice (*Saccostomus campestris*: Cricetidae) in the southern African subregion. *Global Ecology and Biogeography Letters* **3**, 41-47.
- Firmat, C., Rodrigues, H. G., Renaud, S., Claude, J., Hutterer, R., Garcia-Talavera, F. & Michaux, J. 2010 Mandible morphology, dental microwear, and diet of the extinct giant rats *Canariomys* (Rodentia: Murinae) of the Canary Islands (Spain) *Biological Journal of the Linnean Society* **101**, 28-40.
- Guérécheau, A., Ledevin, R., Henttonen, H., Deffontaine, V., Michaux, J. R., Chevret, P. & Renaud, S. 2010 Seasonal variation in molar outline of bank voles: An effect of wear? *Mammalian Biology* **75**, 311-319.

- Gündüz, I., Jaarola, M., Tez, C., Yeniyurt, C., Polly, P. D. & Searle, J. B. 2007 Multigenic and morphometric differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, Scuridae, Rodentia) in Turkey, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**, 916–935.
- Huja, S. S. & Beck, F. 2007 Bone remodelling in maxilla, mandible, and femur of young dogs. *The Anatomical record* **29**, 1-5.
- Ledevin, R., Michaux, J. R., Deffontaine, V., Henttonen, H. & Renaud, S. 2010 Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**, 681-694.
- Liénard, E. 2003 Contribution à l'étude des carnivores sauvages comme sentinelles de la fièvre hémorragique à syndrome rénal, *Ecole Vétérinaire de Nantes, Nantes*, 1-145.
- Lightfoot, P. S. & German, R. Z. 1998 The effects of muscular dystrophy on craniofacial growth in mice: a study of heterochrony and ontogenetic allometry. *Journal of Morphology* **235**, 1-16.
- Marquínez, J., Lastra, J. & García, P. 2003 Estimation models for precipitation in mountainous regions: the use of GIS and multivariate analysis. *Journal of Hydrology* **270**, 1–11.
- Michaux, J., Chevret, P. & Renaud, S. 2007 Morphological diversity of Old World rats and mice (Rodentia, Muridae) mandible in relation with phylogeny and adaptation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **45**, 263–279.
- Monteiro, L. R. 1999 Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology* **48**, 192-199.
- Monteiro, L. R., Lessa, L. G. & Abe, A. S. 1999 Ontogenetic variation of skull shape in *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae). *Journal of Mammalogy* **80**, 102-111.
- Monteiro, L. R., Bonato, V. & Reis, S. F. 2005 Evolutionary integration and morphological diversification in complex morphological structures: mandible shape divergence in spiny rats (Rodentia, Echimyidae). *Evolution and Development* **7**, 429–439.
- Ozaki, M., Suwa, G., Kaji, K., Ohba, T., Hosoi, E., Koizumi, T. & Takatsuki, S. 2007 Correlations between feeding type and mandibular morphology in the sika deer. *Journal of Zoology* **272**, 244–257.
- Prevot-Julliard, A.-C., Henttonen, H., Yoccoz, N. G. & Stenseth, N. C. 1999 Delayed maturation in female bank voles: optimal decision or social constraint? *Journal of Animal Ecology* **68**, 684-697.
- Racz, G., Gubányi, A. & Vozár, A. 2005 Morphometric differences among root vole (Muridae: *Microtus oeconomus*) populations in Hungary. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **51**, 135–149.
- Renaud, S. 2005 First upper molar and mandible shape of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) from northern Germany: ageing, habitat and insularity. *Mammalian Biology* **70**, 157-170.
- Renaud, S. & Auffray, J.-C. 2010 Adaptation and plasticity in insular evolution of the house mouse mandible. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **48**, 138–150.
- Renaud, S., Chevret, P. & Michaux, J. 2007 Morphological vs. molecular evolution: ecology and phylogeny both shape the mandible of rodents. *Zoologica Scripta* **36**, 525–535.
- Renaud, S., Auffray, J.-C. & de la Porte, S. 2010 Epigenetic effects on the mouse mandible: common features and discrepancies in remodelling due to muscular dystrophy and response to food consistency. *Evolutionary Biology* **10**, 28.
- Renaud, S. & Michaux, J. R. 2007 Mandibles and molars of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* (L.): integrated latitudinal signal and mosaic insular evolution. *Journal of Biogeography* **34**, 339-355.
- Rohlf, F. J. & Archie, J. W. 1984 A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology* **33**, 302-317.
- Sundell, J. & Norrdahl, K. 2002 Body size-dependent refuges in voles: an alternative explanation of the Chitty effect. *Annales Zoologici Fennici* **39**, 325-333.
- Taylor, A. B. & Groves, C. P. 2003 Patterns of mandibular variation in *Pan* and *Gorilla* and implications for African ape taxonomy. *Journal of Human Evolution* **44**, 529-561.
- Tkadle, E. & Zejda, J. 1998 Small rodent population fluctuations: The effects of age structure and seasonality. *Evolutionary Ecology* **12**, 191-210.

- Vialatte, A., Guiller, A., Bellido, A. & Madec, L. 2008 Phylogeography and historical demography of the Lusitanian snail *Elona quimperiana* reveal survival in unexpected separate glacial refugia. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 339.
- Zelditch, M. L., Lundrigan, B. L., Sheets, H. D. & Garland Jr., T. 2003 Do precocial mammals develop at a faster rate? A comparison of rates of skull development in *Sigmodon fulviventer* and *Mus musculus domesticus*. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 708-720.

Conclusions et Perspectives

Conclusion

Au cours de cette thèse je me suis intéressé à l'étude des variations morphométriques chez un rongeur forestier, le campagnol roussâtre *Myodes glareolus*. Différentes échelles de variation ont été considérées, allant de l'échelle de l'Europe à l'échelle de populations. De plus, grâce à l'intégration à l'analyse morphologique de méthodes et de concepts complémentaires issus de la génétique moléculaire (ADN mitochondrial : Valérie Deffontaine Deurbroeck, ADN nucléaire : Bernard Lehanse. Analyses réalisées sous la supervision de Johan R. Michaux au CBGP de Montpellier) et des dernières avancées en biologie du développement, les différents processus évolutifs intervenant dans la variation phénotypique ont pu être étudiés.

L'histoire évolutive du campagnol roussâtre

Différents caractères ont été analysés dans le premier chapitre (premières molaires supérieure et inférieure, troisième molaire supérieure), et des résultats contrastés ont été obtenus. Si la mandibule s'est avérée être un caractère très variable, l'analyse comparée de forme des trois molaires a permis de reconstituer un patron de différenciation biogéographique cohérent au sein du campagnol roussâtre (Chapitre 1.1), nous offrant l'opportunité d'étudier les processus de différenciation intra-spécifique. Ainsi l'existence de groupes géographiques précédemment mis en évidence par les analyses phylogéographiques a pu être déterminée sur la base du phénotype, traduisant l'influence des derniers cycles glaciaires sur la divergence intra-*M. glareolus*. Concernant la taille, une décroissance vers les hautes latitudes a été observée, faisant exception à la règle de Bergmann. Des processus écologiques peuvent expliquer cette tendance (une plus petite taille permettant de diminuer la pression de prédation par exemple). Dans le cas des plus hautes latitudes, un autre phénomène peut intervenir, celui de l'hybridation avec une espèce nordique de campagnol, *M. rutilus*, plus petite et mieux adaptée à des environnements froids et plus pauvres en nourriture.

Dans une seconde sous-partie, deux études se sont intéressées au cas particulier de lignées mitochondriales du pourtour méditerranéen (Chapitre 1.2.1 et 1.2.2) : la lignée Basque et la lignée Gargano. Ces lignées ont été identifiées grâce à l'étude de l'ADNmt, et la morphométrie a permis de caractériser ces populations sur la base du phénotype, apportant des informations concernant les processus de sélection ayant conduit à la différenciation de

ces lignées. La UM3 étant le meilleur marqueur de différenciation entre les lignées du pourtour méditerranéen sur à la fois la taille et la forme, c'est ce caractère qui a été choisi. Il s'est ainsi avéré qu'une bonne cohérence existait entre la date de divergence de la lignée Basque (similaire à celle des autres lignées, soit environ 270 000 ans) et sa différenciation morphologique, similaire à celle observée entre les autres lignées. Ceci était moins évident dans le cas du Gargano dont le temps de divergence a été estimé à environ 70 000 ans, soit presque quatre fois moins que les autres lignées. Malgré tout, cette lignée s'est très nettement différenciée, mettant en évidence un cas d'évolution rapide en contexte proche de l'insularité (le promontoire du Gargano présentant une longue histoire d'isolement au cours du Quaternaire).

Finalement, la dernière partie du Chapitre 1 s'est intéressée à des populations de Fennoscandinavie mettant tout d'abord en évidence deux zones de contact entre lignées mitochondriales (Oural et Ouest européenne en Suède, Oural et Est européenne en Finlande). L'analyse morphologique, mise en regard d'analyses portant sur l'ADN nucléaire (microsatellites, étude réalisée par Bernard Lehanse sous la supervision de Johan R. Michaux), a révélé des patrons cohérents à ceux de l'ADNmt dans le sud de la Fennoscandinavie, mais une structuration beaucoup plus complexe a été révélée dans le nord. D'un point de vue morphologique, la lignée Oural est effectivement retrouvée dans cette région, mais en proportion réduite. Les lignées Ouest et Est européennes remontent en effet beaucoup plus haut au nord que ce qui était prédit par l'ADNmt, mettant en évidence une zone de contact correspondant globalement à la frontière Suède-Finlande. Pour finir, la région nord témoigne aussi de la mise en contact de l'espèce *M. glareolus* avec l'espèce *M. rutilus*, offrant l'opportunité d'éclaircir l'origine de la lignée Oural issue de l'hybridation entre ces deux espèces. La découverte d'un spécimen intermédiaire entre les deux espèces a ainsi permis d'argumenter en faveur d'une hybridation toujours en cours actuellement entre les deux espèces, rejetant l'hypothèse d'une hybridation ponctuelle qui se serait passée au sein d'un refuge glaciaire au sud de l'Oural.

L'analyse des molaires, et plus particulièrement de la troisième molaire supérieure, a permis de mieux appréhender la structuration biogéographique du campagnol roussâtre et les processus conduisant à des différenciations intra-spécifiques. Cependant, mes résultats ont mis en évidence une importante variabilité lors de l'étude du contour, que j'ai cherché à expliquer dans le Chapitre 2.

Variabilité du patron dentaire chez *Myodes glareolus*

Parmi les facteurs susceptibles de se superposer au patron de différenciation biogéographique, j'ai participé dans un premier temps au test de l'influence de la structure d'âge de populations en Finlande (Chapitre 2.1), puis en Franche-Comté (Chapitre 2.2). Il s'est avéré que l'effet de l'âge avait une influence considérable lors des études morphométriques en générant des assemblages de degrés d'usure différents entre populations. De ce fait, une très nette différenciation entre les individus piégés au printemps et à l'automne a été observée. J'ai de plus pu montrer qu'outre un impact important à l'échelle intra-population, cet effet expliquait une grande partie du signal de forme lors d'études réalisées à l'échelle européenne. Les traits d'histoire de vie participent donc largement à la variation par l'intermédiaire de différences dans les structures d'âge des populations au cours de l'année. Un tel facteur devrait être pris en considération dans les études biogéographiques qui piègent le plus souvent une fois par localité, et à un instant « t » de l'année. Cependant, cela n'est pas forcément possible, des phénomènes de cyclicités démographiques inter-annuels pouvant venir s'ajouter aux cyclicités saisonnières. Piéger uniquement au cours d'une saison ne garantirait donc pas l'absence de l'influence de la structure d'âge dans les études biogéographiques. Ce facteur reste de plus difficile à prendre en considération en absence de critères de l'âge des spécimens étudiés comme le poids du cristallin ou à défaut les racines dentaires.

Finalement, une seconde étude s'est intéressée à une autre source de variation observée sur la troisième molaire supérieure (Chapitre 2.2) : l'occurrence de deux morphotypes *simplex* et *complex* au sein du campagnol roussâtre, correspondant respectivement à la présence ou l'absence d'un quatrième triangle lingual au niveau de la partie postérieure de la dent. D'après mes résultats, l'existence de ces morphotypes serait produite par des variations intervenant au cours du développement. L'addition séquentielle de triangles se déroulant au cours du processus de développement de la dent ne semble pas modifiée, et le polymorphisme de la UM3 résulterait plutôt de variations ayant lieu dans sa partie postérieure, correspondant à un allongement plus ou moins important. Mes résultats ont pu finalement montrer que le déterminisme de la longueur de la dent n'était lié au développement de la rangée dentaire qu'à hauteur de 20%. De plus amples investigations sont donc nécessaires pour déterminer les facteurs expliquant les 80% de variation restants. Une des pistes envisagées étant que les conditions maternelles (poids, nutrition, santé etc.) influencent de façon significative la croissance des jeunes et par conséquent leur développement dentaire.

Si au cours des deux premiers chapitres, l'étude des molaires a été privilégiée, dans le troisième chapitre je me suis intéressé à la variation de la mandibule afin d'établir une comparaison avec les résultats obtenus sur les dents.

Variations morphologiques de la mandibule

L'étude de la mandibule a mis en évidence une importante variabilité. Le remodelage osseux intervenant tout au long de la vie de l'animal peut expliquer les différences de forme et de taille marquées observées entre individus appartenant à des classes d'âge différentes au sein d'une population de Franche-Comté. Cette différenciation est du même ordre de grandeur que celle observée entre populations à l'échelle de l'Europe, masquant en grande partie la structuration biogéographique de l'espèce. L'influence de la structure d'âge chez le campagnol roussâtre est vraisemblablement intimement liée à son rythme de croissance. Les spécimens considérés pouvaient tous être considérés comme sub-adultes ou adultes (étant tous sevrés comme en témoigne la présence de la dernière molaire), et pourtant ils ont montré une croissance encore importante de la mandibule, localisée dans sa partie postérieure. A l'inverse dans le cas des souris une croissance rapide est observée, se stabilisant en grande partie lorsque la maturité sexuelle est atteinte autour du 45^{ième} jour de croissance (Zelditch et al., 2003). Des phénomènes de retardement de la maturité sexuelle observés chez le campagnol roussâtre pourraient expliquer cette période de croissance plus longue. Mes résultats mettent donc en avant l'importance de considérer la dynamique de croissance du taxon étudié lorsque la mandibule est l'objet d'intérêt.

Perspectives

L'étude dans l'actuel des variations de taille et de forme des molaires et mandibules du campagnol roussâtre *Myodes glareolus* a nécessité l'intégration de concepts touchant à des thématiques aussi variées que le développement des organismes, les traits d'histoire de vie, l'environnement, la différenciation génétique, etc. C'est cette intégration qui a permis au cours de cette thèse de mieux appréhender la complexité des mécanismes conduisant à la grande diversité des patrons de forme observés chez le campagnol roussâtre (cas par exemple de l'isolement répété des individus Basques et Gargano, ou au contraire de la mise en contact de spécimens appartenant à différentes lignées mitochondriales, voir même à différentes espèces).

Par la suite, un couplage des données biologiques récoltées durant cette thèse avec des données paléontologiques permettra d'intégrer la dimension temporelle à la dimension spatiale, poussant encore plus loin la compréhension de la dynamique évolutive du campagnol roussâtre. Des fouilles réalisées dans les Hautes-Pyrénées sous la responsabilité de Vincent Mourre (La Grotte du Noisetier à Fréchet-Aure) ont notamment mis à jour des restes de *Myodes glareolus* antérieurs au dernier maximum glaciaire (Moustérien). En intégrant les fossiles au jeu de données actuel il pourrait être possible de les attribuer à l'un des groupes géographiques identifiés au cours de cette thèse. Le même type d'étude pourrait aussi être réalisé sur des fossiles provenant de Slovaquie (collection de Peter Klepsatel).

L'intégration de fossiles provenant de différentes régions d'Europe pourrait ainsi permettre de déterminer si au fil des cycles glaciaires-interglaciaires la recolonisation du milieu à partir des zones refuges s'est systématiquement effectuée de la même façon, ou si différents scénarios ont eu lieu. Il est par exemple possible d'envisager une recolonisation de l'Europe de l'Ouest dominée par les lignées méditerranéennes dans le cas d'une glaciation peu importante, impliquant une faible couche de glace sur les Pyrénées et les Alpes et autorisant une recolonisation précoce. Au contraire, une glaciation de grande ampleur comme celle du dernier maximum glaciaire a pu favoriser la recolonisation de l'Europe de l'Ouest par les lignées d'Europe centrale, les lignées méditerranéennes ne pouvant franchir rapidement les barrières montagneuses lors de la période de déglaciation. Ce type de scénario aurait conduit à l'établissement des lignées géographiques observées dans l'actuel.

Résumé

Pour mieux comprendre l'impact du changement climatique actuel sur la biodiversité, les fluctuations du climat au Quaternaire (~2.5 Ma - Présent) offrent un contexte particulièrement approprié. La succession de cycles glaciaires-interglaciaires a en effet eu un impact majeur sur la répartition des espèces végétales et animales en provoquant une alternance entre les phases de fragmentation des milieux et les phases de recolonisation. La dernière glaciation, dont le maximum glaciaire s'est terminé il y a environ 19 000 ans, a ainsi largement participé à la distribution des espèces actuelles. Les derniers milliers d'années constituent donc une période de choix pour l'étude de la mise en place et du maintien de la biodiversité.

L'objectif de ma thèse a ainsi été de mieux comprendre comment une espèce de rongeur forestier apparue il y a environ 2 millions d'années, le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*), avait répondu à ces cycles du Quaternaire. Mon étude s'est basée sur une approche morphométrique de plusieurs caractères impliqués dans la mastication (mandibule et molaires), visant à quantifier la différenciation de forme associée à l'influence de différents facteurs.

Des résultats contrastés ont été obtenus selon le caractère considéré, la mandibule montrant une importante variabilité liée aux variations de la structure d'âge des populations.

Au contraire, les molaires ont pu être utilisées comme marqueur de la structuration biogéographique du campagnol roussâtre. Malgré des résultats concluants avec notamment la caractérisation morphologique de deux nouvelles lignées dans le Pays Basque (France) et au Mont Gargano (Italie), et la remise en question de l'origine de la lignée Oural (Nord de l'Europe), l'influence de plusieurs facteurs brouillant le signal biogéographique a pu être étudiée. Ainsi le développement participe largement à la variation, de même que la structure d'âge des populations qui comme pour la mandibule s'est avérée être un facteur de variation majeur.

Finalement, l'étude dans l'actuel des variations de taille et de forme des molaires et mandibules du campagnol roussâtre *Myodes glareolus* a nécessité l'intégration de thématiques variées touchant au patrimoine génétique des organismes, à leur développement, aux traits d'histoire de vie, à l'environnement, etc.. C'est cette intégration qui a permis au cours de cette thèse de mieux appréhender la complexité des processus conduisant à la grande diversité des patrons de forme observés chez le campagnol roussâtre. Par la suite, un couplage de ces données biologiques récoltées avec des données paléontologiques permettrait d'intégrer la dimension temporelle à la dimension spatiale offrant ainsi l'opportunité d'aller encore plus loin dans la compréhension de la dynamique évolutive du campagnol roussâtre et de l'impact des changements climatiques passés sur cette espèce.