
Thèse de Doctorat

Présentée par

Elodie RENVOISÉ

Pour l'obtention du titre de :
Docteur de l'Université de Bourgogne
En Paléontologie

**Histoire des Arvicolinae (Mammalia, Rodentia) au cours
des changements climatiques du Quaternaire :
Evolution phénotypique, génétique et développementale**

Soutenue le 14 Mai 2009

MEMBRES DU JURY

Mme C. DENYS	Professeur	Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Mr J. JERNVALL	Professeur	Université d'Helsinki	Rapporteur
Mme S. HUGHES	CR1	ENS Lyon	Examineur
Mr P. NEIGE	Professeur	Université de Bourgogne	Examineur
Mr P. Alibert	MCU	Université de Bourgogne	Examineur
Mme S. MONTUIRE	DR	EPHE/Université de Bourgogne	Directeur
Mme C. TOUGARD	CR1	Université Montpellier II	Co-Directeur

Thèse de Doctorat

Présentée par

Elodie RENVOISÉ

Pour l'obtention du titre de :
Docteur de l'Université de Bourgogne
En Paléontologie

**Histoire des Arvicolinae (Mammalia, Rodentia) au cours
des changements climatiques du Quaternaire :
Evolution phénotypique, génétique et développementale**

Soutenue le 14 Mai 2009

MEMBRES DU JURY

Mme C. DENYS	Professeur	Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Mr J. JERNVALL	Professeur	Université d'Helsinki	Rapporteur
Mme S. HUGHES	CR1	ENS Lyon	Examineur
Mr G. ESCARGUEL	MCU	Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Mr P. NEIGE	Professeur	Université de Bourgogne	Examineur
Mr P. ALIBERT	MCU	Université de Bourgogne	Examineur
Mme S. MONTUIRE	DR	EPHE/Université de Bourgogne	Directeur
Mme C. TOUGARD	CR1	Université Montpellier II	Co-Directeur

Remerciements

Le travail de thèse, comme toute étude scientifique, ne se ferait pas sans le concours des collaborateurs, des ingénieurs et techniciens, ni sans le soutien des collègues, des amis et de la famille.

Tout d'abord, j'aimerais remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté d'être présent à ma soutenance et de participer activement à la discussion de mon travail : Mme Christiane Denys, Mme Sandrine Hughes, M. Jukka Jernvall, M. Pascal Neige, M. Gilles Escarguel et M. Paul Alibert.

Je tiens également à remercier les membres du comité de thèse qui, lors de nos différentes réunions, ont apporté leurs conseils scientifiques et leurs remarques pertinentes pour orienter et améliorer ce travail de thèse : Mme Christiane Denys, Mme Claudine Montgelard, Mme Catherine Hänni, M. Paul Alibert et M. Pascal Neige.

Toute ma considération et ma sympathie se tourne vers mes deux directrices de thèse qui ont accepté de m'encadrer tout au long de cette thèse. Je tiens à les remercier pour leur écoute, le partage de leurs connaissances et leur disponibilité qui ont permis le bon déroulement de ce travail durant plus de trois ans.

Toute mon amitié et mon admiration se portent vers Gilles Escarguel et Emmanuelle Vennin. Deux personnes qui m'ont guidée dans mon parcours professionnel et personnel, et sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui. J'admire leur dévouement pour leur travail et leur esprit scientifique aiguisé.

Toute ma gratitude va à Jean-Pierre Quéré et Hervé Lesot : le premier pour le prêt de matériel et ses connaissances avisées sur les campagnols, le deuxième pour les discussions passionnantes que nous avons eu sur le développement dentaire des rongeurs.

Pour les parties statistiques je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire Biogéosciences qui m'ont aidée, parmi lesquelles M. Stéphane Garnier, M. Paul Alibert, M. Rémi Laffont. Je remercie également les personnes extérieures au laboratoire comme M. Gilles Escarguel de l'université Lyon 1, M. Ahmad Jebrane, Mme Catherine Labruère-Chazal de l'Institut de mathématiques de Bourgogne et M. Nicolas Navarro de l'université de Barcelone.

Many thanks to Mr. Alistair Evans from the Monash Univesrity in Australia for his helpful collaboration in the developmental evolution of arvicoline and the developmental model.

Je remercie également tous les membres du laboratoire Développement et Communication chez les insectes, surtout les ingénieurs, techniciens et doctorants qui m'ont aidé à chaque instant de mes expériences.

Je remercie Eva-Maria Geigl et Sophie Champlot de l'Institut Jacques Monod pour m'avoir fait découvrir les techniques de PCR quantitative appliquées à l'ADN ancien. J'ai ensuite pu développer cette technique au laboratoire Biogéosciences grâce à leurs conseils avisés et au soutien de Christelle Tougard.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé dans mes fouilles sur le terrain pour récolter des mandibules de campagnols. Je salue leur gentillesse et le

fait de m'avoir acceptée sur leurs sites de fouilles malgré les contraintes que je devais leur faire subir. Parmi ces personnes je tiens à remercier M. Jérôme Primault, M. Stéphane Hinguant, M. Vincent Mourre, Mme Marie-Hélène Moncel, MM. Pierre-Yves Nicot et Régis Picavet, Mme Anne Tresset, M. Serge Grapin et M. Christophe Durllet et leurs équipes respectives.

Pour la récolte des pelotes de réjection je tiens tout particulièrement à saluer la gentillesse de MM. Julien et Philibert Soufflot pour le partage de leur passion et leur dévouement à la protection des chouettes effraies en Bourgogne.

Je tiens à remercier également Béryl Laitung du laboratoire de Biologie végétale et de gestion des adventices pour son aide dans la connaissance de la répartition des plantes majoritaires en France.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire Biogéosciences avec lesquelles j'ai pu travailler de près ou de loin et qui m'ont été d'une aide précieuse, même ponctuelle.

Je remercie tous les doctorants et anciens doctorants du laboratoire Biogéosciences, ainsi que certains plus particulièrement qui me sont plus proches : Benjamin Marie, Elise Escudé, Soumia Sarih, Nathalie Le-Roy et Aurélie Bonin.

Pour son soutien moral et sa bonne humeur matinale je remercie Evelyne Debierre avec laquelle il est toujours possible de discuter et trouver du réconfort.

Toute ma sympathie va à toute l'équipe organisatrice et tous les doctorants de l'Expérimentarium qui m'ont fait vivre une expérience de vulgarisation scientifique inoubliable et qui a été nécessaire la construction de mon expérience de chercheur.

Je porte une affection particulière à Marcel Jeannet qui a voué sa vie à la détermination des petits mammifères et à leur connaissance.

Je souhaite également remercier toute ma famille et mes amis pour leur soutien et pour avoir toujours cru en moi. Je tiens à remercier tout particulièrement ma mère pour avoir relu et corrigé le français de ce manuscrit ainsi que mon fiancé qui a su être patient et compréhensif pendant toutes ces années.

Sommaire

INTRODUCTION	9
I. Evolution des Arvicolinae (Mammalia, Rodentia) : relations avec les changements climatiques au Quaternaire.	9
I.1 Histoire évolutive des Arvicolinae	9
I.2 Phénotype dentaire et paléoclimats : contrainte développementale vs. sélection	16
I.3 Développement du patron dentaire et évolution	18
I.4 Evolution du génotype en relation avec le climat	21
I.4.1 Phylogéographie et paléoclimats	21
I.4.2 Paléogénétique et paléoclimats	24
I.5 Organisation de la thèse	26
I.5.3 Chapitre I : Impact du climat actuel dans les variations morphologiques et génétiques des populations de campagnols	26
I.5.4 Chapitre II : Evolution du patron dentaire au cours du temps chez les campagnols : Modularité et Développement	27
I.5.5 Chapitre III : Evolution génétique chez l'espèce <i>Microtus arvalis</i> : paléogénétique et taphonomie	28
CHAPITRE I : IMPACT DU CLIMAT SUR LES VARIATIONS MORPHOLOGIQUES ET GENETIQUES DES POPULATIONS.	31
I. Impact du climat sur les variations morphologiques et génétiques chez les mammifères	31
II. Le campagnol des champs et le climat actuel	35
II.1 PUBLICATION 1	37
III. Complément de discussion à la PUBLICATION 1	68
IV. Conclusion et Perspectives	71
CHAPITRE II : EVOLUTION DU PATRON DENTAIRE CHEZ LES ARVICOLINES : MODULARITE ET EVO-DEVO	75
I. Intégration morphologique et modularité	75
II. Développement du patron dentaire chez les mammifères	79
II.1 Histologie de la mise en place des dents	81
II.2 Implication des gènes du développement dans la morphogenèse dentaire	83
II.3 Modèles morphogénétiques des cuspides et de la rangée dentaire.	83
II.3.1 Modèles morphogénétiques au sein des cuspides	83
II.3.2 Modèles morphogénétiques de la rangée dentaire	86
III. Développement dentaire chez les campagnols	89
III.1 PUBLICATION 2	95
IV. Complément de discussion à la PUBLICATION 2	107
V. Evolution du développement dentaire chez les arvicolinés	109
V.1 PUBLICATION 3	111
VI. Modularité, développement et évolution du patron dentaire : conséquences sur l'évolution des arvicolinés	127
VII. Conclusions et perspectives	131

Sommaire

CHAPITRE III : EVOLUTION GENETIQUE CHEZ L'ESPECE <i>MICROTUS ARVALIS</i> : ADN ANCIEN ET TAPHONOMIE	135
I. Introduction	135
I.1 L'ADN ancien chez les rongeurs	136
I.2 Problématique	138
II. Processus de dégradation de l'ADN	141
III. Matériels et méthodes	144
III.1 Matériel actuel : mandibules de <i>Microtus arvalis</i>	144
III.2 Matériel digéré : mandibules de rongeurs de pelotes de réjection	144
III.3 Matériel fossile : mandibules de <i>M. arvalis</i> et dent de grand mammifère	144
III.4 Conditions expérimentales	149
III.5 Extraction de l'ADN	149
III.6 PCR classique versus PCR quantitative	150
III.6.1 Principes de la PCR classique	150
III.6.2 Principes de la PCR quantitative	151
III.7 Méthode de quantification de l'ADN initial	159
III.8 Clonage et séquençage	161
IV. Résultats	161
IV.1 Quantification de l'ADN actuel	161
IV.2 Quantification de l'ADN digéré de pelote de rejection	162
IV.3 Quantification de l'ADN fossile	166
V. Discussion	167
V.1 Dégradation de l'ADN dans les mandibules de pelotes de réjection	167
V.2 Problème de validation des séquences en ADN ancien	168
V.3 La préservation de l'ADN au-delà de 12 000 ans est-elle possible chez les rongeurs ?	169
VI. Conclusion et Perspectives	172
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	177
I. Impact du climat sur l'évolution phénotypique des campagnols	177
I.1 Relation forte entre structuration morphologique et climatique chez <i>Microtus arvalis</i> actuel	177
I.2 Evolution du développement dentaire et environnement	178
II. Impact des changements climatiques sur l'évolution génétique des populations de campagnols	180
III. Impact climatique sur l'évolution du développement dentaire des campagnols	182
IV. Développement dentaire et hypsodontie : relation avec l'évolution des campagnols	184
V. Relation entre réponse phénotypique et réponse génétique aux changements climatiques	185
VI. Mécanismes évolutifs et reconstructions phylogénétiques	186
VII. Résumé des conclusions et perspectives majeures	188
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	191

Sommaire

ANNEXES	211
Annexe 1 : Reappraisal of 'chronospecies' and the use of <i>Arvicola</i> (Rodentia, Mammalia) for biochronology	211
Annexe 2 : New insight into the colonization processes of common voles: Inferences from molecular and fossil evidence	225
Annexe 3 : Rodents and paleogenetics: New perspectives	237
Annexe 4 : Informations supplémentaires à la PUBLICATION 3	247

Introduction

INTRODUCTION

I. Evolution des Arvicolinae (Mammalia, Rodentia) : relations avec les changements climatiques au Quaternaire.

I.1 Histoire évolutive des Arvicolinae

La sous-famille des Arvicolinae (Gray, 1821), campagnols, lemmings et rats musqués, appartient à la famille des Cricetidae (Carleton et Musser, 2005). Elle constitue la deuxième sous-famille la plus diversifiée des Cricetidae. Cette sous-famille est composée de 28 genres, 13 sous-genres et 146 espèces actuelles et de 28 genres fossiles (McKenna et Bell, 1997; Carleton et Musser, 2005). Le genre le plus diversifié chez les Arvicolinae est le genre *Microtus*, pour lequel 62 espèces sont référencées actuellement (Carleton et Musser, 2005). Les Arvicolinae dérivent des Cricetidae ancestraux (revue dans Carleton et Musser, 2005). Cependant, leur origine phylogénétique précise n'est pas connue (Chaline *et al.*, 1999). Leur répartition géographique actuelle se situe dans toute la zone eurasiennne et nord-américaine (Figure 0.1, Montuire *et al.*, 1997; Carleton et Musser, 2005).

Les dernières reconstructions phylogénétiques basées sur des données morphologiques et génétiques proposent que, parmi les 17 tribus actuelles et fossiles des Arvicolinae (Kowalski, 2001), 4 tribus actuelles sembleraient être monophylétiques (Robovský *et al.*, 2008) : les tribus de Dicrostonychini, Lemmini, Clethrionomyini et Arvicolini, la plus diversifiée (Figure 0.2). Les genres *Ellobius*, *Prometheomys*, *Hyperacrius* et la tribu des Lagurini se situent phylogénétiquement à la base des Arvicolinae. *Dicrostonyx*, *Phenacomys* et *Arborimus* forment un clade (Dicrostonychini s.lat.). Selon cette phylogénie, les Arvicolinae incluraient trois sous-clades : Lemmini (*Synaptomys*, *Lemmus*, *Myopus*), Clethrionomyini (*Eothenomys*, *Myodes*) et Arvicolini (*Arvicola*, *Chionomys*, *Stenocranius* et *Microtus* avec les six derniers sous-genres monophylétiques : *Alexandromys*, *Neodon*, *Mynomes*, *Lasipodomys*, *Terricola* et *Microtus* s.str.). Les positions systématiques d'*Ondatra* et de *Dinaromys* sont encore incertaines pour l'instant (Robovský *et al.*, 2008).

Introduction

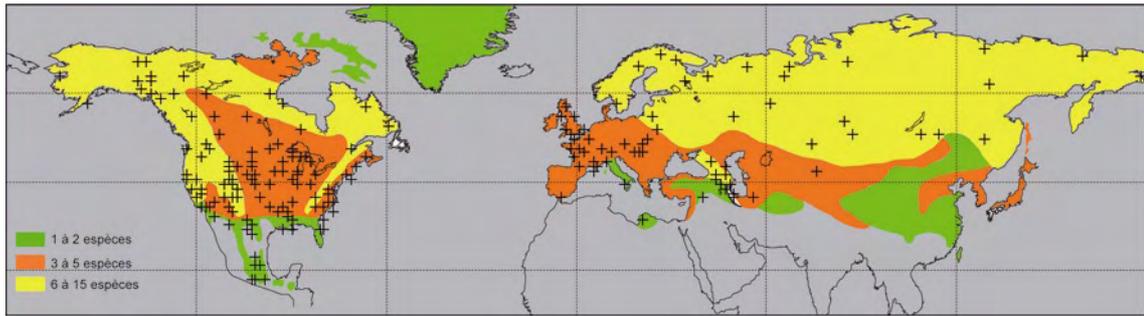


Figure 0.1 : Répartition géographique actuelle des Arvicolinae dans la zone holarctique. Les plages de couleurs différentes indiquent les zones de répartition des Arvicolinae en fonction du nombre d'espèces. Chaque croix correspond à une localité pour laquelle le nombre d'espèces d'Arvicolinae a été compté. Les localités couvrent une aire allant de 100km² à 10 000 km². D'après Montuire *et al.*, 1997.

La grande diversité des patrons dentaires chez les campagnols permet une identification générique assez précise dans le registre fossile. Les dents, chez les micromammifères, sont en général les restes les mieux préservés car l'émail est le tissu le plus résistant du squelette. Chez les campagnols, les dents, essentiellement la première molaire inférieure (m1), portent des caractères diagnostiques assez facilement reconnaissables à la loupe binoculaire. Ainsi il est possible de différencier les genres de campagnols tels que *Arvicola*, *Microtus* et *Myodes* par le nombre de triangles, l'épaisseur de l'émail, la présence ou non d'une racine, etc. (Figure 0.3).

Il est plus difficile de déterminer morphologiquement les espèces par des observations simples, notamment pour les espèces proches telles que, *M. arvalis* et *M. agrestis* (Navarro *et al.*, 2004) ou *M. (Terricola) savii* et *M. (Terricola) pyrenaicus* (Brunet-Lecomte, 1991; Tougard *et al.*, 2008a), ou bien les espèces cryptiques (*M. arvalis* et *M. obscurus*, Contet *et al.*, 2007). Pour cela, une étude de la morphologie plus précise et quantifiée par la prise de points sur le contour des dents (Brunet-Lecomte, 1988; Laplana *et al.*, 2000), ou bien par des méthodes de prise de contour telle que la transformée de Fourier (Renaud, 1997), permet de différencier de façon significative les espèces morphologiques entre elles (ex. Marchand *et al.*, 2003 ; Navarro, 2004; Renaud *et al.*, 2005; Giannini *et al.*, 2006; Escudé *et al.*, 2008).

Introduction

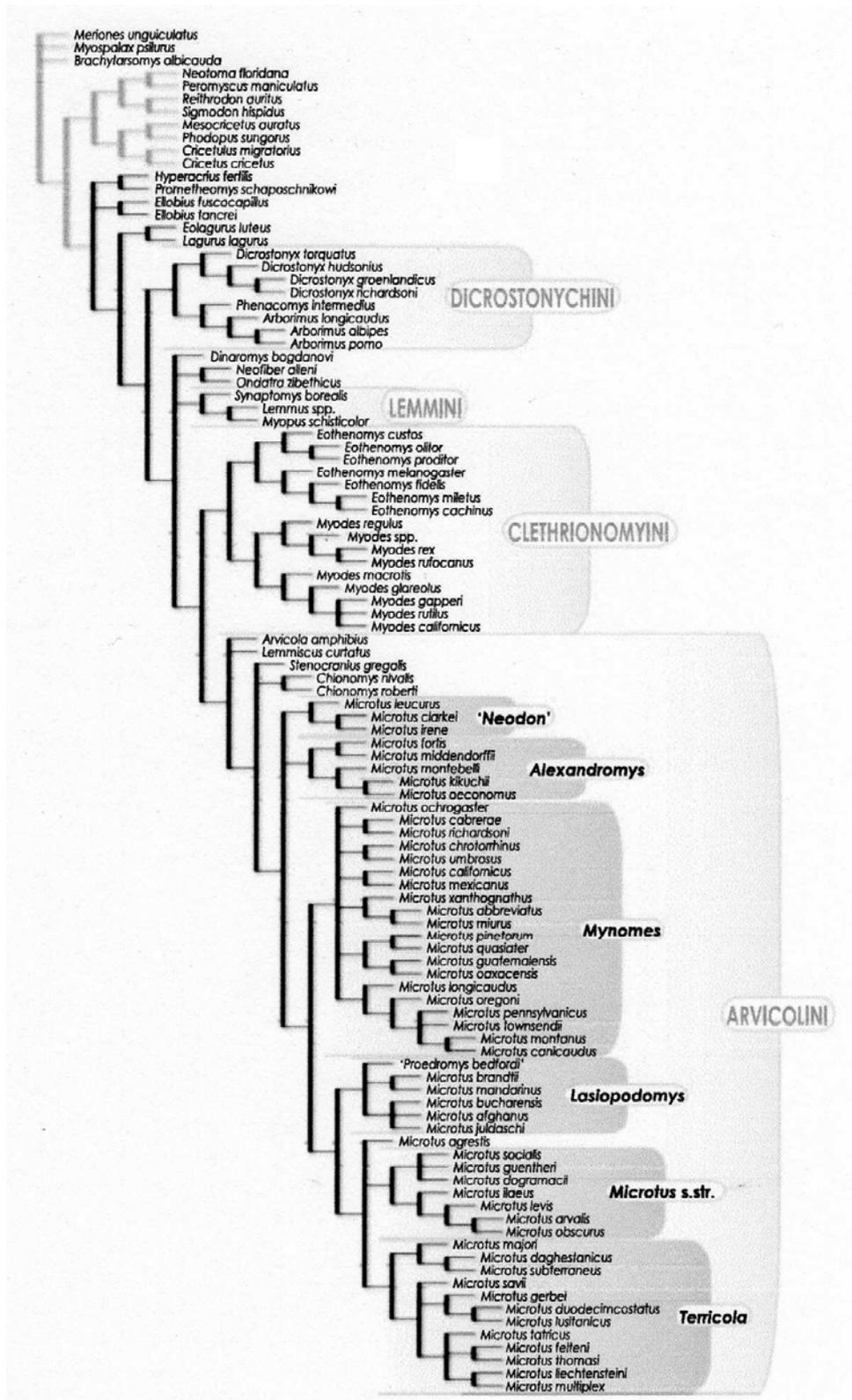


Figure 0.2 : Reconstruction phylogénétique proposée par Robovsky *et al.* (2008) chez les Arvicolinae. Cette phylogénie est un résumé des phylogénies obtenues à partir de données génétiques actuelles (mitochondrial : cytochrome b et nucléaire : GHR) en Approche Bayésienne et de données non moléculaires actuelles et fossiles (morphologie des dents, comportement, écologie, développement et cytogénétique) en Maximum de Parcimonie. La classification des Arvicolinae est représentée en noir. Les out-groupes sont représentés en gris. D'après Robovsky *et al.* (2008).

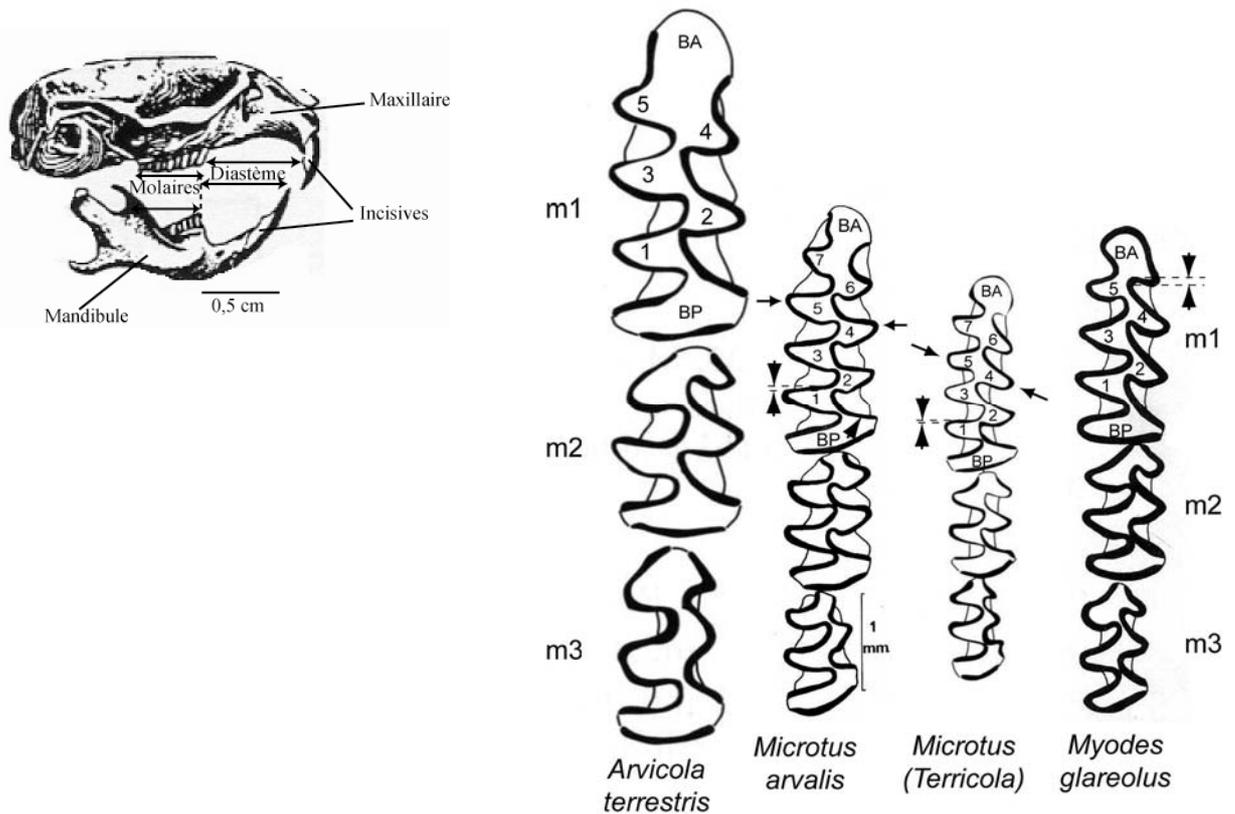


Figure 0.3 : Crânes de campagnols et comparaison visuelle des morphologies dentaires des espèces *Arvicola terrestris*, *Microtus arvalis*, *Myodes glareolus* et du sous-genre *Microtus (Terricola)*. Les différences les plus visuelles se situent au niveau des premières molaires inférieures (m1). Chez *M. arvalis* et *M. (terricola)* la m1 contient sept triangles (notés de 1 à 7) et une épaisseur d'émail fine (têtes de flèches qui encadrent les lignes pointillées). Les triangles 4 et 5 sont alternes chez la plupart des campagnols (*M. arvalis* ici) sauf chez le sous-genre *Terricola* où ils sont confluent. Les espèces *A. terrestris* et *M. glareolus* ne possèdent que 5 triangles dans la m1. La taille des individus du genre *Arvicola* est supérieure à celle des autres campagnols. Chez *M. glareolus* l'épaisseur d'émail est très forte (têtes de flèches qui encadrent les lignes pointillées). De plus, la base des molaires chez *M. arvalis* ne contient pas de racines, contrairement à *M. glareolus* (données non montrées ici). Toutes les rangées dentaires sont représentées à la même échelle. *Arvicola*, d'après Le Louarn et Quéré, 2003. *Microtus* et *Myodes*, d'après Chaline *et al.*, 1974.

D'après le registre fossile, les premiers arvicolinés sont apparus au Pliocène inférieur (≈ 5 Ma) en Amérique du Nord, en Europe et dans le nord-ouest de l'Asie (Carleton et Musser, 2005). Ils étaient nommés *Promimomys* en Europe (Fejfar, 1990; Chaline *et al.*, 1999) et *Prosomys* en Amérique du Nord (Repenning, 2003). Le sud de l'Asie n'a pas été peuplé par les Arvicolinae avant le Pliocène supérieur ($\approx 3,6$ Ma). Ces populations provenaient probablement de l'immigration des campagnols européens du genre *Mimomys* (Chaline *et al.*, 1999). La dispersion du genre *Mimomys* au début du Pliocène, via le détroit de Béring, a permis la diversification importante des populations d'Amérique du Nord (Repenning, 2003).

Actuellement, la dynamique des populations des campagnols est fortement dépendante des conditions de ressource, des prédateurs, de l'accroissement des espèces et

Introduction

donc des variations de densité de populations au cours du temps (Le Louarn et Quéré, 2003). Certains campagnols (ex. campagnol des champs, campagnol agreste, campagnol roussâtre, Le Louarn et Quéré, 2003) connaissent des périodes de pullulations, plus ou moins cycliques et plus ou moins fréquentes, qui peuvent être fonction des prédateurs (Chaline *et al.*, 1974; ex. rapaces : chouette effraie et grand duc, Andrews, 1990; mustélidés : belette, Delattre *et al.*, 1992; canidés : renard, Le Louarn et Quéré, 2003), de la capacité de reproduction et de la structuration des paysages. Par exemple, chez le campagnol des champs (*Microtus arvalis*), il a été démontré que les patrons de cinétique des populations étaient corrélés avec l'accroissement des prairies permanentes (Delattre *et al.*, 1992). Il existe différents biotopes chez les campagnols. Certains arvicolinés vivent dans des zones humides, tels que les marais (campagnol amphibie : *Arvicola sapidus*, forme aquatique du campagnol terrestre : *Arvicola terrestris*). D'autres vivent dans des milieux cavernicoles (substrat rocheux), comme le campagnol des neiges (*Chionomys nivalis*). Néanmoins, la plupart des arvicolinés vivent sur des substrats de sols profonds, car ils sont dotés d'un comportement plus ou moins fouisseur (Le Louarn et Quéré, 2003). De plus, certains campagnols vont préférer les milieux ouverts (campagnol amphibie, campagnol terrestre, campagnols du genre *Microtus*) et paysages de bocage (campagnols du genre *Microtus*, campagnol terrestre), tandis que d'autres vont marquer les environnements de lisières de forêt et de forêts franches comme le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*, Le Louarn et Quéré, 2003). La plupart des arvicolinés sont des herbivores (graines, racines, bulbes, rhizomes, écorces, tiges, etc.), mais parfois ils peuvent ingérer d'autres nourritures présentes dans leur milieu : insectes, écrevisses, poissons et amphibiens pour le campagnol amphibie, fruits et champignons pour le campagnol de Gerbe (*Microtus pyrenaicus*, majoritairement folivore), mollusques et vers chez le campagnol roussâtre etc. (*Myodes glareolus*, Le Louarn et Quéré, 2003). Le temps de survie des campagnols en milieu naturel est d'environ 18 mois dans le meilleur des cas. Le nombre de petits par portée et le nombre de portées par an sont dépendants des espèces. Cependant, les conditions du milieu, comme la température, le photopériodisme ou l'alimentation, peuvent être des facteurs importants dans l'initiation et l'arrêt de la saison de reproduction (ex. le campagnol des champs, Le Louarn et Quéré, 2003). En montagne, certains campagnols n'hibernent pas et se reproduisent sous la neige comme le campagnol des champs, le campagnol de Fatio (*Microtus multiplex*) et le campagnol des neiges.

Introduction

Les arvicolinés sont depuis longtemps utilisés pour comprendre l'évolution des petits mammifères sur le domaine continental au Quaternaire. Ils sont considérés par certains auteurs comme les "drosophiles" des paléobiologistes pour le Quaternaire (Chaline et Mein, 1979) car ils présentent une très grande diversité (Carleton et Musser, 2005) et une évolution rapide (Conroy et Cook, 1999; Jaarola *et al.*, 2004).

Les arvicolinés, par leur grande diversité spécifique actuelle et passée (Kowalski, 1970; Chaline, 1972; Kowalski, 2001; Carleton et Musser, 2005) sont des outils biostratigraphiques précis pour dater les couches géologiques au Quaternaire pour lesquelles la microfaune y est abondante (Charte biostratigraphique de l'Europe, Fejfar et Heinrich, 1983; Charte biostratigraphique mondiale, Repenning *et al.*, 1990; Revue biostratigraphique des muroïdes d'Europe et d'Asie du Néogène, Fejfar *et al.*, 1997). Cependant, certains genres, comme le genre *Arvicola*, ont été utilisés pour dater les couches géologiques et se sont révélés être de mauvais marqueurs biostratigraphiques (Annexe 1, Escudé *et al.*, 2008).

Par ailleurs, leur abondance dans le registre fossile (Kowalski, 2001), leur grande extension géographique (Figure 0.1) sur toute la zone holarctique (Montuire *et al.*, 1997; Carleton et Musser, 2005) et leurs différents biotopes, font des arvicolinés un bon outil permettant des reconstructions paléoenvironnementales, paléoécologiques et paléobiostratigraphiques tout au long du Quaternaire (ex. Fejfar et Repenning, 1992; Kolfshoten, 1992; Sesé, 1994; Montuire *et al.*, 1997; Chaline *et al.*, 1999).

L'évolution des Arvicolinae est caractérisée par deux radiations rapides ou "explosives". La première s'est mise en place lors de l'apparition des campagnols en Amérique du Nord et en Europe entre 6 et 5 Ma, pour le registre fossile (Chaline *et al.*, 1999), et vers $5,7 \pm 0,6$ Ma d'après les estimations moléculaires (Conroy et Cook, 1999). La deuxième radiation s'est produite vers 2 Ma d'après le registre fossile (Chaline et Graf, 1988) et entre $3,5 \pm 0,95$ et 1,6 Ma d'après les estimations moléculaires (Conroy et Cook, 1999) et correspond à l'apparition des campagnols modernes.

Différents modes évolutifs sont évoqués pour mettre en évidence ces radiations à différentes échelles de l'organisation biologique : 1) évolution graduelle marquée par l'apparition de nouvelles lignées (Chaline, 1987; Chaline et Brunet-Lecomte, 1992; Chaline *et al.*, 1999) ou 2) impulsions rapides de la mise en place des genres pendant la première radiation et des espèces pendant la deuxième radiation (Conroy et Cook, 1999; Jaarola *et al.*, 2004).

Introduction

Le mode graduel se base sur l'observation et la quantification des changements morphologiques dentaires des arvicolinés au cours du temps et de périodes d'apparition et d'extinction des lignées. L'hypothèse de lignée graduelle chez les arvicolinés est proposée pour expliquer les changements morphologiques : par exemple pour l'évolution des genres *Mimomys* et *Arvicola* (Figure 0.4) ou des genres *Allophaiomys* et *Microtus* (Chaline, 1987; Chaline *et al.*, 1999). De plus, l'augmentation du nombre de cuspides¹ au cours du temps chez les arvicolinés coïncide temporellement avec la mise en place de leur radiation (Figure 0.5). Cette observation ne permet pas d'affirmer ou d'infirmer l'évolution morphologique graduelle des arvicolinés, mais propose une visualisation de la tendance évolutive à l'augmentation du nombre de triangles sur la première molaire inférieure chez certains genres, comme *Microtus* notamment.

Le mode d'impulsions se base sur des données génétiques de l'ADN mitochondrial et propose une diversification rapide des lignées d'arvicolinés. L'évolution des arvicolinés serait plus une succession "d'impulsions" évolutives qu'une évolution graduelle (Conroy et Cook, 1999; Jaarola *et al.*, 2004).

Il est important de noter que ces deux hypothèses mettent en avant l'influence potentielle des variations du climat dans la mise en place des lignées au moment de la deuxième radiation des campagnols. Dès la fin du Pliocène supérieur, un début de refroidissement du climat est enregistré vers -3,8 / -3,5 Ma (Dansgaard *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999). Vers 2,4 Ma, les cycles climatiques du Quaternaire se mettent en place à l'échelle du globe terrestre (Dansgaard *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 1999). Ces cycles glaciaires et interglaciaires du Quaternaire ont eu un large impact sur la composition et la distribution de la flore et, pour ce qui nous intéresse plus particulièrement, sur les communautés fauniques continentales (Graham *et al.*, 1996; Klicka et Zink, 1997; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000; Hewitt, 2004; Heckel *et al.*, 2005). Chez les campagnols, la mise en place de ces cycles climatiques coïnciderait avec leur deuxième radiation "explosive", marquée à la fois par les données phénotypiques et par les données génétiques (Conroy et Cook, 1999; Jaarola *et al.*, 2004). Cependant, bien que l'influence du climat joue un rôle majeur dans la distribution et la dynamique de mise en place des populations, il est plus délicat d'affirmer que le climat puisse jouer un rôle direct dans la radiation des campagnols, que ce soit au niveau du phénotype dentaire ou au niveau du génotype. En effet, même si des corrélations sont mises en évidence

¹ Cuspides : éminence d'émail localisée à la face occlusale des prémolaires et molaires (www.prothesiste-dentaire.fr/pages/dico-cuspide.php)

aujourd'hui entre morphologie et climat ou bien entre génétique et climat, les mécanismes qui expliquent ces corrélations ne sont encore pas bien contraints.

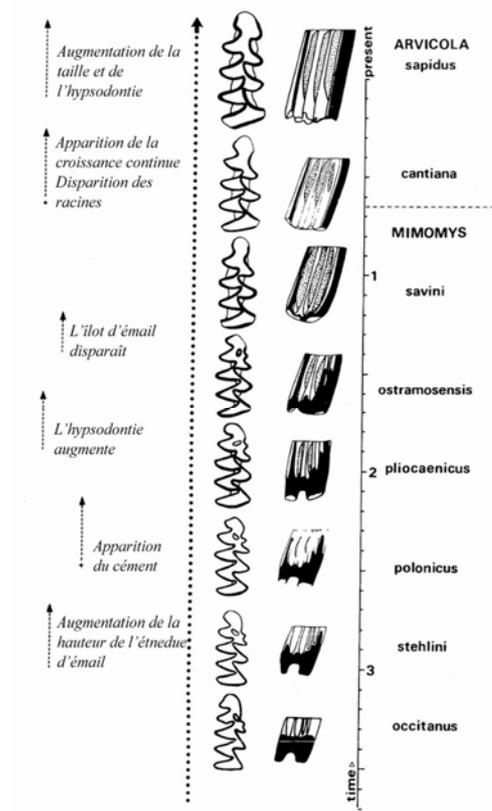


Figure 0.4: Gradualisme phylétique dans la lignée *Mimomys (Hintona) occitanus-Arvicola sapidus*, montrant les étapes majeures des tendances de l'évolution progressive : augmentation de l'hypsodontie, croissance de la hauteur d'étrédue d'émail, apparition du ciment, disparition de l'îlot d'émail et acquisition de la croissance continue, augmentation de la taille. D'après Chaline, 1987.

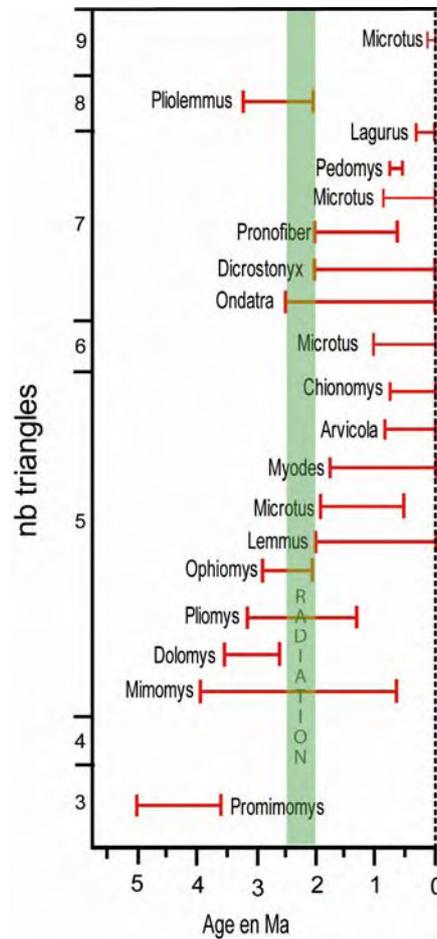


Figure 0.5 : Evolution du nombre de triangles chez les arvicolinés depuis 5 Ma jusqu'à l'actuel. Le deuxième événement de radiation majeur chez les arvicolinés est marqué par la bande verte-claire. Elle représente une période allant de 2,5 à 2 Ma. Le genre à part, *Pliolemmus*, avec 8 triangles apparaît avant la radiation. C'est un genre nord-américain. Données obtenues d'après Chaline *et al.* (1989)

1.2 Phénotype dentaire et paléoclimats : contrainte développementale vs. sélection

A l'échelle macro-évolutive, l'évolution du phénotype est un aspect primordial à étudier, accessible à la fois dans l'actuel et dans le fossile. Ainsi, pour un organisme fossile, il est possible d'appliquer le principe d'actualisme permettant de comprendre les mécanismes de l'évolution du phénotype. Au cours de l'évolution, un caractère morphologique peut se mettre en place progressivement ou bien apparaître brusquement.

Introduction

Ces patrons d'évolution de la forme peuvent être interprétés selon deux conceptions radicalement différentes : "externaliste" ou "structuraliste" (Gould, 1986) et "internaliste" (Alberch, 1989).

La conception externaliste (Figure 0.6) fait référence à la sélection naturelle comme principal agent d'organisation (néo-Darwinisme). Cette approche admet que les paramètres physiques et biotiques de l'environnement déterminent seuls la pression de sélection et, par conséquent, quelle forme sera sélectionnée, en général de façon graduelle. Toutes les formes possibles ne sont pas réalisées car elles n'ont pas été sélectionnées de la même façon. La conception internaliste (Figure 0.7) attribue une part de l'organisation phénotypique à l'émergence des propriétés intrinsèques du matériel vivant (Alberch, 1989). Toutes les formes possibles ne sont pas réalisées car leurs propriétés intrinsèques obéissent à des contraintes développementales. Les phénotypes qui apparaissent « brusquement » seront plutôt expliqués par ce modèle.

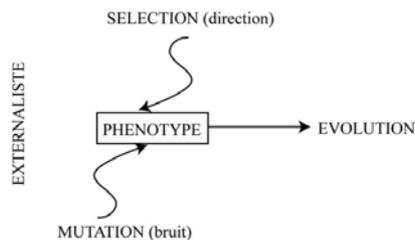


Figure 0.6 : Schéma externaliste. L'évolution phénotypique est le résultat de l'interaction entre la sélection naturelle déterministe et la variation due aux mutations. D'après Alberch, 1989.

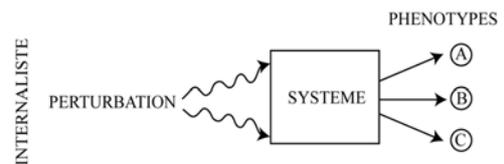


Figure 0.7 : Schéma internaliste. Les perturbations issues de mutations génétiques ou de l'influence de l'environnement sont filtrées par la dynamique d'un système "structurant". Ainsi, la structure même d'un développement impose un nombre fini et discret d'aboutissement possibles (phénotypes), même si les sources de perturbation sont aléatoires. D'après Alberch, 1989.

Chez les campagnols, les variations du phénotype sont surtout mises en évidence sur les caractères dentaires, notamment les molaires, pour leur critère diagnostique et pour leur bonne préservation dans le temps.

De récentes investigations sont faites sur la mesure des caractères dentaires pour quantifier la grande variabilité phénotypique chez les campagnols actuels et fossiles, afin de détecter les causes possibles conduisant à leur diversification (Marchand *et al.*, 2003; Montuire et Brunet-Lecomte, 2004; Navarro, 2004; Nappi *et al.*, 2006). Navarro (2004) a mené une étude paléontologique sur les variations morphologiques du campagnol des champs (*Microtus arvalis*) au cours du temps en fonction des changements climatiques du Quaternaire. Il a travaillé sur le site de Gigny (Jura, France, Campy *et al.*, 1989),

représenté par une série stratigraphique datée depuis 100 000 ans à aujourd'hui, dans laquelle les restes de micrommamifères sont très abondants. Une courbe de paléotempérature a été obtenue à partir d'un profil $\delta^{18}\text{O}$ du phosphate des dents de rongeurs (Navarro *et al.*, 2004). Il a été démontré dans cette étude que la morphologie dentaire de la première molaire inférieure pouvait être corrélée aux variations de l'humidité (ces variations sont marquées par la présence d'un genre de campagnol proche des milieux aquatiques : *Arvicola*). L'asymétrie de la boucle antérieure est plus marquée lorsque le climat est humide. Il a également mis en évidence une corrélation secondaire du phénotype avec la température. Par conséquent, il semblerait qu'il existe un lien entre les variations de la morphologie dentaire et les changements climatiques au cours du temps chez le campagnol des champs. Cependant ces résultats ne permettent pas de trancher sur les mécanismes évolutifs impliqués, ni de savoir quid de l'hypothèse internaliste ou externaliste est à même d'être évoquée dans l'évolution des campagnols. Il faudrait pour cela connaître, d'une part l'importance du développement dans la variabilité du phénotype dentaire et, d'autre part, l'impact de l'environnement sur le maintien de ces phénotypes.

1.3 Développement du patron dentaire et évolution

De récents progrès en biologie évolutive permettent de comprendre les mécanismes du développement, reliant le génotype et le phénotype, qui contribuent intrinsèquement à l'évolution des organismes, c'est la biologie du développement évolutive ou évo-dévo (Raff, 1996; Wagner et Altenberg, 1996; Kirschner et Gerhart, 1998; von Dassow et Munro, 1999; Beldade *et al.*, 2002). Un des concepts qui tente de relier ces mécanismes, entre organisation génétique et organisation phénotypique, est la modularité (ex. Wagner, 1996; Brandon, 1999; Schlosser, 2002; Eble, 2005). Le concept de modularité se base sur le fait que l'organisation biologique est faite de modules, unités qui peuvent évoluer différemment et avoir, potentiellement, des fonctions différentes (Lewontin, 1970; Wagner, 1996; Brandon, 1999; Stock, 2001; Schlosser, 2002; Eble, 2005). Les modules sont des unités robustes dans le temps (Raff, 1996; Kirschner et Gerhart, 1998; Schlosser, 2002) qui peuvent être répétitifs (Raff, 1996) et qui sont « quasi indépendants » (Lewontin, 1970), « compartimentés » (Kirschner et Gerhart, 1998) ou « semi-autonomes » (Raff, 1996; Wagner et Altenberg, 1996; Brandon, 1999; von Dassow et Munro, 1999) les uns par rapport aux autres. C'est-à-dire qu'au sein des modules, les interactions sont fortes, alors qu'entre les modules, les interactions existent

Introduction

mais elles sont moins importantes. Les définitions propres à la modularité peuvent varier considérablement, du module fonctionnel au module développemental en passant par le module évolutif (Callebaut, 2005; Klingenberg, 2008). Cependant, la notion même de l'organisation modulaire est centrale pour étudier les mécanismes du développement et analyser l'évolution morphologique, physiologique et la phylogénie (Bolker, 2000).

L'organisation modulaire des organismes aurait facilité l'évolution indépendante des groupes de traits appartenant à différents modules (Yang, 2001; Beldade *et al.*, 2002). Ainsi, la caractérisation des modules à différents niveaux d'intégration permet de faire correspondre les mécanismes génétiques contrôlant l'organisation développementale (ex. les effets pléiotropiques Wagner et Altenberg, 1996) et les contraintes sur leur évolution. L'identification d'un module comporte deux composantes : 1) la caractérisation et la quantification des interactions au sein des caractères phénotypiques (Klingenberg *et al.*, 2001; Klingenberg, 2005) et 2) la compréhension des mécanismes développementaux sous-jacents qui forment les caractères (Yang, 2001).

Chez les invertébrés et vertébrés, différents exemples d'organisation modulaire ont été démontrés, en relation avec les contraintes développementales, la fonctionnalité, l'environnement et la phylogénie. Yang (2001) a démontré chez les insectes holométaboles², qu'il existe une plus forte organisation modulaire des différents stades de développement que chez les insectes hémimétaboles³. Les holométaboles ont, statistiquement, un plus fort taux de diversification morphologique que les hémimétaboles et ils sont plus dérivés que les hémimétaboles développementalement. Ainsi, ces résultats renforcent l'idée que les différences intrinsèques de modularité peuvent influencer l'évolution à long terme des organismes. Klingenberg *et al.* (2001) ont mis en évidence que les ailes de bourdon antérieures et postérieures sont des modules développementaux indépendants. Les covariations inter-modulaires sont toujours présentes mais sont faibles. Les mécanismes d'interaction développementale entre ces deux paires d'ailes sont liés aux échanges gazeux avec le CO₂. Ainsi, grâce à la modularité développementale, il est possible de mettre en évidence à quel point les mécanismes développementaux régissent le phénotype modulaire. De plus, les

² Holométabole : se dit des insectes chez qui le passage de l'état larvaire à l'état adulte passe par un état nymphal.

³ Hémimétabole : ce développement caractérise des insectes ptérygotes (qui ont des ailes) dont les juvéniles ressemblent à l'adulte. Les ailes se développent progressivement jusqu'à l'état adulte sexuellement mûr.

covariations entre les modules mises en place au cours du développement, peuvent être dues à certains facteurs environnementaux, comme les échanges de CO₂ par exemple.

Chez les mammifères marsupiaux et placentaires, Hlusko *et al.* (2004) ont travaillé sur les effets pléiotropiques des gènes impliqués dans le développement des dents de babouins et la modularité des cuspides (ou lophes chez les babouins, Hlusko *et al.*, 2004). Ils ont démontré que des mécanismes génétiques différents régissent les patrons dentaires des lophes antérieurs et postérieurs au sein des molaires. Ces différences se retrouvent dans les modules du phénotype dentaire. Par conséquent, l'indépendance modulaire au sein des molaires est cohérente avec le retard développemental entre les lophes antérieurs et postérieurs.

Cette notion d'organisation modulaire se retrouve implicitement dans les expérimentations faites sur le développement des systèmes métamériques⁴ (Bolker, 2000; Stock, 2001). En effet, les systèmes métamériques constituent des exemples de sous-unités, développementales au niveau embryonnaire (ex. somites, Christ et Ordahl, 1995; Bolker, 2000) ou de la morphologie adulte (ex. feuilles de plantes, segments d'arthropodes, cheveux, dentition et membres de mammifères, Bolker, 2000; Stock, 2001). Les dents sont considérées comme des structures métamériques (Bateson, 1892; Butler, 1939). La rangée dentaire semble donc être un bon modèle pour comprendre l'importance des mécanismes développementaux dans l'organisation du phénotype et son évolution.

Cependant, même si la modularité permet de mettre en évidence les relations entre le phénotype et les mécanismes du développement, elle n'est pas en mesure de décrire précisément ces mécanismes. Par conséquent, l'étude du développement, de ses mécanismes et des modèles de développement élaborés, permettent de comprendre les relations qui existent entre développement et modularité phénotypique. Les modules développementaux ainsi définis, sont validés par les processus du développement connus par l'expérimentation et la modélisation.

Chez les mammifères, l'exemple le plus courant dans l'étude du développement dentaire est la souris (ex. Jernvall et Thesleff, 2000; Peterkova *et al.*, 2002; Viriot *et al.*, 2002; Line, 2003; Peterkova *et al.*, 2005; Obara et Lesot, 2007). Cependant, d'autres modèles de développement dentaire sont étudiés en comparaison avec le modèle murin : le babouin pour caractériser les effets pléiotropiques des gènes sur les molaires mandibulaires et maxillaires et de différencier les mécanismes conduisant à la

⁴ Métamérisme : répétition d'unités identiques de l'organisation corporelle.

modularité des molaires, (Hlusko *et al.*, 2004) ; le modèle humain pour lequel la perte progressive de la troisième molaire (dent de sagesse) est corrélée à la diminution de la taille de la mâchoire, (Silvestri et Singh, 2003) ; le rat a permis de montrer l'impact de la déplétion de l'expression de protéines "Heat-shock HSP-25" sur la prolifération des cellules de l'émail et de la dentine, (Nakasone *et al.*, 2006) ; la rangée dentaire complète de l'opossum permet de comprendre l'expression génétique chez cet animal qui est similaire à 95% avec celle de la souris et à 94% avec celle de l'humain, (Torres *et al.*, 2008) et notamment le campagnol pour lequel quelques travaux importants existent aujourd'hui et qui montrent les différences développementales entre deux rongeurs dont les histoires évolutives sont elles aussi différentes (Keränen *et al.*, 1998; Keränen *et al.*, 1999; Peterkova *et al.*, 2002; Matalova *et al.*, 2005; Witter *et al.*, 2005; Setkova *et al.*, 2006).

1.4 Evolution du génotype en relation avec le climat

1.4.1 Phylogéographie et paléoclimats

La répartition des espèces tempérées actuelles dépend très fortement des voies de migration empruntées, du nombre et de la situation des zones refuges pendant les périodes glaciaires et des zones de suture où les lignées ont pu se rencontrer (ex. Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000; Hewitt, 2004; Michaux *et al.*, 2004; Deffontaine *et al.*, 2005). Il est également nécessaire de prendre en compte la physiologie des espèces, indispensable à la survie dans des conditions drastiques comme les périodes glaciaires (Bhagwat et Willis, 2008). Par conséquent, l'évolution des populations est fortement dépendante du climat.

A partir des reconstructions phylogénétiques, il est possible de retracer l'histoire évolutive des êtres vivants à travers l'étude de la phylogéographie (Avice, 2000). Cette discipline, créée en 1987 par John Avice et ses collaborateurs (Avice *et al.*, 1987), permet l'étude des principes et processus qui concernent la répartition géographique des lignées généalogiques, surtout au niveau intraspécifique, au cours du temps (Avice, 1998). Interface entre les études micro-évolutives (éthologie, démographie, génétique des populations) et macro-évolutives (biogéographie, paléontologie, phylogénie), la phylogéographie est majoritairement établie grâce à la biologie moléculaire (Figure 0.8). Les premiers gènes sur lesquels les analyses phylogéographiques se sont portées sont les gènes mitochondriaux (Avice, 2000). L'ADN mitochondrial est un outil qui présente plusieurs avantages lorsque que l'on souhaite travailler à la fois à une échelle spatiale et

Introduction

une échelle temporelle. Il est présent en de nombreuses copies dans les cellules ($\approx 25\%$ du volume de cytoplasme cellulaire, Ballard et Whitlock, 2004). Son taux de mutation est supérieur à celui de l'ADN nucléaire car il est moins contraint par les processus de « réparation » de l'ADN (Beebee et Rowe, 2004). Il est transmis maternellement (Avice *et al.*, 1979) et c'est un marqueur neutre influencé principalement par des événements démographiques dans l'histoire des populations (Beebee et Rowe, 2004). Ce marqueur moléculaire est donc très utilisé en phylogéographie. Par ailleurs, l'évolution rapide des gènes mitochondriaux rend leur utilisation pertinente dans l'étude d'événements évolutifs récents comme les périodes de changements climatiques du Quaternaire.

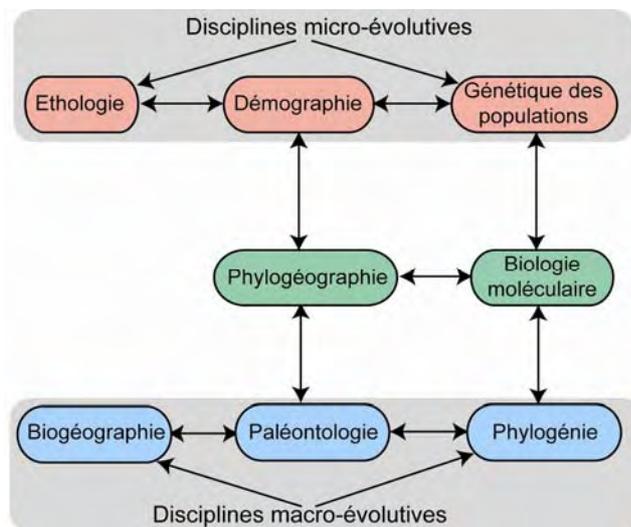


Figure 0.8: La phylogéographie est à l'interface entre les disciplines micro- et macro-évolutives. Elle traite de l'histoire, des composantes phylogénétiques et des distributions spatiales des lignées généalogiques. D'après Avice, 2000.

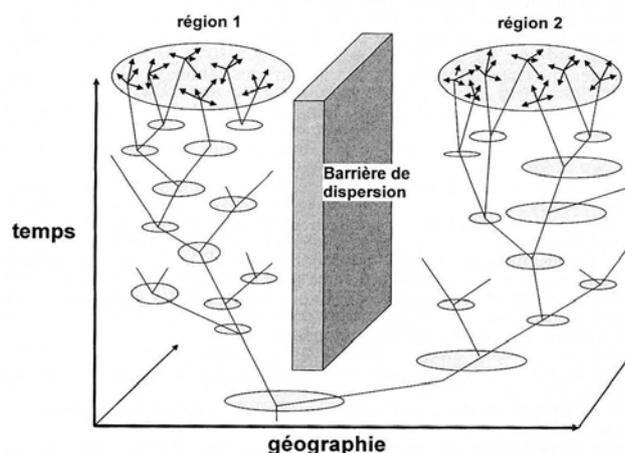


Figure 0.9 : Généalogie hypothétique d'un gène d'une espèce au sein de deux populations séparées physiquement. Les régions 1 et 2 représentent un lieu géographique de lignées particulières. Les vecteurs expriment la magnitude spatiale de la dispersion actuelle des individus issus des régions 1 et 2. La barrière de dispersion représente la limite supposée entre les deux populations expliquant une de leurs différences au cours du temps. D'après Avice, 2000.

Introduction

Chez les vertébrés, le fait d'avoir 1) une petite taille et 2) des temps de génération courts, permettent de répondre rapidement à des changements climatiques de grande ampleur et relativement rapides dans le temps, comme les glaciations du Quaternaire (Bhagwat et Willis, 2008). De plus, les vertébrés aux habitats généralistes doivent mieux survivre dans des zones refuges nordiques pendant ces périodes (Bhagwat et Willis, 2008). Par définition, les espèces à habitats généralistes présentent une plus grande tolérance aux changements environnementaux de grande ampleur que les espèces à habitats spécialistes (dans Bhagwat et Willis, 2008). Par conséquent, les campagnols, qui sont majoritairement généralistes, constituent de bons modèles pour étudier l'évolution des populations au cours des cycles climatiques quaternaires, notamment l'espèce *Microtus arvalis*. Cette espèce est présente actuellement dans toute l'Europe et ce depuis plus de 475 000 ans (Kolfschoten et Turner, 1996; Kowalski, 2001; Tougaard *et al.*, 2008b).

Plusieurs études phylogéographiques ont été menées chez les campagnols afin de comprendre leur dynamique de migration pendant les phases glaciaires et interglaciaires. Chez le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*), il a été démontré que son histoire phylogéographique était assez complexe marqué par des zones reliques pendant les glaciations (Deffontaine *et al.*, 2005; Kotlik *et al.*, 2006). D'après le registre fossile et les reconstructions phylogénétiques, cette espèce a survécu pendant le dernier maximum glaciaire par des populations relictuelles dans des habitats sud et nord (Monts Oural, Carpates). Après les glaciations du Pléistocène, la colonisation de l'Europe par cette espèce s'est faite à partir de ces zones reliques. Brunhoff et ses collaborateurs (Brunhoff *et al.*, 2003; Brunhoff *et al.*, 2006) ont montré chez le campagnol nordique (*Microtus oeconomus*) que les lignées actuelles résultaient des événements climatiques du Quaternaire. Pendant le dernier maximum glaciaire notamment, les populations ont migré vers des zones refuges situées au nord et ont été séparées géographiquement par des montagnes. Chez une espèce de campagnol très locale, située dans les Balkans (*Dinaromys bogdanovi*), une étude propose un schéma de migration à partir de trois centres de différenciation pendant les phases glaciaires (Krystufek *et al.*, 2007). La géographie complexe des Balkans confère chez cette espèce un isolement des populations pendant les phases interglaciaires à petite échelle et, ensuite, un contact secondaire pendant les phases glaciaires. En Amérique du Nord, les populations de campagnol à longue queue (*Microtus longicaudus*) ont connu de longues périodes

d'isolement pendant les phases glaciaires puis des expansions vers le nord en suivant le recul des calottes glaciaires (Conroy et Cook, 2000).

Chez le campagnol des champs (*Microtus arvalis*) une étude récente a été menée par Tougard et ses collaborateurs. (2008b ; Annexe 2). Dans cette étude des données génétiques, fossiles et des traits d'histoire de vie ont été utilisés pour reconstituer l'histoire phylogéographique de cette espèce pendant les périodes glaciaires et interglaciaires. L'espèce *M. arvalis* n'a pas connu de zones refuges pendant les phases glaciaires mais plutôt des micro-zones de survie comme chez *Myodes glareolus* (Deffontaine *et al.*, 2005; Kotlik *et al.*, 2006). Non seulement l'histoire de la dynamique des migrations de *M. arvalis* antérieure au dernier maximum glaciaire a été mise en évidence, mais en plus, il en résulte que l'expansion chez cette espèce est relativement complexe. Dans l'ouest de l'Europe (de l'Allemagne à l'Espagne), la dispersion de cette espèce était relativement graduelle grâce à des zones de survie dans des habitats favorables pendant les périodes glaciaires. Dans le reste de l'Europe, l'expansion des populations était moins régulière, limitées par les conditions périglaciaires et les sols de permafrost. Ces phases d'arrêts de l'expansion des populations sont marquées par une diminution de la diversité génétique au cours du temps (bottleneck). Pendant les phases pré- et post-glaciaires, les populations se sont de nouveau dispersées. Par conséquent, ces études démontrent que les petits mammifères des régions tempérées peuvent avoir des histoires évolutives variées au sein de leur aire de répartition (Annexe 2, Tougard *et al.*, 2008b).

1.4.2 Paléogénétique et paléoclimats

La paléogénétique (étude de l'ADN ancien ou dégradé) naquit il y a 25 ans par l'amplification réussie de moléculee d'ADN d'un animal disparu depuis 140 ans (couagga, Higuchi *et al.*, 1984) et d'une momie égyptienne vieille de 4 000 (4 ka) (Pääbo, 1985). L'avancée des techniques d'amplification (PCR) et de clonage à cette époque a permis des révolutionner le monde de la génétique. Grâce à ces nouvelles techniques et à la découverte de séquences d'ADN anciennes, il était devenu possible de remonter dans le temps avec l'étude génétique. La paléogénétique a été très utilisée pour reconstituer l'histoire évolutive de nombreux grands mammifères, et notamment celle des humains. La paléogénétique tente de résoudre plusieurs grandes énigmes comme la parenté entre l'homme de Néanderthal et l'homme moderne (ex. Krings *et al.*, 1997; Höss, 2000; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Dalton, 2006; Caramelli *et al.*, 2008; Pennisi, 2009), les causes de l'extinction des mammoths laineux (Gilbert *et al.*, 2008; Miller *et*

Introduction

al., 2008) ou bien encore les conséquences des glaciations sur l'évolution génétique des populations : ours des cavernes, (Leonard *et al.*, 2000; Orlando *et al.*, 2002) ; renard polaire, (Dalén *et al.*, 2007) ; campagnol des montagnes et gaufre à poches, (Hadly *et al.*, 2004) etc. Par exemple, l'ours des cavernes (*Ursus spalaeus*) a été très étudié car de nombreux restes fossiles ont été retrouvés dans les grottes pendant la période du Pléistocène (Hänni *et al.*, 1994; Leonard *et al.*, 2000 ; Loreille *et al.*, 2001; Orlando *et al.*, 2002). Il a notamment été démontré chez cette espèce que la diversité génétique des populations était anti-corrélée à l'augmentation de l'intensité des glaciations qui a eu lieu pendant 90 ka (Orlando *et al.*, 2002). Plus le climat était froid, et plus la diversité génétique décroissait et vice-versa.

Nous avons vu grâce à la phylogéographie que la dynamique de répartition des populations de campagnol pouvait être fortement influencée par les glaciations du Quaternaire. Par conséquent, nous pourrions démontrer l'impact des changements climatiques sur l'évolution génétique des populations de campagnol, pendant une période donnée et en un lieu donné, grâce à l'étude de la paléogénétique. Assez peu d'études sur les rongeurs ont été faites dans ce sens (Hadly *et al.*, 2004; Ramakrishnan *et al.*, 2005; Ramakrishnan et Hadly, 2009). Hadly *et al.* (2004) ont montré, sur deux espèces de rongeurs américains (le gaufre à poche : *Thomomys talpoides* et le campagnol des montagnes : *Microtus montanus*), des différences de réponse génétique de ces deux petits mammifères au cours du temps, influencées par les changements climatiques. Alors que ces deux espèces ont des populations qui déclinent pendant la période du réchauffement médiéval (470 à 1438 ans BP⁵), *T. talpoides* a une diversité génétique qui diminue pendant que *M. montanus* connaît une augmentation de sa diversité génétique. Il a été démontré dans cette étude que malgré une réponse génétique similaire entre ces deux espèces, la réponse en termes d'effectif des populations est différente. De ce fait, la réponse génétique aux changements environnementaux peut être vue comme "individualiste", c'est-à-dire, des ajustements uniques en fonction des espèces (Bennett, 2004; Lister, 2004).

Pour caractériser précisément quelles sont les relations qui existent entre l'évolution des arvicolinés actuels et fossiles et les changements climatiques, nous allons travailler à plusieurs échelles d'organisation biologique et plusieurs échelles temporelles.

⁵ BP = Before Present. Le présent étant l'année 1950.

1.5 Organisation de la thèse

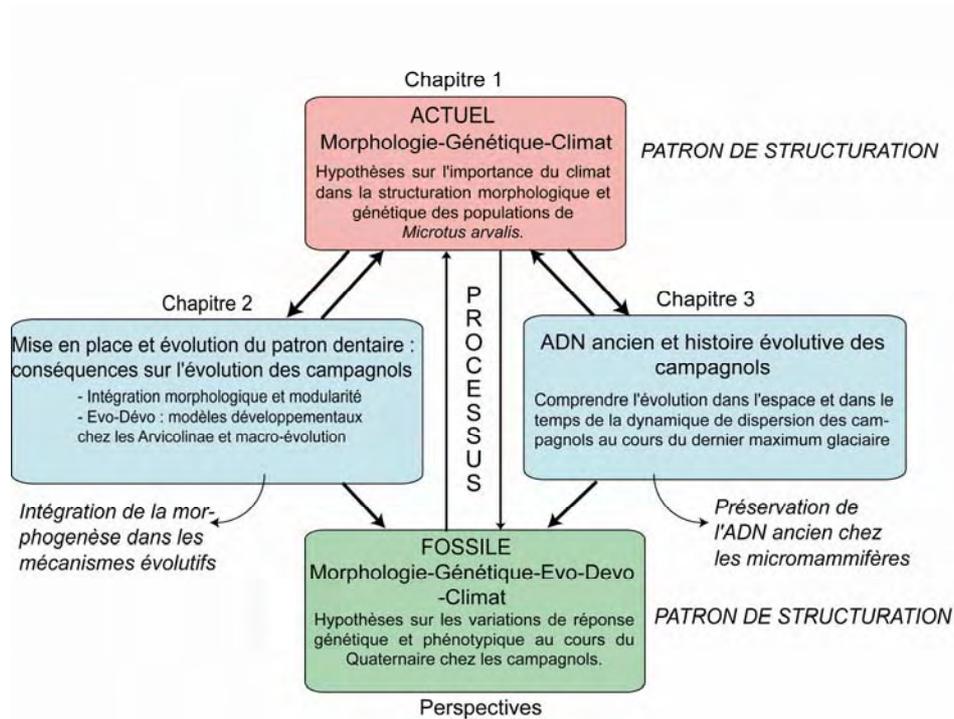


Figure 0.10 : Organisation structurelle des différents chapitres de la thèse. Les flèches pleines représentent les interactions entre les différents chapitres de la thèse. Les flèches courbes correspondent aux orientations possibles à partir des chapitres 2 et 3. Le patron de structuration des campagnols actuels peut être en partie lié à la structuration du climat. Le chapitre 1 s'intéresse aux relations entre structuration morphologique, génétique et climatique chez *Microtus arvalis* à l'échelle de la France. Le chapitre 2 traite des processus macro-évolutifs dans l'évolution du patron dentaire chez les campagnols. Il renseigne sur l'importance du développement dans la variation phénotypique dentaire à travers l'étude de la modularité et de l'évo-dévo. Le chapitre 3 exprime la dynamique micro-évolutive dans l'espace et dans le temps des campagnols à travers l'étude de l'ADN ancien. La perspective de ce chapitre pourrait conduire à discuter de la préservation de l'ADN ancien chez les rongeurs. Une des perspectives de ce chapitre serait d'intégrer les processus morphogénétiques dans les reconstructions phylogénétiques pour la compréhension de la radiation des campagnols.

1.5.3 Chapitre 1 : Impact du climat actuel dans les variations morphologiques et génétiques des populations de campagnols

Nous proposons, dans le Chapitre I, de comprendre quelles peuvent être les relations entre les variations du phénotype dentaire, les reconstructions phylogéographiques et le climat chez l'espèce *Microtus arvalis* actuelle. Pour mettre en évidence les relations entre morphologie, génétique et climat dans l'actuel, nous travaillerons à l'échelle de la France. Ce pays présente l'avantage d'avoir un climat contrasté rassemblant une partie non négligeable de conditions climatiques connues pour cette espèce. L'espèce *M. arvalis* est répartie en Europe de l'extrémité Ouest de la France jusqu'aux monts Ourals. Elle est présente depuis de très basses altitudes jusqu'à 3000 m (Le Louarn et Quéré, 2003). De plus, on la trouve en quasi continuité dans le registre fossile européen depuis son apparition il y a environ 475 ka (Kolfschoten et Turner,

1996; Kowalski, 2001). Par conséquent, avec ce modèle il est possible de tester plusieurs hypothèses : les variations du phénotype actuelles sont-elles corrélées à la structuration climatique de la France ? Quelle influence peut avoir l'effet d'altitude sur ces populations ? Existe-t-il une relation forte entre la structuration génétique des populations et le climat ? Est-ce que l'échelle de la France est une échelle suffisamment grande pour mettre en évidence des relations entre distances génétique et géographique des populations, changements du phénotype et climat ? Peut-on expliquer, à partir des résultats actuels, les relations qui existent dans le fossile ?

1.5.4 Chapitre II : Evolution du patron dentaire au cours du temps chez les campagnols : Modularité et Développement

Nous allons dans un premier temps tenter de comprendre l'organisation modulaire au sein de la rangée dentaire chez *Microtus arvalis*. L'étude de la rangée dentaire pourra nous en apprendre davantage sur les interactions phénotypiques entre les trois molaires. Si nous obtenons trois modules indépendants, alors chaque dent doit se développer indépendamment l'une de l'autre. Dans ce cas, les résultats confirmeraient le développement métamérique des dents et nous serions préférentiellement dans un modèle de « clone » dentaire (Osborn, 1978). Si, au contraire, la rangée dentaire forme un seul et même module, dans ce cas, il faudra plutôt évoquer le modèle développemental des champs morphogénétiques (Butler, 1939). Nous pouvons supposer que dans le modèle de Butler, l'évolution des mécanismes du développement seront moins probables que dans le modèle d'Osborn.

Ensuite, nous comparerons les résultats modulaires avec les derniers modèles de développement dentaire connus à ce jour et nous tenterons de mettre en évidence les mécanismes du développement qui expliqueraient les patrons de covariation phénotypique. Est-ce que les derniers modèles de développement sont cohérents avec le patron dentaire des campagnols ? Peut-on proposer d'autres modèles ? Cela change-t-il les résultats modulaires évoqués précédemment ?

Enfin, nous essaierons de mettre en évidence l'évolution du développement dentaire chez les campagnols afin de caractériser le patron d'évolution du développement. Grâce à la compréhension des mécanismes du développement chez le campagnol, nous serons en mesure d'expliquer les relations entre la modularité au sein de la rangée dentaire et le développement. De plus, nous essaierons d'étudier l'évolution des mécanismes du développement pour caractériser le patron évolutif des molaires chez les campagnols et le comparer aux hypothèses gradualistes émises précédemment sur le

Introduction

phénotype dentaire. Pour caractériser l'évolution des mécanismes du développement nous utiliserons un modèle de développement particulier élaboré par Kavanagh et ses collaborateurs (Kavanagh *et al.*, 2007). Ce modèle permet d'avoir accès aux mécanismes du développement dentaire à partir des proportions des aires de molaires. Or les données d'aires sont accessibles dans le fossile, par conséquent, ce modèle est adapté à une étude paléontologique d'évolution des campagnols. Est-ce que ce patron d'évolution est cohérent avec les hypothèses gradualistes antérieures ? Peut-on évoquer un facteur environnemental dans la mise en place des patrons de développement des campagnols ?

*1.5.5 Chapitre III : Evolution génétique chez l'espèce *Microtus arvalis* : paléogénétique et taphonomie*

Dans le Chapitre III, nous nous intéresserons à l'évolution génétique des populations de campagnol des champs, en France, avant, pendant et après le dernier maximum glaciaire (depuis - 40 000 ans jusqu'à - 10 000 ans). Cependant, cette étude est assez ambitieuse car le plus vieil ADN de rongeur connu à l'heure actuelle est daté d'environ - 12 000 ans (Kuch *et al.*, 2002). En effet, l'ADN ancien est un matériel fragmenté et dégradé dès les premiers stades de fossilisation (Hofreiter *et al.*, 2001). Par conséquent, la première question qu'il faut se poser avant de commencer ce type d'étude sur le long terme chez les campagnols, est la potentialité de retrouver de l'ADN ancien chez les petits mammifères en sites de grottes. Les grottes représentent un site préférentiel pour l'accumulation de restes de rongeurs (Andrews, 1990) et pour la préservation de l'ADN (Smith *et al.*, 2001). Ainsi, nous aborderons la question de la préservation de l'ADN en sites de grottes chez les petits mammifères à partir de l'étude des différentes étapes potentielles de la dégradation de l'ADN dans les mandibules. Nous comparerons les quantités d'ADN présents depuis les mandibules de campagnols actuels, jusqu'aux mandibules fossiles de - 40 000 ans en passant par les pelotes de réjection dont les mandibules ont été digérées et se retrouvent accumulées dans les sites de grottes.

A partir de ces différentes études aux échelles micro- et macro-évolutives, nous serons en mesure de proposer un scénario évolutif chez les campagnols en relation avec le climat. Nous pourrions aborder les questions des différences de réponses génétiques et phénotypiques au climat au cours du temps à travers les contraintes du développement et l'évolution des populations.

Chapitre I
Impact du climat sur les variations
morphologiques et génétiques des
populations

Chapitre I : Impact du climat sur les variations morphologiques et génétiques des populations.

I. Impact du climat sur les variations morphologiques et génétiques chez les mammifères

Il est démontré désormais que les changements climatiques ont, et ont eu, un impact sur la biodiversité des plantes et des animaux (Walther *et al.*, 2002; Parmesan et Yohe, 2003; Root *et al.*, 2003; Qian et Ricklefs, 2008) à différents niveaux d'intégration biologique – écosystème, communauté, population et organismes (Walther *et al.*, 2002). Depuis les derniers 100 ans, la température moyenne à l'échelle du globe terrestre a augmenté d'environ 0,6°C (Root *et al.*, 2003). Pendant 30 ans, à la fin du 20^{ème} siècle, l'adoucissement des températures a affecté la phénologie⁶ des organismes, l'étendue et la distribution des espèces, ainsi que la composition, la dynamique des communautés et des populations (Peñuelas et Filella, 2001; Walther *et al.*, 2002; Root *et al.*, 2003). Dans leur étude très complète sur les interconnexions entre climat, propriétés individuelles, dynamique des populations et structure des communautés, Porter *et al.* (2000) rapportent plusieurs points importants de ces relations (Figure I.1). Premièrement, les variations temporelles et spatiales des environnements physiques imposent d'importantes contraintes sur les fonctions types des animaux (métabolisme, poids corporel etc.) qui coexistent dans des communautés biologiques. Deuxièmement, la morphologie, la physiologie et l'activité dépendante de la température des animaux relie les dépenses énergétiques des individus aux dynamiques des populations. La structure de la communauté est reliée à la dynamique des populations via le temps de l'activité annuelle totale, la masse/énergie disponible pour la croissance et la reproduction. Troisièmement, la posture corporelle (debout, allongé, proche du sol ou non) joue un rôle important dans la perte de chaleur du métabolisme (Porter *et al.*, 2000). Enfin, le calcul du modèle climat/taille corporelle/intestin pour différents types d'aliments, a permis à Porter *et al.* (2000) de montrer que la taille corporelle optimale des mammifères était dépendante du type de nourriture, de leur efficacité digestive associée et de la température extérieure. Les animaux homéothermes, comme les mammifères, peuvent réguler leur température interne. Cependant, à différentes échelles d'organisation biologique, du génotype au phénotype et de l'individu à la communauté, le climat peut jouer un rôle important entraînant des interactions fortes entre elles.

⁶ Phénologie : temps des activités saisonnières des animaux et des plantes (Walther *et al.*, 2002)

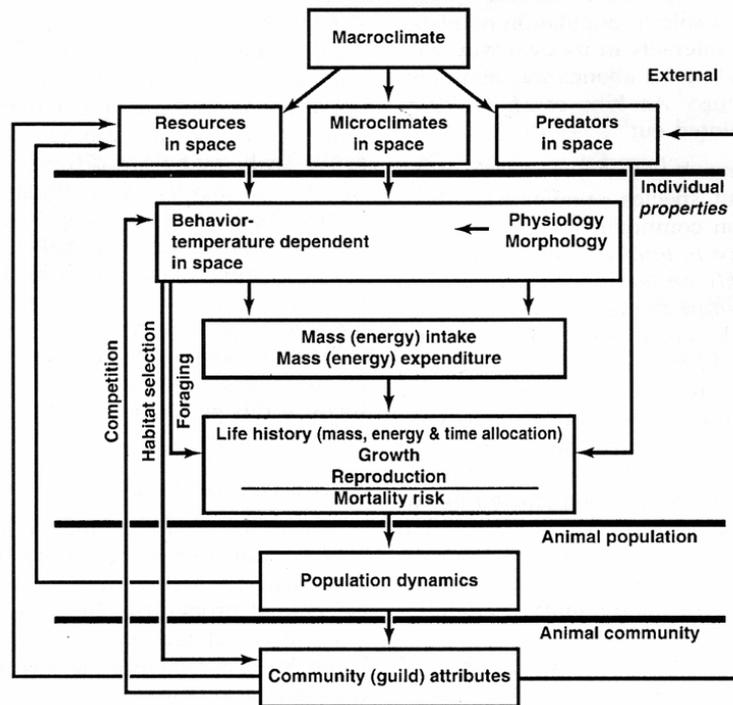


Figure I.1 : Diagramme de flux illustrant les interconnexions entre climat, propriétés individuelles, dynamiques des populations et structure des communautés. D’après Porter *et al.*, 2000

Les lois écogéographiques d’Allen (1877) et de Bergmann (1847) proposent que les distributions géographiques à large échelle soient reliées aux variations morphologiques (Nudds et Oswald, 2007). La loi d’Allen stipule que la longueur des appendices par rapport à la taille corporelle diminue dans les régions froides chez les espèces endothermiques (Allen, 1877). Cette loi a été démontrée chez de nombreux mammifères et oiseaux et précisément chez la souris (Serrat *et al.*, 2008). La croissance de l’extrémité des os du fémur chez les souris est directement dépendante de la température périphérique externe. La loi de Bergmann (Bergmann, 1847) précise que le poids corporel, chez les espèces endothermiques, augmente avec la latitude et la diminution de la température. Cependant, seules 65% des espèces de mammifères suivent cette loi. De plus, les mammifères de petite taille (de 4 à 500 g) montrent une tendance significativement plus faible à répondre à cette règle (Meiri et Dayan, 2003). Ces lois ont généralement été démontrées dans l’actuel. Les études fossiles ont permis d’apporter certaines précisions quand à leur application et à l’évolution des espèces au cours des changements climatiques.

Par exemple, les mêmes changements environnementaux peuvent conduire à des patrons d’évolution morphologiques différents, pour un même poids corporelle, selon que le taxon est spécialiste ou généraliste (Bhagwat et Willis, 2008). Chez les mammifères, la taille des molaires est souvent un bon indicateur du poids corporel (Creighton, 1980;

Gingerich *et al.*, 1982; Legendre, 1989). Par exemple, l'évolution de la taille des molaires chez *Stephanomys*, rongeur spécialiste, est très influencée par le climat à travers les changements de végétation, et donc, de régime alimentaire (Renaud *et al.*, 2005). A l'inverse, *Apodemus*, rongeur généraliste, ne connaît pas de modification notable au niveau de l'évolution de la taille des molaires avec les changements climatiques (Renaud *et al.*, 2005). Chez les grands mammifères, d'autres parties du squelette peuvent être utilisées pour reconstituer le poids corporel. Par exemple, le métacarpe chez les chevaux (Guthrie, 2003). Ainsi, de même que chez les petits mammifères, il est possible de montrer des différences de réponse du poids corporel entre des groupes spécialistes et généralistes. Les chevaux, généralement spécialistes, des prairies d'Alaska ont vu la taille de leur métacarpe diminuer fortement, jusqu'à leur extinction, pendant la phase climatique de transition vers l'Holocène (végétation de milieux humides, Guthrie, 2003). Les mammoths, plus généralistes, avaient survécu plus longtemps à cette phase en enregistrant une augmentation progressive du nombre de lamelles sur leur molaire, plus "adaptée" à ce type de végétation (Lister et Sher, 2001), mais ils ont disparus ensuite. Ainsi, chez les grands et petits mammifères, la réponse du poids corporel aux changements climatiques est dépendante du type de régime alimentaire, généraliste ou spécialiste.

Pendant la mise en place des cycles glaciaires/interglaciaires, à la fin du Pliocène, les populations de mammifères se sont dispersées sur des étendues différentes, dans des directions divergentes et à des temps différents en fonction de leurs limites de tolérance écologique individuelle, de leur métabolisme, de leur temps de génération (Graham *et al.*, 1996; Walther *et al.*, 2002; Lister, 2004; Bhagwat et Willis, 2008), mais aussi en fonction des barrières naturelles à leur dispersion (calottes glaciaires, montagnes, mers, océans, ceinture de végétation et déserts, Lister, 2004). En outre, ces populations de mammifères (grands et petits) ont montré des réponses marquées aux changements climatiques au niveau phénotypique, par la taille corporelle (Smith *et al.*, 1995; Hadly *et al.*, 1998; Guthrie, 2003; Millien, 2004) et la morphologie dentaire (Barnosky et Bell, 2003; Montuire et Brunet-Lecomte, 2004; Navarro, 2004; Renaud *et al.*, 2005), mais également au niveau génétique (Hadly *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005; Bhagwat et Willis, 2008; Lister et Stuart, 2008).

La réponse génétique aux changements climatiques s'opère en fonction des migrations de populations, de la taille de la population effective, mais aussi en fonction de l'espèce considérée. Nous avons vu dans l'introduction que la phylogéographie est une

discipline, basée sur les reconstructions phylogénétiques à partir de séquences actuelles ou fossiles. Aidée des données fossiles (âges, présence/absence⁷), la phylogéographie permet de reconstituer les scénarios évolutifs des espèces au cours du temps et des changements climatiques passés (Bhagwat et Willis, 2008). Cependant, la seule façon d'avoir accès à la réponse génétique des populations *in situ*, pour un lieu et une époque donnée, est de travailler en paléogénétique. De plus, la phylochronologie⁸ des espèces apporte des indications supplémentaires sur la taille effective des populations anciennes, sur les mouvements de populations précis (immigrations, émigrations ou sans changement), ainsi que pour calibrer les horloges moléculaires afin de dater les événements passés (Hadly *et al.*, 2004).

Par exemple, deux espèces de rongeurs, le campagnol des montagnes (*Microtus montanus*) et la gaufre à poches (*Thomomys talpoides*), Hadly *et al.* (2004) ont été étudiés, en utilisant la phylochronologie⁹, pour caractériser la réponse génétique des populations vers l'optimum climatique médiéval (de 470 à 1438 ans BP). L'évolution génétique des populations de *M. montanus* et *T. talpoides* a été observée à partir des séquences de l'ADN mitochondrial (cytochrome *b*) de 312 et 342 pb respectivement. Ces auteurs ont montré que la diversité génétique de *M. montanus* a été maintenue malgré une décroissance de la taille de la population. A l'inverse, *T. talpoides* a répondu comme une population close (sans flux génétique) pendant cette période. La différence de réponse aux changements climatiques entre ces deux espèces est probablement due aux différences de patrons de dispersion démographique entre leurs populations. Par conséquent, les traits d'histoire de vie, comme la propension à la dispersion des espèces, contribue à la diversité génétique aux cours de changements climatiques dans l'espace et dans le temps (Bennett, 2004; Hadly *et al.*, 2004; Lister, 2004).

Il ressort de ces différents exemples que les réponses phénotypiques et génétiques au cours du temps, chez les mammifères, dépendent fortement de l'espèce considérée, de la taille corporelle, du temps de génération, des potentialités de dispersion entre grands et petits mammifères etc. (Bhagwat et Willis, 2008; Lister et Stuart, 2008). Ces réponses peuvent être vues comme "individualistes" (Hadly *et al.*, 2004), identiques à des ajustements uniques dans l'éventail des espèces (Root *et al.*, 2003).

⁷ La présence/absence des populations dans le registre fossile est une donnée à prendre avec précaution car les séquences stratigraphiques sont souvent incomplètes dans le domaine continental. De plus, l'absence des populations est une donnée difficile à quantifier car elle peut être due à de nombreux paramètres : non présence de l'espèce considérée, remaniement stratigraphique, mauvaise préservation des fossiles, non accumulation de l'espèce à un endroit donné, pas de données significatives, etc.

⁸ Phylochronologie : étude des populations dans l'espace et dans le temps en utilisant des méthodes phylogénétiques et de génétique des populations (Hadly *et al.*, 2004).

II. Le campagnol des champs et le climat actuel

Nous avons vu dans l'introduction que l'histoire phylogéographique de *M. arvalis* était probablement liée aux changements du climat quaternaire. Les populations ont "migré" à la faveur des phases pré-, post- et interglaciaires (Tougaard *et al.*, 2008b). Les populations de *M. arvalis* ne se déplacent que de plusieurs centaines de mètres à quelques kilomètres en plusieurs heures ou quelques jours (Schweizer *et al.*, 2007), ce qui leur permet, sur plusieurs générations, de parcourir de longues distances. Les conditions climatiques tempérées, ainsi que des habitats ouverts leur ont été favorables pendant leurs phases d'expansion à l'ouest et à l'est. En revanche, pendant les périodes froides à l'est, les populations disparaissent à cause de la proximité de la calotte glaciaire. La recolonisation de l'espace à l'est s'est fait à partir de stock situé près de l'Allemagne (séquences d'Allemagne de l'Est à la base des lignées Centrale et Est, Tougaard *et al.*, 2008b).

Cependant, le déplacement des populations ne fut pas la seule réponse aux changements climatiques que *M. arvalis* ait connus. Une étude paléontologique a été menée par Navarro (2004) sur une période temporelle relativement continue (de - 70 000 à - 14 450 ans BP) du site de la Baume de Gigny dans le Jura français (Campy *et al.*, 1989). Le but de cette étude était de mettre en évidence les variations du patron dentaire de *M. arvalis* au cours du temps et surtout au cours des changements climatiques enregistrés sur cette période d'après le phénotype dentaire (Navarro *et al.*, 2004). Plusieurs périodes de réchauffement et de refroidissement ont été enregistrées le long de cette coupe et notamment un épisode de refroidissement marqué au niveau VI (entre - 30 000 et - 25 000 ans). Par des méthodes d'analyse de contour sur la première molaire inférieure (m1) et de corrélations avec la reconstitution des variations du climat, cette étude a montré que la morphologie de la m1 devait être liée aux variations du couple température-humidité par la modification des triangles et de l'asymétrie de la boucle dans la partie antérieure. Par exemple, pendant les phases humides, la boucle antérieure était plus asymétrique, marquant le développement potentiel d'un nouveau triangle. Pendant les phases plus arides, il n'y avait pas d'asymétrie de cette boucle antérieure.

Grâce à cette étude, il a pu être démontré qu'il existait une relation entre morphologie dentaire et climat au cours de la fin du Quaternaire chez *M. arvalis*. Cette relation phénotype-climat a été interprétée comme une réponse de la plasticité du développement à des changements environnementaux, ou bien comme un stress

environnemental jouant sur la relation génotype-phénotype au cours du développement (Navarro, 2004). Par conséquent, non seulement les populations de *M. arvalis* ont répondu aux changements climatiques du Quaternaire par des phases successives de migrations à partir de microhabitats favorables à leur survie, mais aussi, probablement, par une plasticité du phénotype, notamment au niveau dentaire.

Pour tenter d'estimer le degré de corrélation qui existe chez *M. arvalis* entre la morphologie dentaire et le climat, nous proposons d'étudier cette espèce dans l'actuel, ce qui permet d'avoir accès aux différents paramètres climatiques (température, précipitation etc.) précisément et en "temps réel". Nous cherchons à savoir s'il existe une véritable structuration phénotypique de la dent de *M. arvalis* par rapport à la structuration du climat actuel, puisque nous savons déjà que le climat a une forte influence sur la structuration génétique des populations (Tougard *et al.*, 2008b). Si tel est le cas, alors nous pourrions envisager de valider les hypothèses de relation phénotype-climat émises chez *M. arvalis* dans le fossile.

De plus, en travaillant dans l'actuel, il est possible de mettre en évidence les corrélations entre la structuration morphologique et génétique des populations de *M. arvalis* en fonction du climat (Figure I. 2). Dans notre étude nous n'abordons pas directement la réponse génétique des populations à la structuration du climat, il faudrait étudier la génétique des populations, mais plutôt la relation entre la structuration géographique, la structuration climatique des populations et leur structure phylogéographique. Les corrélations entre structuration morphologique et génétique seront testées mais il ne faut pas s'attendre à des relations fortes entre les deux étant donné que les indices génétiques sur lesquels nous travaillons (D-loop et cytochrome *b*) ne sont pas impliqués dans la mise en place de la morphologie dentaire.

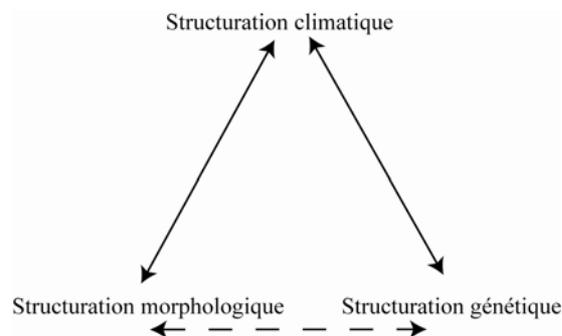


Figure I. 2 : Schéma récapitulatif des corrélations possibles entre morphologie, génétique et climat. Les flèches pleines représentent les corrélations vraies auxquelles il est possible de s'attendre. La flèche pointillée représente de possibles corrélations mais qui ne sont pas attendues étant donné l'absence de relation directe entre ces paramètres.

II.1 PUBLICATION 1

- PUBLICATION 1 -

Environmental components on morphological and genetic structuring in the common vole (*Microtus arvalis*).

Elodie RENVOISE, Sophie MONTUIRE, Yves RICHARD, Jean-Pierre QUERE,
Sylvain GERBER, Thomas CUCCHI, Carmela CHATEAU and Christelle
TOUGARD

En préparation pour Journal of Biogeography

Morphological and genetic structuring in the common vole (*Microtus arvalis*) in relation to climatic and geographical ordination.

Elodie RENVOISE¹, Sophie MONTUIRE^{1,2}, Yves RICHARD³, Jean-Pierre QUERE⁴, Sylvain GERBER⁵, Thomas CUCCHI^{6,7}, Carmela CHATEAU¹ and Christelle TOUGARD⁸

¹UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France.

²Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Paléobiodiversité et Préhistoire, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France.

³UMR CNRS 5210 Centre de Recherches en Climatologie, Université de Bourgogne, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France.

⁴UMR 1062, INRA, Centre Biologie et Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, 34988 Montferrier/Lez, France

⁵ Department of the Geophysical Sciences, The University of Chicago, 5734 South Ellis Avenue, Chicago, IL 60637 USA

⁶ UMR CNRS 5197, Archéozoologie, histoire des sociétés humaines et des peuplements animaux, Muséum National d'Histoire Naturelle, 55 rue Buffon, 75005 Paris

⁷ Department of Archaeology, University of Durham, South Road, Durham, DH1 3LE, Great Britany

⁸UMR CNRS/um2 5554, Institut des Sciences de l'Evolution (ISE-M), Université Montpellier II, CC065, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France.

Abstract

Aim In the context of environmental change, we try to determine the existence of morphological, genetic and climate structuring at the French scale from populations of a small mammal (*Microtus arvalis*: Arvicolinae, Rodentia). Climatic conditions in France correspond well to the climatic range of this rodent in its holarctic distribution area. We test the impact of climate on morphological variation and genetic structuring observed in this species. In addition, we examine the possible correlation of genetic distance between populations and geographical distance.

Location The *M. arvalis* populations are widespread throughout France (except Britain and the Rhone valley). Morphological and climatic data for sixteen populations were obtained from low to high altitudes (5m up to >2300m). Seventeen populations were chosen to represent the genetic data.

Methods Morphological structuring was analyzed from morphometric data on the first lower molar. Size and shape were analyzed separately on the first lower molar. Then a canonical variate analysis was performed between each population to characterize the population structure. Genetic structuring is determined: 1) by phylogenetic reconstructions from the control region and the cytochrome *b* gene and 2) by genetic distances among populations summarized by principal component analysis. Climatic indices are determined from temperature and precipitation describing the French climate. Influences of climate and geography on phenotype and genotype are determined by comparing: 1) observation-by-variable matrices using PROTEST analyses in order to allow more variance in the correlation results and 2) pairwise axis multiple regressions to improve precision in the correlation results.

Results Morphological, genetic and climate changes are structured at the country scale. The morphological ordination (tooth shape) of French *M. arvalis* populations is significantly associated with climate structuring, which itself is correlated with geography. Tooth size is related neither to climate nor geography. Genetic distance structuring is, to a lesser extent, associated with morphology, climate and geography.

Main conclusions Size explains from 35 to 40% of tooth form variation in French *M. arvalis*. The tooth size difference between populations is not explained by climatic parameters. Therefore, size probably depends on the mode of tooth development in the species. We demonstrate that tooth shape depends on climate rather than on genetics. At the intra-specific level, climatic parameters could play an important role in tooth shape variation. However it is difficult to demonstrate the ecological and developmental

mechanisms involved in such relationships. Finally, the genetic distance between populations is corroborated with the geographical distance. This reinforces the phylogeographical interpretations made for this species in France but also in Europe.

INTRODUCTION

Evolutionary biologists try to understand the consequences of biotic (*e.g.*, metabolism, physiology, diet, biological environment) and abiotic (*e.g.* climate, physical environment) factors on the evolution of populations and their interactions (*e.g.* Porter *et al.* 2000 for an integrated study; Weir et Schluter, 2007).

Climate has considerable impact on the community structure through the latitudinal and altitudinal gradients (Shepherd, 1998, Shepherd et Kelt, 1999). In fact, a species richness peak is observed on micro- and macro-land-mammals in mid-elevation habitat and in tropical latitudes. In addition, it has been demonstrated that morphological diversity (size and shape), in the community, is related to altitude. Tropical sites are less size diverse and more shape diverse than polar sites, where morphological diversity is more size diverse and less shape diverse (Shepherd, 1998). Biologists, ecologists and paleontologists try to point out (separately, in general) the phenotypic and genetic responses of populations to climate change, in order to highlight the mechanisms (migration, phenotypic plasticity, genetic differentiation, and so on) involved in the evolution of biological traits (for a review of evolution in changing environments see Gienapp *et al.*, 2007). Skull morphology may respond indirectly to climate change through diet (*e.g.* monkeys, *Platyrrhini*, Couette *et al.*, 2005; marmots, *Marmota*, Caumul et Polly, 2005) or landscape fragmentation, which reduces genetic diversity and morphological variability (*e.g.* fluctuating asymmetry analysis for the bank vole, *Myodes glareolus*, Marchand *et al.*, 2003). In contrast, tooth shape seems to be related to latitudinal gradient (*e.g.* fieldmouse, *Apodemus sylvaticus*, Renaud et Michaux, 2007) and also to body size (*Marmota*, Caumul et Polly, 2005) and phylogenetic history (*e.g.* *Apodemus sylvaticus*, Renaud et Michaux, 2007; *Marmota*, Caumul et Polly, 2005; European ground vole, *Terricola*, Tougard *et al.*, 2008a). Consequently, tooth shape may respond to climate change but may also result from population history, which could be often indirectly influenced by climate change. Genetically, distances between populations are correlated with geography (variations in altitude, latitude and longitude, but also sea and mountain barriers) and climate variations. For instance, genetic distance between two populations of Asian birds (azure-wing magpie, *Cyanopis cyanus*) is explained by their isolation: they are separated by the Da Hingan Ling Mountains and the

Yellow Sea (Fok *et al.*, 2002). In addition, Pilot *et al.* (2006) have demonstrated that genetic structuring in grey wolves (*Canis lupus*) is not due to a topographical barrier or their past fragmentation but rather correlated with climate, habitat type and diet. Moreover, Tougaard *et al.*, (2008b) have suggested that migration events and the phylogeographical history of the common vole (*Microtus arvalis*) were closely linked to the climatic changes of the Pleistocene glacial/interglacial cycles. Accordingly, morphological and genetic differentiation is related to climate structuring.

However, most of the correlation studies related to the influence of environmental change on wild animal phenotype and genotype are based on specific climatic parameters (*e.g.* mean annual temperature, mean temperature in July, solar radiation or rainfall; Smith, 1995; Fortelius *et al.*, 2006), on geographical (altitude, latitude, longitude; *e.g.* Shepherd, 1998; Shepherd et Kelt, 1999; Belen *et al.*, 2004) or ecological parameters (diet, vegetation, competition, predation; Eccard et Ylönen, 2007; Musiani *et al.*, 2007). Unfortunately, all these parameters are still rarely considered together (except for Caumul et Polly, 2005 and Pilot *et al.*, 2006). Furthermore, phenotypic traits in populations from specific locations are often correlated with climatic parameters from a much broader area (*e.g.* Renaud, 1999; Millien, 2004; Caumul et Polly, 2005). This difference in scale between population sampling and climatic data decreases the reliability of the correlation results. In order to assess the impact of population distribution on morphological variability, it would be necessary to compare genetic distance between populations with phenotypic trait variations.

The aim of our study is to characterize the abiotic factors (climate and geography) which may induce tooth phenotype and genetic variations in populations at the French scale. In the present work, we focus on a Recent small rodent mammal, the common vole (*Microtus arvalis*, Arvicolinae, Rodentia). This rodent is particularly suitable for such studies as it is characterized by great phenotypic variability in its first lower molar (m1) (*e.g.* Chaline, 1972; Niethammer et Krapp, 1982). Moreover, *M. arvalis* presents ecological advantages for such studies as it is widespread all over the French area, except in the extreme west and the Rhone valley, and it ranges in altitude from sea level to 3000 m in the Alps (Mitchell-Jones *et al.*, 1999; Le Louarn et Quéré, 2003). In French fossil specimens of *M. arvalis* (\approx 30 000 years), climatic parameters like temperature and humidity is demonstrated to be correlated with tooth variation of the anterior loop. The asymmetry of the anterior loop is correlated with an increasing humidity, whereas a symmetric anterior loop is more correlated with a decreasing humidity (Navarro, 2004). Temperature has an antagonist role on the tooth to the humidity parameter.

Consequently, France provides a valid model, highlighting the relationships between climate, morphology, genetics and geography for *M. arvalis*. Does climate play an important role in the morphological structuring of populations? Are there similarities between morphological, genetic structuring and climate? Does the genetic distance between populations reflect their geographical distribution? Does the history of populations structure phenotypic variation? In this study, peculiar care was taken to obtain precise morphological and genetic data for a given population. Site specific climatic data were obtained for each population. Correlations between morphological, genetic and climatic data are useless if each individual dataset is not well structured to begin with. The first analyses define whether all these datasets are structured at the French scale. Then, we quantify the correlation of morphological and genetic structuring with climatic and geographical variation.

MATERIALS AND METHODS

Morphometric approach

Morphometric data were obtained for the right m1 of 413 *Microtus arvalis* skulls. Sixteen French populations were used as proxies for morphometric analyses. These populations are widespread all over the country (Fig. 1, Table 1) and represent most of the altitudes known for this species (from 5m up to >2300m, Table 1).

Morphometric analyses are based on m1 dental morphology. In *Microtus arvalis*, this molar is composed of seven alternating triangles (T1 to T7; Fig. 2A). Morphological variability in m1 is traditionally studied using 22 linear-distance measurements, taken on the occlusal surface (Fig. 2A, B and C; Brunet-Lecomte, 1988; Laplana *et al.*, 2000). The first six variables describe the global morphology of the tooth. The remainder focuses on the anterior part, which shows the greatest variability. In the present work, morphometric data are considered for two aspects of tooth form i.e. size and shape. The m1 size is calculated as the square root of the sum of all the squared variables. According to Navarro *et al.* (2004), this parameter is a good proxy to represent the m1 area:

$$Size = \sqrt{\sum_{i=1}^{22} V_i^2} \text{ with } V = \text{measured morphometric variable}$$

In order to remove the size component over shape variables, we performed a log shape ratio correction (Eldredge, 1972; Navarro *et al.*, 2004) on all the measured variables:

$$LogShape = \log \frac{V_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{22} V_i^2}} .$$

Morphological structuring for the 16 populations from size and shape variables was analyzed using a Canonical Variate Analysis (CVA; Fisher, 1936) with Statistica software (Statsoft, 2008), minimizing intra-group distances and increasing inter-group distances. Morphological structuring of *M. arvalis* populations was identified by calculating Mahalanobis distances between each population centroid, and associated probabilities.

The sex effect was not tested on this species as there is no sexual dimorphism on tooth morphology (Balčiauskiene, 2004).

Climatic indices

For each of the 16 populations used in morphometric analyses, nearby weather stations were selected. Available climatic parameters were temperature (T) and precipitation (P) for the 1971-2000 period (Fig. 1, Table 1). Data were obtained from Météo-France.

Several variables were taken into account for each of the 12 months (Table 2): absolute daily maximum temperature over 30 years (TMabs), absolute daily minimum temperature over 30 years (Tmabs), mean maximum temperature (TM), mean minimum temperature (Tm) and absolute daily rainfall amount (Pabs). Two annual parameters were also selected: mean annual temperature (Ty) and mean annual rainfall amount (Py). Weather station altitudes were added to the climatic parameters. Latitudes and longitudes (geographical data) of these stations were used to characterize the geographical distribution of the *M. arvalis* populations.

The Köppen classification, based on monthly temperature and precipitation averages, led to a geographical partition of climate types corresponding to the major biomes (Köppen, 1923). Except for the Mediterranean and the mountain areas, France belongs to the “Maritime Oceanic Climate” (Cfb) with variable weather all year long. For such latitudes, summers are warm and winters are mild. An update on Köppen climate shifts in Europe between 1901 and 2003 shows that there have been some changes to the climate type in France (Gerstengarbe et Werner, 2008), i.e. extension of the Mediterranean climate further inland in Roussillon and Provence, or changes in assignments due to overruns or thermal thresholds on the coldest month (middle mountains) or on intermediate seasons (Aquitaine Basin). The aim of our study is not to discuss these previous results but to characterize the weather stations related to molecular and morphological data localities (Fig. 1).

We built several indices from/using monthly temperature and precipitation averages. The aim was to highlight variations in the Cfb “oceanic climate”. These variations are related to the magnitude of seasonal and diurnal contrasts, but also to the seasonal rhythms of temperature and rainfall. Four indices were defined to describe the temperature parameters (Table 2). In addition, three indices using precipitation (P) differences were used, taking into account the principal rainfall calendars (Table 2):

- The “winter rainfall” index P_{winter} , distinguishes high early winter and low late spring precipitations (maritime characteristic of the oceanic climate) from low early winter and high late spring precipitations (continental degradation of the oceanic climate).

- The “spring rainfall” index P_{spring} , distinguishes high late spring and low early spring precipitations (continental degradation of the oceanic climate) from low late and high early spring precipitations (maritime characteristic of the oceanic climate).

- The “autumn rainfall” index P_{autumn} , indicates the high autumnal and low summer precipitations, characteristic of a Mediterranean climate.

A principal component analysis (PCA), based on correlation matrix, was performed on the seven non-standardized climatic variables, on the seven climatic indices and on the weather station altitudes, in order to summarize the total climatic variance on the first axes. The score values of the first axes components are used for further correlation tests.

Phylogenetic reconstructions

The genetic dataset is composed of 40 individuals distributed in 17 French populations. There is one more population for the genetic data than for the morphological data. Two closely related genetic populations (Monthureux and Vittel) were analyzed for the Vittel site, but there is only one population for the morphological data (Table 1). Phylogeographical inferences were based on two mitochondrial genes in order to obtain unequivocal population phylogeny rather than gene phylogeny (Avice, 2000). For this reason, complete cytochrome *b* gene (cytb; 1143 bp) and partial control region (CR; 373 bp) sequences were retrieved from GenBank (accession numbers in Table 1). Moreover, *Microtus obscurus* (AM99310-12 for CR and AY220763-65 for cytb; Tougard *et al.*, 2008b; Haynes *et al.*, 2003) and *M. levis* (DQ015676 for both CR and cytb; Triant et DeWoody, 2007) were used as outgroups to root the different trees.

Cytb and CR sequences were aligned by eye using MEGA 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007). Best-fitting models of sequence evolution were determined using Modeltest 3.7 (Posada et Crandall, 1998) for maximum-likelihood (ML) reconstructions and

MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004) for Bayesian approaches (BA). For CR, the same evolutionary model, HKY+I+G, was obtained for ML and BA. For *cytb*, the ML model was TrN+I+G, while the BA models were K80+I, F81, GTR+G for the first, second and third codon positions respectively. For the concatenated sequences (CR + *cytb*), the models obtained were K81uf+I+G in ML and the same models as CR and *cytb* analyzed separately in BA. ML analyses were conducted using PhyML 2.4.4 software (Guindon et Gascuel, 2003), and nodal robustness was estimated after 1000 bootstrap pseudo-replicates leading to bootstrap percentage values (BP). Mixed models under BA using MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck et Ronquist, 2001) were obtained with five Monte Carlo Markov chains that were simultaneously run for 5,000,000 generations with trees sampled every 100th generation, and after removing the first 30,000 trees as the burn-in stage. Node robustness was defined by posterior probabilities values (PP).

Net and total divergences (Da and Dxy) were calculated using MEGA 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007).

Correlation of morphological, molecular, climatic and geographical data

Correlations between size and shape variables and independent climatic and geographical variables were calculated using multiple regression analyses. The population effect was analyzed by including the number of individuals for each population as a variable in the multiple regressions.

In order to identify statistically the relationships between morphological, molecular, climatic and geographical data, an inter-matrix comparison test, PROTEST, which associates Procrustes analysis and a randomization test was performed (Jackson, 1995; Peres-Neto et Jackson, 2001). This method determines the degree of covariation between two matrices by minimizing the sum-of-squared deviations between data values in two observation-by-variable matrices (Procrustes analyses). Then it tests whether this covariation is greater than expected by chance. PROTEST analyses were performed with R software (R Development Core Team, 2008). An index of correlation (corr) is calculated in a Procrustes rotation. The significance of the correlation index (pcorr) is calculated in each test to ensure the estimated significance using 9,999 random permutations + 1 observed variable (Jackson, 1995; Manly, 1997). Procrustes residuals between the superimposed matrices are represented by arrows joining the best fit of a given population from the first matrix with the target position of the population from the second matrix. The length residuals allow examination of the Procrustes fit for each

population and each dimension, and thus, the detection of those over-length residuals that decrease the correlation results.

Finally, in order to assess the comparison of molecular data with morphological, geographical and climatic data in PROTEST analyses, some modifications of the sequence matrix of concatenated genes were required. A genetic distance matrix is obtained from the 17 populations with MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) using a net between-group average calculation with a Kimura 2-parameter model and an α parameter equal to 0.5595 (the same α value of the Γ law as the ML model for concatenated genes). The distance between group robustness was performed using 1000 bootstraps. Then the distance matrix was transformed into a similarity matrix to perform a principal coordinate analysis (PCoA) which summarizes the distance variance of the population in the first axes.

RESULTS

Morphological, climatic and genetic structuring.

1) Morphological variability

The CVA analysis reveals 10 significant axes (*i.e.* CV, $p < 0.001$) defining the morphospace for both form (size + shape) and shape. Only the two first axes of CVA analyses on form and shape are illustrated. They summarize a total explained variance of 41.5% and 41.4%, respectively (Fig. 3A, B). The third and fourth axes explain less variance but nevertheless their values are not negligible (13.5% and 10.1% for the form axes and, 11.6% and 11.3% for the shape axes). These two axes are retained for further analysis to explain more morphological variance (about 65%) in correlation values. Mahalanobis distances, calculated between population centroids, are all significant ($p < 0.0001$) for both form and shape. A strong difference in the distribution of populations between form and shape analyses can be observed (Fig. 3A, B). In order to understand this difference, we tested the correlation between morphological axes and the size parameter. In fact, size can influence form and shape axes if static allometry is present (measurements of conspecific individuals at the same life stage, Shingleton *et al.*, 2007)

In the form analysis, CV score values on the first two axes (form 1 and form 2) are significantly explained by the size parameter at 36% and 40% respectively (size vs form 1: $R^2 = 0.36$, $p = 0.01$ and size vs form 2: $R^2 = 0.40$, $p = 0.009$). However, shape axes are not significantly predicted by size (size vs shape 1: $R^2 = 0.167$, $p = 0.12$; size vs shape 2: $R^2 = 0.049$, $p = 0.42$). Consequently, static allometry is important in form population

structuring. This allometry is no longer present in shape population structuring. For this reason, CV score values of size and shape are analyzed separately. The CV score values of form are not described as they are strongly size-dependent.

The morphometric approach used in this study focuses on the m1 anterior part. Consequently, the main variations between populations will only be observed in this particular region of the tooth. Extreme CV score values on the first shape axis (shape 1) distinguish all the populations of Vanoise (Van), Monétier-les-Bains (Mon), Septfontaines (Septf), Vittel (Vitt) and Espézel (Esp) on the positive side, from the populations of Calais (Cal) and Mont-Saint-Michel (MSM) on the negative side (Fig. 3B, C). Morphologically, this separation corresponds to populations with a smaller T6-T7 triangle area (Fig. 3B, C) on the positive side, and populations with a high T6-T7 triangle area on the negative side. The differences between the T6-T7 areas are mostly recorded in the anterior loop closure and its angle tilt (Fig. 3B). On the second axis (shape 2), populations of Les Rives (Riv) and Septf are strongly separated on the positive side from the remaining populations by a smaller anterior loop closure and an uplift of the T6 and T7 bases (Fig. 3B, D). As a result, divergence patterns on the two first axes of *M. arvalis* populations are characterized by the relative position and development of the T6-T7 triangle area.

2) Climatic gradients in France

The PCA analysis performed on the 14 climatic indices and variables, characterizing the 16 weather stations, revealed that the three first axes must be retained. In fact, their eigenvalues are greater than one ($\lambda > 1$; Kaiser-Gutman criterion). The correlation scores of variables (Fig. 4A) indicate that the first axis (climate 1: 48.8% of the explained variance) is mostly characterized by the temperature level. Cold temperatures (T_y , T_m , T_M and T_{Mabs}) are associated to high altitude (Alt) and strong seasonal amplitudes (SA_{TM} and SA_{Tm}). This corresponds to warm late spring and low early winter rainfall (P_{winter}) and high early spring rainfall (P_{spring}). This axis may represent the differences between continental degradation, on the positive side, and maritime characteristic, on the negative side, of the oceanic climate in France (Fig. 4B).

The second axis (climate 2: 20.57% of the explained variance) is significantly correlated with the indices (SA_{TM} , T_{aa} and T_{int}): "strong diurnal" and "seasonal maximum" temperature amplitudes, which occur when May is cool in relation to November (Fig. 4A, C). This paradoxical association is strongly determined by the Lanslebourg-Mont-Cenis (LMC) weather station. Its score values on the first and second

axes are very different from the other "continental" stations. This difference may be explained by the high altitude of the station. As LMC is a 2000 m high station, snow is still present in May, which cools down the temperatures. So the "Tint" index of LMC is as low as an "oceanic" station.

The third axis (climate 3: 16.5% of the variance explained) is strongly determined by the "Pautumn" and "Pabs" indices. As a consequence, the third axis may be defined as a "Mediterranean" rhythm of rainfall, tending towards positive values (Fig. 4A, D). In the absence of a genuine Mediterranean station, these characteristics are more pronounced in the mountainous hinterland (Pyrenees, Massif Central and Alps).

As the 16 weather stations are well distributed around the country, the PCA analysis shows a strong structuring of the climatic indices and parameters in France. Our results are therefore consistent with a pertinent climatic analysis.

3) Phylogeographical analyses among populations

Complete phylogenetic reconstructions and phylogeographical interpretations have already been elaborated from *cytb* and *CR* at the European and French scales in previous studies (Fink *et al.*, 2004; Heckel *et al.*, 2005; Tougard *et al.*, 2008b). In order to allow comparison of phylogeny and the other proxies studied (morphology and climate), we considered only the French populations from Tougard *et al.* (2008b). Thus, we can confirm whether the phylogenetic reconstruction obtained is still coherent with previous wider studies on *M. arvalis*.

At the European scale, the French populations are included within the Western lineage which includes the German, Swiss, Belgium and Spanish populations (Tougaard *et al.*, 2008b). The phylogenetic reconstructions obtained from the 40 French common vole individuals, using the maximum-likelihood and Bayesian approach, provide congruent topologies for both *cytb* and *CR* (supplementary information). These topologies separate the same two clades, South-West (SW) and North-East (NE), as defined from *cytb* and *CR* in Tougaard *et al.* (2008b). For *CR* (supplementary information), these clusters are highly to moderately supported. The SW cluster is highly supported (83% in BP and 1.00 in PP), whereas the NE cluster is moderately supported in ML (BP = 78%) and not supported in BA (PP <0.5). For *cytb*, the SW clade is moderately supported in ML (BP = 64%) and highly supported in BA (PP = 1.00). The NE cluster is highly supported in ML (BP = 92%) but not in BA (PP <0.5).

Moreover, in our *cytb* result (supplementary information), a moderately supported sub-cluster (BP=62%; PP=0.68) including populations from southeastern France (SE) is

included within the SW cluster, whereas in CR analysis, this sub-cluster is the sister clade of the NE cluster (BP=83%; PP=1.00). Indeed, the CR tree topology is quite similar to previous published studies based on both *cytb* and CR (Heckel *et al.*, 2005; Tougard *et al.*, 2008b), while the *cytb* differs by the position of the SE sub-cluster in the tree. Moreover, in previous published studies, the SE sub-cluster is moderately supported and is always included in the NE cluster (Tougaard *et al.*, 2008b).

The concatenated CR+*cytb* tree (Fig. 5) shows a SW and NE structuring, but both clusters are weakly supported. The sub-cluster SE is highly supported in both ML and BA methods (BP=99%; PP=1.00). As a result, the global phylogeographical reconstruction among French *M. arvalis* populations is still congruent with European and French results (Fink *et al.*, 2004; Haynes *et al.*, 2003; Heckel *et al.*, 2005; Tougaard *et al.*, 2008b). However, some phylogenetic inaccuracies, such as the SE sub-cluster, are present. They are partly due to the low number of substitutions between the sequences and the relatively recent history of this species, which decreases the genetic isolation of populations. The substitution rate is higher in CR than in *cytb* (for *Microtus* genera: CR \approx 0.10 substitution/site and *cytb* $>$ 0.08 sub/site; Triant et DeWoody, 2006). Tree resolution is improved when the substitution rate of the gene is high, and the difference between sequences is increased. Therefore we obtain a better resolution of the ML phylogeny for CR than for *cytb*. However, our results remain coherent with those of Tougaard *et al.* (2008b), who obtained a better resolution of both ML and BA phylogeny for *cytb*, with a greater number of populations.

In addition, as the geographical context is restricted to France, some part of the population history of *M. arvalis* is missing. However the net (D_a) and total (D_{xy}) divergences between the SW and NE cluster on *cytb* ($D_a = 0.9\%$ and $D_{xy} = 1.7\%$) are unchanged compared to previous studies ($D_a = 0.9\%$ and $D_{xy} = 1.8\%$; Tougaard *et al.*, 2008b). This confirms the reliability of the separation into two clusters of the French *M. arvalis* populations.

Matrix correlations between size and shape, climate, geography and genetic data: multiple regressions and PROTEST analyses

1) Multiple regressions between size and shape, climate, and geography

As size may exhibit variations in relation with climatic gradient (Renaud, 1999; Shepherd et Kelt, 1999), multiple regression analyses were performed on the size parameter versus climatic CV scores and geographical coordinates. None of the 15 climatic parameters or the geography can explain the size changes. The multiple

regression coefficient is high but the associated probability is not significant (R^2 multiple = 0.87; $p > 0.08$). Using the number of individuals by population, we tested the population effect in the multiple regressions. There is no population effect on the size variation ($p = 0.40$). Therefore, size in *M. arvalis* is predicted neither by climatic parameters, nor by geographical or altitudinal distribution.

Each shape axis was compared, using a stepwise multiple regression analysis, with the 15 climatic parameters, the geographical coordinates of population localities and the population effect. For the first axis (shape 1), the best correlated parameter is altitude (R^2 multiple = 0.77; $p < 0.001$). For shape 2, the absolute daily minimum temperature (*i.e.* a discontinuous temperature parameter) is the best correlated parameter (R^2 multiple = 0.61; $p < 0.001$). However, no parameter (*i.e.* no climatic variables or indices, or geography) is correlated with shapes 3 and 4 (R^2 multiple = 0.00; $p > 0.09$).

2) PROTEST correlation analyses between morphology, molecular data, climate and geography

In order to understand the congruence between morphological and climatic structuring in France, associated with genetic structuring and geography, a general analysis such as PROTEST is more relevant.

The matrix comparison method (PROTEST) used in this study requires observation-by-variable matrices. The genetic distance matrix obtained between the 17 French populations was also "transformed" into an observation-by-variable matrix using a PCoA. This procedure allows comparisons between morphological, climatic and geographical matrices. The first two PCoA axes of genetic variance (Fig. 6) indicate that the NE and SW clusters are clearly distinguished on the first axis (genetic 1: 74.96% of the variance). This is congruent with the results obtained from the phylogeographical interpretations on the concatenated gene phylogeny. The SE sub-cluster is clearly separated from the NE and SW clusters on the second axis (genetic 2: 16.96% of the variance). As a result, the population structuring on the first two PCoA axes is mainly congruent with the phylogeographical interpretation of present and previous studies.

Climatic, genetic, morphological and geographical matrix correlations were tested using a PROTEST analysis (Jackson, 1995; Peres-Neto et Jackson, 2001). In this manner, a larger part of variance is taken into account in the analyses. One of the best correlations, that between climate and geography (Table 3) is represented in Figure 7A with the least-square fit and the decreasing residual values for each associated population (right boxes). In the shape space defined by climate and geography matrices (Fig. 7A),

the Van population displays high residual values (0.35) in comparison with other localities (less than 0.23; Fig. 7B). This population disrupts the good agreement between morphology and climate, because the least-square fits are sensitive to such atypical points. If we rerun these analyses without Van, the fit is improved (with Van: corr = 0.6642, pcorr = 0.0001; without Van: corr = 0.6844, pcorr = 0.0001).

All the correlation results are significant between the four matrices tested. The strongest significant correlations ($p < 0.0001$) join climate space with shape space and geography (Table 3). No correlations over 0.70 include the genetic space (Table 3). However this space is better correlated with climatic and geographical spaces.

In order to understand more particularly the congruence between morphological, climatic, geographical and molecular structuring in France, multiple regressions were performed on the different axes defined previously in the various CVA, PCA and PCoA analyses. The shape 1 axis is explained by the first and third climate axes but also by longitude (Table 4). This explains why, in the PROTEST analysis, the morphospaces involving shape 1 are consistently correlated with first and third climate axes and geography. The shape 2 axis is only predicted by latitude, while shape 4 is predicted by the first genetic axis (Table 4). Climate axes 1 and 3 are predicted by latitude and longitude respectively (Table 4). This result is logical as climate is dependent on geographical location. It also explains the good correlation results obtained in PROTEST analyses between climatic axes and geography. In addition, genetic axis 1 is predicted by both longitude and latitude (Table 4). This confirms the phylogeographical interpretation based on mitochondrial genes at the intraspecific level. Moreover, genetic axis 2 is predicted by climate axes 1 and 3 (Table 4).

As a result, morphological ordination of French *M. arvalis* populations is significantly associated with climatic structuring, which is itself correlated with geography. Genetic distance structuring is, to a lesser extent, associated with morphology, climate and geography.

DISCUSSION

Morphological patterns in French Microtus arvalis: shape and size versus climate change

Precise measurements on the m1 anterior part allow us to highlight morphological tooth structuring in French *M. arvalis*. These populations are mostly differentiated by their T6-T7 areas. Populations with a small T6-T7 area (*i.e.* reinforcement of the T6-T7 design and greater closure of the anterior loop base) are usually situated higher in altitude

(multiple regression results). In addition, these populations live under more continental climates (Fig. 6). This general trend of anterior loop closure is also observed in morphological comparisons between species of fossil and Recent, European ground voles (*Microtus (Terricola)*; Brunet-Lecomte et Chaline, 1991). This morphological character differentiates Mediterranean species (open anterior loop) from continental western European and Atlantic species (closed anterior loop). Moreover, the addition of prisms has been demonstrated in the m1 anterior part of the sagebrush vole through time (*Lemmiscus curtatus*; Barnosky et Bell (2003). As a result, this character is considered to be derived. Hence, in *M. arvalis*, a small T6-T7 area may correspond to a derived character, reinforcing the anterior loop closure (as in ground voles; Brunet-Lecomte et Chaline, 1991) and folding the anterior part more deeply, leading to prism formation (as in sagebrush voles; Barnosky et Bell, 2003). In large mammals, a recent study indicates the opposite effect on red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Palearctic regions (Szuma, 2008). The tooth size of *Vulpes vulpes* is enlarged in cooler habitats with greater seasonality. As a consequence, the tooth size response to climate could be size-, and perhaps species-dependent, in mammals.

Conversely, our results show that m1 size in *M. arvalis* is not sensitive to environmental factors. First, m1 size is not significantly related to the elevation gradient (altitude). Secondly, weak correlations are observed between size variations in *M. arvalis* and climatic gradients, longitude and latitude.

Therefore, molar shape variation in *M. arvalis* is significantly correlated to altitude, associated with continental climates. Population structuring in the morphospace is correlated with its organization in climatic space and with its geographical distribution. So inferences of climatic variations and geographical distribution are much more important to *M. arvalis* shape structuring than to size structuring.

Molar size is not related to climate

Our study indicates that molar size structuring is not influenced by climatic variations in *M. arvalis*. This result is not in accordance with recent studies based on murines which demonstrated that molar size can be sensitive to environmental variation (climate and latitudinal gradient; Renaud, 1999; Renaud et Michaux, 2007).

Two reasons may be advocated to explain this difference: 1) the biological model observed; 2) the geographical scale of the study.

1) The effect of the biological model. This hypothesis suggests that if molar size development is different between murines and arvicolines, then environmental variation

may not affect them in the same way. A recent study has demonstrated that lower molar sizes in murines can be significantly predicted by a linear model (the inhibition cascade model, Kavanagh *et al.*, 2007). However, this model is not accurate to predict arvicoline molar sizes. In fact, their molar size would be better predicted by a non-linear developmental model (Renvoisé *et al.*, in press).

2) The effect of the geographical scale of the study. Geographical scale changes the correlation results between molar size and climate. Our study explores a very specific scale (country), whereas the other studies on murine molar variations deal with larger scales (African mainland; Renaud, 1999 or Southern Europe mainland; Renaud et Michaux, 2007).

However, the different responses of molar size to climate can be more readily explained by a difference in developmental mode for murine and arvicoline molars rather than by a difference in geographical scale. The effect of geographical scale on the climatic and morphological correlation results still remains to be explored for murines and arvicolines.

Genetic structuring

Though based on a restricted dataset (French populations), our genetic structuring analyses provide similar results to previously published studies for the Western lineage of *M. arvalis* (Fink *et al.*, 2004; Heckel *et al.*, 2005; Tougard *et al.*, 2008b). Therefore, we have recovered the phylogeographical interpretations made on this species at the French scale. In our results, it is shown that the genetic distance structuring of French *M. arvalis* populations is partly, but significantly, explained by the geographical distance between populations and climatic ordination (Tables 3 and 4). First, phylogeographical interpretations are based on phylogenetic reconstructions linking phylogenetic groups with geographical areas. In general, areas are defined by using estimated locations of population groups. Here, we use an additional argument to validate the association of phylogenetic groups and their geographical areas through the use of statistical correlations. Our correlation results confirm that genetic distance structuring reflects the phylogeographical interpretations. Second, the phylogeographical history of *M. arvalis* has been shown to be strongly related to past Pleistocene glaciations (Tougaard *et al.*, 2008b). As genetic distance structuring is correlated to geography and climate, it is possible that a slight climate effect may be involved in *M. arvalis* population structuring in France. However, this correlation may also be due to the dual correlation between geographical and climatic data.

Molar shape does not reflect genetic structuring

In previous studies on murine species (Renaud, 1999; Renaud *et al.*, 2005; Renaud et Michaux, 2007), on six vole species of *Microtus (Terricola)* (Tougaard *et al.*, 2008a) and on five species of the *Marmota* genus (Caumul et Polly, 2005), it is advocated that tooth shape variations might reflect phylogenetic relationships. However, it has been demonstrated, in hominoids, that dental characters are not reliable for phylogenetic reconstructions (Collard et Wood, 2000). As a consequence, the relationship between molar shape variations and phylogenies might be dependent on the mammal considered. In our results, only a small part of the shape variance is explained by the phylogenetic distance between populations ($6\% = 11.3\% * 54\%$). As the focal point of our study is France, only a small part of *M. arvalis* phylogeographical history is represented. It is possible that this scale may not be vast enough to point out: (i) relationships between slight within-species shape variation and (ii) the long-term history of populations of such a widespread European species. However, even at a larger scale (51 localities in Europe and Asia), Caumul et Polly (2005) have demonstrated that only a small part of the third upper molar shape variance (5%) in marmots is related to the mtDNA distance between populations. This coherence with our results is logical as the mitochondrial genes are not supposed to infer on tooth morphology.

Therefore, it is difficult to draw a definitive conclusion as to genetic distance influence to explain molar shape variation. As a result, even if a small part of the phylogeographical history is represented by tooth shape variability, this does not presuppose any phylogenetic recoverability of dental characters.

Mechanisms involved in shape and climate relationships

Correlations between climate and molar shape variation are interesting to be demonstrated. However, they do not explain the mechanisms involved in each relationship. First, climate can play an indirect role on morphology through the strong link between vegetation type, soil type and climate. Second, competition between species may have an impact on morphology through food availability. Third, morphological variation in *M. arvalis* can be seen as phenotypic responsiveness to environmental variation (*i.e.* phenotypic plasticity; Bradshaw, 1965; West-Eberhard, 2003). Finally, environment may be viewed as an inductor of change during tooth development (Navarro, 2004).

Phenotypic plasticity is a universal characteristic of living beings controlled by two mechanisms: 1) phenotypic accommodation, which is involved in the evolution of new

traits; 2) the integration and exaggeration of both developmental and evolutionary change without genetic change (West-Eberhard, 2003). In any given individual, phenotypic plasticity undergoes the influence of both environment and genetics. In addition, West-Eberhard (2003) indicates that bone is malleable under various regimes of use or stress during development. The minor modification of tooth shape observed in *M. arvalis*, shows that enamel is slightly malleable during development and may respond to climatic structuring through phenotypic plasticity.

Conclusion

About 40% of tooth form variation in French *M. arvalis* is explained by size variation (static allometry). Tooth size difference between populations is not explained by climatic parameters. Size is probably dependent on the species mode of tooth development. Environment plays several roles in species tooth size. Tooth shape depends rather on climate than on genetic change at the intraspecific level. This is logical for mitochondrial genes. However, it is difficult to demonstrate the ecological and developmental mechanisms involved in such relationships (such as diet, competition, phenotypic plasticity, and morphogenesis). At the interspecific level, tooth shape probably reflects the phylogenetic relationships between species. Finally, genetic distance between populations is correlated with geographical distance. Hence, previous phylogeographical interpretations for *M. arvalis* are validated by our study.

Therefore, a morphological and genetic study of *M. arvalis* at the country scale explores a large spectrum of factors involved in tooth morphology but also in genetic distance between populations. Our study can be extrapolated to a larger scale, e.g. Europe. This increase in scale could broaden the investigation of climatic impact on morphological and genetic structuring of populations in recent times, but also over geological time in fossil remains. As a consequence, it would become possible to study the difference in morphological and genetic responses to environmental change and the consequences on phylogenetic reconstructions of the past.

Acknowledgements

We are grateful to M. Bouche (Location) for access to tissues and skulls of *M. arvalis* from the Vanoise National Parc, to B. Laitung (Biologie et gestion des adventices, UMR, INRA, ENESAD, Université de Bourgogne) for access to the vegetation maps, and to O. Mathieu (Biogeosciences laboratory, University of Burgundy)

for his help in reading the soil maps. The climatic data were obtained by kind permission of Serge Taboulot (Météo-France society).

References

- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*, Harvard University Press edn, Cambridge.
- Barnosky, A.D. & Bell, C. J. (2003) Evolution, climatic change and species boundaries: Perspectives from tracing *Lemmys curtatus* populations through time and space. *Proceedings of the Royal Society B*, **270**, 2585-2590.
- Belen, A., Alten, B. & Aytakin, M. (2004) Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Plebotomus papatasi* populations. *Medical and Veterinary Entomology* **18**, 343-350.
- Bradshaw, A.D. (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, **13**, 115-155.
- Brunet-Lecomte, P. (1988) Les campagnols souterrains (*Terricola*, *Arvicolidae*, Rodentia) actuels et fossiles d'Europe occidentale. Unpublished PhD Thesis. Université de Bourgogne, Dijon.
- Brunet-Lecomte, P. & Chaline, J. (1991) Morphological evolution and phylogenetic relationships of the European ground voles (*Arvicolidae*, Rodentia). *Lethaia*, **24**, 45-53.
- Caumul, R.A.P. & Polly, D. (2005) Phylogenetic and environmental components of morphological variation: Skull, mandible & molar shape in marmots (*Marmota*, Rodentia). *Evolution*, **59**, 2460-2472.
- Chaline, J. (1972) *Les rongeurs du Pléistocène moyen et supérieur*. Editions du CNRS, Paris.
- Collard, M. & Wood, B. (2000) How reliable are human phylogenetic hypotheses? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5003-5006
- Couette, S., Escarguel, G. & Montuire, S. (2005) Constructing, bootstrapping, and comparing morphometric and phylogenetic trees: A case study of new world monkeys (Platyrrhini, Primates). *Journal of Mammalogy*, **86**, 773-781.
- Eccard, J.A. & Ylönen, H. (2007) Cost of coexistence along a gradient of competitor densities: An experiment with arvicoline rodents. *Journal of Animal Ecology*, **76**, 65-71.
- Eldredge, N. (1972) Systematics and evolution of *Phacops rana* (Green, 1832) and *Phacops iowensis* Delo, 1935 (Trilobita) from the middle Devonian of North America. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **147**, 45-114.
- Fink, S., Excoffier, L. & Heckel, G. (2004) Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations. *Molecular Ecology*, **13**, 3501-3514.
- Fisher, R.A. (1936) The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics*, **7**, 179-188.
- Fok, K.W., Wade, C.M. & Parkin, D.T. (2002) Inferring the phylogeny of disjunct populations of the azure-winged magpie *Cyanopica cyanus* from mitochondrial control region sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **269**, 1671-1679.
- Fortelius, M., Eronen, J., Liu, L., Pushkina, D., Tesakov, A., Vislobokova, I. & Zhang, Z. (2006) Late Miocene and Pliocene large land mammals and climatic changes in Eurasia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **238**, 219-227.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J.S., Mills, J.A. & Merilä, J. (2007) Climate change and evolution: Disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, **17**, 167-178.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast & accurate algorithm for estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696-704.
- Gerstengarbe, F.-W. & Werner, P. C. (2008) A short update on Koeppen climate shifts in Europe between 1901 and 2003. *Climatic Change* DOI 10.1007/s10584-008-9430-0.
- Guralnick, R. (2006) The legacy of past climate and landscape change on species' current experienced climate and elevation ranges across latitude: A multispecies study utilizing mammals in western north America. *Global Ecology and Biogeography*, **15**, 505-518.
- Haynes, S., Jaarola, M. & Searle, J. B. (2003) Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Molecular Ecology*, **12**, 951-956.
- Heckel, G., Burri, R., Fink, S., Desmet, J.-F. & Excoffier, L. (2005) Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole, *Microtus arvalis*. *Evolution*, **59**, 2231-2242.

- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.
- Jackson, D.A. (1995) Procrustes: A procrustean randomization test of community environment concordance. *Ecoscience*, **2**, 297-303.
- Kavanagh, K.D., Evans, A. & Jernvall, J. (2007) Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature*, **449**, 427-432.
- Köppen, W. (1923) *Die Klimate der Erde - Grundriss der Klimakunde*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, Leipzig.
- Laplana, C., Montuire, S., Brunet-Lecomte & Chaline, J. (2000) Révision des *Allophaiomys* (Arvicolinae, Rodentia, Mammalia) des Valerots (Côte-d'Or, France). *Geodiversitas*, **22**, 255-267.
- Le Louarn, H. & Quéré, J.-P. (2003) *Les rongeurs de France*. INRA, Paris.
- Manly, B.F.J. (1991) *Randomization and monte carlo methods in biology*. Chapman & Hall, New York.
- Marchand, H., Paillat, G., Montuire, S. & Butet, A. (2003) Fluctuating asymmetry in bank vole populations (Rodentia, Arvicolinae) reflects stress caused by landscape fragmentation in the Mont-Saint-Michel bay. *Biological Journal of the Linnean Society*, **80**, 37-44.
- Millien, V. (2004) Relative effects of climatic change, isolation and competition on body-size evolution in the Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Journal of Biogeography*, **31**, 1267-1276.
- Mitchell-Jones, A.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralick, V. & Zima, J. (1999) *The atlas of European mammals*. Academic Press, London.
- Musiani, M., Leonard, J.A., Cluff, H.D., Gates, C.C., Mariani, S., Paquet, P.C., Vila, C. & Wayne, R.K. (2007) Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: Genetics, coat colour and association with migratory caribou. *Molecular Ecology*, **16**, 4149-4170.
- Navarro, N. (2004) Réponses biotiques aux variations environnementales : Communauté et phénotype. Unpublished PhD Thesis Université de Bourgogne, Dijon.
- 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.
- Niethammer, J. & Krapp, F. (1982) *Handbuch der Säugetiere Europas*. Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden.
- Nylander, J.A.A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Peres-Neto, P.R. & Jackson, D.A. (2001) How well do multivariate data sets match? The advantages of a procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia*, **129**, 169-178.
- Pilot, M., Jedrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V.E., Jedrzejewska, B., Stachura, K. & Funk, S.M. (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, **15**, 4533-4553.
- Polly P.D. (2003) Paleophylogeography of *Sorex araneus*: molar shape as a morphological marker for fossil shrews. *Mammalia* **68**: 233-243.
- Porter, W.P., Budaraju, S., Stewart, W. E. & Ramankutty, N. (2000) Calculating climate effects on birds and mammals: Impacts on biodiversity, conservation, population parameters, and global community structure. *American Zoologist*, **40**, 597-630.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) Modeltest : Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. URL www.R-project.org.
- Renaud, S. (1999) Size and shape variability in relation to species differences and climatic gradients in the African rodent *Oenomys*. *Journal of Biogeography*, **26**, 857-865.
- Renaud, S. & Michaux, J. (2007) Mandibles and molars of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* (L.): Integrated latitudinal pattern and mosaic insular evolution. *Journal of Biogeography*, **34**, 339-355.
- Renaud, S., Michaux, J., Schmidt, D. N., Aguilar, J.-P., Mein, P. & Auffray, J.-C. (2005) Morphological evolution, ecological diversification and climate change in rodents. *Proceedings of the Royal Society B*, **272**, 609-617.
- Renvoisé, E., Evans, A., Jebrane, A., Labruère, C. & Montuire, S. (2009) The evolution of mammal tooth patterns: New insights from a developmental prediction model. *Evolution*. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2009.00639.x
- Shepherd, U.L. (1998) A comparison of species diversity and morphological diversity across the north American latitudinal gradient. *Journal of Biogeography*, **25**, 19-29.
- Shepherd, U.L. & Kelt, D. A. (1999) Mammalian species richness and morphological complexity along an elevational gradient in the arid south-west. *Journal of Biogeography*, **26**, 843-855.
- Shingleton AW, Frankino WA, Thomas F, Nijhout HF, and Douglas JE. 2007. Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *BioEssays*, **29**, 536-548.

Chapitre I

- Smith, F.A., Betancourt, J.L., and Brown, J.H. (1995) Evolution of body size in the woodrat over the past 25,000 years of climate-change. *Science*, **270**, 2012-2015.
- Spitz F. (1977) Le campagnol des champs (*Microtus arvalis* Pallas) en Europe. *Bulletin OEPP*, **7**, 165-175.
- Statsoft (2008) Statistica, version 8.0. France.
- Szuma, E. (2008) Evolutionary and climatic factors affecting tooth size in the red fox *Vulpes vulpes* in the holarctic. *Acta Theriologica*, **53**, 289-332.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tougard, C., Brunet-Lecomte, P., Fabre, M. & Montuire, S. (2008a) Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data. *Biological Journal of the Linnean Society*, **93**, 309-323.
- Tougard, C., Renvoisé, E., Petitjean, A., Quéré, J.-P. (2008b) New insight into the colonization processes of common voles: Inferences from molecular and fossil evidence. *Public Library of Science One*, **3**, 1-10.
- Triant, D.A. & DeWoody, J.A. (2006) Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences. *Genetica*, **128**, 95-108
- Triant, D.A. & DeWoody J. A. (2007) Extensive mitochondrial DNA transfer in a rapidly evolving rodent has been mediated by independent insertion events and by duplications. *Gene*, **401**, 61-70.
- Weir, J.T. & Schluter, D. (2007) The latitudinal gradient in recent speciation and extinction rate of birds and mammals. *Science*, **315**, 1574-1576.
- West-Eberhard, M.J. (2003) *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York.

Chapitre I

Morphological data		Genetic data (accession number)			Climatic data		Sources
<i>Locations (Abr) – altitude population</i>	<i>Sample size</i>	<i>Locations (Abr) – altitude population</i>	<i>Control Region^a</i>	<i>Cytochrome b^a</i>	<i>Locations (Abr) – altitude station</i>	<i>Temperatures (T) – Precipitations (P)</i>	<i>(M/G/C)</i>
Broussy-le-Grand (BLG) – 145m	32	-	-	-	Avize (Avi) – 108m	TP	<i>JPQ/-/MF</i>
Caen (Cae) – 70m	29	Evreux (Evr)	AM990267	AM991075	Caen (Cae) – 68m	TP	<i>TC/CT/MF</i>
		Le Neubourg (Neu)	AM990265	AM991074			<i>TC/CT/MF</i>
Calais (Cal) – 5m	21	Calais (Cal) – 5m	AM990307 AM990306	AM991097 AM991098	Dunkerque (Dunk) – 11m	TP	<i>TC/TC/MF</i>
Epoisses (Epo) – 260m	36	Nuit-Saint-Georges (NSG)-	AM990298 AM990300	AM991091 AM991092	Baigneux-les-Juifs (BLJ) – 407m	TP	<i>JPQ/CT/MF</i>
Espézel (Esp) – 890m	28	Espézel (Esp) – 890m	AM990187 AM990195	AM991031 AM991036	Belcaire (Bel) – 1000m	TP	<i>JPQ/JPQ/MF</i>
Férel (Fér) – 31m	26	Férel (Fér) – 31m	AM990252 AM990254	AM991068 AM991069	Billiers (Bill) – 4m	TP	<i>JPQ/JPQ/MF</i>
Heyrieux (Hey) – 300m	21	Chateaudouble (Chat) – 330m	AM990293 AM990296 AM990297	AM991088 AM991090 AM991090	Lyon -St-Exupéry (Lyo) – 235m	TP	<i>JPQ/-/MF</i>
Monétier-les-Bains (Mon) - > 2300m	23	Monétier-les-Bains (Mon) - > 2300m	AM990198	AM991037	Monétier-les-Bains (Mon) – 1459m	TP	<i>JPQ/JPQ/MF</i>
			AM990199	AM991038			
			AM990194	AM991035			
			AM990193	AM991034			
Le Magneraud (Mag) – 60m	23	-	-	-	Nuaille-sur-Boutonne (NSB) – 37m	TP	<i>JPQ/-/MF</i>
Les Rives (Riv) – 750m	16	Les Rives (Riv) – 750m	AM990269 AM990292	AM991076 AM991087	Le Caylar (Cay) – 730m	TP	<i>JPQ/JPQ/MF</i>
Mont-Saint-Michel (MSM) – 10m	9	Vauville (Vau)	AM990303	AM991094	Granville (Gran) – 37m	T	<i>TC/JPQ/MF</i>
			AM990304	AM991094			
Noirmoutier (Noir) – 5m	24	Noirmoutier (Noir) – 5m	AM990243 AM990246 AM990249 AM990251	AM991064 AM991065 AM991066 AM991067	Noirmoutier (Noir) – 3m	TP	<i>JPQ/JPQ/MF</i>

Morphological data		Genetic data (accession number)			Climatic data		Sources
Saint-Michel-en-l'Herm (SMH) – 5m	29	Saint-Michel-en-l'Herm (SMH) – 5m	AM990262	AM991072	Angles (Ang) – 12m	TP	JPQ/JPQ/-
			AM990264	AM991073			
Septfontaines (Septf) – 720m	30	Septfontaines (Septf) – 720m	AM990218	AM991050	Pontarlier (Pont) – 831m	TP	JPQ/JPQ/MF
		Chapelle d'Huin (CH) – 720m	AM990222	AM991052			-/JPQ/-
Vanoise (Van) – 2200m	34	Vanoise (Van) – 2200m	AM990190	AM991032	Lanslebourg-Mont-Cenis (LMC) – 2000m	TP	JPQ/JPQ/MF
			AM990192	AM991033			
			AM990206	AM991043			
			AM990192	AM991042			
Vittel (Vitt) – 420m	30	Vittel (Vitt) – 420m	-	AM991039	Bains-les-Bains (BLB) – 316m	TP	JPQ/JPQ/MF
			AM990200	-			
			AM990203	AM991041			
			AM990184	AM991028			
Monthureux-le-Sec (MLS)		Monthureux-le-Sec (MLS)	AM990185	AM991029			-/JPQ/-
			AM990186	AM991030			

Table 1: Data type (morphological, genetic and climatic data) obtained in each location (in alphabetical order) of the Figure 1. Genetic data correspond to individual sequences. JPQ = Jean-Pierre Quéré, TC = Thomas Cucchi, CT = Christelle Tougard, MF = Météo-France; Sources M/G/C = Morphological, Genetic and Climatic data.

^a Data obtained from Tougard et al. (2008)

Chapitre I

	Index	Description	Formula
Temperature variables	TM_{abs}	Absolute daily maximum temperature by month over 30 years	TM_{month} over 30 years
	Tm_{abs}	Absolute daily minimum temperature by month over 30 years	Tm_{month} over 30 years
	TM	Mean maximum temperature by month	$Max \sum T_{month} / nd$
	Tm	Mean minimum temperature by month	$Min \sum T_{month} / nd$
	Ty	Mean annual temperature	$\sum T_{mean} / month / 12$
Rainfall variables	P_{abs}	Absolute daily rainfall amount	PM_{month} over 30 years
	Py	Mean annual rainfall amount over	$\sum P_{mean/month} / 12$
Temperature indices	T_{aa}	Annual diurnal amplitude	$TM - Tm$
	SA_{TM}	Max seasonal amplitude (between July and January)	$TM_{Jul} - TM_{Jan}$
	SA_{Tm}	Min seasonal amplitude (between July and January)	$Tm_{Jul} - Tm_{Jan}$
	T_{int}	Difference between intermediate seasons (May and November)	$T_{May} - T_{Nov}$
Rainfall indices	P_{winter}	"Winter rainfall"	$P_{Nov+Dec} - P_{May+Jun}$
	P_{spring}	"Spring rainfall"	$P_{May+Jun} - P_{Feb+Mar}$
	P_{autumn}	"Autumn rainfall"	$P_{Oct} - P_{Jul}$

Table 2: Description and calculation of the different temperature and rainfall indices used in the climatic analysis. nd : number of days.

A

	Shape	Climate	Genetic	Geography
Shape		0.7499	0.5397	0.6138
Climate	< 0.0001		0.6142	0.6844
Genetic	0.0043	0.0147		0.5892
Geography	< 0.0001	< 0.0001	0.0118	

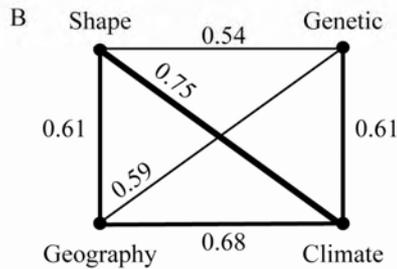


Table 3: PROTEST correlation results. A. Correlation values are presented in the upper diagonal matrix. Correlation probabilities associated are presented in the under diagonal matrix. B. Schematic reconstruction of correlation relationships between shape, genetic, geographical and climate matrices.

Chapitre I

Dependent variable	Independent variables	Multiple Regression Coefficient
shape 1	-0.26 climate 1 + 0.27 climate 3	$R^2 = 0.79$; $p < 0.01$
shape 1	16.71 - 0.37 longitude	$R^2 = 0.71$; $p < 0.01$
shape 2	-9.2 + 0.26 latitude	$R^2 = 0.50$; $p = 0.02$
shape 4	-58.36 genetic 1	$R^2 = 0.64$; $p < 0.01$
climate 1	1.12 latitude	$R^2 = 0.80$; $p < 0.01$
climate 3	26.1 -0.55 longitude	$R^2 = 0.47$; $p = 0.03$
genetic 1	0.13 - 0.027 longitude - 0.002 latitude	$R^2 = 0.54$; $p = 0.02$
genetic 2	-0.0007 climate 1 + 0.00012 climate 3	$R^2 = 0.56$; $p = 0.03$

Table 4: Significant equation results of the multiple regression analysis on the shape, climate, genetic and geography axes.

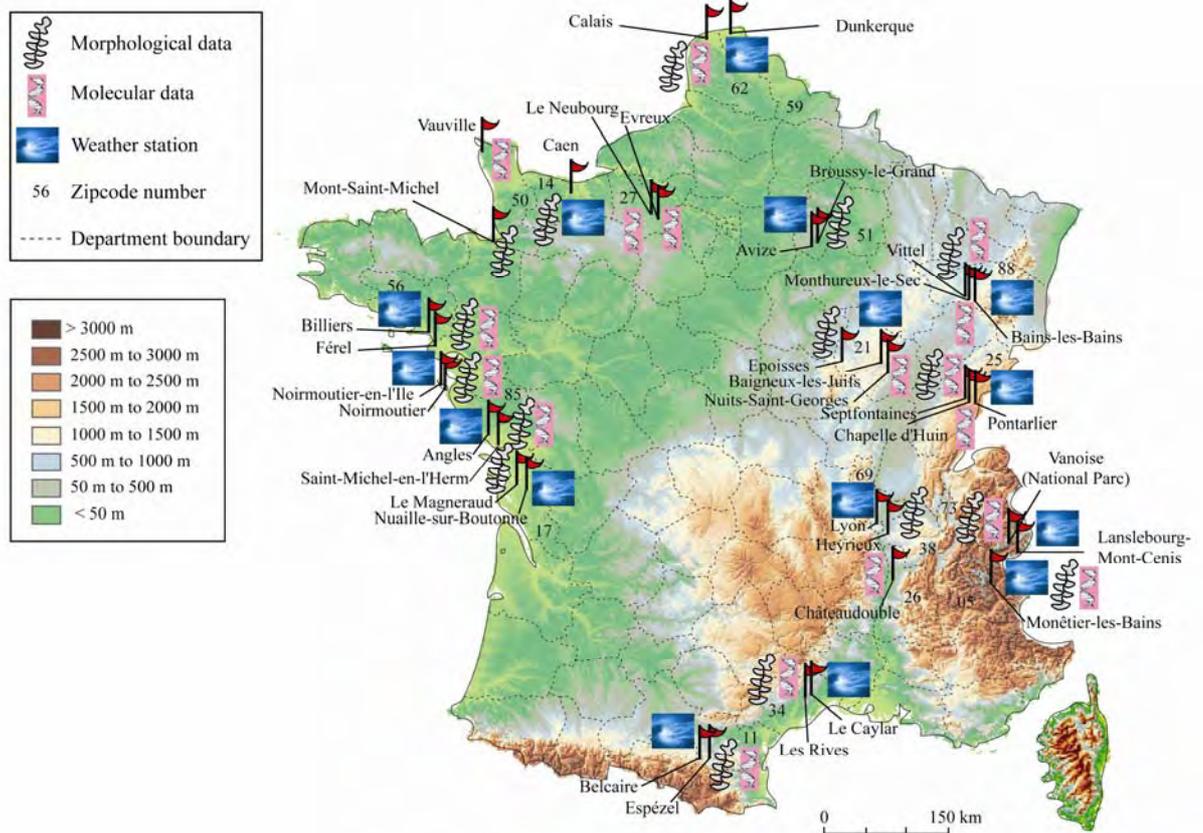


Figure 1: Map of French relief with localities (flags) associated to related data (morphological, molecular and/or climatic). Each molecular weather station sites was chosen as close as possible from the morphological data sites.

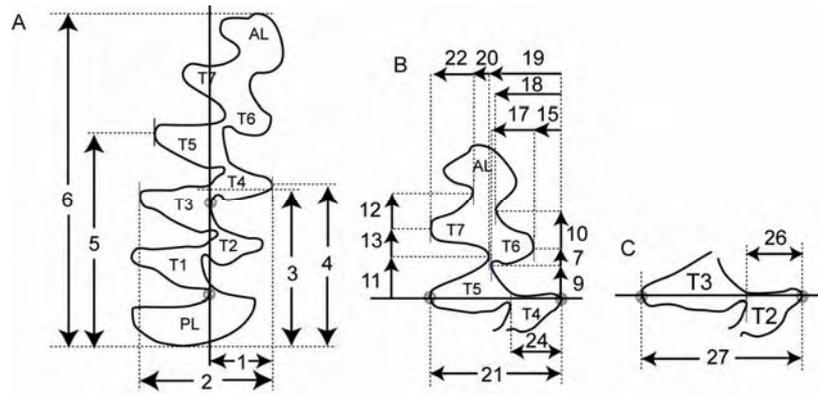


Figure 2: Biometry of the *M. arvalis* first lower molar: linear measurements of the morphological variables. T1-T7: Prisms (or triangles) from first to seven on the first lower molar; AL: Anterior loop; PL: Posterior loop. A: Six linear measurements on the occlusal surface; tooth orientation along the first and the fourth prism bases are indicated. B: Fourteen linear measurements on the anterior part and orientation along the fourth and fifth prism extremities. C: Two linear measurements on the T2-T3 triangles and orientation along the second and third prism extremities. (after Brunet-Lecomte, 1988; Laplana et al., 2000).

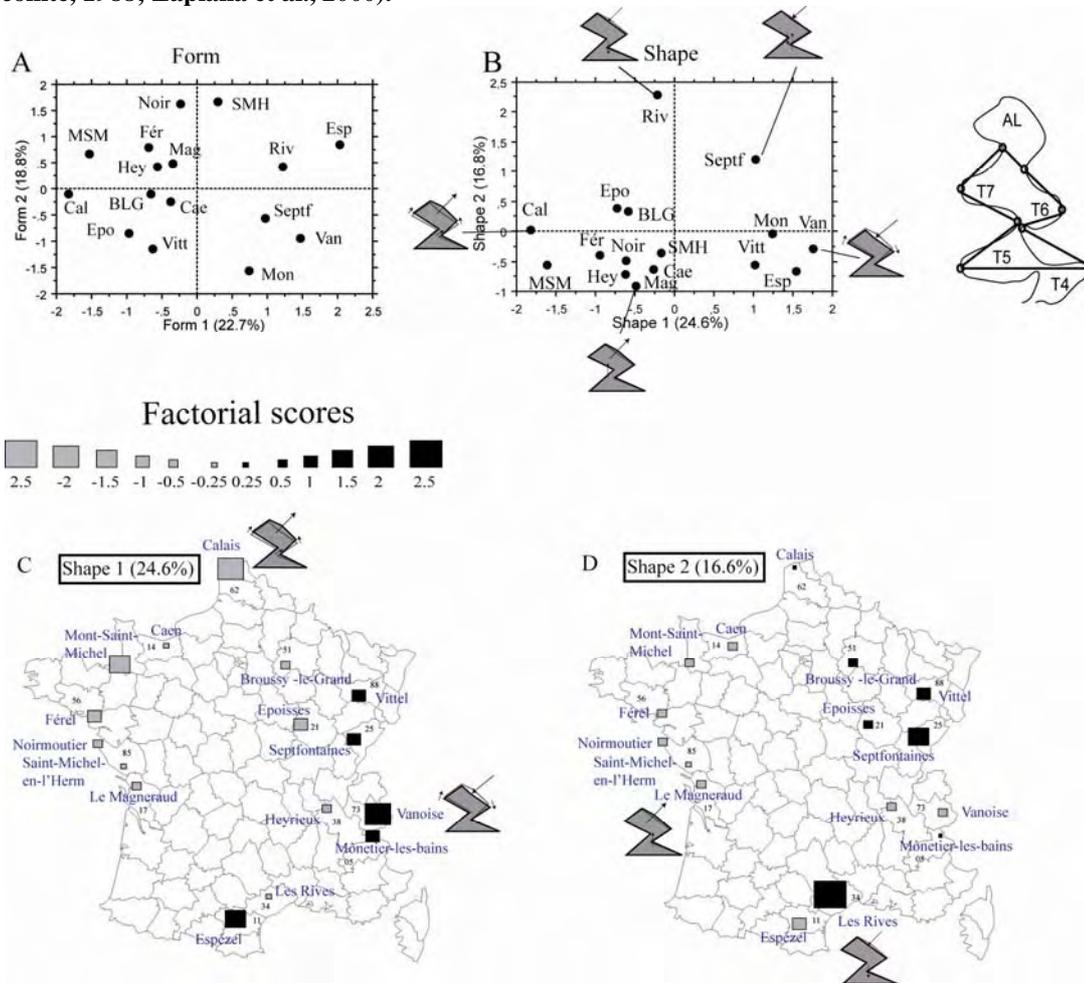


Figure 3: First two canonical axes of (A) form (size + shape) and (B) shape variables. Drawings on (B) represent the extreme anterior part variations of the m1 on the two axes. Arrows indicate the morphological deformation way from the extreme opposite morphology represented in light grey. Drawings are obtained from the linear measurement coordinates on the anterior part. The extreme morphologies are represented in black and dark grey. C-D: Geographical maps of the population scores on the 2 axes. Black squares: positive correlation score values. White squares: negative correlation score values.

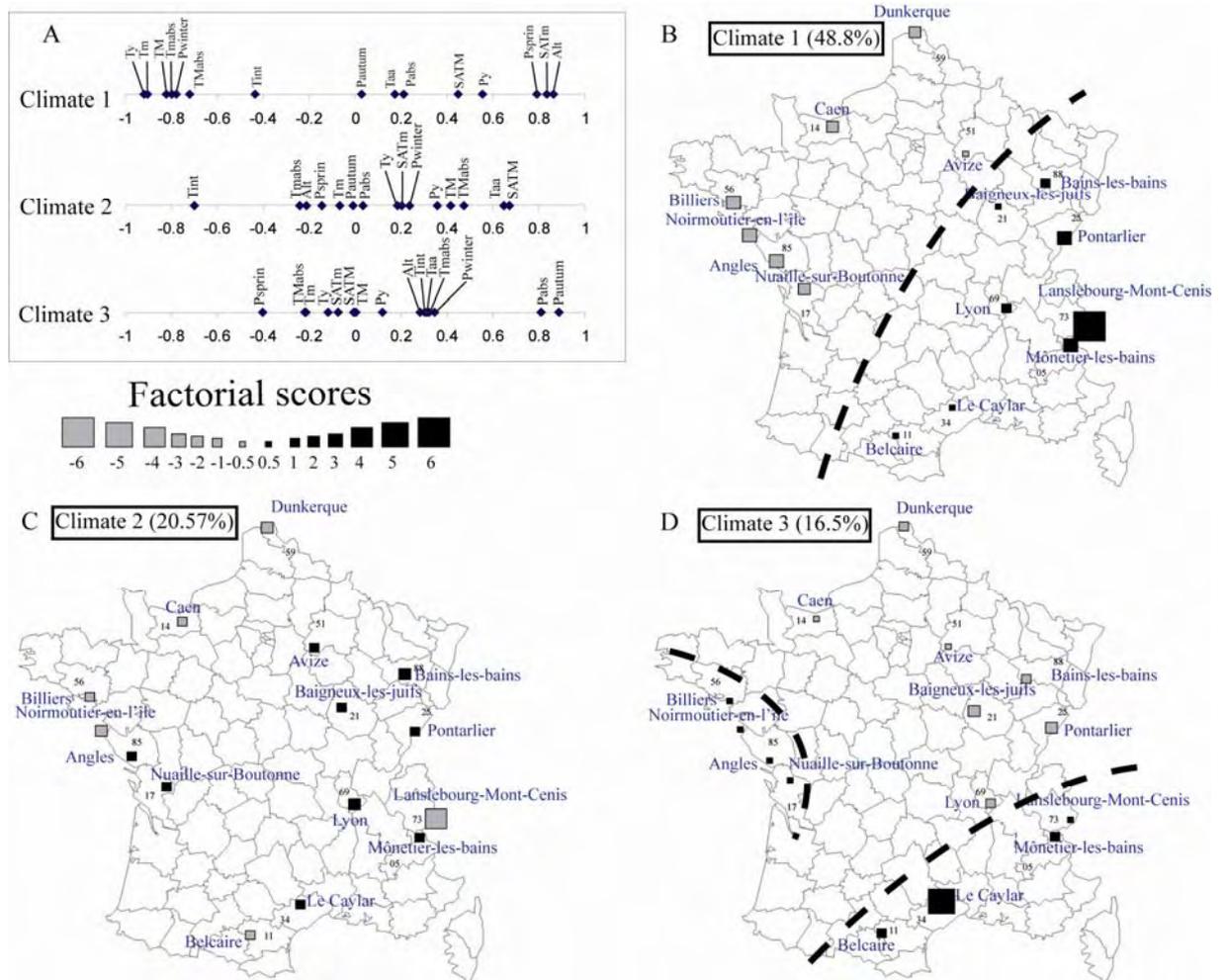


Figure 4: Three first PCA axes on climatic parameters and indices. A: Projection of the variables scores on the three axes. B-D: Geographical maps of the population scores on the three axes. Black squares: positive correlation score values. White squares: negative correlation score values. Dashed black lines limit the clear positive zones on the first and third axes.

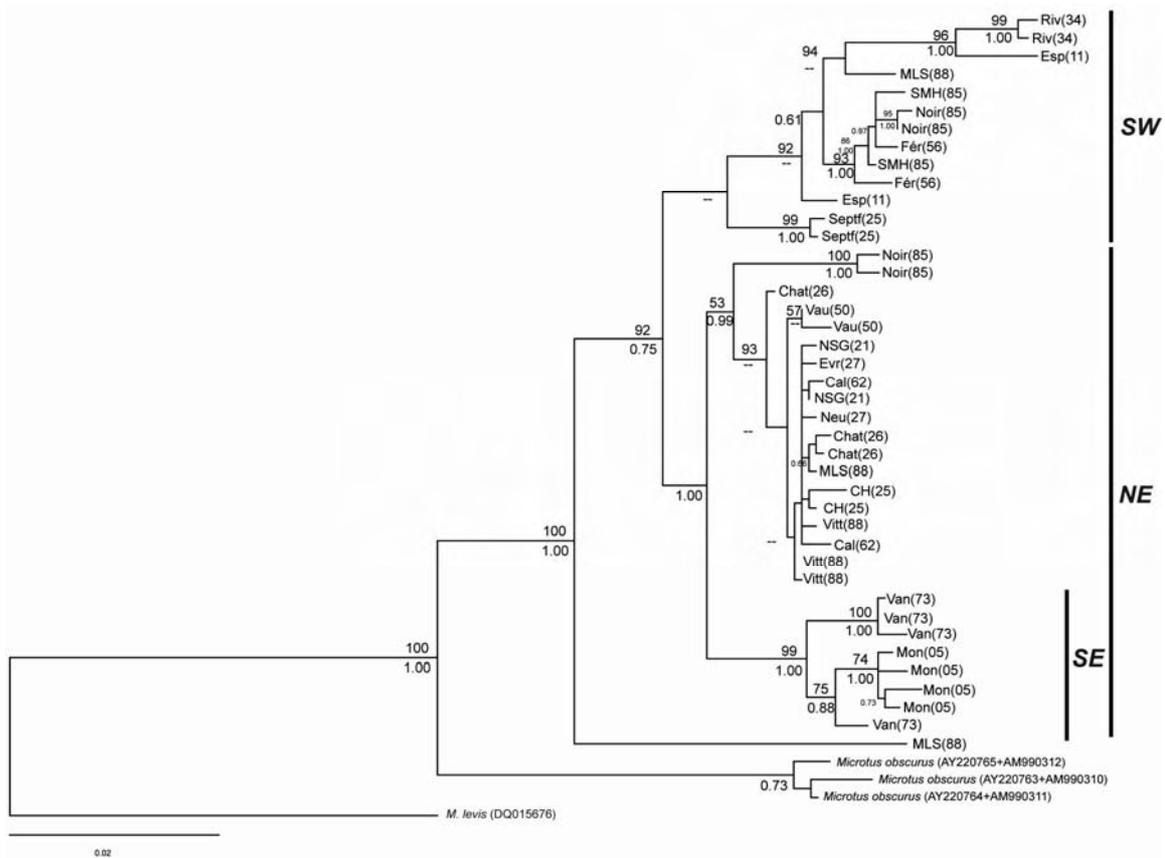


Figure 5: Maximum-likelihood tree reconstructed from concatenated cytochrome b gene and control region sequences of *M. arvalis*. The *Microtus obscurus* outgroup corresponds to concatenated sequences from China and Russia specimens. Numbers at nodes refer to ML bootstrap percentages $\geq 50\%$ (below branches). Dashes indicate non-existing nodes in Bayesian approach. Population labels are detailed in Table1. Clusters are indicated by solid black lines on the right.

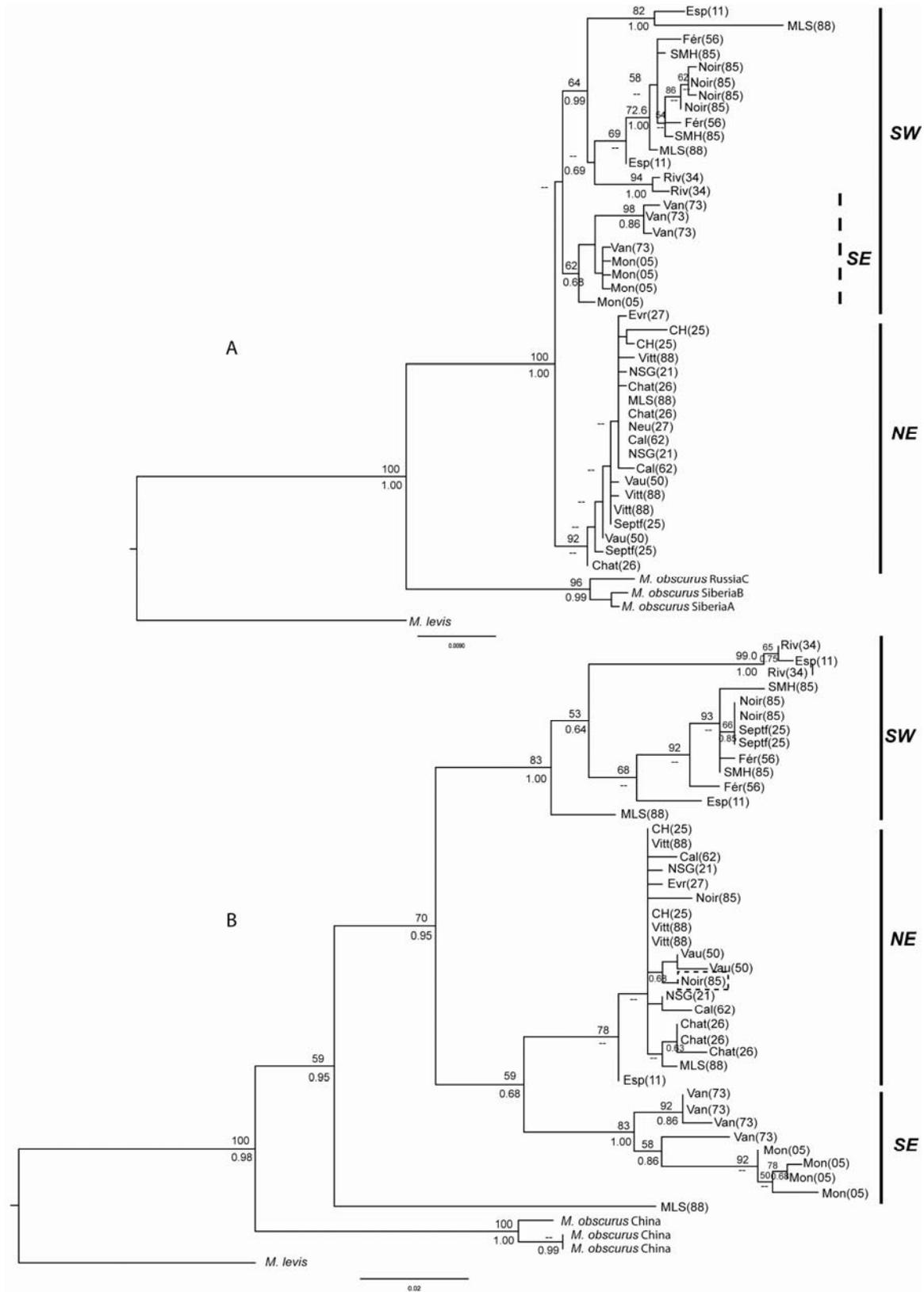


Figure 1 SI: A, B: Maximum-likelihood tree reconstructed from cytochrome b (A) and control region (B) gene sequences of *M. arvalis*. Numbers at nodes refer to ML bootstrap percentages $\geq 50\%$ (A) or Bayesian posterior probabilities (B) below branches. Dashes indicate non-existing nodes in ML (A) or BA (B). Population labels are detailed in Table 1. Clusters are indicated by solid black lines on the right. Sub-cluster is indicated by dashed black line.

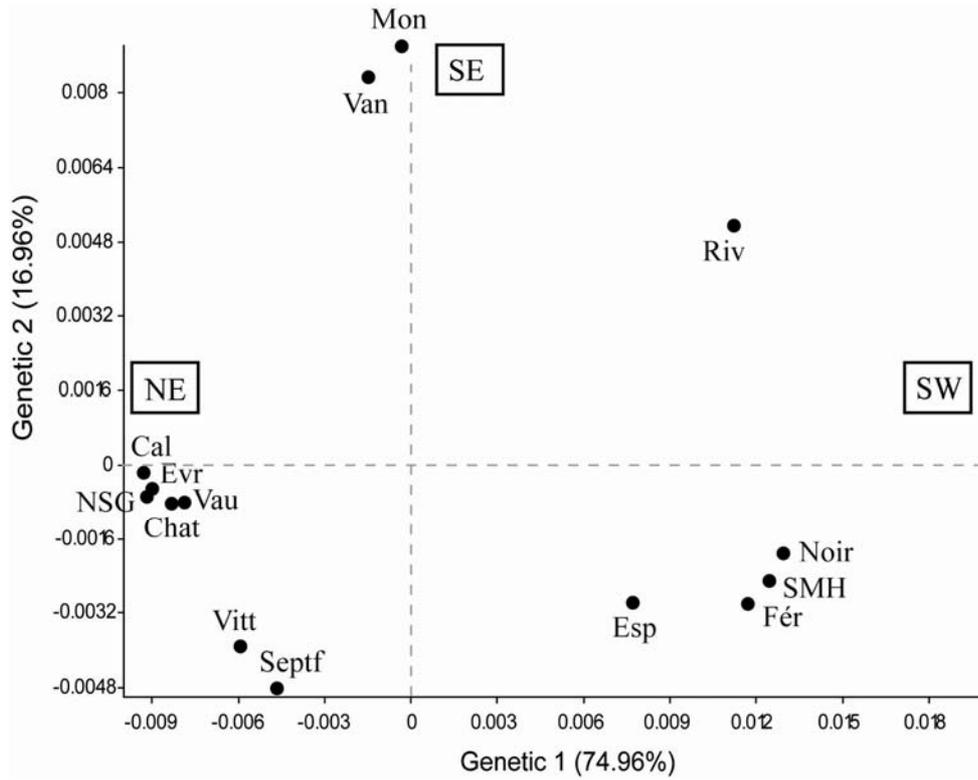


Figure 6: Two first axes of principal coordinates analysis on the genetic distance matrix obtained from 17 French populations of *M. arvalis*. The location labels are detailed in Table 1. The cluster names are identical to the phylogenetic reconstruction (rectangles).

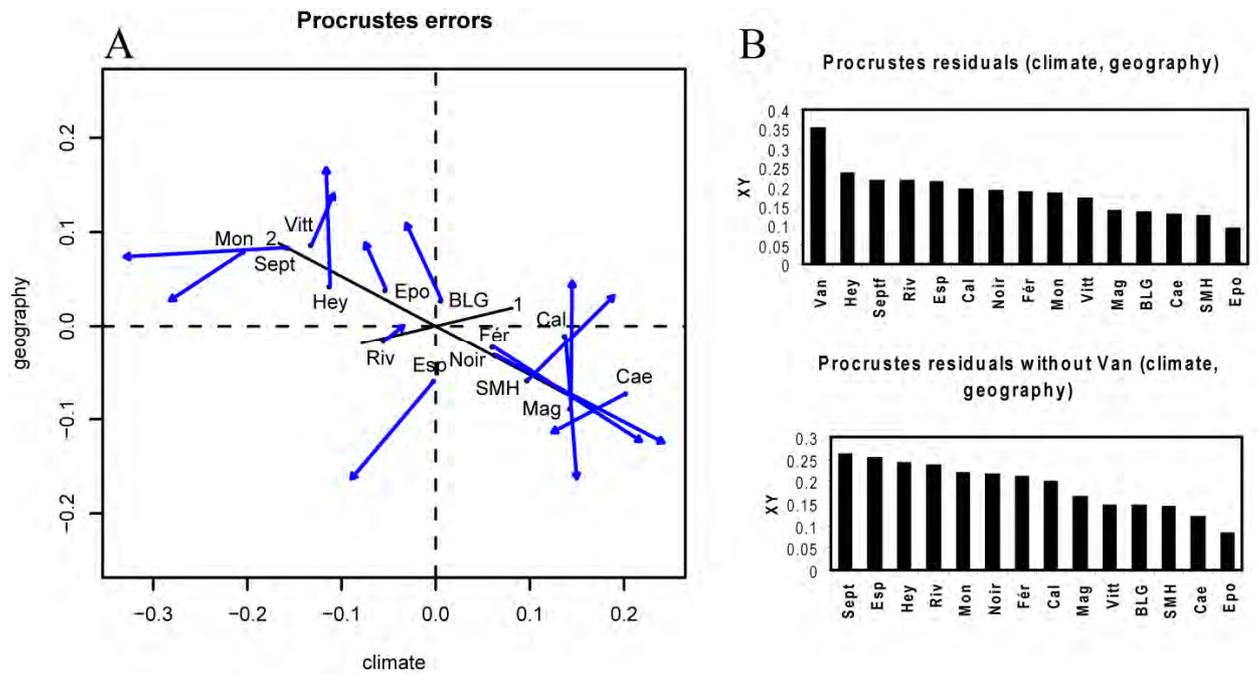


Figure 7: PROTEST correlation diagrams. A. Procrustes error plot between climatic and geographical matrices. Points: reference matrix. Arrow heads: target matrix. Black lines and number associated: Procrustes dimensions of the correlation results. B. The histograms illustrate the oversized dat effect (high Procrustes residual values) on the Procrustes residual distribution.

III. Complément de discussion à la PUBLICATION 1

Dans cette étude réalisée à partir de populations actuelles, nous avons pu démontrer, d'une part, que la forme dentaire était fortement reliée au climat mais pas la taille (c'est-à-dire le poids corporel ici) et, d'autre part, que la structure génétique des populations chez *M. arvalis* en France est dépendante de son histoire phylogéographique et de la distance entre les populations structurée par le climat. Cependant ces résultats sont dépendants de l'échelle taxonomique à laquelle on étudie ces relations. En effet, il semblerait qu'au niveau intraspécifique ce soit le climat qui joue sur les variations de la morphologie dentaire, alors qu'au niveau interspécifique, les patrons dentaires reflèteraient plutôt la phylogénie des espèces.

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ces différences d'interprétation. Premièrement, si des méthodes de corrélation différentes sont employées (test de Mantel ou PROTEST) les résultats peuvent changer. Deuxièmement, selon le modèle d'étude utilisé, les réponses phénotypiques peuvent varier.

Hypothèse 1 : Différence de méthode

La méthode PROTEST, basée sur les statistiques Procrustes, permet de comparer les associations de matrice de données multivariées (morphologiques, génétiques, géographiques etc., Jackson, 1995; Peres-Neto et Jackson, 2001). C'est la méthode que nous avons utilisée dans la PUBLICATION 1. Une autre méthode, le test de Mantel, teste l'association entre des matrices de distance (Peres-Neto et Jackson, 2001). Cette méthode a été utilisée par exemple chez les murinés (Renaud, 1999). Enfin, la méthode « path » permet de partitionner la variance des variables dépendantes parmi les différentes variables prédictives qui ne sont, elles-mêmes, pas indépendantes (voir dans Caumul et Polly, 2005). Cette méthode se rapproche de la régression multiple ou des moindres carrés partiels en deux blocs (Rohlf et Corti, 2000), à ceci près qu'elle permet de prendre en compte les interactions entre les variables.

Une étude comparative entre les méthodes PROTEST et le test de Mantel a été menée par Peres-Neto et Jackson (2001). Il résulte de leur étude que le test de Mantel présente un pouvoir inférieur à l'analyse PROTEST pour détecter les associations de matrice. De plus, le test de Mantel fait plus d'erreur de type I (rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie) que l'analyse PROTEST. Par conséquent, si deux interprétations

différentes résultent d'une différence de méthodologie entre les analyses PROTEST et le test de Mantel, il est probable que l'erreur puisse venir du test de Mantel.

Hypothèse 2 : Différence de modèle

Renaud (1999) a caractérisé les corrélations entre les distances morphologiques et géographiques chez le genre murin *Oenomys*. Les conclusions majeures de cette étude ont été que les variations de la forme dentaire chez ce genre (interspécifique) semblaient plus reliées à la phylogénie, alors que les variations de taille entre groupe (intraspécifique) devaient être reliées aux gradients climatiques. Ces interprétations sont en accord avec les conclusions exposées dans la PUBLICATION 1.

Caumul et Polly (2005) ont recherché les composantes environnementales dans la variation morphologique chez le genre *Marmota*. Ils ont démontré que malgré le pouvoir résolutif de reconstruction phylogénétique des molaires (ce que nous n'avons pas testé), la divergence de l'ADN mitochondrial (cytochrome *b*) explique peu la variance des molaires (5%). De plus, Caumul et Polly (2005) ont montré que sur les molaires, les proportions de variations intraspécifiques étaient plus importantes que les variations interspécifiques.

Par conséquent, l'étude des relations climatiques et phylogénétiques à partir des molaires nécessite un grand jeu de données. Cependant, le type de caractère morphologique étudié (molaire, crâne, mandibule, os longs etc.), va pouvoir changer les interprétations en fonction de la morpho-fonctionnalité et des contraintes du développement de ce caractère (Caumul et Polly, 2005).

Ainsi, il est difficile d'émettre des affirmations quant à la généralisation des résultats que nous avons obtenus. Il résulte cependant que les résultats des corrélations qui ont été réalisés par la méthode PROTEST sont valides. Par conséquent, les interprétations des différences de relation au climat et à la phylogénie en fonction du niveau taxinomique est applicable uniquement chez certaines espèces ou certains genres.

Nous pouvons confirmer qu'il existe bien une relation entre phénotype et environnement cependant, nous ne sommes pas en mesure de déterminer précisément quel paramètre climatique est le plus impliqué dans cette relation. Il semblerait que les effets d'altitude et de température soient des paramètres non négligeables, mais ils n'expriment que 18% et 10% respectivement de la variance totale de la forme. De plus,

le paramètre de précipitation n'explique en rien la structuration de la forme chez cette espèce à l'échelle de la France, à l'inverse de ce qu'avait montré Navarro (2004) dans le fossile.

Par conséquent, même en étudiant précisément les relations qui existent entre phénotype-environnement et génétique-environnement dans l'actuel, il est difficile d'affirmer ou d'infirmer les hypothèses qui ont été émises dans le fossile chez cette espèce. Le signal de température, qui semblerait le plus aisé à obtenir dans le fossile, explique peu les variations de forme, et les variations de précipitation n'expliquent pas les modifications majeures de la morphologie dentaire.

Il faut noter que, dans notre étude, comme dans celle de Navarro (2004), nous avons obtenus des résultats de l'ordre de la corrélation entre les différents paramètres testés. Cette étape est fondamentale dans l'établissement des paramètres qui peuvent influencer la forme. Il est nécessaire ensuite, de rendre compte des mécanismes impliqués dans ces relations.

En ce qui concerne la relation phénotype-climat dans notre étude, cette relation est forte et significative. La première relation à laquelle nous pourrions penser est l'influence du climat sur la végétation et donc sur la morphologie dentaire. Comme nous l'avons vu dans les résultats et la discussion de la PUBLICATION 1, il ne semble pas y avoir de relation évidente et significative entre les patrons de variation de la morphologie dentaire et le type de végétation. La plupart des populations de *M. arvalis* étudiées vivaient dans des zones de prairies très largement anthropisées et avec des types de végétation relativement similaires. Seules deux populations provenaient de la haute montagne, c'est-à-dire sans impact « anthropique » fort sur la végétation. Cependant, ces deux populations ne se distinguent pas significativement des autres au niveau de la morphologie dentaire.

Même si nous sommes en mesure de mettre en évidence une relation entre la morphologie dentaire et le type de végétation chez cette espèce, ces variations seraient faibles et joueraient sur l'hypsodontie ainsi que sur la forme elle-même de la surface occlusale. Comme le stipulent Renaud et Michaux (2007), après éruption des dents au cours du développement, seulement la fonction d'usure peut changer la morphologie des cuspidés dentaires chez les rongeurs (Renaud, 2007). Comme pour les ongulés (MacFadden, 2000), les phytolithes¹⁰ des plantes graminées usent la surface occlusale

¹⁰ Phytolithe : corps microscopiques de silice à l'intérieur des plantes. Cette silice est une opale d'origine végétale.

dentaire et jouent sur le système masticateur. C'est le principe de la résistance de l'émail des molaires sur des graines dures (Lucas *et al.*, 2008). Cependant, cette usure de l'émail par les phytolithes est encore débattue. Sanson *et al.* (2007) remettent en cause l'usure de l'émail des molaires par les phytolithes des plantes car la dureté de ces phytolithes serait inférieure à celle de l'émail (Sanson *et al.*, 2007). Ils ont démontré cette hypothèse sur des dents de mouton, mais elle reste controversée, voire réfutée (G. Merceron comm. pers.). Pour ces auteurs, la nature du sol constituerait un agent d'usure plus performant. Pour une espèce qui creuse des terriers comme *M. arvalis* cette question est d'autant plus pertinente.

De plus, la compétition pourrait jouer sur la taille des individus à cause de la disponibilité de la nourriture chez cette espèce en France. A l'échelle temporelle et sur des communautés fauniques, Alroy *et al.* (2000) ont démontré que l'évolution des mammifères, pendant le Paléocène jusqu'au Pléistocène, est mieux expliquée par des facteurs intrinsèques tels que la compétition que par les changements climatiques eux-mêmes (Alroy *et al.*, 2000). Cependant, les échelles taxonomique et temporelle ne sont pas les mêmes que notre étude dans l'actuel.

IV. Conclusion et Perspectives

Par conséquent, les seuls mécanismes qui peuvent être évoqués pour expliquer l'influence du climat sur la morphologie dentaire sont : 1) le stress environnemental entraîne différentes contraintes sur la réponse morphologique aux variations morphofonctionnelles ou 2) les changements climatiques interagissent à l'échelle de l'individu sur le développement dentaire lui-même en influençant les gènes de régulation du développement dentaire, et par conséquent, l'équilibre des molécules signalisantes. Cette question est largement abordée par Navarro (2004).

Seule une étude développementale directe sur l'influence des paramètres climatiques et la mise en place des molaires permettrait de répondre à cette question mécanistique de façon précise. Cependant, il est possible d'aborder les mécanismes impliqués dans la variabilité du patron dentaire par l'étude du développement au cours du temps. Aujourd'hui, la connaissance croissante du développement dentaire (évo-dévo ; cf. Chapitre II), ainsi que des méthodes caractérisant le phénotype, permettent d'étudier le développement et son évolution uniquement à partir de la caractérisation des relations d'intégration du phénotype (modularité ; cf. Chapitre II). S'il est possible de mettre en

évidence les processus développementaux à partir du phénotype dentaire, alors une étude des variations phénotypiques fossiles permettrait de voir s'il y a des changements de mécanisme dans le temps et donc si ces changements sont à mettre en relation avec des événements climatiques notables ou non. Dans ce cas, les mécanismes reliant phénotype et environnement peuvent être compris au cours du temps et permettrait d'orienter les expérimentations sur les processus développementaux dans l'actuel.

Nous traiterons plus largement de cet aspect dans la deuxième partie. Premièrement, nous chercherons à savoir si, à travers l'étude de la modularité sur la forme de la rangée dentaire, nous retrouvons les processus du développement connus chez *M. arvalis*. Deuxièmement, nous testerons un modèle développemental basé sur les proportions de molaires, chez le modèle arvicoliné et au cours du temps. Ceci, afin de mieux caractériser précisément les relations entre phénotype (taille des molaires) et développement chez cette famille. De plus, nous traiterons de l'évolution du développement (évo-devo) et de ses conséquences sur la radiation des campagnols.

Chapitre II
Evolution du patron dentaire chez les
arvicolinés : Modularité et Evo-Devo

Chapitre II : Evolution du patron dentaire chez les arvicolinés : Modularité et Evo-Dévo

Comme évoqué dans le chapitre I, une question fondamentale en paléontologie réside dans l'étude de l'évolution du patron dentaire : quels sont les mécanismes qui interviennent dans la mise en place du patron dentaire, de ses variations et de son évolution ?

Si nous connaissons mieux les mécanismes développementaux qui interviennent dans la morphogenèse dentaire (ou odontogenèse), il nous sera possible de caractériser les interactions entre les facteurs internes (développement) et externes (environnement) dans l'évolution du phénotype dentaire. En paléontologie, l'étude du développement au cours du temps est une donnée assez difficilement appréhendable. Dans un premier temps, nous chercherons à savoir si la caractérisation des interactions morphologiques dentaires reflète les mécanismes du développement à travers l'étude de la modularité (PUBLICATION 2). Ensuite, nous étudierons plus précisément ce que nous connaissons des mécanismes du développement dentaire chez les mammifères et notamment chez le campagnol. Enfin, nous essaierons de caractériser l'évolution des mécanismes de développement chez les campagnols (PUBLICATION 3). Nous verrons alors les potentialités de ce type d'étude dans la compréhension de l'évolution du patron dentaire.

I. Intégration morphologique et modularité

Au niveau phénotypique, un des concepts permettant d'avoir accès aux processus développementaux est la modularité développementale (ex. Wagner et Altenberg, 1996; Bolker, 2000; Raff et Sly, 2000; Klingenberg *et al.*, 2001; Callebaut, 2005). La modularité se base sur le principe d'une organisation biologique (moléculaire, cellulaire et morphologique) en « parties », ou « unités », fortement intégrées au sein de l'organisme (ex. Lewontin, 1970; Wagner, 1996; Brandon, 1999; Schlosser, 2002; Eble, 2005). Ces unités sont robustes dans le temps (Raff, 1996; Schlosser, 2004), peuvent être répétitives (Raff, 1996) et sont « quasi indépendantes » les unes par rapport aux autres (Lewontin, 1970). C'est-à-dire qu'au sein des modules, les interactions sont fortes, alors qu'entre les modules, les interactions existent mais elles sont moins importantes. On dit alors des modules qu'ils sont semi-autonomes (von Dassow et Munro, 1999). La modularité est difficile à définir du fait de son application à différents niveaux de

l'organisation biologique. En effet, à chaque niveau biologique, il pourra être défini des modules plus intégrés que d'autres mais ne répondant pas nécessairement aux mêmes processus d'intégration (Bolker, 2000). De plus, les relations de causalité entre les entités à différents niveaux d'intégration peuvent évoluer (Bolker, 2000). Ainsi, l'organisation modulaire au sein d'un organisme est hiérarchique (ex. Raff, 1996 ; Klingenberg, 2005), tel un système « d'emboîtement » de modules (Figure II. 1) au sein duquel les processus d'intégration peuvent évoluer dans le temps.

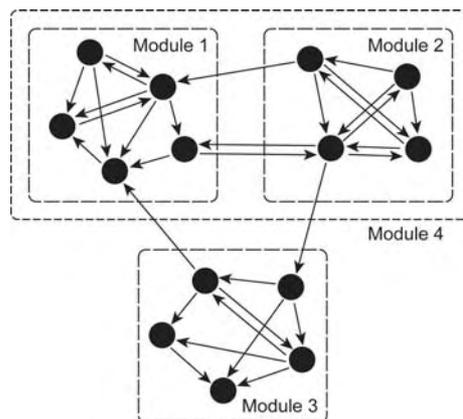


Figure II. 1 : Schéma théorique de quatre modules. Les flèches représentent les interactions entre les caractères morphologiques (ronds noirs). Le module 4 est constitué des modules 1 et 2 (Klingenberg, 2005).

Il existe différentes définitions de la modularité en fonction du niveau d'intégration auquel on s'intéresse. Cependant, toutes ces définitions sont reliées entre elles. La modularité morphologique est la plus intuitive des modularités. En effet, les modules morphologiques sont des parties ou caractères décomposés au sein d'un tout cohérent. De façon descriptive, les modules morphologiques sont des objets définis en termes de géométrie, de topologie et de covariations de traits morphologiques (Eble, 2005). Par exemple, les organes peuvent constituer différents modules morphologiques (cœur, poumon, foie, dent etc.). Cependant, l'organisation en modules morphologiques dépend de la fonction et de l'indépendance des voies développementales qui les génèrent (Schlosser, 2002; Klingenberg, 2005; Young et Badyaev, 2006). Ainsi, les modules fonctionnels et développementaux ont été mis en évidence (Klingenberg, 2005). Les modules fonctionnels sont des unités indépendantes d'un organisme dans la régulation physiologique (ex. unités biochimiques ou parties isolées d'un réseau métabolique, Wagner *et al.*, 2005). Ils sont souvent dépendants du contexte ou de l'environnement dans lequel ils se forment (Young et Badyaev, 2006). Les modules développementaux sont, eux, définis comme des parties de l'embryon ou d'une structure complexe

partageant des voies développementales communes, indépendamment du contexte dans lequel ils ont lieu (ex. bourgeon de membre, germe dentaire, Wagner *et al.*, 2005; Young et Badyaev, 2006). Ces deux types de modules sont fortement reliés l'un à l'autre car ils caractérisent les relations d'intégration qui existent entre les effets du génotype sur les caractères phénotypiques : la carte génotype-phénotype (Wagner, 1996). Les caractères qui servent collectivement un rôle fonctionnel commun doivent être génétiquement intégrés et relativement indépendants du reste de l'organisme (Figure II.2, Wagner, 1996; Mezey *et al.*, 2000). Par conséquent, les notions de modularité développementale et fonctionnelle permettent d'explicitier les mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans l'évolution des unités du phénotype (Eble, 2005).

La notion de modularité développementale est celle qui va nous intéresser tout particulièrement. En effet, ce niveau de modularité permet de valider les modules morphologiques présumés en des modules de développement (Eble, 2005). Dans l'étude présentée dans la PUBLICATION 2, nous cherchons à caractériser les mécanismes du développement dentaire connus chez le campagnol, à partir de l'organisation phénotypique au sein des trois molaires. Cependant, la mise en évidence des modules morphologiques, reflétant les modules développementaux, nécessite de travailler à partir de méthodologies précises qui différencient sans ambiguïté les covariations morphologiques intra-modulaires et inter-modulaires (Marquez, 2008). De plus, il est nécessaire de s'assurer que les covariations inter- ou intra-modulaires sont effectivement le reflet de processus développementaux sous-jacents.

L'idée centrale de l'approche modulaire de Klingenberg (2005) est que, si les traits d'un organisme sont intégrés (inclus dans le même module), leur variation morphologique doit être coordonnée – c'est-à-dire que les traits morphologiques doivent être covariants (cf. Publication 2, Klingenberg, 2007). La méthode développée par Klingenberg (2007 ; PUBLICATION 2) permet de différencier statistiquement les interactions intra-modulaires des interactions inter-modulaires au niveau phénotypique. De plus, cette méthode se base sur le principe que les covariations entre traits morphologiques sont le résultat de deux mécanismes de variation au cours du développement, complémentaires l'un de l'autre : les interactions directes et les variations parallèles (Figure II. 3).

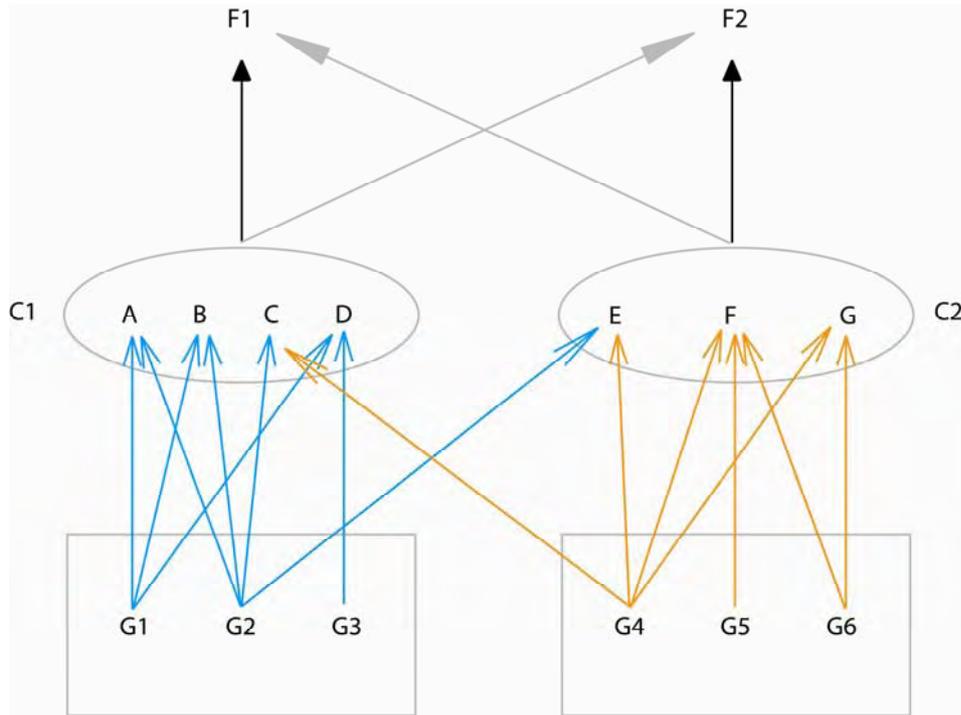


Figure II. 2 : Schéma théorique de la modularité de la carte génotype-phénotype. Deux caractères complexes C1 et C2, composés des traits de caractères A à G, servent principalement à deux fonctions F1 et F2. Deux modules génétiques sont à l'origine de ces modules phénotypiques, composés des gènes G1 à G6. Il existe plus d'effets pléiotropiques au sein de chaque module qu'entre deux modules (flèches bleues et oranges) entraînant peu d'effets de C1 sur F2 et de C2 sur F1. (D'après Wagner et Altenberg, 1996).

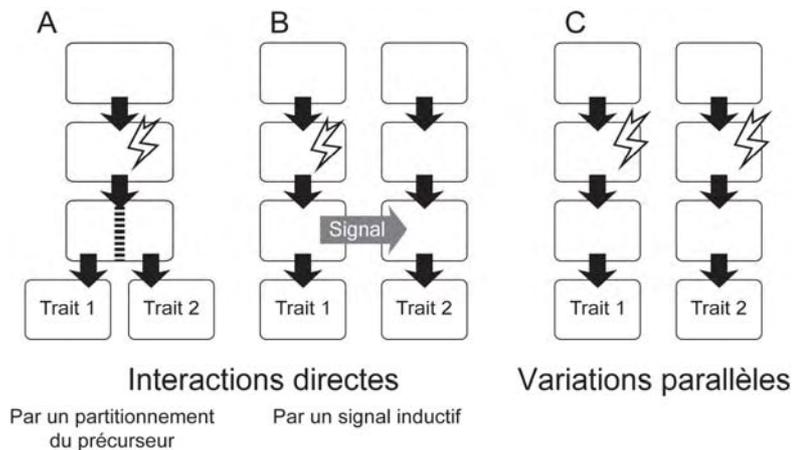


Figure II. 3 : Schéma théorique des processus développementaux responsables des covariations entre caractères. Les séries de carrés représentent les voies développementales (à l'origine des caractères) composées de plusieurs étapes. L'éclair représente une source de variation : en A et en B la variation se produit dans une voie développementale et est transmise à plusieurs voies. En C la même variation se produit sur des voies différentes. (D'après Klingenberg, 2005).

Les variations parallèles se mettent en place entre des voies développementales différentes, qui sont affectées simultanément par des facteurs externes génétiques ou environnementaux (Figure II. 3). La covariation des traits morphologiques résultante ne sera alors pas issue de contraintes développementales intrinsèques, mais du même facteur externe jouant sur des voies développementales différentes. Les sources possibles de

variation engendrée par les facteurs environnementaux peuvent être les changements de température ou bien de nutrition. La pléiotropie des gènes peut également être une source de variation affectant des voies développementales multiples (Klingenberg, 2005). A l'inverse, les interactions directes se mettent en place entre des traits dont les voies développementales sont liées (ex. partitionnement de tissus ou voies de signaux inductifs, Figure II. 3). Les interactions directes sont celles qui révèlent les contraintes du développement sur les covariations au sein du phénotype. Par conséquent, à l'intérieur d'un module, les covariations entre les traits morphologiques vont principalement être maintenues par des interactions directes. Ces covariations vont donc refléter les interactions développementales sous-jacentes.

II. Développement du patron dentaire chez les mammifères

La forme du patron dentaire chez les mammifères est très variable. Cette variation peut être engendrée par une réponse phénotypique aux changements de l'environnement (West-Eberhard, 2003) ou bien encore par un stress environnemental jouant sur les voies développementales (Keller *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2008). Ici, il est question principalement de l'influence du développement dans l'élaboration du phénotype (le patron dentaire). Ainsi, il sera possible de s'interroger sur la caractérisation des processus développementaux à partir du phénotype dentaire et valider les hypothèses modulaires.

La plupart des travaux actuels sur le développement se focalisent sur les dents. En effet, elles constituent un modèle majeur dans le champ disciplinaire de l'évo-dévo. Elles permettent de connecter les stratégies moléculaires qui contrôlent les organes durant le développement et l'évolution morphologique (Line, 2003). La compréhension des mécanismes impliqués dans la morphogenèse dentaire permettrait alors d'expliquer les patrons de variation de la forme des dents actuelles et fossiles, mais aussi leur taille et leur nombre.

Différentes théories existent pour expliquer la mise en place des dents le long de la rangée dentaire au cours du développement. Les deux plus anciennes sont celles de Butler (Figure II. 4, 1939) la théorie des champs, et d'Osborn (Figure II. 5, 1978) ; le modèle de clone. La théorie des champs explique le patron des différentes classes dentaires (incisives, canines, prémolaires et molaires) par des gradients chimiques

exogènes de champs morphogénétiques, régionalisés le long de la lamine dentaire¹¹ (Figure II. 4). Le modèle de clone propose que les dents d'une classe donnée résultent d'un primordium¹² dentaire de l'ectomésenchyme. Ce « clone » prolifère en migrant postérieurement ou antérieurement, donnant naissance aux dents décidues ou permanentes, respectivement. Dans ce modèle le temps est primordial dans la formation des dents, car elles sont directement liées à la croissance continue de la mandibule. Aucune de ces théories n'expliquent la totalité des variations observées dans le développement dentaire. Cependant elles servent de socle important dans l'élaboration de nouvelles théories à ce sujet (Boughner et Hallgrímsson, 2008).

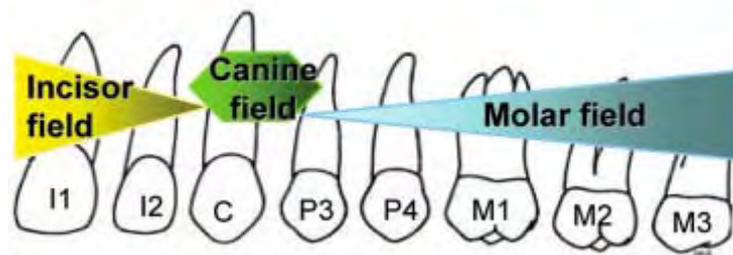


Figure II. 4 : Théorie des champs de Butler pour une dentition permanente. Chaque classe dentaire est spécifiée par un champ morphogénétique. La morphologie des dents varie en fonction du type de morphogène et de l'intensité du gradient. I. incisive ; C. canine ; P. prémolaire ; M. molaire. (D'après Boughner et Hallgrímsson, 2008).

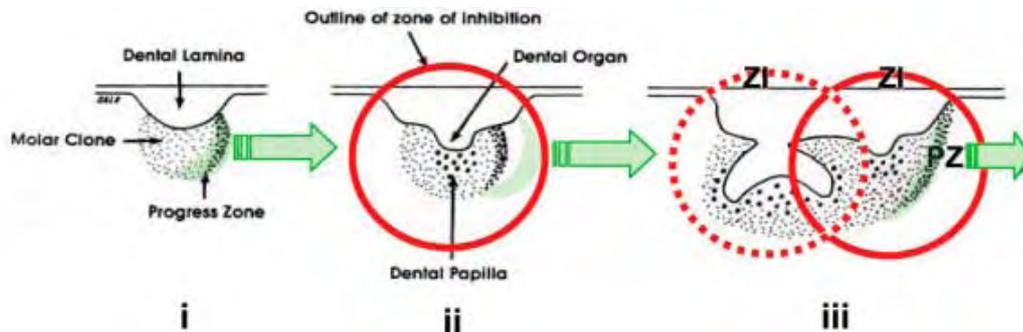


Figure II. 5 : Modèle de Clone d'Osborn se rapportant aux mammifères. (i) Le clone de molaire induit la formation du germe dentaire dans la lamine dentaire. Le germe et la lamine dentaire croissent à reculons vers leurs bords postérieurs via la zone de progression (PZ). (ii) Une zone d'inhibition (ZI) entoure le bourgeon dentaire en cours de développement et inhibe l'initiation des germes supplémentaires. (iii) Comme le PZ du clone excède le ZI, le germe suivant est initié. (D'après Boughner et Hallgrímsson, 2008).

Il existe différentes façons de caractériser la morphogenèse dentaire. Les premiers travaux se sont basés sur la description histologique des tissus (pour une revue voir Nadiri, 2005), puis sur la caractérisation des gènes et des molécules impliqués dans le

¹¹ Lamine dentaire : bande élargie de tissus épithéliaux. C'est la première phase du développement dentaire.

¹² Primordium : ébauche d'organe (ici la dent) qui aboutit à la formation de l'organe.

développement dentaire (Peters et Balling, 1999; Tucker et Sharpe, 2004) et enfin sur la mise en place de modèles développementaux traduisant les mécanismes du développement dentaire : réseaux de gènes, modèle de réaction diffusion, modèles morphostatique et morphodynamique (pour une revue voir Salazar-Ciudad *et al.*, 2000; Solé *et al.*, 2000; Salazar-Ciudad *et al.*, 2003; Salazar-Ciudad et Jernvall, 2004; pour une revue voir Plikus *et al.*, 2005).

II.1 Histologie de la mise en place des dents

Les travaux de l'histologie montrent que les dents se mettent en place au sein de territoires spécifiques définis dans l'épithélium oral (provenant de l'ectoderme) et le mésenchyme (provenant de la crête neurale crânienne) sous-jacent (Tucker et Sharpe, 2004; Nadiri, 2005). Il existe quatre stades fondamentaux impliqués dans la morphogenèse dentaire : la lamine (ou lame) dentaire, le bourgeonnement, le stade capuchon (ou couronne) et le stade cloche (Figure II. 6). Au stade cloche, il existe une différenciation cellulaire des odontoblastes et des améloblastes (Nadiri, 2005). Les odontoblastes sécrètent les constituants de la prédentine-dentine (Figure II. 6). Les améloblastes sécrètent l'émail et le début de la formation des racines (Figure II. 6). Les molécules de la matrice extracellulaire sont impliquées dans la minéralisation des tissus calcifiés. Une cascade de réactions de minéralisation règle la formation du minéral dentaire à travers des étapes thermodynamiques instables jusqu'à la transformation en hydroxyapatite thermodynamiquement stable. Les amélogénines sont très exprimées par les améloblastes pendant la formation de l'émail. Les amélogénines sont non seulement impliquées dans la formation de l'émail et de la dentine, mais aussi fonctionnent comme des molécules signalisantes dans la matrice extracellulaire (Goldberg et Smith, 2004).

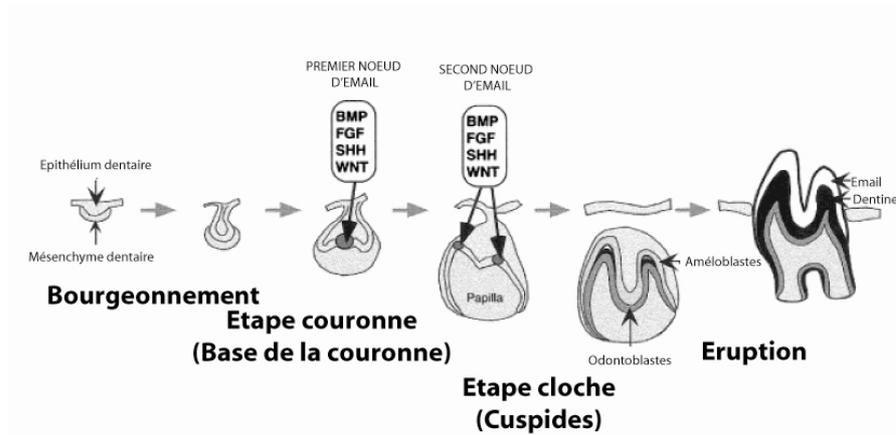


Figure II. 6: Représentation schématique des différentes étapes du développement dentaire. Il est à noter que les mêmes ensembles de gènes signalisant du développement sont impliqués de façon répétée pendant le développement. Bmp. Bone morphogenetic protein; Fgf. Fibroblast growth factor; Shh. Sonic hedgehog; Wnt. Wingless-integrated. (D'après Jernvall et Jung, 2000).

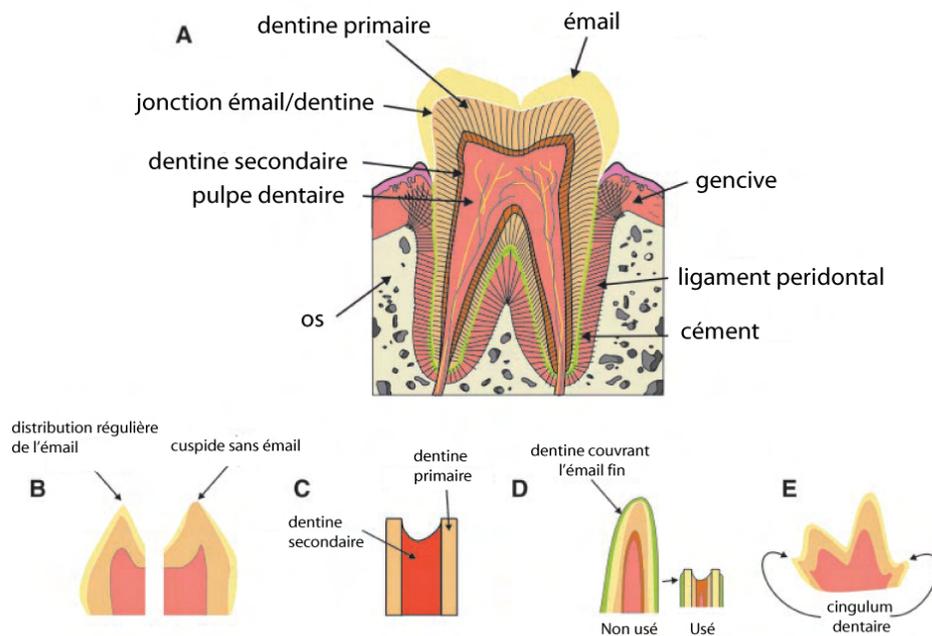


Figure II. 7 : Vues schématiques de la variation structurelle de l'émail dentaire chez les mammifères. A. Structure d'une dent humaine moderne récemment en fonction. L'émail n'est pas distribué de façon homogène le long de la couronne dentaire (contrairement aux rongeurs). La dentine primaire est un élément sur lequel l'émail reste. La dentine secondaire se forme après l'éruption dentaire. Elle continue de se former tout au long de la vie de la dent. B. Beaucoup de mammifères ont un émail recouvrant toute la couronne dentaire. Cependant, certains rongeurs ont des extrémités de cuspide sans émail. Ceci indique que le contrôle local de la disposition des tissus est possible. C. Les paresseux n'ont pas d'émail. Ils produisent des surfaces complexes via une dentine tubulaire (typique des mammifères) qui entoure une dentine plus souple. D. Le cément recouvre la couronne dentaire chez quelques herbivores à haute-couronne (hypsodontie) comme les chevaux ou les campagnols. Il aide la dentine à supporter les crêtes de l'émail. E. Le cingulum est une excroissance de la couronne dentaire présent chez beaucoup de mammifères. Il n'est pas en contact avec la nourriture. (D'après Lucas, 2008).

II.2 Implication des gènes du développement dans la morphogenèse dentaire

Le développement dentaire est un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs gènes et molécules qui déterminent la différenciation des « zones » dentaires (Tucker et Sharpe, 2004) ainsi qu'aurait pu le définir Butler en 1979. Ces gènes peuvent être de régulation ou de transcription (pour une revue des principaux gènes voir Peters et Balling, 1999; Tucker et Sharpe, 2004) et s'expriment soit dans le mésenchyme, soit dans l'épithélium au cours de la morphogenèse dentaire (Tucker et Sharpe, 2004). Cependant, des ensembles similaires de gènes, fonctionnant en réseau (Bmp, Bone morphogenetic protein ; Fgf, Fibroblast growth factor ; Shh, Sonic hedgehog et Wnt ; Wingless integration site ; Figure II. 7 et Figure II. 8), interviennent dans la mise en place des structures fondamentales du développement dentaire comme des modules de signalisation réitératifs (ex. Jernvall et Jung, 2000; Jernvall et Thesleff, 2000). Au cours de l'odontogenèse, un des modules réitératifs est la formation des nœuds d'émail. Ils représentent des éléments fondamentaux dans la détermination de l'emplacement des dents (premier nœud d'émail), puis des cuspides (deuxième nœud d'émail). Les nœuds d'émail se forment par condensation de cellules épithéliales non-prolifératives et constituent des centres de signalisation fugaces qui disparaissent par apoptose¹³ (Vaahtokari *et al.*, 1996; Jernvall *et al.*, 1998; Thesleff *et al.*, 2001). Les premiers nœuds d'émail agissent sur la taille, la disposition et la différenciation des dents dans le temps, tandis que les seconds nœuds d'émail interviennent dans la mise en place des cuspides (Figure II. 6). Ces nœuds d'émail résultent de l'interaction entre les cellules de l'épithélium et du mésenchyme.

II.3 Modèles morphogénétiques des cuspides et de la rangée dentaire.

II.3.1 Modèles morphogénétiques au sein des cuspides

Un modèle récent montre que la taille, le nombre et la disposition des cuspides résulteraient d'un phénomène morphodynamique de réaction-diffusion¹⁴ entre les molécules activatrices (ex. Bmp) et inhibitrices (ex. Fgf ou Shh) des cellules épithéliales et mésenchymateuses respectivement (Jernvall et Thesleff, 2000; Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002., 2004; Salazar-Ciudad, 2008). Ce modèle mécanistique a été proposé par

¹³ Apoptose ou mort cellulaire programmée : processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal.

¹⁴ Système de Réaction-Diffusion : modèles mathématiques qui décrivent comment la concentration d'une ou plusieurs substances distribuées dans l'espace change sous l'influence de deux processus : 1) les réactions chimiques locales dans lesquelles les substances sont converties entre-elles et 2) la diffusion qui cause la dispersion des substances dans l'espace.

Salazar-Ciudad et Jernvall (2002, Figure II. 8) pour définir la morphogenèse dentaire à partir de la combinaison spatiotemporelle des mécanismes inductifs (relation cellule-cellule, réseaux de gènes, Salazar-Ciudad *et al.*, 2003) et des mécanismes morphogénétiques (comportement des cellules : mitose directe, croissance différentielle, apoptose etc., Salazar-Ciudad *et al.*, 2003).

Dans ce modèle, c'est davantage le réseau de gènes, les interactions entre cellules et les mécanismes morphogénétiques, que l'influence des gènes individuellement, qui sont importants dans les modifications du patron dentaire et la disposition des cuspides. Le taux de croissance de l'épithélium est dépendant de la constance de ces cellules internes, moins la concentration des activateurs. Dans les zones où la concentration des molécules activatrices des cellules de l'épithélium dépasse une certaine limite, les cellules de l'épithélium se différencient de façon irréversible en des nœuds d'émail dont les cellules sont indivisibles (Figure II. 9A). Ces nœuds sécrètent en même temps des inhibiteurs à un taux égal à la concentration locale des activateurs. Cet inhibiteur contre l'effet de la sécrétion des activateurs et entraîne la croissance du mésenchyme (Figure II. 9A, B). Ce mécanisme définit le phénomène de réaction-diffusion au sein de la dent (Figure II. 9A, B). Ainsi, une partie de l'épithélium se ploie dans le mésenchyme, laissant les nœuds isolés aux sommets des cuspides en formation. Au même moment, la croissance du mésenchyme produit une expansion latérale localisée affectant la finesse des cuspides et leurs espacements (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2004; Salazar-Ciudad, 2008). Ce deuxième mécanisme définit le processus dynamique de la mise en place des cuspides au sein des dents (Figure II. 9). La Figure II. 7B représente l'ensemble du raisonnement et des résultats du modèle morphodynamique. Cette figure montre que les simulations reflètent la croissance de l'épithélium de l'émail interne au-dessus du mésenchyme, séparé par la membrane basale (ligne blanche en (d)). Sur les dents actuelles, les cellules de l'épithélium de l'émail interne se différencient en améloblastes (formant l'émail) et les cellules du mésenchyme sous-jacentes se différencient en odontoblastes (formant la dentine). Contrairement au modèle de réaction-diffusion classique, dans le modèle morphodynamique, les activateurs et inhibiteurs modulent la croissance tissulaire. Le fait d'engendrer le développement de la forme elle-même a une influence causale sur le placement des nouveaux nœuds d'émail. Par exemple, la formation d'une seconde cuspide dépend aussi de l'étroitesse relative des premières cuspides, parce que l'étroitesse modifie le volume des tissus mésenchymateux dans lesquels les molécules se diluent (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002).

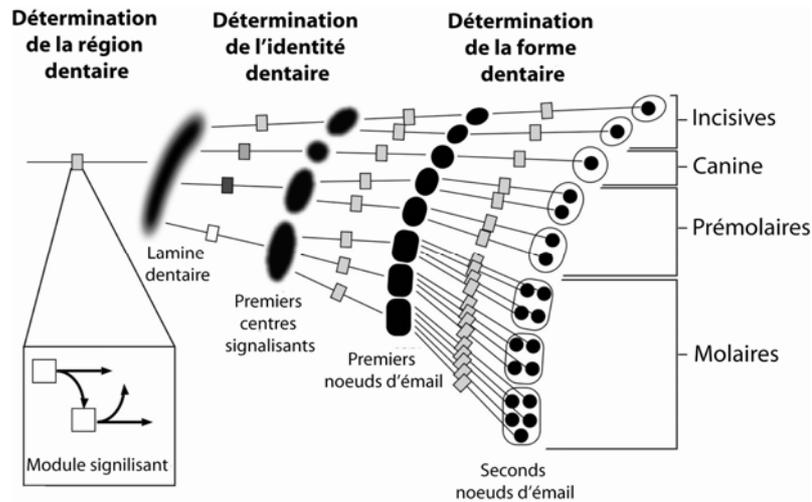
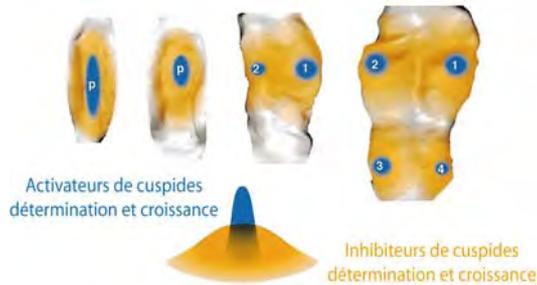


Figure II. 8 : Réitération successive des mêmes modules signalisants depuis l'initiation dentaire jusqu'à la formation des cuspidés. A chaque itération, la région dentaire est partitionnée en de nouveaux compartiments et progressivement un nombre plus grand de domaines signalisants sont induits. Les premiers partitionnements entraînent la formation de l'identité dentaire (incisive, canine, prémolaire, ou molaire) et peuvent être régulés par des différences dans les signalisations (représentées par des différences de teintes de gris dans les boîtes signalisantes) après la détermination de la lamine dentaire ou juste avant. (D'après Jernvall et Thesleff, 2000).

Cependant les mécanismes de réaction-diffusion ne permettent pas de produire des dents asymétriques dans leur axe antéro-postérieur ou bucco-lingual et les processus morphodynamiques n'ont pas encore été démontrés de façon précise expérimentalement (Salazar-Ciudad, 2008).

Le modèle de réaction diffusion sur les cuspidés permet de prédire que plus la couronne dentaire initiale est large, et plus les cuspidés pourront se mettre en place au sein de la dent. Le modèle morphodynamique permet, lui, de décrire la dynamique de mise en place des cuspidés au sein d'une dent et de prédire la disposition des cuspidés les uns par rapport aux autres. Cependant, ces modèles ne permettent pas de prédire le nombre et la taille des dents au sein de la rangée dentaire avec un mécanisme simple de développement.

A



B

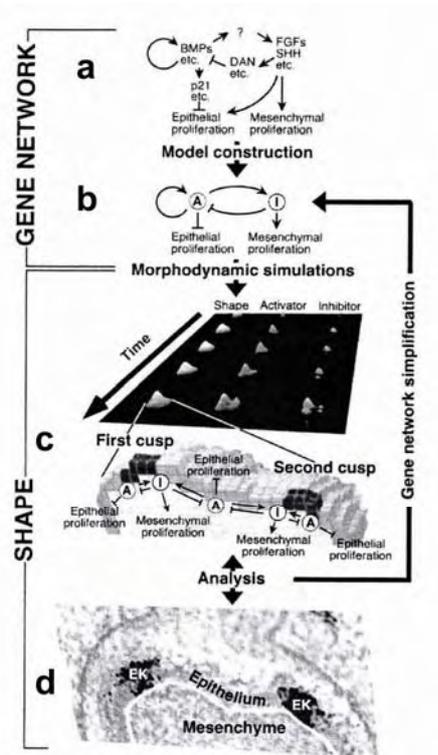


Figure II. 9 : A. Séquence de formation des cuspides sur la première molaire inférieure par réaction-diffusion (vue de dessus). Le premier nœud d'émail (p) établit la base de la couronne dentaire et régresse de façon apoptotique. Le premier pliement de l'épithélium est longitudinal autour du premier nœud d'émail et les pliements successifs se déroulent autour des deuxièmes nœuds d'émail. Les molécules signalisantes activatrices, telles Fgf4, se localisent uniquement dans la zone du nœud d'émail (bleu) et permettent leur initiation et leur croissance. Les inhibiteurs, tels que Bmp4, ont un domaine d'expression plus diffus dans le mésenchyme. Ils contrôlent la distance minimale entre les seconds nœuds d'émail adjacents et peuvent aussi réguler négativement la croissance dentaire (orange). (D'après Jernvall et Thesleff, 2000). B. Base des principes de l'approche du modèle morphodynamique du développement dentaire. (a) Le point de départ du modèle est dérivé empiriquement d'un réseau de gènes simplifié basé à la fois sur l'expérimentation et sur les données de l'expression spatiotemporelle des gènes. (b) Réseau de gènes final après plusieurs simplifications basées sur les simulations et les analyses. (c) Pour examiner si le réseau de gènes est suffisant pour approximer le développement de la forme dentaire, le modèle produit des formes en trois dimensions et des distributions de pics de concentration d'activateurs et d'inhibiteurs. (d) Les formes simulées sont analysées en les comparant aux données empiriques des formes de la dent en développement. (D'après Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002).

II.3.2 Modèles morphogénétiques de la rangée dentaire

A partir de la formule dentaire basique de 3.1.4.3/3.1.4.3, la perte des dents chez les mammifères est un phénomène commun au cours de leur évolution, alors que l'addition est plus rare (Viriot *et al.*, 2002; Peterkova *et al.*, 2005; Plikus *et al.*, 2005). Dans certains cas les dents sont complètement perdues (ex : les baleines). Dans d'autres,

seule une famille, ou une partie de famille dentaire, est perdue (ex. les incisives supérieures chez les cervidés, ou les canines, prémolaires et une incisive chez les souris et les campagnols, Plikus *et al.*, 2005). Chez les rongeurs, les dents perdues se développent en réalité pendant les premiers stades de la morphogenèse dentaire au stade bourgeon, mais régressent de façon apoptotique à la fin du stade de bourgeonnement (Keränen *et al.*, 1999). Cependant, il a été démontré chez des souris mutantes (souris Tabby) qu'il est possible de faire « germer » une prémolaire (l'équivalent de la P4) dans le diastème (Peterkova *et al.*, 2005). Les mécanismes génétiques expliquant cette régression sont en cours d'étude mais ne sont encore pas bien connus. Il semblerait que certains gènes impliqués dans le développement des molaires ne s'expriment pas (Keränen *et al.*, 1999), tandis que d'autres agissent par des rétroactions négatives sur la régulation des gènes, entraînant la répression de la croissance des bourgeons dentaires du diastème (Klein *et al.*, 2006).

Un modèle de développement simple, basé sur un raisonnement similaire à celui évoqué pour les cuspides (modèle dérivé d'un réseau d'activateurs et d'inhibiteurs), permet de prédire, non pas la formation des cuspides, mais la taille et le nombre de molaires au sein de la rangée dentaire chez les mammifères. Ce modèle s'appelle la cascade d'inhibition (CI, Kavanagh *et al.*, 2007). Au même titre que les mutations dans l'inhibition des nœuds d'émail peuvent entraîner la formation de nouvelles cuspides ou bien leur fusion (Kassai *et al.*, 2005), le modèle CI stipule que le développement de la première molaire doit inhiber le développement des molaires successives. Ce modèle s'inspire du modèle de clone d'Osborn lorsque celui-ci indique que le développement d'une dent peut inhiber le développement des autres dents.

Le CI modèle constitue une véritable avancée dans la compréhension et la prédiction du développement des molaires chez les mammifères. Non seulement le modèle CI se base sur une définition simple des relations entre les molaires (le réseau d'activateur-inhibiteur), mais il montre aussi que les rapports de taille de molaire répondent à ce modèle. Ce modèle simple des relations entre les molaires permet de relier les mécanismes du développement et les variations du phénotype (ici la taille des molaires). Pour tester l'hypothèse d'inhibition au sein de la rangée dentaire, Kavanagh *et al.* (2007) ont utilisé des germes dentaires en culture. Ils ont coupé la queue postérieure de la m1, qui va former la m2, pour tester le comportement développemental de la m2 sans influence de la m1 (Figure II. 10). Ils ont alors observé que la m2 apparaissait significativement beaucoup plus tôt et de plus grande taille lorsqu'elle est coupée de la

m1 (Figure II. 10). De plus, ils ont démontré que l'induction des activateurs mésenchymateux (Bmp4 et Activin β A) accélère significativement la formation de la m2 lorsqu'elle n'est pas séparée de la m1. Ainsi, ces auteurs ont pu montrer que le temps d'initiation des molaires postérieures dépend des molaires antérieures à travers un équilibre dynamique de l'inhibition inter-molaire et de l'activation mésenchymateuse. Cet équilibre dynamique entre inhibiteurs (i) et activateurs (a) est défini comme le rapport a/i (Kavanagh *et al.*, 2007 ; cf. PUBLICATION 3 pour la description mathématique de ce modèle). Kavanagh *et al.* (2007) soulignent que les changements du rapport a/i produisent des modifications dans les proportions de molaires et conduisent à des phénotypes dentaires différents entre m1, m2 et m3. Lorsque le rapport a/i est faible, la m1 est plus grande que les autres molaires. A l'inverse, lorsque ce rapport est fort, les dents sont de tailles égales. A l'extrême, si le rapport a/i est supérieur à 1.0, les molaires postérieures sont plus grandes que la première molaire.

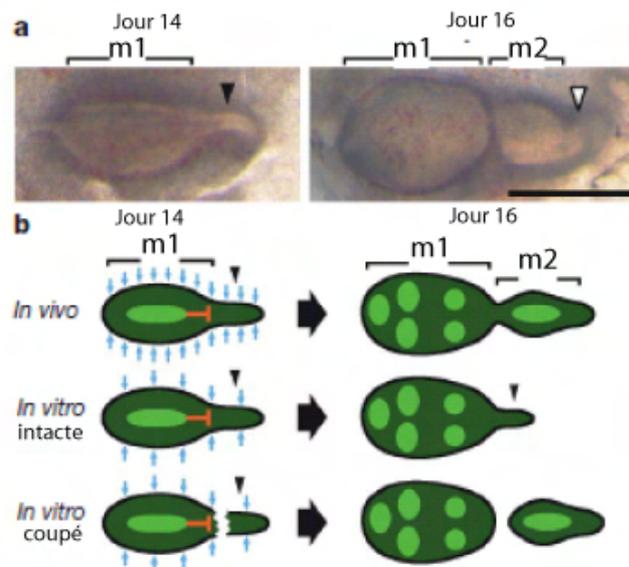


Figure II. 10 : Démonstration expérimentale de l'initiation séquentielle et l'inhibition des molaires chez la souris. a. Les molaires des souris se développent de façon séquentielle et la lamine dentaire s'étend postérieurement (tête de flèche noire), depuis le développement de la m1 qui donnera la m2 au jour 16. La m3 (tête de flèche blanche) se forme postérieurement à la m2 dix jours après. b. En comparaison avec la situation *in vivo*, le développement de la m1 est normal *in vitro* et les nœuds d'émail secondaires se forment au jour 16 (vert clair). En revanche, l'initiation de la m2 est retardée *in vitro*. Ce retard est probablement dû à la décroissance mésenchymateuse qui sécrète les activateurs (flèches bleues), tandis que la m1 continue d'inhiber la m2 normalement. Pour tester cela, la m2 a été coupée à partir de la queue postérieure de la m1. La m2 se développe alors normalement. Echelle = 0.5 mm. (D'après Kavanagh *et al.* 2007).

Le modèle CI, basé sur un modèle dérivé de réseau d'activateurs et d'inhibiteurs, est un mécanisme relativement classique en biologie du développement. Cependant, les fondements génétiques exacts de ce type de modèle restent à identifier. Pour les dents, ce modèle résout les débats de longue date à propos de la régulation individuelle de

l'initiation des molaires et de leur taille. Ce modèle démontre le rôle essentiel que jouent les inhibiteurs dans les modifications de la forme du système dentaire complet.

III. Développement dentaire chez les campagnols

La plupart des travaux relatifs au développement dentaire chez les mammifères se sont focalisés sur le modèle murin (ex. Jernvall et Thesleff, 2000; Peterkova *et al.*, 2002; Viriot *et al.*, 2002; Line, 2003; Peterkova *et al.*, 2005; Obara et Lesot, 2007). En effet, le modèle murin constitue le modèle phare utilisé pour étudier et représenter les processus du développement dentaire chez les mammifères. Cependant ce modèle biologique ne peut pas représenter tous les patrons dentaires, ni chez les mammifères en général, ni chez les rongeurs en particulier.

Le modèle campagnol est pour cela de plus en plus utilisé dans les études développementales (ex. Keränen *et al.*, 1998; Keränen *et al.*, 1999; Peterkova *et al.*, 2002; Matalova *et al.*, 2005; Witter *et al.*, 2005; Setkova *et al.*, 2006), principalement en comparaison avec le modèle murin. Les arvicolinés et les murinés ont des morphologies de molaires contrastées. Ces différences constituent une base essentielle pour reconstruire les changements de mode développemental dans l'évolution des molaires (Jernvall *et al.*, 2000). En effet, alors que les murinés ont des dents bunodontes (cuspides en tubercules), les campagnols ont des dents prismatiques (cuspides planes formant des triangles). Les lignées de murinés ont gardé le nombre ancestral de cuspides depuis leurs ancêtres cricétidés. Cependant, le patron des cuspides a évolué depuis des cuspides buccales et linguales opposées vers des cuspides opposées ou parallèles (Jernvall *et al.*, 2000; Lazzari, 2006). A l'inverse, les campagnols ont conservé le patron diagonal des cuspides, mais le nombre de cuspides a généralement augmenté sur leur première molaire inférieure (Jernvall *et al.*, 2000). La première molaire des campagnols constitue un exemple de molarisation extrême. De plus, les campagnols ont gardé la crête longitudinale qui connecte les cuspides antérieures et postérieures, alors que cette crête a été perdue chez les murinés (Figure II. 11). Les gènes impliqués dans la morphologie des dents de souris et de campagnols sont les mêmes (Keränen *et al.*, 1998; Jernvall *et al.*, 2000). Cependant, la dynamique de mise en place des cuspides diffère (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002).

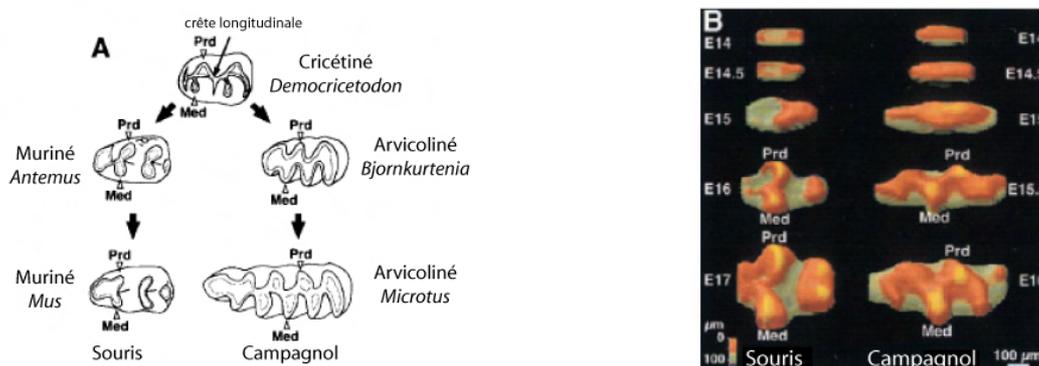


Figure II. 11 : Evolution et développement des premières molaires inférieures de souris et de campagnol avec les deux premières cuspides en formation, le protoconide (Prd) et le métaconide (Med). A. La configuration basale en diagonale des cuspides de cricétiné avec la crête longitudinale (*Democricetodon*). Cette crête longitudinale a été perdue chez la lignée des murinés en plus d'une configuration de cuspides plus parallèle (*Antemus*). Ensuite, chez *Mus* les cuspides ont fusionnées en lophes transverses. Les lignées de campagnols ont gardé la crête longitudinale avec une configuration des cuspides en diagonale (*Bjornkurtenia*), mais le nombre de cuspides augmente fortement (*Microtus*). B. Modèles d'élévation digitale à haute résolution du développement de la forme dentaire. L'échelle de couleur correspond à la hauteur de l'interface entre l'épithélium et le mésenchyme. Les cuspides émergent dans leur configuration spécifique vers le jour embryonnaire 16 (E16) chez la souris et E15.5 chez le campagnol, c'est-à-dire 2 jours après l'initiation de la base de la couronne dentaire (E14 = étape couronne dans le développement dentaire). Le côté antérieur est vers la gauche et le côté buccal vers le haut. (D'après Jernvall *et al.* 2000).

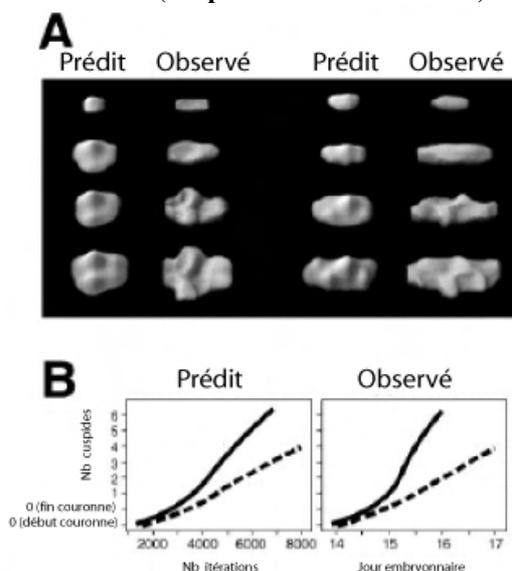


Figure II. 12 : Le modèle morphodynamique prédit la « course au développement » entre campagnol et souris. A. Topographie du développement prédit et observé de la première molaire inférieure chez la souris (à gauche) et chez le campagnol (à droite). Le modèle reproduit la configuration des cuspides parallèles et en diagonale de la souris et du campagnol respectivement. Les différences entre les modèles de prédiction du campagnol et de la souris sont générées par l'augmentation de l'effet des inhibiteurs sur les activateurs, par la décroissance des forces latérales sur les cellules du côté buccal pendant la croissance et par l'augmentation des forces antérieures sur la croissance. Le côté antérieur est vers la gauche et le côté buccal vers le haut. B. Les simulations approximent l'espacement temporel entre les étapes du développement dans la croissance lente et rapide des molaires de souris et de campagnols respectivement. (D'après Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002).

A partir du modèle morphodynamique de mise en place des cuspides, Salazar-Ciudad et Jernvall (2002) ont démontré que l'accroissement de la partie antérieure de la première molaire inférieure chez les campagnols pouvait être générée par l'accélération de la croissance longitudinale (Figure II. 12). En effet, l'étroitesse des cuspides, et leur croissance latérale et longitudinale, influence la forme des nœuds d'émail, qui eux-mêmes affectent la distribution des nouveaux nœuds de façon dynamique : accélération de la croissance et augmentation du nombre de cuspides. De plus, la mise en place de la configuration en diagonale des cuspides de campagnol serait due à une augmentation de l'inhibition des activateurs par les inhibiteurs entre les cuspides (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002). En effet, si les effets des inhibiteurs sont supérieurs aux effets des activateurs, l'accroissement des cellules du mésenchyme sera plus important, de même que l'espacement entre les cuspides.

Comme chez tous les rongeurs, les campagnols ont une zone sur la mâchoire dépourvue de dents : le diastème. Cependant, les campagnols se différencient des souris par la mise en place des bourgeons dentaires dans ce diastème. Alors que le développement des bourgeons dentaires est étudié à la fois dans le diastème mandibulaire et maxillaire chez la souris (Peterkova *et al.*, 2002; Viriot *et al.*, 2002; Peterkova *et al.*, 2006), seul le diastème maxillaire a des données publiées chez le campagnol, à ma connaissance (Keränen *et al.*, 1999; Witter *et al.*, 2005). Deux bourgeons dentaires relativement équivalents se développent à proximité de la première molaire supérieure (M1) dans le diastème maxillaire des souris et des campagnols (Figure II. 13). Cependant, seul le premier bourgeon dentaire (le plus proche de la M1) chez le campagnol intervient dans la formation de la couronne dentaire antérieure de la M1. Dans le diastème mandibulaire, ce même phénomène d'intégration de bourgeon dentaire dans la formation de la couronne dentaire de la m1 a été observé chez la souris (Peterkova *et al.*, 2002; Viriot *et al.*, 2002; Peterkova *et al.*, 2006). Cette intégration entraînerait probablement un léger allongement de la partie antérieure de la m1 (Viriot *et al.*, 2002). Etant donné que la partie antérieure de la m1 chez les campagnols est très allongée, Peterkova *et al.* (2006) ont émis l'hypothèse que non pas un, mais deux bourgeons dentaires devaient être intégrés à la m1 (Figure II. 13). Cependant cette hypothèse n'a encore pas été démontrée expérimentalement.

Les mécanismes du développement dentaire et leurs conséquences sur la mise en place du patron phénotypique chez la souris et le campagnol sont de mieux en mieux connus aujourd'hui. Même si le modèle CI permet de prédire l'évolution du patron des

molaires chez les mammifères à partir du développement, il n'en demeure pas moins que les processus génétiques impliqués dans ces mécanismes ne sont pas encore totalement connus. Cependant, à présent que la mise en place du patron dentaire à travers les mécanismes du développement chez les campagnols est mieux appréhendée, il est possible de se demander si les variations du phénotype elles-mêmes peuvent refléter ces mécanismes. L'étude de la modularité au sein de la rangée dentaire peut être abordée dans ce sens.

Les études sur le développement dentaire montrent que les dents se mettent en place par des signaux moléculaires réitératifs en cascade (Jernvall *et al.*, 2000) et que le nombre et la taille des molaires sont régis par un mécanisme de cascade d'inhibition (Kavanagh *et al.*, 2007). Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que chaque molaire peut constituer un module à part entière (répétition de signaux moléculaires), mais qu'au sein de la rangée dentaire des interactions entre les molaires existent (inhibition des molaires antérieures sur les molaires postérieures). La PUBLICATION 2 présente précisément la méthodologie utilisée pour tester l'hypothèse de la modularité au sein de la rangée dentaire chez le campagnol des champs (*Microtus arvalis*). Elle présente également les hypothèses modulaires qui ont été émises auparavant et qui peuvent être parfois contradictoires.

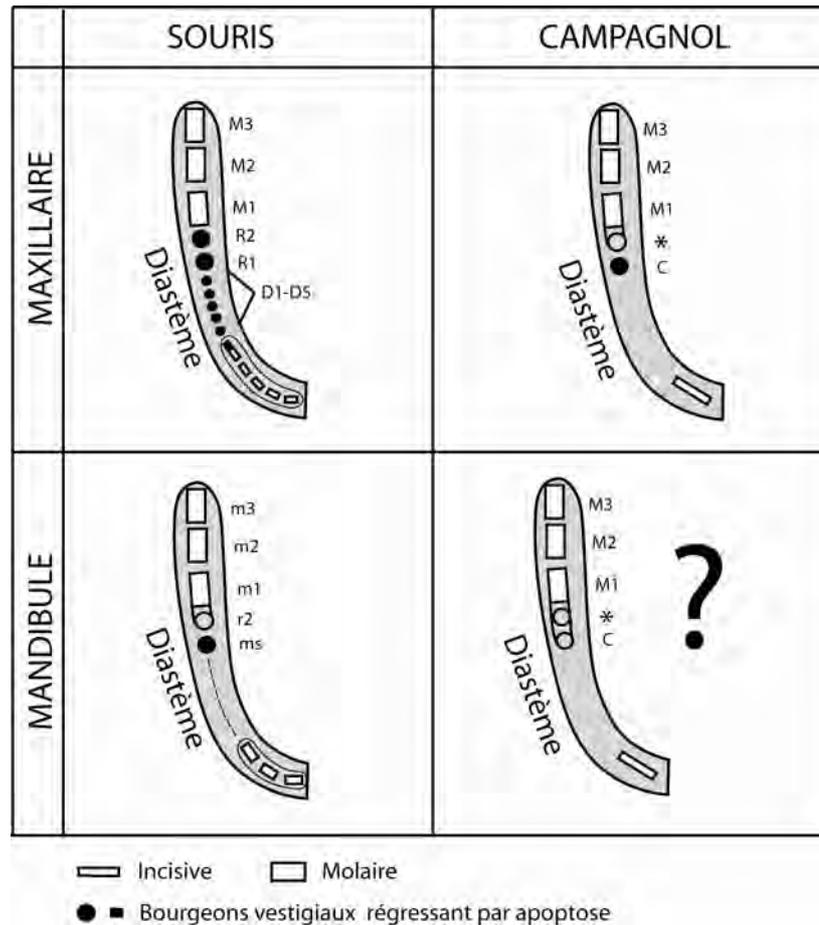


Figure II. 13 : Développement embryonnaire des bourgeons dentaires chez la souris et le campagnol dans les quadrants des diastèmes maxillaire et mandibulaire. Chez la souris, l'incisive supérieure se développe à partir de six placodes dentaires (lamine dentaire primaire). L'incisive inférieure se développe à partir de trois placodes. De petits placodes fugaces (D1-D5) se mettent en place dans le diastème supérieur (petits ronds noirs). Dans la mandibule, seul un épaissement de l'épithélium est présent (ligne pointillée). Deux grands bourgeons dentaires se forment à côté de la première molaire dans le maxillaire (R1 et R2) et dans la mandibule (ms et r2). Les lignes continues signifient une intégration entre molaire et bourgeon dentaire. Chez le campagnol, la partie antérieure du primordium de la M1 dans le maxillaire (astérisque) doit être homologue au vestige de R2 chez la souris. Le bourgeon dentaire C doit être similaire au vestige de R1 chez la souris. Contrairement au campagnol, le bourgeon dentaire R2 chez la souris n'intervient pas dans la formation de la couronne antérieure de la M1, mais régresse par apoptose. En revanche, le bourgeon r2 intervient dans la formation de la couronne dentaire de la m1 dans la mandibule chez la souris. Une hypothèse a été émise dans le diastème mandibulaire du campagnol, selon laquelle la couronne dentaire de la m1 doit incorporer deux bourgeons dentaires pour entraîner un allongement de la partie antérieure. Le côté postérieur est vers le haut et le côté buccal est vers la gauche. (D'après Peterkova *et al.* 2002 ; Viriot *et al.* 2002 ; Witter *et al.* 2005 ; Peterkova *et al.* 2006).

III.1 PUBLICATION 2

- PUBLICATION 2 -

Morphological modularity and assessment of developmental processes within the vole dental row (*Microtus arvalis*, Arvicolinae, Rodentia).

Rémi LAFFONT, Elodie RENVOISE, Nicolas NAVARRO, Paul ALIBERT and
Sophie MONTUIRE
Evolution and Development (2009)

Morphological modularity and assessment of developmental processes within the vole dental row (*Microtus arvalis*, Arvicolinae, Rodentia)

Rémi Laffont,^{a,*} Elodie Renvoisé,^a Nicolas Navarro,^b Paul Alibert,^a and Sophie Montuire^{a,c}

^aUMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France

^bDepartament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^cÉcole Pratique des Hautes Études (EPHE), Paléobiodiversité et Préhistoire, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France

*Author for correspondence (email: remi.laffont@u-bourgogne.fr)

SUMMARY Knowledge of mammalian tooth formation is increasing, through numerous genetic and developmental studies. The prevalence of teeth in fossil remains has led to an intensive description of evolutionary patterns within and among lineages based on tooth morphology. The extent to which developmental processes have influenced tooth morphologies and therefore the role of these processes in these evolutionary patterns are nonetheless challenging. Recent methodological advances have been proposed allowing the inference of developmental processes from

adult morphologies and the characterization of the degree of developmental integration/modularity of morphological traits by studying the patterns of variation within and among individuals. This study focuses on the geometric shape of the lower molars of the vole species *Microtus arvalis*. Our results suggest (i) quasi-independence of each molar at the developmental level (developmental modules), even slightly stronger for the third molar supporting some genetic and developmental hypotheses and (ii) more pervasive integration processes among molars at the morphological level.

INTRODUCTION

Mammalian tooth development has been investigated in depth since the end of the 19th century. First, biologists and paleontologists elaborated developmental hypotheses based on compared anatomy from embryo and adult phenotypic comparisons of characters to understand phylogenetic relationships (Bateson 1892; Butler 1939). They suggested that teeth were comparable with metameric structures (i.e., repetition of an identical unit of body organization; Le Moigne and Fouchier 2004), such as digits and vertebrae, evolving as parts of a system. In fact, both developmental and genetic control of tooth formation could act at the scale of tooth identity (i.e., molar, canine, and incisor: see Butler, 1939 morphogenetic fields, Osborn, 1977, 1978, cell clones; Weiss 1990). Modifications in development, such as genetic mutations, will primarily affect most or all teeth in a series (Butler 1939; Osborn 1978; Weiss 1990), and consequently teeth are not considered as separate evolutionary unit. Recent studies have improved our knowledge of tooth development without contradicting this previous hypothesis, which defines different morphogenetic processes as a reiterative signaling cascade (Jernvall and Thesleff 2000) of inhibitor and activator balance (Kavanagh et al. 2007) along the dental row. Different approaches have improved knowledge of the impact of

development on the resulting tooth phenotype: variance-covariance matrices on common shrew tooth shape (Polly 2005), QTL on mouse molars (Workman et al. 2002), and finally morphodynamic models (see review in Salazar-Ciudad 2008). Despite diverging on the precocity and impact of the implicated developmental stages, all these approaches have underlined the role of development in resulting morphologies. Nevertheless, the extent to which adult phenotypic organization reflects underlying known tooth developmental mechanisms remains to be assessed. Phenotypic integration by developmental pathways can be estimated by the study of morphological modularity (e.g., bumblebee wings, Klingenberg et al. 2001; macaque and mouse skulls, Hallgrímsson et al. 2004; shrew mandibles, Young and Badyaev 2006; mammal skulls, Goswami 2007). Modularity is defined by the fact that organisms are divided into biological parts, which are hierarchically structured, and considered as semi-independent units both developmentally and structurally, with partial integration to ensure organismal coherence (Raff 1996; Wagner and Altenberg 1996; Winther 2001; Schlosser 2004).

A recent approach to the study of modularity and integration in developmental and evolutionary goals has been successfully used in several biological models (e.g., *Drosophila* wings, Klingenberg and Zaklan 2000; bumblebee wings, Klingenberg et al. 2001; mouse mandibles, Klingenberg et al.

2003). This approach makes inferences about the existence and the strength of developmental processes between modules from the covariation existing between morphological traits. The core idea is that if the traits are integrated – that is included in the same module – their morphological variation will be coordinated (Klingenberg 2008a). This method hypothesizes that such morphological covariation may result from two main developmental processes: parallel variation and direct interactions. Parallel variation arises between developmentally independent pathways, which are affected by an external genetic or environmental factor (Klingenberg 2005). Direct interactions take place between traits whose developmental pathways are linked (e.g., tissue partitioning or inductive signaling between pathways). Such interactions reveal intrinsic developmental constraints. Within a module, trait coherence will principally be ensured by direct interactions. Therefore, to detect modules from trait covariation, these two developmental processes need to be identified. To this end, trait covariation in fluctuating asymmetry (FA) levels is studied, in comparison with trait covariation in among-individual variation (IndVar). Each side of an organism shares the same genes and the same environment, apart from a few exceptions (see Klingenberg 2003). Thus, FA results from the randomness of development in each side of an organism (Palmer and Strobeck 1986; Auffray et al. 1999), and controls both environmental and genetic factors which are responsible for parallel variation of developmental pathways (Klingenberg 2003). Therefore, correlation of FA patterns can only arise if the developmental pathways responsible for these traits are affected by shared developmental processes (Klingenberg 2003). Thus, covariation of FA may be solely due to direct interactions between developmental pathways. However, trait covariation in IndVar can result both from direct interactions and from parallel variation of developmental pathways, so that developmental information is not distinguishable from IndVar (Klingenberg 2002, 2003, 2004). The study of trait covariation in FA can therefore infer the strength of direct developmental interactions among morphological traits and thus assess their degree of developmental modularity.

So far, most modularity and integration studies on mammals have dealt with skulls and mandibles (e.g., Cheverud 1982, 1995, 1996; Cheverud et al. 1997; Hallgrímsson et al. 2004; Bastir and Rosas 2005; Young and Badyaev 2006; Goswami 2007). Here, we focus more particularly on the lower molar row of voles. To date, several studies have suggested a genetic and developmental integration of groups of teeth by size (e.g., teeth of the carnassial region in Pengilly 1984; lower molar row in Workman et al. 2002 and in Kavanagh et al. 2007). The shape aspect is either examined in particular teeth (e.g., m1 in Polly 2005), or along the molar row (e.g., Workman et al. 2002). Thus, QTL analyses performed at the mouse molar row scale suggest genetic

nonindependence of molar shapes (Workman et al. 2002). Therefore, by focusing on the vole molar row, our aim was to assess whether developmental integration also exists between molars with regard to shape.

Common vole teeth (*Microtus arvalis*) were chosen for this study, as tooth design in voles is suitable for the recognition of numerous morphological traits. Although mouse studies are more numerous, the vole is also a well-studied model, contributing greatly to knowledge of rodent cheek tooth development (e.g., Keränen et al. 1998; Jernvall et al. 2000; Salazar-Ciudad and Jernvall 2002; Matalova et al. 2005; Witter et al. 2005; Setkova et al. 2006). Several hypotheses have been presented to describe the modular organization of molars within the dentition (for an exhaustive review concerning tooth modular organization, see Stock 2001). The first hypothesis tested in this study assumes that within the molar row, all molars form an integrated unit. It results from the proposition that in mammals, the three tooth groups (i.e., incisor, canine, and molar) originate from three morphogenetic fields (Butler 1939, 1995). Morphogenetic fields probably constitute developmental modules (Gilbert et al. 1996; Klingenberg 2003, 2004). So the three molars developing from the same morphogenetic field could constitute a unique integrated unit. The resulting alternative hypothesis, also tested in this study, is that each molar could constitute a separate module (hypothesis evoked in Stock 2001, but not sufficiently supported by experimental data). A complementary hypothesis tested here is that the third lower molar is more genetically and developmentally independent than the other two, as observed in mice (Bader 1965) and humans (Silvestri and Singh 2003). Nevertheless, other possible causes are invoked for the independence of some teeth (see e.g., Pengilly 1984; Polly 1998; Meiri et al. 2005 about this debate). Consequently, with regard to these hypotheses, our aim was to specify whether or not the molar row shows integration between molar shapes. We also checked if the degree of integration (or modularity) in shape is lower (or higher) for the third lower molar in comparison with the other two. We applied geometric morphometric methods to decompose the sources of variation and to analyze the covariation among molars in order to characterize the integration patterns of molar shapes in the dental row, and to highlight the developmental processes that might be responsible for this structuring.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The studied material is composed of 116 individuals from populations of the vole species *M. arvalis*, trapped in France [Vittel (Vosges), $N = 37$; Espezel (Aude), $N = 31$; and Parc de la Vanoise (Savoie), $N = 31$]. The material is stored in the “Centre de Biologie et de Gestion des Populations” Collections (Montpellier, France).

The three lower molars (m1, m2, and m3) were taken into account for all individuals.

Morphometrics

Landmark acquisition

Landmarks on the three lower molars of both sides were digitized using a Nikon MM-60 measuring microscope (Nikon-Japan, Tokyo, Japan) with a precision of 1 μm. Tooth orientation was normalized before landmark digitalization according to a plane surface (null z-coordinates), and the alignment of two landmarks: U and V for m1 (following Brunet-Lecomte 1988), W and X for m2 and Y and Z for m3 (this study, Fig. 1). Twenty-two landmarks (numbered from 1 to 22) were defined for m1, 12 for m2 (numbered from 23 to 34) and 13 for m3 (numbered from 35 to 47, Fig. 1). Except for landmarks 42 and 43 (m3), they all correspond to the maximal curvature points of the salient angles (called “triangles”), loop tips and re-entrant angles of the tooth. They therefore correspond to landmarks of type II following the nomenclature of Bookstein (1991). Left and right teeth were re-positioned and digitized twice for each individual in order to assess measurement error (ME) caused by positioning and digitizing. The analyses presented here were processed with Matlab® programming and MorphoJ software (Klingenberg 2008b).

Geometric morphometrics

In geometric morphometrics, shape is defined as all the geometric information about an object invariant to size, location, and orientation (Dryden and Mardia 1998). Shape variation was extracted from landmark configuration using generalized least-square Procrustes superimposition. This approach normalizes all configurations to the same centroid size, superimposes them on the same centroid, and rotates them according to a least-square criterion. Before these three traditional steps, in the case of FA analysis, the Procrustes method proceeds by first reflecting one side to its mirror image to align corresponding landmarks on both sides (Klingenberg and McIntyre 1998). Procrustes-aligned configurations are projected on to a linear tangent space at the mean shape (Dryden and Mardia 1998). The tangent coordinates can then be processed using all sets of multivariate linear analyses.

Procrustes fitting was performed separately for each tooth. In fact, the relative freedom of teeth within the alveolus, implying for example differences in the occlusal plane among teeth, could include nonbiological information about tooth relative position. Therefore, the shape quantified here refers to aspects of shape of the molars themselves: that is all the geometric information about the cusps constituting the molars after removing the size, position, and orientation of the teeth. In opposition, the shape quantification obtained from a single Procrustes superimposition of the three molars would also incorporate shape features related to the molar row: in that case shape would also contain the relative sizes and orientations of the molars within the molar row.

Preliminary analyses

From tangent coordinates of individual tooth configurations, Mahalanobis distances were computed for each side and each replicate to detect outliers. A sequential procedure was used where all

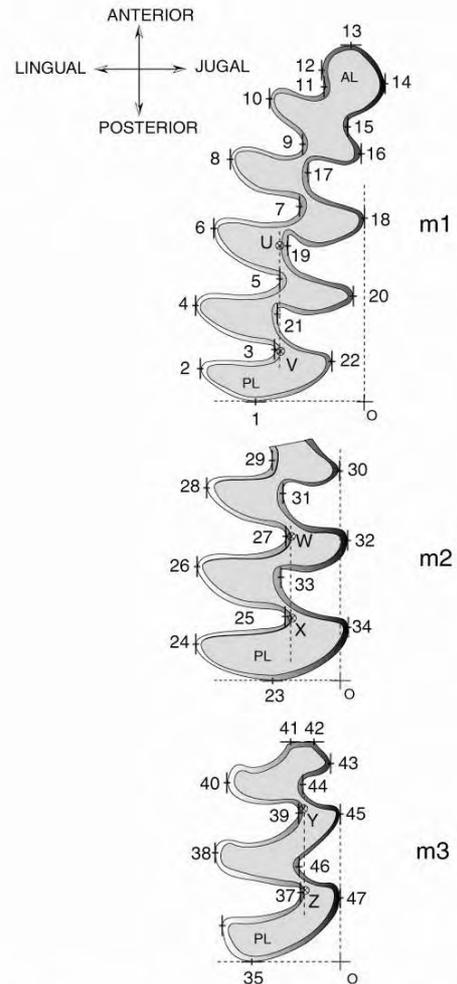


Fig. 1. Description of landmarks defined in this study. The occlusal areas of the three molars are represented. Orientation of each tooth follows an axis defined by two landmarks (crossed circles from U to Z) on the internal enamel outline. Landmarks 1–47 on the external enamel outline are those used for morphometrics.

landmark configurations (three molars × two sides × two replicates) of the strongest outlier (i.e., with the strongest distance value) were removed before a new Procrustes fitting and the re-computation of the Mahalanobis distances. All these outlier individuals were definitely removed before the remaining analyses.

Individual values of signed asymmetry were computed as the left–right differences between Procrustes coordinates corrected for mean asymmetry, to obtain a measure of FA (Palmer and Strobeck 1986). Data were also corrected for the main effect of population size. A Procrustes analysis of variance (ANOVA) was performed (Klingenberg and McIntyre 1998; Klingenberg et al. 2002); it corresponds to a geometric morphometric extension of the two-way mixed model ANOVA of Palmer and Strobeck (1986) for the study

of asymmetry. This approach allows the assessment of the significance of shape FA compared with ME. Potential allometric relationships in FA were tested and corrected by multivariate regression of the signed asymmetries of shape on centroid size (Monteiro 1999; Klingenberg et al. 2003).

Modularity analyses

Tested hypotheses

Several comparisons were tested with regard to two possible situations, that is, whether the molar row constitutes a single integrated unit, or each molar is an independent module. First, we tested the null hypothesis that the three teeth were three independent modules (m1/m2/m3). Then we focused on the pairwise relationships among molars: m1/m2, m1/m3, and m2/m3. Finally, we examined possible stronger independence of the first molar against the last two (m1/m2m3) and the third molar against the first two (m1m2/m3).

Quantifying covariation

Here, we used a methodology developed recently (Klingenberg and Zaklan 2000; Klingenberg et al. 2001, 2003), which uses IndVar and FA comparisons to assess developmental process responsible for modularity. Further improvement of this method uses the R_v coefficient (Escoufier 1973; Klingenberg 2007). This coefficient is based on the joint covariance matrix (noted \mathbf{S}) of two sets of tangent coordinates (\mathbf{E} and \mathbf{F} with, respectively, k_1 and k_2 landmarks in m dimensions):

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} \mathbf{S}_1 & \mathbf{S}_{21} \\ \mathbf{S}_{12} & \mathbf{S}_2 \end{pmatrix} \quad (1)$$

with \mathbf{S}_1 and \mathbf{S}_2 the two covariance matrices of the sets, and \mathbf{S}_{12} the cross-covariance matrix between the two sets (with $\mathbf{S}_{12} = \mathbf{S}'_{21}$). R_v corresponds to:

$$R_v = \frac{\text{trace}(\mathbf{S}_{12} \times \mathbf{S}_{21})}{\sqrt{\text{trace}(\mathbf{S}_1^2) \times \text{trace}(\mathbf{S}_2^2)}}, \quad (2)$$

where the numerator is

$$\text{trace}(\mathbf{S}_{12} \times \mathbf{S}_{21}) = \sum_{j=1}^{m \times k_1} \sum_{h=1}^{m \times k_2} \text{cov}(\mathbf{e}_j, \mathbf{f}_h)^2 = X_{cov}, \quad (3)$$

where $\text{cov}(\mathbf{e}_j, \mathbf{f}_h)$ is the covariance between the j th variable of set 1 and the h th variable of set 2 (the element of the j th row and h th column of the cross-covariance matrix). Therefore, the numerator of R_v (named X_{cov}) is equal to the total squared cross-covariance between the two sets, which is used as a summary statistic in partial least squares analysis (PLS; Rohlf and Corti 2000) to quantify the total amount of cross-covariance.

The elements of the R_v denominator are

$$\text{trace}(\mathbf{S}_1^2) = \sum_{j=1}^{m \times k_1} \text{var}(\mathbf{e}_j)^2 + \sum_{h=1}^{m \times k_1} \sum_{g=1 \wedge g \neq h}^{m \times k_1} \text{cov}(\mathbf{e}_h, \mathbf{e}_g)^2 \quad (4)$$

which correspond to the sum of the squared variances and covariances within each set. The equivalent is obtained for $\text{trace}(\mathbf{S}_2^2)$ by changing the appropriate number of landmarks and variables. Therefore, the R_v denominator is the squared root of the product of the sum of squared variances and covariances of each set.

Consequently, this R_v coefficient measures the association between two subsets of landmarks, by quantifying inter-subset covariation, normalized by intra-subset variation and covariation. Taking all variances as equal to σ^2 and all correlations between variables as equal to 1, then the total cross-covariance and the R_v denominator are equal to $(m \times k_1) \times (m \times k_2) \times \sigma^2$ which corresponds to the maximal possible value of total cross-covariance given by Rohlf and Corti (2000) in the PLS analysis context (with $\sigma^2 = 1$). Therefore, R_v coefficient is a generalization to unequal variances of the second summary statistic used in PLS analysis: the total amount of cross-covariance between sets, normalized by its maximal possible value. It will reach its maximal value of 1, when all the correlations between variables equal 1 and more generally when \mathbf{F} is an orthogonal transformation of \mathbf{E} because R_v is invariant to such orthogonal transformations affecting \mathbf{E} and \mathbf{F} (i.e., rotation, symmetry, and scaling; Escoufier 1973; Klingenberg 2007). Conversely, R_v will be equal to 0 when all cross-covariances are null.

For cases where the covariation is quantified over the three molars simultaneously, the R_v coefficient was computed for each pairwise comparison and then averaged (Klingenberg 2007).

Hypothesis testing

Using the R_v coefficient, we quantified the covariation among teeth on averages of the left and right teeth of individuals (i.e., IndVar) as well as on the signed asymmetries (i.e., FA, computed as differences between the left and right teeth corrected for mean asymmetry). Developmental modules are characterized by low covariation between them due to direct developmental interactions (Klingenberg 2005). Therefore, a low R_v value on signed asymmetries will be expected between developmental modules. Because covariation of IndVar arises from more factors (e.g., size, genetics, environment), higher covariation is expected than for FA. Complete modularity of teeth (i.e., all teeth independent) will be attained if covariation among teeth is not significant. However, modularity is a matter of degree more than an all-or-nothing matter (Klingenberg et al. 2003).

We assessed this null hypothesis of complete modularity ($R_v = 0$) using a permutation approach (initially used with R_i coefficient, Klingenberg et al. 2003, and extended here to R_v). We randomly exchanged teeth among individuals, and recomputed a new random R_v . This procedure was repeated 10,000 times and yielded a distribution of R_v under the null hypothesis of null covariation. A permutation P -value was then obtained as the number of permuted R_v greater or equal to the observed values divided by the number of permutations processed minus 1.

PLS analysis

The R_v coefficient quantifies the overall covariation between teeth, and thus complements PLS. PLS uses the singular value decomposition of the matrix \mathbf{S}_{12} to extract pairs of axes that are uncorrelated with other PLS pairs and accounted for a decreasing amount of squared cross-covariance (Sampson et al. 1989; Klingenberg and Zaklan 2000; Rohlf and Corti 2000). Thus, PLS analysis allows independent features of shape covariation to be quantified and visualized.

As explained before, in the PLS framework, the total amount of cross-covariance between parts is usually computed (Rohlf and

Corti 2000). It corresponds to the sum of squared singular values, and therefore to the sum of the squared cross-covariances. This is $Xcov$ (the numerator of the R_v coefficient, see Equation 3). Rohlf and Corti also proposed a scaling of this total cross-covariance by its maximum possible value, which in the case of the correlation matrix, is the product of the number of variables in the two sets. As stated above, the R_v coefficient is the generalization to the case of unequal variances of the amount of cross-covariance, scaled by the amount of intrablock variance and covariance.

Correlation between the individual scores on the two axes of each PLS pair can also be computed. This correlation refers to the strength of integration of shape features represented by each axis (Bookstein et al. 2003; Bastir and Rosas 2005).

We assessed the significance of between tooth covariation accounted for each PLS pair of axes using the same permutation procedure as for R_v , also repeated 10,000 times. We recomputed the singular values of the cross-covariance matrix between the teeth. This procedure simulated a null hypothesis of null covariation as with the R_v coefficient, but allowing (i) the amount of cross-covariance for each feature of covariation (i.e., each PLS pairs), and (ii) the significance of the correlation between the scores on each PLS pairs (simulating $r=0$) to be tested. P -values were obtained by counting the number of times where the random singular values, or the random correlations, were higher than those observed at the same rank of PLS pairs.

RESULTS

Preliminary analyses

Seventeen individual outliers were detected, based on Mahalanobis distances, and excluded for following analyses. The 99 remaining individuals were then analyzed. Procrustes ANOVA showed that FA was highly significant relative to

ME for each molar (see Table 1), and could therefore be used for analyses of modularity.

Modularity analyses

Quantification of covariation and significance levels (Table 1)

For the IndVar, the tested m1/m2/m3 separation is characterized by low, but highly significant, intertooth covariation ($R_v = 0.19$, $P < 0.0001$), whereas for FA, the R_v value of 0.11 is nonsignificant ($P = 0.39$). Thus, the low and nonsignificant R_v for FA suggests that the strength of direct developmental interactions among molars is weak and that the three molars could constitute three developmentally independent units of the molar row.

As the R_v is the result of an average between the three molars (see Materials and methods), this result could mask the presence of nonindependent units. As a consequence, paired comparisons must be tested in order to investigate more precisely the covariation relationship between pairs of molars. For the three pairwise comparisons tested (m1/m2, m1/m3, and m2/m3), the R_v values for FA are of similar order, increasing slightly from the m2/m3 comparison with the m1/m2 comparison (see Table 2).

There is considerable difference between the R_v for IndVar and the R_v for FA in the m2/m3 comparison. The R_v value for IndVar is more than twice that for FA. Significance levels of R_v for FA are contrasted: $P = 0.08$ for m1/m2, $P = 0.60$ for m2/m3, and $P = 0.74$ for m1/m3. As a result, developmental independence of each molar is never rejected, but a lower P -value could indicate a higher dependence between m1 and m2, compared with m3.

To reinforce this result, independence of m1, and then m3, was investigated further by looking at their respective m2 combinations. Combination m1m2/m3 shows a lower level of covariation for FA ($R_v = 0.13$, $P = 0.70$) than the m1/m2m3 ($R_v = 0.16$, $P = 0.32$). These elements confirm the higher relative independence of m3, compared with the m1m2 association.

Table 1. Procrustes ANOVA of the shape variation

Effect	Sums of squares	Mean squares $\times 10^3$	Degrees of freedom	F	P
m1 Individuals	0.7702	0.1965	3920	6.57	<0.0001
Sides	0.0101	0.2531	40	8.46	<0.0001
Ind. sides	0.1173	0.0299	3920	4.56	<0.0001
Error 1	0.052	0.0066	7920		
m2 Individuals	1.0682	0.545	1960	6.1	<0.0001
Sides	0.0142	0.7111	20	7.95	<0.0001
Ind. sides	0.1752	0.0894	1960	4.09	<0.0001
Error 1	0.0866	0.0219	3960		
m3 Individuals	1.2831	0.5951	2156	5.34	<0.0001
Sides	0.0318	1.4444	22	12.97	<0.0001
Ind. sides	0.2401	0.1114	2156	4.2	<0.0001
Error 1	0.1154	0.0265	4356		

Sums of squares and mean squares are in squared Procrustes distance units following (Klingenberg and McIntyre 1998).

Table 2. R_v coefficient values for the different tested comparisons

	IndVar		FA	
	R_v	P	R_v	P
m1/m2/m3	0.19	<0.0001	0.11	0.39
m1m2/m3	0.26	<0.0001	0.13	0.70
m1/m2m3	0.23	<0.0001	0.16	0.32
m1/m2	0.19	<0.0001	0.12	0.08
m1/m3	0.17	<0.0001	0.12	0.74
m2/m3	0.23	<0.0001	0.09	0.60

IndVar, individual variation; FA, fluctuating asymmetry.

PLS analysis

Cross-covariance analyses between adjacent pairs of molars (m1/m2 and m2/m3) are represented by two sets of PLS analyses (Fig. 2, A and B).

For both IndVar and FA, the total amount of squared cross-covariance (X_{cov}) is very low between both m1 and m2, and m2 and m3, but X_{cov} is significant only for IndVar ($P < 0.0001$). Although X_{cov} was nonsignificant for FA, the PLS for FA was computed for the purpose of comparison with the among-individual PLS. For IndVar, the amount of cross-covariance accounted for the PLS pairs was significant

for the first nine (m1/m2) and seven (m2/m3) PLS pairs. However, intertooth correlation was significant only for the PLS1 of the m2/m3 comparison in IndVar (Table 3).

Although the features of intertooth correlation are rarely significant, we have represented the first two PLS pairs to compare this intertooth correlation between FA and IndVar (Fig. 2). In the case of the m1/m2 comparison, the first two axis pairs explained just over 62% of intertooth covariation for IndVar, and just under 50% for FA. For IndVar, the two PLS axis pairs mainly characterize associated bends (due to

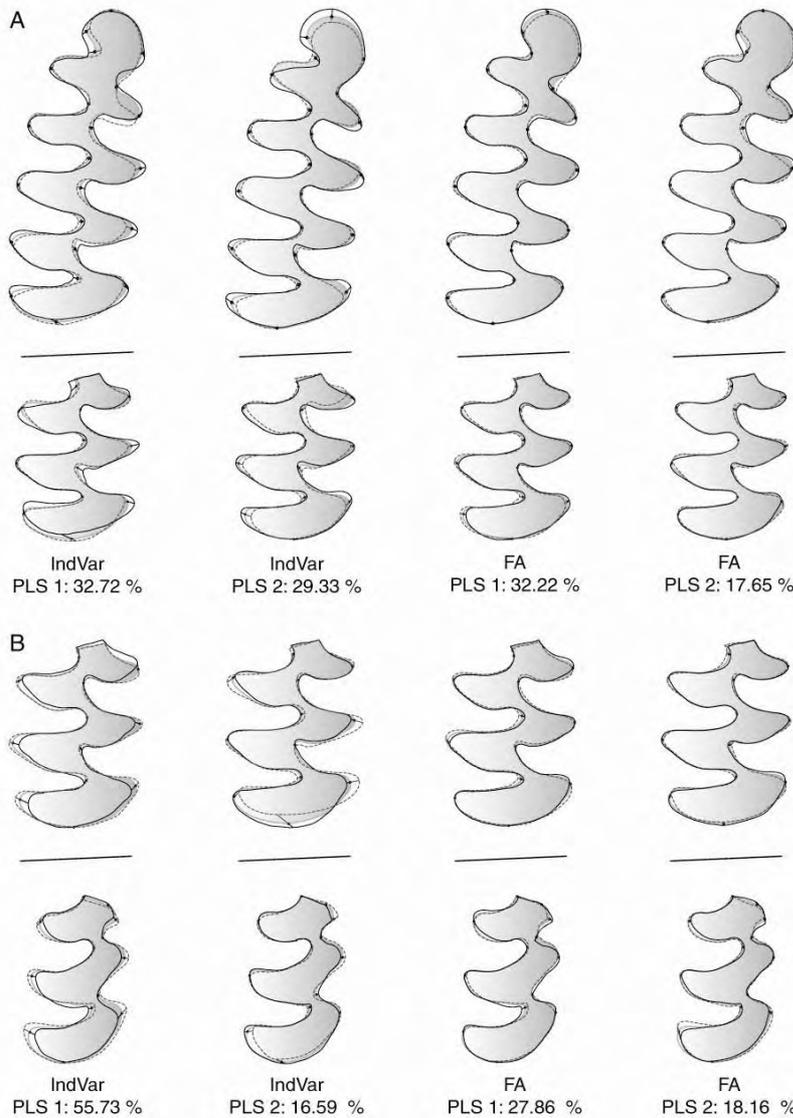


Fig. 2. Patterns of shape intertooth covariation displayed by the first PLS axis pairs for fluctuating asymmetry (FA) and individual variation (IndVar) between m1/m2 (A), and m2/m3 (B). Circles constitute the consensus configuration, whose possible outline is represented by the bold gray line. The maximum attained deviations for each circle are shown as black segments and outline (negative side), and dashed gray segments and outline (positive side) for the axis pair under consideration. Percentages of explained covariation for each PLS pair between teeth are also reported.

Table 3. Details of PLS analysis results

	Singular value $\times 10^3$	<i>P</i>	Percentage of intertooth covariation	Correlation	<i>P</i>
m1/m2					
IndVar					
PLS1	0.19	0.02	32.72%	0.54	0.29
PLS2	0.18	<0.0001	29.33%	0.55	0.82
<i>X_{cov}</i> $\times 10^7$	1.16	<0.0001			
FA					
PLS1	0.09	0.31	32.22%	0.45	0.96
PLS2	0.07	0.20	17.65%	0.45	0.83
<i>X_{cov}</i> $\times 10^7$	0.25	0.08			
m2/m3					
IndVar					
PLS1	0.35	<0.0001	55.73%	0.63	0.02
PLS2	0.19	<0.01	16.59%	0.51	0.11
<i>X_{cov}</i> $\times 10^7$	2.29	<0.0001			
FA					
PLS1	0.11	0.81	27.86%	0.38	0.77
PLS2	0.09	0.57	18.16%	0.44	0.33
<i>X_{cov}</i> $\times 10^7$	0.43	0.60			

IndVar, individual variation; FA, fluctuating asymmetry; PLS, partial least squares.

triangle lengthenings and inclinations) often localized within entire teeth, or sometimes within specific parts of m1 (jugal and posterior parts). In m1, the anterior loop shows specific patterns of dilatation, closure or shear (Fig. 2A). Patterns of covariation for FA are somewhat different, as they are more often localized in specific parts (jugal or anterior parts of m1, jugal, lingual, or anterior parts of m2). These patterns are generally bends and anterior loop deformations (closure, shear) (Fig. 2A).

In the case of the m2/m3 comparison, the first two axis pairs encompass more than 72% of intermolar covariation for IndVar, and almost 46% for FA. The first two PLS axis pairs for IndVar display triangle lengthenings and inclinations, and lingual/jugal asymmetries between m2 and m3. They are localized either in the entire molars or in specific parts (posterior loops and anterior parts, Fig. 2B). For FA, the patterns depicted by the PLS axes differ, as they concern more localized parts of teeth (posterior loops, anterior parts, or isolated triangles) and display loop or triangle asymmetries and inclinations (Fig. 2B).

DISCUSSION

To assess the modular organization of the *M. arvalis* molar row, two hypotheses can be proposed: either the three teeth constitute semi-independent modules (Stock 2001), or the

three molars are a single integrated block with many developmental interactions (resulting from their common developmental origin within their shared morphogenetic field, Butler 1939). Our results show that, for shape covariation, the *R_v* coefficient is always comprised between 0.09 and 0.26 for both FA and IndVar. Comparing these values with the theoretical range of *R_v* (0–1), they could indicate a weak shape covariation between teeth. As a comparison, the only study using the *R_v* coefficient for modularity was conducted on *Drosophila* wings. It suggests that anterior and posterior compartments are not independent modules, with an *R_v* value = 0.41 (Klingenberg 2007). However, a direct comparison between the two studies remains difficult, because of the different organisms and traits studied (Klingenberg 2007).

The nonsignificant amount for covariation of FA and, therefore, the nonrejection of null covariation among tooth shapes, strengthens the idea that molars could constitute three independent developmental modules, whatever the scale of observation (two or three teeth). Nevertheless, this could also be due to a weak statistical power for FA. In contrast, for IndVar, which takes into account both direct interactions and parallel variation, covariation is low but always significant. Furthermore, *R_v* values of IndVar analyses were consistently higher than those obtained for *R_v* values of FA, suggesting the presence of additional components of shape covariation among the three teeth.

Our results on FA suggest that molars are not integrated within the molar row by direct interactions between their developmental processes, but that more pervasive factors of morphological integration act at the level of IndVar. Therefore, the vole molar row could be a unique morphological module including three developmental modules (Fig. 3). This pattern of shape modularity diverges from the hypothesis of integrated cheek teeth (Butler 1939, 1995) if we only focus on developmental integration, but is congruent to molar row morphological integration. What processes cause such a divergent pattern of integration?

In FA, shape covariation is primarily localized within each molar. Trait covariation in FA can result from direct interactions, for example inductive signals between pathways or precursor partitioning (Klingenberg 2003, 2004); such processes can act within each molar. Possible candidates for precursor partitioning are cells of the primary enamel knot controlling molar formation which divide into secondary enamel knots controlling particular cusp formation (Jernvall et al. 2000). From experiments and models on developmental mechanisms in rodent molars, Jernvall and Thesleff (2000), and Kavanagh et al. (2007) demonstrated that cheek tooth development corresponds to a reiterative signaling cascade (m2 inhibited by m1, and m3 by m1 and m2, but voles seem to be a particular case: Polly 2007, Renvoisé et al. 2009), induced by a balance between activators and inhibitors. This balance influences molar timing and size. On our data (results

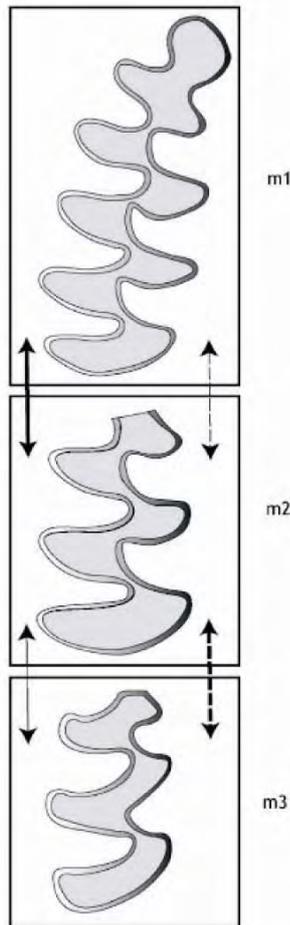


Fig. 3. Summary of shape modular organization and developmental processes involved in the vole dental row. Modules are represented by black rectangles. Direct interactions are shown as continuous black arrows, and parallel variation as dashed black arrows. Differential arrow thickness qualitatively indicates relative importance of direct interactions and parallel variation between teeth.

not shown), such strong correlation of molar sizes is found (on average $r = 0.79$). Thus, if an inductive signal is implied within each molar, a similar inhibition cascade could act at the molar scale and generate shape covariation. Also, the inhibitory cascade evoked by Kavanagh et al. (2007) might generate direct interactions via inductive signaling pathways between molar traits. As this signaling cascade affects the relative sizes of molars (Kavanagh et al. 2007), it could be a more pervasive factor for integration at the level of the molar row shape. This could be responsible for the small and non-significant covariation found in FA.

In IndVar, an additional part of shape covariation could act between molars. Parallel variation and direct interactions

are thought to explain trait covariation in IndVar. Parallel variation is caused by genetic or environmental factors (Klingenberg 2003, 2004). Such genetic factors for morphological integration could be a common genetic basis of tooth shape as shown by QTL studies on mice (Workman et al. 2002). Detected QTLs did not show any regionalization of their effects for different molars and were highly correlated (Workman et al. 2002). Polymorphisms of such genes implied in tooth shape developmental pathways, but expressed downstream to some inductive signaling among pathways (e.g., inhibitory cascade, Kavanagh et al. 2007), or to some precursor partitioning, could affect different teeth independently but in a similar way and therefore could produce among-individual shape covariation. Similarly, environmental factors and their complex interactions with genes could also lead to among-individual covariation. Such complex responsiveness of molar shape to environmental context for different genetic backgrounds has been shown for example in the case of prenatal exposure to dioxin (mice: Keller et al. 2007a, 2008). Moreover, in variational environmental contexts, dental wear could also induce such covariation between teeth, as it impacts on the whole molar row.

As stated above, our results partly echo the signaling cascade affecting the relative sizes of molars (Kavanagh et al. 2007). This cascade could likely be a more pervasive factor of integration at the level of the molar row shape (i.e., all the geometric information about the three molars after one single Procrustes superimposition removing the size, location and orientation of the molar row). Therefore, an analysis performed by the dental row scale would probably give a different result for FA, with an expected higher developmental integration of the three molars. Such potential discrepancies come from the definition of the molar row shape versus the molar shapes. For the row shape, the relative sizes and orientations of molars will be conserved but not for molar shapes. We must emphasize that these two shape definitions are complementary. Both shape quantifications have their own biological meaning. An approach using both definitions together could highlight the anatomical features where developmental integration occurs. This approach might also provide additional insights into the nature and in the strength of tooth integration in the molar row.

Results of this study suggest a modular developmental organization of shape with three individualized molars. Nevertheless, modularity is a hierarchical concept (Raff 1996; Wagner and Altenberg 1996; Bolker 2000; Eble 2005; Klingenberg 2005; Rasskin-Gutman 2005; Thomas 2005) and the hypothesis of integrated cheek teeth (Butler 1939) must certainly not be rejected at a higher level of observation. At the scale of the mandible, the molar family could constitute an integrated unit, like the incisor family. This could reflect the idea that the hierarchical organization of modularity mirrors successive stages in development (Raff 1996;

Klingenberg 2004): the highest levels correspond to the first stages of development; as a corollary, the lower levels reveal later stages. In the case of teeth, development is characterized by the formation of a molar morphogenetic field which then divides into three molar zones (Butler 1939; Jernvall and Thesleff 2000). The modular organization observed in the three molars could express this developmental stage. To pursue this idea, in the later stages of development, the individualization of cusps would therefore represent independent modules at the finest scale.

For the particular case of m3, both the three pairwise comparisons and the “two against one” comparisons detail the degree of modularity within the molar row. Our results suggest that covariation of shape in the m1/m2 comparison is higher and more significant than in m2/m3, or in m1/m3. This is reinforced by the lower degree of covariation found between m3 and the m1m2 group in FA. Thus, it can be suggested that the m1 and m2 molars are better integrated in the shape aspect than m3, which seems to be more developmentally independent (Fig. 3).

Another aspect highlighted by Kavanagh et al.’s model (Kavanagh et al. 2007) is the atypical behavior of the m3 molar during development. This tooth erupts a few days later than m1 and m2 (e.g., Kavanagh et al. 2007 for mice). The third molar may be of less than average size (mice, Bader 1965; humans, Silvestri and Singh 2003). It may even be absent in some mouse laboratory strains through mutations (e.g., Nomura et al. 2003) or susceptibility to environmental toxicants (Keller et al. 2007b), or absent at higher taxonomic level in some mammal families (e.g., Hillson 2005). Because of the peculiar development of the third molar, we would expect it to display less covariation in shape with m1 and m2, and as an outcome, to display a higher degree of modularity. Our results seem to confirm this higher degree of independence of m3.

Using geometric morphometric techniques, we were able to highlight interactions between developing parts like teeth through covariation between different phenotypic traits. Developmental processes following Klingenberg’s dichotomy (direct interactions vs. parallel variation) can partly echo the activator–inhibitor balance involved in tooth development. Thus, the ability to infer developmental processes from the decomposition of morphological covariation opens fundamental evolutionary perspectives leading to studies of development among natural populations. Nevertheless, this approach is restricted to situations where FA can be estimated (i.e., situations where left and right sides are present, identifiable and constitute a sufficiently large dataset).

Acknowledgments

We are very grateful to P. D. Polly and an anonymous reviewer, whose comments have greatly enhanced this paper. We thank C. Tougaard and F.-X. Flotterer for scientific discussions on this work, J.-P. Quéré for supplying teeth from the CBGP collections (Mon-

tpellier, France), and C. Chateau-Smith for English proofreading. This study is a contribution to the research groups “Forme, Évolution, Diversité” (UMR Biogéosciences) and “Paléobiodiversité et Préhistoire” (EPHE), and to the GDR “Morphométrie et Évolution des Formes.” E. R. is supported by a doctoral Fellowship (Grant MENRT, Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, France), and N. N. by a Beatriu de Pinós postdoc grant from the Generalitat de Catalunya (Spain).

REFERENCES

- Auffray, J.-C., Debat, V., and Alibert, P. 1999. Shape asymmetry and developmental stability. In M. A. J. Chaplain, G. D. Singh, and J. C. McLachlan (eds.), *On Growth and Form: Spatio-Temporal Pattern Formation in Biology*. Wiley, Chichester, pp. 309–324.
- Bader, R. S. 1965. Heritability of dental characters in the house mouse. *Evolution* 19: 378–384.
- Bastir, M., and Rosas, A. 2005. Hierarchical nature of morphological integration and modularity in the human posterior face. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128: 26–34.
- Bateson, M. R. W. 1892. On numerical variation in teeth, with a discussion of the conception of homology. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1892: 102–105.
- Bolker, J. A. 2000. Modularity in development and why it matters to evo-devo. *Am. Zool.* 40: 770–776.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F. L., Gunz, P., Mitteroecker, P., Prossinger, H., Schaefer, H., and Seidler, H. 2003. Cranial integration in *Homo*: singular warps analysis of the midsagittal plane in ontogeny and evolution. *J. Evol. Hum.* 44: 167–187.
- Brunet-Lecomte, P. 1988. Les campagnols souterrains (Terricola, Arvicolidae, Rodentia) actuels et fossiles d’Europe occidentale. Ph.D. Thesis, Université de Bourgogne, Dijon, France.
- Butler, P. M. 1939. Studies of the mammalian dentition – differentiation of the post-canine dentition. *Proc. Zool. Soc. Lond. B.* 109: 1–36.
- Butler, P. M. 1995. Ontogenetic aspects of the dental evolution. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 25–34.
- Cheverud, J. M. 1982. Phenotypic, genetic, and environmental morphological integration in the cranium. *Evolution* 36: 499–516.
- Cheverud, J. M. 1995. Morphological integration in the saddle-back Tamarin (*Saguinus fuscicollis*) cranium. *Am. Nat.* 145: 63–89.
- Cheverud, J. M. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *Am. Zool.* 36: 44–50.
- Cheverud, J. M., Routman, E. J., and Irschick, D. J. 1997. Pleiotropic effects of individual gene loci on mandibular morphology. *Evolution* 51: 2006–2016.
- Dryden, I. L., and Mardia, K. V. 1998. *Statistical Analysis of Shape*. Wiley, Chichester.
- Eble, G. 2005. Morphological modularity: empirical aspects and macro-evolutionary implications. In W. Callebaut and D. Rasskin-Gutman (eds.), *Modularity: Understanding the Development and Evolution of Complex Natural Systems*. MIT Press, Cambridge, pp. 221–238.
- Escoufier, Y. 1973. Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics* 29: 751–760.
- Gilbert, S. F., Opitz, J. M., and Raff, R. A. 1996. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Dev. Biol.* 173: 357–372.
- Goswami, A. 2007. Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals. *Evol. Dev.* 9: 290–298.
- Hallgrímsson, G., Willmore, K., Dorval, C., and Cooper, D. M. L. 2004. Craniofacial variability and modularity in Macaques and Mice. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 302B: 207–225.
- Hillson, S. 2005. *Teeth, Cambridge Manuals in Archaeology Series*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jernvall, J., Keränen, S. V. E., and Thesleff, I. 2000. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14444–14448.
- Jernvall, J., and Thesleff, I. 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 92: 19–29.

- Kavanagh, K. D., Evans, A. R., and Jernvall, J. 2007. Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* 449: 427–433.
- Keller, J. M., Huang, J. C., Huet-Hudson, Y., and Leamy, L. 2007a. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on molar and mandible traits in congenic mice: a test of the role of the *Ahr* locus. *Toxicology* 242: 52–62.
- Keller, J. M., Huet-Hudson, Y., and Leamy, L. 2007b. Qualitative effects of dioxin on molars vary among inbred mouse strains. *Arch. Oral Biol.* 52: 450–454.
- Keller, J. M., Huet-Hudson, Y., and Leamy, L. 2008. Effects of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on molar development among non-resistant inbred strains of mice: a geometric morphometric analysis. *Growth Develop. Aging* 71: 3–16.
- Keränen, S. V. E., Åberg, T., Kettunen, P., Thesleff, I., and Jernvall, J. 1998. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodent. *Dev. Gen. Evol.* 208: 477–486.
- Klingenberg, C. P. 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287: 3–10.
- Klingenberg, C. P. 2003. Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. In M. Polak (ed.). *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Oxford University Press, New York, pp. 427–442.
- Klingenberg, C. P. 2004. Integration, modules and development: molecules to morphology to evolution. In M. Pigliucci and K. Preston (eds.). *Phenotypic Integration: Studying the Ecology and Evolution of Complex Phenotypes*. Oxford University Press, New York, pp. 213–230.
- Klingenberg, C. P. 2005. Developmental constraints, modules and evolvability. In B. Hallgrímsson and B. K. Hall (eds.). *Variation*. Academic Press, Oxford, pp. 219–247.
- Klingenberg, C. P. 2007. Analysis of modularity in configurations of landmarks. In S. Barber, P. D. Baxter, and K. V. Mardia (eds.). *Systems Biology & Statistical Bioinformatics*. Leeds University Press, Leeds, pp. 47–50.
- Klingenberg, C. P. 2008a. Morphological integration and developmental modularity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 39: 115–132.
- Klingenberg, C. P. 2008b. MorphoJ. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK. Available at http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm Accessed August 22, 2008.
- Klingenberg, C. P., Badyaev, A. V., Sowry, S. M., and Beckwith, N. J. 2001. Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. *Am. Nat.* 157: 11–23.
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M., and Meyer, A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909–1920.
- Klingenberg, C. P., and McIntyre, G. S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52: 1363–1375.
- Klingenberg, C. P., Mebus, K., and Auffray, J.-C. 2003. Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evol. Dev.* 5: 522–531.
- Klingenberg, C. P., and Zaklan, S. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54: 1273–1285.
- Le Moigne, A., and Fouchier, J. 2004. *Biologie du développement*. Dunod, Paris.
- Matalova, E., Tucker, A. S., and Mišek, I. 2005. Apoptosis-related factors (Fas receptor, Fas ligand, FADD) in early tooth development of the field vole (*Microtus agrestis*). *Arch. Oral Biol.* 50: 165–169.
- Meiri, S., Mayan, T., and Simberloff, D. 2005. Variability and correlations in carnivore crania and dentition. *Funct. Ecol.* 19: 337–343.
- Monteiro, L. R. 1999. Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Syst. Biol.* 48: 192–199.
- Nomura, R., Shimizu, T., Asada, Y., Hirukawa, S., and Maeda, T. 2003. Genetic mapping of the absence of third molars in EL mice to chromosome 3. *J. Dent. Res.* 82: 786–790.
- Osborn, J. W. 1977. The interpretation of patterns in dentition. *Biol. J. Linn. Soc.* 9: 217–229.
- Osborn, J. W. 1978. Morphogenetic gradients: fields versus clones. In P. M. Butler and K. A. Joysey (eds.). *Development, Function and Evolution of Teeth*. Academic Press, London, pp. 171–201.
- Palmer, A. R., and Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17: 391–421.
- Pengilly, D. 1984. Developmental versus functional explanations for patterns of variability and correlation in the dentitions of foxes. *J. Mammal.* 65: 34–43.
- Polly, P. D. 1998. Variability in mammalian dentitions: size-related bias in the coefficient of variation. *Biol. J. Linn. Soc.* 64: 83–99.
- Polly, P. D. 2005. Development and phenotypic correlations: the evolution of tooth shape in *Sorex araneus*. *Evol. Dev.* 7: 29–41.
- Polly, P. D. 2007. Development with a bite. *Nature* 449: 413–415.
- Raff, R. A. (1996). *The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form*. University of Chicago Press, Chicago.
- Rasskin-Gutman, D. 2005. Modularity: jumping forms within morphospace. In W. Callebaut and D. Rasskin-Gutman (eds.). *Modularity: Understanding the Development and Evolution of Complex Natural Systems*. MIT Press, Cambridge, pp. 207–220.
- Renvoisé, E., Evans, A. R., Jebrane, A., Labruère, C., Laffont, R., and Montuire, S. 2009. Evolution of mammal tooth patterns: new insights from a developmental prediction model. *Evolution* (published online: doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00639.x).
- Rohlf, F. J., and Corti, M. 2000. Use of two-block least squares to study covariation in shape. *Syst. Biol.* 49: 740–753.
- Salazar-Ciudad, I. 2008. Tooth morphogenesis *in vivo*, *in vitro* and *in silico*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 81: 341–371.
- Salazar-Ciudad, I., and Jernvall, J. 2002. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8116–8120.
- Sampson, P. D., Streissguth, A. P., Barr, H. M., and Bookstein, F. L. 1989. Neurobehavioral effects of prenatal alcohol: part II. Partial least squares analysis. *Neurotoxicol. Teratol.* 11: 477–491.
- Schlosser, G. 2004. The role of modules in development and evolution. In G. Schlosser and G. P. Wagner (eds.). *Modularity in Development and Evolution*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 519–582.
- Setkova, J., Lesot, H., Matalova, E., Witter, K., Matulova, P., and Mišek, I. 2006. Proliferation and apoptosis in early molar morphogenesis – voles as models in odontogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 481–489.
- Silvestri, A. R., and Singh, I. 2003. The unresolved problem of the third molar – would people be better off without it? *J. Am. Dent. Assoc.* 134: 450–455.
- Stock, D. W. 2001. The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 356: 1633–1653.
- Thomas, R. D. K. 2005. Hierarchical integration of modular structures in the evolution of animal skeletons. In W. Callebaut and D. Rasskin-Gutman (eds.). *Modularity: Understanding the Development and Evolution of Complex Natural Systems*. MIT Press, Cambridge, pp. 239–258.
- Wagner, G. P., and Altenberg, L. 1996. Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 50: 967–976.
- Weiss, K. M. 1990. Duplication with variation: metameric logic in evolution from genes to morphology. *Yearb. Phys. Anthropol.* 33: 1–23.
- Winther, R. G. 2001. Varieties of modules: kinds, levels, origins, and behaviors. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 291: 116–129.
- Witter, K., Lesot, H., Peterka, M., Vonesch, J.-L., Mišek, I., and Peterková, R. 2005. Origin and developmental fate of vestigial tooth primordia in the upper diastema of the field vole (*Microtus agrestis*, Rodentia). *Arch. Oral Biol.* 50: 401–409.
- Workman, M. S., Leamy, L. J., Routman, E. J., and Cheverud, J. M. 2002. Analysis of quantitative trait locus effects on size and shape of mandibular molars in mice. *Genetics* 160: 1573–1586.
- Young, R. L., and Badyaev, A. V. 2006. Evolutionary persistence of phenotypic integration: influence of developmental and functional relationships on complex trait evolution. *Evolution* 60: 1291–1299.

IV. Complément de discussion à la PUBLICATION 2

Dans l'étude de la PUBLICATION 2, nous avons confirmé l'hypothèse selon laquelle chaque molaire devait constituer un module à part entière, une interaction étant maintenue entre chaque module. De plus, nous avons vu que cette organisation modulaire reflétait les processus du développement sous-jacent connus chez les rongeurs. Par conséquent, il est possible d'affirmer qu'au sein de la rangée dentaire il existe une organisation modulaire du développement des trois molaires. En outre, en fonction du niveau d'intégration biologique considéré, il est possible d'émettre l'hypothèse d'une organisation hiérarchique des modules morphologiques, et donc développementaux, au sein de la rangée dentaire (Figure II. 14). Au niveau de la mandibule, la rangée dentaire constitue un module intégré mis en place par les champs morphogénétiques de molaires (niveau I ; Figure II. 14). Au sein de la rangée dentaire, les molaires sont développementalement indépendantes (modules réitératifs, niveau II ; Figure II. 14) mais maintenues par des interactions inter-modulaires (cascade d'inhibition). Ainsi, il apparaît pertinent de s'interroger sur la modularité des cuspides au sein de la dent.

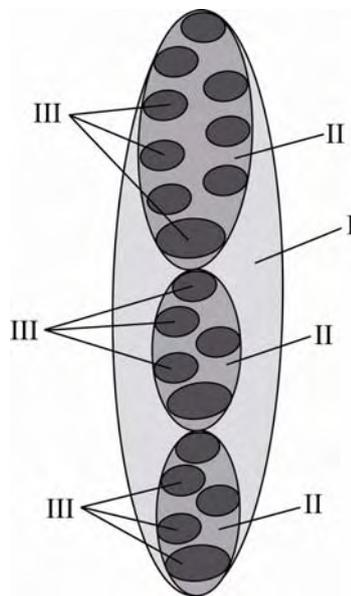


Figure II. 14 : Hypothèse d'organisation hiérarchique des modules morphologiques au sein de la rangée dentaire. Le premier niveau modulaire (I) définit l'intégration entre les trois dents par rapport à la mandibule. Le deuxième niveau (II) reflète chaque dent comme un module indépendant. Enfin, le troisième niveau modulaire (III) émet l'hypothèse que chaque cuspide peut constituer un module à part entière. Les niveaux modulaires (I) et (II) ont été démontrés statistiquement. Le niveau modulaire (III) nécessite d'être démontré.

Chapitre II

Toutefois, le modèle actuel qui permet de caractériser la mise en place des cuspidés dans le temps et dans l'espace est le modèle morphodynamique (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002). Or, ce modèle fait appel à des mécanismes développementaux, tels que la morphogénétique (dynamique du comportement cellulaire), qui ne sont pas pris en compte dans la mise en place des covariations des traits phénotypiques de la méthode de Klingenberg (2007). Seules les variations des mécanismes inductifs au sein des voies développementales sont considérées par Klingenberg (2005) pour expliquer la covariation des traits morphologiques. Or, les mécanismes morphogénétiques peuvent entraîner le même type de covariation mais par des processus différents des mécanismes inductifs. En effet, les traits morphologiques peuvent covarier par modification mécanique des cellules et par modification de leur propriété physique (ex. viscoélasticité, cohésion, Salazar-Ciudad *et al.*, 2003). Ces types de mécanismes ne sont encore pas décelables au niveau phénotypique.

Il n'en demeure pas moins que grâce à la modularité, il est possible de caractériser des mécanismes développementaux simples au niveau phénotypique. Par conséquent, si nous envisageons d'étudier l'évolution des processus développementaux au cours du temps chez les campagnols, il est nécessaire de faire ce même type d'étude, mais à partir de rangées dentaires fossiles. Dans la PUBLICATION 2, il est précisé que la caractérisation des interactions directes (qui définissent les mécanismes du développement) entre les molaires est obtenue grâce à la mesure de l'asymétrie fluctuante (AF). Or, l'asymétrie fluctuante nécessite l'étude des côtés droit et gauche du phénotype. Dans notre cas, il faudrait bénéficier des mandibules complètes de campagnol dans le registre fossile. Malheureusement il est très rare, voire impossible, de retrouver des mandibules droite et gauche appartenant au même individu dans le registre fossile. Parfois les maxillaires sont entiers, mais leur nombre reste de toute façon trop faible pour pouvoir faire les statistiques précises que nécessite l'AF. Il est vrai que l'étude de l'AF sur les grands mammifères fossiles pourrait être un peu plus aisée (mandibules droites et gauches plus facilement disponibles). Néanmoins, il reste le problème de la quantité de matériel disponible (quelques unités, voire dizaines) pour obtenir des résultats statistiques fiables.

Par conséquent, même si nous avons pu démontrer chez des campagnols actuels que l'organisation modulaire des dents reflétait les processus de développement sous-jacents, il paraît difficile d'appliquer cette méthode dans le fossile. Cependant, les résultats modulaires obtenus dans l'actuel permettent d'émettre des hypothèses sur l'évolution potentielle du patron dentaire. Si, comme nous l'avons montré, les molaires sont

considérées comme des modules indépendants au sein de la rangée dentaire, alors nous sommes en droit de penser que seuls des modifications majeures dans les voies développementales permettraient de changer le patron dentaire des campagnols.

Pour étudier l'évolution du patron dentaire des campagnols au cours du temps, il est possible d'utiliser le modèle de cascade d'inhibition (CI) développé par Kavanagh *et al.* (2007). L'intérêt majeur de ce type de modèle pour notre étude est que, non seulement les mécanismes mis en jeu sont relativement simples (rapport activateurs-inhibiteurs), mais aussi que les variations du phénotype (rapport de taille des molaires) reflètent ces mécanismes inter-dentaires. Comme ce type de modèle est applicable relativement facilement au matériel fossile (Polly, 2007), il est possible d'étudier l'évolution du patron dentaire chez les campagnols.

V. Evolution du développement dentaire chez les arvicolinés

Comme nous l'avons décrit dans la deuxième partie de ce chapitre, le modèle CI de Kavanagh *et al.* (2007) permet de prédire l'évolution du nombre et de la taille des molaires chez les mammifères au cours du temps à partir de mécanismes développementaux basés sur l'équilibre activateurs-inhibiteurs entre les molaires. Cependant, dans ce modèle, les campagnols présenteraient une particularité du fait de leur grande m1 (Kavanagh *et al.*, 2007). Dans la PUBLICATION 3, nous avons comparé le comportement des rapports de molaires entre les murinés et les arvicolinés afin de vérifier si le modèle de cascade d'inhibition était pertinent pour caractériser les dents d'arvicolinés. Si le modèle CI n'est pas approprié, n'existe-t-il pas un autre modèle mathématique caractérisant les relations entre les molaires chez les arvicolinés actuels et fossiles ? Que peut-on en déduire en termes de mécanismes développementaux sous-jacents dans la mise en place du patron dentaire chez les arvicolinés ? Dans ce cas, les résultats que nous avons obtenus sur la modularité des molaires au sein de la rangée dentaire refléteraient-ils toujours les mécanismes du développement ? Enfin, si nous mettons en évidence une évolution des mécanismes développementaux au cours du temps chez les arvicolinés, quelles conséquences cela aura-t-il sur les hypothèses évolutives de cette sous-famille ?

V.1 PUBLICATION 3

- PUBLICATION 3 -

**The evolution of mammal tooth patterns: new insights from a
developmental prediction model**

Elodie RENVOISE, Alistair EVANS, Ahmad JEBRANE, Catherine LABRUERE,
Rémi LAFFONT and Sophie MONTUIRE

Evolution (2009)

EVOLUTION OF MAMMAL TOOTH PATTERNS: NEW INSIGHTS FROM A DEVELOPMENTAL PREDICTION MODEL

Elodie Renvoisé,^{1,2} Alistair R. Evans,^{3,4} Ahmad Jebrane,^{5,6} Catherine Labruère,^{5,7} Rémi Laffont,^{1,8}
and Sophie Montuire^{1,9,10}

¹UMR CNRS 5561 Biogéosciences, University of Burgundy, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France

²E-mail: Elodie.Renvoise@u-bourgogne.fr

³School of Biological Sciences, Monash University, Victoria 3800, Australia

⁴E-mail: arevans@fastmail.fm

⁵Mathematical Institute of Burgundy, UMR 5584 CNRS, 9 Av. Alain Savary BP47870, 21078 Dijon, France

⁶E-mail: Ahmed.Jebrane@u-bourgogne.fr

⁷E-mail: Catherine.Labruere@u-bourgogne.fr

⁸E-mail: Remi.Laffont@u-bourgogne.fr

⁹Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Paléobiodiversité et Préhistoire, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France

¹⁰E-mail: Sophie.Montuire@u-bourgogne.fr

Received August 11, 2008

Accepted December 17, 2008

The study of mammalian evolution is often based on insights into the evolution of teeth. Developmental studies may attempt to address the mechanisms that guide evolutionary changes. One example is the new developmental model proposed by Kavanagh et al. (2007), which provides a high-level testable model to predict mammalian tooth evolution. It is constructed on an inhibitory cascade model based on a dynamic balance of activators and inhibitors, regulating differences in molar size along the lower dental row. Nevertheless, molar sizes in some mammals differ from this inhibitory cascade model, in particular in voles. The aim of this study is to point out arvicoline and murine differences within this model and to suggest an alternative model. Here we demonstrate that the inhibitory cascade is not followed, due to the arvicoline's greatly elongated first lower molar. We broaden the scope of the macroevolutionary model by projecting a time scale onto the developmental model. We demonstrate that arvicoline evolution is rather characterized by a large gap from the oldest vole to more recent genera, with the rapid acquisition of a large first lower molar contemporaneous to their radiation. Our study provides alternative evolutionary hypotheses for mammals with different trajectories of development.

KEY WORDS: Arvicolinae, evo-devo, evolution, inhibitory cascade, rodents.

Recent mammalian biodiversity is a consequence of complex life-history evolution influenced by dynamic, biotic, or abiotic phenomena. Palaeontologists have usually considered mammalian evolutionary patterns from morphological trait variations (e.g., Hunter and Jernvall 1995; Line 2003; Polly 2005; Evans

et al. 2007; Plavcan and Ruff 2008) in relation to environmental changes to interpret adaptive radiations, for instance. However, phenotypic and genetic processes leading to mammal morphological changes are often suggested but rarely demonstrated. Hence, one objective of developmental biology studies is to contemplate

developmental mechanisms that may influence these evolutionary changes (Salazar-Ciudad and Jernvall 2004).

A new model established from murine dental development has recently been proposed to predict evolutionary patterns in lower mammalian teeth (Kavanagh et al. 2007). By using tooth germ culture and by cutting the posterior tail that forms the second lower molar (m_2) from the first lower molar (m_1), Kavanagh and colleagues demonstrated that the m_2 arose significantly earlier and increased in size. In addition, induction of mesenchymal activators (*Bmp4* and *activin* βA ; signaling molecules which activate tooth development) significantly accelerated the formation of m_2 without cutting it from the m_1 . Then, they deduced that the timing of the initiation of the posterior molars depends on previous molars through a dynamic balance between intermolar inhibition and mesenchymal activation.

Consequently, this model is constructed as an inhibitory cascade model (IC model) based on the dynamic balance between inhibitors (i) and activators (a), defined by the ali ratio. They underlined that changes in the ali ratio produce modifications in molar tooth proportions and lead to different dental phenotypes between m_1 , m_2 , and third lower molar (m_3). Moreover, low ali leads to a relatively larger first lower molar, whereas high ali results in more equal molar sizes, and if ali is very high (above 1.0), the posterior molars will be larger. Extrapolation of the IC model allows ali to be estimated from molar proportions in extant and particularly in fossil species (Polly 2007), helping to infer evolutionary processes in different taxa at a macroevolutionary scale. However, some taxa do not fit their model (bears, horses, and voles).

Voies, in particular, are not consistent with the model due to their oversized first lower molar (m_1) compared with m_2 and m_3 size (Kavanagh et al. 2007). Contrary to murines, voles are characterized by hypsodont prismatic molars formed by enamel triangles. The number of triangles can be variable between vole genera. Cement is present inside the reentrant angles of the triangles. These are reasons why vole molars have increasingly been used as a parallel model to improve our knowledge of rodent cheek tooth development (e.g., Keränen et al. 1998; Jernvall et al. 2000a; Salazar-Ciudad and Jernvall 2002; Matalova et al. 2005; Witter et al. 2005; Setkova et al. 2006). Furthermore, voles are considered, among terrestrial mammals, as good models to study evolutionary mechanisms and they account for one of the most widely diversified mammal groups of the Quaternary (Chaline 1972; Chaline and Mein 1979; van Kolfschoten 1990; Fejfar and Repenning 1992; Nadachowski 1992; von Koenigswald 1992; van Kolfschoten 1992; Sesé 1995; Montuire and Desclaux 1997; Montuire et al. 1997; Montuire 1999; Montuire and Marcolini 2002).

The aim of our study is to characterize the peculiarity of arvicoline lower molars (voles and lemmings) within the IC model

framework and define another model based on molar areas. Can we better understand the vole and lemming developmental distinctiveness if we compare them to murines using this IC model? Given that differences are noticeable, what hypotheses can be suggested to explain the divergence in the vole dental trajectory?

Recently, dental phenotypic variability has been investigated with character measurements on both extant and fossil populations to detect the causal effects leading to arvicoline diversification (Nadachowski 1984; Marchand et al. 2003; Montuire and Brunet-Lecomte 2004; Nappi et al. 2006). We project arvicoline fossil data onto the developmental model of Kavanagh et al. (2007). Indeed, a recent study insists on the necessity of a time scale in evolutionary developmental biology (Raff 2007). Thereby, we can explore a real macroevolutionary trend through time within vole and lemming molar ratios to emphasize evidence of past developmental features in the arvicoline radiation.

Materials and Methods

EXTANT AND FOSSIL LOWER DENTAL ROW SPECIMENS

Photographs and drawings of scaled lower dental rows from extant and fossil arvicoline individuals (voles and lemmings) were compiled from both literature and rodent collections stored at the University of Burgundy and International Campus of Baillarguet (France, see Supporting Information). All tribes defined in voles and lemmings from Eurasia and North America are represented (McKenna and Bell 1997). Twenty genera of arvicoline rodents covering a wide spectrum of morphological variability in each tribe were considered. All individuals were classed into two groups: (1) 14 genera of fossil individuals, (2) eight genera of extant individuals. Data for mice are from Kavanagh et al. (2007) supporting information. Extant and fossil cricetines are considered as the ancestral tooth pattern for arvicoline and murine molars (Hartenberger 1998; Fejfar 1999; Kálin 1999). They were obtained by our measurements from literature illustrations of scaled lower dental rows and rodent collections of the National Museum of Natural History in Paris (France).

For extant vole specimens, an attempt was made to measure 30 individuals per genus. For fossil vole specimens, the entire lower dental row is rarely preserved, however, a few individuals were nonetheless available (1 to 9; see Supporting Information). Our dataset for arvicolines consists of more than 230 area measurements of complete lower dental rows (see Supporting Information).

METHODS

Lower molar size is estimated using the area of the occlusal surface. Two different proxies can be used to measure tooth area: (1) length by width or (2) outline surfaces. In arvicolines, these two

measurement proxies have been tested. Because of their complex and prismatic outline, the area measurements between the two proxies are significantly different (nonparametric Wilcoxon test, normal approximation: $z = 4.096$, $P = 4.1 \times 10^{-5}$). The length by width overestimates the area calculation. Therefore, the outline surface measurements were used in this study.

To compare our vole data with murine area measurements obtained by Kavanagh et al. (2007), we used the same software, Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), to measure the occlusal surface area. The number of pixels within the tooth outline was calculated by the software. We used drawings of vole teeth from camera lucida because Image J does not automatically extract the outline of the molars directly from pictures.

The IC model examines how lower molar initiation and size in the mouse are regulated along the dental row. The lower molar teeth develop from the anterior to the posterior of the dental row. The activation–inhibition balance leads to equal-sized molars, whereas increasing inhibition has a cumulative effect from the second to the third molar. Relative lower molar size consequently reflects this inhibitory cascade throughout molars following the equation:

$$Y = 1 + [(a - i)/i](X - 1),$$

where Y is molar size relative to its position; X is molar position (e.g., 1, 2, 3 . . .), a is activator, and i is inhibitor.

The $(a - i)/i$ represents the relative strengths of the activators versus the inhibitors.

The above equation gives, for molar areas, $m1 = 1$; $m2 = ali$ and $m3 = 2ali - 1$. The relationship between the molar proportions ($m2/m1$ vs. $m3/m1$) is $m3/m1 = 2(m2/m1) - 1$. Thus, $m2/m1$ versus $m3/m1$ demonstrates the inhibitory cascade along the tooth row. For mammals with three molars, applying the ali ratio, $m2$ will be one-third of the total molar area ($m1 + m2 + m3$). Moreover, high ali leads to equal lower molar size, whereas low ali results in a relatively larger first lower molar.

In the case of simple linear regression, several approaches may be used: least-square adjustment, major axis, and reduced major axis. For comparisons with Kavanagh et al.'s results, the relationships between molar ratios are plotted with PAST version 1.71 (Hammer et al. 2001), using reduced major axis (Model II regression, for $m2/m1$ vs. $m3/m1$ and for $m2$ vs. [$m1 + m2 + m3$]). In the Model II regression line, only the Pearson correlation coefficient “ r ” is calculated and tested against nullity. In fact, the determination coefficient “ R^2 ” is only the squared-value of “ r ” and does not provide further information (e.g., about the amount of explained variance, as in a least-square model; G. Escarguel, pers. comm. 2008).

The inhibitory cascade random model (ICR model), defined by Kavanagh et al. (2007), is here applied on arvicoline data to compare with a model in which the ali ratio varies along the dental

row. Model randomizations and calculations of 10,000 reduced major-axis regressions were performed in a MATLAB function (MathWorks, Inc., Natick, MA). Then, predicted $m3/m1$ ratios are calculated from 10,000 randomized reshuffled (without replacement) $m2/m1$ ratios by the equation:

$$(m3/m1)_{Exp} = m2/m1 - 1 + (m2/m1)_{Shuf},$$

where $(m3/m1)_{Exp}$ is the expected ratio of $m3/m1$, $m2/m1$ is the molar ratio of a given individual, and $(m2/m1)_{Shuf}$ is the reshuffled $m2/m1$ ratio within individuals.

Different analyses of $m2/m1$ versus $m3/m1$ were performed: (1) on extant arvicoline data, to compare with the IC model based on mice and (2) on extant and fossil arvicoline measurements to underline the evolutionary trajectory in molar proportions at the subfamily level.

Results

ARVICOLINE DATA AND THE KAVANAGH ET AL. MODEL

As with the mouse measurements made by Kavanagh et al. (2007), the lower molar proportions of recent arvicolines are included in the same square: $0 \leq m2/m1 \leq 1$ and $0 \leq m3/m1 \leq 1$.

The comparison of the IC model in mouse in Kavanagh et al. (2007) and recent vole and lemming regressions (Fig. 1) demonstrates that the 95% confidence interval (95% CI) of the slope of vole and lemming data is clearly different from the 95% CI of the slope of mouse data (Table 1). A randomization of our arvicoline measurements has been performed by the ICR model (Kavanagh et al. 2007) leading to an average equation with a slope parallel to the murine ICR model equation ($y = 1.413x - 0.668$ for arvicolines; $y = 1.404x - 0.529$ for murines). Furthermore, the mean of the arvicoline slope falls in the 95% CI of the randomized proportions for murines and vice versa (Table 1). The ICR model defined by Kavanagh et al. (2007, see Materials and Methods) represents three categories of lower molar proportions that are predicted by the change of the strength of the inhibition along the dental row: $m1 = m2 > m3$; $m1 \gg m2 > m3$. Most arvicolines fit in the group in which $m1 \gg m2 = m3$, which is close to the $m1 \gg m2 > m3$ predicted by the murine ICR model (Fig. 1). All the lemmings fit in the group in which $m1 > m2 = m3$. Even if the equations of the ICR model for arvicolines (own data) and murines (see Kavanagh et al. 2007) are a mean of all the different regressions generated, not only the slope and intercept values of extant voles and lemmings, but also the 95% CI, are comparable to the ICR models.

In addition, some arvicoline individuals fall within the upper range of the murine distribution (Fig. 1). Two individuals belong to the equal size molars of the murine distribution, and only one extreme arvicoline individual (*Prometheomys schaposchnikowi*)

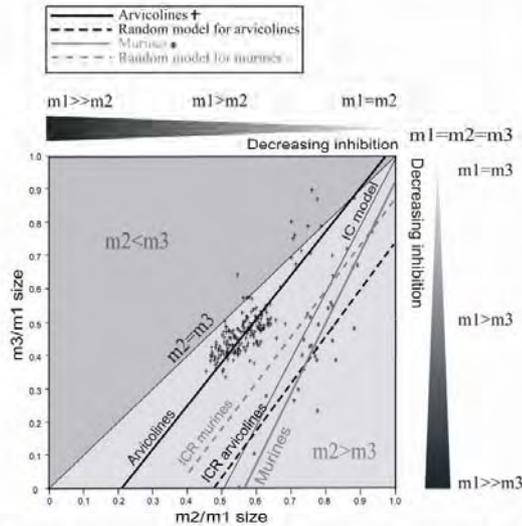


Figure 1. Comparison of extant arvicoline (184 individuals in 12 species) and murine (29 individuals in 29 species) molar proportions in the Kavanagh prediction model. The slope drawn through the extant arvicoline molar sizes (black crosses and line) is 1.389 and the intercept is -0.313 (Table 1). We note the parallelism between arvicoline and random molar prediction regressions (gray dashed line; Kavanagh et al. 2007; black dashed line; this study), whereas arvicoline and murine (gray line) regressions are not parallel. Throughout the murine regression, the decreasing inhibition trajectory provides changes in molar sizes. High inhibition leads to smaller posterior molar. In contrast, low inhibition leads to more equal-sized molar (for more information, see Kavanagh et al. 2007).

has a molar relationship of $m1 > m2 > m3$. For equal molar size murines, only one species (*Hyomys goliath*) falls within in the range of arvicoline molar proportions (Fig. 1).

THE ARVICOLINAE SUBFAMILY

In our extant arvicoline measurements, lower molar proportions in all individuals seem to show a linear regression ($y = 1.389x - 0.313$; Table 1). Most arvicolines (78%) are represented by low values of molar proportions ($m2/m1$ and $m3/m1 < 0.7$) in which the posterior molars $m2$ and $m3$ are much smaller than $m1$: $m1 \gg m2 = m3$ (Fig. 2). Nevertheless some groups of individuals show different molar proportions compared to this general pattern in which $m1 > m2 > m3$ (15%) or $m1 > m2 < m3$ (0.5%, Fig. 2). Another group (Fig. 2), belonging to the *Lemmus* genus, can be distinguished with high molar proportion values ($m2/m1$ and $m3/m1 > 0.70$) in which the molars $m2$ and $m3$ are slightly smaller than $m1$: $m1 > m2 = m3$. An analysis of variance (ANOVA; Model I) and an a posteriori Scheffe's test were performed between all recent arvicoline genera and *Lemmus* was always significantly different from the other genera (for $m2/m1$ and $m3/m1$ $P < 0.001$; Scheffe's test). Consequently, *Lemmus* seems to be different from all other extant arvicolines. Within the arvicolines, one genus, *Prometheomys* (represented by a unique species, *Prometheomys schaposchnikowi*) (Kryštufek and Vohralík 2005; Musser and Carleton 2005) is very far from the general molar proportions ($m2/m1 = 0.70$; $m3/m1 = 0.26$) because of its small $m3$ (Figs. 2, 3). In addition, it is noteworthy that, in the arvicoline macroevolutionary pattern, we observe a change in $m2/m1$ and $m3/m1$ ratios (at about the 0.7 value) between the most frequent scheme with $m1 \gg m2 = m3$ and that with $m1 > m2 = m3$ (Fig. 2).

Table 1. Reduced major-axis regression analysis of arvicoline molar size, arvicoline reduced $m1$ size, and cricetine measurements. The values obtained by Kavanagh et al. (2007) on murines were added for comparisons. Apart from the plot $m2$ versus total dental row area in which regression is based on model I, all the others are based on a model II regression. Only the Pearson coefficient " r " is calculated to represent the distribution as " R^2 " is only the square of " r " and does not indicate the correlation coefficient in a model II regression (see Material and Methods).

Data	Associated figures	Slope	95% CI	Intercept	95% CI	r
Extant arvicolines	Fig. 1 and 2	1.390	1.208; 1.555	-0.313	-0.407; -0.213	0.771
Extant murines	Fig. 1 and 2	2.150	1.772; 2.688	-1.219	-1.651; -0.925	0.740
Random model arvicolines	Fig. 1	1.413	1.323; 1.502	-0.668	-0.718; -0.616	0.860
IC model	Fig. 1 and 2	2.00	-; -	0.000	-; -	1.0
Random model murines	Fig. 1	1.404	1.141; 1.673	-0.529	-1.247; -0.584	0.702
Fossil arvicolines	Fig. 2	1.179	0.943; 1.509	-0.233	-0.410; -0.100	0.697
Extant + fossil arvicolines	Fig. 2	1.381	1.219; 1.534	-0.316	-0.403; -0.225	0.750
$m2$ versus total area arvicolines	Fig. 3	3.380	3.308; 3.447	0.325	0.229; 0.421	0.994
$m2=1/3$ total area IC model	Fig. 3	3.000	-; -	0.000	-; -	1.000
Voies	Fig. 5	1.380	1.219; 1.534	-0.316	-0.403; -0.225	0.749
Lemmings	Fig. 5	1.887	0.982; 3.167	-0.623	-1.540; -0.016	0.209
Extant + fossils arvicolines with reduced $m1$	Fig. 6B	1.543	1.191; 1.877	-0.559	-0.814; -0.297	0.787
Cricetines	Fig. 4	1.631	1.191; 2.274	-0.796	-1.393; -0.373	0.876

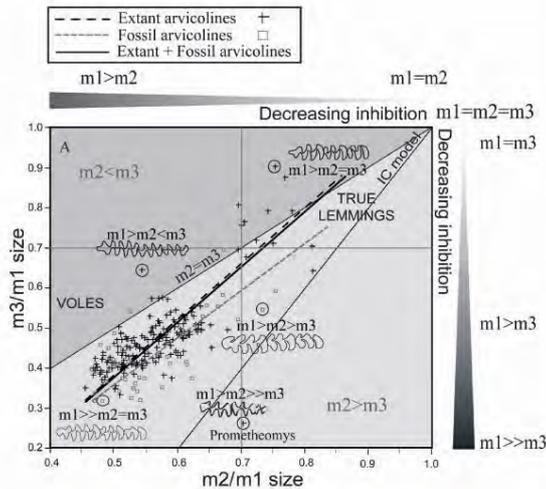


Figure 2. The arvicoline subfamily. Extant and fossil molar proportions. The extant and fossil slope regression (1.378; black solid line; Table 1) is more affected by the number of extant data (black crosses and black dashed line: $y = 1.389x - 0.313$; see Table 1) than the fossil data (gray squares and gray dashed line: $y = 1.169x - 0.228$; see Table 1). We observe decreasing inhibition between the majority of arvicolines, with $m1 \gg m2 = m3$, and the other individuals, mostly lemmings, with $m1 > m2 = m3$. True lemming and vole morphological spaces are delimited by perpendicular gray lines. Tooth row drawings illustrate different molar proportions, with their corresponding symbol circled. $m1 \gg m2 = m3$, $m1 > m2 < m3$, $m1 > m2 > m3$, and $m1 > m2 = m3$ represent *Microtus agrestis*, *Lagurus lagurus*, *Clethrionomys glareolus*, and *Lemmus lemmus*, respectively. The outlier of the regression, *Prometheomys schaposchnikowi* ($m1 > m2 \gg m3$), is also represented with a drawing.

We can also notice that the arvicoline second lower molar is not one-third of total lower molar area, $m2 \neq 1/3 (m1 + m2 + m3)$ (Fig. 4) contrary to the specific result obtained by the IC model.

THE ARVICOLINAE EVOLUTIONARY PATTERN

We focused our study on the evolutionary pattern of lower molar proportions within the arvicoline subfamily. Kavanagh et al. (2007) did not use fossil data and Polly (2007) did not use this level of organization to study macroevolutionary patterns. Therefore, we added measurements of fossil arvicolines, belonging to extinct and recent tribes, to investigate whether a temporal trajectory can be found in molar proportions within this subfamily. In addition, as cricetines represent an ancestral lineage for arvicolines (Conroy and Cook 1999; Fejfar 1999; Kälin 1999; Stepan et al. 2004), molar proportions of fossil and extant cricetine genera are used to polarize the arvicoline evolutionary trajectory.

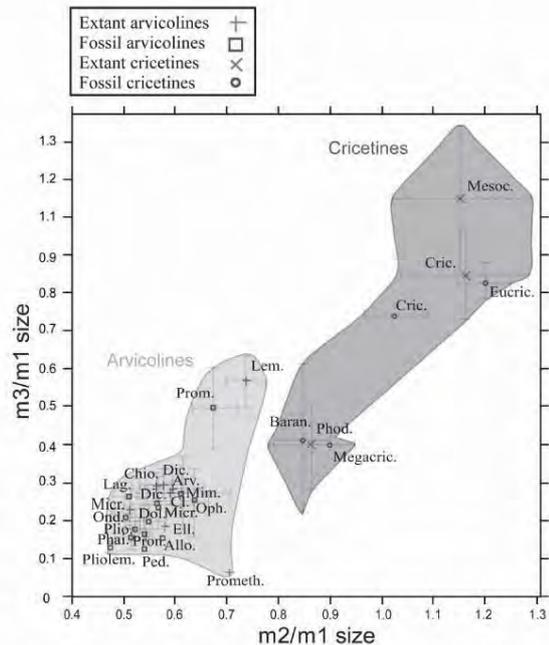


Figure 3. Means of molar proportions in arvicolines (light gray area) and cricetines (dark gray area), extant and fossil genera. Ancestral molar proportions of cricetines polarize the phenotypic trajectory of arvicolines. Fossil genus abbreviations for arvicolines (black open squares) and cricetines (black open circles): Allo., *Allophaiomys*; Cric., *Cricetus*; Dicro., *Dicrostonyx*; Dol., *Dolomys*; Lag., *Lagurus*; Mesoc., *Mesocricetus*; Micr., *Microtus*; Mim., *Miomomys*; Ond., *Ondatra*; Oph., *Ophiomys*; Ped., *Pedomys*; Phai., *Phaiomys*; Phod., *Phodopus*; Plio., *Pliomys*; Pliolem., *Pliolemmus*; Prom., *Promiomys*; Pron., *Proneofiber*. Extant genus abbreviations for arvicolines (gray crosses) and cricetines (gray diagonal crosses): Arv., *Arvicola*; Chio., *Chionomys*; Cleth., *Clethrionomys*; Cric., *Cricetus*; Dicro., *Dicrostonyx*; Ell., *Ellobius*; Eucric., *Eucricetus*; Lem., *Lemmus*; Megacric., *Megacricetus*; Micr., *Microtus*; Prometh., *Prometheomys*.

Even though we included all the area measurements of fossil arvicolines (14 genera, 47 individuals; Fig. 2 and Table 1), the equation of the general regression (extant and fossil data) was not visibly changed as 95% CI for slope and intercept are overlapping in comparison with the equation obtained from extant data only (Fig. 2 and Table 1). This could, in part, be due to the much greater sample size of the extant compared to the fossil data. As with extant arvicolines, many fossils have low values of molar proportions (i.e., the $m1$ is greater than $m2$ and $m3$), falling off the predicted inhibitory cascade line. All of the proportion values obtained in arvicoline fossils are always lower than the highest values in arvicolines (i.e., *Lemmus*).

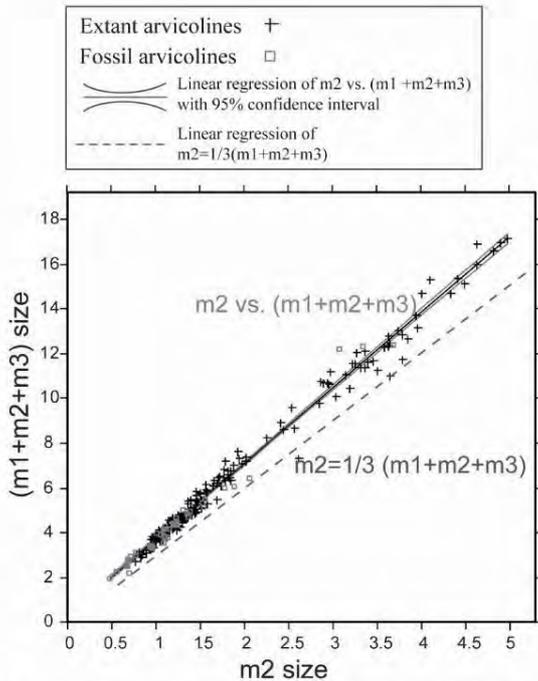


Figure 4. Relation between m_2 size and total molar area in arvicolines compared with the m_2 equal one-third of the total molar area predicted by the IC model. The equation ($y = 3.380x + 0.325$; Table 1), based on fossil and extant arvicolines, demonstrates that m_2 is lower than one-third of the total molar area. The arvicoline m_2 is too small compared to the IC model. Gray arcs represent the 95% confidence interval.

Figure 3 shows the lower molar proportion mean values of all arvicolines and cricetines to identify the different genera. In this plot, in accordance with the distribution of all individuals (Fig. 2), the majority of the genera are concentrated in the lowermost region of molar proportion values. Not only are *Lemmus* and *Prometheomys* far outside the general distribution of the arvicolines, but so is the fossil genus *Promimomys*, which is the oldest arvicoline found in the Holarctic region ($\approx 6\text{--}3.8$ Ma) (Chaline 1987; McKenna and Bell 1997; Chaline et al. 1999; Kowalski 2001). *Mimomys*, represented by nine individuals, expresses a greater standard deviation than the other arvicoline genera. This genus also represents transitional molar proportions from *Promimomys* to the other fossil and extant arvicolines (Fig. 2). Cricetine lower molar proportions ranged from 0.86 to 1.20 for m_2/m_1 and from 0.60 to 1.25 for m_3/m_1 , which are always higher than arvicolines (except for *Lemmus*). Therefore, m_2/m_1 and m_3/m_1 in cricetines can be higher than 1. This means that m_2 or m_3 is larger than m_1 : $m_1 < m_2 = m_3$ or $m_1 < m_2 < m_3$. Among

cricetines, a large difference is observed between two main groups formed by high values of molar proportions *Mesocricetus*, *Crice-tus*, *Eucricetus* ($m_2/m_1 = 0.93$ to 1.36 and $m_3/m_1 = 0.89$ to 1.510 : $m_1 = m_2 = m_3$) and lower values of molar proportions *Baranomys*, *Phodopus*, *Megacricetodon* ($m_2/m_1 = 0.72$ to 0.99 and $m_3/m_1 = 0.44$ to 0.82 : $m_1 > m_2 > m_3$). Within the arvicoline group, a smaller difference can be noticed between *Promimomys* and the other arvicolines, that is, between $m_1 > m_2 = m_3$ and $m_1 \gg m_2 = m_3$. In addition, *Prometheomys* can be considered far outside the other group of arvicolines (Fig. 3).

A NEW MODEL FOR THE ARVICOLINAE

With the IC model, we were not able to predict the peculiar vole molar proportions. To determine the best mathematical model available to reflect vole lower molar proportions, several simple linear regressions were tested: least-square adjustment, major axis, and reduced major axis, but all of them are unsatisfactory in term of regression coefficient ($R^2 = 0.56$ in least-square regression and the explained variance by the major axis and reduced major axis is about 0.50). In addition, the requirement of normality for these regressions is not met by the molar ratio data. For these reasons, it was necessary to find another model which best fits the relationship between the three molars: the multiple regressions.

In the multiple regressions of three variables (m_1 , m_2 , and m_3), the best relationship (minimizing the vertical least squares) for fitting the three-dimensional point cloud data is checked. It amounts to determining the b_0 , b_1 , and b_2 coefficients such as:

$$m_3 = b_0 + b_1 m_1 + b_2 m_2 + \epsilon$$

where ϵ = residual.

This method enables the calculation of the significant coefficients and gives the proportion R^2 of variance explained by the model. To highlight the dynamic relationships between the molar areas, we start with the explanation of the variable m_3 as a function of m_1 and m_2 (multiple regressions), then, m_2 as a function of m_1 and, m_3 as a function of m_2 (simple regressions). This approach is justified by the high values of simple correlations between the three molar areas (see R^2 values in Table 2).

To validate this model we applied it to the murine molar areas available in the Kavanagh et al. datasets. The multiple and simple regression results obtained for murines are presented in Table 2A. We will now look in detail at these results. For each regression presented below, only those coefficients significantly different from zero will be included in the formulas.

Contrary to voles, the multiple regressions on murines show that the m_3 size is simply predicted by the m_1 size:

$$m_3 = 0.66 m_1$$

Table 2. Results on multiple and simple regressions on murine data (A), from Kavanagh et al. (2007), arvicoline data (B), without outliers, vole data (C), lemming data (D), and cricetine data (E). Bold characters correspond to significant probabilities (*P* level) for the *b* coefficients affected to the variables. Orig. Ord., Origin ordinate.

A	Murines <i>n</i> =29	<i>b</i> coefficients	<i>P</i> level	C.I. min (95%)	C.I. max (95%)	<i>R</i> ²
	<i>m3</i> versus <i>m1m2</i>					
	Orig. Ord.	-0.940	0.154	-2.257	0.376	0.837
	<i>m1</i>	0.655	0.000	0.381	0.928	
	<i>m2</i>	0.068	0.678	-0.263	0.399	
	<i>m2</i> versus <i>m1</i>					0.789
	Orig.Ord.	0.047	0.951	-1.522	1.617	
	<i>m1</i>	0.733	0.000	0.583	0.883	
	<i>m3</i> versus <i>m2</i>					0.684
	Orig. Ord.	0.008	0.993	-1.702	1.717	
	<i>m2</i>	0.772	0.000	0.565	0.979	
B	Arvicolines <i>n</i> =225	<i>b</i> coefficients	<i>P</i> level	C.I. min (95%)	C.I. max (95%)	<i>R</i> ²
	<i>m3</i> versus <i>m1m2</i>					0.957
	Orig. Ord.	0.027	0.330	-0.027	0.081	
	<i>m1</i>	-0.275	0.000	-0.343	-0.207	
	<i>m2</i>	1.298	0.000	1.192	1.405	
	<i>m2</i> versus <i>m1</i>					0.945
	Orig. Ord.	-0.134	0.000	-0.199	-0.070	
	<i>m1</i>	0.619	0.000	0.600	0.638	
	<i>m3</i> versus <i>m2</i>					0.944
	Orig. Ord.	-0.073	0.008	-0.128	-0.019	
	<i>m2</i>	0.878	0.000	0.850	0.907	
C	Voies <i>n</i> =213	<i>b</i> coefficients	<i>P</i> level	C.I. min (95%)	C.I. max (95%)	<i>R</i> ²
	<i>m3</i> versus <i>m1m2</i>					0.973
	Orig. Ord.	-0.005	0.811	-0.042	0.033	
	<i>m1</i>	0.004	0.907	-0.060	0.068	
	<i>m2</i>	0.807	0.000	0.701	0.913	
	<i>m2</i> versus <i>m1</i>					0.970
	Orig. Ord.	-0.098	0.000	-0.144	-0.052	
	<i>m1</i>	0.594	0.000	0.579	0.608	
	<i>m3</i> versus <i>m2</i>					0.973
	Orig. Ord.	-0.004	0.833	-0.038	0.030	
	<i>m2</i>	0.813	0.000	0.795	0.832	
D	Lemmings <i>n</i> =12	<i>b</i> coefficients	<i>P</i> level	C.I. min (95%)	C.I. max (95%)	<i>R</i> ²
	<i>m3</i> versus <i>m1m2</i>					0.611
	Orig. Ord.	0.364	0.673	-1.524	2.252	
	<i>m1</i>	0.368	0.488	-0.774	1.510	
	<i>m2</i>	0.426	0.501	-0.949	1.800	
	<i>m2</i> versus <i>m1</i>					0.86
	Orig. Ord.	-0.148	0.738	-1.111	0.813	
	<i>m1</i>	0.771	0.000	0.552	0.989	
	<i>m3</i> versus <i>m2</i>					0.588
	Orig. Ord.	0.649	0.389	-0.956	2.253	
	<i>m2</i>	0.837	0.004	0.343	1.330	

Continued.

Table 2. Continued.

E	Cricetines <i>n</i> =34	b coefficients	<i>P</i> level	C.I. min (95%)	C.I. max (95%)	<i>R</i> ²
	<i>m3</i> versus <i>m1m2</i>					0.962
	Orig. Ord.	-0.043	0.552	-0.187	0.102	
	<i>m1</i>	-0.192	0.276	-0.544	0.161	
	<i>m2</i>	1.089	0.000	0.780	1.398	
	<i>m2</i> versus <i>m1</i>					0.954
	Orig. Ord.	-0.066	0.420	-0.230	0.098	
	<i>m1</i>	1.115	0.000	1.028	1.202	
	<i>m3</i> versus <i>m2</i>					0.960
	Orig. Ord.	-0.068	0.322	-0.205	0.069	
	<i>m2</i>	0.925	0.000	0.858	0.991	

Simple regressions indicate that *m2* size is strongly influenced by *m1* size ($m2 = 0.73 m1$) and that *m3* size is equally influenced by *m2* size ($m3 = 0.77 m2$). As the Kavanagh et al. model suggests, the *m1* inhibits both the *m2* and the *m3*.

Table 2B shows the multiple regression results obtained from the global sample of arvicolines. The obtained residuals follow a normal distribution. When the value of residuals for an individual was very high, it was considered that it was not well represented by the model and was analyzed separately. Most of the individuals with high residual values correspond to lemmings, but also included *Prometheomys* and *Allophaiomys* (see Supporting Information). For the global sample of arvicolines, the multiple regressions between *m3* versus *m2* and *m1* (Table 2B) give a model in which an influence of both *m1* and *m2* is registered on the *m3* by the equation:

$$m3 = -0.28 m1 + 1.30 m2$$

It can be noticed that the *m1* influence on *m3* is assigned with a negative coefficient. The *m2* size has a positive influence on the *m3*: as the *m2* get larger, the *m3* get 1.3-fold larger. Simple regression between *m2* and *m1* (Table 2B) gives a model in which

$$m2 = -0.13 + 0.62 m1$$

The *m2* size is much smaller than the *m1* size. The *m1* has a positive influence on *m2*. These two molars evolve in parallel with a proportional coefficient of 62%. Simple regression between *m3* and *m2* (Table 2B) indicates that

$$m3 = -0.07 + 0.88 m2.$$

The sizes of *m2* and *m3* are quite similar but *m3* is consistently smaller.

Detailed analysis of the residuals shows that most of the lemmings (50%) are not well represented by this mathematical model (the *R*² coefficient is closer to 1 without these individuals). It is then justified to consider voles and lemmings separately

within the model. For voles only (Table 2C) the same multiple and simple regressions were done on the 213 remaining individuals. The results summarized in the Table 2C show that, for the multiple regressions, the *m1* does not influence significantly the *m3* size prediction as the equation gives:

$$m3 = 0.81 m2$$

However, the relationship between *m1* and *m2* areas is close to the model defined in the global sample as:

$$m2 = -0.10 + 0.59 m1$$

In voles, the relationships between the three molars indicate that *m1* has no influence on *m3* but has a great influence on *m2*. Only the *m2* can predict the *m3* size. Therefore, there is mediation between the three molars. The *m2* can be seen as the mediator variable between *m1* and *m3*.

For the lemming data (Table 2D), the multiple regression model is unsatisfactory for two reasons: (1) none of the b coefficients of the model are significant and (2) the *R*² coefficient is not as high as for voles. There is probably a sample bias as only 12 individuals are taken into account. Nevertheless, in simple regression, the *m1* and *m2* sizes relationship is relevant (*R*² = 0.86) as

$$m2 = 0.77 m1$$

A fundamental difference is underlined here between the vole and lemming area relationships of *m1* and *m2*. The influence of *m1* is higher in the lemming group than the vole group. However, the *m2* influence on the *m3* is similar in the two groups.

Furthermore, we tested this multiple regression model on the cricetine molar areas, as they represent an ancestral molar pattern for arvicolines and murines. We obtained another model closer to the vole model. Indeed, Table 2E shows a multiple regression

model in which only the $m2$ size predicts the $m3$ size and $m2$ size is equal to $m3$ size:

$$m3 = 1.09 m2$$

For the linear regressions, the influence between $m1$ and $m2$ ($m2 = 1.12 m1$) is equivalent to the influence of $m2$ on $m3$ ($m3 = 0.93 m2$).

Discussion

ARVICOLINAE DEVELOPMENTAL NOVELTY

Our results reinforce the peculiarity of voles and lemmings and develop the possibility that the linear IC model may not be applied across all mammals. We highlight a phenotypic tendency in arvicolines from $m1 \gg m2 = m3$ to $m1 > m2 = m3$. This phenomenon could be explained by a varying inhibition for $m1$ throughout development of the lower dental row (Figs. 1, 2) or by a discontinuation of the influence of $m1$ on the remainder of the tooth row after some point in time. Therefore, we have demonstrated that this model, established from murine measurements, does not predict adequately molar proportions in arvicolines. In fact, a multiple regression model is more appropriate to reflect the arvicoline molar relationships. Our measurements show that all arvicolines have a large $m1$ compared to the other molars and that their $m2$ size is almost always equal to the $m3$ size. This singularity of arvicoline $m1$ has already been underlined by Jernvall et al. (2000a) and Salazar-Ciudad and Jernvall (2002) who suggest that arvicoline $m1$ development is different from murine $m1$, but also from other mammals (Kavanagh et al. 2007). Three hypotheses can be formulated.

First, Kavanagh et al. (2007) hypothesized that the greatly elongated anterior part of the arvicoline $m1$, observed by Jernvall et al. (2000a) and Guthrie (1965), is allowed during development by the absence of premolars in the anterior part of the lower dental diastema. In addition, rodents with large lower fourth premolar ($p4$) erupted (e.g., gliroids, sciurids) do not have an elongated $m1$ in the anterior part compared to the $m2$ and $m3$ (Hillson 2005). Furthermore, Viriot et al. (2002) has demonstrated in murine lower jaws that, historically, the loss of premolars through time may have favored the formation of more anteroconid cusps. Then, it would be advocated that the ultimate reason for why the $m1$ "could" elongate is the lack of premolars.

Second, it was demonstrated that the longitudinal growth of $m1$ is faster in voles than in mice (Jernvall et al. 2000a). So, at the same embryonic time (embryonic day 15), the acceleration of the longitudinal development of the first lower molar in voles can explain their greatly elongated anterior part. Furthermore, diagonal spatial shifting of cusps in voles is explained by a model in which: (1) longitudinal growth is higher, and (2) more inhibition

of activators by inhibitors is involved in $m1$ development (Salazar-Ciudad and Jernvall 2002), that is, the a/i ratio decreases, in the IC model. As a result, the hypothesis of faster growth for arvicoline $m1$, in relation to murine $m1$, is congruent with experimental and model results, to explain partly the elongated $m1$ in arvicolines.

Third, it can be hypothesized that, compared to mice, the larger anterior part of the lower $m1$ in voles can result from the incorporation of more proximal diastemal (premolar) buds into the $m1$ in voles than in mice. Peterková et al. (2006) suggested that arvicolines incorporate two vestigial buds in their lower $m1$ anterior part, whereas only one is incorporated in the mouse. This hypothesis in the mandible can be supported by results obtained in molar development in the maxilla. During development, differences between the vole and mouse are noted in the number of incorporated premolar buds into the $m1$ anterior part. One bud is incorporated in the vole $m1$ at the end of the bud stage (embryonic day 14), whereas no buds are incorporated in the mouse (Witter et al. 2005). However, the incorporation of one vestigial premolar does not involve an elongation of the anterior part, neither for the upper $m1$ of voles, nor for the lower $m1$ of mice. In voles, the elongation is usually situated in the posterior part of the third upper molar (Guthrie 1965). It is then difficult to advocate a great elongation of the lower $m1$ anterior part with the incorporation of vestigial premolars, even with two vestigial buds, without strong developmental observations on vole teeth to confirm it.

Consequently, the highly elongated first lower molar of arvicolines might rather be explained by a faster growth of the anterior part (ED = 15), which may be favored by the premolar disappearance in the diastema (ED = 14). In addition, the fast growth of the $m1$ anterior part may be related to a strong decrease of the a/i ratio within the molar.

ARVICOLINAE DEVELOPMENTAL SCENARIOS

The multiple regression model does not demonstrate the mechanisms involved in the varying molar proportions, but instead it describes the best relationships that exists between the molars. We demonstrate in arvicolines that $m1$ influences the $m2$ size ($m1 \gg m2$) and that both $m1$ and $m2$ can predict the $m3$ size. However, for voles, only the $m2$ area predicts the $m3$ size and the $m1$ does not predict the $m3$ size. Therefore, it is possible that $m2$ mediates the effect of $m1$ on $m3$. Afterwards, we might hypothesize that the inhibition of $m1$ on $m2$ may increase and the inhibition of $m2$ on $m3$ may decrease. We have already seen that a part of the greatly elongated $m1$ of voles may be explained by an increasing inhibition of activators by inhibitors, that is, a decrease in the a/i ratio. Yet, in the IC model, a decrease in the a/i ratio leads to smaller posterior molar. Then, the elongated $m1$ development may involve decreasing posterior molar size.

As the arvicoline regression line is parallel to the arvicoline ICR regression line, then the arvicoline molar proportions seem

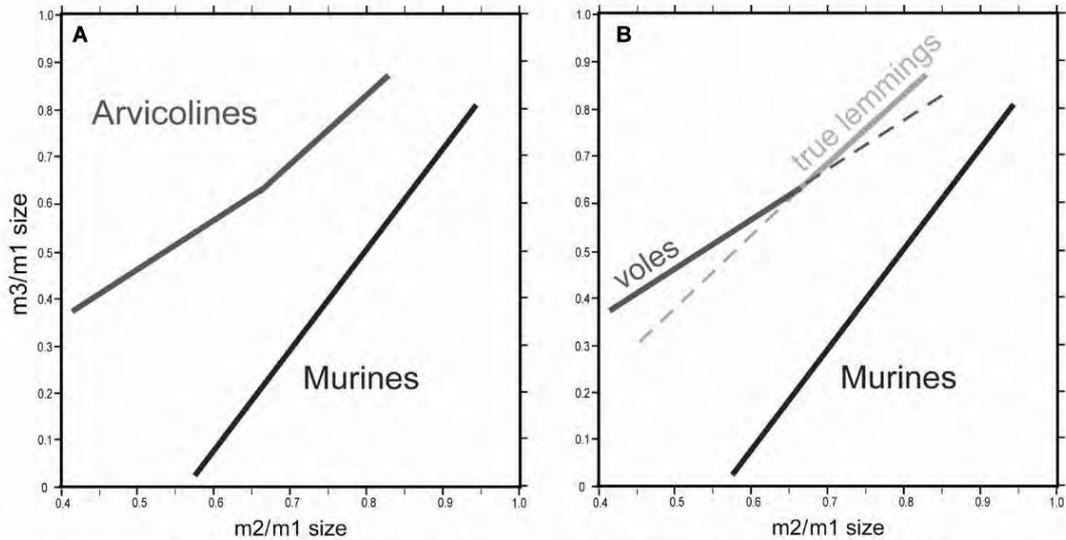


Figure 5. Summary of the two patterns in arvicoline molar proportions. (A) Nonlinear molar proportions: a breakdown is observed within the extant arvicoline regression. The inhibition changes between $m1 \gg m2 = m3$ and $m1 > m2 = m3$. (B) Two different linear models between voles and true lemmings. There are two linear regressions for voles ($y = 1.120x - 0.174$; dark gray line) and true lemmings ($y = 1.887x - 0.623$; light gray line). No break is observed in the murine regression (black line) illustrating the linear IC model in both diagrams (Kavanagh et al. 2007).

to act in a “random-like” linear manner, or at least there is a degree of independence of the $m3$ from the $m1$. However, within the arvicolines, it is possible to distinguish two groups formed by different molar proportions: voles and true lemmings (Figs. 2, 5). Therefore, one of two cases could be advocated: either a two-part linear regression for the arvicolines (Fig. 5A), or two different linear models for voles and lemmings separately (Fig. 5B). In the first case, a single nonlinear model may characterize the linear breakdown. In the second case, two linear models, responding to the IC model or not, may be differentiated within the arvicolines.

The multiple regression model reflects strong differences between the vole and lemming molar relationships. Lemming molar area relationships seem to more closely reflect the linear IC model. However, a large enough sample size is not available to confirm it. As a result, two different linear models may explain the voles and lemmings molar proportions (Fig. 5B).

The most recent published phylogenies of arvicolines (Galewski et al. 2006; Robovsky et al. 2008; Buzan et al. 2008) recognize the different tribes (Arvicolini, Lemmini, Dicrostonyichi . . .) and clearly differentiate all the lemmings (Lemmini and Dicrostonyichi) from Arvicolini. Nevertheless, in our results, molar proportions of the tribe Dicrostonyichi fall into the Arvicolini distribution (Fig. 3). Only the true lemmings (Lemmini) express different molar proportions. This would confirm the differences expressed between voles and true lemmings.

One other genus, *Prometheomys*, has a peculiar molar proportion compared to all the other arvicolines and close to murines. Several authors (Kretzoi 1969; McKenna and Bell 1997; Musser and Carleton 2005; Galewski et al. 2006) suggest that this genus could represent an archaic line and thus be isolated as a tribe Prometheomyini. Furthermore, this genus emerges first within the arvicoline phylogeny based on mitochondrial and nuclear DNA (Galewski et al. 2006).

We can see two main ways in which the molar proportions along the tooth row can be altered and therefore that arvicolines can depart from the expected pattern: (1) change the influence of an early tooth (e.g., $m1$) on the development of a later tooth (e.g., $m2$) so that the inhibition of later teeth no longer follows the specific murine inhibitory cascade rule ($Y = 1 + [(a - i) / i] [X - 1]$); (2) the addition of prisms to the $m1$, with a consequent increase in size, that does not influence the inhibitory cascade along the tooth row. In the first case, there may be no pattern at all to the relative tooth sizes along the tooth row (i.e., a random occupation of dental proportion morphospace), or a different pattern from that found in murines may exist (e.g., a different line or perhaps a region in morphospace). In the second case, the molars do follow the inhibitory cascade rule, with the exception that the $m1$ is larger than expected.

To determine whether the second method is a likely cause of the difference in arvicoline molar proportions, we artificially

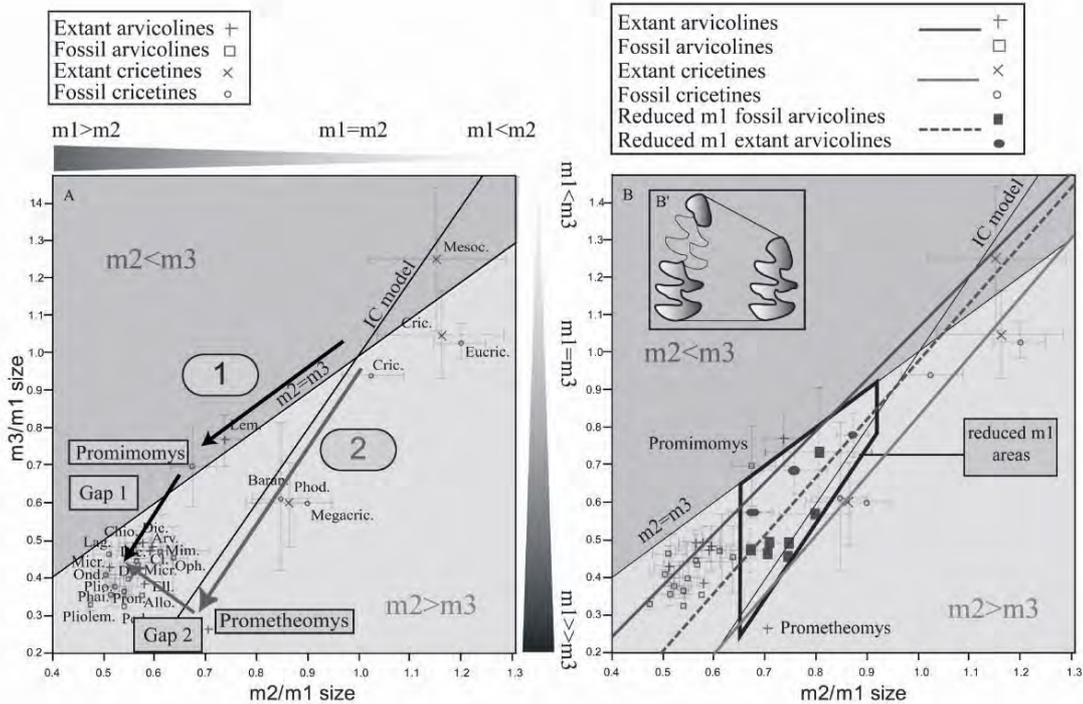


Figure 6. Hypotheses of the arvicoline evolution from cricetinae. (A) Two scenarios may be involved in the arvicoline molar proportion evolution from cricetines. Black arrows represent the evolutionary trajectory from cricetines to the oldest arvicoline genus *Promimomys* and from *Promimomys* to the more recent genera (1). Gray arrows describe the second scenario in which *Prometheomys* molar proportions derived from cricetines and then lead to all other arvicolines (2). (B) New molar proportions with reduced $m1$ area (three prisms left, see the B' box) are encapsulated inside the area surrounded by a black thick line.

reduced the $m1$ size of 19 extant and fossil arvicolines (see Supporting Information) to transform them into the nonderived molar pattern. We kept only the three first prisms of the $m1$ posterior part (*Promimomys* and *Prometheomys* forms) and the anterior loop. This therefore shows the relative proportions of the molars without the additional prisms. It can be observed that the molar proportions of arvicolines obviously change and are higher than the real molar proportions (Fig. 6B).

However, the reduced lower molar proportions of arvicolines still do not follow the linear IC model, but they are closer than the unaltered proportions. The arvicoline line is rather close to the cricetine and *Promimomys* molar sizes (Fig. 6B, Table 1).

ARVICOLINAE EVOLUTION

The addition of fossil data (arvicolines and cricetines) allows us to project a time scale onto the developmental model obtained in extant arvicolines to describe an evolutionary trend. We demonstrate, from extant and fossil arvicoline lower molar proportions, that throughout arvicoline evolution, there might be two large

gaps in molar proportions: (1) from the oldest arvicoline genus *Promimomys* to all other more recent genera, except for *Lemmus*; or (2) from *Prometheomys* to all other arvicolines (Fig. 6A). These phenotypic trajectories are strengthened by the cricetine position in the morphospace in which $m1 = m2 = m3$. Indeed, the most reliable molecular phylogenies (Steppan et al. 2004; Galewski et al. 2006), established on nuclear and mitochondrial genes, support the cricetine basal position for arvicoline in muroid reconstructions. Therefore, two trajectories of arvicolines from cricetines may be involved (Fig. 6A) corresponding to the gaps observed in molar proportions: (1) the main group of voles derived from the oldest fossil *Promimomys* or (2) they derived from the most “primitive” modern genus *Prometheomys* (Galewski et al. 2006). However, only two individuals represent the genus *Promimomys* and one individual characterizes the genus *Prometheomys*.

McKenna and Bell (1997) reported the first appearance of the *Prometheomys* genus in the Asian fossil record dated from the Late Pleistocene (≈ 130 ka). If *Prometheomys* led to the more recent arvicolines, this genus should be older than the oldest

arvicoline genus in the major group, *Mimomys*. However, the genus *Mimomys* (which appeared in Europe at about 3.6 Ma; Chaline 1987; McKenna and Bell 1997; Chaline et al. 1999; Kowalski 2001) is much older than *Prometheomys*. Therefore, this temporal inadequacy reinforces the *Promimomys* origin of the more recent molar proportions in arvicolines. As a result, we confirm that the arvicoline evolutionary trajectory derived from a slight change of $m1$ size between cricetines ($m1 = m2 = m3$) and *Promimomys* ($m1 > m2 = m3$). Then, the rapid acquisition of a large $m1$ in arvicolines (leading to $m1 \gg m2 = m3$) could explain the gap observed in molar proportions from *Promimomys* rather than from *Prometheomys*.

Consequently, we could deduce that there might not have been a gradual evolution in molar proportions in contrast to the gradual morphological evolution hypothesized by some authors from observations on the occlusal surface evolution (Chaline and Sevilla 1990; Chaline and Brunet-Lecomte 1992; Néraudeau et al. 1995). Instead, this may represent a scenario of punctuated evolution in which this leap in molar proportions in the first stages of arvicoline evolution (between 3.8 and 2 Ma) could be congruent with the radiation event (≈ 2 Ma ago) registered in the arvicoline fossil record (Chaline et al. 1999) and with molecular clock ages (between 4.4 and 2.6 Ma, Conroy and Cook 1999). This hypothesis is also congruent with a nonlinear development allowing run-away changes in molar size. In fact, the major changes in molar relationships between voles and cricetines are the unequal distribution of the inhibition through the three molars. Cricetines have molar relationships in which $m1 = m2 = m3$, which might be shifted in arvicolines $m1 \gg m2 = m3$ and murines $m1 > m2 > m3$ through time. Therefore, the rapid acquisition of a large $m1$ in arvicolines could be seen as an advantage and a response to selection as it has also been mentioned by Kavanagh et al. (2007). Indeed, not just molar proportions but also tooth pattern began to be highly specialized (prismatic pattern and increasing high-crown molars) as food became very abrasive. In comparison with the pattern found in other groups of rodents during quaternary time (i.e., bunodont form), the prismatic pattern of vole molars could provide a better adaptation to the abrasive vegetation found in steppes and meadows in which voles and lemmings usually live (Nadachowski 1984; Marchand et al. 2003; Montuire and Brunet-Lecomte 2004; Nappi et al. 2006).

Nevertheless, essentially three features can be distinguished on the structure of tooth row: (1) molar proportions, (2) occlusal tooth design and enamel structure (e.g., bunodont, lophodont, prismatic; see von Koenigswald 1980, 1982; Janis 1995, 2000; Evans et al. 2005, 2007; Lucas et al. 2008), and (3) crown growth (hypsodonty versus brachyodonty; see Jernvall et al. 2000b; Jernvall and Fortelius 2002; Fortelius et al. 2003; MacFadden 2005). However the occlusal tooth complexity is probably the most linked to diet (Evans et al. 2007) and thus to vegetation.

In conclusion, we suggest that the elongated anterior part of vole $m1$ is explained by faster longitudinal growth probably favored by the absence of premolars. Faster longitudinal growth of the first molar may induce for voles, an increasing inhibition of posterior molar development in voles, or in fact be independent of the inhibition of posterior molars, which remain approximately the same size. We explain that the need for a multiple regression model to characterize the vole distinctiveness ($m1 \gg m2 = m3$, Fig. 1) implies that the linear IC model is not sufficient in explaining, or predicting, vole molar evolution. In addition, we demonstrate from fossil molar area measurements (Figs. 2, 3) that the evolution of arvicoline molar proportions might be characterized by a gap corresponding to the rapid acquisition of a large $m1$ contemporaneous to arvicoline radiation. This acquisition can be viewed as an adaptive advantage for consuming abrasive food. Therefore, questions still remain in rodent evolution to explain the two different trajectories of development taken by arvicolines and murines. It can be suggested that a shift in the distribution of inhibition between the three molar happened from the cricetine molar pattern.

Our approach not only provides new insights on the IC model of Kavanagh et al. (2007) but also describes a new model that can characterize nonlinear molar proportions in mammals. It also underlines the essential focus on fossil data in evolutionary developmental studies to highlight macroevolutionary trajectories through time.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank for helpful discussions H. Lesot and G. Escarguel, for help with scientific revisions; E. Escudé and C. Tougard, for tooth supply from CBGP collections of Montpellier and MNHN collections of Paris; J.-P. Quéré and C. Denys, respectively; and for English revisions, C. Chateau-Smith. This work was supported by Biogéosciences laboratory (University of Burgundy, France) and by a doctoral Fellowship (Grant MENRT, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France).

LITERATURE CITED

- Buzan, E., B. Krystufek, B. Hänfling, and W. F. Hutchinson. 2008. Mitochondrial phylogeny of Arvicolinae based on comprehensive taxonomic sampling yields new insights. *Biol. J. Linn. Soc.* 94:825–835.
- Chaline, J. 1972. Le rôle des rongeurs dans l'élaboration d'une biostratigraphie et d'une stratigraphie climatique fine du Quaternaire. *Mém. BRGM* 77:375–379.
- . 1987. Arvicolid data (Arvicolidae, Rodentia) and Evolutionary concepts. *Evol. Biol.* 21:237–310.
- Chaline, J., and P. Brunet-Lecomte. 1992. Anatomy of the European arvicolid radiation (Rodentia): a quantified test of the punctuated equilibria/desequilibria model. *C. R. Acad. Sci.* 314:251–256.
- Chaline, J., and P. Mein. 1979. *Rongeurs et évolution*. Doin, Paris.
- Chaline, J., and P. Sevilla. 1990. Phyletic gradualism and developmental heterochronies in a European Pliocene/Pleistocene *Mimomys* lineage (Arvicolidae, Rodentia). Pp. 85–89 in O. Fejfar and W. D. Heinrich, eds. *Int.*

- Symp. Evol. Phyl. Biostr. Arvicolids. Rohanov (Czechoslovakia) May 1987. Geological Survey, Praha, Czech Republic.
- Chaline, J., P. Brunet-Lecomte, S. Montuire, L. Viriot, and F. Courant. 1999. Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Ann. Zool. Fennici* 36:239–267.
- Conroy, C. J., and J. A. Cook. 1999. MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *J. Mamm. Evol.* 6:221–245.
- Evans, A. R., J. Hunter, M. Fortelius, and G. D. Sanson. 2005. The scaling of tooth sharpness in mammals. *Ann. Zool. Fennici* 42:603–613.
- Evans, A. R., G. P. Wilson, M. Fortelius, and J. Jernvall. 2007. High-level similarity of dentitions in carnivorans and rodents. *Nature* 445:78–81.
- Fejfar, O. 1999. Microtoid Cricetids. Pp. 365–372 in G. E. Rössner and K. Heissig, eds. *The Miocene land mammals of Europe*. Pfeil, München, Germany.
- Fejfar, O., and C. A. Repenning. 1992. Holarctic dispersal of the arvicolids (Rodentia, Cricetidae). *Courier Forsch. Inst. Senckenberg* 153:205–212.
- Fortelius, M., J. T. Eronen, L. Liu, D. Pushkina, A. Tesakov, I. A. Vislobokova, and Z. Zhang. 2003. Continental-scale hypsodonty patterns, climatic palaeobiogeography, and dispersal of Eurasian Neogene large mammal herbivores. Pp. 1–11 in J. W. F. Reumer and W. Wessels, eds. *Distribution and migration of Tertiary mammals in Eurasia*. A volume in honour of Hans de Bruijn. Deinsea, Utrecht, The Netherlands.
- Galewski, T., M.-ka Tilak, S. Sanchez, P. Chevez, E. Paradis, and E. J. P. Douzery. 2006. The evolutionary radiation of Arvicolinae rodents (voles and lemmings): relative contribution of nuclear and mitochondrial DNA phylogenies. *BMC Evol. Biol.* 6:1–17 (doi:10.1186/1471-2148-6-80).
- Guthrie, R. D. 1965. Variability in characters undergoing rapid evolution, an analysis of *Microtus* molars. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 19:214–233.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont. Electronica* 4:9.
- Hartenberger, J.-L. 1998. Description of the radiation of the Rodentia (Mammalia) from the Late Paleocene to the Miocene; phylogenetic consequences. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 326:439–444.
- Hillson, S. 2005. *Teeth*, ed. Cambridge Manuals in Archaeology series. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Hunter, J. P., and J. Jernvall. 1995. The hypocone as a key innovation in mammalian evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10718–10722.
- Janis, C. M. 1995. Correlations between craniodental morphology and feeding behavior in ungulates: reciprocal illumination between living and fossil taxa. Pp. 76–98 in J. J. Thomason, ed. *Functional morphology in Vertebrates Paleontology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Jernvall, J., and M. Fortelius. 2002. Common mammals drive the evolutionary increase of hypsodonty in the Neogene. *Nature* 417:538–540.
- Jernvall, J., S. V. E. Keränen, and I. Thesleff. 2000a. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14444–14448.
- Jernvall, J., J. P. Hunter, and M. Fortelius. 2000b. Trends in the evolution of molar crown types in ungulate mammals: evidence from the northern hemisphere. Pp. 269–281 in M. F. Teaford, M. M. Smith, and M. W. J. Ferguson, eds. *Development, function and evolution of teeth*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Kälin, D. 1999. Pp. 373–387 in G. E. Rössner and K. Heissig, eds. *The Miocene land mammals of Europe*. Pfeil, München, Germany.
- Kavanagh, K. D., A. R. Evans, and J. Jernvall. 2007. Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* 449:427–432.
- Keränen, S. V. E., T. Åberg, P. Kettunen, I. Thesleff, and J. Jernvall. 1998. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev. Genes Evol.* 208:477–486.
- Kowalski, K. 2001. Pleistocene rodents of Europe. *Folia Quaternaria* 72:3–389.
- Kretzoi, M. 1969. Skizze einer arvicoliden-Phylogenie—Stand 1969. *Vertebrata Hungarica* 11:155–193.
- Kryštufek, B., and V. Vohralík. 2005. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae. *Založba annales, Koper, Slovenia*.
- Line, S. R. P. 2003. Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development, and evolution. *Evol. Dev.* 5:295–304.
- Lucas, P., P. Constantino, B. Wood, and B. Lawn. 2008. Dental enamel as a dietary indicator in mammals. *BioEssays* 30:374–385.
- MacFadden, J. B. 2005. Fossil horses: evidence for evolution. *Science* 307:1728–1730.
- Marchand, H., G. Paillat, S. Montuire, and A. Butet. 2003. Landscape fragmentation and stress in populations of bank voles (Rodentia, Arvicolinae). *Biol. J. Linn. Soc.* 80:37–44.
- Matalová, E., A. S. Tucker, and I. Mišek. 2005. Apoptosis-related factors (Fas Receptor, Fas ligand, FADD) in early tooth development of the field vole (*Microtus agrestis*). *Arch. Oral. Biol.* 50:165–169.
- McKenna, M. C., S. K. Bell. 1997. *Classification of mammals: above the species level*. Columbia Univ. Press, New York, NY.
- Montuire, S. 1999. Mammalian faunas as indicators of environmental and climatic changes in Spain during the Pliocene–Quaternary transition. *Quat. Res.* 52:129–137.
- Montuire, S., and P. Brunet-Lecomte. 2004. Relation between climatic fluctuation and morphological variability in *Microtus (Terricola) grafi* (Arvicolinae, Rodentia) from Bacho Kiro (Bulgaria, Upper Pleistocene). *Lethaia* 37:71–78.
- Montuire, S., and E. Desclaux. 1997. Palaeoecological analysis of mammalian faunas and environmental evolution in the South of France during the Pleistocene. *Boreas* 26:355–365.
- Montuire, S., and F. Marcolini. 2002. Palaeoenvironmental significance of the mammalian faunas of Italy since the Pliocene. *J. Quaternary Sci.* 17:87–96.
- Montuire, S., J. Michaux, S. Legendre, J.-P. Aguilar. 1997. Rodents and climate. 1. A model for estimating past temperatures using arvicolids (Mammalia: Rodentia). *Paleogeogr. Paleoclimatol. Palaeoecol.* 128:187–206.
- Musser, G. G., and M. D. Carleton. 2005. Order Rodentia. Pp. 745–1944 in D. E. Wilson, and D. M. Reeder, eds. *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD.
- Nadachowski, A. 1984. Morphometric variability of dentition of late Pleistocene voles (Arvicolidae, Rodentia) from Bacho Kiro cave (Bulgaria). *Acta Zool. Cracov.* 27:149–176.
- . 1992. Short-distance migration of Quaternary and Recent mammals: a case study of *Chionomys* (Arvicolidae). *Courier Forsch. Inst. Senckenberg* 153:221–228.
- Nappi, A., P. Brunet-Lecomte, and S. Montuire. 2006. Intraspecific morphological tooth variability and geographic distribution: application to the Savi's vole, *Microtus (Terricola) savii* (Rodentia, Arvicolinae). *J. Nat. Hist.* 40:345–358.
- Néraudeau, D., L. Viriot, J. Chaline, B. Laurin, and T. van Kolfschoten. 1995. Discontinuity in the Plio-Pleistocene Eurasian water vole lineage. *Palaeontology* 38:77–85.
- Peterková, R., M. H. Lesot, and J. Peterka. 2006. Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *J. Exp. Zool. Part B.* 306B:234–250.

ELODIE RENVOISÉ ET AL.

- Plavcan, J. M., and C. B. Ruff. 2008. Canine size, shape, and bending strength in primates and carnivores. *Am. J. Phys. Anthropol.* 136:65–84.
- Polly, P. D. 2005. Development and phenotypic correlations: the evolution of tooth shape in *Sorex araneus*. *Evol. Dev.* 7:29–41.
- . 2007. Development with a bite. *Nature* 449:413–415.
- Raff, R. A. 2007. Written in stone: fossils, genes and evo-devo. *Nat. Rev. Genet.* 8:911–920.
- Robovsky, J., V. Ricankova, and J. Zrzavy. 2008. Phylogeny of arvicoline (mammalian, cricetidae): utility of morphological and molecular data sets in a recently radiating clade. *Zool. Scr.* 37:571–590.
- Salazar-Ciudad, I., and J. Jernvall. 2002. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:8116–8120.
- . 2004. How different types of pattern formation mechanisms affect the evolution of form and development. *Evol. Dev.* 6:6–16.
- Sesé, C. 1995. Paleoclimatical interpretation of the Quaternary small mammals of Spain. *Geobios* 27:753–767.
- Setkova, J., H. Lesot, E. Matalová, K. Witter, P. Matulova, and I. Míšek. 2006. Proliferation and apoptosis in early molar morphogenesis—voles as models in odontogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 50:481–489.
- Steppan, S. J., R. M. Adkins, and J. Anderson. 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in murid rodents. *Syst. Biol.* 53:533–553.
- van Kolfschoten, T. 1990. The evolution of the mammal fauna in the Netherlands and the middle Rhine area (Western Germany) during the late middle Pleistocene. *Meded. Rijks Geol. Dienst.* 43:42–74.
- . 1992. Aspects of the migration of mammals to Northwestern Europe during the Pleistocene, in particular the reimmigration of *Arvicola terrestris*. *Courier Forsch. Inst. Senkenberg* 153:213–220.
- Viriót, L., R. Peterková, M. Peterka, and H. Lesot. 2002. Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in the mouse lower jaw. *Connect. Tissue Res.* 43:129–133.
- von Koenigswald, W. 1980. Schmelzstruktur und morphologie in den molaren der Arvicolidae (Rodentia). *Abh. Slenken. Naturforsch. Ges.* 539: 1–129.
- . 1982. Zum Verständnis der Morphologie der Wühlmausmolaren (Arvicolidae, Rodentia, Mammalia). *Z. Geol. Wiss.* 10: 951–962.
- . 1992. Various aspects of migration in terrestrial mammals in relation to Pleistocene faunas of central Europe. *Courier Forsch. Inst. Senkenberg* 153:39–47.
- . 2000. Two different strategies in enamel differentiation: Marsupialia versus Eutheria. Pp. 107–118 in M. F. Teaford, M. M. Smith, and M. W. J. Ferguson, eds. *Development, function and evolution of teeth*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Witter, K., H. Lesot, M. Peterka, J.-L. Vonesch, I. Míšek, and R. Peterková. 2005. Origin and developmental fate of vestigial tooth primordia in the upper diastema of the field vole (*Microtus agrestis*, Rodentia). *Arch. Oral. Biol.* 50:401–409.

Associate Editor: B. Swalla

Supporting Information

The following supporting information is available for this article:

Table S1. Measurements of arvicoline and cricetine molar areas. CBGP, Biology Center of Population Control (International Campus of Baillarguet, France); UBGD, University of Burgundy Geology Dijon (Dijon, France).

Table S2. Measurements of arvicolines with reduced first lower molar (*m*₁) areas. *m*₂ and *m*₃ areas are still unchanged.

Supporting Information may be found in the online version of this article.

(This link will take you to the article abstract).

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

VI. Modularité, développement et évolution du patron dentaire : conséquences sur l'évolution des arvicolinés

Nous avons démontré dans la PUBLICATION 2 que les dents constituent des modules morphologiques indépendants au sein de la rangée dentaire, conservant une certaine intégration entre les molaires. Ces modules morphologiques sont le reflet des modules développementaux impliqués dans la mise en place des molaires. Les modules dentaires peuvent être expliqués par le processus de réitération de modules signalisants identiques. L'intégration entre les molaires peut être expliquée par l'interaction qui existe lors du développement. Ces interactions peuvent provenir du mécanisme d'inhibition en cascade des molaires antérieures sur les molaires postérieures. Cependant, ce modèle de cascade d'inhibition ne permet pas de rendre compte des rapports de molaire chez les arvicolinés, caractérisés par une grande m1 (PUBLICATION 3). Nous avons montré que le modèle de régression multiple entre les molaires est plus approprié pour caractériser cette grande m1. Ainsi, il a été supposé que la croissance rapide de la partie antérieure de la m1 au cours de son développement (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002) peut entraîner soit une forte inhibition des molaires postérieures, soit un arrêt de l'inhibition favorisant le développement des dents postérieures de même taille. Le modèle que nous avons défini ici n'est pas issu de la même démarche que celle utilisée par Kavanagh *et al.* (2007). Dans leur étude, Kavanagh *et al.* (2007) se basent sur des observations développementales afin de construire un modèle prédictif issu de ces observations. Ils ont validé ce modèle sur des données phénotypiques d'individus adultes. Dans notre étude, nous avons utilisé la démarche inverse. Nous avons construit un modèle mathématique, à partir des données d'aires de molaires d'individus adultes (actuels et fossiles), qui caractérise plus précisément les relations entre les molaires pour les arvicolinés (les valeurs de significativité des coefficients de corrélation sont plus élevées). A partir de ce modèle, nous avons pu émettre des hypothèses sur le développement des dents d'arvicolinés et leur évolution. Cependant seules de véritables études développementales permettraient de confirmer notre hypothèse. Notre méthode de caractérisation des relations entre dents présente les avantages suivants : 1) elle n'est pas dépendante du nombre d'éléments à comparer et 2) elle peut les comparer en même temps et de façon hiérarchique. Dans la méthode de Kavanagh *et al.* (2007), il est nécessaire de travailler en deux dimensions sur des rapports de molaires. Ainsi, notre méthode est plus facilement applicable à d'autres objets biologiques à développement répétitif (ex.

Chapitre II

vertèbres, phalanges etc.) dont l'étude de l'évolution est tout aussi importante que les travaux sur les molaires.

Notre nouvelle interprétation du développement dentaire chez les arvicolinés ne remet pas en cause les hypothèses modulaires que nous avons émises auparavant. En effet, nous ne distinguons pas un arrêt de l'inhibition d'une répartition différentielle de cette inhibition au sein de la rangée dentaire. Dans le premier cas, les résultats de la modularité montreraient une indépendance très forte de la m1 par rapport à la m2 et la m3. Dans le deuxième cas, l'intégration entre les molaires serait maintenue. Comme les résultats significatifs de la modularité confirment que les molaires conservent une certaine intégration, alors la deuxième hypothèse semblerait être la plus vraisemblable.

La PUBLICATION 3 montre qu'au cours de l'évolution des arvicolinés, il existe un « saut » dans les proportions de molaires, entre 3,8 et 2 Ma, correspondant à l'acquisition rapide d'un allongement de la m1 dans la partie antérieure. Il semblerait que ce saut soit contemporain de la période de radiation des campagnols (entre 3,5 et 2,0 Ma). Il y aurait eu, au cours de l'évolution des arvicolinés, un changement dans les processus de mise en place du patron au sein de la rangée dentaire caractérisé par un saut évolutif. L'évolution du phénotype dentaire des arvicolinés ressemble à un modèle d'évolution de type équilibre ponctué (Gould et Eldredge, 1977) contrairement à l'évolution graduelle qu'on lui associe depuis longtemps (Chaline et Sevilla, 1990; Chaline et Brunet-Lecomte, 1992; Néraudeau *et al.*, 1995). Ce nouveau scénario évolutif pour les arvicolinés est en accord avec les hypothèses de Salazar-Ciudad et Jernvall (2005) concernant l'évolution des phénotypes complexes. Dans leur étude, ces auteurs ont démontré que les phénotypes complexes, tels que les dents multi-cuspides, ont une tendance à évoluer de façon ponctuelle avec des périodes de stases. Ce scénario ressemble fortement à l'hypothèse des équilibres/déséquilibres ponctuels définis par Chaline *et al.* (1999). A l'inverse, les phénotypes simples, tels que les dents mono-, bi- ou tri-cuspides, dont les cuspides sont de taille différente, auront tendance à évoluer de façon graduelle. Ces différences évolutives viennent du fait que la complexité des relations génotype-phénotype, permettant de générer ces phénotypes, ne sont pas du même ordre. Ainsi, les morphologies dentaires dont les relations sont simples (une variation au cours du développement entraîne un petit changement au niveau du phénotype), auront plus de facilité à se modifier et ceci de façon graduelle. Pour les morphologies complexes (une petite variation au cours du développement peut entraîner de grandes modifications au niveau phénotypique), les relations génotype-phénotype sont telles que seuls des changements majeurs au niveau du phénotype pourront être mis en place.

Chapitre II

Il est vrai que la période temporelle sur laquelle nous avons travaillé, à partir des données fossiles que nous avons obtenues, n'est pas exhaustive. En effet, les dates considérées pour les différents genres sont souvent anciennes et estimées de façon globale. Toutefois, cette période correspond de façon synchrone à la détérioration du climat et la mise en place des cycles glaciaires/interglaciaires du Pliocène supérieur (entre 3,2 et 2,0 Ma, Aguilar *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Haywood *et al.*, 2009). L'allongement de la partie antérieure de la m1 des arvicolinés, et donc du changement de processus développemental, est contemporain de ce refroidissement. Keller *et al.* (2007, 2008) ont démontré dans l'actuel que les conditions environnementales pouvaient avoir un impact direct sur le développement dentaire. Par conséquent, il est possible d'envisager que le climat lui-même puisse avoir une influence sur l'évolution du développement du phénotype dentaire chez les arvicolinés. De nouveau, seules des expérimentations sur du matériel vivant actuel peuvent donner accès à ce type de mécanismes.

Il est possible d'envisager une hypothèse morphofonctionnelle selon laquelle l'allongement de la m1 conférerait à la dent un avantage fonctionnel pour consommer des graminées riches en silice dans les milieux froids et secs. Cette hypothèse est intéressante mais elle n'est pas encore démontrée. Il est vrai que l'allongement de la m1 procurerait au campagnol une surface d'occlusion plus grande et donc plus efficace dans le broyage des herbes. Quand bien même cette grande m1 apportait aux campagnols un avantage dans les milieux ouverts de la fin du Pliocène, cela n'explique pas comment les patrons phénotypiques peuvent être modifiés au cours du temps. De plus, il existe des campagnols de milieux fermés qui présentent également cet allongement de la m1.

Néanmoins, il est possible d'émettre des hypothèses sur ces mécanismes. Selon le modèle morphodynamique de Salazar-Ciudad et Jernvall (2002), les transitions majeures de l'évolution des molaires (positionnement des cuspidés parallèles ou diagonales) chez les mammifères requièrent de petits changements dans les paramètres du modèle (plus d'inhibition sur les activateurs). De plus, Salazar-Ciudad (2008) précise que dans les modèles de réaction-diffusion, une petite modification dans les voies développementales peut entraîner de grands changements dans le patron dentaire. Ces mécanismes de variation sont typiques du comportement de systèmes complexes (Kauffman, 1995). Chez les campagnols, il semblerait que les processus du développement aient évolué en augmentant, dans le réseau d'activateurs-inhibiteurs, l'inhibition de la molaire postérieure sur les autres molaires. Est-ce que les variations drastiques du climat

Chapitre II

enregistrées au Pliocène supérieur peuvent entraîner une modification de l'inhibition entre les molaires au cours du temps ? Si oui, par quels mécanismes ?

Il est assez difficile de répondre à cette question à l'heure actuelle au vu des connaissances acquises sur le développement dentaire. Il existe plus de 300 gènes impliqués dans le développement dentaire (Thesleff *et al.*, 2001). Cependant, tous les gènes ne sont pas connus (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2005). De plus, certains gènes et protéines ont plus d'effet que d'autres sur les variations du phénotype dentaire. Par exemple, l'activité des Bmp peut entraîner la réduction de la taille des dents (Plikus *et al.*, 2005) ou jouer un rôle dans l'initiation et la morphogenèse dentaire (Torres *et al.*, 2008). L'inhibition de signalisation de la molécule Wnt/ β -caténine dans l'épithélium et le mésenchyme peut entraîner l'arrêt du développement dentaire au début du stade bourgeon (Liu *et al.*, 2008). Les facteurs de contrôle fibroblastiques (FGF) interviennent dans les variations de croissance cellulaires dans le mésenchyme (Fgf3, Jernvall et Thesleff, 2000), et donc dans la régulation de l'initiation dentaire. Dans l'étude de Kavanagh *et al.* (2007), la nature même des molécules impliquées dans les processus de réseau d'activateurs et d'inhibiteurs n'est pas connue précisément. Ce sont les mécanismes d'interactions entre ces molécules qui sont décrits dans cette étude et qui importent pour prédire dynamiquement le patron dentaire chez les mammifères. Donc si l'environnement doit avoir une influence sur l'évolution du développement ce serait plutôt au niveau des modifications de la dynamique des interactions entre gènes, molécules et cellules que sur les gènes eux-mêmes.

Il a été démontré récemment que les changements environnementaux pouvaient avoir un lien direct sur le développement dentaire et, par conséquent, sur le phénotype dentaire. Keller *et al.* (2008) ont montré qu'un contaminant environnemental actuel (TCDD) jouait sur la taille et la forme des molaires chez la souris. Plusieurs concentrations de cet agent contaminant ont été injectées chez des femelles en gestation. Les femelles, portant l'allèle codant pour le récepteur de la TCDD (AHR) ont montré des signes de modification au niveau de la forme de la molaire, mais aussi de la mandibule, pour des concentrations où la quantité de contaminants est maximale (Keller *et al.*, 2008). Toutefois, ces auteurs n'expriment pas de façon explicite les mécanismes développementaux sous-jacents reliant le génotype au phénotype. Nakasone *et al.* (2006) se sont, eux, intéressés à l'expression de protéines heat-shock (HSP), ou protéines chaperons, dans l'odontogenèse des molaires chez le rat. Les HSPs sont des protéines anciennes et fortement conservées, dont la synthèse est induite dans la réponse cellulaire à des stress physiologiques ou environnementaux (Nakasone *et al.*, 2006). Les protéines

HSP-25 agissent à différents stades du développement des molaires chez le rat : entre la prolifération cellulaire et la différenciation (odontoblastes et améloblastes), pendant le développement dentaire, et même après l'achèvement de la formation des racines (Nakasone *et al.*, 2006). Les effets des mutations de ces HSPs peuvent être dépendants de la température (Patterson et Klingenberg, 2007). Si la température augmente, les HSPs libèrent leur contrainte sur la différenciation cellulaire, permettant ainsi des modifications de l'expression des gènes sous-jacents et du phénotype émergent. Ainsi, les effets du climat peuvent jouer directement sur les voies développementales des dents et donc sur leur phénotype résultant. Cependant, le processus d'inhibition entre les molaires n'est pas dépendant que d'un seul gène, ou d'une seule protéine, mais au contraire d'un réseau de gènes dont la dynamique peut être complexe (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2005). Il serait difficile de mettre en évidence l'influence directe des facteurs environnementaux sur cette dynamique et les conséquences sur les variations de l'inhibition entre les molaires. Néanmoins, ce type d'approche permettrait de mieux contraindre les facteurs d'évolution du patron dentaire.

VII. Conclusions et perspectives

Grâce aux études sur la modularité, sur le développement et sur l'évolution du patron dentaire chez les arvicolinés, nous avons pu mettre en évidence les relations entre génotype, développement et phénotype au cours du temps chez cette sous-famille. De plus, cette démarche couplant différents niveaux d'intégration biologique, nous a permis de mieux caractériser la dynamique de l'évolution du patron dentaire chez les arvicolinés d'une part, et chez les murinés et cricétinés d'autre part. L'étude de l'évolution du patron dentaire (rapport de molaires ; modèle CI, ou relations entre aires de molaires ; modèle de régression multiple) au cours du temps est maintenant devenue un moyen simple de caractérisation des processus développementaux dans le fossile.

Il existe aujourd'hui des modèles mathématiques complexes qui permettent de rendre compte des mécanismes du développement dentaire, mais aussi, par extrapolation, d'autres structures morphologiques métamériques (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2005; Kavanagh *et al.*, 2007). De plus, ces modèles autorisent le test de différents paramètres impliqués dans les changements du patron dentaire. Ainsi, il est possible de mieux comprendre et prédire l'influence des mécanismes du développement dans la mise en place du patron dentaire.

Chapitre II

Notre démarche, qui est complémentaire de celle évoquée auparavant, propose d'étudier l'évolution des mécanismes du développement au cours du temps à partir du matériel fossile et actuel, afin de mettre en relation d'éventuelles influences des changements environnementaux. Cependant, nous ne pouvons pas tester ces hypothèses d'évolution développementales uniquement à partir des corrélations obtenues dans le registre fossile. Il est nécessaire : 1) de valider les nouvelles hypothèses développementales chez les arvicolinés à partir d'observations sur le développement lui-même et 2) de mettre en place des expériences et des modèles développementaux, dans lesquels il est possible de tester l'influence des paramètres environnementaux.

Chapitre III
Evolution génétique chez l'espèce *Microtus*
***arvalis* : ADN ancien et taphonomie**

Chapitre III : Evolution génétique chez l'espèce *Microtus arvalis* : ADN ancien et taphonomie

I. Introduction

Ainsi que nous l'avons suggéré dans le chapitre II, il semblerait que l'évolution du patron dentaire des arvicolinés soit très liée à la mise en place du refroidissement de la fin du Pliocène. En outre, chez l'espèce *Microtus arvalis*, des relations fortes entre l'histoire phylogéographique de cette espèce et les climats du Quaternaire semblent se dessiner au cours de son évolution (Tougaard *et al.* 2008b ; Annexe 2). L'histoire phylogéographique de *M. arvalis* nous apprend que cette espèce a connu, depuis son apparition dans le centre de l'Europe (plus précisément, au sud-est de l'Allemagne), deux phases de migration de dynamiques différentes et légèrement décalées dans le temps. La première phase s'est mise en place vers - 376 000 ans avec une migration des populations vers le sud-ouest de l'Europe. La dynamique de migration de ces populations de campagnols s'est effectuée graduellement pendant les phases de réchauffement (Tougaard *et al.*, 2008b). Pendant les phases glaciaires, les populations ont survécu dans de petits habitats favorables, à partir desquels elles ont pu se disperser de nouveau. La deuxième phase s'est mise en place un peu plus tard, vers - 338 000 ans. Pendant cette deuxième phase, les populations de *M. arvalis* se sont dirigées vers le nord-est de l'Europe. Le mode de dispersion était moins régulier à cause des environnements périglaciaires. Ce mode de dispersion est marqué par des événements de « bottleneck¹⁵ » et suivi par des phases d'expansions postglaciaires (Annexe 2, Tougaard *et al.*, 2008b).

De la même manière qu'il est pertinent de tester les mécanismes reliant phénotype et climat dans le fossile, il est envisageable d'étudier précisément l'histoire phylogéographique de *M. arvalis* dans le temps en se basant sur des données génétiques anciennes. En effet, si le climat a joué un rôle prépondérant dans la structuration génétique des populations de campagnols des champs, l'étude phylogéographique de différentes populations françaises avant, pendant et après le dernier maximum glaciaire devrait nous montrer comment les populations ont réagi précisément pendant cette phase glaciaire majeure. Cela permettrait : 1) de confirmer ou d'infirmer les hypothèses émises

¹⁵ Bottleneck de population : réduction significative de la taille d'une population qui cause l'extinction de beaucoup de lignées génétiques au sein de cette population. Par conséquent, la diversité génétique est diminuée (Ambrose, 1998)

sur la dynamique de dispersion des campagnols des champs (Tougaard *et al.*, 2008b) et 2) de calibrer précisément les horloges moléculaires¹⁶. Pour aborder ce type de question il est nécessaire de faire appel à l'étude de l'ADN conservé dans les restes fossiles (ADN dit « ancien ») de rongeurs avec toutes les difficultés méthodologiques que, a priori, cela peut comporter (dégradation de l'ADN, taphonomie des échantillons, méthode de PCR employée, type d'extraction, méthode de purification, taille de l'échantillon, quantité d'ADN initial, contamination par de l'ADN exogène, etc.).

1.1 L'ADN ancien chez les rongeurs

L'âge limite pour lequel de l'ADN ancien a été retrouvé est sans cesse reculé (400 000 ans pour un ours des cavernes, Valdiosera *et al.*, 2006; un demi-million d'années pour une bactérie, Johnson *et al.*, 2007). De plus, la reconstruction du génome à partir de petits fragments d'ADN ancien est de plus en plus complète (Rogaev *et al.*, 2006; séquençage du génome mitochondrial complet chez le mammouth et chez Ötzi, l'homme des Alpes tyroliennes, Ermini *et al.*, 2008; 3.3 Giga paires de bases d'ADN nucléaire chez un mammouth laineux du Pléistocène, Miller *et al.*, 2008). Ces performances ont été obtenues sur de grands mammifères et des bactéries conservés dans des conditions très favorables à la conservation d'ADN telles que des carottes de glaces, des grottes ou des sols gelés.

La majorité des études paléogénétiques se sont focalisées sur les mammifères (Hofreiter *et al.*, 2001; Paabo *et al.*, 2004; Willerslev et Cooper, 2005), mais peu d'entre elles ont traités des rongeurs (Annexe 3, Tougaard et Renvoisé, 2008), malgré la grande quantité de matériel de musée et fossile disponible testé des hypothèses évolutives.

Dans un contexte systématique, l'ADN ancien peut permettre de résoudre des problèmes d'identification des espèces à cause d'échantillons endommagés (Matisoo-Smith et Allen, 2001) ou ne contenant pas assez des traits morphologiques pour bien différencier les espèces (Demastes *et al.*, 2003). Les séquences anciennes sont comparées avec celles des espèces actuelles les plus proches taxonomiquement pour confirmer l'identification des spécimens. Chez les rongeurs, cette technique a été utilisée pour la première fois par Matisoo-Smith et Allen (2001) dans le but de valider l'identification des restes fossiles du rat de Pacifique (*Rattus exulans*) à partir de méthodes paléogénétiques et morphologiques (Matisoo-Smith et Allen, 2001). De plus, les

¹⁶ Horloge moléculaire : hypothèse selon laquelle les mutations génétiques s'accumulent dans un génome à une vitesse globalement proportionnelle aux temps géologiques

reconstructions phylogénétiques basées sur des séquences d'ADN ancien, associées à des analyses d'ADN moderne, peuvent résoudre les relations phylogénétiques des espèces éteintes et actuelles (Annexe 3, Tougard et Renvoisé, 2008). En outre, les changements génétiques des populations de rongeurs sont étudiés au cours du temps afin de mettre en évidence des événements de migration (pour une revue complète voir Annexe 3, Tougard et Renvoisé, 2008). Comparés aux changements climatiques, ces événements permettent d'étudier les réponses évolutives des populations de rongeurs en fonction des changements environnementaux (Annexe 3, Tougard et Renvoisé, 2008).

Chez les rongeurs, les plus anciens fossiles, sur lesquels de l'ADN ancien a été obtenu sont datés d'environ 12 000 ans (Kuch *et al.*, 2002) et ils ont été conservés, dans des « midden » (i.e. matières fécales consolidées par de l'urine), ce qui constitue des conditions de conservation inhabituelles pour de l'ADN ancien. Chez les rongeurs, l'ADN ancien est généralement obtenu à partir d'échantillons de musées (peau déshydratée, spécimens taxidermisés, des dents, des mandibules ou des os longs), des sites de grottes (dents et os), des nichoirs de chouettes effraies (dents) ou de pelotes fécales (Annexe 3, Tougard et Renvoisé, 2008).

L'un des sites paléontologiques et archéologiques dans lequel les chances d'extraire des restes osseux et des restes dentaires, et où l'ADN pourrait être bien préservé, est le site de grotte (Smith *et al.*, 2001). Par exemple, à Atapuerca (Espagne), l'ADN le plus ancien daté de 400 000 ans a été obtenu chez des ours des cavernes (Valdiosera *et al.*, 2006). D'autres exemples peuvent être cités pour montrer les potentialités des sites de grottes pour retrouver de l'ADN. L'ADN ancien chez l'homme de Néanderthal a été majoritairement obtenu dans des sites de grotte, datées d'environ 28 à 29 000 ans (respectivement, Ovchinnikov *et al.*, 2000; respectivement, Caramelli *et al.*, 2008). De l'ADN de mouton et de chèvre du Néolithique a été obtenu à partir de restes fossiles provenant de sites de grottes (Loreille *et al.*, 1997). Il est possible de citer également de l'ADN de rongeur retrouvé à partir de mandibules fossilisées dans la grotte de Lamar aux Etats-Unis (de 800 à 1300 ans, Hadly *et al.*, 2004). Dans les grottes, les os et les dents de rongeurs sont concentrés, la plupart du temps, par des agents accumulateurs animaux tels que les carnivores, les rapaces et particulièrement les chouettes (Andrews, 1990; Denys *et al.*, 1997).

Cependant, l'ADN peut être parfois dégradé par l'action des sucs gastriques de l'estomac des chouettes (Taberlet et Fumagalli, 1996). Il n'y a que peu de travaux à l'heure actuelle qui traitent de la dégradation de l'ADN dans les pelotes de rejection de

rapaces. Taberlet et Fumagalli (1996) ont réussi à amplifier de l'ADN mitochondrial (cytochrome *b*) à partir des crânes de rongeur provenant de pelotes. Ils ont obtenu des fragments de 307 et 1073 paires de bases (pb) à partir de chouettes effraies (dont les sucs gastriques dégradent peu l'os et l'émail dentaire) et de chouettes hulottes (dont les sucs gastriques dégradent davantage l'os et l'émail). Ils ont également voulu tester la préservation dans le temps en essayant d'extraire de l'ADN ancien sur des os de pelotes conservées dans un musée depuis 15 ans. Ces auteurs se sont aperçus qu'il n'y avait pas de différence d'amplification entre les deux chouettes pour les deux périodes testées. Cependant, les fragments de 1 kilobases ont été moins bien amplifiés que les fragments de 307 pb. Les fragments de 307 pb ont été amplifiés sur des pelotes datées de 15 ans. En outre, ils n'ont pas noté de contamination croisée dans les pelotes. Ils en ont ainsi déduit que l'ADN des proies devait être protégé à l'intérieur des pelotes contre la contamination, mais qu'en revanche, l'ADN pouvait être partiellement dégradé sous l'action des sucs gastriques de l'estomac des chouettes (Taberlet et Fumagalli, 1996). Cosson *et al.* (2005) ont réussi à amplifier des fragments de 273 à 998 pb à partir de pelotes en utilisant la méthode de Taberlet et Fumagalli (1996). Enfin, Jaarola et Searle (2004) ont réussi à obtenir des fragments de 385 pb issus de pelotes datées de 32 ans. Quant à Poulakakis *et al.* (2005), ces auteurs ont fait plusieurs tests méthodologiques pour optimiser l'extraction d'ADN (test du lavage des os à l'EDTA avant extraction; tests des extractions au Guanadinium, au mélange protéinase K, EDTA et N-lauryl sarcosyl, et au mélange urée et protéinase K). Ils en ont conclu que des lavages courts en présence d'un tampon de décalcification (EDTA), avant certains processus d'extraction, permettaient d'optimiser la présence d'ADN dans les produits de PCR. Ils ont noté cependant que l'amplification de longs fragments d'ADN était difficile. Ces auteurs ont obtenu de meilleurs rendements avec des fragments de 308 pb, que des fragments de 425 pb (Poulakakis *et al.*, 2005). Il est à noter toutefois, que peu de ces études portent sur la dégradation dans le temps des pelotes et qu'aucune d'entre elles ne se basent sur des méthodes de quantification précises de la dégradation de l'ADN dans les pelotes de rejection.

1.2 Problématique

L'objet de notre étude est, dans un premier temps, de caractériser et de quantifier les possibilités de préservation, ou de dégradation, de l'ADN de petits mammifères dans des sites paléontologiques et archéologiques. Nous supposons que si la quantité d'ADN

disponible après digestion par un rapace est diminuée, alors les chances d'extraire de l'ADN dans des mandibules anciennes de rongeurs sont d'autant plus limitées.

Pour tester la dégradation de l'ADN chez les rongeurs nous avons travaillé en plusieurs étapes :

1) Quantification de l'ADN de mandibules actuelles (=ADN actuel).

Cette étape permet d'avoir une estimation de la quantité d'ADN initial présente dans des mandibules actuelles. Cette quantification sert de point de comparaison avec les autres étapes où la dégradation est potentiellement plus marquée.

2) Quantification de l'ADN de mandibules de pelotes de rejection (=ADN digéré)

Cette étape permet de quantifier l'ADN présent dans les mandibules de rongeurs après digestion par la chouette. Nous avons également testé la dégradation au cours du temps de l'ADN dans les pelotes de rejection. L'effet du temps est un paramètre supplémentaire à prendre en compte dans les processus de dégradation de l'ADN. Si l'ADN des mandibules digérées est déjà dégradé, l'effet temporel peut aggraver la situation, même si les mandibules sont supposées être relativement préservées dans la pelote (Taberlet et Fumagalli, 1996). Nous avons donc comparé la dégradation de l'ADN entre des pelotes fraîches, datées de plus d'un mois et vieilles de plus de 25 ans.

Plusieurs genres et espèces de rongeurs ont été examinés, afin de tester les contaminations croisées potentielles au sein d'une pelote (Taberlet et Fumagalli, 1996).

3) Quantification de l'ADN de mandibules fossiles dans des sites de grottes (=ADN fossile)

Enfin, cette dernière étape est destinée à quantifier l'ADN restant dans les mandibules fossiles des sites de grottes. Si toutefois l'ADN n'était pas préservé, il faudra se référer aux étapes antérieures pour essayer de comprendre les processus entraînant la dégradation de l'ADN.

La quantification de l'ADN initiale disponible a été effectuée à partir d'une approche relativement récente : la PCR en temps réel ou PCR quantitative (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Cette approche permet, non seulement de quantifier la quantité initiale de molécules à l'origine du produit de PCR obtenu, mais elle atteste également de la fiabilité des séquences d'ADN ancien vis-à-vis des contaminations éventuelles (Paabo *et al.*, 2004; Pruvost et Geigl, 2004; Willerslev et Cooper, 2005). Cette technique a été utilisée pour la première fois en paléogénétique par Kefi *et al.* en 2003 (Kefi *et al.*, 2003).

De façon à pouvoir comparer nos résultats avec les travaux antérieurs les tests de dégradation de l'ADN ont été réalisés sur le gène cytochrome *b*.

La majorité des travaux en ADN ancien se sont focalisés sur l'étude des grands-mammifères. Alors que les rongeurs présentent un grand intérêt évolutif, les travaux de paléogénétique sur ce modèle sont moins fréquents (Tougaard et Renvoisé, 2008). Peut-on supposer que les différences de quantité d'ADN préservé entre les grands et les petits mammifères en sont la cause ? Pour tester cette hypothèse, nous comparerons les résultats des mandibules de plusieurs rongeurs fossiles avec un échantillon d'une dent de grand mammifère pour un même site. De plus, il est possible de se demander s'il existe des différences de dégradation de l'ADN pour différents sites de grottes ? Peut-on envisager de prédire quel site aura potentiellement de meilleures chances qu'un autre de préserver l'ADN ?

Dans la mesure où l'ADN fossile serait préservé dans les mandibules des rongeurs, il faudrait tenter de mettre en évidence la réponse génétique des populations aux changements climatiques chez l'espèce *M. arvalis*. Par conséquent, nous avons travaillé sur la deuxième région hypervariable de la D-loop (HVII). La D-loop présente un taux de substitution de bases important ($> 0,10$ substitution/sites, Triant et DeWoody, 2006) en comparaison avec celui du cytochrome *b* (*cytb* > 0.08 sub/sites, Triant et DeWoody, 2006). Par conséquent, ce marqueur accumulera plus de mutations, ce qui permet une meilleure distinction génétique des populations. Grâce à l'étude paléogénétique chez l'espèce *M. arvalis*, nous pourrions tester l'évolution des séquences avant, pendant et après le dernier maximum glaciaire.

Nous travaillerons à l'échelle de la France car l'espèce *M. arvalis* y est très présente. De plus, nous avons montré dans le Chapitre I, qu'il y existait, dans ce pays, une structuration génétique des populations forte et cohérente avec l'échelle européenne (ADN mitochondrial). Pour ces raisons, la France constitue une bonne échelle d'étude pour les questions que nous nous posons chez cette espèce. Les mandibules fossiles testées ont été obtenues sur différents sites archéologiques français datés de - 40 000 ans à moins de - 12 000 ans, encadrant ainsi le dernier maximum glaciaire.

II. Processus de dégradation de l'ADN

Avant de s'intéresser à la caractérisation de la dégradation de l'ADN dans les mandibules de campagnols, il est nécessaire de connaître les différents processus de dégradation de l'ADN et leurs conséquences sur les analyses PCR.

Après la mort de tout organisme vivant, l'ADN est dégradé par des nucléases endogènes (Hofreiter *et al.*, 2001; Brotherton *et al.*, 2007). L'ADN subit plusieurs types de dégradations qui détruisent plus ou moins rapidement la molécule d'ADN (Figure III. 1). Par exemple, l'oxydation modifie les bases azotées et les phosphates des sucres du squelette de l'ADN. En outre, la désamination (ôtement d'un acide aminée) et autre processus hydrolytique conduisent à la destabilisation et la destruction de la molécule d'ADN. Tous ces processus réduisent la potentialité de retrouver des séquences d'ADN ancien. Par exemple, une forte proportion de résidus de thymine et de cytosine dans les extraits de tissus anciens est modifiée par des processus d'oxydation en hydantoïnes¹⁷ (Figure III. 2), qui bloquent l'ADN polymérase pendant la PCR (voir dans Hofreiter *et al.*, 2001; Paabo *et al.*, 2004; Willerslev et Cooper, 2005; Brotherton *et al.*, 2007). Tous ces processus engendrent des erreurs dans la séquence finale après amplification (Figure III. 2). Si on s'intéresse plus particulièrement à la désamination de la cytosine en uracile, cette modification est la plus fréquente et la plus facilement détectable des modifications. En effet, si la cytosine est transformée en uracile, les bases uraciles seront traduites en bases thymines lors de la PCR par les taq polymérases. Les séquences ainsi obtenues seront riches en substitutions C→T (Hofreiter *et al.*, 2001; Paabo *et al.*, 2004; Willerslev et Cooper, 2005; Brotherton *et al.*, 2007).

¹⁷ Hydantoïnes : produits d'oxydation des bases pyrimidines (cytosine et thymine).

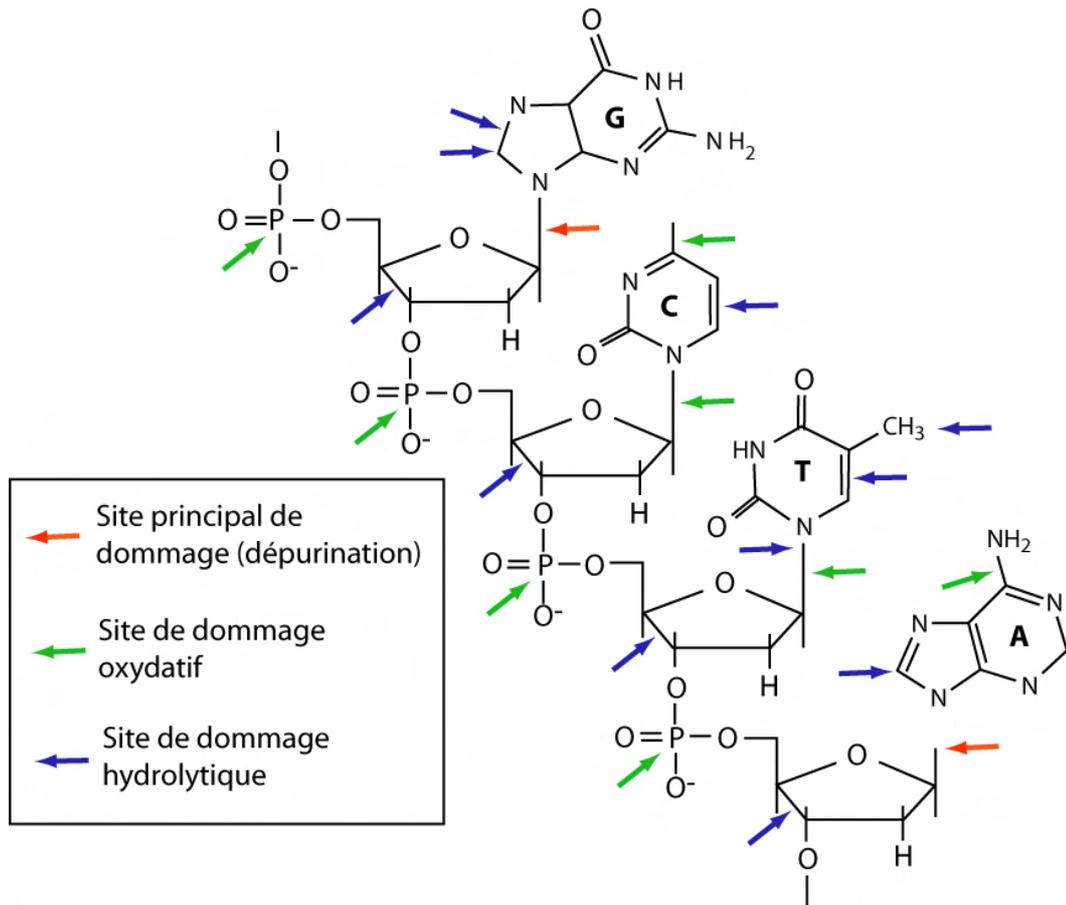


Figure III. 1 : Processus de dégradation de la molécule d'ADN. Un court segment sur un brin de la double hélice de la molécule d'ADN est représenté avec les quatre bases communes. Les sites principaux de dégradation, ou dommage, sont représentés par les flèches rouges. Les sites susceptibles d'être dégradés par des attaques hydrolytiques sont représentés par des flèches bleues et ceux prompts à être détruits par de l'oxydation sont représentés par des flèches vertes. G, guanine ; C, cytosine ; T, thymine ; A, adenine. (Modifié par Hofreiter *et al.* 2001).

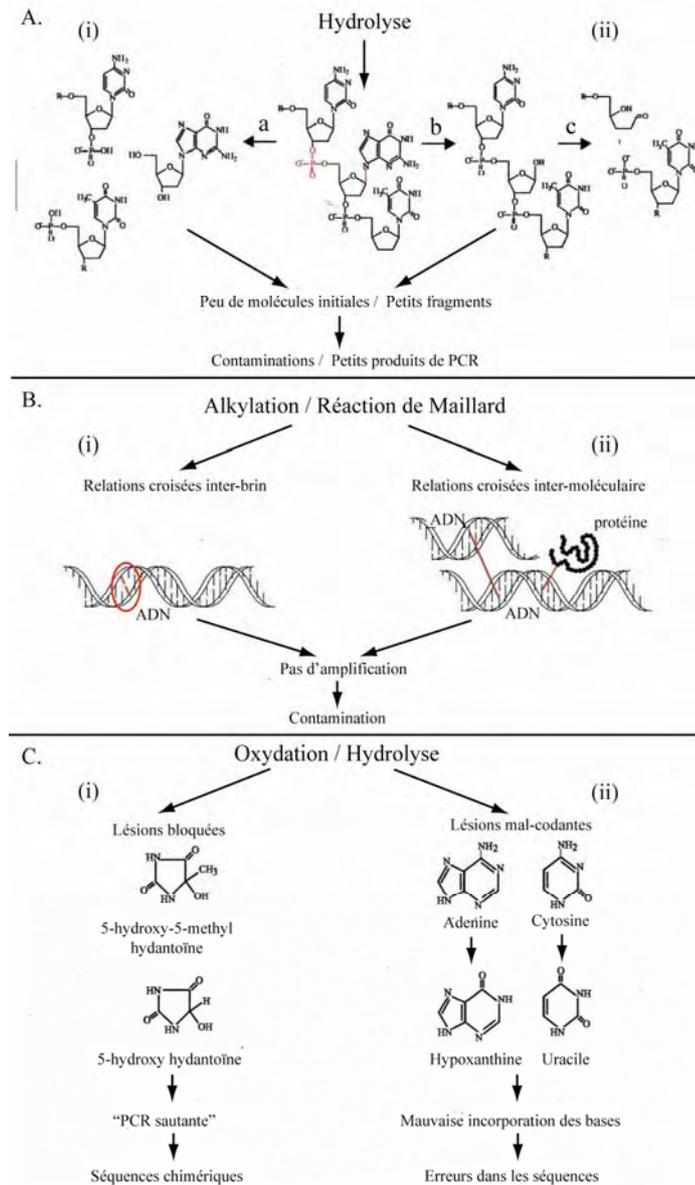


Figure III. 2 : Détail des processus biochimiques de la dégradation de l'ADN *post-mortem*. Les structures endommagées sont montrées en rouge. A. Formation des cassures des brins d'ADN par attaque hydrolytique. (i) clivage direct du squelette phosphodiester de la molécule d'ADN (a). (ii) Dépurination produisant un site sans base (site AP) (b), suivi par une cassure au niveau des sucres du squelette de l'ADN (c). La cassure des brins d'ADN est largement responsable de l'amplification de courts fragments d'ADN et du fort taux d'ADN perdu dans les restes fossiles. B. Différents types de formation de relations croisées. (i) Relation croisée inter-brin par alkylation¹⁸ (ii) Relations croisées inter-moléculaires par réaction de Maillard¹⁹. Les relations croisées empêchent l'amplification des molécules endogènes, augmentant le risque de contamination. C. Modifications oxydantes et hydrolytiques des bases produisant (i) des lésions bloquées ou (ii) des lésions mal codées. Quelques dégradations oxydantes engendrent des lésions bloquant l'action de l'ADN polymérase, et produisant des séquences chimériques à travers la «jumping PCR ». Les attaques hydrolytiques des bases entraînent des lésions mal codantes (par exemple, la désamination de la cytosine et de l'adénine en uracile et hypoxanthine, respectivement). Ces lésions entraînent l'incorporation de bases erronées pendant l'amplification. (D'après Willerslev et Cooper, 2005).

¹⁸ Alkylation : transfert d'un groupement alkyle d'une molécule organique à une autre

¹⁹ Réaction de Maillard : le groupement carboxyle réagit avec le groupe amine de l'acide aminé, produisant des glycosylamines N-substitués et de l'eau.

III. Matériels et méthodes

III.1 Matériel actuel : mandibules de *Microtus arvalis*

Six mandibules actuelles de l'espèce *Microtus arvalis* (mandibules droite et gauche de trois individus), non digérées, ont été utilisées pour caractériser la quantité initiale présente dans les mandibules avant digestion. Ces mandibules proviennent d'une population de Nuit-Saint-Georges (Bourgogne, France). Les individus ont été piégés sur le terrain et les crânes prélevés ont été préservés dans de l'alcool absolu ou à - 20°C. Seuls les crânes ont été conservés.

III.2 Matériel digéré : mandibules de rongeurs de pelotes de réjection

En ce qui concerne les pelotes de rejection, 24 mandibules ont été obtenues à partir de pelotes fraîches ou très récentes (1 journée tout au plus) récoltées dans des nichoirs artificiels de chouette effraie (*Tyto alba*), situés dans des villages proches de Dijon (Bourgogne, France ; Figure III. 3, Tableau III. 1). D'autre part, neuf mandibules analysées proviennent de pelotes anciennes de chouettes effraies anciennes, récoltées en 1980 sur l'île d'Oléron (Aquitaine, France) et conservées depuis au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris (Tableau III. 1). Ces pelotes ont été choisies car des dates de prélèvement précises y étaient associées. Les pelotes de réjection n'ont été ouvertes qu'après avoir été déposées dans le laboratoire d'ADN ancien pour limiter au maximum les contaminations externes. Par conséquent, les espèces ont été déterminées à l'œil nu selon les critères définis par Chaline *et al.* (1974).

III.3 Matériel fossile : mandibules de *M. arvalis* et dent de grand mammifère

Pour les sites de grottes, 35 mandibules de rongeurs (principalement de *M. arvalis*) et une dent de grand mammifère (*Equus caballus*) ont été étudiées (Tableau III. 1 ; Figure III. 3). Les rongeurs ont été pré-déterminés à la loupe binoculaire à partir des molaires comme mentionné précédemment (Chaline *et al.*, 1974). Sur tous les sites de grottes étudiés, des restes de dents de grands mammifères étaient présents dans la série sédimentaire. Nous avons voulu tester l'une de ces dents, celle du site de la grotte de Rochefort, qui a été récoltée dans les conditions les plus stériles possibles (cf. partie III. 4 conditions expérimentales), pour valider la présence ou non d'ADN dans le site.

L'hypothèse sous-jacente de l'utilisation du matériel de grand mammifère est que, si les mandibules de rongeurs ne présentent pas d'ADN, alors que les dents de grands

mammifères en contiennent, le problème de préservation serait probablement issu du type d'échantillon testé, mais aussi de la préservation différentielle au sein d'un même site. S'il n'y a pas d'ADN dans aucune des deux catégories de mammifères, le problème viendrait probablement des conditions de préservation du site lui-même. Les niveaux sédimentologiques des grottes sur lesquels les prélèvements ont été effectués sont datés entre - 40 000 ans BP (grotte du Noisetier) et moins de - 12 000 ans BP (la Baume de Gigny ; Tableau III. 1).

Pour le site de la Baume de Gigny plusieurs prélèvements, décalés dans le temps, ont été réalisés. Les premiers prélèvements de rongeurs sur le site de la Baume de Gigny ont été effectués par Jean Chaline (Campy *et al.*, 1989). Les sédiments ont été tamisés à l'eau et les échantillons ont été stockés sans conditions particulières dans les collections de l'Université de Bourgogne (uB ; Dijon, France). Plusieurs niveaux stratigraphiques ont été datés précisément, par la méthode radiocarbone, lors des fouilles de cette époque. D'autres prélèvements ont été effectués par Pierre Lopinet (2003 et 2004) dans un sondage à 30 mètres de la fouille précédente. Certains niveaux ont été corrélés stratigraphiquement avec ceux de Campy *et al.* (1989), mais aucun d'entre eux n'a été daté précisément. Les échantillons de rongeurs issus de ce sondage n'ont pas été conservés dans des conditions particulières. Enfin, une fouille de reconnaissance a été réalisée par Christelle Tougard (2004) dans les premiers niveaux du sondage de Lopinet (2003). Ces prélèvements ont été réalisés dans des conditions dites stériles. Les sédiments issus de cette fouille de reconnaissance ont été tamisés à sec et conservés à - 20°C.

Pour les autres sites, j'ai effectué les prélèvements moi-même dans les conditions les plus stériles possibles (cf. partie III. 4 conditions expérimentales). Les échantillons ont été conservés à -20°C après tamisage des sédiments.

Des tests préliminaires, en PCR classique, ont été effectués sur des mandibules de *M. arvalis* par C. Tougard et Amélie Petitjean sur les échantillons du site de la Baume de Gigny (C. Tougard comm. pers., Petitjean, 2005). Quelques échantillons de toutes les phases de prélèvements ont été testés. Des échantillons de mandibule des niveaux VIII et IX (selon Campy *et al.*, 1989) ont été testés. Ces échantillons provenaient à la fois des fouilles de Chaline (conservés depuis plus de 20 ans en collection) et à la fois des sondages de Lopinet (conservés depuis un an dans les collections). De plus, des tests ont été effectués sur des mandibules du niveau 3 (selon Lopinet, 2005), prélevées lors de la fouille de reconnaissance en 2004 par C. Tougard. De tous les échantillons testés, seul un

échantillon, issu du niveau 3 (selon Lopinet, 2005) du prélèvement 2004, a donné des résultats positifs (Petitjean, 2005). Une séquence de 200 pb du gène *cytb* a été obtenue. Cette séquence a été attribuée à *M. arvalis* par BLAST. Elle correspond à la séquence d'un *M. arvalis* de la localité d'Otterswiller dans le bas Rhin (AM991084, Tougard *et al.*, 2008b). Cet échantillon n'est pas daté précisément. Il correspond à un âge inférieur à 6 000 ans. Ces premiers tests indiquent donc que de l'ADN est potentiellement préservé dans les mandibules de rongeur pour ce site, mais uniquement pour des sédiments fraîchement prélevés. Par conséquent, j'ai testé un autre échantillon de ce niveau, ainsi que des échantillons des niveaux testés auparavant par C. Tougard et A. Petitjean (Tableau III. 1).

Chapitre III

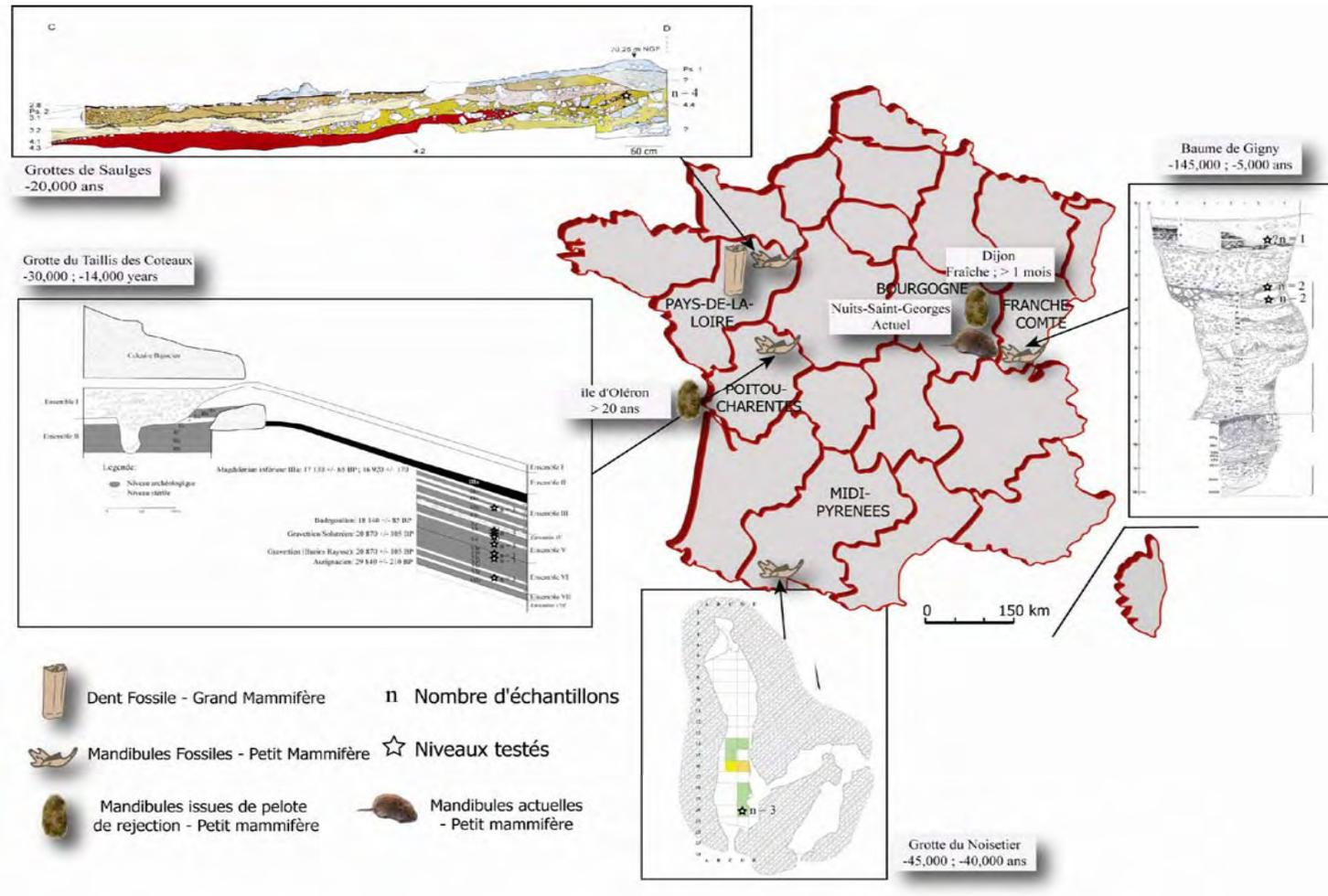


Figure III. 3 : Situation géographique des sites pour lesquels les mandibules actuelles de pelote et fossiles ont été récoltées. Le nombre et la situation des échantillons de mandibules et de dents fossiles sont matérialisés par des étoiles pour chaque niveau.

Chapitre III

	Région	Niveau archéologique	Age (années)	Lieu d'extraction	Nombre d'échantillons	Mandibules ¹					Dent ²
						<i>Microtus arvalis</i>	<i>Microtus oeconomus</i>	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Apodemus sp.</i>	<i>Crocidura sp.</i>	<i>Equus caballus</i>
<i>Sites de grotte</i>											
Grotte du Noisetier	Midi-Pyrénées	D20	? 40 000 (BP)	uB	3	3					
Baume de Gigny	Franche-Comté	IX (selon Campy)	< 31 500 (BP)	uB	2	2					
		VIII (selon Campy)	28 500±1400 (BP)	uB	2	2					
		3 (selon Lopinet)	< 6 000 (?)	uB	1	1					
Taillis des Coteaux	Poitou-Charentes	VIg	24 950±135 (BP)	IJM	3	3					
		VIb	20 870±105 (BP)	IJM	3	3					
		VIa		IJM	3	3					
		Vd	18 140±85 (BP)	uB	3	3					
		V a,b,c III f		uB	3	3					
Grotte de Rochefort	Pays-de-la-Loire	4,3	> 20 000 (BP)	IJM/uB	4	3				1	
<i>Pelotes de réjection</i>											
Champagny	Bourgogne		Fraiches	uB	10	5		2	3		
Ferme de la Rochette			Fraiches	uB	4	1		2	1		
Prayré			< 1 mois	uB	3	3					
Messigny-les-Ventoux			> 1 mois	uB	7	3			4		
Collection MNHN Paris	Ile d'Oléron		> 20	uB	9				7	2	
Total					63	39	2	4	15	2	1

¹Petits mammifères

²Grands mammifères

uB = laboratoire université de Bourgogne

IJM = Institut Jacques Monod

Tableau III. 1 : Tableau récapitulatif des échantillons analysés en France.

III.4 Conditions expérimentales

Sur le terrain, les sédiments de grotte et les pelotes ont été récoltés suivant un protocole strict défini par Pruvost *et al.* (2007). Les ustensiles ont été nettoyés à l'eau de javel ou à l'alcool. Cependant le nettoyage à l'eau de javel est plus efficace pour éviter le plus possible les contaminations éventuelles. Charlottes, blouses en plastique jetable, masques et gants en latex ont été utilisés pendant la période de fouille pour limiter les contaminations par le fouilleur. Les fossiles ont été préservés dans les sédiments pendant toute la période de fouille. Ensuite, ces sédiments ont été transportés dans des sacs stériles et des glacières jusqu'à leur stockage dans une pièce tempérée ($\approx 15^{\circ}\text{C}$). Dans la mesure du possible, les sédiments ont été maintenus à la température des grottes ($\approx 15^{\circ}\text{C}$) pour limiter les changements brusques de température qui favorisent la dégradation de l'ADN (Smith *et al.*, 2001; Pruvost *et al.*, 2007). La grotte du Taillis des Coteaux a une température moyenne en Juillet de 16°C , celle de la grotte du Noisetier était de 15°C et la grotte de Rochefort de 13°C . Après tamisage dans les conditions les plus stériles possible (nettoyage des tamis à l'eau de javel), les fossiles ont été conservés à -20°C au congélateur du laboratoire d'ADN ancien de Biogéosciences.

Les pelotes ont été prélevées sur le terrain à l'aide de gants en latex et déposées dans des sachets en plastique stériles. Elles ont été transportées dans une glacière à 5°C et directement stockées à -20°C dans le laboratoire d'ADN ancien de Biogéosciences.

III.5 Extraction de l'ADN

Toutes les expérimentations pré-PCR ont été effectuées dans une pièce, avec matériel et équipement, spécialement dédiée à l'étude de l'ADN ancien et dégradé et séparée physiquement des autres laboratoires traitant de l'ADN moderne. Les extractions de l'ADN des mandibules fossiles et des pelotes ont été faites au laboratoire Biogéosciences (uB). La dent de cheval a été extraite à l'Institut Jacques Monod (IJM ; Paris VII, France) par Sophie Champlot.

La surface des mandibules de rongeurs et du cheval a été grattée avec un scalpel stérile. Les mandibules ont été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier. La dent de cheval été broyée dans un moulin réfrigéré « freezer mill ». Pour évaluer si des contaminations d'ADN externe surviennent pendant l'extraction, un tube témoin sans poudre d'os a été traité de façon identique aux autres tubes pendant la phase d'extraction, mais aussi pendant la phase d'amplification.

L'extraction des mandibules a été réalisée en utilisant uniquement un traitement à l'EDTA. Cette technique améliore la quantité de molécules restituée dans le tampon de réaction (Eva-Maria Geigl, comm. pers., Rohland et Hofreiter, 2007). La poudre des mandibules (de 9 à 132 mg) a été suspendue dans 400 µl d'EDTA à 0,5 M (pH = 8.0) et la dent de cheval (156,7 mg) a été suspendue dans 700 µl de la même solution. Ensuite, les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 48h avec agitation. Après centrifugation (4000 rpm pendant 10 min), les échantillons ont été purifiés en utilisant un kit de purification de produits de PCR (QIAquick, Qiagen).

III.6 PCR classique versus PCR quantitative

III.6.1 Principes de la PCR classique

Le principe de la PCR classique est d'amplifier en plusieurs milliards de fois une séquence d'ADN cible (mitochondrial ou nucléaire). La première étape du cycle consiste en la dénaturation (ou séparation) de la double hélice d'ADN. La température de dénaturation se situe en général entre 94 et 96°C. Ensuite, l'étape d'hybridation permet aux amorces de se fixer sur chacun des brins dénaturés, sur les extrémités de la séquence cible à amplifier. La température d'hybridation est dépendante de la taille et de la composition en base des amorces, mais en général elle se situe entre 50 et 65°C (Rychlik *et al.*, 1990). La dernière étape est l'extension ou élongation. Cette étape consiste à ajouter progressivement des bases, complémentaires au brin dénaturé, à partir des amorces. L'ADN polymérase, ou *Taq* polymérase, est une enzyme qui se fixe sur le brin d'ADN à l'extrémité 5' de chaque amorce et qui initie ensuite l'ajout de bases (dATP, dCTP, dTTP, dGTP ou dNTP pour désigner l'ensemble), en se déplaçant le long de chaque brin dénaturé (Figure III. 4). La température d'élongation est en général de 72°C car l'optimum d'activité de l'enzyme se situe entre 75 et 80°C (Chien *et al.*, 1976; Lawyer *et al.*, 1993). Dans certains protocoles de PCR, cette étape n'est pas spécifiquement programmée, car le temps de passage entre la température d'hybridation (60°C) et la température de dénaturation (94-96°C) permet à l'ADN polymérase d'effectuer la phase d'extension. Chaque cycle est ensuite répété plusieurs dizaines de fois de façon à obtenir plusieurs milliers de copies du même fragment d'ADN.

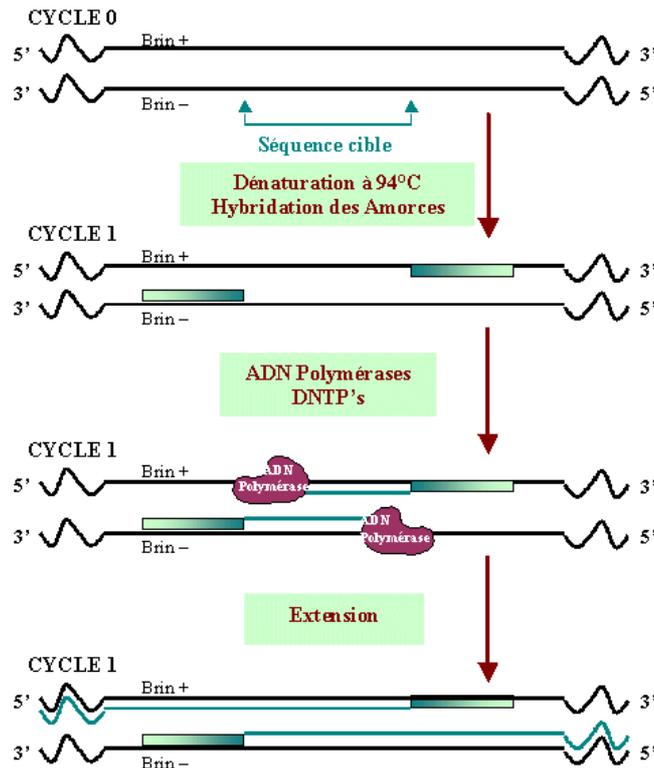


Figure III. 4 : Schéma récapitulatif du fonctionnement de la PCR classique. (Larzul, 1999).

III.6.2 Principes de la PCR quantitative

La PCR quantitative ou en temps réel (QPCR) a été inventée par Higuchi *et al.* (1992). Cette technique ressemble à la PCR classique dans les principes d'amplification. Toutefois, la PCR quantitative permet, par définition, de quantifier l'ADN présent initialement dans l'échantillon. De plus, cette technique apporte des avancées techniques considérables, par rapport à la PCR classique, pour la détection des contaminations et la validation des séquences obtenues (Paabo *et al.*, 2004; Willerslev et Cooper, 2005) car il est possible de tester précisément la spécificité des séquences et de quantifier la valeur minimale requise pour acquiesser de la véracité des séquences.

La quantification peut se faire à partir de différents procédés, mais nous décrivons celui le plus généralement utilisé à l'heure actuelle : la détection de la quantité d'ADN amplifié par fluorescence au SYBR Green®. Le SYBR Green® est un colorant fluorescent qui a la propriété de s'intercaler au sein de la molécule d'ADN double brin (Figure III. 5). Il est non spécifique, c'est-à-dire qu'il peut s'insérer dans n'importe quel type de séquence. Cette propriété du SYBR Green® est un avantage pour l'étude de l'ADN ancien (Pruvost et Geigl, 2004). En effet, la plupart du temps on ne connaît pas

exactement la séquence que l'on souhaite amplifier. Par conséquent, un intercalant spécifique risquerait de ne pas s'hybrider correctement à la séquence souhaitée.

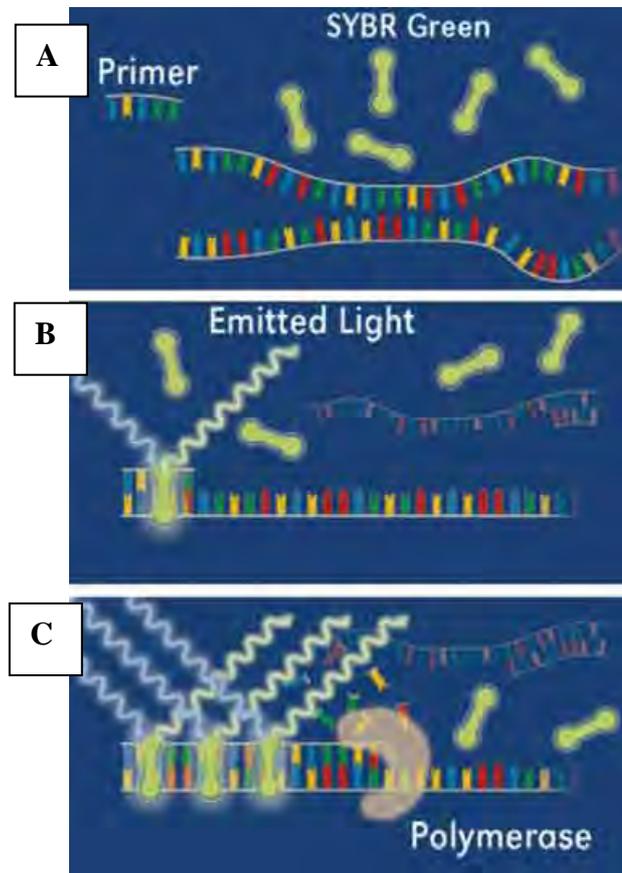


Figure III. 5 : Principe d'intercalation et de fluorescence du Sybr Green ® au sein de la molécule d'ADN pendant la PCR quantitative. A. Pendant la phase de dénaturation le Sybr Green ne fluoresce pas, il n'y a pas de détection par les capteurs. B. Pendant la phase d'hybridation, le Sybr Green commence à s'intercaler dans la molécule d'ADN au niveau des amorces. Il y a un début de fluorescence. C. Pendant la phase d'élongation, le Sybr Green est incorporé au fur et à mesure le long du fragment d'ADN. Plus il y a d'ADN amplifié pendant les cycles de la PCR, plus l'intensité de la fluorescence sera importante. Image provenant de www.thaiscience.com.

La fluorescence est détectée par des capteurs pour une certaine longueur d'onde (530 nm). Au fur et à mesure des cycles, la quantité d'ADN augmente (et donc la fluorescence) de façon exponentielle (2^n), jusqu'à un plateau qui détermine la fin de l'utilisation de tous les réactifs de la PCR et de l'ADN cible. Le cycle à partir duquel commence la détection de la phase exponentielle de la fluorescence (cycle seuil ou cycle threshold (Ct) en anglais) est pris en compte pour déterminer à quel moment les produits de PCR sont amplifiés.

Les différentes étapes d'utilisation de cette technique sont décrites précisément point par point d'après Pruvost et Geigl (2004).

Définition et test des amorces.

La définition des couples d'amorces (forward et reverse) peut se faire « à la main » (c'est-à-dire à partir d'un alignement regroupant des séquences du taxon étudiés ou de taxons proches) où à l'aide de logiciels de définition d'amorces (ex. Oligo®). Ce logiciel permet de calculer l'énergie de liaison à la séquence, d'estimer les risques d'hybridation de chacune des amorces sur elle-même ou entre-elles et de calculer la température d'hybridation des amorces sur la séquence cible. Ce dernier paramètre est primordial pour augmenter l'efficacité de la PCR et donc son rendement.

Une fois les couples d'amorces définis, ils sont testés sur du matériel actuel dont la séquence est connue et dont la quantité initiale est connue. Ce test permet de vérifier que la PCR fonctionne correctement. Plusieurs tests sont à effectuer :

- Test de la gamme de dilution. La quantité d'ADN initial en ng/μl de l'échantillon actuel est connue. A partir de cet échantillon de référence, une série de 6 dilutions (au 10^{ème} en général) est effectuée. Ainsi chaque concentration de dilution de la gamme est connue. Plus les concentrations initiales amplifiées sont petites, plus la PCR aura une bonne efficacité avec le couple d'amorce considéré

- Test de l'efficacité de la PCR. Le calcul de l'efficacité de la PCR est dépendant de la pente de la droite définie par les Ct des échantillons en fonction du logarithme (souvent exprimé en log base 10) de la quantité d'ADN initial (Figure III. 8, Rasmussen, 2001; Figure III. 8, Pruvost et Geigl, 2004). Ici, la pente correspond à la droite de la gamme de dilution.

$$E = 10^{\frac{-1}{pente}} - 1$$

Plus l'efficacité de la PCR est proche de 100%, meilleur est plus le couple d'amorces. L'erreur sur le calcul de l'efficacité est en général de ± 5%.

- Test des appariements d'amorces (dimères). Plus les amorces s'hybrideront entre elles, et plus elles s'hybrident tôt durant la PCR, moins le couple d'amorces sera adéquat pour des études en ADN ancien. Si les dimères d'amorces apparaissent avant ou peu l'apparition de l'échantillon cible, il faut estimer que le couple d'amorces n'est pas valide. Dans ce cas, l'appariement des amorces pourrait être antérieur à l'hybridation sur les séquences cibles. Les produits de PCR ne seraient alors pas spécifiques.

Chapitre III

- Test de l'auto-hybridation des amorces. Il est possible que chacune des amorces s'hybride avec elle-même. Cette anomalie des amorces diminue fortement l'hybridation correcte de celles-ci sur la séquence cible. Par conséquent, l'efficacité de la PCR est diminuée.

- Test de la spécificité des amorces. A la fin de la PCR quantitative, la température est augmentée progressivement. Au bout d'une certaine température, les deux brins des produits de PCR se disjoignent. La température, dite de fusion, va dépendre de la taille du fragment et de la quantité de liaisons G-C présentes dans la séquence. Plus le fragment est long et plus les liaisons G-C dans la séquence sont nombreuses, plus la température de fusion sera élevée. Cette température est donc spécifique au fragment recherché. Ainsi, si la température de fusion des produits de PCR n'est pas la même qu'au sein de la gamme, le couple d'amorce n'est pas spécifique. Si la température de fusion des dimères est identique à celle de la gamme, la confusion entre des séquences vraies et des dimères est possible. Ce type de couple d'amorces n'est pas à considérer pour des analyses futures.

- Test d'inhibition des échantillons Une fois les amorces définies, il est nécessaire de tester l'inhibition des échantillons sur la PCR. Lorsque l'on travaille en ADN ancien, il est parfois plus facile de s'affranchir au préalable des contaminants éventuels que des inhibiteurs co-extraits avec l'ADN (Gilbert *et al.*, 2006; Pruvost *et al.*, 2007). Il faut pour cela que le manipulateur travaille avec précautions. Une solution simple pour limiter l'inhibition lors de la PCR, et ainsi augmenter son efficacité, est de diluer les échantillons. Toutefois, pour connaître précisément la dilution qu'il faut effectuer, il faut connaître l'ampleur de l'inhibition. La PCR quantitative permet d'avoir accès à cette information. Une valeur seuil de fluorescence est établie lorsque les signaux de la fluorescence se situent au niveau de la phase exponentielle de toutes les amplifications (Figure III. 6). Pour chaque échantillon, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce seuil est mesuré. Cette valeur est nommée cycle seuil ou « cycle threshold (Ct) » ou « crossing point (Cp) ». Ce sont les terminologies anglaises qui sont généralement les plus utilisées. Les échantillons qui ont une forte quantité d'ADN et qui ne sont pas inhibés au début de la réaction vont être amplifiés plus rapidement et vont donc dépasser la valeur seuil plus rapidement. Ainsi, leur valeur de Ct sera plus basse. Par exemple, dans la Figure III. 6, les trois points de gamme représentent des concentrations d'ADN initial connues et décroissantes. Ainsi, les trois courbes sont décalées lors de la PCR. Le

point de gamme ayant la plus forte concentration d'ADN (300 pg/μl) a la plus faible valeur de Ct et ainsi de suite. Pour tester l'inhibition des échantillons, il suffit de faire la comparaison entre l'amplification d'une gamme seule et l'amplification de la gamme à laquelle nous aurons ajouté l'échantillon. S'il y a un « retard », c'est-à-dire que les Ct correspondant à la gamme + échantillon sont supérieurs aux Ct de la gamme seule, alors l'échantillon inhibe l'amplification optimale lors de la PCR (Figure III. 6). Plus l'inhibition est forte et plus il faudra diluer l'échantillon et recommencer jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'inhibition.

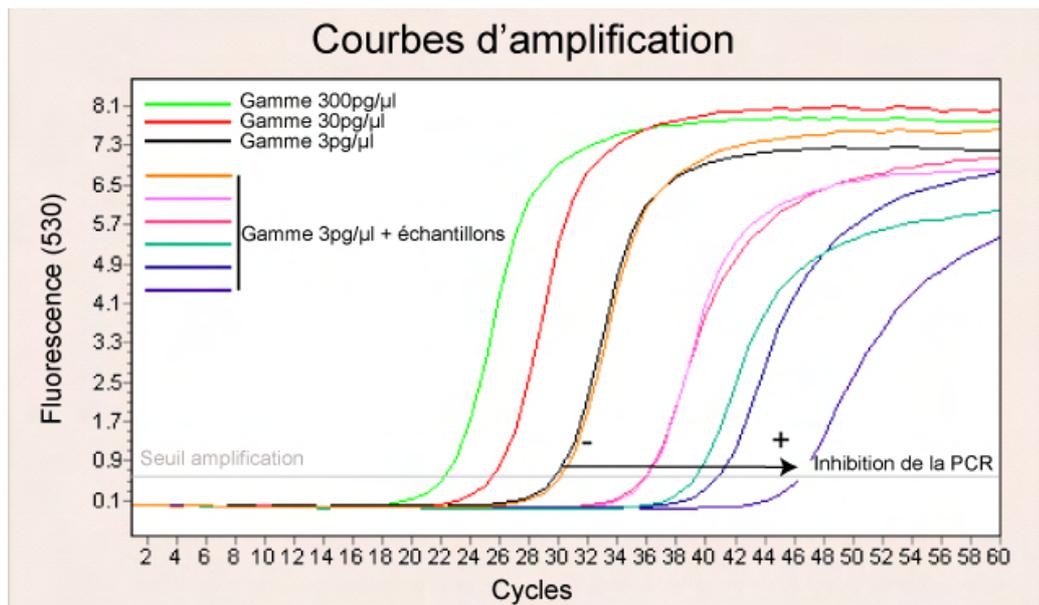


Figure III. 6 : Test d'inhibition d'échantillons fossiles. Le test d'inhibition est ici réalisé sur le dernier point de gamme pour l'illustration. Il faut noter que l'inhibition se fait généralement sur tous les points de gamme. Ici, l'échantillon matérialisé par la courbe orange n'inhibe pas la PCR. Il n'y a pas de « retard » dans l'amplification par rapport à la gamme. A l'inverse, l'échantillon bleu inhibe le plus fortement la PCR. Le produit de PCR est amplifié à 46 cycles alors que la gamme pour la même concentration est amplifiée à 30 cycles.

Spécificité et validité des échantillons

Quand l'inhibition est ôtée et que l'amplification fonctionne pour les échantillons testés, il faut s'assurer que le produit de PCR est spécifique. Pour cela on utilise la courbe de fusion (cf. Définition et test des amorces). La spécificité de la gamme est définie lors des tests des amorces. Ainsi, pour valider la spécificité d'une séquence, il suffit de comparer la température de fusion des produits de la gamme avec celle de l'échantillon (Figure III. 7).

Enfin, pour valider l'exactitude des produits de PCR obtenus, chaque échantillon positif devra être répliqué au moins trois fois.

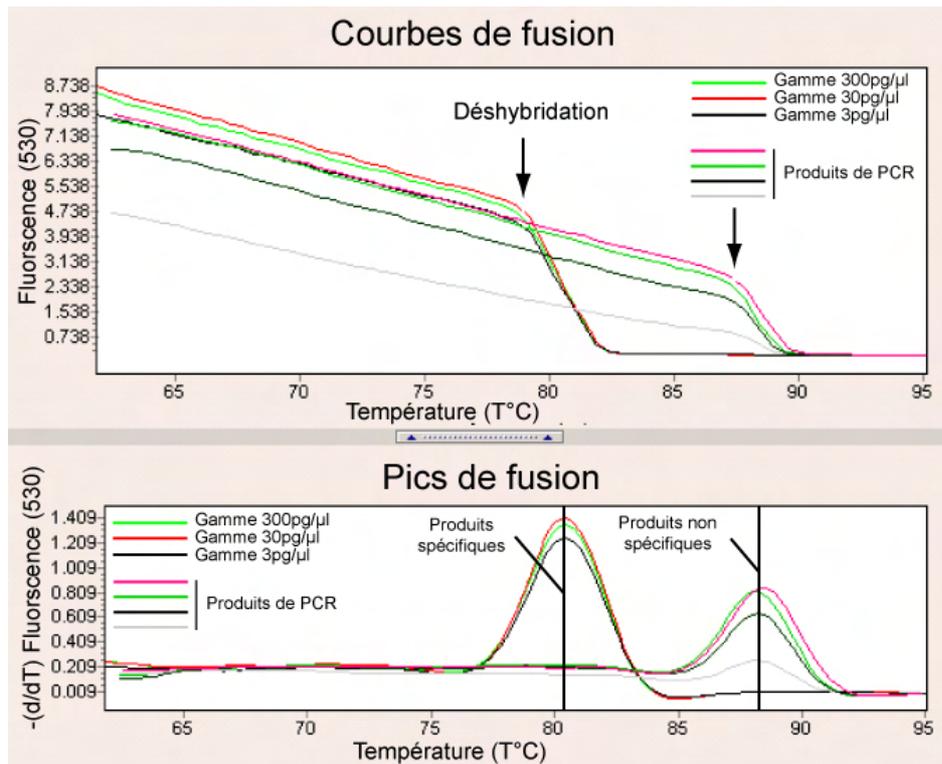


Figure III. 7 : Définition des produits spécifiques à partir des courbes et pics de fusion. Les courbes de fusion montrent à partir de quelle température les deux brins des produits de PCR se déshybrident. Les pics de fusion sont calculés par la dérivée première des courbes de fusion. Ils indiquent précisément la température de déshybridation des produits de PCR. Ici, les produits de PCR spécifiques de la gamme ont une température de fusion d'environ 80°C alors que les produits de PCR des échantillons ont une température de fusion de 87°C. Ces produits de PCR non spécifiques sont souvent des dimères d'amorces.

Par conséquent, la PCR quantitative renforce la véracité des séquences obtenues par rapport à la PCR classique. En effet, la QPCR permet de savoir :

- Pourquoi une PCR ne fonctionne pas. Si l'échantillon inhibe la PCR, seule la QPCR sera capable de le détecter.

- Si la séquence obtenue est potentiellement valide. Si le produit de PCR n'est pas spécifique, il est plus facile de le voir avec une QPCR qu'avec une PCR classique. De plus, si la quantité d'ADN initial n'est pas suffisante (< 100 molécules/g d'os), alors la séquence obtenue a davantage de risque d'être issue de contaminations que de l'échantillon lui-même.

Deux types de PCR quantitative ont été réalisés : i) l'UQPCR (Uracile-Quantitative-PCR, Pruvost et Geigl, 2004; Pruvost *et al.*, 2005) à l'IJM et ii) l'usuelle QPCR (Quantitative-PCR, Higuchi *et al.*, 1992) dont le protocole a été adapté au matériel du laboratoire Biogéosciences. L'UQPCR a été utilisée sur les mandibules fossiles de la grotte du Noisetier, de Rochefort, du Taillis des Coteaux et sur la dent de cheval de la grotte de Rochefort.

Chapitre III

L'UQPCR et la QPCR se différencient par deux processus :

1) Remplacement de la base thymine (T) par la base uracile (U) dans les réactions de PCR. Dans ce processus, toutes les séquences des produits de PCR issues de l'UQPCR auront des bases U.

2) Destruction de toutes les séquences contenant de l'U en début de PCR par l'enzyme UNG (Uracile-DNA-glycosylase).

L'une des substitutions les plus fréquentes que l'on peut observer dans des séquences anciennes est la transformation d'une base cytosine (C) en U (Hofreiter *et al.*, 2001; Paabo *et al.*, 2004; Willerslev et Cooper, 2005). Par conséquent, pendant les premiers cycles de l'UQPCR, ces séquences seront détruites. Il ne restera donc à amplifier que les séquences les moins dégradées. De plus, comme les produits de PCR de l'UQPCR contiennent de l'U, les produits des PCR antérieures seront détruits pendant cette phase de l'activation de l'UNG (à 37°C, Pruvost *et al.*, 2005),.

Ainsi, l'UQPCR présente un avantage supplémentaire par rapport à la QPCR car elle limite l'amplification des brins d'ADN trop dégradés et elle empêche les contaminations de produits de PCR antérieures pendant la phase d'amplification de la PCR (Pruvost et Geigl, 2005). Cependant, elle diminue la détection de brins d'ADN dégradés qui font partis de l'échantillon initial.

Pour l'UQPCR (Pruvost et Geigl, 2004; Pruvost *et al.*, 2005), deux jeux de couples d'amorces ont été utilisés pour la HVRII de *M. arvalis* et définis à partir du logiciel Oligo® (Institut Jacques Monod):

1) MaA3 (5' - TATAGTCAATGGGACCGGGA - 3') et MaB3 (5' - TGCCTTTGGGGGTTGTTAT - 3')

2) MaC4 (5' - GGCATACTTTTCATGCTCTTTTAG - 3') et MaD4 (5' - AATGTACGAGAACCCGGATG - 3').

Ces couples d'amorces amplifient des fragments de 81 pb et de 69 pb respectivement.

Les amplifications ont été réalisées sur un LightCycler (Roche, Allemagne) comme dans l'étude de Pruvost *et al.* (2005), mais dans une solution finale de 10µl. Le volume d'ADN source est dépendant du test d'inhibition effectué sur les échantillons fossiles (Figure III. 6). Le programme d'amplification a été défini comme suit : 15 min à 37 °C, 5 min à 95 °C et 60 cycles de 5 s à 95 °C et 40 s à 62 °C.

Les courbes de fusion ont été établies par une décroissance rapide de la température depuis 95°C vers 62°C, suivie d'une augmentation lente et régulière de la

Chapitre III

température jusqu'à 95°C à un taux de 0,1°C/s. La courbe standard de référence a été obtenue à partir d'une série de dilution (tous les 10èmes à partir de 3ng/μl) d'un échantillon actuel de *M. arvalis* (Ma9, Monthureux-le-Sec, France ; source J.-P. Quéré, Centre Biologie et Gestion des Populations -CBGP, Campus International de Baillarguet, France) de concentration initiale connue (228,10ng/μl). La valeur de la concentration a été obtenue grâce à un Nanodrop® qui mesure la quantité d'ADN à partir de l'intensité de la longueur d'onde émise par l'ADN (680 nm). Pour que la mesure soit la plus précise possible, il est nécessaire que l'échantillon soit très bien purifié de façon à éliminer le plus d'ARN possible. Sinon, la valeur de quantification est faussée.

Pour la QPCR, réalisée au laboratoire de l'uB, un jeu d'amorces spécifiques à l'ADN de rongeurs présents dans les pelotes de chouettes a été défini à la main pour le *cytb* : CB1 (5' – AAGCCACCTCACACGATTC – 3') and CB2 (5' – CAGTTGGGTTGTTAGATCCTGTT – 3'). Ce couple d'amorces amplifie un fragment de 116 pb.

Ensuite, l'amplification a été réalisée sur un iCycler (BioRad, USA) avec 12.5μl de iQ™ SYBR® Green Supermix d'une concentration de 1X [50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH=8,4), 0,2mM pour chaque dNTP, 0,05u/μl d'iTaq ADN polymerase, 3mM de MgCl₂, SYBR Green I, 10nM fluorescéine, et des stabilisateurs], 0.5μl de chaque amorce (0.5μM), xμl d'ADN source (x dépend des résultats des tests d'inhibition, Pruvost et al., 2004, 2005) et de l'eau distillée stérile dans un volume final de 25 μl. Le programme d'amplification a été défini en fonction des instructions du constructeur et des spécificités liées à l'ADN ancien. En effet, en ADN ancien le nombre de cycles doit être plus important que pour les analyses en ADN moderne. Comme on s'attend à ce que la quantité d'ADN initial présent dans les échantillons fossiles soit faible, le nombre de cycles nécessaires à amplifier de l'ADN ancien va être d'autant plus élevé. La base générale est de 60 cycles (E.-M. Geigl comm. pers.). Il est parfois nécessaire de réaliser plus de cycles, mais dans ce cas il faut mettre plus de produit de réaction de PCR. On se heurte cependant au fait que, plus la PCR va durer longtemps, plus nous risquons d'amplifier des produits de PCR non spécifiques comme les dimères.

Le programme qui a été établi sur l'iCycler de l'uB est différent de celui utilisé à l'IJM pour trois raisons. La première est que le marqueur moléculaire utilisé est différent (*cytb* pour l'uB au lieu de D-loop pour l'IJM). Par conséquent, les températures d'hybridations ne sont pas les mêmes pour les deux protocoles. La deuxième raison est que, selon les machines de PCR et les réactifs de PCR utilisés, les constructeurs ne

définissent pas tout à fait les mêmes temps et températures de cycle. La troisième raison est que, comme nous n'avons pas utilisé d'UNG dans notre protocole d'amplification, la phase de destruction par l'UNG à 37 °C est supprimée. Selon ces critères, le programme a été défini comme suit : 3 min à 98 °C, 60 cycles de 15 s à 95 °C, 30 s à 55 °C et 30 s à 72 °C, et 1 min 30 s à 95 °C. Les courbes de fusion ont été établies par une décroissance rapide de la température depuis 95°C vers 55°C, suivie d'une augmentation lente et régulière de la température jusqu'à 95°C à un taux de 0,05°C/s.

Pour chaque échantillon positif, trois répliquas ont été réalisés. La courbe de dilution standard a été obtenue à partir d'un échantillon cloné de *Microtus (Terricola) pyrenaicus* (E56, Pyrénées, France ; source : J.-P. CBGP) de concentration connue (130,52 ng/μl). Le clonage de l'échantillon permet d'isoler le gène cible, ici le *cytb*, de façon à limiter la présence de pseudogènes²⁰ (*numt*) et d'ARN lors de la quantification de l'échantillon.

III.7 Méthode de quantification de l'ADN initial

La quantité d'ADN ancien initial a été calculée par une méthode de quantification absolue définie selon Pruvost et Geigl (2004). La quantité d'ADN initial est définie à partir d'une courbe de calibration, ou courbe standard, établie à partir de la gamme de dilution (Figure III. 8). La courbe de dilution est représentée par le Ct de chaque standard en fonction du logarithme de leur concentration. Pour chaque échantillon dont la concentration est inconnue, le nombre de Ct de cet échantillon renvoie à une concentration définie par la courbe standard. Par un calcul simple de $10^{\log(QI)}$ (avec QI = quantité initiale), on retrouve la quantité initiale d'ADN, ici en pg/μl, présent dans l'échantillon.

En ADN ancien, il est nécessaire d'obtenir le nombre de molécules initiales dans l'échantillon. Si ce nombre est trop faible (< 100 molécules/g d'os), les risques d'erreur lors de la PCR sont importants (Pruvost *et al.*, 2005; Pruvost *et al.*, 2007; Pruvost *et al.*, 2008). En effet, si la quantité d'ADN initial n'est pas assez importante, il y a des risques pour que, lors de la PCR, les erreurs de l'ADN polymérase soient amplifiées. Lors d'une PCR, le nombre de mutations dues aux erreurs faites par la Taq polymérase est de l'ordre de 1 mutation tous les 10 000 nucléotides (Pruvost *et al.*, 2008).

²⁰ Pseudogène : gène inactif au sein d'un génome. Ici, gène mitochondrial inactif contenu dans le génome nucléaire.

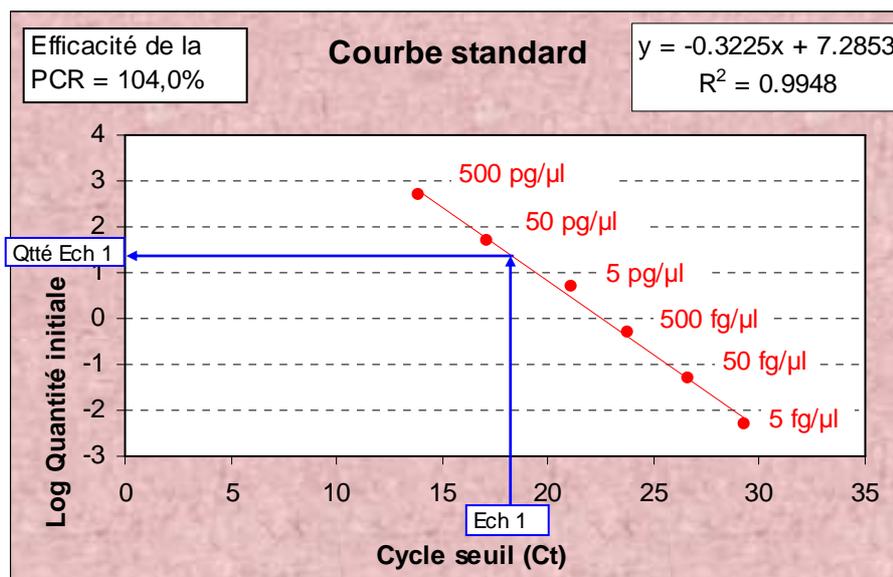


Figure III. 8 : Méthode de calcul de la quantité d'ADN initial à partir de la gamme de dilution. La QPCR donne la valeur du nombre de cycles à partir duquel la PCR entre dans sa phase exponentielle (cycle seuil ou cycle threshold, Ct). La courbe standard est obtenue à partir des Ct spécifiques à chaque point de gamme dont la concentration est connue. Plus la droite de régression a un coefficient de détermination proche de 1 et plus l'efficacité est élevée, plus la gamme de dilution constitue une bonne référence. Cette courbe a été obtenue à partir du couple d'amorces CB1-CB2 sur l'échantillon E56. Pour un échantillon inconnu "Ech 1", le Ct est connu après la PCR. Il est possible d'en déduire la quantité initiale à partir de la courbe standard.

En ADN ancien, plus l'ADN est dégradé, plus il faut augmenter le nombre de cycles, c'est-à-dire le risque d'erreur faite par la *Taq*. De plus, lorsque l'ADN est trop dégradé, la PCR va avoir tendance à amplifier les fragments les mieux préservés. Si la quantité d'ADN initial est trop faible et que l'ADN est trop dégradé, les séquences des contaminations potentielles seront amplifiées préférentiellement (Pruvost *et al.*, 2008).

Pour calculer la quantité de molécules initiales, il faut d'abord obtenir la masse moléculaire d'ADN initial : nombre de molécules dans un génome complet double brin = 6.10^9 pb, nombre qu'il faut multiplier par 2 chez un diploïde = 12.10^9 pb. Ce nombre de paires de bases représente un poids moléculaire de 4.10^{12} g/mol, c'est-à-dire 4.10^{24} pg/mol. En divisant ce dernier nombre par le nombre d'Avogadro (6.10^{23} molécules), on obtient ainsi le poids du génome par molécule = 6,5 pg/molécules. Pour l'ADN mitochondrial, il est considéré qu'il existe environ 1 000 mitochondries par génome diploïde. Par conséquent, pour obtenir le nombre de molécules de l'échantillon, il faut effectuer le rapport suivant :

$$\frac{X * 1000}{6,5} = Y \text{ avec}$$

X = valeur de l'échantillon en pg (obtenu à partir de la courbe standard)

Y = valeur de l'échantillon en nombre de molécules

Pour calculer la quantité d'ADN en pg/ μ l dans l'échantillon initial, il est nécessaire de faire le rapport de la quantité d'ADN initial après la PCR avec la quantité d'échantillon introduit dans la réaction de PCR. De même, il est possible de calculer la quantité d'os en pg/g, en divisant la quantité d'ADN initial dans le produit de PCR par le poids d'os introduit lors de l'extraction. Enfin, le nombre de molécules par gramme d'os est obtenu grâce au rapport de la quantité de molécules initiales et du poids de poudre d'os utilisé pour l'extraction. Ici, nous avons utilisé toute la mandibule car la quantité d'os est très faible pour réaliser une PCR.

III.8 Clonage et séquençage

Chaque amplification positive a été séquencée directement à l'aide d'un séquenceur d'ADN ABI 3730 (MACROGEN®, Séoul, Corée) et clonée. Dix clones par produit cloné ont été testés en utilisant un kit de clonage pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA), suivant le protocole du fabricant. Le clonage réplique chaque séquence à l'identique en un grand nombre de fois (Pääbo, 1989). La réplication en un grand nombre de clones permet de détecter les mutations « vraies » des séquences (communes à toutes les séquences) et les mutations dues à la dégradation de l'ADN (mutations disparates entre les séquences, Pruvost *et al.*, 2008).

La fiabilité des séquences, c'est-à-dire que les séquences correspondent à l'espèce recherchée initialement, a été vérifiée à l'aide d'un algorithme BLAST (interrogation des bases de données). Les séquences ont été alignées manuellement en utilisant le logiciel MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

IV. Résultats

IV.1 Quantification de l'ADN actuel

Toutes les mandibules actuelles ont eu des produits de PCR, mais les témoins d'extraction étaient tous contaminés. Donc les produits de PCR ne sont pas utilisables. Des tests sur les réactifs utilisés pour l'extraction ont été réalisés aucune contamination n'a été détectée. Par conséquent, la contamination survient probablement au moment même de la PCR. Il est possible que cette contamination vienne du fait qu'au laboratoire de l'uB nous n'avons pas utilisé d'UNG avant de faire les PCR. Cette procédure sera donc à tester par la suite pour valider ou non la présence de cette contamination. De plus, il faudra valider les extractions en les effectuant dans un autre laboratoire.

Toutefois, pour avoir tout de même une idée de la quantité d'ADN qui peut être présent sur du matériel actuel, il nous est possible d'utiliser la quantification des tissus frais utilisés pour faire la gamme de dilution (méthode du spectrophotomètre). Cela nous permettra d'estimer un ordre de grandeur de cette quantité initiale, en ng/ μ l en général. La moyenne que nous avons obtenue sur ces échantillons actuels est de 124 ± 77 ng/ μ l.

IV.2 Quantification de l'ADN digéré de pelote de rejection

Sur les 33 échantillons de mandibules de pelotes de chouettes (fraîches, > 1 mois et > 20 ans), $\approx 10\%$ se sont révélés positifs (trois échantillons de pelotes fraîches, Pel-1, Pel-2 et Pel-4, Tableau III.2). Parmi les 90% d'échantillons négatifs, 30% n'ont pas été amplifiés (ces échantillons correspondent aux genres *Apodemus* et *Crocidura* et 60% des échantillons sont négatifs car le témoin d'extraction était contaminé par l'espèce *Microtus arvalis*. Ces échantillons contaminés correspondent à tous les genres et espèces testés ici, sauf pour *Crocidura*. Les mandibules du genre *Apodemus* sp. se sont avérées systématiquement négatives dans les pelotes fraîches et anciennes. Néanmoins, deux mandibules de *M. arvalis* et une mandibule de *Myodes glareolus* ont été positives.

Ces résultats suggèrent que les amorces définies sont uniquement spécifiques aux campagnols et n'amplifient pas l'ADN de murins tels que *Apodemus*. L'identification des séquences de clones positifs par BLAST a montré une forte similarité de ces séquences avec celles de leurs espèces respectives. Les valeurs moyennes obtenues sont 98,6%, 97,5% et 95% de similarité pour les deux *M. arvalis* et pour *M. glareolus* respectivement. Sur les 45 clones obtenus, seuls deux types de transversions ont été observés C \rightarrow G and C \rightarrow A et trois types de transitions T \rightarrow C, C \rightarrow T et G \rightarrow A (Tableau III. 2).

Parmi les trois échantillons positifs, l'échantillon de *M. glareolus* a inhibé la PCR de deux Ct. Cet échantillon a été dilué comme recommandé dans Pruvost *et al.* 2004, jusqu'à ce que l'inhibition soit inexistante. Comme nous l'avons vu précédemment, cette procédure améliore l'efficacité de la PCR. Les trois échantillons positifs sont amplifiés à partir des cycles 14 à 16 au cours de la QPCR (Tableau III. 3), ce qui est relativement tôt comparé à de l'ADN ancien (environ 30 cycles, E.-M. Geigl comm. pers.). Les résultats de la quantification de ces échantillons indiquent qu'il y a approximativement 132 ± 40 , 310 ± 3 et 110 ± 37 pg/ μ l pour les deux *M. arvalis* et pour *M. glareolus* respectivement. Cela correspond à une moyenne de 642 ± 208 , $1,465 \pm 70$ et 615 ± 209 molécules/g de poudre fossile respectivement (Tableau III. 3).

Chapitre III

Marvalis_Fpo01 |15266 GCCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCCTTTATCATTACCGCCCTCGTATTAGTCCACCTTTTATTCCTTCACGAAACAGGATCTAACCAACCCAACTG |15366
Microtus_arvalis
Pel-1-R1-C1 AG.CA.....C.A.....G.T.C.G..C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R1-C2 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R1-C4 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R1-C7 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....-.....
Pel-1-R1-C9 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R2-C2 AG.CA.....CA.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R2-C3 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R2-C4 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R2-C7 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R2-C8 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R3-C1 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R3-C4 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R3-C5 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-1-R3-C6 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....AT.G.A.T
Pel-1-R3-C7 AG.CA.....C.A.....G.T.C.....C.A.....T.C.....T.A.....A.....
Pel-2-R1-C1 AG.CA.....
Pel-2-R1-C4 AG.CA.....
Pel-2-R1-C5 AG.CA.....
Pel-2-R1-C6 AG.CA.....
Pel-2-R1-C7 AG.CA.....
Pel-2-R2-C1 AG.CA.....
Pel-2-R2-C2 AG.CA.....
Pel-2-R2-C3 AG.CA.....
Pel-2-R2-C6 AG.CA.....
Pel-2-R2-C7 AG.CA.....
Pel-2-R3-C3 AG.CA.....G-
Pel-2-R2-C4 AG.CA.....
Pel-2-R2-C5 AG.CA.....
Pel-2-R2-C8 AG.CA.....
Pel-2-R2-C9 AG.CA.....
Pel-4-R1-C3 AG.CA.....
Pel-4-R1-C4 AG.CA.....
Pel-4-R1-C5 AG.CA.....
Pel-4-R1-C7 AG.CA.....
Pel-4-R1-C10 AG.CA.....
Pel-4-R2-C1 AG.CA.....
Pel-4-R2-C2 AG.CA.....
Pel-4-R2-C3 AG.CA.....
Pel-4-R2-C7 AG.CA.....A.....

Chapitre III

Pel-4-R2-C10	AG.CA.....
Pel-4-R3-C5	AG.CA.....
Pel-4-R3-C6	AG.CA.....
Pel-4-R3-C7	AG.CA.....G.....
Pel-4-R3-C8	AG.CA.....
Pel-4-R3-C10	AG.CA.....
Gig-5-R1-C1	AG.CA.....T.T.....TT.....
Gig-5-R1-C3	AG.CA.....T.....
Gig-5-R1-C4	AG.CA.....T.....
Gig-5-R1-C5	AG.CA.....
Gig-5-R1-C9	AG.CA.....C.....
Gig-5-R2-C3	AG.CA.....T.....T.....G.....
Gig-5-R2-C4	AG.CA.....
Gig-5-R2-C5	AG.CA.....T.....T.....
Gig-5-R2-C8	AG.CA.....C.....T.....T.....T.....
Gig-5-R2-C10	AG.CA.....T.....
Gig-5-R3-C4	AG.CA.....C.....T.....T.....
Gig-5-R3-C5	AG.CA.....T.....T.....
Gig-5-R3-C6	AG.CA.....T.....T.....
Gig-5-R3-C9	AG.CA.....T.....T.....
Gig-5-R3-C10	AG.CA.....

Tableau III. 2 : Alignement des fragments de séquences de 116 pb du gène cytb. La première séquence appartient à une séquence de *Microtus arvalis* de France (AY708510, Fink *et al.*, 2004). La deuxième séquence correspond à un *M. arvalis* d'Orkney (AY220787, Haynes *et al.*, 2003). Pel-1 = *Myodes glareolus* ; Pel-2,4 and Gig-5 = *Microtus arvalis*. "." = similarités ; "-" = délétion.

Chapitre III

Echantillon	Poids de poudre (mg)	Volume d'élution (µl)	Volume d'extraction (µl)	Nb tentatives	Seuil, du nombre de cycles (Ct)	Log Quantité initiale	Quantité initiale (pg)	Quantité initiale moyenne	Déviati on standard	Nombre de molécules	pg/µl	pg/g d'os	molécules/g d'os
Gamme 500pM					13.93	2.699	500.000			76923.077			
Gamme 50pM					17.49	1.699	50.000	185.000	273.724	7692.308			
Gamme 5pM					21.01	0.699	5.000			769.231			
Pel-1-R1	55	50	2	4	15.65	2.379	239.525			36849.928	119.762	4.355	669.999
Pel-1-R2	55	50	2	4	16.53	2.137	137.199	219.705	74.597	21107.492	68.599	2.495	383.773
Pel-1-R3	55	50	2	4	15.39	2.451	282.390			43444.684	141.195	5.134	789.903
Pel-2-R1	63	50	2	4	15.45	2.434	271.863			41825.067	135.931	4.315	663.890
Pel-2-R2	63	50	2	4	15.43	2.440	275.328	263.256	17.992	42358.117	137.664	4.370	672.351
Pel-2-R3	63	50	2	4	15.63	2.385	242.577			37319.571	121.289	3.850	592.374
Pel-4-R1	65	50	2	4	14.01	2.830	676.628			104096.624	338.314	10.410	1601.487
Pel-4-R2	65	50	2	4	14.25	2.764	581.233	619.263	50.551	89420.407	290.616	8.942	1375.699
Pel-4-R3	65	50	2	4	14.2	2.778	599.929			92296.800	299.965	9.230	1419.951
Gig-5-R1	53	50	2	4	35.96	-3.206	0.001			0.096	0.000	0.000	0.002
Gig-5-R2	53	50	2	4	35.72	-3.140	0.001	0.001	0.000	0.111	0.000	0.000	0.002
Gig-5-R3	53	50	2	4	35.54	-3.090	0.001			0.125	0.000	0.000	0.002

Tableau III. 3 : Résultats de la quantification des échantillons positifs de mandibules de pelotes et fossiles. Pel-1 = *Myodes glareolus*, Pel-2,4 and Gig-5 = *Microtus arvalis*.

IV.3 Quantification de l'ADN fossile

Seulement 3% des 32 mandibules fossiles de *M. arvalis* se sont avérées positives. Pour les grottes de Rochefort, du Taillis des Coteaux et du Noisetier, le séquençage direct des produits de PCR indiquait que les séquences correspondaient uniquement à des duplications d'amorces. Les tests que nous avons réalisés sur les échantillons de Gigny, en PCR quantitative, ont montré qu'un seul échantillon fraîchement prélevé était positif (Gig-5, Tableau III. 2). Cet échantillon ayant été tripliqué a montré que toutes les séquences clonées correspondaient entre 97% et 99% à des séquences de *M. arvalis* (AM991044, AM991070, AM991098, Tougard *et al.* 2008b et EU439954, Essbauer *et al.*, 2008, données non publiées).

Les substitutions majeures observées (27 sur 113 pb \approx 24%) dans ces séquences sont caractérisées par plus de 70% de transition de type 2 C→T (Tableau III. 2). Cette transition est représentative de la dégradation de l'ADN ancien. Elle correspond à la désamination de la cytosine pour produire de l'uracile (Hofreiter *et al.*, 2001; Paabo *et al.*, 2004; Willerslev et Cooper, 2005; Pruvost *et al.*, 2008). Pendant la phase d'élongation de la PCR, la base uracile est transcrite en une base thymine. Par conséquent les transitions C→T sont observées dans les séquences clonées. Si nous avons utilisé de l'UNG, il est probable que ces séquences auraient été détruites au début de la PCR. Aucun effet d'inhibition n'a été enregistré dans les échantillons de Gigny. Par conséquent, l'efficacité de la PCR n'en a pas été diminuée. Nous avons calculé, à partir de chaque séquence clonée, que la quantité moyenne initiale d'ADN présente dans 1g d'os de mandibule de *M. arvalis* était inférieure à une molécule ($2.10^{-3} \pm 2.10^{-4}$ de molécules initiales ; Tableau III. 3).

Une séquence positive a été obtenue sur la dent de cheval du site de Rochefort. La séquence de ce fossile correspond à l'espèce *Equus caballus*. La quantité d'ADN initial calculée donne un résultat de 621,4 pg/g de dent (c'est-à-dire 449,5 molécules initiales) pour un produit de PCR et 1084 pg/g de dent (784 molécules initiales) pour l'autre produit de PCR. Ces résultats sont cohérents avec l'intervalle de quantité de molécules initiales obtenues sur des grands mammifères par Pruvost *et al.* (2007).

V. Discussion

V.1 Dégradation de l'ADN dans les mandibules de pelotes de réjection

Les résultats de la PCR quantitative nous ont permis de montrer que de petits fragments d'ADN (≈ 100 pb), dans des mandibules de rongeurs de pelotes de réjection, étaient relativement faciles à obtenir et en quantité non négligeable (615 à 1 465 molécules/g de d'os ce qui correspond à 110 et 310 pg/ μ l d'échantillon ;

Tableau III. 3). Or nous avons mesuré que la quantité d'ADN présente dans les tissus mous de *M. arvalis* est de l'ordre de 124 ng/ μ l. Il y a donc 1 000 fois plus d'ADN dans des tissus mous que dans des tissus osseux issus de pelotes. Pour comparaison, une côte fossile d'auroch, datée d'environ 3 200 ans et prélevée dans une crevasse, a donné une quantité de molécules par gramme d'os de 761 ± 715 (site de Pontvallin, Sarthe, Pruvost *et al.*, 2007). Cette quantité d'ADN correspond à ce que nous avons obtenu dans nos échantillons de pelotes, sauf que nos échantillons sont très récents comparés à cet échantillon fossile de 3 200 ans.

Par conséquent, bien que nous ayons amplifié des fragments d'ADN dans les mandibules de pelotes, il se trouve que les fragments obtenus sont de petite taille. De plus, la quantité d'ADN initial, calculée sur les mandibules de pelote, correspondrait à la quantité obtenue sur de l'os de grand mammifère dégradé depuis 3 200 ans, mais préservé dans de relativement bonnes conditions (crevasse). Ainsi, il est possible de conclure que l'ADN des mandibules de pelote semble dégradé par rapport à du matériel frais (i.e. tissus mous provenant d'animaux piégés et stockés au congélateur ou dans l'alcool peu de temps après la mort de l'animal).

La quantité d'ADN initial cible que nous avons obtenue dans les pelotes est suffisante pour valider la fiabilité des séquences (plus de 100 molécules/g d'os). En effet, avec une quantité d'ADN suffisante, les erreurs de mutations de la séquence due à la *Taq* polymérase sont diminuées (Pruvost *et al.*, 2008). De plus, le très faible nombre de substitutions atteste de la bonne préservation de ces petits fragments d'ADN.

Contrairement à Taberlet et Fumagalli (1996) et Jaarola et Searle (2004), nous n'avons pas réussi à obtenir d'ADN à partir de mandibules provenant de pelotes anciennes conservées dans un musée (> 20 ans). Dans les pelotes de musée étudiées ici, seuls des mulots et des musaraignes étaient présents. Comme les amorces initiales devaient amplifier des rongeurs uniquement, seuls des tests sur les mulots ont été effectués. Or, il s'avère que les amorces sont spécifiques uniquement des campagnols

(malgré les BLAST initiaux faits sur les séquences des amorces). L'amplification des échantillons de mulot n'était donc pas réalisable.

Il serait nécessaire de confirmer ces premiers résultats en comparant avec des PCR effectuées sur des fragments plus longs, pour voir si le rendement serait aussi concluant. De plus, nous pourrions refaire les tests sur les mandibules actuelles de façon à obtenir de vrais éléments de comparaison en termes de quantité d'ADN actuel. Néanmoins, la faible dégradation de l'ADN par les sucs gastriques des rapaces évoquée par Andrews (1990) et Taberlet et Fumagalli (1996) semble être infirmée par nos résultats. Il s'avèrerait, qu'au contraire, seuls de petits fragments sont amplifiables et que la quantité initiale d'ADN soit faible par rapport à des tissus frais. Dès lors, obtenir de l'ADN ancien à partir de mandibules fossiles, issues de l'accumulation de rejections de rapaces, n'apparaît pas être facile, contrairement à ce que certains travaux antérieurs ont pu le suggérer (Taberlet et Fumagalli, 1996; Cosson *et al.*, 2005).

Par conséquent, si l'ADN des mandibules de pelote est déjà dégradé après le passage des sucs gastriques des rapaces, les chances d'en retrouver dans les sites de grotte sont amenuisées.

V.2 Problème de validation des séquences en ADN ancien

Parmi les résultats que nous avons obtenus sur les mandibules fossiles, seule une mandibule provenant d'un niveau de Gigny (< à 12 000 ans) s'est révélée positive. Cette mandibule correspond à un niveau récent de Gigny. Elle a été prélevée en 2004 dans des conditions optimales de stérilité (prélèvement avec masque, blouse, gants, charlotte, conservation des sédiments à 15°C, puis conservation des restes fossiles à -20°C après tamisage des sédiments). De plus, la fouille n'était pas en cours, ce qui limitait les contaminations éventuelles d'autres personnes sur le site. Les autres échantillons négatifs provenaient, soit de niveaux plus anciens, soit de fouilles plus anciennes dont les sédiments ou les mandibules ont été conservés sans précautions particulières. L'autre échantillon positif, obtenu à partir de la PCR classique, provenait du même niveau et correspondait à la même campagne de fouille que notre échantillon positif. La première conclusion que nous pouvons formuler est que l'optimisation des résultats en ADN ancien provient, d'une certaine manière, de la « fraîcheur » du prélèvement des échantillons. Si les conditions sont favorables à la préservation de l'ADN ancien (site de grotte, température basse etc., cf. partie V. 3.), le prélèvement des échantillons fossiles dans les conditions les plus stériles possibles et leur stockage rapide à -20°C augmenteront les chances d'obtenir de l'ADN ancien. Nos résultats renforcent les

conclusions auxquelles sont arrivées Pruvost *et al.* (2007), précisant que de bonnes conditions de préservation de l'ADN ainsi que des prélèvements très précautionneux garantissent de meilleurs résultats en ADN ancien.

Le clonage des trois répliquas de PCR que nous avons obtenus pour le site de Gigny montre que les mutations majeures des séquences ressemblent à de la dégradation typique de l'ADN ancien : désamination de C en T. Ces résultats suggèrent que les séquences de *M. arvalis* obtenues sur le site de la Baume de Gigny sont de véritables séquences d'ADN ancien. Toutefois, la très faible quantité de molécules d'ADN cible initial ne nous permet pas d'être affirmatif sur l'interprétation de nos résultats. Par conséquent, de nouvelles analyses sont nécessaires. Néanmoins, il est permis de rester optimiste car deux échantillons, issus du même niveau et de la même grotte, mais analysés avec des méthodes différentes, présentent des potentialités de préservation de l'ADN ancien.

De nouvelles analyses en QPCR sur ces échantillons, permettraient d'authentifier nos séquences. De plus, pour valider la fiabilité des séquences obtenues, il serait possible à présent d'utiliser l'UNG pour ôter les séquences trop dégradées lors de l'UQPCR et de ne conserver que les séquences authentiques (Pruvost *et al.*, 2005; Willerslev et Cooper, 2005). Cependant, vu la quantité d'ADN initial très faible, il est possible également que cette technique ne permette pas d'optimiser la QPCR dans notre cas.

V.3 La préservation de l'ADN au-delà de 12 000 ans est-elle possible chez les rongeurs ?

Selon notre étude, nous n'avons pas réussi à affirmer de façon ferme et définitive que de l'ADN ancien de rongeurs provenant de sites de grotte datés de plus de 12 000 ans a été retrouvé. Plusieurs paramètres peuvent entrer en ligne de compte pour tenter d'expliquer ce défaut de préservation de l'ADN ancien chez les petits mammifères.

La préservation de l'ADN fossile dans les sites de grotte doit être dépendant des conditions chimiques (ex : pH, potentiel Red-Ox, attaques bactériennes endogènes et exogènes) et physiques (ex : température, porosité, substances humiques, humidité, taux de sédimentation, temps de cémentation) des sédiments de la grotte en contact avec les os (Hänni, 1994; Geigl, 2002a; Geigl, 2002b).

La température est un facteur important de la préservation de l'ADN (Smith *et al.*, 2001). Par conséquent, les variations de température modérées que l'on peut trouver dans les sites de grotte des régions tempérées constituent un paramètre idéal pour retrouver de

l'ADN ancien. Plusieurs exemples d'ADN retrouvé dans des sites de grotte chez des grands mammifères ou des humains peuvent être cités : Cro-Magnon (Caramelli *et al.*, 2008) et Ours des cavernes, (Loreille *et al.*, 2001; Hofreiter *et al.*, 2002; Orlando *et al.*, 2002). De plus, l'âge des séquences obtenues sur ces exemples d'échantillons de grotte s'échelonne entre 130 000 et 20 000 ans, c'est à dire que ces séquences sont bien plus anciennes que celles obtenues chez les rongeurs (cf Tougard et Renvoisé, 2008 ; ANNEXE 3). Le seul exemple, à ma connaissance, qui relate de l'ADN ancien retrouvé chez des rongeurs dans un site de grotte est le travail de Hadly *et al.* (2004). Dans cette étude, les espèces étudiées sont *Microtus montanus* (campagnol) et *Thomomys talpoides* (gaufre à poches). Ces espèces proviennent du site de la grotte de Lamar, dans le parc naturel de Yellowstone aux Etats-Unis et les séquences les plus anciennes qu'ils ont obtenues (312 pb, cyt b) datent de 2860 ans.

Les taxons de grands mammifères en sites de grottes sont très étudiés actuellement. Cependant, les rongeurs constituent 40% de la diversité des mammifères euthériens actuels (2277 espèces, Carleton et Musser, 2005). Cet ordre est composée de 481 genres actuels (Carleton et Musser, 2005) et de 743 genres fossiles (Kowalski, 2001). Par conséquent, même si pour l'instant peu d'études sont menées sur ce type de matériel en sites de grottes, la classe des rongeurs offre une quantité considérable de matériel à analyser par rapport aux grands mammifères.

Geigl (2002a) révèle que les sédiments marrons-noirs, pauvres en oxygène et riches en lipides (ex : argiles et humus) favoriseraient la protection des os contre les attaques hydrolytiques et oxydatives. Les molécules d'ADN peuvent être adsorbées par l'hydroxyapatite de l'os. Cette adsorption est favorisée par la présence des lipides dans les argiles entourant l'os. De plus, la faible porosité présente dans les argiles peut prévenir des attaques hydrolytiques, limitant la dégradation de l'ADN. Dans les trois sites pour lesquels nous n'avons pas obtenu d'ADN sur les petits mammifères (Grotte du Taillis des Coteaux, grotte du Noisetier et grotte de Rochefort), les sédiments sont sableux à silteux avec une forte porosité et une faible fraction argileuse (Hinguant et Colleter, 2007; Mourre, 2007; Primault, 2007). Les échantillons fossiles provenant de la Baume de Gigny, dont de potentielles séquences ont été obtenues, étaient entourés de sédiments riches en argiles (Campy *et al.*, 1989). Par conséquent, il serait préférable à l'heure actuelle de se focaliser sur les grottes riches en argiles, de façon à optimiser nos chances de retrouver de l'ADN ancien dans les os de petite taille.

Chapitre III

Nous avons obtenu des résultats positifs à partir d'un grand mammifère (*Equus caballus*) de la grotte de Rochefort âgé de - 20 000 ans, alors que, pour le même niveau sédimentologique, les résultats étaient négatifs pour les mandibules de rongeurs. Sur le site de Gigny, nous n'avons pas obtenu des séquences potentiellement positives sur du rongeur (*M. arvalis*) et de l'ADN ancien d'ours des cavernes a été également obtenu auparavant sur ce site (Orlando *et al.*, 2002). Toutefois, l'âge de ce fossile n'est pas connu. Ceci nous amène à penser raisonnablement que, quelque soit le site considéré, il sera toujours plus aisé d'obtenir de l'ADN ancien à partir de grands mammifères que de petits. L'ADN des os de grands mammifères doit être mieux préservé que celui des petits. Chez les grands mammifères, l'ADN présent dans la périphérie de l'os, en contact avec l'extérieur, doit probablement être moins bien préservé et présenter plus de contaminations que l'intérieur de l'os. C'est d'ailleurs pour cela, qu'en général, la surface de l'os est soumise aux UV, grattée ou enlevée pour détruire les contaminations de surface (ex. Tuross, 1994) et que les prélèvements d'os se font dans le cortex (ex. Bon *et al.*, 2008). L'échantillon de cheval qui a été analysé correspond à une dent (molaire). La dent est considérée comme un système clos, contenant moins d'ADN que l'os (Currey, 2002), mais dont la dégradation est limitée par la protection de l'émail (Oota *et al.*, 1995). Néanmoins, le matériel de rongeurs est tellement petit et fin qu'il est exclu de ne travailler que sur la dent (pas assez de matériel) et de prélever de l'échantillon uniquement à l'intérieur de la mandibule (os pas suffisamment épais). De plus, la surface occlusale des campagnols est composée de dentine. L'émail est autour des prismes. L'ADN est probablement moins bien préservé que des dents complètement minéralisées sur toute leur surface.

De plus, la chouette effraie n'est pas le seul agent accumulateur de rongeurs dans les grottes. D'autres chouettes, comme la chouette hulotte (*Strix aluco*), ou des carnivores, majoritairement le renard roux (*Vulpes vulpes*), peuvent accumuler les micromammifères dans les grottes (Andrews, 1990). Par rapport à la chouette effraie, ces animaux produisent une plus forte dégradation sur les os digérés (Andrews, 1990). Ce processus de digestion plus importante doit probablement accélérer la dégradation de l'ADN. En effet, Taberlet et Fumagalli (1996) ont mis en évidence que l'amplification de fragments d'ADN longs (≈ 1000 pb) était plus facile chez la chouette effraie que chez la chouette hulotte. Comme l'effet de digestion est plus important chez la chouette hulotte que chez la chouette effraie (Andrews, 1990), il est possible de voir dans les résultats de Taberlet et Fumagalli (1996) une relation de causalité. Toutefois, ces résultats nécessitent

d'être validés par une étude précise de la corrélation entre digestion de l'émail par les sucs gastriques et quantité initiale d'ADN présent dans les mandibules de rongeurs.

En conséquence, repousser les limites temporelles pour obtenir de l'ADN ancien chez les petits mammifères reste un véritable challenge aujourd'hui. Les chances seraient vraisemblablement optimisées dans des sites de grottes riches en argiles et sur des échantillons fraîchement prélevés dans les conditions les plus drastiques possibles. Il est possible d'obtenir des fragments d'ADN à partir de pelotes de musées. Cependant, les chances seraient d'autant plus améliorées si les pelotes, et même les fossiles, étaient stockés dans des endroits frais, voire dans des chambres froides après prélèvement sur le terrain (Pruvost *et al.*, 2007). Nous avons réussi à obtenir des séquences d'ADN à partir d'un site fossile mais la fiabilité de cette séquence n'est encore pas tout à fait démontrée. Or en ADN ancien, l'authentification des séquences est un passage obligatoire pour justifier des résultats et des discussions que l'on fait ensuite à partir des séquences (Willerslev et Cooper, 2005).

VI. Conclusion et Perspectives

Il est nécessaire de réaliser des tests complémentaires pour valider les hypothèses taphonomiques sur la dégradation de l'ADN par les rapaces dans les pelotes de rejection, pour mieux comprendre la dégradation de l'ADN chez les petits mammifères en sites de grottes. Pour cela de nouvelles expériences vont être faites en utilisant la méthode de l'UQPCR pour valider au maximum les séquences obtenues. De plus, il sera nécessaire d'obtenir des résultats positifs sur les mandibules actuelles ainsi que sur les pelotes anciennes de façon à avoir un panel d'éléments de comparaison permettant de mieux maîtriser la dégradation de l'ADN par rapport à la quantité disponible initialement.

L'étude de l'ADN ancien chez les rongeurs représente un grand intérêt pour comprendre la vitesse d'évolution du génome de ces organismes. Est-ce que cette vitesse d'évolution est corrélée ou non aux changements du climat ? Y a-t-il une réponse immédiate ou bien décalée dans le temps ? Peut-on relier cette évolution génétique à l'évolution morphologique ? Y a-t-il un décalage entre les deux ? Les rongeurs représentent l'ordre de mammifère le plus diversifiée à l'heure actuelle (Carleton et Musser, 2005), et ils sont très présents dans le registre fossile (Kowalski, 2001). Par conséquent, ils méritent qu'on leur porte une attention particulière pour répondre à ces questions d'évolution génétique en fonction du climat, même si les difficultés

méthodologiques actuelles nous obligent à nous cantonner à des périodes récentes (inférieures à 10 000 ans).

Il existe aujourd'hui une nouvelle méthode d'amplification, appelée la méthode de PCR par émulsion associé au pyrosequencing (ou méthode 454), permettant d'amplifier et de séquencer 25 millions de bases en quatre heures de cycles (c'est-à-dire, 67 000 bases par heure), avec une précision de 99% (Margulies *et al.*, 2005). Cette méthodologie novatrice permet de séquencer un génome complet beaucoup plus rapidement qu'auparavant (1 ou 2 runs). Elle est actuellement utilisée en ADN ancien pour séquencer le génome de l'homme de Néanderthal, et le fut récemment pour celui du mammoth et celui de l'ours des cavernes par exemple (Green *et al.*, 2006; Briggs *et al.*, 2007; Maricic et Paabo, 2009). De plus, la quantité d'ADN initial ou d'os n'a pas besoin d'être très importante ; ($\approx 100\text{pg}/\mu\text{l}$ d'ADN, Margulies *et al.*, 2005; 100 à 200 mg d'os, Green *et al.*, 2006). Cependant, ces quantités initiales sont tout de même très supérieures à ce que nous avons pu trouver chez les rongeurs fossiles. En outre, cette méthode permet d'effectuer des études très précises sur des petits fragments de gènes de quelques paires des bases (63 ou 119 pb, Green *et al.*, 2006). Cependant les jeux de données générés sont de telle ampleur qu'ils ne peuvent être analysés par les logiciels de reconstruction phylogénétique (Matheson, comm. pers.). Par ailleurs cette technique reste très onéreuse aujourd'hui. Pour le projet « Jim » portant sur le séquençage du génome humain, 67 jours de manipulations avec la technique de la PCR a émulsion ont été facturés 1 million de dollars américains (Ovchinnikov, comm. pers.), 6,4 millions de dollars pour 5 ans de recherches sur le projet du séquençage complet de l'homme de Néanderthal (Pennisi, 2009). Pour l'étude des génomes dans le temps, cette nouvelle méthodologie permet d'avoir accès à tout le génome rapidement et donc de pouvoir comparer les taux d'évolution de chaque gène et de voir ceux qui répondent ou non aux modifications externes ou internes.

Chapitre IV

Conclusions générales et Perspectives

Chapitre IV : Conclusions générales et Perspectives

L'étude de l'évolution des êtres vivants au cours des temps géologiques est une discipline complexe, faisant intervenir de nombreux concepts et méthodologies permettant de comprendre notamment l'impact de l'environnement sur les êtres vivants aux échelles micro- et macro-évolutives. Les traits d'histoire de vie des organismes évoluent en réponse à la fois aux facteurs physiologiques intrinsèques et aux facteurs environnementaux extrinsèques (Sibly, 2007).

Nous avons abordé les questions évolutives en rapport avec l'environnement à travers l'étude des campagnols, et plus particulièrement l'histoire évolutive du campagnol des champs, par le biais de concepts et méthodologies complémentaires. La méthode de morphométrie a permis d'aborder le concept de modularité, concept lui-même relié au développement. Enfin, l'histoire évolutive des campagnols est abordée à travers l'étude de la paléogénétique, discipline en plein essor depuis plus d'une vingtaine d'années.

I. Impact du climat sur l'évolution phénotypique des campagnols

1.1 Relation forte entre structuration morphologique et climatique chez *Microtus arvalis* actuel

A l'aide d'un exemple de campagnol actuel, le campagnol des champs, nous avons montré quelles pouvaient être les relations entre structuration morphologique et structuration du climat. Cette relation avait déjà été supposée chez le campagnol des champs fossile, par la détection de l'augmentation de l'asymétrie de la boucle antérieure corrélée avec les variations d'humidité au cours du temps (Navarro, 2004). A l'échelle de la France, nous avons quantifié de façon précise que la structuration de la morphologie dentaire des populations de campagnols actuels est très fortement corrélée à la structuration du climat. L'avantage d'une référence actuelle est qu'elle permet d'avoir accès à un grand nombre de paramètres climatiques, et donc, de travailler dans des conditions descriptives précises. En effet, les paramètres climatiques actuels sont définis de façon plus précise que dans le fossile. Ainsi, nous avons pu tenter de comprendre la nature des relations et leur intensité entre morphologie et climat. La relation la plus forte entre morphologie (taille de l'aire de la boucle antérieure) et climat semblerait se situer au niveau de la température et de l'altitude. Par conséquent, nos conclusions ne

confirment pas les interprétations qui avaient été faites dans le fossile sur cette espèce (Navarro, 2004). Cette différence peut résider dans le fait que dans l'actuel les populations de campagnols vont enregistrer les modifications de l'environnement de l'instant présent (quelques dizaines d'années), alors que les populations définies dans le fossile subissent des modifications à plus long terme (quelques milliers à quelques dizaines de milliers d'années). Aussi, l'étude actuelle nous a permis de confirmer les relations fortes qui existent entre phénotype dentaire et climat chez le campagnol des champs. Néanmoins, il est possible que les paramètres de température interviennent dans la structuration morphologique très fine (petites variations de la morphologie de la boucle antérieure) et que l'humidité soit un paramètre qui intervienne à plus long terme et sur une variation phénotypique plus importante (asymétrie de la boucle antérieure).

Toutefois, les mécanismes sous-jacents à ce type de relations ne sont pas mis en évidence à partir de la seule quantification des corrélations entre morphologie et climat. L'étude des relations entre variation du patron dentaire et processus de développement permettrait de comprendre l'impact du climat sur les corrélations mises en évidence à l'échelle micro-évolutive (phénotype actuel) et macro-évolutive (phénotype fossile).

1.2 Evolution du développement dentaire et environnement

D'un point de vue paléontologique, l'étude du développement dentaire au cours du temps n'est pas une information que l'on peut obtenir facilement (Butler, 1995). Certaines études sur l'ontogenèse dentaire de rongeurs ont permis de différencier les caractères juvéniles des caractères adultes chez les individus fossiles (Hurth *et al.*, 2003). Cependant, l'ontogenèse dans le fossile permet de déterminer uniquement les trajectoires évolutives des organismes (Gerber *et al.*, 2007). Les mécanismes développementaux sous-jacents, reliant patron phénotypique et ontogenèse ne sont, en général, accessibles qu'au niveau actuel. Par conséquent, nous avons tenté de caractériser l'évolution du développement dentaire chez les campagnols de deux façons complémentaires. Premièrement, nous avons étudié les relations existantes entre intégration des traits phénotypiques et développement (modularité développementale). Deuxièmement, nous avons caractérisé l'évolution des mécanismes développementaux chez les campagnols à partir du phénotype dentaire (modèles développementaux basés sur les rapports dentaires).

L'étude de la modularité développementale nous a permis de montrer, chez le campagnol des champs actuel, l'existence de trois modules phénotypiques au sein de la

rangée dentaire inférieure, correspondant à chacune des molaires. Comme les molaires se développent sous la forme de modules moléculaires réitératifs (Jernvall *et al.*, 2000), cette organisation modulaire des molaires reflèterait ce mécanisme développemental. Nous avons également démontré que l'organisation au sein de la rangée dentaire n'était pas purement modulaire car il subsiste des covariations entre les molaires. Ces covariations des traits phénotypiques reflèteraient la relation qui existe entre les molaires au cours de la cascade d'inhibition (Kavanagh *et al.*, 2007) de la première molaire influant sur les molaires suivantes. Par conséquent, nous avons montré dans l'actuel qu'il était possible de mettre en évidence les mécanismes développementaux sous-jacents à l'organisation et à la variabilité phénotypique de la rangée dentaire chez les arvicolinés. Toutefois, l'étude de la modularité au cours du temps chez les arvicolinés représente une difficulté méthodologique qui n'est pas résolue à l'heure actuelle. En effet, la mise en évidence des modules développementaux au sein de la rangée dentaire nécessite de caractériser l'asymétrie fluctuante des côtés droit et gauche de la mandibule. Ces données sont difficilement accessibles dans le fossile chez les campagnols.

En conséquence, nous avons étudié l'évolution du développement dentaire chez les arvicolinés à partir d'un modèle développemental récent : le modèle de cascade d'inhibition (Kavanagh *et al.*, 2007). Toutefois, il a été nécessaire de reconsidérer ce modèle chez les arvicolinés car l'allongement de la partie antérieure de leur première molaire inférieure durant le développement leur confère une particularité qui n'est pas prédite par ce modèle. A partir d'un autre modèle mathématique, mais celui-ci descriptif (le modèle linéaire de régression multiple), nous avons réussi à caractériser un mode de développement non linéaire au sein de la rangée dentaire des arvicolinés. Alors que la m1 a une forte influence sur le développement de la m2, elle n'a aucun impact sur le développement de la m3. Ainsi, nous avons décrit un modèle de développement non linéaire dans lequel la m2 représente une dent de « transition » entre la m1 et la m3 dans l'inhibition.

Il semblerait que les arvicolinés aient connu, au cours de leur évolution depuis 5 Ma, une seule modification majeure dans leurs proportions dentaires, et donc dans leur mode de développement, correspondant à l'allongement de la première molaire inférieure. D'après les datations des fossiles qui ont été obtenues, cet allongement brutal de la première molaire chez les arvicolinés correspondrait à la mise en place des cycles glaciaires de la fin du Pliocène supérieur. L'évolution dentaire chez les arvicolinés serait donc de nature non graduelle. Ceci remettrait considérablement en cause les hypothèses

graduelles émises pour décrire l'évolution dentaire, de la première molaire principalement (Chaline, 1987; Chaline *et al.*, 1999). Néanmoins, les échelles phénotypiques et taxonomiques sur lesquelles sont basées ces hypothèses évolutives sont différentes. Notre hypothèse se base sur l'ensemble de la rangée dentaire pour la majorité des arvicolinés, alors que les hypothèses de Chaline (1987) et Chaline *et al.* (1999) sont fondées à partir de la première molaire inférieure sur des lignées particulières. Par conséquent, il est possible que l'évolution du patron dentaire général des arvicolinés ait un caractère non graduel et que l'évolution du patron de la première molaire au sein d'une lignée soit graduelle.

Il est important de noter dans notre étude que les hypothèses évolutives proposées pour caractériser l'évolution des cricétinés, arvicolinés et murinés sont cohérentes avec les reconstructions phylogénétiques proposées pour ces trois sous-familles. En effet, nous avons montré que depuis les cricétinés ($m1 = m2 = m3$), les proportions de molaires ont évolué, soit par augmentation de l'inhibition brutale entre la $m1$ et les autres dents comme chez les arvicolinés, soit par augmentation en cascade entre les molaires comme chez les murinés. Nous avons montré également que les proportions de molaires chez les arvicolinés étaient plus proches de celles des cricétinés que de celles des murinés. Cette observation est validée par les reconstructions phylogénétiques, basées sur des gènes mitochondriaux et nucléaires, pour lesquelles les arvicolinés sont plus proches des cricétinés que des murinés (Steppan *et al.*, 2004). Ainsi, non seulement nous avons réussi à caractériser l'évolution du développement dentaire chez les arvicolinés en relation avec le climat, mais nous avons pu aussi mettre en évidence des relations cohérentes de parenté entre des familles de rongeurs à partir de proportions de molaires.

II. Impact des changements climatiques sur l'évolution génétique des populations de campagnols

Les hypothèses émises à partir des reconstructions phylogénétiques chez le campagnol des champs suggèrent que leur histoire phylogéographique est très fortement liée aux grands changements climatiques du Quaternaire (Tougaard *et al.*, 2008b).

Alors que la structuration génétique des populations est liée à leur distribution géographique (phylogéographie ; Avise, 2000), nous avons quantifié cette corrélation chez le campagnol des champs actuel. Par conséquent, la structuration génétique des

populations est plutôt liée à l'histoire phylogéographique de l'espèce *Microtus arvalis* et à la structuration géographique des populations, elle-même dépendante du climat.

Pour caractériser précisément l'impact du climat sur l'évolution génétique des campagnols à une époque donnée et en un lieu donné, il est nécessaire de travailler à partir de l'ADN ancien. Toutefois, les potentialités de préservation de l'ADN ancien dans les fossiles de mandibules de petits mammifères semblent assez faibles. En effet, bien que l'ADN ancien soit une discipline dont les techniques sont en constant développement, elle ne l'est pas nécessairement sur du matériel tel que les rongeurs (Tougaard et Renvoisé, 2008). Il est, par conséquent, nécessaire en amont de construire un protocole expérimental caractérisant les étapes de la dégradation de l'ADN pour estimer les chances de retrouver de l'ADN ancien de bonne qualité et en quantité suffisante chez les campagnols fossiles.

L'approche essentielle que nous avons développée sur les rongeurs est l'étude de la PCR quantitative. Cette technique permet de quantifier à chaque étape de la dégradation de l'ADN la quantité restante. Ainsi nous avons cherché à comparer la quantité d'ADN des mandibules de campagnols au fur-et-à-mesure des étapes de la dégradation :

Etape 1 : mandibules actuelles : piégées et congelées ou stockées dans l'alcool rapidement après piégeage,

Etape 2 : mandibules digérées de pelote de rejection : fraîchement prélevées et congelées ou conservées dans un musée depuis plusieurs années sans conditions particulières,

Etape 3 : mandibules fossiles en site de grotte : fraîchement prélevées en conditions stériles et congelées.

Bien qu'il reste encore des améliorations protocolaires à effectuer pour s'assurer de la véracité de nos résultats, il semblerait dès à présent que l'ADN des mandibules digérées dans les pelotes de rejection soit dégradé. Par conséquent, si les mandibules fossiles retrouvées en sites de grottes sont majoritairement issues des dépôts de pelote de rejection, les chances de trouver de l'ADN dans les mandibules fossiles sont moindre. Cependant, d'après nos résultats préliminaires, certains sites de grottes semblent propices à la préservation de l'ADN, notamment les sites de grotte dont les sédiments sont riches en argiles (ex. Baume de Gigny).

De plus, nous avons montré l'importance fondamentale des fouilles en conditions stériles et du stockage des échantillons au congélateur. Il reste néanmoins des améliorations à faire à partir du protocole déjà établi. Notamment, il faut s'assurer que

les séquences anciennes sont authentiques. De plus, des avancées techniques en termes d'extraction d'ADN à partir d'une très faible quantité d'os initial reste encore à développer.

Aussi, bien que l'étude de l'ADN ancien chez les rongeurs permette de comprendre l'impact du climat sur l'évolution génétique d'une part, et sur la structuration des populations d'autre part, il reste encore des difficultés d'ordre méthodologique à résoudre avant de pouvoir obtenir des résultats satisfaisants.

Bien que nous ayons constaté les difficultés méthodologiques actuelles pour obtenir de l'ADN ancien chez les campagnols, il n'en demeure pas moins que certaines études phylochronologiques ont permis de montrer l'impact de l'environnement sur les petits mammifères (Hadly *et al.*, 2004). L'avantage que représentent les petits mammifères dans l'étude de l'évolution génétique au cours du temps et des changements environnementaux se mesure à différents niveaux :

Les petits mammifères peuvent répondre plus rapidement que les grands mammifères aux changements climatiques. En effet, les populations de petits mammifères accumulent plus rapidement les mutations au sein de leur génome.

L'obtention de séquences anciennes, datées de façon absolue, permettrait de calibrer les horloges moléculaires. Ainsi, les événements majeurs de spéciation, de radiations etc., pourraient être datés de façon précise à partir des données génétiques.

III. Impact climatique sur l'évolution du développement dentaire des campagnols

Dans l'hypothèse selon laquelle les variations du climat peuvent avoir un impact sur les mécanismes du développement dentaire, et par conséquent sur la morphologie dentaire, il paraît difficile de le démontrer sans faire d'expérimentation sur le développement des embryons chez les femelles gestantes. En effet, la mise en place des variations de la morphologie dentaire chez les campagnols est déterminante pendant la gestation. Après la naissance, il n'y a que très peu de changements de la morphologie dentaire car il n'existe pas de dentition lactéale (Viriot *et al.*, 2002). Cependant, si cette relation existe il est primordial de déterminer à quel moment du développement dentaire cette relation peut avoir lieu. Il a déjà été démontré que l'environnement pouvait avoir un impact sur la taille et le nombre de dent chez les souris gestantes à travers la performance

lactéale, le régime alimentaire des parents, la dépense énergétique, la physiologie maternelle et les substances tératogéniques (Line, 2003). A quel stade du développement dentaire l'environnement peut avoir un effet sur la morphologie dentaire et à quel niveau d'intégration ? Les premiers stades du développement dentaire (ploiement de l'épithélium) sont relativement robustes au cours du développement (Line, 2003). Des changements environnementaux à ce stade ne risqueraient pas d'entraîner de changements morphologiques très importants. Par contre, comme nous l'avons suggéré, l'environnement peut influencer le taux d'inhibition entre les molaires. Soit des modifications génétiques, impliquées dans la fabrication des activateurs et inhibiteurs dentaires sont induites par l'environnement extérieur sur la femelle, soit l'environnement joue directement sur l'équilibre même entre activateurs et inhibiteurs au cours du développement. Par des expérimentations sur les femelles gestantes il serait possible de tester quels sont les paramètres climatiques les plus influents dans les changements du développement dentaire : au bout de combien de génération ces changements sont visibles ? A quel niveau d'intégration (génétique, moléculaire, cellulaire ...) les mécanismes développementaux sont-ils modifiés ?

Pour tester cette hypothèse de relation entre morphologie et développement, il est nécessaire de s'intéresser aux deux rangées dentaires. En effet, chez les campagnols, les rapports dentaires de la rangée supérieure (données à acquérir) semblent être différents de ceux de la rangée inférieure. Par conséquent, il est possible que le modèle de développement dentaire que nous avons émis pour la rangée inférieure ne soit pas applicable pour la rangée supérieure. Si tel était le cas, il faudrait différencier l'évolution du développement dentaire de la rangée inférieure par rapport à la rangée supérieure. Si l'intégration morphologique entre les deux rangées dentaires n'est pas fortement soutenue par l'étude de la modularité, cela confirmerait les différences développementales qui pourraient exister entre rangée supérieure et rangée inférieure. Dans ce cas, l'environnement ne pourrait pas être à l'origine des différences développementales, mais les mécanismes et les relations complexes du développement expliqueraient ces différences.

IV. Développement dentaire et hypsodontie : relation avec l'évolution des campagnols

L'allongement de la m1 chez les arvicolinés au moment du refroidissement du Pliocène supérieur pourrait être vu comme un caractère « adaptatif » pendant l'ouverture des milieux à cette époque. L'augmentation de la surface occlusale par l'allongement de la m1 conférerait aux campagnols une « râpe » plus efficace pour broyer les graminées riches en silice. Cependant la question de la relation entre morphofonctionnalité dentaire et régime alimentaire n'est pas encore très bien contrainte aujourd'hui. Kavanagh *et al.* (2007) et Polly (2007) ont tenté de montrer que les rapports dentaires pouvaient refléter différents régimes alimentaires. Les relations qu'ils ont mises en évidence ne sont pas basées sur des données de corrélation fiables et statistiquement significatives. Cet argument est donc difficilement envisageable. Il semblerait que ce soit la complexité du schéma des cuspidés dentaires (Evans, 2007), ainsi que l'organisation et l'épaisseur de l'émail (Lucas *et al.*, 2008) qui soient en relation étroite avec le régime alimentaire. Le mouvement propalinéal de la mastication chez les campagnols (Lazzari, 2006) ainsi que la mise en place de l'hypsodontie, peuvent également être considérés comme des avantages lors de l'ouverture des milieux avec des environnements plus steppiques à la fin du Pliocène. Il est vrai que la radiation des campagnols il y a environ 2 Ma semble être adaptative. Pour démontrer cette hypothèse, il serait nécessaire dans un premier temps de déterminer s'il existe des relations morphologiques entre rangées dentaires supérieures et inférieures à partir de l'étude de la modularité (*a priori* non selon la partie III). Si des covariations fortes existent entre rangées supérieures et inférieures, l'occlusion propalinéale peut jouer un rôle dans les modifications morphologiques des molaires. Ainsi, ces covariations peuvent provenir de la nature et de la dureté des aliments ingérés. A l'inverse, s'il n'y a pas de covariations, les modifications morphologiques, proviendrait des mécanismes du développement dentaire (cf. partie III).

Dans notre étude, nous avons focalisé notre travail sur les variations et l'évolution morphologiques de la surface occlusale des campagnols. En outre, la mise en place de l'hypsodontie chez les campagnols est également un caractère important dans la démonstration du caractère adaptatif de leur radiation. Alors que les anciens campagnols avaient des dents racinaires, leur évolution a conduit à la mise en place de dents hypsodontes (ex. lignées *Mimomys-Arvicola* et *Allophaiomys-Microtus*, Chaline, 1987). Il est évoqué en général, surtout chez les grands mammifères herbivores, que

l'hypsodontie est un caractère avantageux pour broyer des aliments abrasifs, ou contenant des poussières exogènes, au moment de l'ouverture des milieux (Fortelius *et al.*, 2002). Cependant, certains auteurs pensent plutôt que l'hypsodontie favoriserait un régime alimentaire plus diversifié (Feranec, 2003) et donc une adaptation plus large aux modifications du milieu.

Outre la relation entre hypsodontie et régime alimentaire qui est évoquée précédemment, le développement dentaire démontre que la mise en place d'une dent brachyodonte (racines dentaires) par rapport à une dent hypsodonte (croissance continue) est très proche. Alors que l'évolution de l'hypsodontie est considérée comme un caractère graduel avec une disparition progressive des racines dentaires, cette modification peut être développementalement soudaine ou pas. Tummers et Thesleff (2003) ont démontré quelles étaient les différences fondamentales entre une dent brachyodonte chez la souris et une dent hypsodonte chez le campagnol. Chez la souris l'épithélium arrête le développement de la couronne dentaire et change de fonction pour former les racines. Chez le campagnol, l'épithélium continue de fabriquer de l'émail dentaire, mais des zones racinaires sont tout de même présentes (Tummers et Thesleff, 2003). Le passage d'une dent brachyodonte à une dent hypsodonte dépend de la régulation moléculaire dans l'aire de la boucle cervicale. Ainsi, la mise en place de l'hypsodontie chez les campagnols serait probablement dû à un changement de la régulation moléculaire au cours du temps. Cependant, les facteurs induisant ces changements ne sont pas encore connus.

Comme nous l'avons élaboré pour l'évolution des mécanismes développementaux au cours des changements climatiques sur les relations entre molaires, il serait envisageable d'étudier l'évolution de la mise en place de l'hypsodontie. Par conséquent, s'il existe une relation entre environnement et hypsodontie à travers le régime alimentaire, le développement de l'hypsodontie peut lui-même être modifié par l'environnement.

V. Relation entre réponse phénotypique et réponse génétique aux changements climatiques

Nous avons montré à l'échelle macro-évolutive que le climat avait probablement un impact fort sur l'évolution morphologique des campagnols. La comparaison de ces résultats et de l'évolution génétique au cours du temps permettrait de comprendre les

variations de vitesse de réponse aux changements climatiques aux échelles macro- et micro-évolutive. Il serait nécessaire, pour faire une étude approfondie, de travailler sur les gènes permettant de comprendre l'évolution des populations au cours du temps (gènes mitochondriaux et nucléaires). Ainsi nous serions en mesure de comparer les taux d'évolution génétique et phénotypique et de les corrélés aux paramètres climatiques majeurs du Quaternaire.

Malheureusement, ce type d'approche, aussi importante soit-elle pour comprendre les mécanismes évolutifs en réponse aux changements environnementaux, n'est pas totalement réalisable chez les petits mammifères à l'heure actuelle, sauf sur des périodes temporelles très courtes (de l'ordre de quelques milliers d'années).

VI. Mécanismes évolutifs et reconstructions phylogénétiques

L'évolution peut être abordée en termes de mécanismes développementaux et de facteurs environnementaux pouvant influencer cette évolution. Quelles sont les conséquences de ces facteurs dans la relation de parenté entre les espèces, c'est-à-dire sur les reconstructions phylogénétiques ?

Chez les campagnols, les reconstructions phylogénétiques à partir de données morphologiques ou génétiques ont mis en évidence une radiation explosive entre 3,5 et 1,6 Ma (Conroy et Cook, 1999; Jaarola *et al.*, 2004; Buzan *et al.*, 2008). A partir des différents résultats sur l'évolution des campagnols obtenus grâce aux études sur l'actuel (corrélations morphologie-génétique-climat, modularité de la rangée dentaire) et sur l'évolution des mécanismes développementaux au cours du temps, nous pouvons suggérer un impact fort des changements environnementaux sur l'évolution des campagnols. Chacune des approches que nous avons abordées modularité, évo-dévo et paléogénétique, est un élément essentiel pour comprendre l'évolution. De plus, leur étude couplée permet de se rendre compte de l'interaction entre les échelles macro- et micro-évolutives.

Dans un but ultime, l'utilisation de chacune de ces disciplines à des fins de reconstruction phylogénétique permettrait de comprendre la nature des facteurs agissant sur les relations de parenté entre les campagnols et d'expliquer leur radiation. Est-ce que comme le préconise Alberch (1989), les formes que nous observons dans la nature sont régies par des contraintes développementales pures ? Si tel est le cas, la radiation, mise en évidence par les reconstructions phylogénétiques, est un phénomène non aléatoire et

contraint par les mécanismes du développement. Si tel n'est pas le cas, la radiation des campagnols est dite « adaptative » et les relations génotype-phénotype des formes observées ont été sélectionnées par l'environnement.

L'étude couplée des données paléontologiques, génétiques et paléogénétiques permet de polariser les reconstructions phylogénétiques et de dater les événements passés en relation avec les paléoclimats (datations radiogéniques et calibration de l'horloge moléculaire, Raff, 2007). L'étude de la modularité permet de comprendre les contraintes intégratives dans l'évolvabilité des phénotypes (Yang, 2001). L'évo-dévo et la phylogéographie sont des disciplines situées à l'interface entre micro-évolution et macro-évolution (Jernvall et Jung, 2000 ; Avise, 2000 respectivement). L'évo-dévo favorise la compréhension des contraintes du développement dans la morphogenèse. Ainsi, les mécanismes développementaux les plus contraints au cours du développement vont être partagés par plus d'espèces que les caractères non contraints, et ceci indépendamment de l'environnement. Par conséquent, il sera possible de déterminer la part des contraintes développementales dans la mise en place des formes et dans les radiations des êtres vivants.

VII. Résumé des conclusions et perspectives majeures

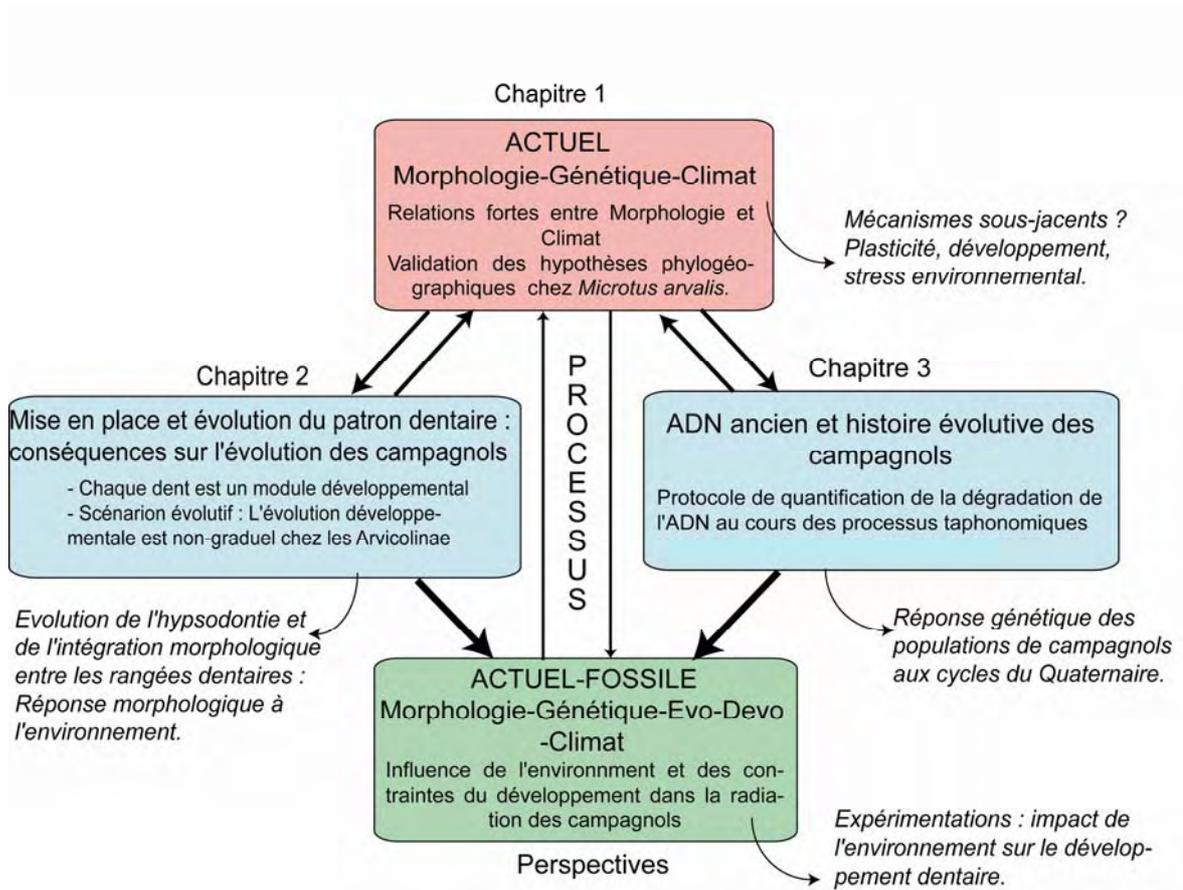


Figure IV. 1 : Schéma récapitulatif des résultats et perspectives dans l'étude de l'évolution des campagnols. Les flèches courbes représentent les perspectives de chaque partie. Les flèches pleines représentent les interactions entre les différents chapitres.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aguilar J-P, Legendre S, Michaux J, and Montuire S. 1999.** Pliocene mammals and climatic reconstruction in the western mediterranean area. In: Wrenn JH, Suc J-P and Leroy SAG, eds. *The Pliocene: Time of Change*. Dallas: American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation. 109-120.
- Alberch P. 1989.** The logic of monsters : evidence for internal constraint in development and evolution. *Geobios* **12**: 21-57.
- Allen JA. 1877.** The influence of physical conditions in the genesis of species. *Radical Review* **1**: 108-140.
- Alroy J, Koch PL, and Zochos JC. 2000.** Global climate change and north American mammalian evolution. *Paleobiology* **26**: 259-288.
- Andrews P. 1990.** *Owls, caves and fossils: predation, preservation and accumulation of small mammal bones in caves, with analysis of the Pleistocene cave faunas from Westbury -sub- Mendip, Somerset, UK* The Natural History Museum Publications, London.
- Avise JC. 1998.** The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**: 371-379.
- Avise JC. 2000.** *Phylogeography : The History and Formation of Species*, Cambridge.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Reeb JEN, and Saunders NC. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Revue of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.
- Avise JC, Lansman RA, and Shade RO. 1979.** The use of restriction endonuclease to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics* **92**: 279-295.
- Ballard JW, and Whitlock MC. 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**: 729 - 744.
- Barnosky AD, and Bell CJ. 2003.** Evolution, climatic change and species boundaries: perspectives from tracing *Lemmiscus curtatus* populations through time and space. *Proceedings of the Royal Society B* **270**: 2585-2590.
- Bateson W. 1892.** On numerical variation in teeth, with a discussion of the conception of homology. *Proceedings of the Zoological Society of London*: 102-105.
- Beebe TJC, and Rowe G. 2004.** *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, New York.
- Beldade P, Koops K, and Brakefield PM. 2002.** Modularity, individuality, and evo-devo in butterfly wings. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 14262-14267.
- Bennett KD. 2004.** Continuing the debate on the role of Quaternary environmental change for macroevolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **359**: 295-303.

Références bibliographiques

- Bergmann C. 1847.** Ueber die verhältnisse der wärmeökonomie der thiere zu ihrer grösse. *Göttinger studien* **3**: 595-708.
- Bhagwat SA, and Willis KJ. 2008.** Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits? *Journal of Biogeography* **35**: 464-482.
- Bolker JA. 2000.** Modularity in development and why it matters to evo-devo. *American Zoologist* **40**: 770-776.
- Bon CI, Caudy N, de Dieuleveult M, Fosse P, Philippe M, Maksud Fdr, Beraud-Colomb A, Bouzaid E, Kefi R, Laugier C, Rousseau B, Casane D, van der Plicht J, and Elalouf J-M. 2008.** Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 17447-17452.
- Boughner JC, and Hallgrímsson B. 2008.** Biological spacetime and the temporal integration of functional modules: A case study of dento-gnathic developmental timing. *Developmental Dynamics* **237**: 1-17.
- Brandon RN. 1999.** The units of selection revisited: The modules of selection. *Biology and Philosophy* **14**: 167-180.
- Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF, Green RE, Kelso J, Prafer K, Meyer M, Krause J, Ronan MT, Lachmann M, and Pääbo S. 2007.** Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**: 14616-14621.
- Brotherton P, Endicott P, Sanchez JJ, Beaumont M, Barnett R, Austin J, and Cooper A. 2007.** Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucl. Acids Res.* **35**: 5717-5728.
- Brunet-Lecomte P. 1988.** Les campagnols souterrains (*Terricola*, Arvicolidae, Rodentia) actuels et fossiles d'Europe occidentale Dijon: Université de Bourgogne.
- Brunet-Lecomte P, and Chaline, J. 1991.** Morphological evolution and phylogenetic relationships of the European ground voles (Arvicolidae, Rodentia). *Lethaia* **24**: 45-53.
- Brunhoff C, Galbreath KE, Fedorov VB, Cook JA, and Jaarola M. 2003.** Holarctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. *Molecular Ecology* **12**: 957-968.
- Brunhoff C, Yoccoz NG, Ims RA, and Jaarola M. 2006.** Glacial survival or late glacial colonization? Phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*) in north-west Norway. *Journal of Biogeography*: 1-9.
- Butler PM. 1939.** Studies of the mammalian dentition: Differentiation of the postcanine dentition. *Proceedings of the Zoological Society of London* **109**: 1-36.
- Butler PM. 1995.** Ontogenetic aspects of dental evolution. *International Journal of Developmental Biology* **39**: 25-34.
- Buzan EV, Krystufek B, Hänfling B, and Hutchinson WF. 2008.** Mitochondrial phylogeny of Arvicolinae using comprehensive taxonomic sampling yields new insights. *Biological Journal of the Linnean Society* **94**: 825-835.

Références bibliographiques

- Callebaut W. 2005.** The ubiquity of modularity. In: Callebaut W, Rasskin-Gutman D and Simon HA, eds. *Modularity: Understanding the development of evolution of natural complex systems*. Cambridge: MIT Press. 3-28.
- Campy M, Chaline J, and Vuillemey M. 1989.** *La Baume de Gigny*. Editions de CNRS, Paris.
- Caramelli D, Milani L, Vai S, Modi A, Pecchioli E, Girardi M, Pilli E, Lari M, Lippi B, Ronchitelli A, Mallegni F, Casoli A, Bertorelle G, and Barbujani G. 2008.** A 28,000 years old Cro-Magnon mtDNA sequence differs from all potentially contaminating modern sequences. *PLoS ONE* **3**: e2700.
- Carleton MD, and Musser GG. 2005.** Superfamily Muroidea. In: Wilson DE and Reeder DM, eds. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed)*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 894-1531.
- Caumul R, and 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. 1972.** *Les rongeurs du Pléistocène moyen et supérieur*. CNRS, Paris.
- Chaline J. 1987.** *Paléontologie des vertébrés*. Dunod.
- Chaline J, Baudvin H, Jammot D, and Saint Girons M-C. 1974.** *Les proies des rapaces*. Doin, Paris.
- Chaline J, and Brunet-Lecomte P. 1992.** Anatomy of the European Arvicolid radiation (Rodentia): a quantified test of the punctuated equilibria/desequilibria model. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* **314**: 251-256.
- Chaline J, Brunet-Lecomte P, Montuire S, Viriot L, and Courant F. 1999.** Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Finnish Zoological and Botanical Publishing Board* **36**: 239-267.
- Chaline J, and Graf J-D. 1988.** Phylogeny of the Arvicolidae (Rodentia): Biochemical and paleontological evidence. *Journal of Mammalogy* **69**: 22-33.
- Chaline J, and Mein P. 1979.** *Rongeurs et évolution*. Doin, Paris.
- Chaline J, and Sevilla P. 1990.** Phyletic gradualism and developmental heterochronies in a European Plio/Pleistocene *Mimomys* lineage (Arvicolidae, Rodentia). In: Fejfar O and Heinrich WD, eds. *International Symposium Evolution, Phylogeny and Biostratigraphy of Arvicolids. Rohanov (Czechoslovakia) May 1987*. Praha: Geological Survey. 85-89.
- Chan YL, Lacey EA, Pearson OP, and Hadly EA. 2005.** Ancient DNA reveals Holocene loss of genetic diversity in a south American rodent. *Biology letters* **1**: 423-426.
- Chien A, Edgar DB, and Trela JM. 1976.** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* **127**: 1550-1557.
- Christ B, and Ordahl C. 1995.** Early stages of chick somite development. *Anatomy and embryology* **191**: 381-96.

Références bibliographiques

- Collard M, and Wood B. 2000.** How reliable are human phylogenetic hypotheses? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 5003-5006.
- Conroy CJ, and Cook JA. 1999.** MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *Journal of Mammalian Evolution* **6**: 221-245.
- Conroy CJ, and Cook JA. 2000.** Phylogeography of a post-glacial colonizer: *Microtus longicaudus* (Rodentia: Muridae). *Molecular Ecology* **9**: 165-175.
- Contet J, Montuire S, Quéré J-P, Volobouev V, and Tougaard C. 2007.** Phylogenetic relationships among members of the *Microtus arvalis* complex using morphometric, molecular and karyological data: focus on the Altaï vole *Vth* *European Congress of Mammalogy*. Siena, Italy: Hystrix the Italian Journal of Mammalogy.
- Cosson J-F, Hutterer R, Libois R, Sara M, Taberlet P, and Vogel P. 2005.** Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in the western Mediterranean: a case study with the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula* (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology* **14**: 1151-1162.
- Creighton GK. 1980.** Static allometry of mammalian teeth and the correlation of tooth size and body size in contemporary mammals. *Journal of Zoology* **191**: 435-443.
- Currey J. 2002.** *Bones: structures and mechanisms*. Princeton University Press, Princeton.
- Dalén L, Nyström v, Valdiosera C, Germonpré M, Sablin M, Turner E, Angerbjörn A, Arsuaga JL, and Götherström A. 2007.** Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**: 6726-6729.
- Dalton R. 2006.** Neanderthal DNA yields to genome foray. *Nature* **441**: 260-261.
- Dansgaard W, Johnsen SJ, Clausen HB, Dahl-Jensen D, Gundestrup NS, Hammer CU, Hvidberg CS, Steffensen JP, Sveinbjornsdottir AE, Jouzel J, and Bond G. 1993.** Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record. *Nature* **364**: 218-220.
- Deffontaine V, Libois R, Kotlik P, Sommer R, Nieberding C, Paradis E, Searle JB, and 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.
- Delattre P, Giraudoux P, Baudry J, Musard P, Toussaint M, Truchetet D, Stahl P, Poule M-L, Artois M, Damange J-P, and Quéré J-P. 1992.** Land use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population kinetics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **39**: 153-169.
- Demastes JW, Butt AL, Hafner MS, and Light JE. 2003.** Systematics of a rare species of pocket gopher, *Pappogeomys alcorni*. *Journal of Mammalogy* **84**: 753-761.
- Denys C, Andrews P, Dauphin Y, Williams T, and Fernandez-Jalvo Y. 1997.** Towards a site classification: comparison of stratigraphic, taphonomic and diagenetic patterns and processes. *Bulletin de la Societe Geologique de France* **168**: 751-757.

Références bibliographiques

- Eble G. 2005.** Morphological modularity and macroevolution: conceptual and empirical aspects. In: Callebaut W, Rasskin-Gutman D and Simon HA, eds. *Modularity: Understanding the development of evolution of natural complex systems*. Cambridge: MIT Press. 221-238.
- Ermini L, Olivieri C, Rizzi E, Corti G, Bonnal R, Soares P, Luciani S, Marota I, De Bellis G, Richards MB, and Rollo F. 2008.** Complete Mitochondrial Genome Sequence of the Tyrolean Iceman. *Current Biology* **18**: 1687-1693.
- Escudé E, Montuire S, Desclaux E, Quéré J-P, Renvoisé E, and Jeannet M. 2008.** Reappraisal of 'chronospecies' and the use of *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) for biochronology. *Journal of Archaeological Science* **35**: 1867-1879.
- Evans AR, Wilson, G.P., Fortellius, M., and Jernvall, J. 2007.** High-level similarity of dentitions in carnivorans and rodents. *Nature* **445**: 78-81.
- Fejfar O. 1990.** The Neogene vertebrate paleontology sites of Czechoslovakia: a contribution to the Neogene terrestrial biostratigraphy of Europe based on rodents. In: Lindsay EH, Fahlbusch V and Mein P, eds. *European Neogene mammal chronology*. New York: Plenum Press. 211-236.
- Fejfar O, and Heinrich W-D. 1983.** Arvicoliden-Sukzession und Stratigraphie des Oberpliozöns und Quartärs in Europe. *Schriftenreihe für Geologische Wissenschaftler, Berlin* **19/20**: 61-109.
- Fejfar O, Heinrich W-D, Pevzner MA, and Vangengeim EA. 1997.** Late Cenozoic sequences of mammalian sites in Eurasia: an updated correlation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **133**: 259-288.
- Fejfar O, and Repenning CA. 1992.** Holarctic dispersal of the arvicolids (Rodentia, Cricetidae). *Courier Forschungs-Institut Senckenberg* **153** 205-212.
- Feranec RS. 2003.** Stable isotopes, hypsodonty, and the paleodiet of *Hemiauchenia* (Mammalia: Camelidae): a morphological specialization creating ecological generalization. *Paleobiology* **29**: 230-242.
- Fortelius M, Eronen J, Jernvall J, Liu L, Pushkina D, Rinne J, Tesakov A, Vislobokova I, Zhang Z, and Zhou L. 2002.** Fossil mammals resolve regional patterns of Eurasian climate change over 20 million years. *Evolutionary Ecology Research* **4**: 1005-1016.
- Geigl E-M. 2002a.** Why ancient DNA needs taphonomy. In O'Connor T, ed. *Proceedings of the 9th Conference of the international Council of Archaeozoology*. Durham: Oxbow Books, 78-85.
- Geigl EM. 2002b.** On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* **3**: 337-342.
- Gerber S, Neige P, and Eble GJ. 2007.** Combining ontogenetic and evolutionary scales of morphological disparity: a study of early Jurassic ammonites. *Evolution & Development* **9**: 472-482.
- Giannini NP, Wible JR, and Simmons NB. 2006.** On the cranial osteology of Chiroptera. I. Pteropus (Megachiroptera : Pteropodidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*: 4-134.
- Gilbert MTP, Drautz DI, Lesk AM, Ho SYW, Qi J, Ratan A, Hsu C-H, Sher A, Dalén L, Götherström A, Tomsho LP, Rendulic S, Packard M, Campos PF,**

Références bibliographiques

- Kuznetsova TV, Shidlovskiy F, Tikhonov A, Willerslev E, Iacumin P, Buigues B, Ericson PGP, Germonpré M, Kosintsev P, Nikolaev V, Nowak-Kemp M, Knight JR, Irzyk GP, Perbost CS, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Miller W, and Schuster SC. 2008.** Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 8327-8332.
- Gilbert MTP, Menez L, Janaway RC, Tobin DJ, Cooper A, and Wilson AS. 2006.** Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Science International* **156**: 208-212.
- Gingerich PD, Holly Smith B, and Rosenberg K. 1982.** Allometric scaling in the dentition of primates and prediction of body weight from tooth size in fossils. *American Journal of Physical Anthropology* **58**: 81-100.
- Goldberg M, and Smith AJ. 2004.** Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **15**: 13-27.
- Gould S-J. 1986.** Archetype and adaptation. *Natural History* **10**: 16-27.
- Gould S, and Eldredge N. 1977.** Punctuated equilibria: the tempo and mode reconsidered. *Paleobiology* **3**: 115-151.
- Graham RW, Lundelius ELJ, Graham MA, Schroeder EK, Toomey RSI, Naderson E, Barnosky AD, Burns JA, Churcher CS, Grayson DK, Guthrie RD, Harington CR, Jefferson GT, Martin LD, McDonald HG, Morlan RE, Semken HAJ, Webb SD, Werdelin L, and Wilson MC. 1996.** Spatial response of mammals to late Quaternary environmental fluctuations. *Science* **272**: 1601-1605.
- Gray JE. 1821.** On the natural arrangement of vertebrate animals. *London Medical Repository* **15**: 296-310.
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, and Paabo S. 2006.** Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* **444**: 330-336.
- Guthrie RD. 2003.** Rapid body size decline in Alaskan Pleistocene horses before extinction. *Nature* **426**: 169-171.
- Hadly EA, Kohn MH, Leonard JA, and 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.
- Hadly EA, Ramakrishnan U, Chan YL, Tuinen Mv, Keefe K, Spaeth PA, and Conroy CJ. 2004.** Genetic response to climatic change: Insights from ancient DNA and phylochronology. *PLoS Biology* **2**: e290.
- Hänni C. 1994.** The use of ancient DNA in anthropology. *Bulletin et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* **6**: 5-23.
- Hänni C, Laudet V, Stehelin D, and Taberlet P. 1994.** Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spalaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Science* **91**: 12336-12340.
- Haywood AM, Dowsett HJ, Valdes PJ, Lunt DJ, Francis JE, and Sellwood BW. 2009.** Introduction. Pliocene climate, processes and problems. *Philosophical*

Références bibliographiques

Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **367**: 3-17.

- Heckel G, Burri R, Fink S, Desmet J-F, and Excoffier L. 2005.** Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole, *Microtus arvalis*. *Evolution* **59**: 2231-2242.
- Hewitt G. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-912.
- Hewitt GM. 2004.** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **359**: 183-195.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger B, Ryder OA, and Wilson AC. 1984.** DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**: 644-645.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, and Griffith R. 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10**: 413-7.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. 1993.** Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* **11**: 1026-1030.
- Hinguant S, and Colleter R. 2007.** *Le Solutréen de la grotte Rochefort (Saint-Pierre-sur-Erve, Mayenne): premiers résultats. Rapport de fin d'opération triennale.* Service Régional d'Archéologie des Pays de la Loire.
- Hlusko LJ, Maas ML, and Mahaney MC. 2004.** Statistical genetics of molar cusp patterning in pedigreed baboons: Implications for primate dental development and evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* **302B**: 268-283.
- Hofreiter M, Capelli C, Krings M, Waits L, Conard N, Munzel S, Rabeder G, Nagel D, Paunovic M, Jambresic G, Meyer S, Weiss G, and Paabo S. 2002.** Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of Late Pleistocene cave bears. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1244-1250.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, and Pääbo S. 2001.** Ancient DNA. *Nature Review Genetics* **2**: 353-359.
- Höss M. 2000.** Ancient DNA: Neanderthal population genetics. *Nature* **404**: 453-454.
- Hurth E, Montuire S, Schmittbuhl M, Schaaf A, Viriot L, and Chaline J. 2003.** Examination of the tooth morphospace of three *Mimomys* lineages (Arvicolinae, Rodentia) by elliptical Fourier methods. *Colloquios de Paleontologia* **1**: 325-334.
- Jaarola M, Martinkova N, Gündüz I, Brunhoff C, Zima J, Nadachowski A, Amori G, Butalova NS, Chondropoulos B, Fragedakis-Tsolis S, Gonzalez-Esteban J, Lopez-Fuster MJ, Kandaurov AS, Kefelioglu H, da Luz Mathias M, Villate I, and Searle JB. 2004.** Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**: 647-663.
- Jackson DA. 1995.** PROTEST: A PROcrustean Randomization TEST of community environment concordance. *Ecoscience* **2**: 297-303.

Références bibliographiques

- Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, and Thesleff I. 1998.** The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* **125**: 161-169.
- Jernvall J, and Jung H-S. 2000.** Genotype, phenotype, and developmental biology of molar tooth characters. *Yearbook of Physical Anthropology* **43**: 171-190.
- Jernvall J, Keränen SVE, and 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.
- Jernvall J, and Thesleff I. 2000.** Reiterative signalling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of Development* **92**: 19-29.
- Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, Mastepanov M, Nielsen R, Munch K, Brand T, Gilbert MTP, Zuber MT, Bunce M, Rønn R, Gilichinsky D, Froese D, and Willerslev E. 2007.** Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 14401-14405.
- Kasai Y, Munne P, Hotta Y, Penttila E, Kavanagh K, Ohbayashi N, Takada S, Thesleff I, Jernvall J, and Itoh N. 2005.** Regulation of mammalian tooth cusp patterning by Ectodin. *Science* **309**: 2067-2070.
- Kauffman S. 1995.** *At home in the Universe: The search for laws of self-organisation and complexity.* Oxford University Press, Oxford.
- Kavanagh KD, Evans A, and Jernvall J. 2007.** Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* **449**: 427-432.
- Kefi R, Mafart B, Spadoni JL, Stevanovitch A, and Béraud-Colomb É. 2003.** Application de la technique de PCR en temps réel à l'étude de l'ADN ancien. *Comptes Rendus Palevol* **2**: 125-132.
- Keller JM, Huang JC, Huet-Hudson Y, and Leamy LJ. 2007.** The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on molar and mandible traits in congenic mice: A test of the role of the *Ahr* locus. *Toxicology* **242**: 52-62.
- Keller JM, Huet-Hudson Y, and Leamy LJ. 2008.** Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on molar development among non-resistant inbred strains of mice: A geometric morphometric analysis. *Growth, Development & Aging* **71**: 3-16.
- Keränen SVE, Åberg T, Kettunen P, Thesleff I, and Jernvall J. 1998.** Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Development Genes and Evolution* **208**: 477-486.
- Keränen SVE, Kettunen P, Åberg T, Thesleff I, and Jernvall J. 1999.** Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Development Genes and Evolution* **209**: 495-506.
- Kirschner M, and Gerhart J. 1998.** Evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 8420-8427.
- Klein O, Minowada G, Peterkova R, Kangas A, Yu BD, Lesot H, Peterka M, Jernvall, and Martin GR. 2006.** Sprouty genes control diastema tooth

Références bibliographiques

- development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signalling. *Developmental Cell* **11**: 181-190.
- Klicka J, and Zink M. 1997.** The importance of Recent ice ages in speciation: Failed paradigm. *Science* **277**: 1666-1669.
- Klingenberg CP. 2005.** *Developmental constraints, modules and evolvability*. Variation. Academic Press, San Diego.
- Klingenberg CP. 2007.** Analysis of modularity in configurations of landmarks. In: Baxter PD, and Mardia, K.V., ed. *Systems Biology & Statistical Bioinformatics*. Leeds: Leeds University Press.
- Klingenberg CP. 2008.** Morphological integration and developmental modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **39**: 115-132.
- Klingenberg CP, Badyaev AV, Sowry SM, and Beckwith NJ. 2001.** Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. *The American Naturalist* **157**: 11-23.
- Kolfschoten Tv. 1992.** Aspects of the migration of mammals to northwestern Europe during the Pleistocene, in particular the reimmigration of *Arvicola terrestris*. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* **153**: 213-220.
- Kolfschoten Tv, and Turner E. 1996.** Early Middle Pleistocene mammalian faunas from Kärlich and Miesenheim I and their biostratigraphical implications. In: Turner E, ed. *The early Middle Pleistocene in Europe*. Rotterdam: Balkema. 227-253.
- Kotlik P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, and Searle JB. 2006.** A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Science* **103**: 14860-14864.
- Kowalski K. 1970.** 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**: 1-389.
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, and Pääbo S. 1997.** Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* **90**: 19-30.
- Krystufek B, Buzan EV, Hutchinson WF, and Nfling B. 2007.** Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* **16**: 1221-1232.
- Kuch M, Rohland N, Betancourt JI, Latorre C, Steppen S, and Poinar HN. 2002.** Molecular analysis of a 11 700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile. *Molecular Ecology* **11**: 913-924.
- Laplana C, Montuire S, Brunet-Lecomte, and Chaline J. 2000.** Révision des *Allophaiomys* (Arvicolinae, Rodentia, Mammalia) des Valerots (Côte-d'Or, France). *Geodiversitas* **22**: 255-267.
- Larzul D. 1999.** *La PCR, un procédé de répllication in vitro*. Tec et doc.
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, and Gelfand DH. 1993.** High-level expression, purification, and enzymatic

Références bibliographiques

- characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research* **2**: 275-287.
- Lazzari V. 2006.** Origine et évolution morpho-fonctionnelle du plan dentaire murin chez les Muroidea (Rodentia, Mammalia): Comparaison des données paléontologiques et embryologiques *Institut des Sciences de L'évolution*. Montpellier: Université de Montpellier II.
- Le Louarn H, and Quéré J-P. 2003.** *Les rongeurs de France*. INRA, Paris.
- Legendre S. 1989.** *Les communautés de mammifères du Paléogène (Eocène supérieur et Oligocène) d'Europe occidentale: structures, milieux et évolution*. Mûchner Geowissenschaftliche Abhandlungen, München.
- Leonard JA, Wayne RK, and Cooper A. 2000.** Population genetics of Ice Age brown bears. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 1651-1654.
- Lewontin RC. 1970.** The units of selection. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics* **1**: 1-18.
- Line RP. 2003.** Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development and evolution. *Evolution & Development* **5**: 295-304.
- Lister A, and Stuart A. 2008.** The impact of climate change on large mammal distribution and extinction: Evidence from the last glacial/interglacial transition. *Compte Rendus Geosciences* **340**: 615-620.
- Lister AM. 2004.** The impact of Quaternary ice ages on mammalian evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**: 221-241.
- Lister AM, and Sher AV. 2001.** The origin and evolution of the woolly mammoth. *Science* **294**: 1094-1097.
- Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang YH, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu MM, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Taketo MM, Morrisey EE, Atit R, Dlugosz AA, and Millar SE. 2008.** Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology* **313**: 210-224.
- Liu G, Leopold EB, Liu Y, Wang W, Yu Z, and Tong G. 2002.** Palynological record of Pliocene climate events in North China. *Review of Palaeobotany and Palynology* **119**: 335-340.
- Lopinot P. 2005.** Rapport de fouille de la Baume de Gigny (2003-2004): SRA Bourgogne.
- Loreille O, Orlando L, Patou-Mathis M, Philippe M, Taberlet P, and Hänni C. 2001.** Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Current Biology* **11**: 200-203.
- Loreille O, Vigne J-D, Hardy C, Callou C, Treinen-Claustre F, Dennebouy N, and Monnerot M. 1997.** First distinction of sheep and goat archaeological bones by the means of their fossil mtDNA. *Journal of Archaeological Science* **24**: 33-37.
- Lucas P, Constantino P, Wood B, and Lawn B. 2008.** Dental enamel as a dietary indicator in mammals. *BioEssays* **30**: 374-385.

Références bibliographiques

- MacFadden BJ. 2000.** Cenozoic mammalian herbivores from the Americas: Reconstructing ancient diets and terrestrial communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* **31**: 33-59.
- Marchand H, Paillat G, Montuire S, and Butet A. 2003.** Fluctuating asymmetry in bank vole populations (Rodentia, Arvicolinae) reflects stress caused by landscape fragmentation in the Mont-Saint-Michel Bay. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 37-44.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim J-B, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, and Rothberg JM. 2005.** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-380.
- Maricic T, and Paabo S. 2009.** Optimization of 454 sequencing library preparation from small amounts of DNA permits sequence determination of both DNA strands. *Biotechniques* **46**: 51-57.
- Marquez EJ. 2008.** A statistical framework for testing modularity in multidimensional data. *Evolution* **62**: 2688-2708.
- Matalova E, Tucker AS, and Misek I. 2005.** Apoptosis-related factors (Fas receptor, Fas ligand, FADD) in early tooth development of the field vole (*Microtus agrestis*). *Archives of Oral Biology* **50**: 165-169.
- Matisoo-Smith E, and Allen JS. 2001.** Name the rat: molecular and morphological identification of Pacific rodent remains. *International Journal of Osteoarcheology* **11**: 34-42.
- McKenna MC, and Bell SK. 1997.** *Classification of mammals above the species level*. Columbia Univ. Press, New York.
- Meiri S, and Dayan T. 2003.** On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography* **30**: 331-351.
- Mezey JG, Cheverud JM, and Wagner GP. 2000.** Is the genotype-phenotype map modular?: A statistical approach using mouse Quantitative Trait Loci data. *Genetics* **156**: 305-311.
- Michaux JR, Libois R, Paradis E, and Filipucci M-G. 2004.** Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 788-798.
- Miller W, Drautz DI, Ratan A, Pusey B, Qi J, Lesk AM, Tomsho LP, Packard MD, Zhao F, Sher A, Tikhonov A, Raney B, Patterson N, Lindblad-Toh K, Lander ES, Knight JR, Irzyk GP, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Pringle T, and Schuster SC. 2008.** Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* **456**: 387-390.

Références bibliographiques

- Millien V. 2004.** Relative effects of climatic change, isolation and competition on body-size evolution in the Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Journal of Biogeography* **31**: 1267-1276.
- Montuire S, and Brunet-Lecomte P. 2004.** Relation between climatic fluctuations and morphological variability in *Microtus (Terricola) grafi* (Arvicolinae, Rodentia) from Bacho Kiro (Bulgaria, Upper Pleistocene). *Lethaia* **37**: 71-78.
- Montuire S, Michaux J, Legendre S, and Aguilar J-P. 1997.** Rodents and climate. 1. A model for estimating past temperatures using arvicolids (Mammalia: Rodentia) *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **128**: 187-206.
- Mourre V. 2007.** *Le site moustérien de la Grotte du Noisetier à Fréchet-Aure (Hautes-Pyrénées). Rapport final de fouille programmée pluriannuelle 2005-2007.* Service Régional d'Archéologie des Hautes-Pyrénées.
- Nadiri A. 2005.** Molécules de signalisation au cours du développement dentaire chez la souris : BMP-2, -4, FGF-4 et WNT10b et leurs récepteurs *Sciences du vivant : aspect Moléculaires et Cellulaires de la Biologie*. Srasbourg: Université Louis Pasteur. 130.
- Nakasone N, Yoshie H, and Ohshima H. 2006.** An immunohistochemical study of the expression of heat-shock protein-25 and cell proliferation on the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in rat molars. *Archives of Oral Biology* **51**: 378-386.
- Nappi A, Brunet-Lecomte P, and Montuire S. 2006.** Intraspecific morphological tooth variability and geographical distribution: Application to the Savi's voles, *Microtus (Terricola) savii* (Rodentia, Arvicolinae). *Journal of Natural History* **40**: 345-358.
- Navarro N. 2004.** Réponses biotiques aux variations environnementales : Communauté et phénotype. *Centre des Sciences de la Terre*. Dijon: Université de Bourgogne.
- Navarro N, Lécuyer C, Montuire S, Langlois C, and Martineau F. 2004.** Oxygen isotope compositions of phosphate from arvicoline teeth and Quaternary climatic changes, Gigny, French Jura. *Quaternary Research* **62**: 172-182.
- Néraudeau D, Viriot L, Chaline J, Laurin B, and van Kolfschoten T. 1995.** Discontinuity in the Plio-Pleistocene Eurasian water vole lineage. *Palaeontology* **38**: 77-85.
- Nudds RL, and Oswald SA. 2007.** An interspecific test of Allen's rule : evolutionary implication for enthermic species *Evolution* **61**: 2839-2848.
- Obara N, and Lesot H. 2007.** Asymmetrical growth, differential cell proliferation, and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in mouse molar development. *Cell and Tissue Research* **330**: 461-473.
- Oota H, Saitou N, Matsushita T, and Ueda S. 1995.** A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *American Journal of Physical Anthropology* **98**: 133-145.
- Orlando L, Bonjean D, Bocherans H, Thenot A, Argant A, Otte M, and Hänni C. 2002.** Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spalaeus*) through space and time. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1920-1933.

Références bibliographiques

- Osborn J. 1978.** Morphogenetic gradients: fields vs. clones. In: Butler P and Joysey K, eds. *Development, function and evolution of teeth*. New York: New York: Academic Press.
- Ovchinnikov IV, Götherström A, Romanova GP, Kharitonov VM, Liden K, and Goodwin W. 2000.** Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* **404**: 490-493.
- Pääbo S. 1985.** Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *Journal of Archaeological Science* **12**: 411-417.
- Pääbo S. 1989.** Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Science* **86**: 1939-1943.
- Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, and Hofreiter M. 2004.** Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* **38**: 645-679.
- Parmesan C, and Yohe G. 2003.** A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* **421**: 37-42.
- Patterson JS, and Klingenberg CP. 2007.** Developmental buffering: how many genes? *Evolution and Development* **9**: 525-526.
- Pennisi E. 2009.** Neandertal genomics: Tales of a prehistoric human genome. *Science* **323**: 866-871.
- Peñuelas J, and Filella I. 2001.** Responses to a warming world. *Science* **294**: 793-795.
- Peres-Neto PR, and Jackson DA. 2001.** How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* **129**: 169-178.
- Peterkova R, Lesot H, and Peterka M. 2006.** Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **306B**: 234-250.
- Peterkova R, Lesot H, Viriot L, and Peterka M. 2005.** The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice - a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Archives of Oral Biology* **50**: 219-225.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, and Lesot H. 2002.** Development of the vestigial tooth primordia and part of mouse odontogenesis. *Connective Tissue Research* **43**: 120-128.
- Peters H, and Balling R. 1999.** Teeth: where and how to make them. *Trends in Genetics* **15**: 59-65.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis M, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lipenkov VY, Lorius C, Pepin L, Ritz C, Saltzman E, and Stievenard M. 1999.** Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**: 429-436.
- Petitjean A. 2005.** ADN ancien et traitement contre les contaminations. Dijon: Université de Bourgogne.

Références bibliographiques

- Plikus M, Zeichner-David M, Mayer J-A, Reyna J, Bringas P, Thewissen JGM, Snead ML, Chai Y, and Chuong C-M. 2005.** Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evolution and Development* **7**: 440-457.
- Polly PD. 2007.** Development with a bite. *Nature* **449**: 413-415.
- Porter WP, Budaraju S, Stewart WE, and Ramankutty N. 2000.** Calculating climate effects on birds and mammals: impacts on biodiversity, conservation, population parameters, and global community structure. *American Zoologist* **40**: 597-630.
- Poulakakis N, Lymberakis P, Paragamian K, and Mylonas M. 2005.** Isolation and amplification of shrew DNA from barn owl pellets. *Biol J Linn Soc* **85**: 331-340.
- Primault J. 2007.** La grotte du Taillis des Coteaux. Rapport intermédiaire de la fouille programmée pluri-annuelle 2006-2008: Service Regional de l'Archéologie de Poitou-Charentes. 150.
- Pruvost M, and Geigl E-M. 2004.** Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. *Journal of Archaeological Science* **31**: 1191-1197.
- Pruvost M, Grange T, and Geigl E-M. 2005.** Minimizing DNA contamination by using UHG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *BioTechniques* **38**: 569-575.
- Pruvost M, Schwarz R, Bessa Correia V, Champlot S, Grange T, and Geigl E-M. 2008.** DNA diagenesis and palaeogenetic analysis: Critical assessment and methodological progress. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **266**: 211-219.
- Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, Champlot S, Braguier S, Morel N, Fernandez-Jalvo Y, Grange T, and Geigl E-M. 2007.** Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 739-744.
- Qian H, and Ricklefs RE. 2008.** Global concordance in diversity patterns of vascular plants and terrestrial vertebrates. *Ecology Letters* **11**: 547-553.
- Raff RA. 1996.** *The shape of life: genes, development and the evolution of animal form.* The University of Chicago Press, Chicago.
- Raff RA. 2007.** Written in stones: fossils, genes and evo-devo. *Nature Reviews Genetics* **8**: 911-919.
- Raff RA, and Sly BJ. 2000.** Modularity and dissociation in the evolution of gene expression territories in development. *Evol Dev* **2**: 102-113.
- Ramakrishnan U, and Hadly EA. 2009.** Using phylochronology to reveal cryptic population histories: review and synthesis of 29 ancient DNA studies. *Molecular Ecology* **18**: 1310-1330.
- Ramakrishnan U, Hadly EA, and Mountain JL. 2005.** Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. *Molecular Ecology* **14**: 2915-2922.
- Rasmussen R. 2001.** Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C and Nakagawara K, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR*. Berlin: Springer. 11-20.

Références bibliographiques

- Renaud S. 1997.** *Modalités de l'évolution morphologique : Analyse morphométrique d'une spécialisation dentaires chez les murinés, la stéphanodontie.* Montpellier: Université de Montpellier II. 100.
- Renaud S. 1999.** Size and shape variability in relation to species differences and climatic gradients in the African rodent *Oenomys*. *Journal of Biogeography* **26**: 857-865.
- Renaud S, and Michaux, J. 2007.** Mandibles and molars of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* (L.): integrated latitudinal pattern and mosaic insular evolution. *Journal of Biogeography* **34**: 339-355.
- Renaud S, Michaux J, Schmidt DN, Aguilar J-P, Mein P, and Auffray J-C. 2005.** Morphological evolution, ecological diversification and climate change in rodents. *Proceedings of the Royal Society B* **272**: 609-617.
- Repenning CA. 2003.** Chapter 17. *Mimomys* in North America. *Bulletin American Museum of Natural History* **279**: 469-512.
- Repenning CA, Fejfar O, and Heinrich W-D. 1990.** Arvicolid rodent biochronology of the northern Hemisphere. In: Fejfar O and Heinrich W-D, eds. *International Symposium on the Evolution and Phylogenetic Biostratigraphy of Arvicolids*. Prague: Pfeil-Verlag. 385-418.
- Robovský J, Ricankova V, and Zrzavý J. 2008.** Phylogeny of Arvicolinae (Mammalia, Cricetidae): utility of morphological and molecular data sets in a recently radiating clade. *Zoologica Scripta* **37**: 571-590.
- Rogaev EI, Moliaka YK, Malyarchuk BA, Kondrashov FA, Derenko MV, Chumakov I, and Grigorenko AP. 2006.** Complete Mitochondrial Genome and Phylogeny of Pleistocene Mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biology* **4**: e73.
- Rohland N, and Hofreiter M. 2007.** Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* **42**: 343-352.
- Rohlf FJ, and Corti M. 2000.** Use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Systematic Biology* **49**: 740-753.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, and Pounds JA. 2003.** Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* **421**: 57-60.
- Rychlik W, Spencer WJ, and Rhoads RE. 1990.** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* **18**: 6409-6412.
- Salazar-Ciudad I. 2008.** Tooth morphogenesis in vivo, in vitro, and in silico. *Current Topics of Developmental Biology* **81**: 341-371.
- Salazar-Ciudad I, Garcia-Fernandez J, and Solé RV. 2000.** Gene networks capable of pattern formation: From induction to reaction-diffusion. *Journal of Theoretical Biology* **205**: 587-603.
- Salazar-Ciudad I, and Jernvall J. 2002.** A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proceedings of the National Academy of Science* **99**: 8116-8120.

Références bibliographiques

- Salazar-Ciudad I, and Jernvall J. 2004.** How different types of pattern formation mechanisms affect the evolution of form and development. *Evolution and Development* **6**: 6-16.
- Salazar-Ciudad I, and Jernvall J. 2005.** Graduality and innovation in the evolution of complex phenotypes: Insights from development. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* **304B**: 619-631.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J, and Newman SA. 2003.** Mechanisms of pattern formation in development and evolution. *Development* **130**: 2027-2037.
- Sanson GD, Kerr SA, and Gross KA. 2007.** Do silica phytoliths really wear mammalian teeth. *Journal of Archeological Science* **34**: 526-531.
- Schlosser G. 2002.** Modularity and the units of evolution. *Theory in Biosciences* **121**: 1-80.
- Schlosser G, and Wagner, G. P. 2004.** *Modularity in Development and Evolution*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Schweizer M, Excoffier L, and Heckel G. 2007.** Fine-scale, genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* **16**: 2463-2473.
- Serratt MA, King D, and Lovejoy CO. 2008.** Temperature regulates limb length in homeotherms by directly modulating cartilage growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 19348-19353.
- Sesé C. 1994.** Paleoclimatical interpretation of the Quaternary small mammals of Spain. *Geobios* **27**: 753-767.
- Setkova J, Lesot H, Matalova E, Witter K, Matulova P, and Misek I. 2006.** Proliferation and apoptosis in early molar morphogenesis - voles as models in odontogenesis. *International Journal of Developmental Biology* **50**: 481-489.
- Shingleton AW, Frankino WA, Thomas F, Nijhout HF, and Douglas JE. 2007.** Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *BioEssays* **29**: 536-548.
- Sibly RM, and Brown, J. H. 2007.** Effects of body size and lifestyle on evolution of mammal life histories. *Proceedings of the National Academy of Science* **104**: 17707-17712.
- Silvestri AR, and Singh I. 2003.** The unresolved problem of the third molar: Would people be better off without it? *The Journal of the American Dental Association* **134**: 450-455.
- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Cooper A, Stringer CB, and Collins MJ. 2001.** Neanderthal DNA: Not just old but old and cold? *Nature* **410**: 771-772.
- Smith FA, Betancourt JL, and Brown JH. 1995.** Evolution of body size in the woodrat over the past 25,000 years of climate-change. *Science* **270**: 2012-2015.
- Solé RV, Salazar-Ciudad I, and Newman SA. 2000.** Gene network dynamics and the evolution of development. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 479-480.
- Steppan SJ, Adkins RM, and Anderson J. 2004.** Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Systematic Biology* **53**: 533-553.

Références bibliographiques

- Stock DW. 2001.** The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B* **356**: 1633-1653.
- Szuma E. 2008.** Evolutionary and climatic factors affecting tooth size in the red fox *Vulpes vulpes* in the Holarctic. *Acta Theriologica* **53**: 289-332.
- Taberlet P, and Fumagalli L. 1996.** Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Molecular Ecology* **5**: 301-305.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, and Cossons J-F. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. 2007.** MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Thesleff I, Keranen S, and Jernvall J. 2001.** Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Advances in Dental Research* **15**: 14-18.
- Torres CBB, Alves JB, Silva GAB, Goes VS, Nakao LYS, and Goes AM. 2008.** Role of BMP-4 during tooth development in a model with complete dentition. *Archives of Oral Biology* **53**: 2-8.
- Tougaard C, Brunet-Lecomte P, Fabre M, and Montuire S. 2008a.** Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**: 309-323.
- Tougaard C, and Renvoisé E. 2008.** Rodents and palaeogenetics: New perspectives. *Comptes Rendus Palevol* **7**: 125-134.
- Tougaard C, Renvoisé E, Petitjean A, and Quéré J-P. 2008b.** New insight into the colonization processes of common voles: Inferences from molecular and fossil evidence. *PLoS One* **3**: 1-10.
- Triant DA, and DeWoody JA. 2006.** Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences. *Genetica* **128**: 95-108.
- Tucker A, and Sharpe P. 2004.** The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature Reviews Genetics* **5**: 499-508.
- Tummers M, and Thesleff I. 2003.** Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development* **130**: 1049-1057.
- Tuross N. 1994.** The biochemistry of ancient DNA in bone. *Cellular and Molecular Life Sciences* **50**: 530-535.
- Vahtokari A, Aberg T, Jernvall J, Keränen SVE, and Thesleff I. 1996.** The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mechanisms of Development* **54**: 39-43.
- Valdiosera C, Garcia N, Dalen L, Smith C, Kahlke R-D, Liden K, Angerbjörn A, Arsuaga JL, and Götherström A. 2006.** Typing single polymorphic nucleotides

Références bibliographiques

- in mitochondrial DNA as a way to access Middle Pleistocene DNA. *Biology Letters* **2**: 601-603.
- Viriot L, Peterkova R, Peterka M, and Lesot H. 2002.** Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in the mouse lower jaw. *Connective Tissue Research* **43**: 129-133.
- von Dassow G, and Munro E. 1999.** Modularity in animal development and evolution: elements of a conceptual framework for evo-devo. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **285**: 307-325.
- Wagner GP. 1996.** Homologues, natural kinds end the evolution of modularity. *American Zoologist* **36**: 36-48.
- Wagner GP, and Altenberg L. 1996.** Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* **50**: 967-976.
- Wagner GP, Mezey J, and Calabretta R. 2005.** Natural selection and the origin of modules. In: Callebaut W, Rasskin-Gutman D and Simon HA, eds. *Modularity: Understanding the development of evolution of natural complex systems*. Cambridge.
- Walther G-R, Post E, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin J-M, Hoegh-Guldberg O, and Bairlein F. 2002.** Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**: 389-395.
- West-Eberhard MJ. 2003.** *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York.
- Willerslev E, and Cooper A. 2005.** Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B* **272**: 3-16.
- Witter K, Lesot H, Peterka M, Vonesch J-L, Misek I, and Peterkova R. 2005.** Origin and developmental fate of vestigial tooth primordia in the upper diastema of the field vole (*Microtus agrestis*, Rodentia). *Archives of Oral Biology* **50**: 401-409.
- Yang AS. 2001.** Modularity, evolvability, and adaptive radiations: a comparison of the hemi- and holometabolous insects. *Evolution & Development* **3**: 59-72.
- Young RL, and Badyaev AV. 2006.** Evolutionary persistence of phenotypic integration: influence of developmental and functional relationships on complex trait evolution. *Evolution* **60**: 1291-1299.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Reappraisal of 'chronospecies' and the use of *Arvicola*

Journal of Archaeological Science 35 (2008) 1867–1879

Journal of
Archaeological
SCIENCE

http://www.elsevier.com/locate/jas

Reappraisal of 'chronospecies' and the use of *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) for biochronology

Elise Escudé^{a,e,*}, Sophie Montuire^b, Emmanuel Desclaux^c, Jean-Pierre Quéré^d,
Elodie Renvoisé^e, Marcel Jeannet^f

^a CNRS UMR 6569, Institut de Paléontologie Humaine, 1 rue René Panhard, F-75013 Paris, France

^b CNRS UMR 5561, Biogéosciences & EPHE, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université de Bourgogne, 6 bd Gabriel, F-21000 Dijon, France

^c Laboratoire départemental de Préhistoire du Lazaret, 33bis bd Frank Pilatte, F-06300 Nice, France

^d INRA UMR 1062, CBGP (Centre Biologie et Gestion des Populations), Campus International de Baillarguet,

CS 30 016, F-34988 Montpellier/Lez, France

^e CNRS UMR 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 bd Gabriel, F-21000 Dijon, France

^f ARPA (Association de Recherche Paléocologique en Archéologie) 2 rue du 19 Mars 1962, F-71850 Charnay-lès-Macon, France

Received 30 March 2007; received in revised form 13 November 2007; accepted 27 November 2007

Abstract

The water vole, genus *Arvicola*, is characterised by a broad geographic distribution throughout Europe and is widespread during the late Middle and Upper Pleistocene. This genus is used as a major biostratigraphic tool within the Quaternary. Specific determinations using the Schmelzband-Differenzierung-Quotient or SDQ have identified many chronospecies within the fossil species *Arvicola cantiana* (Hinton, 1910). As SDQ calculation remains limited, this study reappraises the *Arvicola* genus in terms of morphodiversity and morphospace using outline analysis which takes into account the tooth as a whole. Outline analysis suggests that one single species of *Arvicola*, *A. cantiana*, was present during the Pleistocene. This species shows great variability with no trends or patterns in morphospace. Thus, these results call into question the reliability of SDQ for specific determinations and throw doubt on the biochronological framework based on *Arvicola*.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Rodentia; *Arvicola*; Enamel quotient; Morphology; Outline analysis; Biochronology

1. Introduction

The water vole, genus *Arvicola* (Lacépède, 1799), is characterised by a broad geographic distribution throughout Europe and a wide climatic tolerance, throughout the Quaternary (Shenbrot and Krasnov, 2005). As a result, this genus is present in both glacial and interglacial periods and was widespread during the late Middle and Upper Pleistocene. Its rapid

evolution and successive migration waves have encouraged the use of the genus as a major biostratigraphic tool within the Quaternary. *Arvicola* was one of the most important components of the "short chronology" theory, based on Mammalian assemblage and expansion (Roebroeks and Kolsfschoten, 1994).

All palaeontological analyses within *Arvicolinae* are based on first lower molars (m1) because m1 have visible diagnostic features and are found in great quantities in the fossil record. In water voles, m1 are continuously growing rootless hypsodont molars, composed of a posterior loop, five closed enamel triangles (or salient angles) and an anterior loop (Chaline, 1972, 1987; Chaline and Laurin, 1986; Hinton, 1926).

In 1955, Heim de Balzac and Guislain (1955) showed the existence in Western Europe of three species in the extant

* Corresponding author. CNRS UMR 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 bd Gabriel, F-21000 Dijon, France.

E-mail addresses: elise.escude@netcourrier.com (E. Escudé), sophie.montuire@u-bourgogne.fr (S. Montuire), manu@lazaret-unic.fr (E. Desclaux), quere@ensam.inra.fr (J.-P. Quéré), elodie.renvoise@u-bourgogne.fr (M. Renvoisé), m.jeannet.arpa.mf@wanadoo.fr (M. Jeannet).

fauna: *Arvicola sapidus* (Miller, 1908) in the north and in the south, sympatric with *Arvicola scherman* (Shaw, 1801), the small Central European species and *Arvicola terrestris* (Linnaeus, 1758), the Eastern and Northern water vole.

Today, two main species are distinguished. *A. sapidus*, the largest in size, is restricted to Spain and France and is completely aquatic. The second extant species, *A. terrestris*, is characterised by a terrestrial lifestyle, and a geographic distribution covering the whole of Europe except Spain. Two ecotypes are defined according to habitat: the aquatic form *Arvicola terrestris terrestris*, and the terrestrial form *Arvicola terrestris scherman* (Le Louarn and Quéré, 2003). These forms are raised to species rank (Wilson and Reeder, 2005): *Arvicola amphibius* (Linnaeus, 1758) for the aquatic form and *Arvicola scherman* (Shaw, 1801) for the terrestrial form. Nevertheless, in Western Europe, morphological and genetic features are not sufficiently established to follow the new nomenclature (Wust-Saucy, 1998). Thus, for our work, *A. terrestris* will be used for the terrestrial form.

1.1. State of the art

Arvicola made its first appearance in Central Europe around 500,000 years ago, and in Eastern Europe around 400,000 years ago (Agadjanian, 1977, 1983; Radulesco and Samson, 1977). Both the extant species and the fossil, *Arvicola cantiana* (Hinton, 1910), were probably derived from *Mimomys* lineage (*Mimomys occitanus*–*Mimomys polonicus*–*Mimomys pliocaenicus*–*Mimomys ostromosensis*–*Mimomys savini*) as suggested by the great similarity in molar occlusal surfaces (Chaline, 1972; Fejfar and Heinrich, 1983; Janossy, 1969; Koenigswald von, 1970, 1973, 1980; Kretzoi, 1969; Rabeder, 1981). Thus, the transition from *M. savini* to *A. cantiana*, which corresponds to the Biharian–Toringian boundary in the Cromerian complex, is an important stratigraphic marker (Koenigswald von and Kolfshoten van, 1996).

In *Arvicola*, the enamel band of salient angles underwent differentiation, and m1 length increased during the Quaternary. *A. cantiana* follows the *Mimomys* enamel pattern, the enamel is thicker on the posterior wall and thinner on the anterior wall, while in modern *Arvicola* the enamel is thinner on the posterior wall and thicker on the anterior wall. The thinning of the enamel band on the posterior wall reduces continually, and thus corresponds to an irreversible trend (Heinrich, 1978; Koenigswald von, 1970, 1973, 1980, 1994).

In previous works, enamel differentiation and m1 length have been used for specific determinations, relative dating and correlations of archaeological records (Heinrich, 1978, 1982).

Koenigswald von (1973, 1980, 1994) defined three species and proposed the following stratigraphic division:

- *A. cantiana* in the Middle Pleistocene.
- *A. cantianalterrestris* in the Middle and Upper Pleistocene.
- *A. terrestris* in the Upper Pleistocene.

Heinrich (1978, 1982, 1987, 1990) traced the evolutionary trend in the *Arvicola* lineage and proposed a biostratigraphic framework based on *Arvicola* with the calculation of the “enamel quotient” (SDQ = Schmelzband-Differenzierungs-Quotient). The species partition is *A. cantiana* (SDQ > 100), *A. terrestris* (SDQ < 100) and the transition between the two species coincides approximately with the Eemian–Weichselian boundary.

In the Middle Pleistocene, in the Netherlands and in the Rhine area, Kolfshoten van (1990) and Koenigswald von and Kolfshoten van (1996) distinguished three distinct taxa:

- *Arvicola terrestris cantiana* (SDQ > 120).
- *A. terrestris* ssp. A (120 > SDQ > 95).
- *A. terrestris* ssp. B (SDQ < 95).

In the south-east of France and Liguria, Abbassi and Desclaux (1996) and Abbassi et al. (1998) showed two taxa and proposed a biochronological scheme:

- *Arvicola* morphotype *cantianalterrestris* (small, and T4–T5 confluent) and *Arvicola* morphotype *cantiana/sapidus* (large, and T4–T5 alternate) in the late Middle Pleistocene (120 < SDQ < 95).
- *A. terrestris* and *A. sapidus* in the Upper Pleistocene (with generally SDQ < 100, except in Italy and Spain, SDQ > 100).

Kolfshoten van (1992), Abbassi et al. (1998) and Desclaux et al. (2000) demonstrated a migration event of *A. terrestris* ssp. B to the Rhone Valley area during the Saalien and the migration of more primitive *A. terrestris* from the south into North-western Europe during the Eemian.

1.2. Aim of our study

However, as SDQ calculation remains limited (Kratochvil, 1980, 1981; Röttger, 1986, 1987), it appeared interesting to suggest a new approach to the genus using a new morphometric method (outline analysis) applied in systematic (Rohlf and Marcus, 1993; Schmittbuhl et al., 1997). At present, these methods are preferred as they provide a general quantitative description of shape and size which allows the study of the object as a whole (Rohlf and Marcus, 1993; Schmittbuhl et al., 1997).

The choice of morphological descriptor depends on the type of object described: geometric morphometry requires a precise determination of homologous landmarks, which are relatively difficult to define and sometimes uncertain on vole molars. This method would result in information loss through less accurate characterisation. For voles, the most appropriate descriptors for the analysis of the first lower molar (with enamel triangle) are linear measurements and outline methods, which allow discrimination between species and are robust for morphospace analysis (Navarro et al., 2004). For our study, we chose outline analysis, which takes into account shape as

a whole, rather than linear measurements which focus on a detailed and specific part of the tooth.

Our study consists of (1) a discussion of the validity and variability of the SDQ method and values and (2) remarks on the reliability of a biochronological framework based on *Arvicola*.

2. Material and methods

The fossil populations chosen for analysis come from France and Liguria. They are listed in Table 1. This material is compared with modern species for morphometric analysis. The present-day populations were obtained by traps in the north and east of France:

- *A. terrestris*, terrestrial form: Valleroy-le-Sec (Vosges, $N = 32$), Chapelle-d'Huin (Doubs, $N = 35$), La Grave (Hautes Alpes, $N = 31$).
- *A. sapidus*: samples ($N = 20$) were collected from all over the Paris Basin as this species is difficult to trap.

The localisation of present populations and fossil localities is given in Fig. 1.

2.1. Outline analysis

The closed outline of each tooth is defined by an empirical periodic function expressing the radius length between outline point and centre of gravity. Each function is resolved into Fourier series for mathematic description which is comparable function to function. Fourier series consist of the approximation of periodic function by a sum of trigonometric functions of decreasing wavelength (Lestrel, 1997; Renaud, 1997).

Vole molars have a complex outline with triangles and loops where the radius from the centre of gravity may cut through the outline several times (i.e. non-holomorph outline). Thus, the co-ordinates x and y of the outline are each expressed by a function $x(t)$ and $y(t)$.

Complex Discrete Fourier Transform, CDFT (Gonzalez and Woods, 1992), allows a complex outline to be treated under

the same principle as Elliptic Fourier (Kuhl and Giardina, 1982). The two-dimensional signal is represented by complex number and processed in a single pass.

In order to limit measurement error linked to analysis point of origin (cf maximum of anterior loop), we chose the amplitude of each harmonic as the parameter of analysis.

The external enamel contour of each occlusal surface was hand-drawn then scanned at 300 dpi. For this analysis, 200 equidistant points along the curve were sampled and 20 harmonics were chosen permitting the reconstruction about 97% of the original outline (Fig. 2). The morphospaces are obtained for form (=size and shape) and shape. Shape requires a size-standarisation, using the square root of the area of the occlusal surface. Measurement error for hand drawing was not statistically significant (each tooth has been drawn and scanned several times).

Analyses were performed using MATLAB Toolbox CDFT 2.7 (Dommergues, 2000, 2001), modified by Navarro et al. (2004).

All variables stemming from CDFT were treated by multivariate analysis.

Factorial discriminant analysis (FDA) allows the validation or invalidation of the *a priori* hypothesis for individual classes. This technique aims to maximise inter-group differences and minimise intra-group differences. Mahalanobis distances and associated probabilities indicate the distance between each group and whether the groups are distinct. The statistical level of significance for each discriminant analysis was evaluated by Wilks' Lambda test. For each sample, all individuals were represented by a scatter plot.

Principal component analysis (PCA) is an exploratory technique used to visualise the morphospace to n -dimensions of each species and each population by reducing its dimensionality.

All analyses were performed with *Statistica StatSoft*[®] (Statsoft).

2.2. Schmelzband-Differenzierung-Quotient (SDQ)

The principle is to quantify the differences in enamel thickness by calculating a quotient (SDQ). In the first lower

Table 1
Fossil populations by archaeological sites, regions, individual number, dating, epoch and bibliographic references

Populations	Sites	Regions	N	OIS	Epoch	References
Gigny IX	Gigny cave	Jura	29	3	Upper Pleistocene	Campy (1982), Chaline and Brochet (1989)
Gigny XIX			40	3	Upper Pleistocene	
Gigny XXII			40	4	Upper Pleistocene	
Moula XIV–XV	Moula-Guercy cave	Ardèche	40	5e	Upper Pleistocene	Defleur et al. (1998)
Moula XIX–XVII			30	6	Middle Pleistocene	
Orgnac	Orgnac-3 sinkhole		30	9	Middle Pleistocene	Combiér (1967, 1976)
Eglise	Eglise cave	Dordogne	32	3	Upper Pleistocene	Laville et al. (1973), Laville (1973)
Vaufrey	Vaufrey cave		67	6	Middle Pleistocene	Delpech (1988), Marquet (1989), Rigaud (1988)
Artenac	Artenac cave	Charente	37	5	Upper Pleistocene	Delagnes et al. (1999)
Suard	Suard cave		32	5	Upper Pleistocene	Debenath (1974), Marquet (1989)
Gaudry	Gaudry cave		63	6	Middle Pleistocene	Debenath (1974), Lumley de (1989)
Manie	Arma delle Manie	Côte d'azur	22	4	Upper Pleistocene	Arroda et al. (1976), Fornasiero (1989)
Lazaret	Lazaret cave	Liguria	40	6	Middle Pleistocene	Lumley de (1989)

N , individual number; OIS, Oxygen Isotopic Stage.

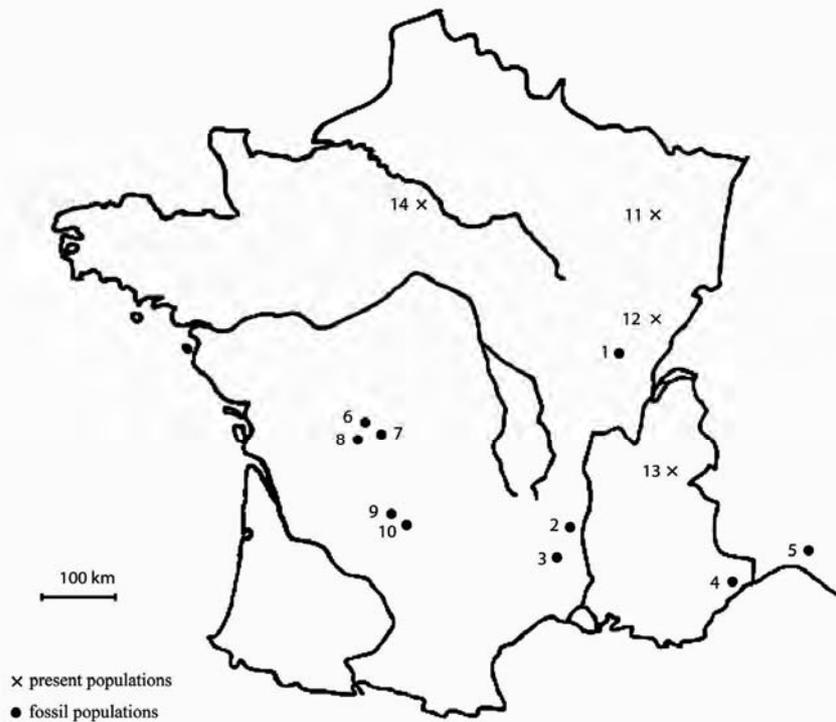


Fig. 1. Map of France and Liguria (Italy) with fossil and present populations of *Arvicola*: 1. Gigny cave, 2. Orgnac-3 sinkhole, 3. Moula-Guercy cave, 4. Lazaret cave, 5. Arma delle Manie, 6. Suard cave, 7. Gaudry cave, 8. Artenac cave, 9. Vaufrey, 10. Eglise, 11. Valleroy-le-Sec, 12. Chapelle-d'Huin, 13. La Grave, 14. The Paris Basin.

molar (m1), the enamel band of each triangle is measured and the thickness of the posterior wall is divided by the thickness of the anterior wall. The SDQ for each m1 is the mean of the SDQ values of each salient angle. The SDQ for a population is the mean of the SDQ of each m1. The landmarks of each measurement are the middle of the enamel band of the anterior and posterior walls (Heinrich, 1978) (Fig. 3).

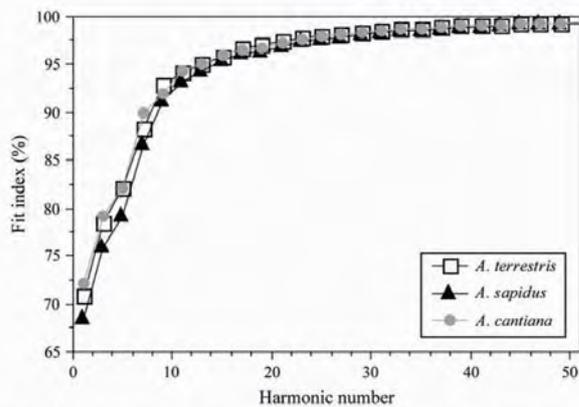


Fig. 2. Convergence index of occlusal surfaces for the 29 first harmonics.

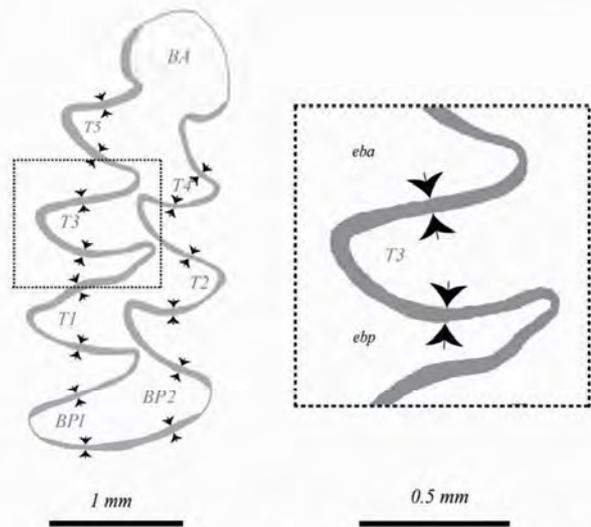


Fig. 3. SDQ calculation. With T: enamel triangle, BA: anterior loop, BP: posterior loop, eba: anterior wall, ebp: posterior wall.

$$\text{SDQ triangle} : \text{SDQ}_t = \frac{\text{ebp}}{\text{eba}} 100$$

$$\text{SDQ m1} : \text{SDQ}_{m1} = \frac{\sum \text{SDQ}_p}{7} 100$$

$$\text{SDQ population} : \text{SDQ}_{\text{pop}} = \frac{\sum \text{SDQ}_{m1}}{n} 100$$

SDQ values, morphology and dimensions of m1 are taken into account for specific determinations. As SDQ values decrease with time, the relative stratigraphic position of studied populations can be established in order to construct a biochronological framework.

Enamel thickness measurements are made with a measuring video (colour video camera).

Analysis of variance (ANOVA) is used to test the significance of differences between several means (*F* test, Snedecor) of SDQ calculation depending on the measurer, measurement series (inter- and intra-measurer variability), between right and left sides, and between individuals (inter- and intra-individual variability). Each ANOVA was performed after verification of distribution normality and variance homogeneity for all samples.

Regression techniques are probabilistic relationships allowing the study of the relationship between SDQ value decrease

and time represented by Oxygen Isotopic Stage (OIS 9–1). The linear correlation degree was assessed by the correlation coefficient (R^2).

2.3. Artificial wear and thin-slides

First of all, to examine variation of SDQ values with wear, we reproduce wear artificially in successive steps. This technique was established by Viriot (1994) who showed that the great morphological variability of m1 between individuals of different ages has led to an over-estimation of the number of species. To reproduce the most natural way of chewing, we must consider skull characteristics. In rodents, elongate fosse with no postglenoid process only allows the lower jaw to move forwards and backwards with a pendulum movement, but no lateral movements (Lecointre and Le Guyader, 2003). This movement creates greater wear in the middle of the lower molar row and at the ends of upper molar row. In order to limit error measurement created by failure to reproduce the pendulum movement, only m1 was submitted to this procedure (Viriot, 1994). The following protocol was followed: the molar was fixed to the mobile plate at the same angle as in the alveolar bone of the mandible; the base of the tooth was fixed with ethyl methacrylate resin; the tooth was coated in black epoxy resin, to contrast with the light-coloured

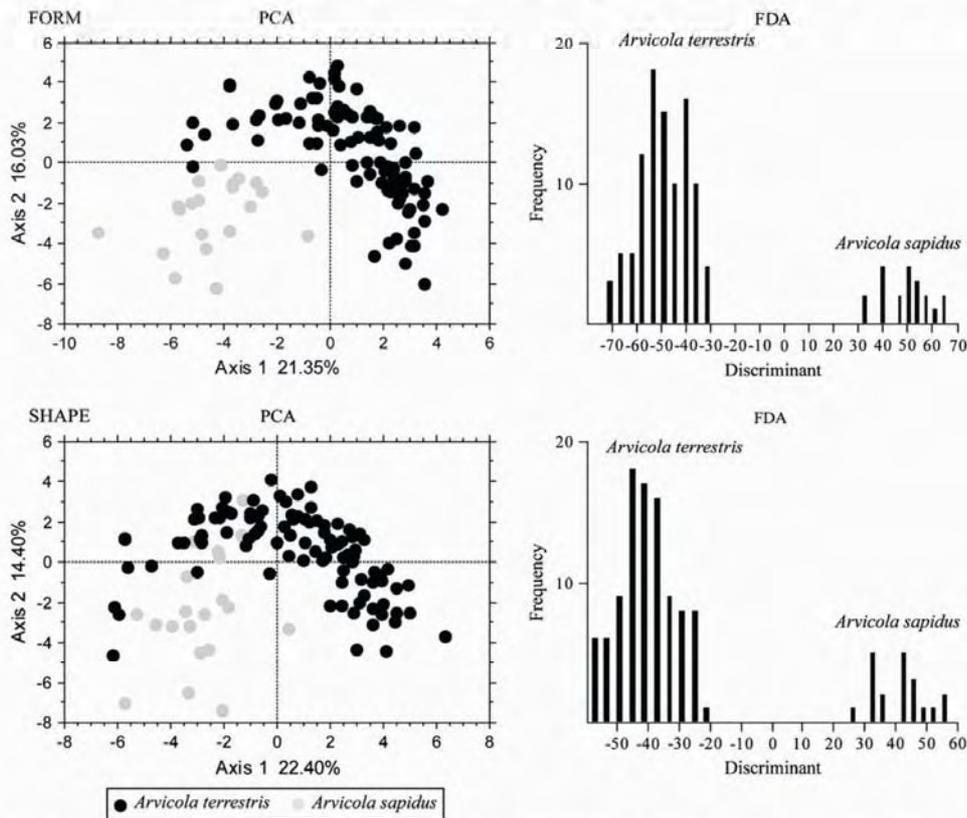


Fig. 4. Current model: *Arvicola terrestris* and *Arvicola sapidus* with principal component analysis (PCA) and factorial discriminant analysis (FDA).

Table 2
Specific determination according to SDQ values (Desclaux et al., 2000)

	<i>Arvicola</i> morphotype <i>cantiana/terrestris</i>	<i>Arvicola</i> morphotype <i>cantiana/sapidus</i>	<i>Arvicola</i> <i>terrestris</i>	<i>Arvicola</i> <i>sapidus</i>
Gigny IX			+	+
Eglise			+	
Gigny XIX			+	+
Suard			+	
Artenac			+	
Manic				+
Moula XIV–XV				+
Gigny XXII	+			
Moula XIX–XVIII	+	+		
Vaufrey	+	+		
Lazaret	+	+		
Orgnac	+			
Gaudry	+			

mineralised tissues; the tooth was worn down mechanically with a diamond wheel, with a wear step of 0.5 mm; SDQ measurement and calculation for each step (seven steps in all) on a sample of five molars from young individuals of various species.

Afterwards, to observe the variation of enamel band thickness along tooth crowns without wear, two thin-slides were made per tooth from a sample of two young individuals and three adult individuals, various species.

3. Results

3.1. Outline analysis

First of all, it was necessary to establish a current model from individuals as identified by criteria other than their first lower molar (e.g. fur colour, body mass, habitat) so as to verify the efficiency of the chosen specific determination method. Morphospaces of *A. terrestris* and *A. sapidus* are given in Fig. 4 (PCA) for form and shape. The morphospace of *A. sapidus* is separated from *A. terrestris* and the two first axes of the PCA expressed 37.4% (form) and 36.8% (shape) of total variance. To verify the statistical classification, discriminant analyses are performed and presented in Fig. 4 (FDA) for form and shape. All individuals are well classed (form: Wilks' Lambda: 0.0622*F* approx. (40.77) = 27.592, $p < 0.000$; shape: Wilks' Lambda: 0.07699*F* approx. (40.77) = 23.088, $p < 0.000$). Thus, outline analysis is robust and appropriate to separate *A. terrestris* from *A. sapidus*.

Afterwards, the fossil populations were inserted in the robust present model *A. terrestris*–*A. sapidus* in order to understand relationships between the different species. The groups were established *a priori* according to specific determination extracted from previous works (Desclaux et al., 2000), using SDQ (Table 2). Thus, six groups are distinguished: *Arvicola cantiana terrestris*, *Arvicola cantiana sapidus*, *A. terrestris* fossil, *A. sapidus* fossil, *A. terrestris* and *A. sapidus*. Sixty percent of total individuals are well classed for form and 60.6% for shape (form: Wilks' Lambda: 0.12244*F* approx. (200.2917) = 7.6722, $p < 0.000$; shape: Wilks' Lambda: 0.15469*F* approx. (200.2912) = 6.6378, $p < 0.000$). The Mahalanobis distances are significant between the centroids of each group (Tables 3 and 4). They are very small between fossil species, small between fossil species and *A. terrestris*. They are large between *A. sapidus* and *A. terrestris*, and *A. sapidus* and fossil species. The first axis permits the separation between *A. sapidus* and *A. terrestris* and fossil species. The second axis permits the separation between *A. sapidus*, *A. terrestris* and fossil species (Figs. 5 and 6). The *A. sapidus* group is spread out with few individuals whereas the *A. terrestris* and *A. cantiana* groups are more compact with many individuals. Taking into account the parameters of form then shape, the fossil group is distinct from the modern species and shows considerable variability within certain limits. There is no separation between species defined by SDQ in previous works: *A. cantiana terrestris*, *A. cantiana sapidus*, *A. terrestris* and *A. sapidus*.

Finally, an attempt was made to analyse changes in form and shape over time. Figs. 7A and 8A allow the morphospaces of each population to be visualised for form and shape over time. About 30–40% of total variance is explained by the first and second component of PCA. Populations are placed depending on their relative chronological position defined by radiometric data and SDQ (Desclaux et al., 2000). Figs. 7B and 8B represent boundary markers (minimum and maximum) of morphospace for the first and second principal component. As illustrated by these figures, we note that there are no significant changes in morphospace over time and that *Arvicola* shows great morphological variability.

3.2. Schmelzband-Differenzierung-Quotient (SDQ)

In a first part, we aim to quantify the error measurement of enamel band thickness and the variability of SDQ calculation between enamel salients of a same m1, along the crown of a same m1 with and without wear, a given individual (between

Table 3
Mahalanobis distance* between centroids of each species scatter plot and associated probability** for form

	<i>A. sapidus</i> fossil	<i>A. terrestris</i> fossil	<i>A. cantiana terrestris</i>	<i>A. cantiana sapidus</i>	<i>A. sapidus</i>	<i>A. terrestris</i>
<i>A. sapidus</i> fossil		1.80*	2.28	1.65	48.38	7.71
<i>A. terrestris</i> fossil	0.00**		3.12	1.98	51.50	5.94
<i>A. cantiana terrestris</i>	0.00	0.00		2.01	45.13	7.81
<i>A. cantiana sapidus</i>	0.01	0.00	0.00		51.64	8.11
<i>A. sapidus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00		57.23
<i>A. terrestris</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Table 4
Mahalanobis distance* between centroids of each species scatter plot and associated probability** for shape

	<i>A. sapidus fossil</i>	<i>A. terrestris fossil</i>	<i>A. cantiana terrestris</i>	<i>A. cantiana sapidus</i>	<i>A. sapidus</i>	<i>A. terrestris</i>
<i>A. sapidus fossil</i>		1.84*	2.40	1.61	37.27	7.91
<i>A. terrestris fossil</i>	0.00**		3.06	1.98	36.37	5.63
<i>A. cantiana terrestris</i>	0.00	0.00		1.97	29.21	7.76
<i>A. cantiana sapidus</i>	0.01	0.00	0.00		34.64	7.95
<i>A. sapidus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00		38.81
<i>A. terrestris</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

right and left side) by measurement series and different measurers. Concerning the first remark, the enamel bands are rarely parallel along the same edge, thus thickness can vary greatly (e.g. in the T4 posterior wall, T4ebp, thickness varied from 56 μm in the middle to 85 and 90 μm at each end). The repetitive measurements of a same enamel band thickness vary greatly (e.g. in the BP1 posterior wall, BP1ebp, the thickness varied from 79 to 88 μm then 100 μm for three measurement series). This is significant for half of the measurements (BP1ebp: $F = 5.64$, $p = 0.004$; BP2eba: $F = 3.60$, $p = 0.030$; T1eba: $F = 8.32$, $p = 0.000$; T2eba: $F = 7.0$, $p = 0.001$; T2ebp: $F = 3.32$, $p = 0.040$; T3eba: $F = 3.39$, $p = 0.380$; T3ebp: $F = 9.22$, $p = 0.000$). Within a same m1 of *Arvicola* type *terrestris*, we note that some enamel salients have “*cantiana* values” and some *Arvicola* type *cantiana* have “*terrestris* values” (e.g. Eglise: BP1 114.3, BP2 98.8, T1 87.1, T2 88.2, T3 92.1, T4 120.3, T5 72.7; Gaudry: BP1 113.8, BP2 111.2, T1 110.4, T2 96.4, T3 112.1, T4 87.2, T5 113.9). Concerning the variability of SDQ calculation along the crown of a same m1 with and without wear (the artificial wear and thin-slides), in both cases (Tables 6 and 7), we observe a great variability in values without trends along tooth crowns in young individuals and in adult individuals. For a given individual, the significant difference of averages between right and left

sides seems to indicate a directional asymmetry (right side: Mean 82.3 and left side: Mean 84.6; $F = 8.46$, $p = 0.005$). With three measurement series of the SDQ values for the same population ($N = 30$), the difference between each mean is not significant ($F = 0.738$, $p = 0.481$), but these values for one population (Mean: 83.3, 84.0, 82.5) replaced in a chronological context may change the relative stratigraphic position of this population compared to others. The comparison of previous works with present analyses (Table 5) shows that the relative position of populations changes considerably depending on sampling size and measurer. With differentiation of sampling, Moula XIV–XV (Table 1) value is 100.53 for 15 individuals and 93 for 40 individuals. Within the same sample, Manie average of SDQ values increases from 99.84 to 106.55, Vaufrey average decreases from 104 to 100, Lazaret average decreases from 107.9 to 98.03 and Gaudry decreases from 113.9 to 107.12. The unavailability of previous data does not allow the significance of the difference to be tested using ANOVA. Nevertheless, these differences involve problems for stratigraphic interpretations.

In a second part of our analyses, we attempt to verify if a statistical relationship clearly exists between the decrease in SDQ values and time, using regression techniques. Classically, the decrease in SDQ values in time is used by several authors

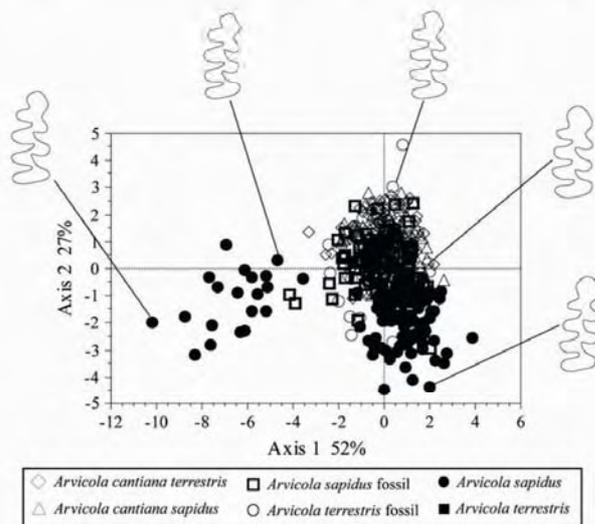


Fig. 5. Discriminant analysis between current and fossil species of *Arvicola* for form.

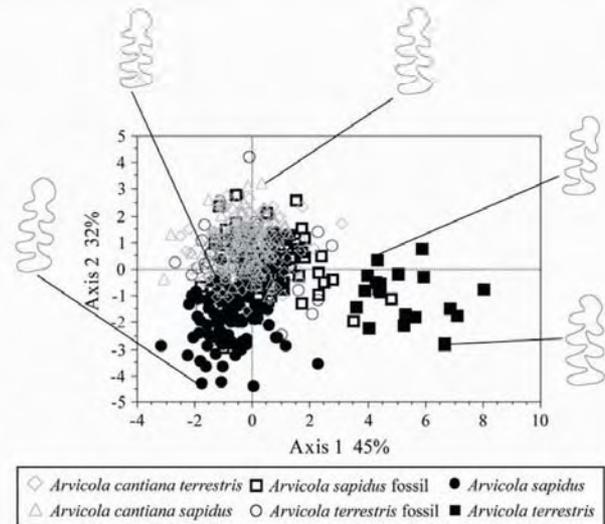


Fig. 6. Discriminant analysis between current and fossil species of *Arvicola* for shape.

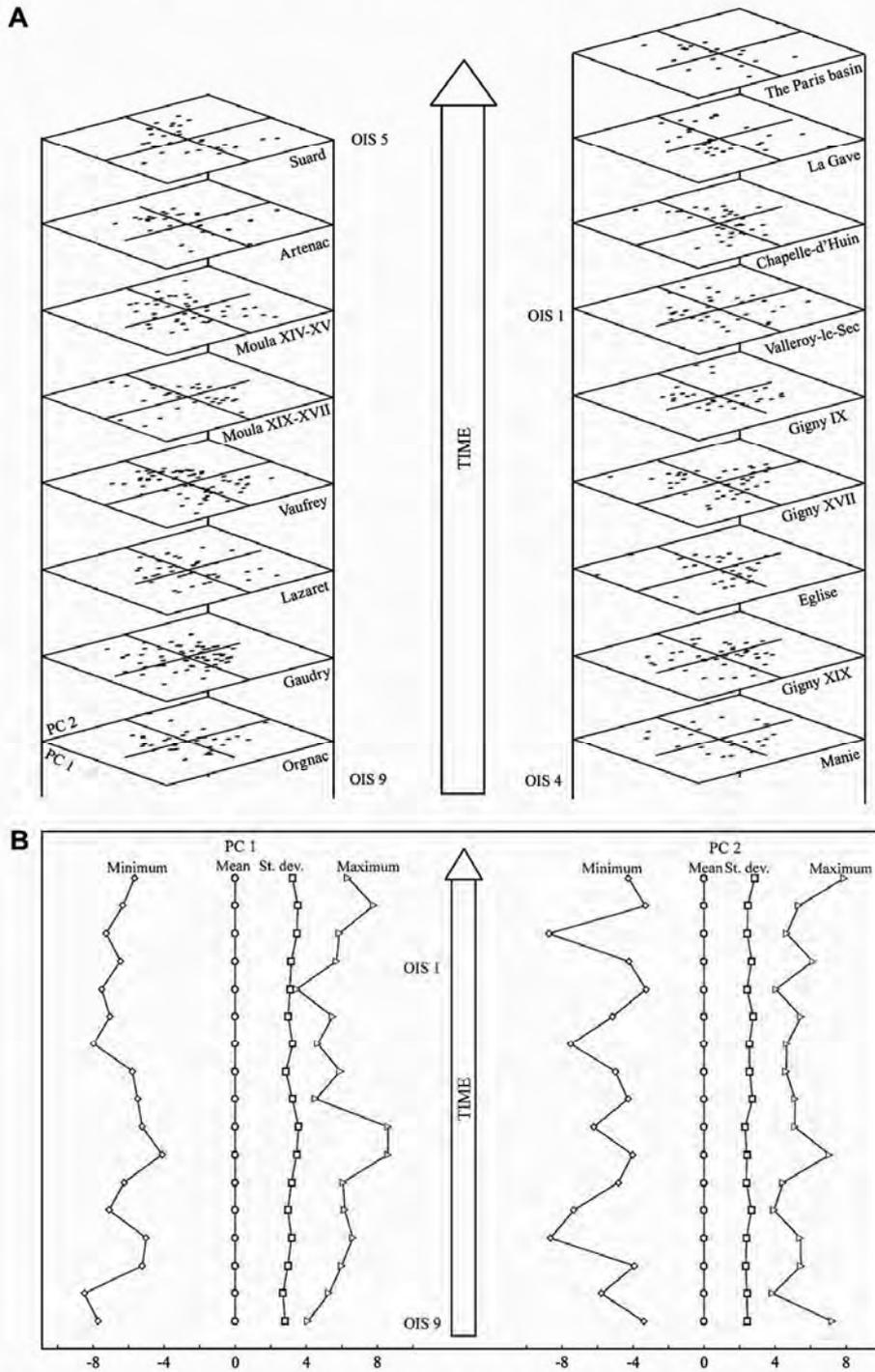


Fig. 7. Visualisation of population morphospaces of *Arvicola* during the time for form with principal component analysis (PCA), St. dev.: standard deviation.

(Abbassi and Desclaux, 1996; Abbassi et al., 1998; Desclaux et al., 2000; Heinrich, 1978, 1982, 1987, 1990; Kolfshoten van, 1990, 1992) to construct a biochronological framework, but this observation has never been statistically tested. Fig. 9

is a scatter diagram of the results of SDQ calculation for 547 individuals in extant and fossil fauna, and the Oxygen Isotopic Stage (OIS 9–1). The relationship between SDQ values and time is low. The correlation coefficient (R^2) reaches 0.165

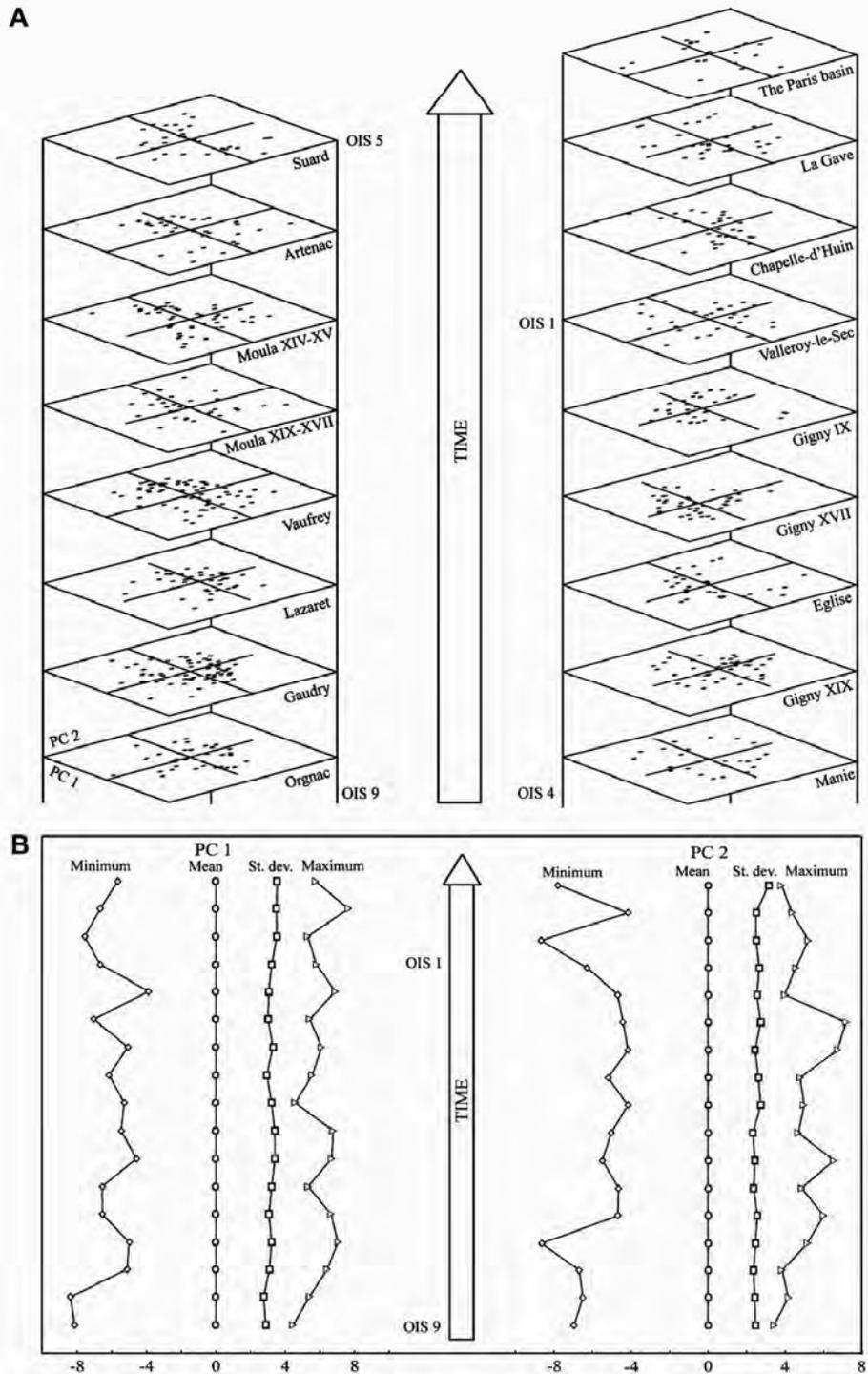


Fig. 8. Visualisation of population morphospaces of *Arvicola* during the time for shape with principal component analysis (PCA). St. dev.: standard deviation.

Table 5
Comparison of previous SDQ values with present study for each population according to different measurers and individual numbers

	Desclaux et al. (2000)			Escudé (present study)		
	N	Min–Max	Mean	N	Min–Max	Mean
Eglise	31	68.1–96.0	83.59	32	70.7–84.7	84.78
Gigny XIX	41	79.2–108.9	93.68	40	89.64–109.55	96.25
Gigny XXII	6	88.7–97.3	94.19	40	87.33–103.83	94.34
Manie	25	81.8–119.1	99.84	22	86.9–122.5	106.55
Suard	32	79.5–103.2	91.59	32	67–99	89.1
Artenac	14	80.5–110.8	93.85	37	81–111	93.73
Moula	15	81.8–114.3	100.53	40	73–117	93
XIV–XV						
Moula	31	74.5–106.1	87.41	30	76.24–122.56	87.9
XIX–XVIII						
Vaufrey	31	87.3–131	104	37	80.7–127.6	100.1
Lazaret	47	90.5–127.2	107.9	40	66.26–109.65	98.03
Gaudry	64	98–138.7	113.9	63	96–118	107.12

($p < 0.0001$). Only 40% of the variation of SDQ values can be explained by time. Thus, although the regression is significant, there is a high error risk in estimating the relative stratigraphic position of near populations.

4. Discussion

Our study suggests that perhaps only one species of *Arvicola*, *A. cantiana*, was present during the Pleistocene. This species shows great phenotypic variability in which it is difficult to show trends or patterns in morphospace. Therefore indications of glacial or interglacial periods and migration waves (Desclaux et al., 2000; Kolfshoten van, 1990, 1992) are not obvious.

It is necessary to remember that, in previous works, SDQ calculation has led to the description of subspecies, morphotypes and migration waves. SDQ also has been used in the construction of a biochronological framework based on *Arvicola* in the Quaternary. Nevertheless, some works show that the great variation in SDQ values can induce problems for specific determinations and biochronological interpretations. Kratochvil (1980, 1981) and Röttger (1986, 1987) showed that interpretations of SDQ values are more complex because of a chronomorphocline, and also geographical, climatological and altitudinal clines. Röttger (1986) established that there is a great variation in the enamel quotient related to the distribution of *Arvicola* species in Europe and the Middle East.

Table 6
SDQ values variability with different step of artificial wear

	<i>A. terrestris</i>	<i>A. terrestris</i>	<i>A. terrestris</i>	<i>A. sapidus</i>	<i>A. sapidus</i>
Step 1	85.42	78.33	87.07	89.27	75.84
Step 2	84.62	74.39	86.93	89.17	82.00
Step 3	76.14	82.70	88.39	81.07	76.81
Step 4	67.44	75.71	82.00	85.37	76.72
Step 5	67.08	63.10	80.88	83.14	84.60
Step 6	74.68	73.94	84.59	88.24	79.98
Step 7	77.89	80.97	81.57	78.82	74.79

Table 7
SDQ values variability along tooth crown (thin-slides)

	Young individual		Adult individual		
	<i>A. terrestris</i>	<i>A. sapidus</i>	<i>A. terrestris</i>	<i>A. sapidus</i>	<i>A. sapidus</i>
Thin-slide 1	100	100	98.17	112	123.6
Thin-slide 2	101.18	102.60	81.13	120.15	93.95
Thin-slide 3	92.04	100.66	85.37	110.93	112.72

Western European populations show *Arvicola* enamel differentiation ($75.5 < \text{SDQ m1} < 120.8$). Eastern populations have a *Mimomys* enamel quotient (e.g. Turkey, SDQ m1 = 124.6, and Iran, SDQ m1 = 134.4). Kratochvil (1981) demonstrated that the enamel quotient of living water vole populations generally increases with altitude, which is why *Arvicola* populations in Switzerland (Vaud Canton, for example, 1160 m above sea level) have an *A. cantiana* SDQ value. Kratochvil (1980) noted that enamel quotient generally decreases with the age of the animals concerned. However, if young specimens are discounted, no essential difference is found between SDQ values in adults and old specimens. At the first stage of tooth wear, the pattern is undifferentiated (SDQ is close to 100).

Thus, our results induce a discussion of the validity and variability of the “enamel quotient” method and values and remarks on the reliability of a biochronological framework based on *Arvicola*.

The reduction in the number of subspecies and morphotype defined is linked to methodological choice. The outline analysis method and multivariate analyses take into account the enamel contour of the occlusal surface; they position the object in a morphospace to n -dimensions and give an overall view of size and shape. In contrast, SDQ calculation, m1 length measurement and univariate analysis focus on one feature of m1. The multiplication of subspecies and morphotype is induced by the method itself and the great variability of SDQ values. The great measurement error of enamel band thickness and the great variability of SDQ calculation result from a problem of protocol. The enamel thickness values

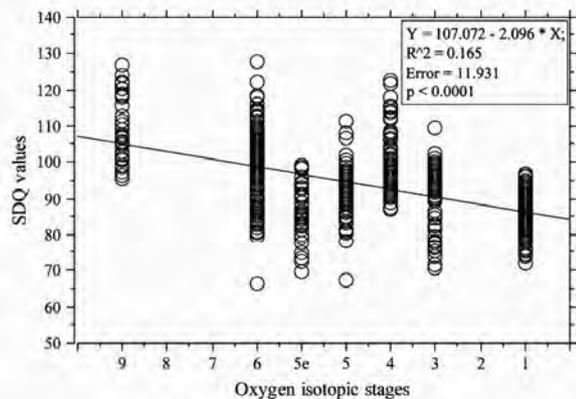


Fig. 9. Scatter diagram of SDQ values and the time (OIS).

are included between about 24 and 150 μm , consequently the acquisition of measurements requires great precision which may be affected by choice of landmarks. The enamel bands are rarely parallel along the same edge and the landmarks defined in the middle of the enamel wall reduce the precision of standardisation. Thus, the repeatability of measurements is less accurate and induces great variability in values between several measurers and between different measurement series of SDQ values. To work with the mean causes problems for biozonation definition, since the mean is a central point which requires consideration of dispersion (variance), and where values depend greatly on sample size and sample range. In this way, because of the great variability of SDQ values, the dispersion around the mean and the overlap of dispersion between each population, the arbitrary limitations of specific determination and biozonation are perhaps defined with too much precision. Another bias may be taphonomic effects such as abrasion by predator digestion (Andrews, 1991) leading to poor conservation and an “artificial” reduction in enamel thickness. These facts involve a loss of information and strongly distort SDQ calculation inducing the great variability of SDQ values. SDQ values show great variability within m1 and a given individual. The variability between salient angles and along tooth crowns with wear can be explained by chewing which is peculiar to each individual and is not a mechanical movement. Thus, irregular movements give different pressure points of wear. This fact explains the variability of SDQ calculation between the right and left side of a given individual. The variability along tooth crowns without wear has no trend in young individuals and in adult individuals whereas a decrease was supposed by Kratochvil (1980). This fact can be explained by irregularity of tooth growth.

In short, the variability in SDQ values involves considerable error in interpretation and is very important to assess the error risk incurred before specific determinations and stratigraphic interpretation.

The variation of SDQ values depends somewhat on time because of the low correlation between the decrease in SDQ values and the oxygen isotopic stages. The risk of a mistake in the relative stratigraphic positioning of a population is major (60%). In the morphological variability of *Arvicola*, there is no trend over time and no particular pattern with glacial and interglacial periods and geography. The chronomorphocline, and geographical, climatological and altitudinal clines and the migration wave of the northern form corresponding to SDQ values of *A. terrestris* ssp. B (Moula XIX–XVII) (Abbassi et al., 1998; Desclaux et al., 2000; Kolfshoten van, 1990, 1992) are not displayed. For archaeological records in a fluvial context, the *Arvicola* lifestyle must be taken into account as the water vole digs tunnels in banks. Thus, *Arvicola* populations may be more recent than the archaeological levels where they have been found. This fact can explain cases where the SDQ values disagree with radiometric data. Consequently, it seems foolhardy to consider SDQ as a robust tool for dating and correlating archaeological records.

5. Conclusions

The present morphometric analyses suggest that a single species with great variability, *A. cantiana*, existed during the late Middle Pleistocene and the Upper Pleistocene.

The considerable difference between measurers, the complex interpretations of values, the high bias of measurement and calculation and also the error risk incurred throw doubt on the reliability of SDQ for specific determinations and stratigraphy.

To conclude, in terms of SDQ calculation and morphodiversity, *Arvicola* is not a useful tool for the construction of a biochronological framework. Taking into account the great phenotypic plasticity of m1, it seems difficult to apply biochronology methods within a rodent genus. It would be preferable to work with biozonation boundaries (FAD and LAD) between genera (e.g. *Mimomys/Arvicola* boundary).

Acknowledgements

This article is a contribution of the Institut de Paléontologie Humaine (CNRS UMR 6569) and Biogéosciences & EPHE, Ecole Pratique des Hautes Etudes (CNRS UMR 5561).

We wish to thank Alain Festeau and Dominique Champagnac for the establishment of the artificial wear protocol, Pascal Taubaty for thin-slides, Carmela Chateau for English corrections and François-Xavier Flotterer for discussions. We also thank two anonymous reviewers for their helpful remarks.

References

- Abbassi, M., Desclaux, E., 1996. *Arvicola* Lacépède, 1799 (Rodentia, Mammalia) de quatre séquences du Sud-Est de la France et de Ligurie datant de la fin du Pléistocène moyen et du début du Pléistocène supérieur. Quaternaire 8 (1), 29–37.
- Abbassi, M., Desclaux, E., Marquet, J.-C., Chaline, J., 1998. Répartition et évolution des *Arvicola* Lacépède, 1799 (Rodentia, Mammalia) au cours du Pléistocène moyen et supérieur en France et en Ligurie. Quaternaire 9 (2), 105–116.
- Agadjhanian, A.-K., 1977. Quartäre Kleinsäuger aus der Russischen Ebene. Quartär 27/28, 111–145 (Bonn).
- Agadjhanian, A.-K., 1983. Eine urtümliche *Arvicola* aus dem Mittelpleistozän der Russischen Ebene. Schriftenr. Geol. Wiss. 19/20, 9–29 (Berlin).
- Arroda, D., Giuggiola, O., Imperiale, G., Lamberti, A., Oxiola, M., Vicino, G., 1976. Le Manie. Il giacimento musteriano dell'Arma (Finale, Savona). Archeologia in Liguria, Scavi e scoperte 1967–75. Doc. Soprin. Archeol. Della Liguria, Genova, pp. 113–144.
- Andrews, P., 1991. Owls, Caves and Fossils Predation, Preservation and Accumulation of Mammals Bones in Caves, with an Analysis of the Pleistocene Caves Faunas from Westbury-sub-Mendip, Somerset. National History Museum Publications, London, U.K., pp. 231.
- Campy, M., 1982. Le Quaternaire franc-comtois, Essai chronologique et paléoclimatique. Doctorat d'état, Fac. Sc. et Tech. de Franche-Comté, pp. 575.
- Chaline, J., 1972. Les rongeurs du Pléistocène moyen et supérieur de France. Cahiers de Paléontologie. C.N.R.S., Paris, pp. 410.
- Chaline, J., Laurin, B., 1986. Phyletic gradualism in a European Pliocene *Mimomys* lineage (Arvicolidae, Rodentia). Paleobiology 12 (2), 203–216.
- Chaline, J., 1987. Arvicolid data (Arvicolinae, Rodentia) and evolutionary concepts. Evol. Biol. 21, 237–310.

- Chaline, J., Brochet, G., 1989. Les Rongeurs et leurs significations paléocologiques et paléoclimatiques. In: Campy, M., Chaline, J., Vuilleme, M. (Eds.), «La Baume de Gigny (Jura)» Gallia Préhistoire, 27ème suppl, pp. 97–110 (Paris).
- Combié, J., 1967. Le Paléolithique d'Ardèche dans son cadre paléoclimatique. Publ. Inst. Préhist. Bord. Mem. 4, 31–127.
- Combié, J., 1976. Gisement acheuléen d'Orgnac III. In: IXe congrès U.S.P.P. Nice. Livret guide de l'excursion A8, Paléolithique et Néolithique, pp. 212–226.
- Defleur, A., Cregut-Bonnouère, E., Desclaux, E., 1998. Première mise en évidence d'une séquence éémienne à restes humains dans le remplissage de la Baume Moula-Guercy (Soyons, Ardèche). C. R. Acad. Sci. Paris 326 (6), 453–458.
- Debenath, A., 1974. Recherches sur les terrains quaternaires charentais et les industries qui leur sont associées. Doctorat d'état, Univ Bordeaux I, pp. 678.
- Delagnes, A., Tournepiche, J.-F., Armand, D., Desclaux, E., Diot, M.-F., Ferrier, C., Le Fillâtre, V., Vandermeersch, B., 1999. Le gisement Pléistocène moyen et supérieur d'Artenac (Saint-Mary, Charente): premier bilan interdisciplinaire. Bull. Soc. Préhist. Fr. 4, 469–496.
- Delpech, F., 1988. Les grands mammifères, à l'exception des Ursidés. In: Rigaud, J.P. (Ed.), «La grotte Vaufray, paléoenvironnements, chronologie, activités humaines». Mémoire de la Société préhistorique Française, pp. 213–289.
- Desclaux, E., Abbassi, M., Marquet, J.-C., Chaline, J., Kolschoten van, T., 2000. Distribution and evolution of *Arvicola* Lapeyrolle, 1799 (Mammalia, Rodentia) in France and Liguria (Italy) during the Middle and the Upper Pleistocene. Acta Zool. Cracov. 43 (1–2), 107–125.
- Dommergues, C.-H., 2000. Développement d'une application Matlab d'analyse de contour par transformées de Fourier, TX 5x Travaux de laboratoire Biogéosciences. Université de Bourgogne, Dijon, pp. 13.
- Dommergues, C.-H., 2001. CDFT Complex Discret Fourier Transform (Matlab Package), Version 2.7. Biogéosciences-Dijon, UMR CNRS 5561, (Dijon).
- Fejfar, O., Heinrich, W.-D., 1983. Arvicoliden-Sukzession und Biostratigraphie des Oberpliozän und Quartärs in Europa. Schriftenr. Geol. Wiss. 19/20, 61–109.
- Fornasiero, O., 1989. Cronostratigrafia di due giacimenti Quaternari continentali a mammiferi della Liguria. Corso di Laurea in Scienze Geologiche. Univ. Degli Studi di Ferrara, pp. 119.
- Gonzalez, R.-C., Woods, R.-E., 1992. Digital Image Processing. Addison Wesley Longman, Inc, pp. 716.
- Heim de Balzac, H., Guislain, R., 1955. Evolution et spéciation des campagnols du genre *Arvicola* en territoire français. Mammalia 19 (3), 367–390.
- Heinrich, W.-D., 1978. Zur biometrischen Erfassung eines Evolutionstrends bei *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) aus dem Pleistozän Thüringens. Säugetierkd. Inform. 2/3, 3–21.
- Heinrich, W.-D., 1982. Zur Evolution und Biostratigraphie von *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) im Pleistozän Europas. Z. Geol. Wiss. 10, 683–735.
- Heinrich, W.-D., 1987. Neue Ergebnisse zur evolution und Biostratigraphie von *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) in Quartärs Europas. Z. Geol. Wiss. 15, 389–406.
- Heinrich, W.-D., 1990. Some aspects of evolution and biostratigraphy of *Arvicola* (Mammalia, Rodentia) in the central European Pleistocene. In: International Symposium on Evolution Phylogeny and Biostratigraphy of Arvicolidids, pp. 165–182.
- Hinton, M.A.C., 1926. Monograph of Voles and Lemmings (Microtinae) Living and Extinct, vol. 1. British Museum (Natural History), London.
- Janossy, D., 1969. Stratigraphische Auswertung der europäischen mittelpleistozänen Wirbeltierfaunen. Ber. Dtsch. Ges. Geol. Wiss. A 14 (Teil 1: Heft 4), 367–438. Teil 2: Heft 5, 573–643.
- Koenigswald von, W., 1970. Mittelpleistozäne Kleinsäugerfauna aus der Spaltenfüllung Petersbuch bei Eichstätt. Mitt. Bayer. Staatssamm. Paläontol. Hist. Geol. 10, 407–432.
- Koenigswald von, W., 1973. Veränderungen in der Kleinsäugerfauna von Mitteleuropa zwischen Cromer und Eem (Pleistozän). Eiszeitalt. Ggw 23/24, 159–167.
- Koenigswald von, W., 1980. Schmelzstruktur und Morphologie in dem molaren der Arvicoliden (Rodentia). Abh. Senckenb. Natforsch. Ges. 59 (1), 1–94.
- Koenigswald von, W., 1994. Functional symmetries in the schmelzmuster and morphology of rootless rodent molars. Zool. J. Linn. Soc. 110, 141–179.
- Koenigswald von, W., Kolschoten van, T., 1996. The *Mimomys*–*Arvicola* boundary and the enamel thickness quotient (SDQ) of *Arvicola* as stratigraphic markers in the Middle Pleistocene. In: The Early Middle Pleistocene in Europe, Balkema, pp. 211–238.
- Kolschoten van, T., 1990. The evolution of mammal fauna in the Netherlands and the middle Rhine area (Western Germany) during the late middle Pleistocene. Meded. Rijks Geol. Dienst. 43 (3), 42–74.
- Kolschoten van, T., 1992. Aspect of the migration of mammals to north-western Europe during the Pleistocene, in particular the reimmigration of *Arvicola terrestris*. Cour. Forschungsinst. Senckenb. 153, 213–220.
- Kratochvil, J., 1980. Zur Phylogenie und Ontogenie bei *Arvicola terrestris* (Rodentia, Arvicola). Folia Zool. 29, 209–224.
- Kratochvil, J., 1981. *Arvicola cantiana* vit-elle encore? Folia Zool. 30, 289–300.
- Kretzoi, M., 1969. Skizze einer Arvicoliden-Phylogenie, Stand, 1969. Vertebr. Hung. 11, 155–193.
- Kuhl, F.-P., Giardina, C.-R., 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. Comput. Graph. Image Process. 18, 236–258.
- Laville, H., Prat, F., Thibault, C., 1973. Un gisement à faune du Pléistocène moyen: la grotte de l'Eglise à Cénac et Saint-Julien (Dordogne). Quaternaria XIV, 71–119.
- Laville, H., 1973. Climatologie et chronologie du Paléolithique en Périgord. Etude sédimentologique des dépôts en grottes et en abris. Doctorat d'état, Univ Bordeaux I, pp. 716.
- Lecoindre, G., Le Guyader, H., 2003. Classification phylogénétique du vivant, 2e éd. Belin, pp. 543.
- Lestrel, P.E., 1997. Fourier Descriptors and their Applications in Biology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Le Louarn, H., Quéré, J.-P., 2003. Les rongeurs de France. Faunistique et biologie. revue et augmentée, 2e éd. INRA édition, Paris, pp. 256.
- Lumley de, H., 1989. Le Paléolithique inférieur et moyen du Midi Méditerranéen dans son cadre géologique. Vème suppl. à Galia Préhistoire. 2t, 896.
- Marquet, J.-C., 1989. Paléoenvironnements et chronologie des sites du domaine atlantique français d'âge Pléistocène moyen et supérieur d'après l'étude des rongeurs. Doctorat d'état, Univ. Bourgogne, pp. 637.
- Navarro, N., Zatarian, X., Montuire, S., 2004. Effects of morphometric descriptor changes on statistical classification and morphospaces. Biol. J. Linn. Soc. 83, 243–260.
- Radulesco, C., Samson, P., 1977. *Arvicola* (Rodentia, Mammalia) dans le Pléistocène moyen de Roumanie. Trav. Inst. Spéol. «Emilie Racovita» 16, 151–162.
- Rabeder, G., 1981. Die Arvicoliden (Rodentia, Mammalia) aus dem Pliozän und dem älteren Pleistozän von Niederösterreich. Beitr. Paläontol. Österreich 8 (1), 343.
- Renaud, S., 1997. Modalité de l'évolution morphologique: analyse morphométrique d'une spécialisation dentaire chez les Murinés, la stephanodontie. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II.
- Rigaud, J.P., 1988. La grotte Vaufray à Cénac et Saint-Julien (Dordogne): Paléoenvironnement, chronologie et activités humaines. Mém. Soc. Préhist. Fr. 19, 616.
- Roebroeks, W., Kolschoten van, T., 1994. The earliest occupation of Europe: a short chronology. Antiquity 68, 489–503.
- Rohlf, F.J., Marcus, L.F., 1993. A revolution in morphometrics. Tree 8 (4), 129–132.
- Röttger, U., 1986. Schmelzbandbreiten an Molaren der Gattung "*Arvicola*" Lacépède, 1799. Med. Dissertation 121.

- Röttger, U., 1987. Schmelzbandbreiten an Molaren von Spermäusen (*Arvicola* Lacépède, 1799). *Bonn. Zool. Beitr.* 38 (2), 95–105.
- Schmittbuhl, M., Allenbach, B., Schaaf, A., Viriot, L., 1997. Méthodes de Fourier elliptique appliqués à la quantification de la forme de contours complexes. *Biom. Hum. Anthropol.* 15, 233–241.
- Shenbrot, G., Krasnov, B., 2005. An Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Pensoft Publishers, Sofia, pp. 336.
- Statsoft, Statistica® Version 7.1.
- Viriot, L., 1994. Tendances évolutives des molaires chez les Arvicolidés (Rodentia, Mammalia). Université de Bourgogne, Centre des Sciences de la Terre, Dijon, pp. 160.
- Wilson, D., Reeder, D., 2005. *Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference*, third ed., Washington and London, pp. 1207.
- Wust-Saucy, A.-G., 1998. Polymorphisme génétique et phylogéographie du Campagnol terrestre *Arvicola terrestris*. Diss. thesis, Université de Lausanne, pp. 162.

Annexe 2 : New insight into the colonization processes of common voles: Inferences from molecular and fossil evidence

OPEN ACCESS Freely available online



New Insight into the Colonization Processes of Common Voles: Inferences from Molecular and Fossil Evidence

Christelle Tougard^{1†*}, Elodie Renvoisé¹, Amélie Petitjean¹, Jean-Pierre Quéré²

1 UMR CNRS/uB 5561 Biogéosciences-Dijon, Université de Bourgogne, Dijon, France, **2** UMR 1062, INRA, Centre Biologie et Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, Montpellier/Lez, France

Abstract

Elucidating the colonization processes associated with Quaternary climatic cycles is important in order to understand the distribution of biodiversity and the evolutionary potential of temperate plant and animal species. In Europe, general evolutionary scenarios have been defined from genetic evidence. Recently, these scenarios have been challenged with genetic as well as fossil data. The origins of the modern distributions of most temperate plant and animal species could predate the Last Glacial Maximum. The glacial survival of such populations may have occurred in either southern (Mediterranean regions) and/or northern (Carpathians) refugia. Here, a phylogeographic analysis of a widespread European small mammal (*Microtus arvalis*) is conducted with a multidisciplinary approach. Genetic, fossil and ecological traits are used to assess the evolutionary history of this vole. Regardless of whether the European distribution of the five previously identified evolutionary lineages is corroborated, this combined analysis brings to light several colonization processes of *M. arvalis*. The species' dispersal was relatively gradual with glacial survival in small favourable habitats in Western Europe (from Germany to Spain) while in the rest of Europe, because of periglacial conditions, dispersal was less regular with bottleneck events followed by postglacial expansions. Our study demonstrates that the evolutionary history of European temperate small mammals is indeed much more complex than previously suggested. Species can experience heterogeneous evolutionary histories over their geographic range. Multidisciplinary approaches should therefore be preferentially chosen in prospective studies, the better to understand the impact of climatic change on past and present biodiversity.

Citation: Tougard C, Renvoisé E, Petitjean A, Quéré J-P (2008) New Insight into the Colonization Processes of Common Voles: Inferences from Molecular and Fossil Evidence. PLoS ONE 3(10): e3532. doi:10.1371/journal.pone.0003532

Editor: Michael Hofreiter, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Germany

Received: June 9, 2008; **Accepted:** October 1, 2008; **Published:** October 29, 2008

Copyright: © 2008 Tougard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: CNRS (French Government) provided financial support for the experiment realization. The funder has no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Christelle.Tougard@univ-montp2.fr

† Current address: Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, UMR 5554 CNRS/um2, Université Montpellier II, Montpellier, France

Introduction

Since the birth of phylogeography 20 years ago [1], a large number of molecular studies have investigated the influence of Quaternary climatic changes on the distribution and evolution of modern fauna and flora [2–7]. In Europe, a number of general evolutionary scenarios have been identified for certain species of temperate plants and animals: (i) the postglacial colonization of northern regions from Mediterranean refugia (Iberia and Balkans/Greece); (ii) the isolation of Italian populations due to the Alpine barrier; and (iii) the occurrence of four main suture-zones where populations from different refugia meet [3–5]. Several studies based on molecular and/or fossil data have challenged the universality of postglacial colonization from southern glacial refugia for a wide range of European temperate species [8–17]. Distinctive mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes indicate that Mediterranean regions were hospitable to some small mammals, insects and plants [8,13,18]. These regions may therefore have been a “hot spot” of endemism rather than a major source area for postglacial colonization [8]. Colonization may have occurred from cryptic northern glacial refugia, in for example Central Europe and Western Asia [7,8,11,15–17,19–22]. The northerly survival of species could thus be related to biogeographic traits (past and

present-day geographic distribution, habitat preference, body size, mobility, generation time) [17]. Although the genetic divergence between the lineages of most European temperate species often predates the Last Glacial Maximum (LGM; 0.023–0.015 Myr), intraspecific phylogeographic reconstructions are generally explained as a relic of the LGM [3,23]. The lack of phylogeographic patterns in European temperate mammals before the LGM could result from the erosion of the phylogeographic structure by population migration and mixing between the penultimate glacial period (0.300–0.130 Myr) and the LGM [23]. But what happened between the first appearance of European temperate species and the LGM?

The common vole (*Microtus arvalis*) is a small European rodent often considered a pest, although as with most Arvicolinae, it is a good species model for the study of evolutionary questions. This is because of its short generation time, good fossil record, well-known ecology and fast mtDNA substitution rates [24–28]. This vole has been present in the fossil record since the Late Cromerian (0.500–0.450 Myr) [29,30]. It is currently widespread in Europe with a continuous distribution from the Atlantic coast of France to central Siberia, ranging in altitude from sea level to 3000 m in the Alps (Figure 1A) [25,31]. Its range is limited by a double climatic barrier to the north by mean July temperatures <+16°C, and to

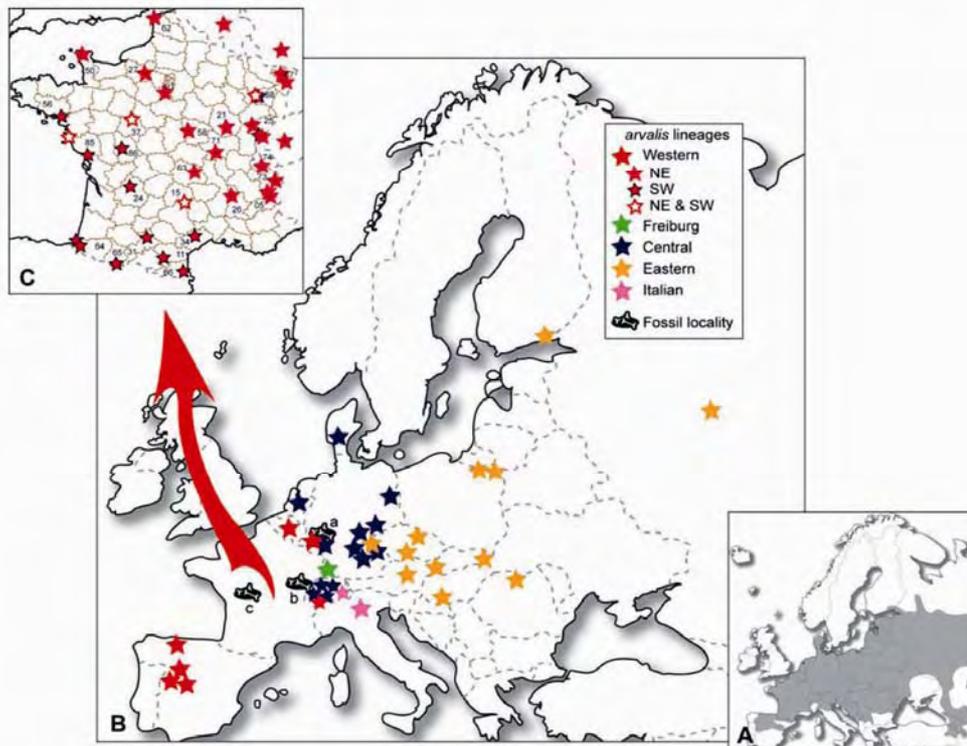


Figure 1. Geographic distribution of *Microtus arvalis* populations and fossil localities. The shaded zone (A) corresponds to the distribution range of the common vole [25,31]. European (B) and French (C) populations are listed in Table S1. Fossil localities studied are: (a) Miesenheim I, Germany [29]; (b) la Baume de Gigny, France (Gigny, Jura) [49]; (c) le Taillis des Coteaux, France (Antigny, Vienne) [52]. Numbers are French zip codes. doi:10.1371/journal.pone.0003532.g001

the south by arid environments [32]. This vole builds tunnel systems connected by surface runways, and lives in open field areas (*i.e.* cultivated fields, temporary alfalfa and clover meadows and mountain grassland) [25]. The phylogeography of the common vole has previously been investigated from mtDNA control region (CR) and cytochrome *b* gene (*cytb*) sequences and microsatellites [6,33,34]. This rodent displays a clear phylogeographic structure with five evolutionary lineages identified over its range: Western (W), Eastern (E), Central (C), Freiburg (F) and Italian (I) lineages. Haynes *et al.* [6] agree with the general evolutionary scenarios of colonization (*e.g.* spread from different southern LGM refugia), whereas Fink *et al.* [33] and Heckel *et al.* [34] see things somewhat differently. For them, genetic diversity through Europe suggests glacial survival of the common vole outside the classical refugia and a potentially more ancient colonization (pre-LGM) from the northeast to the southwest of Europe. Nevertheless, neither the exact location of the *M. arvalis* lineage origin, nor the position of glacial refugia, or even the date of the colonization onset have yet been established. Fossil data have perhaps not yet been accorded the place they deserve.

The importance of combining molecular and fossil data to obtain more reliable interpretations of the spatio-temporal colonization processes has recently been underlined for other species [13,17,35–38]. Here, we consider the crucial parameters necessary for a complete description and understanding of such processes for the common vole. First and foremost, the molecular sample size was increased in order to try and improve the tree topology and

robustness. This would allow clarification of the hypothetical implications of European southern and/or cryptic northern refugia in postglacial colonization. Mandible and tooth remains are commonly found in European palaeontological and archaeological sites [30] and this considerable fossil record was put to good account. Peculiar care was taken over the choice of fossil sites to avoid possible controversy about species determination (*M. arvalis* vs *M. agrestis*). Biogeographic traits (past and present-day geographic distribution, habitat preference and life-history traits) were also integrated in this multidisciplinary approach. In the present analysis, both fossil and biogeographic informations are considered in a qualitative manner to support hypothetical colonization processes.

Results

Phylogenetic and phylogeographic analyses

The phylogeographic structure of the common vole in Europe was investigated from *cytb* (1044 bp) and CR (304 bp) fragments (Figures 1B–1C and Tables S1, S2). These fragments were not concatenated for phylogenetic reconstructions because they concern different specimens. Instead, the CR dataset (French populations) was analyzed mainly for correlation with the *cytb* dataset (European populations) on the genetic structure of the lineages potentially involved in postglacial colonization. The *cytb* sequences specified 209 variable sites defining 116 haplotypes (Table S3), and 113 of these polymorphic sites were phylogenetically informative (CR = 141 variable and 105 informative sites).

Phylogenetic analyses using the maximum-likelihood method (ML) and Bayesian approach (BA) provided congruent tree topologies for both cytb and CR dataset (Figure 2 and Figure S1). The cytb topology reflected the geographic origin of the specimens, and the five main evolutionary lineages of Fink *et al.* [33] and Heckel *et al.* [34] were found: W (France, Germany, Switzerland, Belgium, Spain), F (Germany), I (Switzerland, Italy), E (Germany, Austria, Hungary, Slovakia, Czech Republic, Poland, Ukraine, Russia, Finland) and C (France, Germany, Switzerland, Netherlands, Denmark). A high consistency was

observed for the C, E, and I lineages with previously published analyses, whereas the W and F lineages seemed more closely related. However, the WF cluster and the W lineage were the least supported clades, with ML bootstrap percentages (BP) lower than 50%, and BA posterior probabilities (PP) between 0.50 and 0.80. Alternative hypotheses were investigated using the Shimodaira & Hasegawa test [39]. Over the 105 possible tree topologies among the five lineages, 34 trees were not significantly worse than the highest likelihood tree at the 5% confidence level ($0.46 < P < 1$; Table S4). The best ML tree placed the C lineage as the first

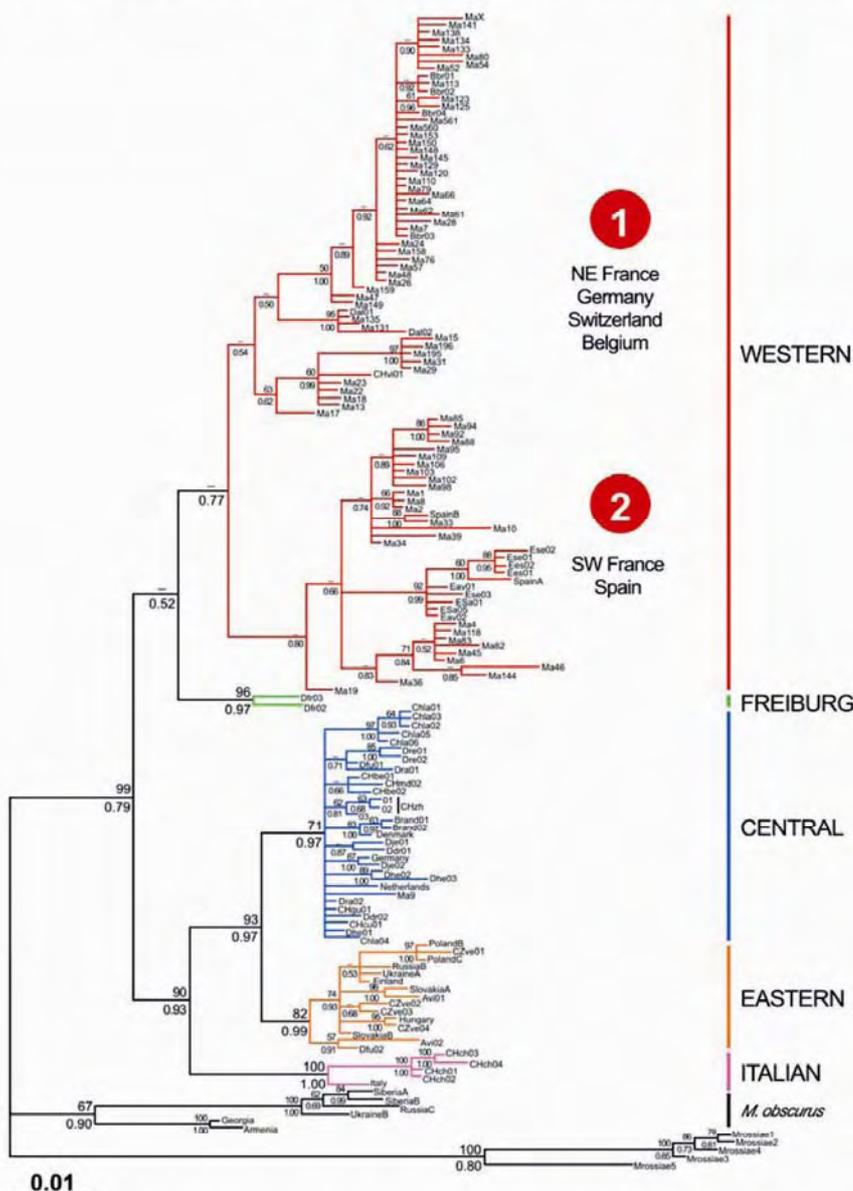


Figure 2. Bayesian tree reconstructed from cytochrome *b* gene sequences of *Microtus arvalis*. Individual labels are detailed in Table S1. The numbers at nodes refer to ML bootstrap percentages (above branches) and BA posterior probabilities (below branches). The five main evolutionary lineages as previously mentioned [34] are indicated on the right. doi:10.1371/journal.pone.0003532.g002

ramification of the *M. arvalis* lineages, and the I and E lineages as the sister groups of the WF and WFI clusters, respectively. As such, it differed from the tree shown in Figure 2 ($P=0.976$) and previously published trees ($P=0.993$) [33,34]. These topology differences can be explained by the low number of sequences clustered in the F and I lineages (respectively, 2 and 5). Phylogenetic analyses displayed a substructure within the W lineage (cytb: $BP<50\%$; $0.54<PP<0.80$; CR: $81\%<BP<85\%$; $PP=0.87$): (i) a northeastern (NE) group with specimens from NE France, Belgium, Germany and Switzerland; and (ii) a southwestern (SW) group with specimens from SW France and Spain. The Spanish common voles formed a monophyletic clade (92% BP, and 0.99 PP) that appeared to be the last offshoot of the SW group. This hierarchical phylogeographic structure of the W lineage had partly been revealed in previously published analyses with a smaller dataset [33,34]. Conversely, the C and E lineages had cytb star-like topologies (Figure 2).

Nucleotide and haplotype diversities, as well as total and net DNA divergences were calculated for each lineage (Table 1). The W lineage had the highest nucleotide diversity (1.31%), while the I lineage had the lowest (0.49%). Nucleotide diversity for the other lineages was between 0.53% and 0.62%. The haplotype diversity was relatively high and homogeneous, from 0.90 (Italian) to 1 (Freiburg). Total and net DNA divergences between lineages were estimated at 1.44–3.18% and 0.86–2.40%, respectively. The I lineage showed the highest value. The nucleotide diversity and net DNA divergence were in agreement with previously published analyses [6,33]. Demographic histories were inferred by a pairwise mismatch distribution analysis [40] (Figure 3). This analysis, when applied to the whole dataset, showed a heterogeneous distribution suggesting long-term stability. As pooling differentiated samples may induce bias, the mismatch distribution analyses were also performed for the W, C and E lineages separately. The W lineage presented a heterogeneous distribution; the C and E lineages had a bell-shaped distribution, suggesting a sudden expansion of these populations. As for alternative topology hypotheses, there were too few samples available for the F and I lineages (respectively, 2 and 5) to obtain reliable results.

Divergence time estimates within and among *M. arvalis* lineages

As a consequence of the mismatch distribution analysis for the whole dataset, divergence dates of the main clades (Figure 4) were

calculated under a Bayesian relaxed-clock method assuming constant population size. With the first occurrence of *M. arvalis* at 0.475 ± 0.025 Myr (Miesenheim I, Germany) [29,30], the mutation rate was estimated at 4.8 substitutions/site/Myr. The W lineage showed the oldest divergence time (0.317 Myr; 95% confidence 0.199–0.440 Myr), while the F lineage showed the most recent one (0.075 Myr; 95% confidence 0.012–0.163 Myr). However, this latter result should be considered with caution because the tree topology was not in agreement with such a recent divergence time. The two F sequences are probably insufficient for inferring reliable time estimates. As for the Spanish clade (data not shown), the most recent common ancestor was 0.086 Myr old (95% confidence 0.037–0.144 Myr).

The 95% confidence ranges of divergence time estimates are wide, making it difficult to correlate formation events of *M. arvalis* lineages to Quaternary climatic events. However, Bayesian posterior probability densities (data not shown) of these estimates are unimodal, indicating that mean estimates should provide a reasonable basis for inferences about the evolutionary history of *M. arvalis* [41].

The divergence time estimates among the five evolutionary lineages of *M. arvalis* covered several glacial and interglacial periods in the Middle and Late Pleistocene. This pattern is congruent with a pre-LGM origin, split and evolution of the lineages, although some previously published divergence times are much younger than the present molecular dating [33,34]. Each of our estimates corresponds to warm or pre- and postglacial periods (Figure 4).

Discussion

The phylogeographic history of the common vole is characterized by a deep genetic differentiation of the five main evolutionary lineages (Western, Freiburg, Central, Eastern and Italian; Figures 2 and 4). Similarities with phylogeographic patterns of *M. arvalis* data from several genetic markers (cytb, CR, microsatellites) [33,34], as well as data from other temperate species [3,13,42–45] suggest that the distribution of populations between Western and Eastern Europe reflects the evolutionary history of populations rather than genetic marker genealogy. Molecular dating indicates that the population divergence, from the lineage origin to the origin of the Spanish clade of *M. arvalis*, occurred during the Middle and Late Pleistocene (0.475–0.086 Myr), and thus predated the LGM widely. These molecular dating results coincide

Table 1. Genetic variability within and between *Microtus arvalis* lineages based on cytochrome *b* gene sequences.

Da ^a	Western		Eastern	Central	Freiburg	Italian	π^c	h^d
Dxy ^b	<i>NE</i>	<i>SW</i>						
Western	-	1.76 (0.12)	1.71 (0.08)	0.92 (0.23)	2.28 (0.25)	1.31 (0.05)	0.98	
NE	-	<i>0.90 (0.1)^e</i>					<i>0.76 (0.08)</i>	<i>0.96</i>
SW	<i>1.80 (0.009)</i>	-					<i>1.02 (0.07)</i>	<i>0.99</i>
Eastern	2.72 (0.11) ^f	-	0.86 (0.11)	1.58 (0.50)	2.01 (0.42)	0.62 (0.09)	0.98	
Central	2.66 (0.08)	1.44 (0.11)	-	1.42 (0.34)	2.16 (0.31)	0.53 (0.05)	0.99	
Freiburg	1.87 (0.18)	2.18 (0.48)	1.99 (0.30)	-	2.40 (1.08)	0.58 (0.29)	1	
Italian	3.18 (0.22)	2.57 (0.40)	2.65 (0.29)	2.93 (1.07)	-	0.49 (0.21)	0.90	

^aNet and ^btotal DNA divergences.

^cNucleotide and ^dhaplotype diversities.

^eNE and SW values are in italics.

^fStandard error.

doi:10.1371/journal.pone.0003532.t001

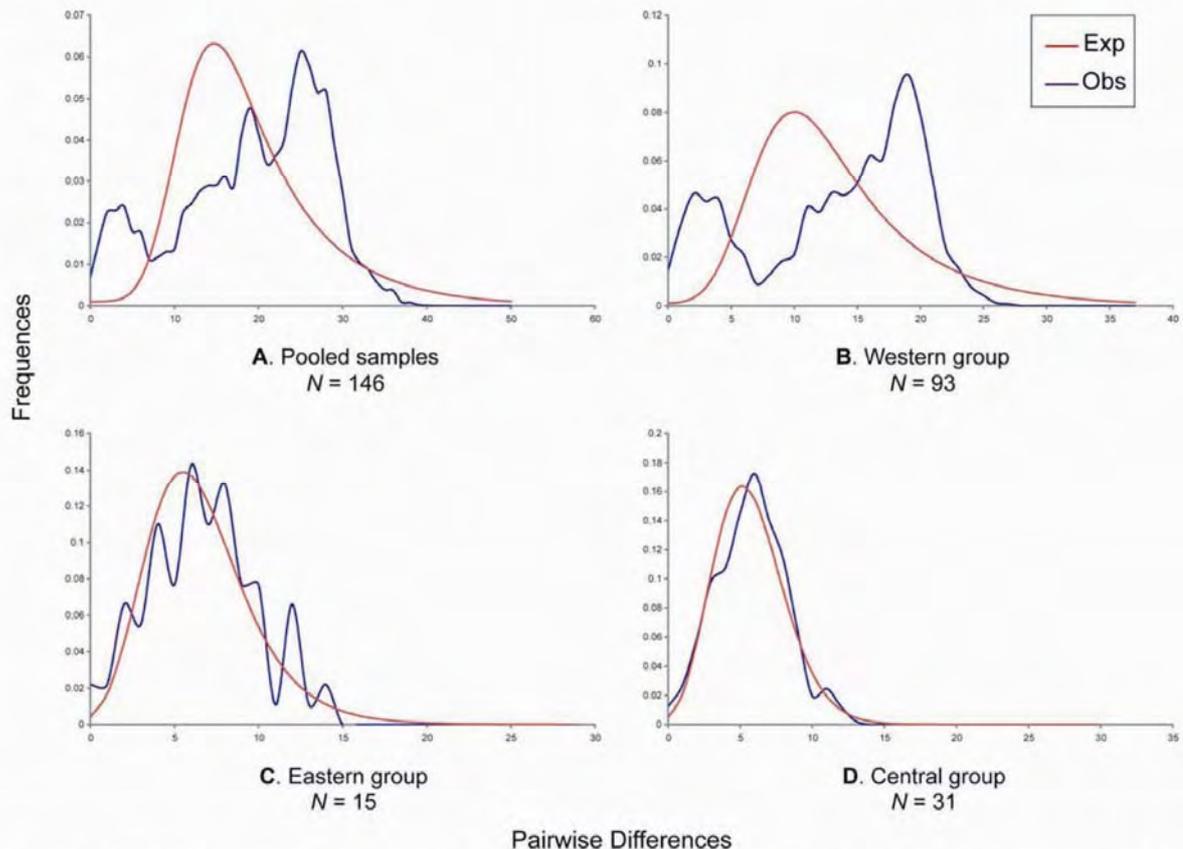


Figure 3. Demographic history of *Microtus arvalis* inferred from cytochrome *b* gene dataset. Observed mismatch distributions (blue line) for the whole dataset (A) as well as the Western (B), Eastern (C) and Central (D) lineages are compared to expected distributions under a population growth-decline model (red line). Numbers of pairwise differences are on the X-axis, while relative frequencies are on the Y-axis. doi:10.1371/journal.pone.0003532.g003

with warm or pre- and postglacial periods between the Late Cromerian and the LGM (Figure 4). The C and E lineages have a shallow regional genetic structure. Low nucleotide diversity (0.53% and 0.62%, respectively), star-like topologies (Figure 2) and analyses of demographic history indicating sudden expansion (Figure 3) provide evidence for a past bottleneck event followed by probable post-LGM population expansion [45–47]. The oldest major W lineage presents a higher level of nucleotide diversity (1.31%) suggestive of relatively large population sizes, and shows a hierarchical phylogeographic structure (NE and SW sublineages) as observed in the field vole [43]. However, these sublineages found on either side of the Loire River (France) also have different topological tree structures, reflecting different genetic structures (Table 1). The NE sublineage experienced to a lesser extent the effect of periglacial climatic conditions, while the SW populations located between the Atlantic and Mediterranean coasts were under milder climatic conditions (Figures 2, 5 and S1). The closer the populations were to the ice front, the more significant was the loss of genetic diversity.

On closer examination of lineage composition, individuals from Germany, France and Switzerland are found in nearly all lineages. German individuals belong to the W, F, C and E lineages, while individuals from Switzerland are from the W, C and I lineages.

Particular attention should be paid to populations from eastern France, because some individuals from the Vittel and Monthureux populations belong not only to both W sublineages, but also to the C lineage (Figures 2 and S1) [33,34]. Therefore, the *M. arvalis* lineages meet in an area including eastern France, southwestern Germany and northern Switzerland. Moreover, the fossil site of Miesenheim I, where the oldest *M. arvalis* remains were found (0.500–0.450 Myr) [29,30], is located in southwestern Germany (Figure 1). For these reasons, we consider the origin of *M. arvalis* to be located in western Central Europe. From this area, populations of the common vole certainly spread out through Europe during the Holsteinian (0.430–0.300 Myr), first southwestwards and then northeastwards (Figure 5). Western Central Europe was not only the cradle of the *M. arvalis* lineages, it was also a dispersal centre for this rodent.

Mediterranean regions were long considered to have been refugia for numerous European temperate plants and animals during Pleistocene ice ages [3–5]. However, the role of these refugia for the survival of *M. arvalis* during the LGM has recently been challenged [34]. The Spanish clade has distinctive haplotypes (Table S3), and seems to be the last offshoot of the W lineage dated back 0.086 Myr (Figures 2 and 4). Likewise, the Italian lineage has distinctive haplotypes but also the highest DNA divergence

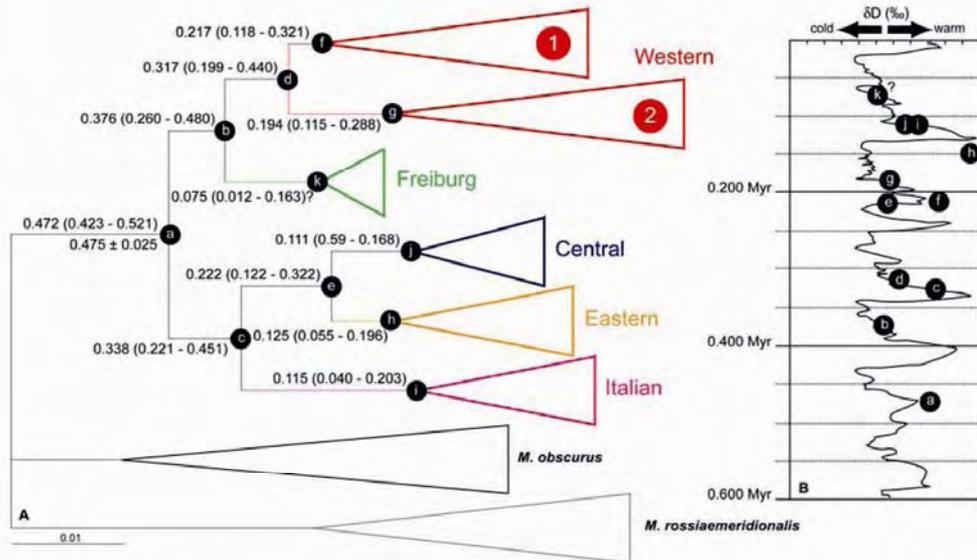


Figure 4. Divergence time estimates within and among *Microtus arvalis* lineages. Numbers at nodes (b to k) of the simplified Bayesian tree (A) are times to most recent common ancestors (with 95% confidence) estimated from cytochrome *b* gene sequences with BEAST. Numbers at node (a) are the divergence time estimate by BEAST (above branch) based on the fossil calibration point (below branch; Miesenheim I, Germany) [29,30]. Small letters allow one to locate the possible lineage appearance on the δD curve (B) from EPICA Dome C (modified from [75]). doi:10.1371/journal.pone.0003532.g004

(Tables 1 and S3). Even if the Spanish clade may result from a gradual expansion of the species from eastern France to Spain, both Spanish and Italian populations may represent long-term isolates, explaining their relatively high level of endemism [3,8]. Therefore, these populations probably did not contribute to potential postglacial colonization of Europe. Central European glacial refugia (in the Carpathians), as opposed to Mediterranean refugia, have been proposed for some large mammals (e.g. brown bear, European badger, red deer) [16,41,48] and for several more small mammals adapted to open (root vole and field vole) [35,43] and forest (bank vole and yellow-necked fieldmouse) [13,44] landscapes. The fossil record indicates that *M. arvalis* was present in Mediterranean regions (Spain, Portugal, Italy, Greece) during both warm periods and glacials [30]. Surprisingly, this rodent has been recorded in fossil localities of Western (France), Central (Germany, Switzerland and Austria) and Eastern (Slovakia, Hungary, Romania) Europe from the Late Cromerian to the Holocene [30], regardless of the climatic conditions. Furthermore, the detailed examination of two French fossil localities, la Baume de Gigny (Gigny, Jura; 0.060–0.015 Myr) [49–51] and le Taillis des Coteaux (Antigny, Vienne; 0.030–0.015 Myr) [52] reveals that the common vole survived even in northern France during the LGM. We therefore suggest that glacial survival of *M. arvalis* could have occurred in patchy and restricted favourable habitats (as described by [11,17]) on its whole geographic range rather than in southern or northern glacial refugia.

Biogeographic traits may have determined the responses of plant and animal species to Pleistocene ice ages [17]. When both fossil and genetic evidence for northerly glacial survival exists, the mammals concerned have short generation time and small body size (like voles), as well as high mobility. The common vole is not really a highly mobile rodent but it is able to travel distances of several hundred meters to a few kilometres [53]. This rodent has

also shown ecological adaptation to cold environments. For example, it was reported at an altitude of 3000 m in the Alps, and it can survive several months, and even reproduce, under snow cover in mountainous areas [54]. However, landscape structure and composition as well as climatic conditions seem to be important constraints for species dispersal and population dynamics [55–57]. Open habitats and mean July temperatures $>+16^{\circ}\text{C}$ favour vole outbreak and the spread to all habitats around, while a mosaic landscape and arid environment prevent the dispersal of the species [25,58,59]. Analyses of climate dynamics and vegetation response during the past 0.140 Myr in Western and Central Europe allow the documentation of environmental changes. The Eemian interglacial (0.126–0.110 Myr) and the Weichselian (0.110–0.001 Myr) interstadials were characterized by closed forests or forest steppes and summer temperatures $>+16^{\circ}\text{C}$. Landscapes of the Weichselian stadials were dominated by open vegetation typical of tundra, steppe tundra, tundra woodland or possibly open taiga, and mean July temperatures were $\leq 10^{\circ}\text{C}$ [37,60–62]. Our molecular dating results indicate that the dispersal of *M. arvalis* was effective during warm, pre- and postglacial periods, and not in cold periods (Figure 4). Warm climatic conditions were indeed more suitable for this species, and open habitats (floodplains, open woodlands, scrub, woodland glades, open marshes and meadows) were sufficiently well represented to allow for its existence and expansion [63]. Moreover, the high haplotype diversity (Table 1) suggests glacial survival of small, isolated populations in micro-environmentally favourable habitats from which local dispersal was then possible [11,17]. A relationship between the ratio of permanent grassland and the kinetics of *M. arvalis* was also brought to light. When grassland represents less than 10% of cultivated environments, *M. arvalis* densities remain constantly low in those grassland habitats. However, when grassland is the main

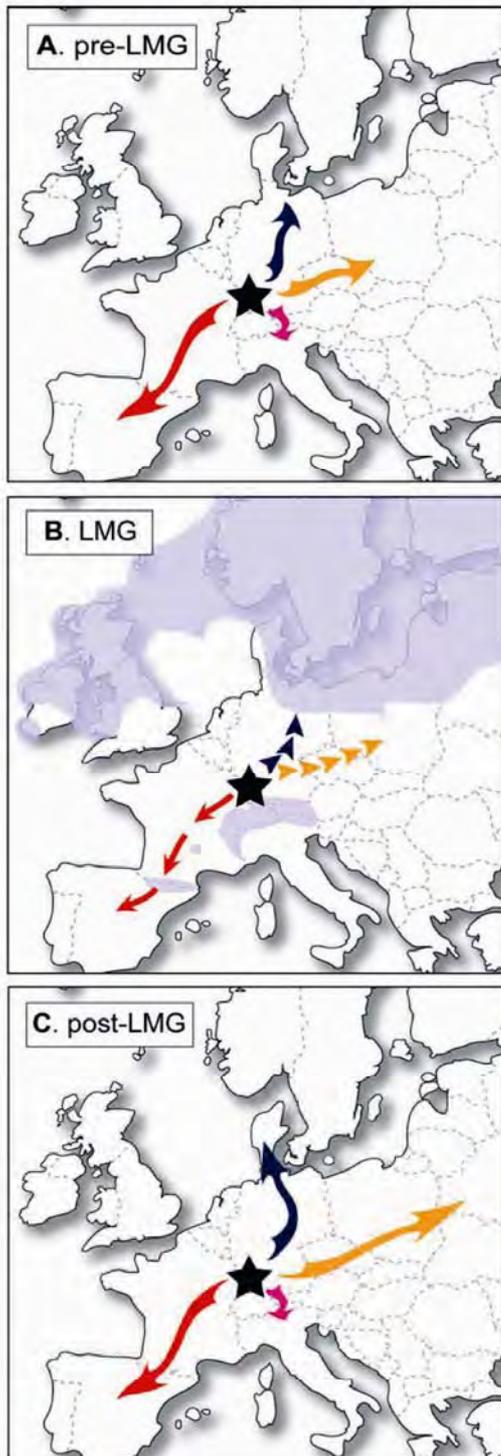


Figure 5. Estimated expansions of *Microtus arvalis* before (A), during (B) and after (C) the LGM. The black star locates the most likely origin of the species from fossil and genetic evidence. Solid arrows

indicate the southwestward and northeastward gradual range expansion during warm periods, while dotted arrows are for more or less irregular expansion (U glacial survival in isolated populations or a bottleneck events) during cold periods. Shaded areas (B) correspond to the estimated extension of ice cover. doi:10.1371/journal.pone.0003532.g005

constituent of these environments transformed by human activity, *M. arvalis* populations may present episodes of high densities (hundred individuals/ha) [59]. The common vole seems therefore able to survive harsh environmental conditions (*i.e.* snow cover, patchy habitats). The species can then disperse from grassland patch to patch by increasing population density during more suitable conditions. This capacity could therefore allow the expansion of this species during transitional phases such as pre- and postglacial periods (relatively open landscape and mild climate conditions).

Therefore, combined fossil, genetic and biogeographic evidence provides a new insight into the evolutionary history of *M. arvalis*. Different colonization processes from western Central Europe allowed the dispersal of this species from small isolated populations rather than from southern or northern glacial refugia. These colonization directions included: (i) southwestwards, with a relatively gradual range expansion during suitable periods in Western Europe; and (ii) northeastwards, with a more irregular expansion in Central and Eastern Europe. In this latter case, populations might not retreat towards glacial refugia, only to perish because of periglacial conditions. The lack of fossil remains in Denmark, Poland, Russia and Ukraine for the LGM [30] and the genetic evidence of a past C and E bottleneck event strengthen these hypotheses. In fact, the dispersal of the common vole throughout Europe is due to a balance between favourable structure and composition of the landscape and climatic conditions. Thus, the evolutionary history of European temperate species is probably the result of much more complex colonization processes than usually thought. Fossil and genetic evidence as well as biogeographic traits should lead to the improved management and conservation of modern biodiversity.

Materials and Methods

Samples

Voles were euthanized by cervical dislocation as recommended by our institutions (<http://ethique.ipbs.fr/sdv/GUIDEmars2008.pdf>) and Mills *et al.* [64]. One of the authors (JPQ) has an authorization to experiment on living vertebrate animals (Certificate n° 34.107). Phylogeographic inferences are based on agreement in analysis of 131 control region and 75 cytochrome *b* gene sequences from common voles, sampled from 35 French localities (1 to 9 individuals/population; Figure 1 and Tables S1, S2). Our molecular dataset was complemented with GenBank sequences including *M. arvalis* from other European localities and *M. rossiaemeridionalis* used as outgroup (Figure 1 and Tables S1, S2).

From a palaeontological standpoint, the whole European fossil record of *M. arvalis* was considered [30]. Kowalski [30] listed *M. arvalis* remains in two categories: *M. arvalis*/*M. agrestis* assemblages and *M. arvalis* localities. In the present study, only the second category with well-determined specimens is taken into account. Two continuous and well-studied sequences located in France were also examined (Figure 1): La Baume de Gigny (Gigny, Jura; 0.060–0.015 Myr) [49–51] and le Taillis des Coteaux (Antigny, Vienne; 0.030–0.015 Myr) [52]. In the former locality, *M. arvalis* and *M. agrestis* were identified [49], while *M. arvalis* remains of the latter locality were determined by one of us (ER in [52]).

DNA extraction, amplification and sequencing

Total DNA was extracted from 95% ethanol-preserved liver, foot and skin fragments following standard procedures [65]. Because of their relatively fast substitution rate, the control region and the cytochrome *b* gene are frequently used as genetic marker in phylogeographic studies dealing with, vertebrates in general, and mammals in particular [e.g. 3,6,7,10,13,15,18,20,23,34]. For this reason, the CR 5' peripheral domain (more informative than the 3') and the *cytb* gene were PCR-amplified ($T_m = 50^\circ\text{C}$) with, respectively, specific and universal primers (Table S5) [28,66,67]. Direct sequencing was performed in both directions to confirm polymorphic sites by Macrogen (Seoul, Korea). The new sequences were deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers AM990179–AM990312 for CR, and AM991024–AM991098 for *cytb* (see Table S1 for sequence details).

Data analysis

Best-fitting models of sequence evolution were determined using Modeltest 3.7 [68] for ML reconstructions and MrModeltest 2.2 [69] for BA. These models are: K81uf+I+G (ML) and GTR+I+G (BA) for CR; TrN+I+G (ML) and K80+I, GTR, GTR+G (respectively, first, second and third codon positions; BA) for *cytb* (for details about models, see <http://workshop.molecularevolution.org/eur/resources/models/dnamodels.php>). ML analyses were conducted using the software PhyML 2.4.4 [70], and nodal robustness was estimated after 1000 bootstrap replicates. Alternative topologies to the best ML tree were evaluated with the test of Shimodaira & Hasegawa [39] as implemented in PAUP* 4.010b [71]. Mixed models under BA using MrBayes 3.0b4 [72] was performed with five Markov chain Monte Carlo chains that were simultaneously run for 2,000,000 generations with trees sampled every 100th generation, and after removing the first 2000 trees as the burn-in stage.

Nucleotide and haplotype diversities within evolutionary lineages, as well as total and net DNA divergence were calculated using DnaSP 4.20.2 [73]. Mismatch distribution analyses among individuals [40] were carried out under a population growth-decline model in DnaSP. Demographic stability is illustrated by multimodal distributions, while a unimodal pattern is consistent with sudden expansion [46].

Divergence time estimates

Time to most recent common ancestor for several clades was estimated from *cytb* dataset using BA with BEAST 1.4.6 [74] under a GTR+I+G model. Runs were performed with an uncorrelated lognormal clock assuming constant population size (20,000,000 generations with the first 2,000,000 discarded as burn-in). The date of 0.475 ± 0.025 Myr for the origin of *M. arvalis* lineages (Late Cromerian; Miesenheim I, Germany) [29,30] was used as calibration point.

Supporting Information

Table S1 Labels, geographic distribution and references/sources of *Microtus arvalis* samples. Accession numbers for original and Genbank data of the cytochrome *b* gene and the control region are

References

1. Avise JC, Arnold J, Ball MR, Bermingham E, Lamb T, et al. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489–522.
2. Bennett KD (1997) *Evolution and Ecology: the Pace of Life*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 259.

also listed. Colours refer to the five lineages: Western (red), Central (blue), Eastern (orange), Freiburg (green) and Italian (pink).
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003532.s001 (0.34 MB DOC)

Table S2 Origin and sample size of *Microtus arvalis*

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003532.s002 (0.13 MB DOC)

Table S3 Haplotype list for each *Microtus arvalis* lineage. The positions of changes in the amino acid sequence are given according to the cytochrome *b* model by Howell [79] and Degli Esposti et al. [80].

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003532.s003 (0.17 MB DOC)

Table S4 Alternative topologies nonsignificantly different (5% confidence level) including the five lineages of *Microtus arvalis*. The topology in bold is the previously published topology [33,34], while the topology in red corresponds to the present topology based on cytochrome *b* gene sequences (Figure 2).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003532.s004 (0.09 MB DOC)

Table S5 Primers used for PCR-amplification of the cytochrome *b* gene [28,67] and the control region [66]

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003532.s005 (0.03 MB DOC)

Figure S1 Bayesian tree reconstructed from control region sequences of *Microtus arvalis*. Individual labels are detailed in Table S1. The numbers at nodes refer to ML bootstrap percentages $\geq 50\%$ (above branches) and BA posterior probabilities ≥ 0.50 (below branches). The five main evolutionary lineages as previously mentioned [34] are indicated on the right.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003532.s006 (0.34 MB DOC)

Acknowledgments

All people who collected and provided us with tissue samples are gratefully acknowledged (full list in Table S1). Warm thanks are expressed to: Claudine Montgelard (CEFE, Montpellier, France) and Stéphane Garnier (Biogéosciences-Dijon, France) for analytical help; Sophie Montuire and Emmanuel Fara (Biogéosciences-Dijon) for helpful discussions and comments on the manuscript; the UMR 5548 “Développement et Communication Chimique chez les Insectes” for technical support; Christian Arthur and Christophe Bordes (Réserve Naturelle du Néouvielle, Pyrénées, France) for field management; Carmela Chateau-Smith (Univ. de Bourgogne, Dijon) and John Stewart (Natural History Museum, London, UK) for English assistance; Jérôme Thomas (Biogéosciences-Dijon) for computer loan; Robert Sommer (Museum of Zoology, Dresden, Germany) for informations provided on mammalian fossil; Gérard and Nicole Lévy for field accommodation; John Stewart and an anonymous reviewer for helpful comments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CT. Performed the experiments: CT ER AP. Analyzed the data: CT. Contributed reagents/materials/analysis tools: CT ER. Wrote the paper: CT. Conceived the project: CT. Identified some fossil remains of *Microtus arvalis*: ER. Conceived the project and collected specimens of common vole: JPO.

5. Hewitt G (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B* 359: 183–195.
6. Haynes S, Jaarola M, Searle JB (2003) Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Mol Ecol* 12: 951–956.
7. Dubey S, Zaitsev M, Gosson J-F, Abdoukader A, Vogel P (2006) Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Mol Phylogenet Evol* 38: 635–647.
8. Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, et al. (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proc R Soc Lond B* 265: 1219–1226.
9. Rafinski J, Babik W (2000) Genetic differentiation among northern and southern populations of the moor frog *Rana arvalis* Nilsson in central Europe. *Heredity* 84: 610–618.
10. Kotlík P, Berrebi P (2001) Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Mol Ecol* 10: 2177–2185.
11. Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends Ecol Evol* 16: 608–613.
12. Haase M, Misof B, Wirth T, Baminger H, Baur B (2003) Mitochondrial differentiation in a polymorphic land snail: evidence for Pleistocene survival within the boundaries of permafrost. *J Evol Biol* 16: 415–428.
13. Delfontaine V, Libois R, Kofik P, Sommer R, Nieberding C, et al. (2005) Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Mol Ecol* 14: 1727–1739.
14. Schönsweeter P, Stehlik I, Holderegger R, Trübsh A (2005) Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Mol Ecol* 14: 3547–3555.
15. Kotlík P, Delfontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, et al. (2006) A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *P Natl Acad Sci USA* 103: 14860–14864.
16. Sommer RS, Nadachowski A (2006) Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Rev* 36: 251–265.
17. Bhagwat SA, Willis KJ (2008) Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits? *J Biogeogr* 35: 464–482.
18. Jaarola M, Searle JB (2004) A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe. *Heredity* 92: 228–234.
19. Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt GM (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the European Grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Mol Ecol* 4: 49–60.
20. Nesbo CL, Fosheim T, Vollestad LA, Jakobsen KS (1999) Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Mol Ecol* 8: 1387–1404.
21. Palmé AE, Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Mol Ecol* 11: 1769–1780.
22. Stewart JR (2003) Comment on “Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications”. *Science* 299: 825a.
23. Hofreiter M, Serre D, Rohland N, Rabeder G, Nagel D, et al. (2004) Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation. *P Natl Acad Sci USA* 101: 12963–12968.
24. Chaline J, Brunet-Lecomte P, Montuire S, Viriot L, Courant F (1999) Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Ann Zool Fennici* 36: 239–267.
25. Le Louarn H, Quéré J-P (2003) Les Rongeurs de France. Paris: INRA Editions. 256 p.
26. Triant DA, DeWoody A (2006) Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed by complete mitochondrial genome sequences. *Genetica* 128: 95–108.
27. Fedorov VB, Goropashnaya AV, Boeskorov GG, Cook JA (2008) Comparative phylogeography and demographic history of the wood lemming (*Myopus schisticolor*): implications for late Quaternary history of the taiga species in Eurasia. *Mol Ecol* 17: 598–610.
28. 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. *Biol J Linn Soc* 93: 309–323.
29. Kolšchoten T van, Turner E (1996) Early Middle Pleistocene mammalian faunas from Kärlich and Miesenheim I and their biostratigraphical implications. In: Turner E, ed. *The early Middle Pleistocene in Europe*. Rotterdam: Balkema. pp 227–253.
30. Kowalski K (2001) Pleistocene Rodents of Europe. *Folia Quaternaria* 72: 1–389.
31. Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W, Krystufek B, Reijnders PJH, et al. (1999) *The atlas of European mammals*. London: T & AD Poyser Natural History. pp 484.
32. Spitz F (1977) Le campagnol des champs (*Microtus arvalis* Pallas) en Europe. *Bull OEPP* 7: 165–175.
33. Fink S, Excoffier L, Heckel G (2004) Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations. *Mol Ecol* 13: 3501–3514.
34. Heckel G, Burri R, Fink S, Desmet J-F, Excoffier L (2005) Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole *Microtus arvalis*. *Evolution* 59: 2231–2242.
35. Brunoff C, Galbreath KE, Fedorov VB, Cook JA, Jaarola M (2003) Holarctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. *Mol Ecol* 12: 957–968.
36. Sommer R, Benecke N (2004) Late- and post-glacial history of the Mustelidae in Europe. *Mammal Rev* 34: 249–284.
37. Willis KJ, van Andel TH (2004) Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Sci Rev* 23: 2369–2387.
38. Lee-Yaw JA, Irwin JT, Green DM (2008) Postglacial range expansion from northern refugia by the wood frog, *Rana sylvatica*. *Mol Ecol* 17: 867–884.
39. Shimodaira H, Hasegawa M (1999) Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 16: 1114–1116.
40. Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569.
41. Saarna U, Ho SYW, Pybus OG, Kalluste M, Tumanov IL, et al. (2007) Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in northeastern Europe and a new time frame for the formation of European brown bear lineages. *Mol Ecol* 16: 401–413.
42. Taberlet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proc R Soc Lond B* 255: 195–200.
43. Jaarola M, Searle JB (2002) Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Ecol* 11: 2613–2621.
44. Michaux JR, Libois R, Filippucci M-G (2005) So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity* 94: 52–63.
45. Dubey S, Cosson J-F, Vohralík V, Krystufek B, Diker E, et al. (2007) Molecular evidence of Pleistocene bidirectional faunal exchange between Europe and the Near East: the case of the bicoloured shrew (*Crocidura leucodon*, Soricidae). *J Evol Biol* 20: 1799–1808.
46. Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.
47. Fedorov VB, Stenseth NG (2001) Glacial survival of the Norwegian lemming (*Lemmus lemmus*) in Scandinavia: inference from mitochondrial DNA variation. *Proc R Soc Lond B* 268: 809–814.
48. Valdiosera CE, Garcia N, Anderung C, Dalén L, Créguat-Bonnouire E, et al. (2007) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Mol Ecol* 16: 5140–5148.
49. Chaline J, Brochet G (1989) Les rongeurs: leurs significations paléocologiques et paléoclimatiques. In: Campy M, Chaline J, Vuillemy M, eds. *Paris. XXVII^{ème} supplément à Gallia Préhistoire, Editions du CNRS*. pp 97–109.
50. Evin J (1989) Les datations radiocarbone. In: Campy M, Chaline J, Vuillemy M, eds. *Paris. XXVII^{ème} supplément à Gallia Préhistoire, Editions du CNRS*. pp 53–56.
51. Campy M, Chaline J (1993) Missing records and depositional breaks in French Late Pleistocene cave sediments. *Quaternary Res* 40: 318–331.
52. Primault J, Airvaux J, Brou L, Gabilleau J, Griggo C, et al. (2007) La grotte du Taillis des Coteaux, Antigny (Vienne). Rapport intermédiaire de fouille programmée pluri-annuelle 2006–2008. Service Régional de l’Archéologie Poitou-Charentes. . pp 150.
53. Schweizer M, Excoffier L, Heckel G (2007) Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Mol Ecol* 16: 2463–2473.
54. Le Louarn H, Spitz F, Grolleau G (1970) Le campagnol des champs *Microtus arvalis* Pallas dans le Briannonnais. *Ann Zool Ecol Anim* 2: 423–426.
55. Delattre P, Giraudoux P, Baudry J, Quéré J-P, Fichet E (1996) Effect of landscape structure on Common vole (*Microtus arvalis*) distribution and abundance at several space scales. *Landscape Ecol* 11: 279–288.
56. Delattre P, De Sousa B, Fichet-Calvet E, Quéré J-P, Giraudoux P (1999) Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecol* 14: 401–412.
57. Benoit M, Grespín L, Delattre P, Mehay V, Quéré J-P (2007) Evaluation du risque d’abondance du campagnol des champs (*Microtus arvalis*) en fonction du type de prairie. *Fourrages* 191: 347–358.
58. Delattre P, Giraudoux P, Baudry J, Musard P, Toussaint M, et al. (1992) Land use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population kinetics. *Agr Ecosyst Environ* 39: 153–169.
59. Giraudoux P, Delattre P, Quéré J-P, Damange J-P (1994) Structure and kinetics of rodent populations, in a region under agricultural land abandonment. *Acta Oecologica* 15: 385–400.
60. Guiter F, Andrieu-Ponel V, de Beaulieu J-L, Cheddadi R, Calvez M, et al. (2003) The last climatic cycles in Western Europe: a comparison between long continuous lacustrine sequences from France and other terrestrial records. *Quaternary Int* 111: 59–74.
61. Klotz S, Guiot J, Mosbrugger V (2003) Continental European Eemian and early Würmian climate evolution: comparing signals using different quantitative reconstruction approaches based on pollen. *Global Planet Change* 36: 277–294.
62. Müller UC, Pross J, Bibus E (2003) Vegetation response to rapid climate change in Central Europe during the past 140,000 yr based on evidence from the Fúrsmo pollen record. *Quaternary Res* 59: 235–245.
63. Svenning J-C (2002) A review of natural vegetation openness in north-western Europe. *Biol Conserv* 104: 133–148.

64. Mills JN, Childs J, Ksiazek T, Peters C, Velleca W (1995) Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Atlanta Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention. 61 p.
65. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
66. Haring E, Herzig-Straschil B, Spitzenberger F (2000) Phylogenetic analysis of Alpine voles of the *Microtus multiplex* complex using the mitochondrial control region. *J Zool Syst Evol Research* 38: 231–238.
67. Tougaard C, Delefosse T, Hänni C, Montgelard C (2001) Phylogenetic relationships of the five extant rhinoceros species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) based on mitochondrial cytochrome *b* and 12S rRNA genes. *Mol Phylogenet Evol* 19: 34–44.
68. Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
69. Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
70. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.
71. Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
72. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
73. Rozas J, Sánchez-DeBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
74. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
75. EPICA (2004) Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature* 429: 623–628.
76. Baker RJ, van den Bussche RA, Wright AJ, Wiggins LE, Hamilton MJ, et al. (1996) High levels of genetic change in rodents of Chernobyl. *Nature* 380: 707–708.
77. Martin Y, Gerlach G, Schlötter C, Meyer A (2000) Molecular phylogeny of European Muroid rodents based on complete cytochrome *b* sequences. *Mol Phylogenet Evol* 16: 37–47.
78. Jaarola M, Martinková N, Gündüz I, Brunoff C, Zima J, et al. (2004) Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 33: 647–663.
79. Howell N (1989) Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome *b* and their possible roles in redox catalysis. *J Mol Evol* 29: 157–169.
80. Degli Esposti M, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, et al. (1993) Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 243–271.

Annexe 3 : Rodents and paleogenetics: New perspectives



Available online at www.sciencedirect.com



C. R. Palevol 7 (2008) 125–134



<http://france.elsevier.com/direct/PALEVO/>

General palaeontology

Rodents and palaeogenetics: New perspectives

Christelle Tougard*, Elodie Renvoisé

Laboratoire Biogéosciences–Dijon, UMR 5561 CNRS/uB, université de Bourgogne, 6, boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

Received 27 July 2007; accepted after revision 10 December 2007

Available online 4 March 2008

Written on invitation of the Editorial Board

Abstract

Rodents are the most diversified mammalian order (484 extant genera including 2277 species), and they have a worldwide distribution. Palaeontological, morphological and molecular data have greatly helped to resolve their systematics and evolutionary history. However, some discrepancies remain between palaeontologists and molecular biologists. New techniques in molecular biology, and especially in palaeogenetics, allow us to have direct access to the hereditary material of extinct organisms, and they can compensate for some morphological limits. Unfortunately, few studies are dealing with rodent palaeogenetics, despite the amount of museum and fossil material available. Here, we review the major research activities in rodent palaeogenetics (phylogeny, genetic diversity, migration), and we present the promising research perspectives in this field (phylochronology, palaeoparasitology).

To cite this article: C. Tougard, E. Renvoisé, C. R. Palevol 7 (2008).

© 2007 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Rongeurs et paléogénétique: nouvelles perspectives. Parmi les Mammifères, l'ordre des Rongeurs est de loin le mieux représenté (484 genres, comprenant 2277 espèces) à travers le monde. L'histoire évolutive et la systématique de ce groupe ont largement été étudiées par le biais de données paléontologiques, morphologiques et moléculaires. Cependant, il persiste certains points de désaccord entre paléontologistes et biologistes moléculaires. L'avancée des techniques de biologie moléculaire, et particulièrement en paléogénétique, permet désormais d'accéder au patrimoine génétique d'organismes disparus depuis plusieurs milliers d'années, mais aussi de pallier certaines limites de la morphologie. Malheureusement, peu de travaux se rapportant aux rongeurs intègrent des données paléogénétiques, malgré l'importante quantité de fossiles et de matériel conservés dans les musées. Nous présentons ici une synthèse des travaux effectués en paléogénétique (phylogénie, diversité génétique, migration) depuis l'origine de la discipline, ainsi que les champs disciplinaires prometteurs dans ce domaine (phylochronologie, paléoparasitologie).

Pour citer cet article : C. Tougard, E. Renvoisé, C. R. Palevol 7 (2008).

© 2007 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Rodents; Ancient DNA; Phylogeny; Genetic diversity; Phylochronology; Palaeoparasitology

Mots clés : Rongeurs ; ADN ancien ; Phylogénie ; Diversité génétique ; Phylochronologie ; Paléoparasitologie

1. Introduction

Rodents (Rodentia, Mammalia) are the most diversified order of eutherian mammals, representing over 40% of all extant species (2277 species), and they have

* Corresponding author.

E-mail address: Christelle.Tougard@u-bourgogne.fr (C. Tougard).

a worldwide distribution [13,73]. With their great fossil (743 extinct genera) [71] and extant (484 extant genera) [13] diversity, rodents are an excellent model group for evolutionary studies: most species are characterized by a short generation time and a fast evolving genome; some species are good ecological, climatological, and geographical indicators (Fig. 1A). The fossil record sup-

ports a rodent radiation 65–55 Myr ago (Palaeocene epoch) [42], whereas a Palaeocene or even a Late Cretaceous age is suggested by recent molecular estimates (75 Myr, [1]; 60 Myr [26]; 63.5–74.5 Myr [27]; 56 Myr [48]; 70–77 Myr [88]). The monophyly of Rodentia is strongly supported by morphological, palaeontological and molecular data [1,42,70,85], although it was seri-

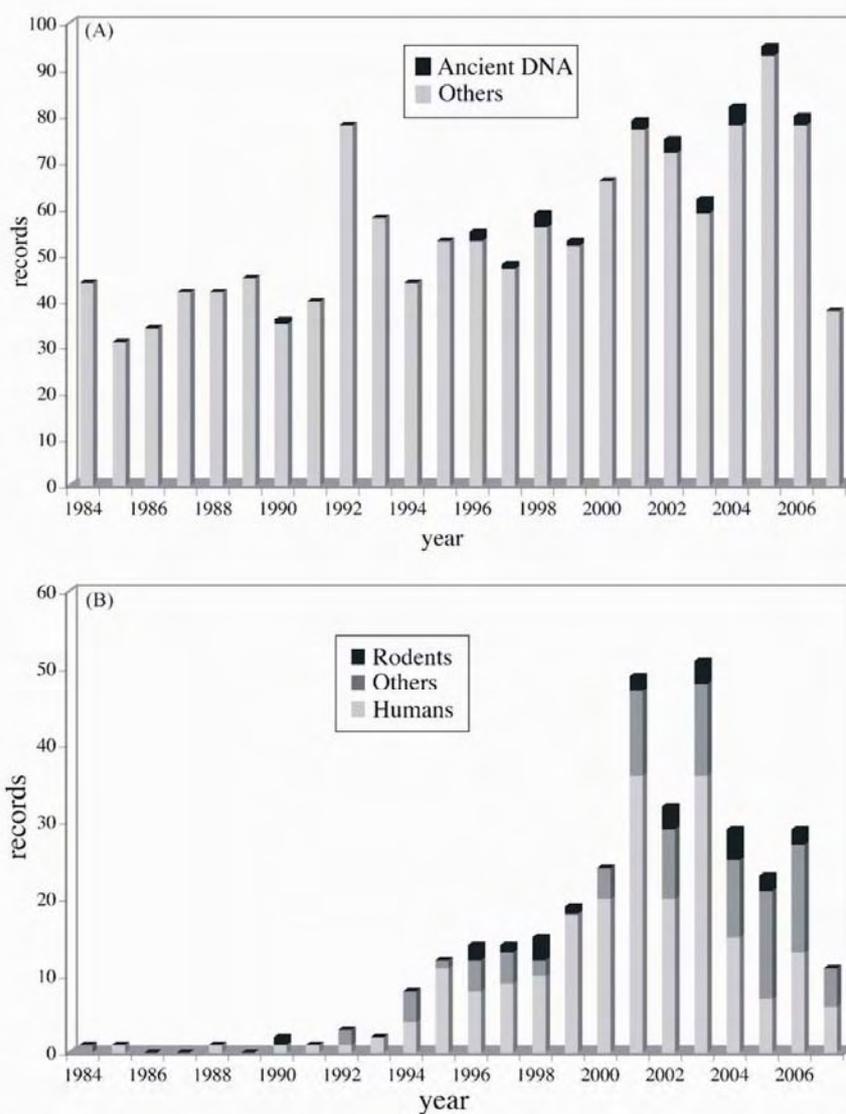


Fig. 1. Number of publications retrieved from public reference data banks (ISI Web of Sciences, PubMed) in July 2007: **A**, studies dealing with rodent evolution (e.g., palaeontology, archaeology, morphology, morphometrics, phylogeny, phylogeography, cytogenetics, population genetics, and palaeogenetics); **B**, studies based on ancient DNA sequences from mammals.

Fig. 1. Nombre de publications recueillies en juillet 2007 à partir de bases publiques de références bibliographiques (ISI Web of Sciences, PubMed) : **A**, études se rapportant à l'évolution des rongeurs (paléontologie, archéologie, morphologie, morphométrie, phylogénie, phylogéographie, cytogénétique, génétique des populations, paléogénétique, etc.) ; **B**, études intégrant des séquences d'ADN ancien de Mammifères.

Table 1

Published works dealing with rodent palaeogenetic studies. Nomenclature is based on Carleton and Musser [13]

Tableau 1

Liste des travaux publiés se rapportant aux études paléogénétiques de rongeurs. La nomenclature suit Carleton et Musser [13]

Taxa	DNA Source	Genetic Marker	Age	Origin	Authors
Cricetidae					
<i>Phyllotis limatus</i> Lima pericote	fecal pellets	cytochrome <i>b</i> (273 bp)	10,120 ± 150 yr	midden	[59]
<i>Microtus montanus</i> Montane vole	teeth (upper first molar)	cytochrome <i>b</i> (312 bp)	present to 2860 ± 70 yr	cave	[39]
Ctenomyidae					
<i>Ctenomys socialis</i> Social tuco-tuco	teeth	cytochrome <i>b</i> (150 to 253 bp)	present to ≈ 10,000 yr	barn owl roost	[16,38]
Echimyidae					
<i>Mesomys hispidus</i> Spiny tree rat	dried skin	cytochrome <i>b</i> (331 bp)	1817	museum	[74]
Geomyidae					
<i>Pappogeomys alcorni</i> Alcornis pocket gopher	dried skins	cytochrome <i>b</i> (402 bp)	1950 and 1966	museum	[22]
<i>Thomomys talpoides</i> Northern pocket gopher	teeth	cytochrome <i>b</i> (164 bp)	present to 2860 ± 70 yr	cave	[39,42]
Heteromyidae					
<i>Dipodomys panamintinus</i> Panamint kangaroo rat	dried skins	control region (225 bp)	1911, 1917 and 1937	museum	[93]
Muridae					
<i>Rattus exulans</i> Pacific rat	bones (femora, mandibles) and teeth (incisives)	control region (173 to 239 bp)	400 to 2000 yr	museum and archaeological sites	[65,66,67]
Various rodent species	taxidermized specimens		1941 to 1975	museum	[4]

ously challenged in the 1990s [12,23,33,62]. However, some disagreements remain within and among palaeontologists and molecular biologists about the divergence dates of major lineages (e.g., the *Mus/Rattus* split) [1,26,47,52,53,88], and the relationships among families [1,14,17,28,42,47,51,72,94].

Since the mid-1980s, palaeogenetics (i.e. studies of ancient DNA) has added another temporal dimension to evolutionary studies [44,77]. The first most common use of ancient DNA was systematics, whereas a wide variety of evolutionary issues (notably phylogeography, genetic diversity through time, population response to climate and environmental changes, domestication origin, past human migrations) are investigated today [80]. The majority of palaeogenetic studies have focused predominantly on mammal species (Fig. 1B) [45,80,98], but few of them are dealing with rodents, despite the amount of museum and fossil material available for evolutionary hypothesis testing. Here, we review the major research activities in rodent palaeogenetics, and we present the promising research perspectives in this field (see Table 1

for an overview). We deliberately refrain from dealing with technical aspects of ancient DNA works and the issue of authenticity, as it has been widely discussed in the literature [6,20,45,55,80,96,98].

2. Sources of ancient DNA

In the 1980s, the technical improvements in Polymerase Chain Reaction (PCR) have opened up the possibility of ancient DNA studies on museum specimens [19,56,78,81,97]. The first study on rodent ancient DNA was performed on dried skin tissue from museum specimens [93]. A 225-base pair (bp) fragment of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region was amplified and sequenced. Later on, other studies used the same DNA source to address taxonomic questions [74] or to investigate phylogenetic relationships of species [22]. Likewise, owl pellets stored in museums or collected in the field are also considered as another good DNA source [91]. The DNA contained in that kind of samples could be protected from cross-contamination and degradation

inside pellets. However, dried skins and owl pellets are usually few decades old, and they do not allow phylogenetic and phylogeographic studies to be carried out on long time periods.

On the other hand, archaeological and palaeontological field collections can also provide fossil bone and tooth remains. The sampling is thus widely increased and it covers several thousand years (e.g., 2000 to 10,000 yr, [16]; 400 to 2000 yr, [67]). However, palaeogenetic analyses of fossil bones and rodent teeth are relatively rare. Post-excavation conditions and museum storage cause DNA degradation in fossil samples [84]. Consequently, bones and teeth used in most of ancient DNA studies of rodent remains should be freshly excavated [8,37,38,64–66]. Later on, fossil samples aimed at ancient DNA extractions should be kept at low temperatures shortly after excavation, and from the field to the lab [10].

Fossil bones and teeth of rodents are generally collected in caves (e.g., Lamar Cave, Wyoming, USA, [37,39]; Polynesian archaeological sites and caves; [8,64–67]; raptor roost, Argentina, [38]). Even if DNA preservation conditions are really different in terms of taphonomy (e.g., soil acidity, humidity, sediment porosity) inside each cave, this environment is less subject to temperature fluctuations (e.g., [31,32,40,45,46,83,84,87]). The low amplitude of temperature fluctuations as well as the cold to temperate temperatures is supposed to favour DNA preservation. Moreover, rodent skeletal remains are abundant there, essentially due to the accumulation of owl pellets [14,91].

Faecal material is also commonly found in caves frequented by animals [45,83], but also in much more unusual environments, such as rodent middens [59]. In this latter case, DNA was extracted from faecal pellets in order to identify the agent of an ancient midden located in the Atacama Desert (Salar de Atacama, Chile). To date, these remains are the oldest material used for ancient DNA studies on rodents (~11,700 yr BP) [59]. The reason of such an exceptional DNA preservation (in crystallized urine strongly cemented as adobe brick) is still questioned, but it suggests new perspectives for potential sources of ancient DNA retrieval.

Most palaeogenetic studies are dealing with North and South American rodents. Many European archaeological sites have yielded rodent remains (e.g., Gigny, Jura, France, [11], Pilisszántó, Hungary, [54], Bacho Kiro, Bulgaria, [58], Bedburg-Königshoven, Germany, [89], British Islands, [57,90]), but they remain understudied [82]. The main reason seems to us related to the difficulties encountered to extract ancient DNA from tiny

teeth and bones. Even in the best conditions of preservation, the recoverable quantity of DNA from one tooth or bone is small. In order to compensate for this drawback for phylogenetic studies, some authors propose to pool, during extraction and PCR analyses, several samples belonging to one species to get a consensus DNA sequence [24]. However, in these conditions, the results are completely unreliable, and they make the authentication of ancient DNA sequences nearly impossible. For phylogeographic studies, it is much more problematic: two (or more) samples from the same fossil site could have different haplotypes. Unfortunately, no paper related to rodent palaeogenetics discusses this fact.

3. Phylogenetics and phylogeography

Ancient DNA data are usually used in a systematic context (e.g., [5,35,44,75,84,86,100]). In fact, ancient DNA sequences provide an accurate vision of genetic differentiation through time to conduct phylogenetic and phylogeographic studies. Sometimes, species identification is difficult because of unidentifiable broken samples [65], or insufficient morphological features for species differentiation [22]. In such conditions, analyses of ancient DNA can be very helpful [61]. Ancient sequences are compared with those of the closest extant taxonomic species in order to confirm the identification of the specimen. In the case of rodent remains, this technique was first used by Matisoo-Smith et al. [65]. These authors validated the identification of the Pacific rat (*Rattus exulans*) fossil remains by both palaeogenetic and morphological methods.

Phylogenetic reconstructions based on ancient DNA sequences, associated with modern DNA analyses, can help to solve the phylogenetic relationships of extinct and extant species, and to improve the systematics significantly. For instance, the spiny rat (*Mesomys hispidus*) lacks adequate taxonomic definition, and the geographic origin of the holotype described in 1817 and stored in the 'Museum National d'Histoire Naturelle' (Paris, France) is unknown [74]. The mtDNA cytochrome *b* (cytb) gene sequence (331 bp) and morphometric analyses based on 22 cranial and dental measurements show a clear affinity of the holotype to extant specimens of *M. hispidus* from French Guiana [74]. Therefore, the holotype probably came from an area close to French Guiana, but its exact geographic origin is still unresolved. Likewise, the systematics of a rare pocket gopher (*Pappogeomys alcornii*) was investigated with cranial measurements and ancient DNA sequences [22]. The DNA was extracted from dried skins of specimens collected between 1950 and 1966. The monophyly of the genus *Pappogeomys* is strongly

supported (bootstrap value = 100%) by DNA sequences of *P. alcorni* and *P. bulleri*. From the tree topology, *P. alcorni* is included in the *bulleri* clade. From the morphometric analysis, there were no significant differences between *P. alcorni* and *P. bulleri* for each one of the 12 characters examined. Phylogenetic and morphometric analyses suggest that *P. alcorni* is a subspecies of *P. bulleri* rather than a distinct species [22].

Phylogeographic studies on rodents are mostly based on extant populations [18,21,43,49,50,76,99]. However, temporal changes are not explicitly taken into account in these studies. For this reason, sequence information from ancient DNA is also used to test the reliability of evolutionary hypotheses. Some fossil deposits hold the potential to carry out temporal and spatial studies of genetic diversity at the population level [16,37,39,64,79,96]. Genetic changes in rodent populations are tracked through time in order to point out migration events [37,38,39,64,66,67,93]. Compared with climatic changes, these events allow us to investigate evolutionary responses of rodent populations to environmental changes [16,37–39] (for details, see § *Phylochronology* below). Indeed, some migration routes and movements of past human populations can also be tracked back by studies of temporal and spatial genetic changes from some rodent populations. For instance, the Pacific rat (*Rattus exulans*), a commensal rat often transported as a food item in colonizing canoes, is an indirect valuable tool for tracing prehistoric human migration within Polynesia [8,64–67] (for details, see § *Rodents and human migrations* below).

4. Phylochronology

Phylogeography (i.e. the study of the processes governing the geographical distribution of genealogical lineages) has improved our understanding of the geographical distribution, phylogenetic relationships, and genetic diversity within and among animal and plant species [7]. This discipline offers the opportunity to interpret the effects of climatic and environmental changes on spatial distribution and population dynamics of living organisms. However, it gives a limited access to the past because the fossil record is not taken into account. Hadly et al. [39] have proposed a new approach, named phylochronology, to study populations in space and time using phylogenetic and population genetic methods. This approach uses both ancient and modern DNA data, and it integrates fossil abundance data, ecological parameters, as well as historical climate records to infer microevolutionary processes [39,95]. In this framework, analyses of ancient DNA provide

the opportunity to track the response of past populations, as well as to predict that of the extant biodiversity to environmental changes [16]. Phylochronology was elaborated from studies on North and South American rodent populations: the northern pocket gopher (*Thomomys talpoides*) and the montane vole (*Microtus montanus*) from the Lamar Cave (Yellowstone National Park, Wyoming, USA) [37,39], and the social tuco-tuco (*Ctenomys sociabilis*, Estancia Nahuel Huapi and Cueva Traful, Argentina) [16,38].

Previous palaeontological studies on Lamar Cave faunas (fossil sequence spanning the last 3000 yr) have shown the influence of climatic change on population dynamics and phenotypic response [36]. In addition, ancient DNA analyses indicate that some species (*T. talpoides*) exhibited lowered gene diversity with decreasing population size at the time of the Medieval Warm Period (470–1438 yr), whereas others (*M. montanus*) did not [39]. The opposite responses seem to be due to differences in demographic dispersal patterns of these species. *Microtus* migrations could occur more frequently in and between low-density populations, whereas *T. talpoides* could experience a long-term isolation [37,39]. In fact, these analyses have documented environmental change, population response, genetic diversity change, and the correlation between the three [39].

Likewise, the response of *C. sociabilis* to climate change was investigated on a period of 10,000 yr [16,38]. Modern populations share the same cytb haplotype (M), while eight haplotypes were identified for the Cueva Traful fossil samples: M and seven historical variants. Prior to ca. 3000 yr, *C. sociabilis* was characterized by a greater genetic diversity than the present specimens living in the Cueva Traful area. Moreover, based on the tooth abundance from several stratigraphic levels, the population density decreased between approximately 8200 and 3000 yr [39]. Several factors may have contributed to this population bottleneck: changes in vegetation, volcanic eruption, or competition with the Haig's tuco-tuco (*C. haigi*). The survival of *C. sociabilis*, despite low modern genetic variation, is probably due to its unusual social system, either as a cause or consequence of the bottleneck [15].

5. Rodents and human migrations

The dynamic reconstruction of the human past migrations is a real challenge. Palaeogenetic studies have the potential to shed light on these migrations. Unfortunately, they can encounter methodological difficulties due to contamination with modern DNA, insufficient

samples and ethical problems preventing sample destruction [45,66,67,80,98]. An alternate approach is to focus ancient DNA studies on the genetic variation of commensal or domesticated animals and plants (e.g., [2,29,41,60,66,69]).

Human settlement in the Pacific, and particularly in Polynesia, was a major event in world prehistory, and it is still cause for debate. It represents one of the last human population migrations. Works in various disciplines (archaeology, human skeletal biology, cultural anthropology, linguistics, and human genetics) have improved our understanding of this event, but questions remained in abeyance. Where was the starting point of the Polynesian populations? What was their dispersal pattern throughout Polynesia? What were the settlement process and population interactions? [66,69]. The Pacific rat (*Rattus exulans*) provided an ideal model for telling the story of human colonization through Near and Remote Oceania (respectively, western and eastern Pacific) and the Polynesian triangle (French Polynesia, New Zealand, Chatham and Kermadec islands, Rapa Nui, and so on) [8,63–69]. In fact, this rat, carried intentionally by ancestral Polynesians as a food item, cannot swim more than a few metres in the open ocean; it was thus dependent upon humans for its dispersal across waters. Moreover, it is characterized by a short generation time and a fast evolving genome.

The history of human colonization in the Pacific can be divided in two major phases: the colonization of Near Oceania approximately 40,000 yr BP ago and that of Remote Oceania around 3100 yr BP ago [66]. From modern, museum (1921–1963) and archaeological (400 to 2000 yr) specimens of *R. exulans*, mtDNA control region phylogenies provide an indication of the degree of interaction between the various Polynesian archipelagos: isolation after colonization of some islands (the Marquesas, Chatham islands, Rapa Nui) or multiple contacts with some islands (Hawaii and New Zealand) [8,64,68,69]. Colonization of the eastern Polynesian islands occurred in a broad central area of the Polynesian triangle, but there was no evidence from *R. exulans* molecular data for a dispersal centre restricted to any particular archipelago [69].

In fact, molecular studies of *R. exulans* on a larger scale (Southeast Asia in addition to Near and Remote Oceania, including Polynesian islands) allow us to identify three distinct haplogroups (I, II, and III) [66]. Haplogroup I clusters with some Southeast Asian populations, whereas haplogroup II consists of populations from Southeast Asia and Near Oceania, and haplogroup III includes most of Remote Oceanic populations. From these phylogeographic results, Southeast Asia appears

as the starting point of *R. exulans* populations toward Near Oceania. Likewise, the most likely origin for rat populations from Remote Oceania might be Halmahera (between the Philippines and New Guinea), since Halmahera rats are found in haplogroups II and III [66]. The clear distinction between these two latter haplogroups suggests that *R. exulans* was introduced at least twice into Oceania. Morphological studies of this species support the following hypothesis: one population (haplogroup II) could have been introduced from Southeast Asia through Melanesia into Near Oceania, and the other one from Southeast Asia through Micronesia into Remote Oceania [92]. The distribution and variation of haplogroup III confirms the rapid dispersal of *R. exulans* populations (and therefore of human populations) through Pacific islands (Mobile Founding Migrant models; [34,66]). These results are consistent with data from human language analysis, comparisons of human populations and cultures.

6. Palaeoparasitology

Rodents are known to convey indirectly pathogen agents such as the plague agent, *Yersinia pestis*, as well as internal and external parasites. Some of these parasites were found with coprolites or mummies of rodents in archaeological sites, mainly in South America. In coprolites, two kind of internal parasites were identified: (1) the nematode *Strongyloides ferreirai* from Brazilian archaeological sites (2000 to 8000 yr BP) [3]; (2) eggs from a potentially extinct species of the nematode *Trichuris* (8450 to 30,000 yr BP) [30]. On the other hand, well-preserved ectoparasites (lice, fleas, mites) were discovered in the fur of various guinea pig mummies (*Cavia aperea*) belonging to the Chiribaya Culture (900–1100 AD, Moquegua Valley, southern Peru) [24,25]. Guinea pig (159 individuals of *Cavia aperea*) and dog (17 individuals of *Canis familiaris*) mummies were found in Moquegua Valley sites. Over 1200 fleas of the genus *Pulex* were recovered from animal mummies. Phylogenetic reconstructions based on sequences from 300 fleas (taken from three dogs) did not allow us to identify clearly the *Pulex* species (*irritans* or *simulans*). However, two lines of research could benefit from this study: taxonomic and medical interests [25].

Pathogen agents and parasites are common in soil or animal hosts, raising the possibility of contamination of past samples with modern DNA [80,96]. For this reason, very few ancient DNA analyses were performed on rodent parasites. PCR was used to study the possibility of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA extraction from experimentally desiccated mouse tissue.

- [20] A. Cooper, H.N. Poinar, Ancient DNA: do it right or not at all, *Science* 289 (2000) 1139–1139.
- [21] V. Deffontaine, R. Libois, P. Kotlik, R. Sommer, C. Nieberding, E. Paradis, J.B. Searle, J.R. Michaux, Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), *Mol. Ecol.* 14 (2005) 1727–1739.
- [22] J.W. Demastes, A.L. Butt, M.S. Hafner, J.E. Light, Systematics of a rare species of pocket gopher, *Pappogeomys alcorni*, *J. Mammal.* 84 (2003) 753–761.
- [23] A.M. D'Erchia, C. Gissi, G. Pesole, C. Saccone, U. Arnason, The guinea pig is not a rodent, *Nature* 381 (1996) 597–599.
- [24] K. Dittmar, U. Mamat, M. Whiting, T. Goldmann, K. Reinhard, S. Guillen, Techniques of DNA studies on Prehispanic ectoparasites (*Pulex* sp., Pulicidae, Siphonaptera) from animal mummies of the Chiribaya culture, southern Peru, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98 (Suppl. 1) (2003) 53–58.
- [25] K. Dittmar, R. Ribbeck, A. Daugchies, Palaeoparasitological analysis of the guinea pig mummies of the Chiribaya culture, Moquegua Valley, Peru, *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.* 116 (2003) 45–49.
- [26] E.J.P. Douzery, F. Delsuc, M.J. Stanhope, D. Huchon, Local molecular clocks in three nuclear genes: divergence times for rodents and other mammals and incompatibility among fossil calibrations, *J. Mol. Evol.* 57 (2003) 201–213.
- [27] E. Eizirik, W.J. Murphy, S.J. O'Brien, Molecular dating and biogeography of the early placental mammal radiation, *J. Hered.* 92 (2001) 212–219.
- [28] S.R. Engel, K.M. Hogan, J.F. Taylor, S.K. Davis, Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents, *Mol. Biol. Evol.* 15 (1998) 35–49.
- [29] D.L. Erickson, B.D. Smith, A.C. Clarke, D.H. Sandweiss, N. Tuross, An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in the Americas, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102 (2005) 18315–18320.
- [30] L.F. Ferreira, A. Araújo, U. Confalonieri, M. Chame, D.C. Gomes, *Trichuris* eggs in animal coprolites dated from 30,000 years ago, *J. Parasitol.* 77 (1991) 491–493.
- [31] E.-M. Geigl, On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA, *Archaeometry* 44 (2002) 337–342.
- [32] E.-M. Geigl, Why ancient DNA research needs taphonomy, in: T. O'Connor (Ed.), *Biosphere to Litosphere: new studies in vertebrate taphonomy*, Oxbow Books, Oxford, UK, 2005, pp. 78–85.
- [33] D. Graur, W.A. Hide, W.-H. Li, Is the guinea pig a rodent? *Nature* 351 (1991) 649–652.
- [34] R.C. Green, The Lapita horizon and traditions – Signature for one set of oceanic migrations, In: C. Sand (Ed.), *Pacific archaeology: assessments and prospects*, Les Cahiers de l'Archéologie en Nouvelle-Calédonie 15, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France, 2003, pp. 95–120.
- [35] A.D. Greenwood, J. Castresana, G. Feldmaier-Fuchs, S. Pääbo, A molecular phylogeny of two extinct sloths, *Mol. Phylogenet. Evol.* 18 (2001) 94–103.
- [36] E.A. Hadly, Evolutionary and ecological response of pocket gopher (*Thomomys talpoides*) to Late-Holocene climatic change, *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 60 (1997) 277–296.
- [37] E.A. Hadly, M.H. Kohn, J.A. Leonard, R.K. Wayne, A genetic record of population isolation in pocket gophers during Holocene climatic change, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6893–6896.
- [38] E.A. Hadly, M. van Tuinen, Y. Chan, K. Heiman, Ancient DNA evidence of prolonged population persistence with negligible genetic diversity in an endemic tuco-tuco (*Ctenomys sociabilis*), *J. Mammal.* 84 (2003) 403–417.
- [39] E.A. Hadly, U. Ramakrishnan, Y.L. Chan, M. van Tuinen, K. O'Keefe, P.A. Spaeth, C.J. Conroy, Genetic response to climatic change: Insights from ancient DNA and phylochronology, *PLoS Biol.* 2 (2004) 1600–1609.
- [40] C. Hänni, Utilisation de l'ADN ancien en anthropologie, *Bull. Mem. Soc. Anthropol. Paris* 6 (1994) 5–28.
- [41] C. Hardy, D. Casane, J.-D. Vigne, C. Callou, N. Dennebouy, J.-C. Mounolou, M. Monnerot, Ancient DNA from Bronze Age bones of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), *Cell. Mol. Life Sci.* 50 (1994) 564–570.
- [42] J.-L. Hartenberger, Description de la radiation des Rodentia (Mammalia) du Paléocène supérieur au Miocène; incidences phylogénétiques, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. IIa* 326 (1998) 439–444.
- [43] G. Heckel, R. Burri, S. Fink, J.-F. Desmet, L. Excoffier, Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole, *Microtus arvalis*, *Evolution* 59 (2005) 2231–2242.
- [44] R. Higuchi, B. Bowman, M. Freiburger, O.A. Ryder, A.C. Wilson, DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family, *Nature* 312 (1984) 282–284.
- [45] M. Hofreiter, D. Serre, H.N. Poinar, M. Kuch, S. Pääbo, Ancient DNA, *Nat. Genet.* 2 (2001) 353–359.
- [46] M. Höss, P. Jaruga, T.H. Zastawny, M. Dizdaroğlu, S. Pääbo, DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 1304–1307.
- [47] D. Huchon, F.M. Catzeflis, E.J.P. Douzery, Variance of molecular datings, evolution of rodents and the phylogenetic affinities between Ctenodactylidae and Hystricognathi, *Proc. R. Soc. Lond. B* 267 (2000) 393–402.
- [48] D. Huchon, O. Madsen, M.J.J.B. Sibbald, K. Ament, M.J. Stanhope, F. Catzeflis, W.W. de Jong, E.J.P. Douzery, Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes, *Mol. Biol. Evol.* 19 (2002) 1053–1065.
- [49] M.H. Huhndorf, J.C. Kerbis Peterhans, S.S. Loew, Comparative phylogeography of three endemic rodents from the Albertine Rift, east central Africa, *Mol. Ecol.* 16 (2007) 663–674.
- [50] M. Jaarola, J.B. Searle, Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences, *Mol. Ecol.* 11 (2002) 2613–2621.
- [51] M. Jaarola, N. Martínková, I. Gündüz, C. Brunhoff, J. Zima, A. Nadachowski, G. Amori, N.S. Bulatova, B. Chondropoulos, S. Fraguédakis-Tsolis, J. González-Esteban, M.J. López-Fuster, A.S. Kandaurov, H. Kefelioglu, M.L. Mathias, I. Villate, J.B. Searle, Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.* 33 (2004) 647–663.
- [52] L.L. Jacobs, W.R. Dows, The evolution of murine rodents in Asia, in: Y. Tomida, C.-K. Li, T. Setoguchi (Eds.), *Rodent and lagomorph families of Asian origins and diversification*, National Science Museum Monographs, Tokyo, Japan, 1994, pp. 149–156.
- [53] A. Janke, G. Feldmaier-Fuch, K. Thomas, A. von Haeseler, S. Pääbo, The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals, *Genetics* 137 (1994) 243–256.
- [54] D. Jánossy, *Pleistocene vertebrate faunas of Hungary*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1986.

- [55] L.M. Kelman, Z. Kelman, The use of ancient DNA in paleontological studies, *J. Vertebr. Paleontol.* 19 (1999) 8–20.
- [56] T.D. Kocher, W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pääbo, F.X. Villablanca, A.C. Wilson, Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6196–6200.
- [57] K. Kowalski, Pleistocene rodents of Europe, *Folia Quat.* 72 (2001) 1–389.
- [58] J.K. Kozłowski, Excavation in the Bacho Kiro cave (Bulgaria) – Final report, *Panstwowe Wydawnictwo Naukowe*, Warsaw, Poland, 1982.
- [59] M. Kuch, N. Rohland, J.L. Betancourt, C. Latorre, S. Steppans, H.N. Poinar, Molecular analysis of a 11,700-year-old from the Atacama Desert, Chile, *Mol. Ecol.* 11 (2002) 913–924.
- [60] G. Larson, T. Cucchi, M. Fujita, E. Matisoo-Smith, J. Robins, A. Anderson, B. Rolett, M. Spriggs, G. Dolman, T.-H. Kim, N.T.D. Thuy, E. Randi, M. Doherty, R.A. Due, R. Bollt, T. Djubiantono, B. Griffin, M. Intoh, E. Keana, P. Kirch, K.-T. Li, M. Morwood, L.M. Pedriña, P.J. Piper, R.J. Rabett, P. Shooter, C. van den Bergh, E. West, S. Wickler, J. Yuan, A. Cooper, K. Dobney, Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into Neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104 (2007) 4834–4839.
- [61] O. Loreille, J.-D. Vigne, C. Hardy, C. Callou, F. Treinen-Claustre, N. Dennebouy, M. Monnerot, First distinction of sheep and goat archaeological bones by the means of their fossil mtDNA, *J. Archaeol. Sci.* 24 (1997) 33–37.
- [62] W.P. Luckett, J.-L. Hartenberger, Monophyly or polyphyly of the order Rodentia. Conflict between morphological and molecular interpretations, *J. Mammal. Evol.* 1 (1993) 227–254.
- [63] E. Matisoo-Smith, The human colonisation of Polynesia – A novel approach: genetic analyses of the Polynesian rat (*Rattus exulans*), *J. Polynesian Soc.* 103 (1994) 75–87.
- [64] E. Matisoo-Smith, Something old, something new: do genetic studies of contemporary populations reliably represent prehistoric populations of Pacific *Rattus exulans*? *Hum. Biol.* 74 (2002) 489–496.
- [65] E. Matisoo-Smith, J.S. Allen, Name that rat: molecular and morphological identification of Pacific rodent remains, *Int. J. Osteoarchaeol.* 11 (2001) 34–42.
- [66] E. Matisoo-Smith, J.H. Robins, Origins and dispersals of Pacific peoples: evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9167–9172.
- [67] E. Matisoo-Smith, J.S. Allen, T.N. Ladefoged, R.M. Roberts, D.M. Lambert, Ancient DNA from Polynesian rats: extraction, amplification and sequence from single small bones, *Electrophoresis* 18 (1997) 1534–1537.
- [68] E. Matisoo-Smith, D.G. Sutton, T.H. Ladefoged, D.M. Lambert, J.S. Allen, Prehistoric mobility in Polynesia: mtDNA variation in *Rattus exulans* from Chatham and Kermadec Islands, *Asian Perspect.* 38 (1999) 186–1186.
- [69] E. Matisoo-Smith, R.M. Roberts, G.J. Irwin, J.S. Allen, D. Penny, D.M. Lambert, Patterns of prehistoric human mobility in Polynesia indicated by mtDNA from the Pacific rat, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15145–15150.
- [70] C.A. Matthee, G. Eick, S. Willows-Munro, C. Montgelard, A.T. Pardini, T.J. Robinson, Indel evolution of mammalian introns and the utility of non-coding nuclear markers in eutherian phylogenetics, *Mol. Phylogenet. Evol.* 42 (2007) 827–837.
- [71] M.C. McKenna, S.K. Bell, Classification of mammals – Above the species level, Columbia University Press, New York, USA, 1997.
- [72] C. Montgelard, C. Matthee, T.J. Robinson, Molecular systematics of dormice (Rodentia: Gliridae) and the radiation of *Graphiurus* in Africa, *Proc. R. Soc. Lond. B* 270 (2003) 1947–1955.
- [73] R.M. Nowak, Order Rodentia, in: R.M. Nowak (Ed.), Walker's mammals species of the world, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA and London, UK, 1999, pp. 1273–1714.
- [74] L. Orlando, J.F. Mauffrey, J. Cuisin, J.L. Patton, C. Hänni, F. Catzeffli, Napoleon Bonaparte and the fate of an Amazonian rat: new data on the taxonomy of *Mesomys hispidus* (Rodentia: Echimyidae), *Mol. Phylogenet. Evol.* 27 (2003) 113–120.
- [75] L. Orlando, J.A. Leonard, A. Thenot, V. Laudet, C. Guerin, C. Hänni, Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships, *Mol. Phylogenet. Evol.* 28 (2003) 485–499.
- [76] T. Oshida, L. Liang-Kong, R. Masuda, M. Yoshida, Phylogenetic relationships among Asian species of *Petaurista* (Rodentia, Sciuridae), inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences, *Zool. Sci.* 17 (2000) 123–128.
- [77] S. Pääbo, Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA, *Nature* 314 (1985) 644–645.
- [78] S. Pääbo, Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1939–1943.
- [79] S. Pääbo, Of bears, conservation genetics, and the value of time travel, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 1320–1321.
- [80] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 645–679.
- [81] R.B. Payne, M.D. Sorenson, Museum collections as sources of genetic DNA, *Bonn. Zool. Beitr.* 51 (2002) 97–104.
- [82] A. Petitjean, ADN ancien et traitement contre les contaminations, mémoire de stage d'été, université de Bourgogne, 2005.
- [83] H.N. Poinar, M. Hofreiter, W.G. Spaulding, P.S. Martin, B.A. Stankiewicz, H. Bland, R.P. Evershed, G. Possnert, S. Pääbo, Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*, *Science* 281 (1998) 402–406.
- [84] M. Pruvost, R. Schwarz, V.B. Correia, S. Champlot, S. Braguier, N. Morel, Y. Fernandez-Jalvo, T. Grange, E.-M. Geigl, Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104 (2007) 739–744.
- [85] M. Robinson-Rechavi, L. Ponger, D. Mouchiroud, Nuclear gene LCAT supports rodent monophyly, *Mol. Biol. Evol.* 17 (2000) 1410–1412.
- [86] B. Shapiro, D. Sibthorpe, A. Rambaut, J. Austin, G.M. Wragg, O.R.P. Bininda-Emonds, P.L.M. Lee, A. Cooper, Flight of the dodo, *Science* 295 (2002) 1683–11683.
- [87] C.I. Smith, A.T. Chamberlain, M.S. Riley, A. Copper, C.B. Stringer, M.J. Collins, Neanderthal DNA: not just old but old and cold? *Nature* 410 (2001) 771–772.
- [88] M.S. Springer, W.J. Murphy, E. Eizirik, S.J. O'Brien, Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100 (2003) 1056–1061.
- [89] M. Street, Butchering activities at the Early Mesolithic site Bedburg-Königshoven, Rhineland, F.R.G., *Cranium* 7 (1990) 25–43.

- [90] A.J. Sutcliffe, K. Kowalski, Pleistocene rodents of the British Isles, *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.), Geology* 27 (1976) 31–147.
- [91] P. Taberlet, L. Fumagalli, Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals, *Mol. Ecol.* 5 (1996) 301–305.
- [92] G.H.H. Tate, Rodents of the genera *Rattus* and *Mus* from the Pacific Islands, collected by the Whitney South Sea Expedition, with a discussion of the origin and races of the Pacific Island rat, *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 68 (1935) 145–178.
- [93] W.K. Thomas, S. Pääbo, F.X. Villablanca, A.C. Wilson, Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens, *J. Mol. Evol.* 31 (1990) 101–112.
- [94] C. Tougard, P. Brunet-Lecomte, M. Fabre, S. Montuire, Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological and palaeontological data, *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 93 (2008) 309–323.
- [95] M. van Tuinen, U. Ramakrishnan, E.A. Hadly, Studying the effect of environmental change on biotic evolution: past genetic contributions, current work and future directions, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 362 (2004) 2795–2820.
- [96] R.K. Wayne, J.L. Leonard, A. Cooper, Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30 (1999) 457–477.
- [97] T.J. White, N. Arnheim, H.A. Erlich, The polymerase chain reaction, *Trends Genet.* 5 (1989) 185–189.
- [98] E. Willerslev, A. Cooper, Ancient DNA, *Proc. R. Soc. Lond. B* 272 (2005) 3–16.
- [99] G.M. Wilson, R.A. Den Bussche, K. McBee, L.A. Johnson, C.A. Jones, Intraspecific phylogeography of red squirrels (*Tamiasciurus hudsoni*) in the central Rocky Mountain region of North America, *Genetica* 125 (2005) 141–154.
- [100] D.Y. Yang, A. Cannon, S.R. Saunders, DNA species identification of archaeological salmon bone from the Pacific Northwest Coast of North America, *J. Archaeol. Sci.* 31 (2004) 619–631.

Annexe 4 : Informations supplémentaires à la PUBLICATION 3

ARVICOLINES FOSSILES	Genus	Species	References	m1 mm ²	m2 mm ²	m3 mm ²	m2/m1	m3/m1	Mean m2/m1	Mean m3/m1
	<i>Allophaiomys</i>	<i>pliocaenicus</i>	Massini and Torre 1990	2.94	1.724	1.058	0.586	0.360	0.586	0.360
	<i>Dicrostonyx</i>	<i>antiquitatis</i>	Chaline 1972	4.501	2.525	1.931	0.560	0.429	0.567	0.443
		<i>antiquitatis</i>	Chaline 1972	4.992	2.888	2.379	0.578	0.476		
		<i>antiquitatis</i>	Chaline 1972	4.589	2.613	2.066	0.560	0.450		
		<i>antiquitatis</i>	Chaline 1972	4.501	2.538	2.006	0.563	0.445		
		<i>antiquitatis</i>	Chaline 1972	4.738	2.636	1.920	0.556	0.405		
	<i>Dolomys</i>	<i>dalmarinus</i>	Kowalski 1958	2.176	1.244	0.927	0.572	0.426	0.549	0.393
		<i>episcopalis</i>	Kowalski 1958	1.943	1.098	0.804	0.565	0.414		
		<i>hungaricus</i>	Kormos 1930	5.064	2.587	1.725	0.511	0.341		
	<i>Lagurus</i>	<i>lagurus</i>	Koenigswald 1973	0.973	0.489	0.472	0.503	0.485	0.512	0.460
		<i>lagurus</i>	Chaline 1972	1.216	0.698	0.582	0.574	0.479		
		<i>lagurus</i>	Chaline 1972	1.142	0.563	0.513	0.493	0.449		
		<i>lagurus</i>	Chaline 1972	1.486	0.783	0.803	0.527	0.540		
		<i>lagurus</i>	Chaline 1972	1.455	0.700	0.664	0.481	0.456		
		<i>lagurus</i>	Chaline 1972	1.381	0.712	0.617	0.516	0.447		
		<i>pannonicus</i>	Kormos 1938	1.607	0.787	0.588	0.490	0.366		
	<i>Microtus</i>	<i>pennsylvanicus</i>	Hibbard 1963	2.152	1.225	0.926	0.569	0.430	0.569	0.430
	<i>Mimomys</i>	<i>cappettai</i>	Michaux 1971	2.972	1.571	0.964	0.529	0.324	0.613	0.467
		<i>newtoni</i>	Kormos 1938	1.558	0.727	0.615	0.467	0.395		
<i>newtoni</i>		Kormos 1938	0.94	0.710	0.556	0.755	0.591			
<i>newtoni</i>		Kormos 1938	1.508	0.976	0.837	0.647	0.555			
<i>newtoni</i>		Kormos 1938	1.738	0.955	0.719	0.549	0.414			
<i>reidi</i>		Chaline 1972	1.889	1.115	0.773	0.590	0.409			
<i>tornensis</i>		Chaline 1972	2.528	1.556	1.049	0.616	0.415			
<i>polonicus</i>		Kowalski 1960	2.664	1.792	1.551	0.673	0.582			
<i>pussilus</i>		Kowalski 1956	2.724	1.895	1.420	0.696	0.521			
<i>Ondatra</i>	<i>zibethicus</i>	Hibbard 1963	2.618	1.313	1.096	0.502	0.419	0.502	0.407	
	<i>annectens</i>	Hibbard and Dalquest 1966	6.515	3.083	2.55	0.473	0.391			
	<i>idahoensis</i>	Hibbard 1959	6.328	3.354	2.594	0.530	0.410			
<i>Ophiomys</i>	<i>parvus</i>	Hibbard and Zarzewski 1967	1.769	1.104	0.661	0.624	0.374	0.635	0.444	
	<i>taylori</i>	Hibbard and Zarzewski 1967	1.872	1.154	0.763	0.616	0.408			
	<i>taylori</i>	Hibbard and Zarzewski 1967	1.476	0.981	0.815	0.665	0.552			
<i>Pedomys</i>	<i>ochrogaster</i>	Hibbard 1963	2.845	1.544	0.911	0.543	0.320	0.543	0.320	
<i>Phaiomys</i>	<i>leucurus</i>	Repenning unpublished	2.307	1.114	0.731	0.483	0.317	0.513	0.354	
	<i>leucurus</i>	Repenning unpublished	2.192	1.128	0.815	0.515	0.372			
	<i>leucurus</i>	Repenning unpublished	1.739	0.942	0.651	0.542	0.374			
<i>Pliolemmus</i>	<i>antiquus</i>	Chaline 1987	2.179	1.028	0.731	0.472	0.335	0.472	0.326	
	<i>antiquus</i>	Hibbard 1972	2.384	1.124	0.756	0.471	0.317			
<i>Pliomys</i>	<i>lenki</i>	Bartolomei et al. 1975	1.389	0.678	0.509	0.488	0.366	0.519	0.370	
	<i>lenki</i>	Bartolomei et al. 1975	2.184	1.169	0.787	0.535	0.360			
	<i>lenki</i>	Bartolomei et al. 1975	2.051	1.067	0.762	0.520	0.372			
	<i>lenki</i>	Bartolomei et al. 1975	2.324	1.251	0.794	0.538	0.342			
<i>Promimomys</i>	<i>mimus</i>	Repenning 1968	1.829	1.233	1.268	0.674	0.693	0.674	0.693	
	<i>moldavicus</i>	Fejfar et al. 1990	2.824	2.076	1.539	0.735	0.545			
<i>Proneofiber</i>	<i>guildayi</i>	Hibbard and Dalquest 1973	2.638	1.404	0.918	0.532	0.348	0.541	0.361	
	<i>guildayi</i>	Hibbard and Dalquest 1973	2.496	1.371	0.933	0.549	0.374			

Annexes

ARVICOLINES ACTUELS	<i>Genus</i>	<i>Species</i>	<i>References</i>	<i>m1</i> <i>mm²</i>	<i>m2</i> <i>mm²</i>	<i>m3</i> <i>mm²</i>	<i>m2/m1</i>	<i>m3/m1</i>	<i>Mean</i> <i>m2/m1</i>	<i>Mean</i> <i>m3/m1</i>
	Arvicola		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	6.056	3.632	2.646	0.600	0.437	0.592
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.039	4.006	3.635	0.569	0.516		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	6.689	3.936	3.049	0.588	0.456		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.304	4.414	3.638	0.604	0.498		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.095	4.091	4.091	0.577	0.577		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.847	4.884	4.229	0.622	0.539		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	5.891	3.247	2.419	0.551	0.411		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	8.350	4.620	3.928	0.553	0.470		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.272	4.629	4.023	0.637	0.553		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	6.024	3.785	2.984	0.628	0.495		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	6.689	3.949	2.500	0.590	0.374		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	5.989	3.736	3.283	0.624	0.548		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.935	4.961	4.199	0.625	0.529		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	5.938	3.642	2.844	0.613	0.479		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.957	4.808	3.819	0.604	0.480		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	7.030	4.487	3.594	0.638	0.511		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	5.671	3.460	2.500	0.610	0.441		
		<i>sapidus</i>	CBGP collections (France)	6.840	4.331	3.473	0.633	0.508		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.356	2.895	2.410	0.541	0.450		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	4.650	3.028	2.356	0.651	0.507		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	6.154	3.363	2.562	0.546	0.416		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.006	2.537	2.011	0.507	0.402		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.446	3.310	2.585	0.608	0.475		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.472	2.937	2.237	0.537	0.409		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.163	3.504	2.556	0.679	0.495		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.664	2.974	2.556	0.525	0.451		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.571	2.863	2.278	0.514	0.409		
		<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	6.510	3.262	2.256	0.501	0.347		
	<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	5.610	3.222	2.689	0.574	0.479			
	<i>terrestris</i>	CBGP collections (France)	4.481	3.638	2.877	0.812	0.642			
Chionomys		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.231	1.716	1.537	0.531	0.476	0.562	0.488
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.354	1.868	1.772	0.557	0.528		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.430	1.758	1.61	0.513	0.469		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.432	1.969	1.663	0.574	0.485		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.051	1.637	1.400	0.537	0.459		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.442	2.009	1.698	0.584	0.493		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.547	2.009	1.785	0.566	0.503		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.155	1.827	1.441	0.579	0.457		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.649	1.936	1.731	0.531	0.474		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	2.232	1.305	1.092	0.585	0.489		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.074	1.684	1.456	0.548	0.474		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.945	2.256	2.014	0.572	0.511		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.171	1.657	1.501	0.523	0.473		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	2.497	1.359	1.047	0.544	0.419		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.325	1.810	1.594	0.544	0.479		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.102	1.806	1.650	0.582	0.532		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.243	1.85	1.673	0.570	0.516		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	2.784	1.85	1.689	0.665	0.607		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.020	1.733	1.315	0.574	0.435		
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.151	1.758	1.537	0.558	0.488		
	<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	3.086	1.780	1.469	0.577	0.476			
Myodes		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.386	1.405	1.031	0.589	0.432	0.591	0.468
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.537	1.456	1.219	0.574	0.480		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.584	1.688	1.163	0.653	0.450		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.231	1.359	1.054	0.609	0.472		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.383	1.427	1.160	0.599	0.487		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.417	1.371	1.091	0.567	0.451		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.264	1.402	1.106	0.619	0.489		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.240	1.266	0.926	0.565	0.413		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	1.787	1.080	0.770	0.604	0.431		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.437	1.330	0.972	0.546	0.399		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.487	1.363	1.082	0.548	0.435		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.114	1.290	1.035	0.610	0.490		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.098	1.258	0.902	0.600	0.430		
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.519	1.397	1.099	0.555	0.436		

Annexes

ARVICOLINES ACTUELS	Genus	Species	References	m1 mm ²	m2 mm ²	m3 mm ²	m2/m1	m3/m1	Mean m2/m1	Mean m3/m1
	Myodes	<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.421	1.390	1.160	0.574	0.479		
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.397	1.430	1.048	0.597	0.437			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.276	1.431	1.161	0.629	0.510			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.495	1.575	1.224	0.631	0.491			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.387	1.446	1.168	0.606	0.489			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.404	1.517	1.195	0.631	0.497			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.638	1.538	1.253	0.583	0.475			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	1.939	1.236	0.957	0.637	0.494			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.328	1.327	0.991	0.570	0.426			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.374	1.292	0.956	0.544	0.403			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	1.948	1.189	1.030	0.610	0.529			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.198	1.255	1.042	0.571	0.474			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.279	1.320	1.097	0.579	0.481			
<i>glareolus</i>		UBGD collections (France)	2.261	1.338	1.064	0.592	0.471			
<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.347	1.450	1.129	0.618	0.481				
Dicrostonyx	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	4.176	2.338	2.089	0.560	0.500			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.58	2.127	1.859	0.594	0.519			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.958	2.357	2.033	0.596	0.514			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.619	1.987	1.549	0.549	0.428			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.450	1.723	1.413	0.499	0.410			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.184	1.870	1.475	0.587	0.463			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.795	2.235	2.045	0.589	0.539			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	2.90	1.744	1.476	0.601	0.509			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	2.883	1.617	1.220	0.561	0.423			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.123	1.786	1.483	0.572	0.475			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.908	2.192	1.832	0.561	0.469			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.729	1.986	1.715	0.533	0.460			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.264	1.948	1.775	0.597	0.544			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.759	2.299	1.967	0.612	0.523			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.385	1.974	1.580	0.583	0.467	0.576	0.492	
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.695	2.220	1.781	0.601	0.482			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	4.280	2.550	2.151	0.596	0.503			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.304	2.042	1.595	0.618	0.483			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.254	1.881	1.621	0.578	0.498			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.212	1.969	1.667	0.613	0.519			
	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.299	2.012	1.678	0.610	0.509			
<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	3.249	1.974	1.729	0.608	0.532				
<i>torquatus</i>	UBGD collections (France)	4.005	2.283	2.295	0.570	0.573				
<i>torquatus</i>	UBGD collections (France)	4.559	2.193	1.924	0.481	0.422				
<i>torquatus</i>	UBGD collections (France)	4.513	2.385	2.107	0.528	0.467				
<i>torquatus</i>	UBGD collections (France)	3.850	2.168	1.854	0.563	0.482				
<i>torquatus</i>	UBGD collections (France)	4.561	2.664	2.601	0.584	0.570				
Ellobius	<i>lutescens</i>	Krystufek&Vohralik 2005	4.817	2.787	1.839	0.579	0.382	0.579	0.382	
Lemmus	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	3.533	2.556	2.536	0.723	0.718			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	4.240	3.182	3.009	0.750	0.710			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	4.575	3.396	3.623	0.742	0.792			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	3.693	2.839	3.231	0.769	0.875			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	4.235	2.947	3.416	0.696	0.807			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	4.467	3.145	3.414	0.704	0.764	0.736	0.766	
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	5.137	3.571	3.573	0.695	0.696			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	3.489	2.443	2.636	0.700	0.756			
	<i>lemmus</i>	UBGD collections (France)	4.81	3.621	4.339	0.753	0.902			
	<i>sibericus</i>	UBGD collections (France)	4.651	3.775	3.265	0.812	0.702			
	<i>sibericus</i>	UBGD collections (France)	4.749	3.364	3.210	0.708	0.676			
<i>sibericus</i>	UBGD collections (France)	4.924	3.840	3.894	0.780	0.791				
Microtus	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.378	1.298	0.961	0.546	0.404			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.126	1.046	0.847	0.492	0.398			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	1.974	0.968	0.825	0.490	0.418			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.042	0.954	0.814	0.467	0.399			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	1.975	0.935	0.792	0.473	0.401	0.505	0.412	
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.117	1.034	0.822	0.488	0.388			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.117	1.015	0.836	0.479	0.395			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.297	1.123	0.95	0.489	0.414			
	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	1.986	1.041	0.852	0.524	0.429			
<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.169	1.013	0.827	0.467	0.381				

Annexes

	Genus	Species	References	m1 mm ²	m2 mm ²	m3 mm ²	m2/m1	m3/m1	Mean m2/m1	Mean m3/m1
	ARVICOLINES ACTUELS	Microtus	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	2.329	1.122	0.86	0.482	0.369	0.505
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.142	1.135	0.923	0.530	0.431		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.283	1.179	0.910	0.516	0.399		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.422	1.285	1.024	0.531	0.423		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.125	1.105	0.962	0.520	0.453		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.394	1.246	1.128	0.520	0.471		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.104	1.257	0.933	0.597	0.443		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.130	1.059	0.850	0.497	0.399		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.161	1.107	0.884	0.512	0.409		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.006	1.014	0.878	0.505	0.438		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.375	1.181	0.979	0.497	0.412		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.102	0.987	0.826	0.470	0.393		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.233	1.197	0.924	0.536	0.414		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.360	1.138	1.019	0.482	0.432		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.496	1.205	0.894	0.483	0.358		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.308	1.180	1.122	0.511	0.486		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.000	1.039	0.860	0.520	0.430		
<i>arvalis</i>			CBGP collections (France)	2.070	1.106	0.935	0.534	0.452		
<i>arvalis</i>		CBGP collections (France)	2.250	1.131	0.799	0.503	0.355			
<i>arvalis</i>		CBGP collections (France)	2.086	1.014	0.785	0.486	0.376			
Microtus		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.672	1.493	1.530	0.559	0.573	0.516	0.437
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.901	1.506	1.386	0.519	0.478		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	3.303	1.697	1.459	0.514	0.442		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.837	1.449	1.378	0.511	0.486		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.325	1.195	0.947	0.514	0.407		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	3.031	1.558	1.328	0.514	0.438		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.670	1.461	1.191	0.547	0.446		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.542	1.395	1.132	0.549	0.445		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.814	1.358	1.231	0.483	0.437		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	3.066	1.557	1.539	0.508	0.502		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.533	1.276	1.043	0.504	0.412		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.170	1.161	0.875	0.535	0.403		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.755	1.396	1.248	0.507	0.453		
		<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.840	1.582	1.393	0.557	0.490		
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.812	1.448	1.178	0.515	0.419			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.749	1.356	1.173	0.493	0.427			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.842	1.511	1.091	0.532	0.384			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	3.085	1.449	1.306	0.470	0.423			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.798	1.398	1.285	0.500	0.459			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.624	1.497	1.223	0.571	0.466			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.929	1.502	1.258	0.513	0.429			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.352	1.187	1.105	0.505	0.470			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.820	1.447	1.128	0.513	0.400			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	3.042	1.456	1.170	0.479	0.385			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.502	1.137	0.877	0.454	0.351			
	<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.306	1.217	0.941	0.528	0.408			
<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.530	1.366	1.131	0.540	0.447				
<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.257	1.149	0.751	0.509	0.333				
<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	2.620	1.466	1.306	0.560	0.498				
<i>agrestis</i>	UBGD collections (France)	3.034	1.457	1.179	0.480	0.389				
Microtus	<i>brecciensis</i>	Chaline 1972	4.671	2.407	1.810	0.515	0.387	0.510	0.480	
	<i>brecciensis</i>	Chaline 1972	4.063	1.915	1.657	0.471	0.408			
	<i>brecciensis</i>	Chaline 1972	3.280	1.781	2.113	0.543	0.644			
Prometheomys	<i>schaposchnikowi</i>	Krystufek and Vohralik 2005	3.726	2.617	0.977	0.702	0.262	0.702	0.262	

Annexes

	<i>Genus</i>	<i>Species</i>	<i>References</i>	<i>m1</i> mm	<i>m2</i> mm	<i>m3</i> mm	<i>m2/m1</i>	<i>m3/m1</i>	<i>Mean</i> <i>m2/m1</i>	<i>Mean</i> <i>m3/m1</i>	
	EXTANT CRICETINES	<i>Cricetus</i>	<i>cricetus</i>	MNHN collections (France)	2.254	2.562	2.489	1.137	1.104	1.159	1.048
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.282	2.696	2.456	1.181	1.076			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.457	2.891	2.631	1.177	1.071			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.431	2.617	2.562	1.077	1.054			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.889	2.697	2.57	0.934	0.890			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.504	2.932	2.802	1.171	1.119			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.635	2.792	2.649	1.060	1.005			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.562	2.832	2.113	1.105	0.825			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.250	2.835	2.291	1.260	1.018			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	2.621	2.838	2.641	1.083	1.008			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	1.884	2.566	2.367	1.362	1.256			
<i>cricetus</i>			MNHN collections (France)	1.884	2.564	2.174	1.361	1.154			
<i>Phodopus</i>		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.525	0.475	0.306	0.905	0.583	0.862	0.597	
		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.582	0.485	0.369	0.833	0.634			
		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.577	0.513	0.299	0.889	0.518			
		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.668	0.518	0.299	0.775	0.448			
		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.668	0.483	0.341	0.723	0.510			
		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.648	0.564	0.320	0.870	0.494			
		<i>roborowskii</i>	MNHN collections (France)	0.698	0.550	0.366	0.788	0.524			
		<i>sungorus</i>	MNHN collections (France)	0.541	0.494	0.386	0.913	0.713			
		<i>sungorus</i>	MNHN collections (France)	0.628	0.517	0.402	0.823	0.640			
		<i>sungorus</i>	MNHN collections (France)	0.768	0.745	0.525	0.970	0.684			
		<i>sungorus</i>	MNHN collections (France)	0.747	0.741	0.615	0.992	0.823			
<i>Mesocricetus</i>		<i>auratus</i>	MNHN collections (France)	1.099	1.392	1.472	1.267	1.339	1.151	1.254	
		<i>auratus</i>	MNHN collections (France)	1.316	1.398	1.306	1.062	0.992			
		<i>auratus</i>	MNHN collections (France)	1.138	1.229	1.392	1.080	1.223			
		<i>auratus</i>	MNHN collections (France)	1.045	1.383	1.578	1.323	1.510			
		<i>brandti</i>	MNHN collections (France)	1.237	1.268	1.492	1.025	1.206			
FOSSIL CRICETINES		<i>Cricetus</i>	<i>barrieri</i>	Mein and Michaux 1970	3.322	3.262	3.101	0.982	0.933	1.025	0.934
			<i>aff. agustidens</i>	Aguilar 1986	4.531	4.835	4.234	1.067	0.934		
		<i>Eucricetus</i>	<i>atavus</i>	Vianey-Liaud 1972	1.214	1.409	1.209	1.161	0.996	1.197	1.031
			<i>quercyi</i>	Vianey-Liaud 1972	1.661	2.047	1.771	1.232	1.066		
		<i>Megacricetodon</i>	<i>aff. bavaricus</i>	Aguilar and Clauzon 1979	2.115	1.904	1.258	0.900	0.595	0.900	0.595

Table 1: Donn2es des mesures des aires de molaires des arvicolinés et des cricétinés actuels et fossiles. CBGP = Biology Center of Population Control (International Campus of Baillarguet, France). UBGD = University of Burgundy Geology Dijon (Dijon, France).

Annexes

Tableau 1

	<i>Genus</i>	<i>Species</i>	<i>References</i>	m1 mm ²	m2 mm ²	m3 mm ²	m2/m1	m3/m1	Mean m2/m1	Mean m3/m1
Fossile	<i>Dolomys</i>	<i>hungaricus</i>	Kormos 1930	4.015	2.587	1.725	0.644	0.430	0.672	0.471
		<i>episcopalis</i>	Kowalski 1958	1.570	1.098	0.804	0.699	0.512		
	<i>Pliolemmus</i>	<i>antiquus</i>	Chaline 1987	1.516	1.124	0.756	0.741	0.499	0.711	0.491
		<i>antiquus</i>	Hibbard 1972	1.511	1.028	0.731	0.680	0.484		
	<i>Proneofiber</i>	<i>guildayi</i>	Hibbard and Dalquest 1973	2.165	1.404	0.918	0.648	0.424	0.706	0.462
	<i>Lagurus</i>	<i>lagurus</i>	Koenigswald 1973	0.557	0.489	0.472	0.878	0.847	0.804	0.728
		<i>lagurus</i>	Chaline 1972	0.955	0.698	0.582	0.731	0.609		
<i>Pliomys</i>	<i>lenki</i>	Bartolomei et al. 1975	0.905	0.678	0.509	0.749	0.562	0.798	0.567	
	<i>lenki</i>	Bartolomei et al. 1975	1.379	1.169	0.787	0.848	0.571			
<i>Phaiomys</i>	<i>leucurus</i>	Repenning unpublished	1.479	1.114	0.731	0.753	0.494	0.753	0.494	
<i>Mimomys</i>	<i>cappettai</i>	Michaux 1971	2.187	1.571	0.964	0.718	0.441	0.745	0.457	
Actuel	<i>Dicrostonyx</i>	<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	2.341	1.986	1.715	0.848	0.733	0.871	0.773
		<i>groenlandicus</i>	UBGD collections (France)	2.18	1.948	1.775	0.894	0.814		
	<i>Chionomys</i>	<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	2.736	1.758	1.537	0.643	0.562	0.674	0.572
		<i>nivalis</i>	UBGD collections (France)	2.524	1.780	1.469	0.705	0.582		
	<i>Myodes</i>	<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	2.03	1.427	1.160	0.703	0.571	0.680	0.570
		<i>glareolus</i>	UBGD collections (France)	1.810	1.189	1.030	0.657	0.569		
	<i>Microtus</i>	<i>arvalis</i>	CBGP collections (France)	1.597	1.138	1.019	0.713	0.638	0.757	0.682
<i>arvalis</i>		CBGP collections (France)	1.554	1.246	1.128	0.802	0.726			

Table 2: mesures des arvicolinés don't la première molaire inférieure a été réduite artificiellement. Les aires des deuxièmes et troisièmes molaires inférieures restent inchangées. Les abbreviations sont les mêmes que pour le tableau 1.

Références bibliographiques :

- Aguilar, J.-P., and G. Clauzon. 1979. Un gisement à mammifères dans la formation lacustre d'âge Miocène moyen du Collet Redon près de St-Cannat (Bouches-du-Rhône). Implications stratigraphiques. *Palaeovertebrata*. 8:327-341.
- Aguilar, J.-P., M. Calvet and J. Michaux. 1986. Description des rongeurs Pliocènes de la faune du Mont-Hélène (Pyrénées-Orientales, France), nouveau jalon entre les faunes de Perpignan (Serrat-D'en-Vacquer) et de Sète. *Palaeovertebrata*. 16:127-144.
- Bartolomei, G., J. Chaline, O. Fejfar, D. Jánossy, M. Jeannet, W. von Koenigswald, and K. Kowalski. 1975. *Pliomys lenki* (Heller, 1930) (Rodentia, Mammalia) en Europe. Kraków, 1975. *Acta Zool. Crac.* 20:393-468 (in French with Polish and Russian summaries).
- Chaline, J. 1972. Les rongeurs du Pleistocene moyen et supérieur de France. *Cahier de Paléontologie*. Edition du C.N.R.S., Paris.
- . 1987. Arvicolid data (Arvicolidae, Rodentia) and Evolutionary concepts. *Evol. Biol.* 21:237-310.
- Fejfar, O., P. Mein, and E. Moissenet. 1990. Early arvicolids from the Ruscinian (Early Pliocene) of the Teruel Basin, Spain. Pp. 133-164 in O. Fejfar, and W. D. Heinrich, eds. *Int. Symp. Evol. Phyl. Biostr. Arvicolids*. Rohanov (Czechoslovakia) May 1987. Geological Survey, Praha.
- Hibbard, C. W. 1959. Late Cenozoic microtine rodents from Wyoming and Idaho. *Pap. Mich. Acad. Sci., Arts, and Letters*. 41:145-200.
- . 1963. A Late Illinonian fauna from Kansas and its climatic significance. *Pap. Mich. Acad. Sci., Arts, and Letters*. 48:187-221.
- . 1972. Early Pleistocene pre-glacial and glacial rocks and faunas of North-Central Nebraska. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 148:77-148.

- Hibbard, C. W., and W. W. Dalquest. 1966. Fossils from the Seymour Formation of Knox and Baylor counties, Texas, and their bearing on the Late Kansan climate of that region. *Contrib. Mus. Paleontol. Univ. Mich.* 21:1-66.
- . 1973. *Proneofiber*, a new genus of vole (Cricetidae: Rodentia) from the Pleistocene Seymour Formation of Texas, and its evolutionary and stratigraphic significance. *Quaternary Res.* 3:269-274.
- Hibbard, C. W., and R. J. Zarzewski. 1967. Phyletic trends in the Late Cenozoic microtine *Ophiomys* gen. nov., from Idaho. *Contrib. Mus. Paleontol. Univ. Mich.* 21:255-271.
- Kormos, T. 1930. Diagnosen neuer säugetiere aus der Oberpliozänen fauna des Somlyóberges bei Püspökfürdő. *Annales Mus. Nat. Hung.* 27:237-320.
- . 1938. *Mimomys newtoni* f. *major* und *lagurus pannonicus korm.*, zwei gleichzeitige verwandte wühlmäuse von verschniedener phylogenetischen entwicklung. *Math. Natur wiss. Anz. Ungar. Akad. Wiss.* 57:356-379.
- Kowalski, K. 1956. Insectivores, bats, and rodents from the early Pleistocene bone breccia of Podlesice near Kroczyce (Poland). *Acta Paleontol. Pol.* 1:331-394.
- . 1958. Altpleistozäne Kleinsäugerfauna von Podumci in Norddalmatien. *Palaeont. Jugosl.* 2:1-30.
- . 1960. Pliocene Insectivores and Rodents from Rebielice Krolewski (Poland). *Acta Zool. Crac.* 5:172-176.
- Kryštufek, B., and V. Vohtalík. 2005. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae. *Založba annales, Koper.*
- Massini, F., and D. Torre. 1990. Review of the Villafranchian arvicolids of Italy. Pp. 339-346 in O. Fejfar, and W. D. Heinrich, eds. *Int. Symp. Evol. Phyl. Biostr. Arvicolids. Rohanov (Czechoslovakia) May 1987.* Geological Survey, Praha.
- Mein, P., and J. Michaux. 1970. Un nouveau stade dans l'évolution des rongeurs Pliocènes de l'Europe sud-occidentale. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 270:2780-2783.
- Michaux, J. 1971. Arvicolinae (Rodentia) du Pliocène terminal et du Quaternaire ancien de France et d'Espagne. *Paleovertebrata* 4:138-214.
- Repenning, C. A. 1968. Mandibular musculature and the origin of the Subfamily Arvicolinae (Rodentia). *Acta Zool. Crac.* 13:29-72.
- Vianey-Liaud, M. 1972. Contribution à l'étude des cricétidés oligocènes d'Europe occidentale. *Palaeovertebrata.* 5:1-44.
- von Koenigswald, W. 1973. *Lagurus lagurus* from the upper Pleistocene travertine of Biedermann's Quarry (Stuttgert-Untertürkheim, Germany). *N. Jb. Geol. Paläont. Mh.* 143:23-38

Abstract:

Arvicolinae, voles, lemmings and muskrats appeared in Europe and Asia 5-6 million years ago. An explosive radiation was registered for this sub-family around 2 My at the onset of the Quaternary glacial/interglacial cycles. Anterior studies have demonstrated that the dental phenotype of modern and fossil voles and the genetic structuring are potentially related to climate changes. Therefore, several questions can be asked: Are the phenotypic and genetic response link to climate variation? What is the influence of internal factors (development) in the vole radiation? Can the hypotheses on vole genetic structuring during Quaternary be confirmed by paleogenetic studies? Our studies were particularly focused on the common vole (*Microtus arvalis*). This species is currently widespread all over Europe and has been present in the fossil record for about 470 000 years.

On Recent French populations of *M. arvalis*, we have demonstrated that the morphological structuring of the first lower molar is significantly correlated with climate, in particular, to temperature. In addition, the genetic structuring of vole populations is significantly correlated with their geographical distribution, which also depends on climate.

Developmental mechanisms can explain the molar organization inside the dental row. We have shown that each molar is a single developmental module, which reflects the underlying developmental mechanisms. Moreover, we have characterized the great elongation of the vole first lower molar by establishing a new developmental model. The evolution of dental development suggests that this elongation was unique and sudden in the vole radiation, at the onset of the upper Pliocene glacial cycles.

Paleogenetic studies in small mammals is nowadays a true challenge as the DNA preservation potentialities over 12 000 years seems to be limited. We have highlighted that DNA of owl pellet mandibles is degraded during rapacious digestion. Consequently, we have hypothesized that this degradation, anterior to the fossilization in cave sites, might be responsible of the low preservation of DNA in small mammals.

Thus, morphometry, modularity, Evo-Devo and paleogenetic studies can improve our knowledge in macro- and micro-evolution relationships involved in the radiation settings during past climate changes.

Key words: Arvicolinae, Morphometry, Climate, Quaternary, Macroevolution, Microevolution, Modularity, Development, Paleogenetic, Teeth.

Résumé :

Les Arvicolinae, campagnols, lemmings et rats musqués sont apparus en Europe et en Asie il y a environ 5-6 millions d'années. Ils ont connu une radiation explosive vers 2 Ma, coïncidant avec la mise en place des cycles glaciaires/interglaciaires du début du Quaternaire. Des études antérieures ont montré que le phénotype dentaire des campagnols actuels et fossiles et la structuration génétique des populations pouvaient être liés au climat. A partir de ces études plusieurs questions ont été posées : Existe-t-il véritablement un lien entre les réponses phénotypique et génétique et les variations du climat actuel ? Quelle peut être l'influence des facteurs internes (développement) dans la mise en place de la radiation des campagnols ? Peut-on confirmer les hypothèses de mise en place de la structuration génétique au cours du Quaternaire par l'étude de la paléogénétique chez les campagnols ? Nos études se sont focalisées en particulier sur le campagnol des champs (*Microtus arvalis*) car cette espèce est très répandue actuellement en Europe et elle est très présente dans le registre fossile depuis environ 470 000 ans.

Chez les populations françaises actuelles de *M. arvalis*, la structuration morphologique de la première molaire inférieure est significativement corrélée au climat, notamment la température. De plus, la structuration génétique des populations est corrélée significativement à leur distribution géographique, elle-même dépendante du climat.

Les mécanismes développementaux permettent de comprendre l'organisation des molaires au sein de la rangée dentaire. Nous avons montré que chaque molaire constituait un module développemental reflétant les mécanismes du développement sous-jacents. En outre, nous avons proposé un modèle de développement permettant de caractériser l'allongement important de la première molaire inférieure chez les campagnols. L'évolution du développement dentaire suggère une mise en place unique et brutale de cet allongement au moment de la deuxième radiation des campagnols, lors de l'installation des cycles glaciaires de la fin du Pliocène.

L'étude de la paléogénétique chez les petits mammifères constitue aujourd'hui un véritable challenge, car les possibilités de préservation de l'ADN au-delà de 12 000 ans semblent limitées. Nous avons pu montrer que l'ADN des mandibules de pelotes de rejection était dégradé lors de la digestion par les rapaces. Cette dégradation, antérieure à la fossilisation dans les sites de grottes, peut-être à l'origine de la préservation difficile de l'ADN chez les petits mammifères.

Ainsi, l'étude couplée de la morphométrie, de la modularité, de l'Evo-Dévo et de la paléogénétique peut permettre de comprendre les interactions entre échelles macro- et micro-évolutives influant sur la mise en place des radiations au cours des changements climatiques passés.

Mots clés : Arvicolinae, Morphométrie, Climat, Quaternaire, Macroévolution, Microévolution, Modularité, Développement, Paléogénétique, Dents.