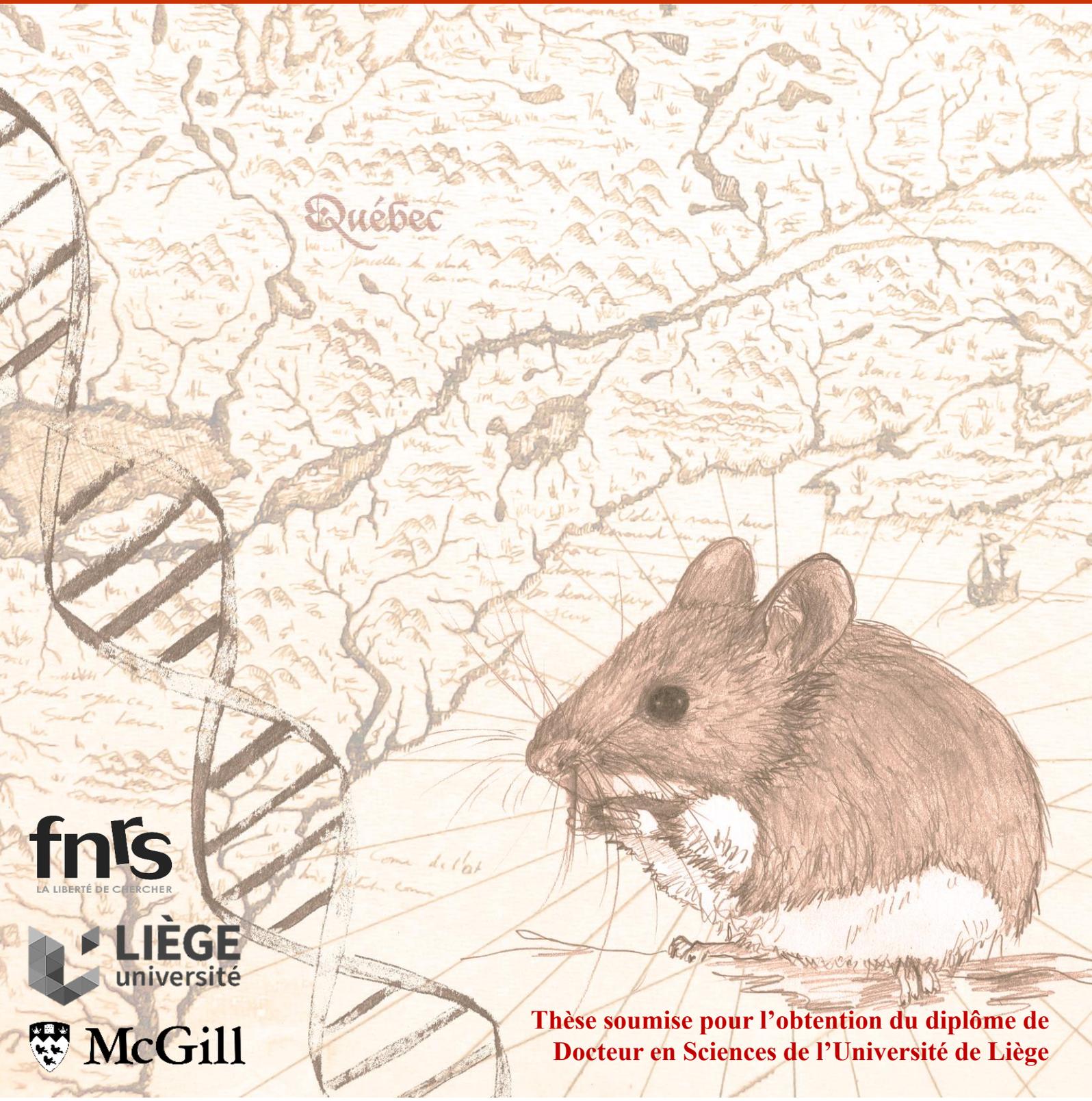


CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES D'UN MICROMAMMIFÈRE EN EXPANSION : LA SOURIS À PATTES BLANCHES

Adrien ANDRÉ

Mai 2017

Directeurs de thèse : Johan MICHAUX & Virginie MILLIEN



fnr
LA LIBERTÉ DE CHERCHER

LIÈGE
université

 **McGill**

Thèse soumise pour l'obtention du diplôme de
Docteur en Sciences de l'Université de Liège



Université de Liège
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Vie
Laboratoire de Génétique de la conservation

Caractéristiques biologiques
d'un micromammifère en expansion :
La souris à pattes blanches

Thèse soumise et présentée par
Adrien ANDRÉ

pour l'obtention du diplôme de
Docteur en Sciences de l'Université de Liège

Mai 2017

Directeurs de thèse :

Johan Michaux
&
Virginie Millien

Comité de thèse :

Johan Michaux (*directeur*)
Virginie Millien (*co-directrice*)
Alain Vanderpoorten
Serge Morand

Jury de thèse :

Alain Vanderpoorten (*ULg, président*)
Johan Michaux (*ULg, directeur*)
Virginie Millien (*McGill University, co-directrice*)
Olivier Plantard (*Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, Nantes*)
Claire Remacle (*ULg*)
Denis Baurain (*ULg*)

Couverture

Dessins : Julie Pitoors
Design : Adrien André & Renaud Petry

Remerciements

J'aimerais commencer par remercier Johan, mon directeur tout au long de ces quatre années de thèse. Tu t'es toujours montré très motivant, tout en me laissant une grande liberté dans mon travail, tu as toujours été très disponible et ce malgré la distance. J'ai découvert au fur et à mesure que nous partagions beaucoup de points de vue, que ce soit dans le domaine scientifique mais aussi dans la vie en général. J'aimerais donc te remercier du fond du cœur Johan, de m'avoir fait confiance dès le début, et de m'avoir soutenu dans les moments un peu plus difficiles.

J'aimerais aussi remercier ma co-directrice, Virginie, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire à l'université McGill à Montréal. J'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés. Merci pour les nombreux conseils que tu m'as donnés et les multiples relectures qui ont permis d'améliorer grandement la qualité du présent travail et des articles qui le composent.

Merci à Alexis Ribas qui m'a initié à la parasitologie et avec qui j'ai beaucoup apprécié collaborer, que ce soit lors d'un séjour à Barcelone ou à Udon Thani.

Merci aux deux autres membres de mon comité de thèse, Alain Vanderpoorten et Serge Morand.

Merci au Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS et au FRIA pour le financement qui a permis la réalisation de cette thèse de doctorat.

J'estime être une personne extrêmement chanceuse dans bien des aspects de la vie en général, et particulièrement avec les personnes qui m'entourent. Je saisis donc l'opportunité qui m'est donnée pour les remercier ici.

Ma petite famille tout d'abord, avec mes parents, Patrick et Nathalie. Dans le cadre d'une formation, j'ai un jour dû apporter un objet symbolisant mes parents. C'est une carte de scopa que j'avais choisi, le « settebello ». Pourquoi ? Parce que c'est la meilleure carte du jeu, celle que chacun rêve d'avoir dans sa main. Je suis reconnaissant au sort de m'avoir fait naître dans cette famille aimante, qui a toujours su m'encourager dans les différents choix que j'ai entrepris. Je vous aime très fort et j'aimerais vous dédier ce travail qui pour moi représente l'accomplissement de mon éducation que vous avez démarré il y a 30 ans. Merci aussi Maman pour les multiples corrections orthographiques que tu as effectuées. (Cette partie n'est pas passée sous ton œil avisé, j'espère ne pas avoir laissé passer trop d'erreurs !)

Ma vie n'aurait pas été aussi colorée sans la présence de mon frère et de ma sœur, Lucas et Irène, qui m'ont vite rejoint avec qui nous formons désormais une fratrie d'enfer !

Un grand merci tout particulier à mon amoureuse, Justine.

Merci à mes grands-parents, Odile et Philippe ainsi que Jacques et Monique. Merci aussi à mes grandes tantes, Ginette et Odette.

Merci à mes oncles et tantes, parrain et marraine, Lydie, Pascal, Jean-Paul et Françoise,

Merci à mes cousins, Stéphane, Yann, Marine, Anne-Lise, Paul, Gaétan, Clara, aux valeurs ajoutées – Marianne, Vincent, William -, ainsi qu'à toute la nouvelle génération. Grâce, à vous, le professeur des champignons existera peut-être un jour pour du vrai !

Je ne serais pas grand-chose sans toutes ces personnes qui m'ont offert leur précieuse amitié à un moment ou l'autre dans ma vie :

À mon meilleur ami François (mon MEILLEUR ami !), à défaut d'être mon frère de sang, tu es mon frère de cœur depuis plus de 15 ans maintenant ! merci pour tout ce que tu m'as apporté !

À Léo, l'histoire de ma thèse est intimement liée à la tienne. Je te remercie de m'avoir rejoint à Montréal il y a maintenant 6 ans de cela. Ce fut un plaisir de partager tous ces bons moments, ici et là-bas, avec toi.

À toute la troupe des Grunhaut – Dorian, Justine, Marc, Grand Max, Caro, Fany – il est bon de savoir que vous m’entourez et que je peux compter sur vous.

À mes colocs et anciens colocs. Un soir que je n’arrivais pas à m’endormir, j’ai fait le compte des personnes avec qui j’avais partagé un toit. Je me suis arrêté passé les 40, perdu dans les souvenirs que cela a fait remonter. Que ce soit chez les Marquises, à Sherbrooklyn, au Palacio, aux koteaux, à la coloc du frère Orban ou celle du bon vieux curé Ramoux, j’ai à chaque fois vécu de belles expériences, partagé plus que juste un appartement avec de belles personnes, qui m’auront marqué, chacune par leur style de vie, leur originalité propre, leur gentillesse ou encore par leur sens de l’accueil et du partage. La personne qui me fera quitter la vie en collocation devra avoir de bien bons arguments...

À mes amis de l’université – Fred, Mouchette, Maxou, Ren, Romo, Lola, Adelin A., Justine, Choupito, Coline, Pierre, Thomas, Oli, Christophe, François, Yvos, Cécile et tous les autres – Vous avez chacun fait, à votre manière que mes 5 ans à l’université soient une aventure à la fois douce, et folle. Je suis enchanté d’avoir gardé contact avec vous tous et d’avoir vécu notre amitié bien au-delà de l’enceinte universitaire, que ce soit pour des séjours à Ténériffe, sur un canot le long d’une rivière au Québec, à vélo dans le Connemara, entre deux scènes de concert à Dour ou à Budapest, dans un gîte ardennais ou comblinois, entre deux bars à Dublin et si souvent juste ici à Lidge !

A mes amis de secondaires, et plus particulièrement Roulio, Kim, JP, Christophe, Philou et Jon. Les années passent mais vous êtes toujours là !

Merci à tous mes oufti-potes de l’équipe d’ultimate de Liège : Ouftimate ! Tous les Tchantchès et les Nanesses qui m’ont fait découvrir un sport fabuleux !

Merci à mes labmates aussi. En commençant par Alice Mouton, sans qui je n’aurais sûrement jamais commencé cette aventure doctorale. Merci de m’avoir coaché au tout début ! Merci aussi à François, avec qui j’ai trouvé très agréable de collaborer et j’espère que cette collaboration se poursuivra pour de nouvelles aventures !

Merci aussi à Laurent qui m’a rendu très souvent service ainsi qu’à toutes les autres personnes, chercheurs comme étudiants avec qui j’ai partagé le bureau ou le labo.

Merci à mes labmates québécois aussi, en particulier Cédric, Shaun, Robby, Julie, Jorge et Rodrigo, ainsi que tous les autres qui ont participé de près ou de loin aux campagnes d’échantillonnage.

Merci à tous mes amis québécois, et en particulier Jean-Martin, la plus belle crisse de personne que j’aie rencontré outre-atlantique. Merci aux Charlie’s Angels et à toute la bande des Nazes.

Et puis merci aux inclassables :

Victor, malgré que nos vies aient pris des trajectoires différentes, tu es, depuis près de trente ans toujours mon frère de pot !

Merci à Fanny, ma sparring partner de toujours, en athlétisme comme à Civilization.

Merci à Gaël, mon partner d’escalade préféré !

Merci à mes autres partners d’escalade qui m’ont permis de me vider la tête tout comme les bras. Un merci tout particulier à Julie Pitoors qui m’a généreusement proposé les magnifiques dessins figurant dans ce travail.

Merci à Philippe Seijkens et Dominique Andrès, deux personnes qui ont été très importantes à des moments différents de ma vie.

Merci à vous tous donc pour vos encouragements, mais aussi pour les sourires que vous m’avez adressés et les rires que nous avons partagés. On m’a demandé récemment quel était l’accomplissement qui me rendait le plus fier. La question n’était pas facile et je n’ai d’ailleurs pas trouvé de réponse sur le moment même. La réponse m’est cependant venue quelques jours plus tard : Mon plus grand accomplissement a été de vous avoir rencontré, toutes et tous, et d’avoir su vous garder auprès de moi, et de compter aujourd’hui encore, parmi vos amis.

J’en suis chaque jour un peu plus fier et plus heureux.

À l’amour, à l’amitié !

Préface

La science, au fur et à mesure de son évolution, s'est complexifiée. Le temps où de grandes découvertes se faisaient en s'immergeant dans son bain est révolu depuis bien longtemps. Nous vivons à une époque où la plupart des pommes les plus accessibles de l'arbre ont déjà été cueillies. Si l'on veut obtenir sa part, il faut donc s'équiper des meilleurs outils.

Or la complexité des méthodes mises en œuvre rend parfois difficile la communication des résultats obtenus. D'une part, j'ai le sentiment que la science est aujourd'hui devenue une discipline trop hermétique. De l'autre, j'observe de plus en plus souvent de courts articles de presse relatant de récentes découvertes scientifiques qui ne s'embarrassent pas de détails trop encombrants, menant alors à des raccourcis simplistes, voire dangereux. Ces résultats de pseudo-vulgarisation, pris pour acquis, sont alors relayés par les réseaux sociaux et des demi-vérités font alors loi pour une grande partie de la population.

Il me semble qu'il appartient donc aux scientifiques eux-mêmes de vulgariser leurs recherches, en y incluant les nuances que d'autres préfèrent omettre. J'ai donc souhaité écrire une thèse destinée bien sûr à la communauté scientifique, tout en étant la plus accessible possible pour les personnes non scientifiques de formation. Une attention toute particulière a été portée à l'introduction. J'y relate notamment un bref historique de la biogéographie, ainsi que quelques anecdotes scientifiques qui m'ont marqué pendant ces cinq années de recherche et qui, je l'espère, maintiendront l'intérêt du lecteur.

Après cette introduction suivent les chapitres 2 à 6 qui relatent les différents résultats obtenus tout au long de ce travail. Quatre articles viennent les étoffer. Ils sont rédigés en anglais comme l'exige ce type de travail. Deux sont déjà publiés dans des revues à comité de lecture (Article 1 : **André A**, Millien V, Galan M, Ribas A, Michaux J. (2017) Effects of parasite and historic driven selection on the diversity and structure of a MHC-II gene in a small mammal species (*Peromyscus leucopus*) undergoing range expansion. **Evolutionary Ecology** doi:10.1007/s10682-017-9898-z ; Article 3 : **André A**, Mouton A, Millien V, Michaux J. (2017) Liver microbiome of *Peromyscus leucopus*, a key reservoir host species for emerging infectious diseases in North America. **Infection, Genetics and Evolution** 52: 10-18) tandis que les deux autres seront soumis dans les prochains jours (Article 2 : **André A**, Ribas A, Millien V, Michaux JR ; Helminths of the white-footed mouse (*peromyscus leucopus*) along its expanding range in quebec. Prochainement soumis à **Acta Parasitologica** ; Article 4 : **André A**, Gaitan J, Michaux JR, Millien V ; Long-term stress level in a small mammal species undergoing range expansion. Prochainement soumis à **Canadian Journal of Zoology**). Le septième et dernier chapitre apporte une discussion générale des résultats ainsi qu'une conclusion et des perspectives pour l'avenir. Enfin, deux papiers auxquels j'ai contribué sont annexés à la fin de ce document car ils ne présentent pas de lien direct avec le reste de la thèse. Seul l'abstract est repris pour le premier, puisque celui-ci, bien qu'il ait été soumis, n'a pas encore été accepté (Article 5 : Biffi M, Laffaille P, Jabiol J, **André A**, Gillet F, Lamothe S, Michaux J, Buisson L ; Is there a trophic overlap between the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* and the Eurasian water shrew *Neomys fodiens*? Comparison of diet and prey selectivity using next-generation sequencing methods ; Soumis à **Mammalian Biology**). Le second article est quant à lui présenté dans sa version publiée (Article 6 : Torres, J., Miquel, J., Fournier-Chambrillon, C., **André, A.**, Maya, F. U., Carrera, G. G., Fournier, P. (2016). First report of *Filaria martis* Gmelin, 1790 in the European mink, *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761). **Parasitology research**, 115(6), 2499-2503).

Je vous souhaite une bonne lecture.

Table des matières

Préface	8
Chapitre 1 : Introduction générale	13
1.1) Une brève histoire de la biogéographie	14
1.2) Dynamisme des aires de distribution	20
1.2.1) Climat	21
1.2.2) Génétique.....	22
1.2.3) Pression de pathogènes et prédateurs.....	24
1.2.4) Niveau de stress	26
1.2.5) Niveau de santé.....	34
1.3) Objectifs de la thèse.....	35
1.4) Espèce étudiée : <i>Peromyscus leucopus</i>	37
1.4.1) Généralités	38
1.4.2) Maladie de Lyme	42
1.4.2.1) Histoire et écologie de la maladie de Lyme	42
1.4.2.2) La maladie de Lyme chez l'Homme	44
1.4.3) Compétence de réservoir de la souris à pattes blanches	45
1.4.3.1) Maladie de Lyme	45
1.4.3.2) Autres maladies.....	47
1.4.4) Pathogènes et prédateurs de la souris à pattes blanches	48
1.5) Zone d'étude	50
1.6) Contexte méthodologique	52
1.6.1) Récolte des échantillons.....	52
1.6.2) Mesures de stress.....	53
1.6.3) Parasitologie.....	54
1.6.4) Génétique.....	54

1.6.4.1) Séquençage nouvelle génération	54
1.6.4.2) Séquençage Sanger	56
1.6.5) Traitement bio-informatique	57
Chapitre 2 : Structure génétique (gène sélectionné et gène neutre)	60
2.1) Avant-propos.....	61
2.2) Etude à l'échelle du Québec.....	62
2.3) Article 1 : Etude à large échelle géographique	64
Chapitre 3 : Parasitologie	82
3.1) Avant propos	83
3.2 Article 2	84
3.3 Prévalences en parasites internes et externes de la souris à pattes blanches dans le sud du Québec.....	101
3.4 Impact des parasites sur le niveau de santé des souris hôtes.	104
Chapitre 4 : Bactériologie	110
4.1 Avant-propos.....	111
4.2) Article 3	113
Chapitre 5 : Niveau de stress.....	123
5.1) Avant-propos et résumé de l'article 4	124
5.2) Article 4	125
Chapitre 6 : Niveau de santé	146
Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives	150
7.1) Facteurs biotiques et potentiel d'expansion de la souris à pattes blanches au Québec.	151
7.2) Structure génétique de la souris à pattes blanches.....	153
7.3) Parasitologie de la souris à pattes blanches	153
7.4) Bactériologie de la souris à pattes blanches.....	154
7.5) Comparaison des méthodes d'évaluation du stress à long terme	155
7.6) Comment réduire l'émergence de la maladie de Lyme dans le paysage québécois ?	156

7.7) Conclusion générale	161
Bibliographie	162
Annexes.....	174
Article 5 :	174
Article 6 :	175

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1) Une brève histoire de la biogéographie

Chaque espèce, qu'elle soit animale ou végétale est caractérisée par une aire de distribution qui lui est propre. Celle-ci se définit comme la zone à l'intérieur de laquelle se trouve l'intégralité des individus de l'espèce. La biogéographie est la science qui étudie ces aires de distribution. Elle a passionné nombre de scientifiques et ce depuis des centaines d'années.

Comme pour beaucoup d'autres disciplines scientifiques, c'est à Aristote (384 - 322 av. J.-C. ; Fig. 1) que l'on attribue généralement le fait de s'être posé en premier une des questions centrales de la biogéographie, à savoir : « Comment les organismes se distribuent-ils autour du monde? ».

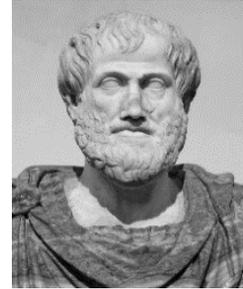


Figure 1 : Buste d'Aristote d'après Lysippus

Carl Linnaeus (1707- 1778 ; fig. 2), père-fondateur de la systématique, est une des premières personnes à avoir tenté de répondre à cette question en élaborant l'hypothèse de la « Montagne paradisiaque ». Linnaeus affirmait que les différentes espèces connues provenaient des flancs d'une colossale montagne (le mont Ararat) en y étant distribuées selon leurs

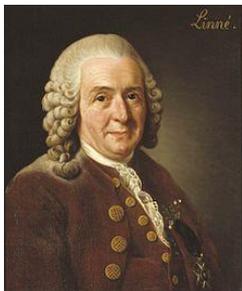


Figure 2 : portrait de Carl Linnaeus, peint par Alexander Roslin

préférences écologiques. Il y a de cela 6000 ans, suite à une descente massive du niveau des eaux, les terres telles que nous les connaissons aujourd'hui auraient émergé, permettant aux différentes espèces de s'y disperser. Cette hypothèse, que nous savons erronée aujourd'hui, avait cela de commode à l'époque qu'elle n'allait pas à l'encontre des croyances bibliques. En effet, le mythe de l'Arche de Noé pouvait très bien s'inscrire dans cette hypothèse en tant qu'événement postérieur. Linnaeus n'infirme donc pas les principes du fixisme des espèces, autre pilier de la croyance biblique.

A la même époque, Georges Louis Leclerc, comte de Buffon (1707- 1788), après avoir étudié des mammifères vivants mais aussi fossilisés, arrive à des conclusions différentes. Pour lui, les espèces proviendraient plutôt de l'extrême nord de l'Europe de l'Ouest. Il émet aussi l'idée du dynamisme du climat et de l'adaptation des espèces à ce dernier. Selon lui, certaines espèces s'amélioreraient et survivraient, tandis que d'autres dégénéraient et disparaîtraient. Dans son ouvrage principal, "L'Histoire Naturelle, générale et particulière, avec la description du Cabinet du Roi" (fig.

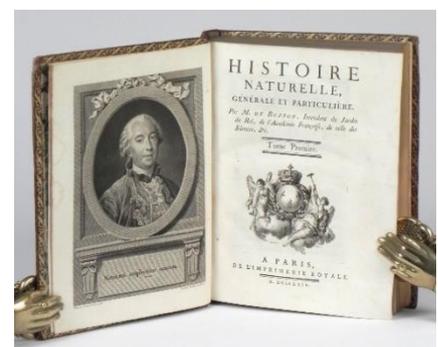


Figure 3 : édition de L'Histoire Naturelle, générale et particulière, avec la description du Cabinet du Roi

3), Buffon instaure un des premiers principes de la biogéographie, connu sous le nom de loi de Buffon.

Celle-ci affirme que des régions environnementalement similaires mais isolées l'une de l'autre présenteront des assemblages fauniques différents.

Quelques dizaines d'années plus tard, Alexander Von Humboldt (1769-1859) permit à la biogéographie de faire plusieurs bonds en avant. C'est à lui que l'on doit en premier les lignes isothermes sur les cartes, reliant les zones géographiques aux températures similaires (fig. 4).

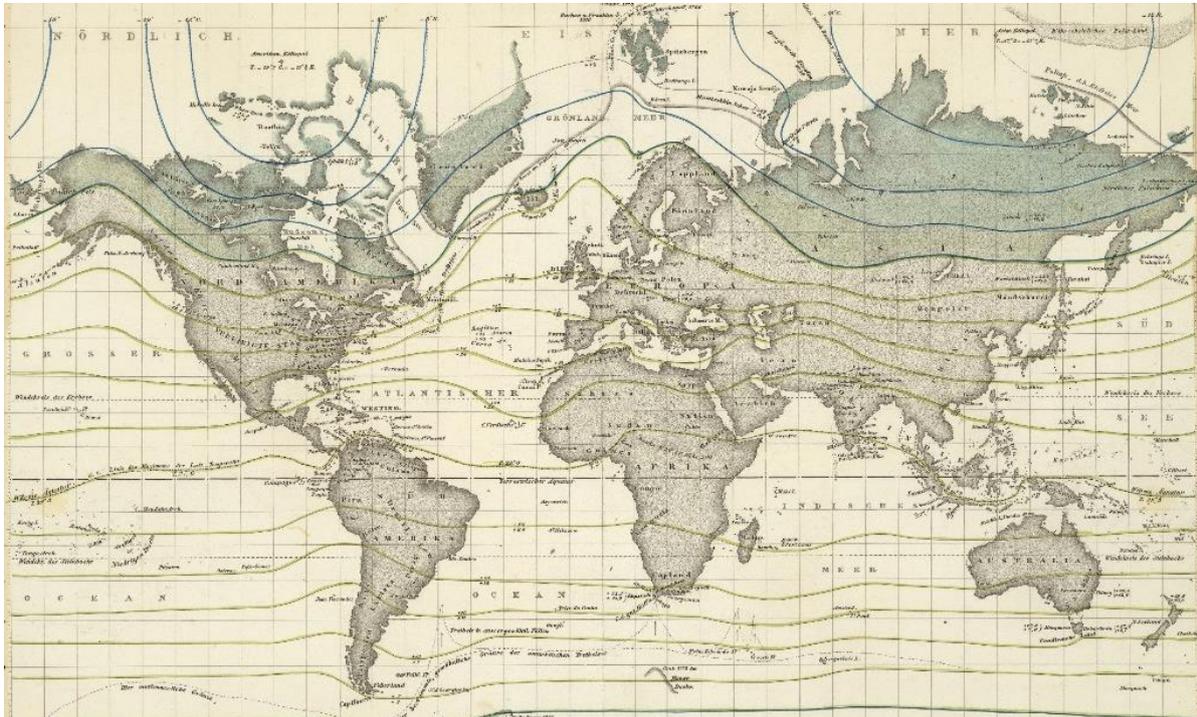


Figure 4 : Carte des courbes isothermes de A. von Humboldt (1849).

Il fut aussi le premier à diviser la terre en régions biogéographiques définies comme tropicales, tempérées et arctiques. Il remarqua aussi qu'à l'intérieur de ces régions, les assemblages d'espèces se structuraient en fonction de l'altitude.

Le 19^{ème} siècle vit naître lui aussi plusieurs avancées majeures dans le domaine de la biogéographie, notamment grâce aux travaux de Charles Lyell (1797 – 1875 ; fig. 5), de Charles Darwin (1809-1882) ou encore d'Alfred Russel Wallace (1823-1913).



Figure 5 : portrait de Charles Lyell par E.H. Jeans.

Le premier, s'appuyant sur l'étude qu'il fit des fossiles et de la géologie en général, émit l'hypothèse que puisque le climat évoluait de manière dynamique, les distributions d'espèces devaient évoluer en parallèle. Il fut aussi un des premiers à imaginer que les espèces résultent de plusieurs événements de création et que certaines d'entre elles avaient même pu s'éteindre par le passé. Ses recherches le poussèrent même à penser que la Terre pouvait être plus âgée que les 6000 ans

qu'on lui attribuait encore à l'époque. Toutes ces avancées scientifiques s'inscrivirent ainsi aux antipodes des préceptes bibliques.

Charles Darwin (fig. 6) s'intéressa lui aussi de très près à la biogéographie. Il y consacre d'ailleurs plusieurs chapitres de son œuvre magistrale « L'origine des espèces », en particulier le 12^{ème} et le 13^{ème} : « Distribution géographique (et suite) ». Dans ces chapitres, il relate notamment son expérience vécue dans l'archipel des Galápagos, au large de l'Amérique du Sud. Contrairement à la théorie traditionnellement acceptée par ses contemporains selon laquelle chaque espèce avait été spécialement créée pour vivre à l'endroit auquel on la trouvait, Darwin émet l'hypothèse, en se basant sur l'observation dans ces îles, que les différentes espèces auraient évolué à partir d'une espèce parente se trouvant, dans ce cas, sur le continent.

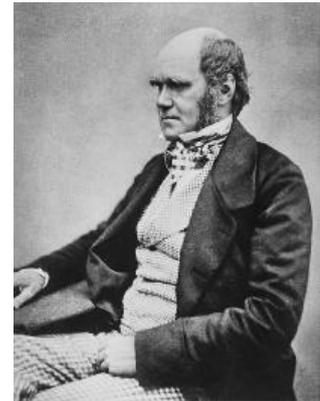


Figure 6 : photo de Charles Darwin prise par H. Maull et J. Fox (1854).

Alfred Russel Wallace, codécouvreur avec Charles Darwin de la théorie de l'évolution par la sélection naturelle, est souvent considéré comme le père de la biogéographie. C'est à lui que l'on doit par exemple la mise en évidence des différentes régions zoogéographiques (fig. 7), concept toujours d'actualité aujourd'hui. Dans l'ouvrage qu'il publie en 1876, « The Geographical Distribution of Animals », Wallace distingue en effet six régions. Il intègre les effets de différentes glaciations ainsi que ceux provoqués par l'apparition et la disparition des ponts de terre reliant ou ayant relié un continent à un autre.

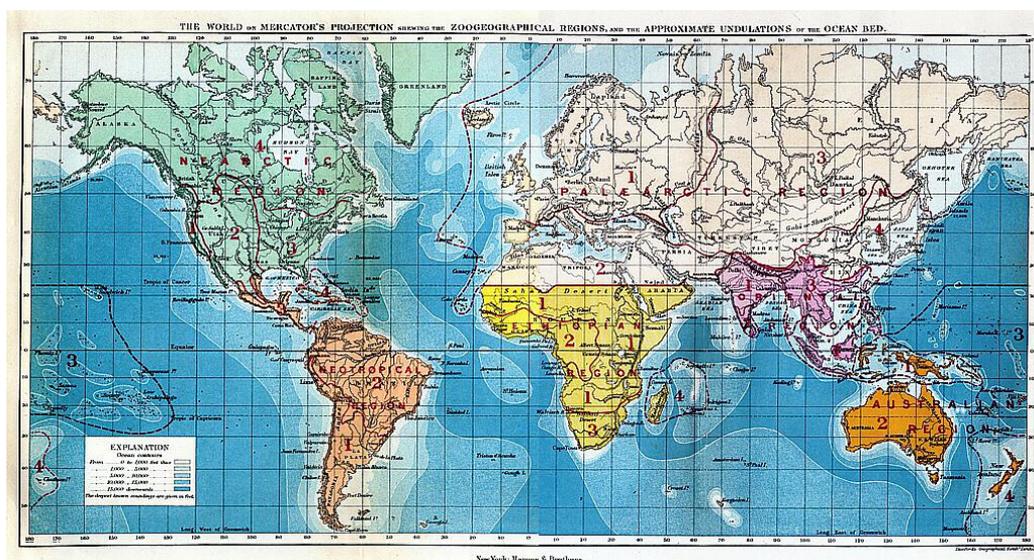


Figure 7 : "Le monde en projection de Mercator montrant les régions zoogéographiques et les ondulations approximatives du lit océanique" par A. R. Wallace (1876).

L'ouvrage du 20^{ème} siècle qui eut la plus grande influence dans le domaine de la biogéographie classique fut peut-être celui publié en 1967 par Robert MacArthur et Edward Osborne Wilson intitulé "The theory of island biogeography" (fig. 8). Ils y démontrent que la richesse spécifique d'une île

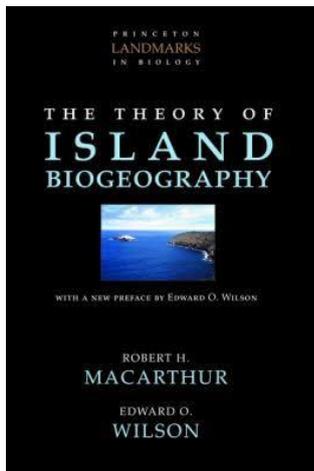


Figure 8 : édition de "la théorie de la biogéographie des îles" par R. MacArthur.

s'explique par des facteurs tels que sa surface mais aussi par les phénomènes d'immigration et d'extinction des espèces, idée relativement neuve pour l'époque. Le terme « île », originalement réservé aux îles océaniques, s'est ensuite généralisé à n'importe quel écosystème spécifique entouré d'un habitat différent. Cette publication a joué un rôle prépondérant en conservation de la nature et plus particulièrement dans la gestion des réserves naturelles grâce à la fameuse question « SLOSS ? » (Single Large Or Several Small ?) : Vaut-il mieux créer une seule réserve naturelle de grande taille ou plusieurs de petite taille ? D'après les auteurs, à surface égale, il serait préférable de mettre en place une seule grande réserve plutôt que plusieurs petites.

La dernière grande révolution en matière de biogéographie fut provoquée par l'arrivée de la génétique, à l'origine d'une nouvelle discipline, la phylogéographie. Cette science, dont le nom a été introduit la première fois par John Avise, a pour but principal mais non exclusif, d'étudier, en se basant sur des données génétiques, les processus historiques responsables de la distribution géographique actuelle des populations (Avise 2000) (fig. 9). Le séquençage de gènes mitochondriens humains a par exemple permis de retracer l'histoire migratoire de l'homme moderne. En 1987, Cann et al. publient une théorie au retentissement phénoménal, non seulement au sein de la communauté scientifique, mais aussi auprès du grand public.

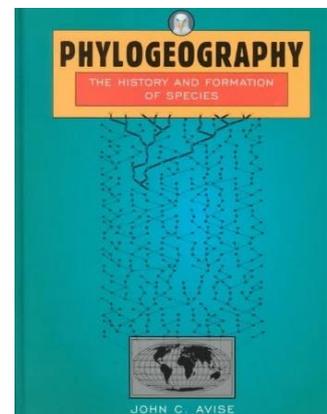


Figure 9 : édition de "Phylogeographie ; l'histoire et la formation des espèces" par J. Avise

Leur découverte se base sur l'étude du génome mitochondrial qui a la particularité d'être transmis de mère en fille uniquement. Grâce au séquençage d'une partie de celui-ci auprès de 134 personnes provenant des quatre coins du monde, ils ont mis en évidence l'existence de l'Eve mitochondriale (fig. 10). Autrement dit, une femme qui aurait vécu en Afrique entre 100 000 et 200 000 ans avant notre ère, et qui serait l'ancêtre commune de chaque être humain vivant actuellement sur la planète.

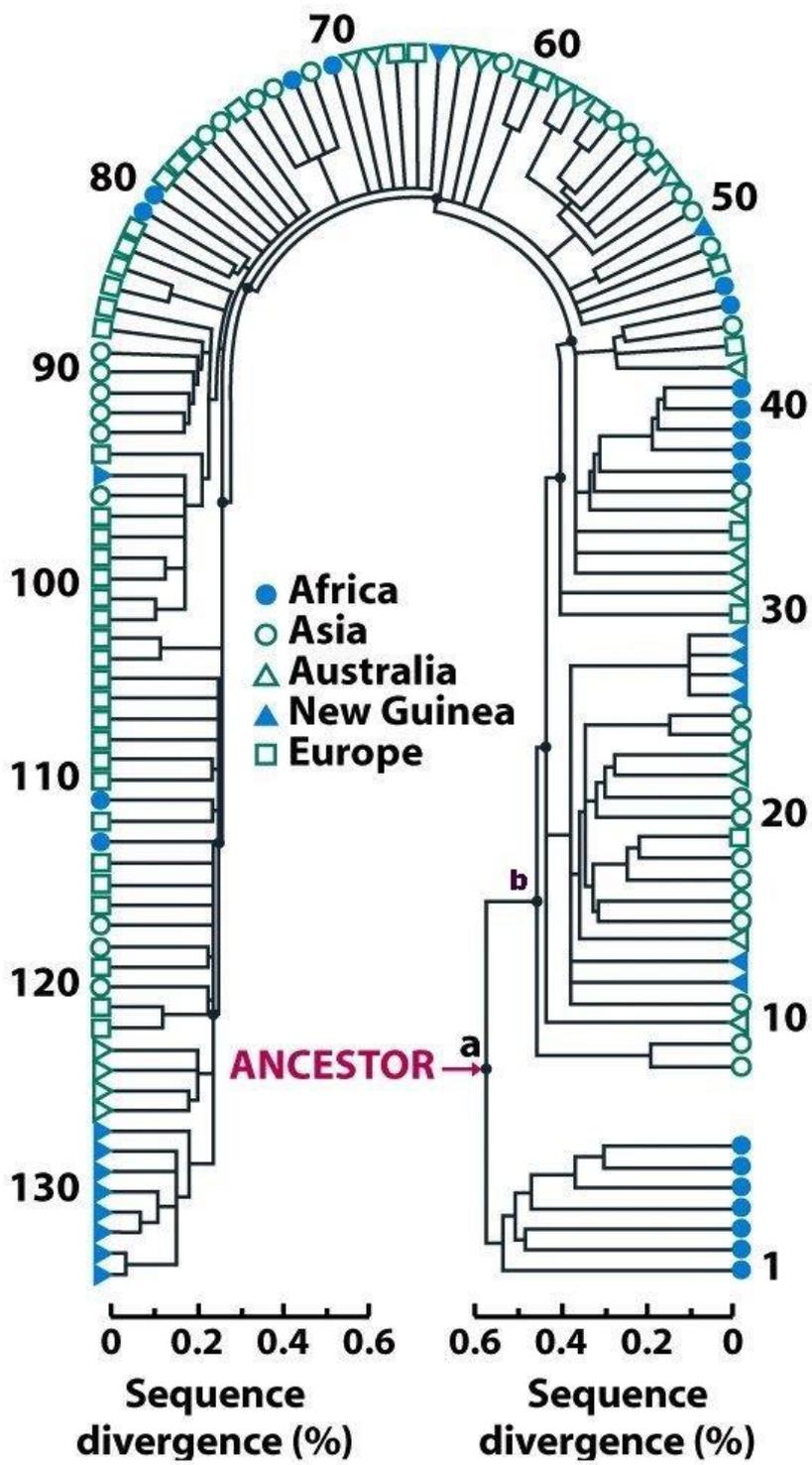


Figure 10 : arbre généalogique des 134 mtDNA humains (Cann et al. 1987)

L'utilisation de la génétique vient également confirmer certaines hypothèses émises précédemment sur bases archéologiques. En particulier, Templeton (2002), en se basant sur différents marqueurs génétiques, a pu affirmer que les populations humaines actuelles seraient le fruit de deux expansions majeures hors d'Afrique s'étant déroulées entre 0.42 et 0.84 million d'années pour la première et entre 0.08 et 0.15 million d'années pour la seconde (fig. 11).

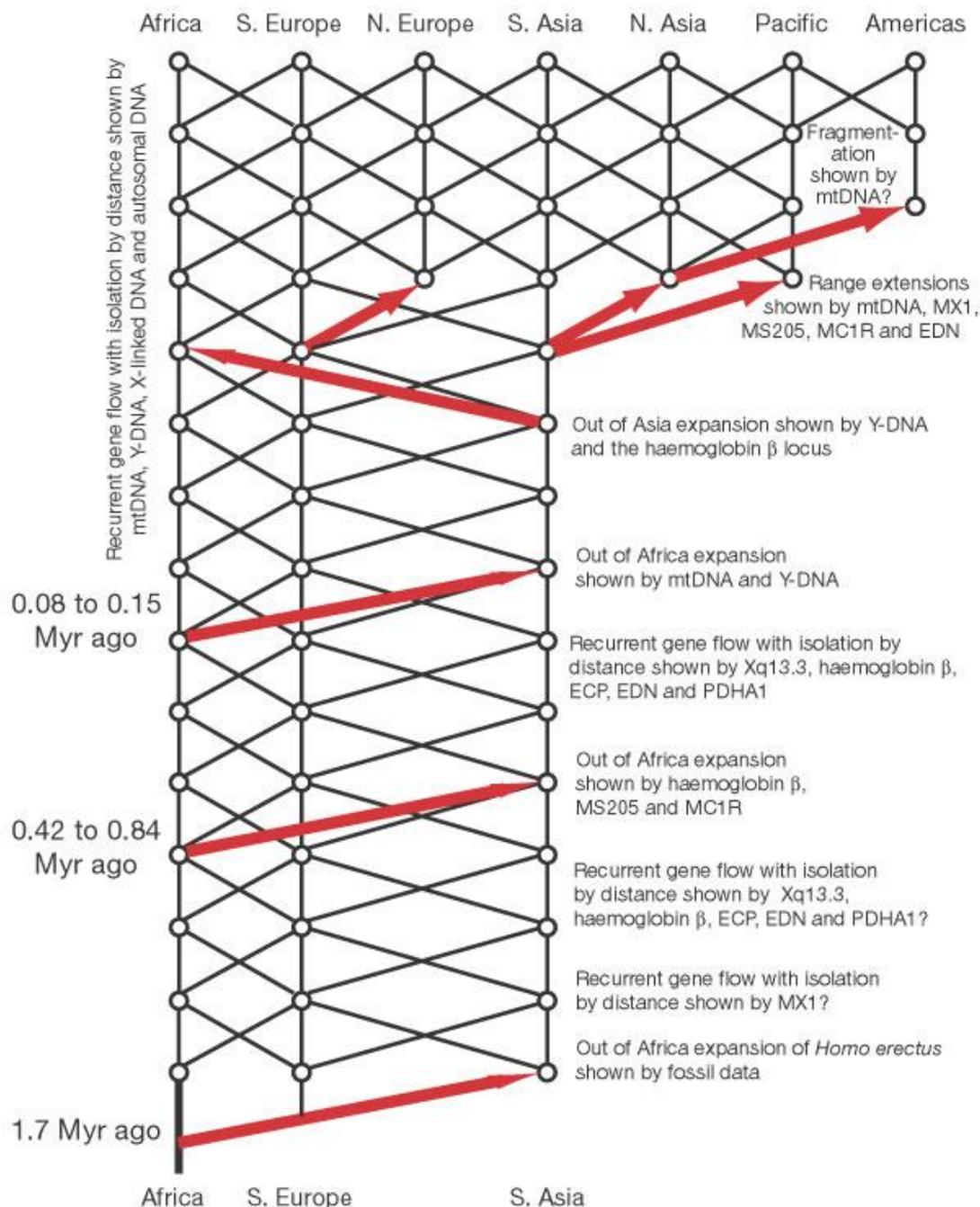


Figure 11 : nouveau modèle de l'évolution humaine récente. Les expansions humaines majeures sont indiquées par les flèches en gras. (Templeton et al. 2002)

Le perfectionnement des méthodes génétiques ces dernières années a permis de mieux explorer encore les origines de l'homme moderne et de découvrir que celles-ci étaient plus complexes qu'imaginées auparavant. Ainsi, Stringer a émis l'hypothèse que l'homme moderne serait le résultat d'un métissage entre l'Homo sapiens ayant émigré hors d'Afrique et d'autres espèces d'hominidés aujourd'hui disparues telles que l'Homme de Néandertal (*Homo neanderthalensis*), l'Homme de Denisovans ainsi que d'autres espèces hominidées africaines archaïques (Stringer 2012) (fig. 12).

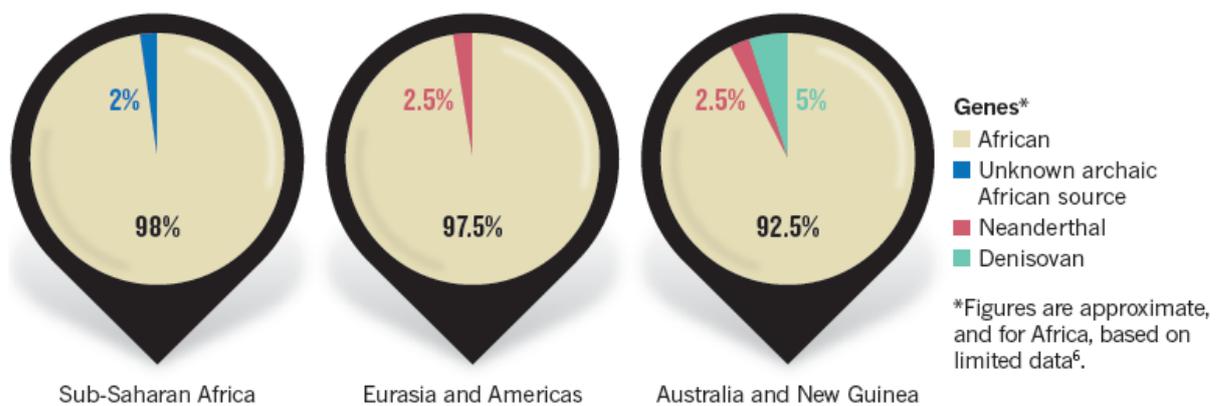


Figure 12 : pourcentage d'ADN archaïque dans le génôme des populations actuelles (Stringer et al. 2012).

1.2) Dynamisme des aires de distribution

Comme les scientifiques cités précédemment l'ont démontré par diverses approches, l'aire de distribution d'une espèce n'est ni fixée dans le temps, ni dans l'espace. Son dynamisme est dû à la résultante des événements de colonisation de nouveaux territoires et d'extinction des populations locales. On peut ainsi observer des espèces dont l'aire de distribution s'élargit, tandis que d'autres voient leur distribution se rétrécir, allant même parfois jusqu'à disparaître.

Le loup (*Canis lupus*) constitue un bon exemple lorsque l'on veut illustrer le dynamisme possible des aires de distribution. En effet, cet animal emblématique occupait une vaste aire de distribution en Europe avec une population estimée entre trois et sept milles individus en France à la fin du 18^{ème} siècle. Cependant, après des dizaines d'années de persécution organisée, l'espèce disparut du territoire français dans les années 30. Elle y est réapparue en 1992 dans le Parc national du Mercantour situé dans les Alpes du Sud et elle est aujourd'hui en pleine reconquête de son territoire passé (fig. 13). Ces dernières années, des individus ont même été aperçus jusque dans le sud de la Belgique.

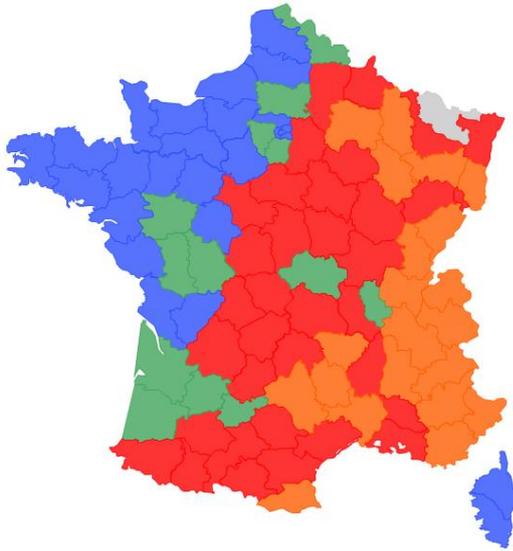


Figure 13 : Carte de dispersion du loup sur le territoire français par départements (juin 2016). Vert : peut y être présent de manière aléatoire. Rouge : s’y disperse avant de s’y établir définitivement (1 ou +). Orange : y est établi et s’y reproduit. Gris : dispersion probable du loup gris européen d’origine allemande. Bleu : absent de manière certaine. Source : <http://www.observatoireduloup.fr/category/carte-de-dispersion-du-loup/>

Dans le cas de cette espèce, le dynamisme de son aire de distribution est presque exclusivement dû à des facteurs anthropogéniques. Il existe cependant une multitude d’autres facteurs, qu’ils soient biotiques ou abiotiques, à l’origine des différents événements de colonisation ou d’extinction, agissant à différentes échelles spatiales et temporelles. La suite de ce chapitre est ainsi consacrée à la description de ces différents facteurs et à l’influence qu’ils peuvent avoir sur l’évolution des aires de distribution.

1.2.1) Climat

Le climat est sûrement, parmi tous les paramètres, aussi bien biotiques qu’abiotiques, celui qui est le plus influent. Depuis des millions d’années, les différentes espèces animales et végétales ont évolué pour s’adapter à des conditions climatiques allant d’un extrême à l’autre. C’est le cas notamment pour certaines archées comme *Pyrolobus fumarii*, capable de vivre et de se reproduire à des températures allant jusque 113°C (Blochl et al. 1997). Au sein du règne animal, on retrouve aussi des espèces adaptées aux conditions de températures extrêmes comme le manchot empereur (*Aptenodytes forsteri*) en Antarctique ou le fennec (*Vulpes zerda*) dans le désert du Sahara.

Les changements climatiques peuvent avoir des conséquences colossales sur les aires de distribution. Lorsqu’une espèce en est capable, elle va se déplacer pour rester dans son optimum écologique. Ainsi, Parmesan et al. (1999) ont observé un déplacement latitudinal de l’aire de distribution de l’espèce de papillon (*Euphydryas editha*) de 92km vers le Nord ainsi qu’un déplacement altitudinal de 124m vers le haut, et ceci en moins d’un siècle, en réponse au réchauffement climatique occurring dans la région.

D'autres espèces, cependant, n'ont pas l'opportunité de réagir à ces changements climatiques. Leur aire de distribution ne peut être déplacée et donc se réduit, voir disparaît. C'est le cas notamment de l'ours polaire (*Ursus maritimus*), dépendant de la banquise pour se nourrir. Or, celle-ci se forme dorénavant de plus en plus tard en automne et disparaît de plus en plus tôt en été, prolongeant ainsi la période de jeûne des ours, ce qui entraîne un déclin de leur santé et de leur capacité à se reproduire (Hunter et al. 2010).

En Amérique du Nord, le réchauffement climatique a été pointé du doigt pour expliquer la remontée vers le Nord de la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*). Des hivers plus doux permettraient en effet une meilleure survie hivernale de l'espèce, même à des latitudes précédemment non atteintes par l'espèce. C'est ainsi qu'on estime à 10km/an la vitesse de remontée de l'espèce vers le Nord (Roy-Dufresne et al. 2013).

Il serait cependant réducteur d'attribuer le dynamisme des aires de distribution aux seuls facteurs climatiques. En effet, beaucoup de paramètres biotiques peuvent eux aussi jouer un rôle primordial dans le succès ou l'échec de la colonisation de nouveaux territoires.

1.2.2) Génétique

Les facteurs liés à la génétique constituent ainsi un paramètre non négligeable de la progression géographique d'une espèce. En effet, les événements de colonisation sont souvent dus à la dispersion de quelques individus aventureux, puis de leur progéniture. Ces populations nouvellement installées se retrouvent par conséquent plus isolées géographiquement mais aussi génétiquement, puisque le brassage génétique entre les populations s'en trouve réduit. Plusieurs études ont ainsi montré que ces populations en marge des aires de distribution présentent souvent une diversité génétique plus faible par rapport aux populations plus centrales. Cette observation est à la base de la « central-marginal hypothesis » émise la première fois par Prakash et al. (1969) puis précisée par Brussard (1984). Eckert et al. (2008) ont passé en revue la littérature à ce sujet et en ont conclu que 64,2% des études présentaient ce déclin de diversité génétique de manière significative. Une review plus récente (Pironon et al. 2016), n'a elle observé ce déclin que dans 47% des cas.

Génétique et système immunitaire

Une diversité génétique importante au sein d'une population est couramment considérée comme un signe de bonne santé de cette population. En effet, une population génétiquement diversifiée aura la capacité de lutter contre une vaste gamme de pathogènes et de s'adapter plus facilement aux changements de son environnement. La meilleure résistance aux pathogènes s'explique par les mécanismes immunitaires responsables de la reconnaissance des pathogènes.

Le système immunitaire chez les êtres vivants est classiquement séparé entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Alors que le premier existe au sein de tout être vivant, le second, quant à lui, ne se retrouve que chez les vertébrés. Le système immunitaire inné répond aux infections de manière générique en proposant une défense immédiate. Ses fonctions principales chez les vertébrés incluent (1) le recrutement de cellules immunitaires au site d'infection initiant le processus d'inflammation ; (2) l'activation de la cascade du complément qui permet, entre autre, d'éliminer les cellules mortes et les complexes anticorps-antigène ; (3) la suppression de corps étrangers par les globules blancs ; (4) la constitution de barrières physiques et chimiques contre les agents infectieux ; (5) l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

Le système immunitaire adaptatif diffère du système immunitaire inné par plusieurs points. Tout d'abord, il est caractérisé par la spécificité de sa réponse en fonction du pathogène. L'immunité adaptative a aussi la capacité de protéger son hôte à long terme via la mémoire immunologique qui déclenche une réponse renforcée envers un pathogène lorsque celui-ci a été combattu précédemment. La vaccination est d'ailleurs une application reposant sur ce principe.

Un des éléments clés de la réponse immunitaire adaptative réside dans l'existence du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce complexe protéique permet la reconnaissance de fragments peptidiques pathogènes, puis la présentation de ceux-ci aux lymphocytes T qui les détruiront (Klein 1986). Il existe deux sortes de CMH. Les CMH de type I qui se retrouvent sur la majorité des cellules nucléées et le CMH de type II que l'on retrouve uniquement sur les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes B activés ou les macrophages. Les gènes codant pour le CMH comptent parmi les gènes les plus polymorphes connus chez les vertébrés (Hedrick 1994). En effet, pour chaque locus, il existe une quantité très élevée de gènes différents, si bien qu'on estime par exemple que chez l'homme, deux personnes ne présenteront jamais la même combinaison allélique pour le CMH (hormis chez les vrais jumeaux). Cette extraordinaire diversité a longtemps intéressé la communauté scientifique. Elle s'expliquerait par le phénomène de sélection balancée qui repose sur deux mécanismes principaux. Le premier, l'avantage hétérozygote, repose sur le fait qu'un individu hétérozygote pour un gène du CMH (possédant donc 2 copies différentes de ce gène) bénéficierait d'un avantage sélectif par rapport à un individu homozygote (possédant les deux même copies) puisque son CMH serait capable de reconnaître une plus grande diversité de pathogènes (Doherty and Zinkernagel 1975). Le second mécanisme, la sélection fréquence dépendante négative (Takahata and Nei 1990), part du principe que les allèles rares au sein d'une population ont plus de chance d'être efficaces dans la détection des pathogènes puisque ces derniers n'auront pas eu l'opportunité de s'y adapter. Ces deux mécanismes induisent ainsi une diversité génétique bien plus élevée pour les gènes du CMH que pour les autres gènes.

La faible diversité génétique caractéristique des populations périphériques pourrait ainsi constituer un paramètre biotique pouvant nuire à leur développement, du fait que ces populations seront moins aptes à combattre une vaste gamme de pathogènes.

D'une façon générale, la fragilité des populations peu diversifiées génétiquement est un problème majeur en conservation de la nature. En effet, lorsqu'une population présente un fort taux de consanguinité et peu de flux génique avec les populations voisines, l'apparition d'un seul pathogène peut alors potentiellement avoir des conséquences désastreuses sur l'ensemble de la population (Spielman et al. 2004). Voilà pourquoi des programmes de conservation impliquant la mise en place de corridors biologiques ou la translocation pure et simple d'individus voient le jour, dans le but de favoriser le brassage génétique des espèces et donc la probabilité que celles-ci puissent lutter efficacement contre leur pathogènes.

1.2.3) Pression de pathogènes et prédateurs

La pression exercée par les pathogènes et les prédateurs constitue un autre facteur clé dans l'évolution des aires de distribution. Prédateurs et pathogènes, de par l'effet régulateur qu'ils exercent, vont en effet ralentir, voire interdire, la progression d'une espèce vers de nouveaux territoires (Hochberg and Ives 1999, Holt and Keitt 2000). Briers (2003) a par exemple observé que la prévalence en parasites trématodes au sein d'une espèce de gastéropode marin (*Lymnaea stagnalis*) augmentait significativement en bordure d'aire de distribution par rapport aux zones plus centrales. Bien que les mécanismes exacts expliquant ce phénomène restent nébuleux, l'auteur émet tout de même l'hypothèse que des changements dans les facteurs abiotiques survenant en bordure d'aire de distribution seraient responsables de changements physiologiques chez le gastéropode, modifiant leur réponse immunitaire et altérant ainsi indirectement la prévalence en parasites. L'augmentation de la pression due aux parasites et autres pathogènes pourrait aussi être une conséquence de la diminution de la diversité génétique souvent observée en périphérie de l'aire de distribution, comme expliqué dans le chapitre précédent. Cette augmentation de pression pourrait aussi être causée par la confrontation de nouvelles espèces parasites ou pathogènes dans les zones nouvellement colonisées.

L' "Enemy-Release Hypothesis" est une théorie qui vient bouleverser la vision classique selon laquelle les populations marginales sont supposées présenter une richesse génétique plus faible ainsi qu'une pression pathogène ou parasitaire plus élevée par rapport aux populations plus centrales. Cette théorie affirme, au contraire, qu'au fur et à mesure de la progression d'une espèce vers de nouveaux territoires, elle n'est pas forcément suivie par ses pathogènes et prédateurs ancestraux. L' espèce ainsi délivrée de ses ennemis peut alors en profiter pour proliférer et s'étendre, facilitant ainsi encore plus

la progression de l'espèce (Keane and Crawley 2002). Nombre d'espèces invasives doivent ce qualificatif à cette théorie. Au sein du règne animal, un des exemples historiques le plus célèbre est sans doute celui de l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*). En 1890, Eugène Schieffelin, à l'époque président de l'American Acclimatization Society, se sentit investi du devoir d'introduire dans la ville de New-York chaque espèce d'oiseau mentionnée dans les œuvres de Shakespeare, et ce pour le confort des migrants anglais dans la nouvelle nation d'Amérique. Parmi ces espèces, il relâcha une centaine d'étourneaux à Central Park avec l'espoir que ceux-ci s'y multiplient (Phillips 1928). C'est malheureusement ce qui se produisit (fig. 14), si bien qu'aujourd'hui, on compte plus de 200 millions d'individus aux Etats-Unis, ce qui en ferait l'espèce d'oiseau la plus abondante dans ce pays (Bitton and Graham 2015).

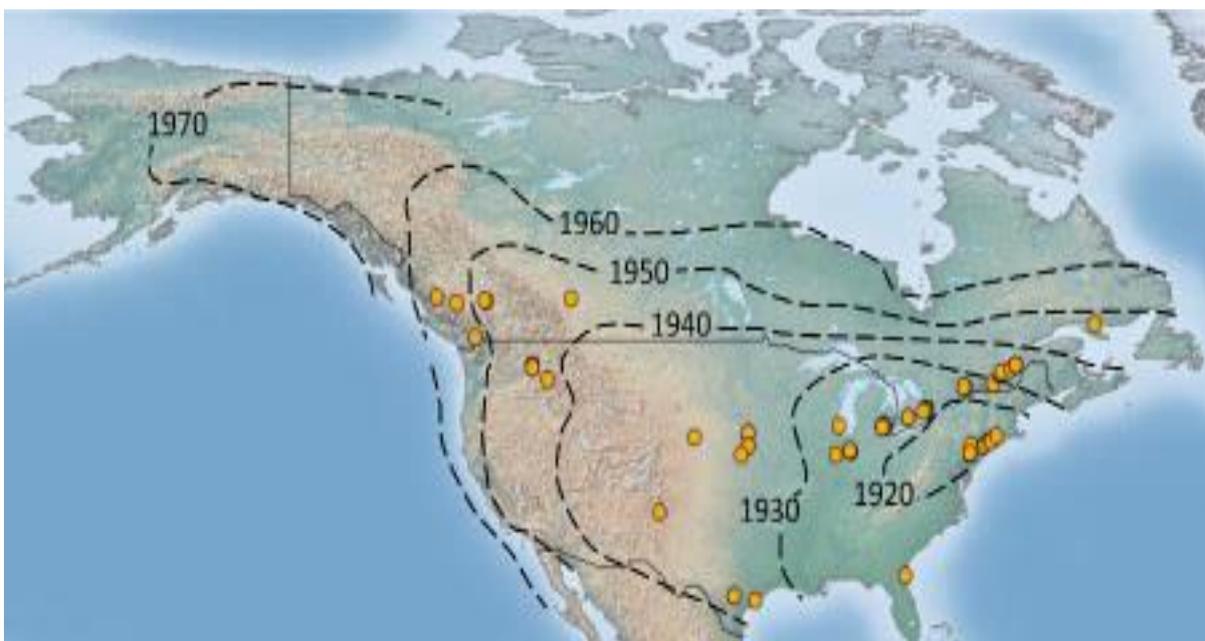


Figure 14 : Isoplèthes indiquant l'expansion progressive de l'étourneau sansonnet suivant son introduction à Central Park (New-York City) en 1890 (Bitton and Graham 2015)

Cette espèce est responsable de dommages aux cultures à hauteur d'un milliard de dollars par an, en particulier sur des arbres fruitiers. Elle est aussi responsable des réductions substantielles de production de lait, car elle se nourrit du grain réservé à l'alimentation des vaches laitières. Enfin, les volées d'étourneaux posent de gros problèmes aux abords des aéroports, non seulement par leur nombre mais aussi à cause de leur densité corporelle très élevée qui provoque des effets dévastateurs lorsqu'ils percutent les avions. En 1960, ils furent d'ailleurs à l'origine d'un crash à l'aéroport de Boston ayant entraîné la mort de 62 personnes (O'Brien 2014). Une étude récente a estimé et comparé la richesse spécifique en parasites de 100 étourneaux américains par rapport à 100 étourneaux européens. La faible taille de la population introduite, couplée à l'absence d'hôtes intermédiaires appropriés, aurait ainsi réduit le nombre d'espèces parasites pour 100 étourneaux de 28 en Europe à seulement 9

en Amérique du Nord, favorisant de cette manière l'implacable invasion de l'espèce (Torchin et al. 2003).

Le déclin de la pression exercée par les pathogènes/prédateurs peut aussi s'effectuer graduellement du centre vers le bord de l'aire de distribution. Cela a notamment été observé par Hopper et al. (2014) pour une espèce de gastéropode marin, *Kelletia kelletii*. L'étude a été conduite sur 199 individus provenant de 25 récifs situés dans le centre et sur les bords de leur aire de distribution. Les auteurs concluent que le nombre d'individus parasités était cinq fois moindre en bordure de l'aire de distribution par rapport aux régions plus centrales, et que ceux qui étaient effectivement parasités ne présentaient en moyenne que 6% du nombre de parasites en comparaison avec les individus situés dans les zones plus centrales de l'aire de distribution.

Qui plus est, il a été montré par Phillips et al. (2010) que les parasites et pathogènes associés à une espèce en expansion auraient tendance à afficher un retard d'expansion par rapport à leur hôte. En conséquence, les individus de front de colonisation pourraient bénéficier d'une pression de prédation/pathogène amoindrie.

1.2.4) Niveau de stress

Le niveau de stress à long terme est souvent utilisé comme variable pour mesurer la pression environnementale auquel est soumis tout individu (Charmandari et al. 2005, Keay et al. 2006, Knierim et al. 2007, Sheriff et al. 2011, Liebl and Martin 2013, Malcolm et al. 2013). En effet, la présence de prédateurs ou de pathogènes, la compétition, le manque de nourriture ou les conditions climatiques difficiles, sont autant de facteurs de stress qui vont éloigner l'individu de son optimum environnemental. Celui-ci devra donc lutter pour sa survie à court terme plutôt qu'investir de l'énergie dans sa reproduction. Puisqu'une espèce est supposée s'éloigner de son optimum écologique au fur et à mesure qu'elle s'éloigne du centre de son aire de distribution (central-marginal hypothesis) (Prakash et al. 1969, Brussard 1984), on s'attend logiquement à observer des individus présentant des niveaux de stress plus élevés en marge de l'aire de distribution, limitant ainsi potentiellement leur pouvoir dispersif. Le stress en physiologie animale peut être défini comme un mécanisme permettant de faire face aux différents challenges de l'environnement grâce à la réallocation du potentiel énergétique de l'animal vers des activités destinées à assurer sa survie à court terme (Boonstra 2005, Busch and Hayward 2009). Ce mécanisme est régi par l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénal. Toute information relative à une situation menaçante ou stressante finit par converger vers l'hypothalamus qui synthétisera en réponse le facteur de libération de corticotropine (CRHF). Ce dernier va alors se lier à des récepteurs au niveau de la glande pituitaire antérieure et stimuler la production de l'hormone

adrénocorticotrope (ACTH). Celle-ci est ensuite envoyée dans la circulation sanguine et, lorsqu'elle atteint le cortex surrénal, y provoque la libération de glucocorticoïdes (GCs) (Fig. 15). Chez les souris, c'est la corticostérone qui constitue le GC principal tandis que chez l'homme, c'est plutôt le cortisol.

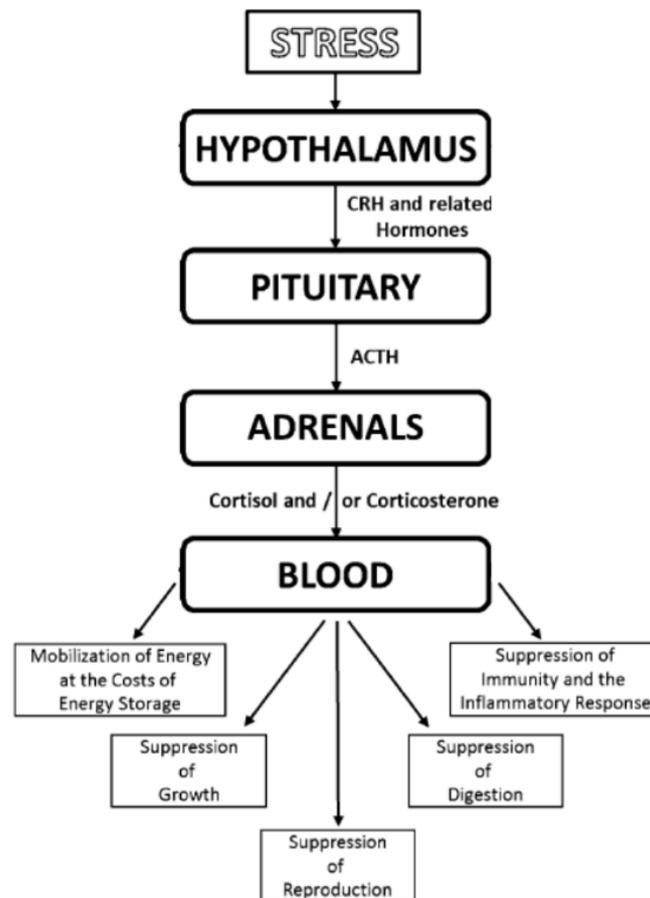


Figure 15 : L'axe hypothalamo-pituito-surrénal (Sheriff et al. 2011)

Ce sont ces GC qui induisent les réactions physiologiques et les comportements permettant de pallier aux situations de stress. Les GC induisent par exemple la stimulation de la gluconéogenèse hépatique (synthèse du glucose à partir de composés non-glucidiques) ainsi que la mobilisation du glucose depuis les tissus périphériques non requis par la survie à court terme vers les organes plus primordiaux tels que les muscles. Un taux élevé de GC provoque aussi l'accélération du rythme cardiaque ainsi que la stimulation des fonctions immunitaires. Les GC peuvent encore induire l'augmentation de la cognition et l'inhibition des mécanismes comportementaux et physiologiques relatifs à la reproduction (Hennen 2001).

Le niveau de stress peut être mesuré à plus ou moins long terme selon la matrice à partir de laquelle les GC sont quantifiés. Si l'objectif est de mesurer le niveau de stress instantané, on se tournera vers la matrice sanguine ou salivaire. L'urine ou les fèces ont cela de pratique qu'ils présentent, quant à eux, une valeur moyenne du niveau de stress perçu pendant une période de plusieurs heures (durée

dépendante du métabolisme de l'espèce étudiée). Un avantage non négligeable de l'utilisation de cette matrice réside dans le fait que le stress occasionné par le piégeage ou la manipulation de l'animal ne se répercute pas directement dans les fèces puisqu'il existe un délai de plusieurs heures entre le moment où l'événement stressant se produit et le moment où celui-ci est détectable dans les fèces ou l'urine (Sheriff et al. 2011).

Enfin, s'il est question d'étudier les niveaux de stress à long terme, on aura tout intérêt à plutôt utiliser la matrice capillaire. Celle-ci renvoie en effet une valeur moyenne du niveau de stress sur une période correspondant à la durée totale de la pousse du poil. Pour les études se focalisant sur l'évaluation du stress environnemental, c'est la méthode la plus intéressante puisqu'elle donne une valeur moyenne sur une longue période de temps sans être soumise aux fluctuations journalières .

D'autres méthodes existent pour quantifier le stress à long terme. L'une d'entre elles consiste à mesurer le poids de glandes surrénales puisque le stress chronique est supposé provoquer une hyperplasie de celles-ci (Ulrich-Lai et al. 2006, Gaitan and Millien 2016).

Une autre méthode est couramment utilisée, se basant cette fois sur des critères morphologiques. Cette méthode est moins intuitive, et peu connue, même au sein de la communauté scientifique, voilà pourquoi elle est mieux détaillée dans le présent paragraphe. Cette technique repose sur la quantification de l'asymétrie fluctuante (AF), qui est définie comme l'ensemble des déviations aléatoires d'une structure morphologique par rapport à une symétrie parfaite (Van Valen 1962, Palmer and Strobeck 1986). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer les processus par lesquels des phénomènes de stress génétiques et/ou environnementaux produisent cette asymétrie fluctuante. Dans le cas d'un organisme présentant une morphologie à symétrie bilatérale, les deux parties du corps se développent selon la même information génétique et sous les mêmes conditions environnementales. Ceci implique donc qu'en absence de toute contrainte, le développement devrait se faire en suivant une trajectoire ontogénique idéale, et donc, symétrique. Des événements stochastiques ou des perturbations dues à des stress peuvent cependant perturber cette trajectoire idéale en introduisant de la variation dans le développement cellulaire, la migration de ces cellules ou leur différenciation. Des mécanismes tampons existent cependant, permettant un remodelage osseux dans le but de maintenir cette trajectoire idéale, mais un régime alimentaire inadéquat, ou une forte charge parasitaire peuvent entraîner une diminution de la disponibilité des matériaux bruts nécessaires pour ce processus de remodelage, induisant par ce fait une asymétrie dite fluctuante (Willmore et al. 2005). Cette AF se calcule en mesurant le caractère morphologique du côté droit moins la mesure du même caractère du côté gauche ($D - G$). Ceci peut être fait pour un caractère (taille d'un membre ou d'un os en particulier, etc...) ou pour plusieurs caractères au sein du même organisme, on parle alors

de valeur d'AF composite. Plus récemment, la morphométrie géométrique a permis de mettre au point des valeurs d'AF basées sur la forme plutôt que sur la taille des structures morphologiques, en utilisant la méthode des repères. Ces repères sont placés à des endroits définis précisément sur une image en 2 ou 3 dimensions (crâne, mâchoires) et un programme informatique permet ensuite de mesurer les déformations de forme par rapport à une symétrie optimale (Klingenberg and Montero 2005). Le type d'asymétrie qui nous intéresse ici, l'asymétrie fluctuante, est caractérisée par une distribution normale des valeurs D – G au sein d'une population d'individus avec une moyenne de ces valeurs égale à zéro (fig. 16). En d'autres termes, il y a statistiquement autant d'individus présentant un côté gauche plus développé pour un trait que d'individus présentant le côté droit plus développé.

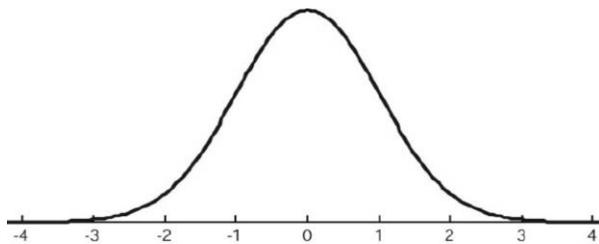


Figure 16 : distribution idéale de l'asymétrie fluctuante pour un trait donné. La valeur zéro indique la symétrie parfaite tandis que les unités de mesures sont arbitraires. Le nombre d'individus constitue l'ordonnée du graphique.

D'autres types de symétrie existent, sans que celles-ci ne soient forcément induites pas des stress. L'asymétrie directionnelle, par exemple, correspond à une symétrie caractérisée elle aussi par une distribution normale des valeurs D – G mais dont la moyenne des déviations gauche-droite est différente de zéro (fig. 17). Cette asymétrie directionnelle s'observe par exemple dans la majorité des organes internes comme le cœur ou les poumons dont le même côté est constamment plus développé que l'autre chez tous les individus d'une même espèce.

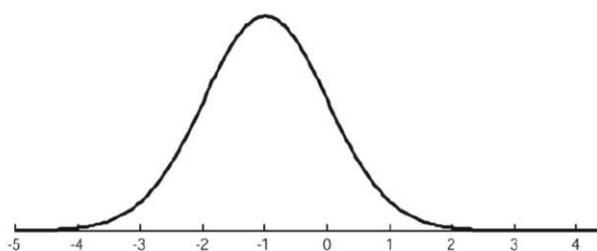


Figure 17 : distribution idéale de l'asymétrie pour un trait donné en présence d'asymétrie directionnelle

Il existe un troisième type d'asymétrie, l'antisymétrie, qui apparaît lorsque les individus présentent une nette asymétrie dont la direction varie d'un individu à l'autre. La distribution des valeurs D – G correspondante est donc bimodale (fig. 18). L'exemple le plus typique est sans doute celui d'*Uca panacea*, un crabe de la famille des Ocypodidae, dont une des deux pinces est surdéveloppée et constitue un caractère sexuel important (fig. 19). On parle ici d'antisymétrie car le développement spectaculaire de la pince se fait aussi bien du côté gauche que du côté droit selon les individus.

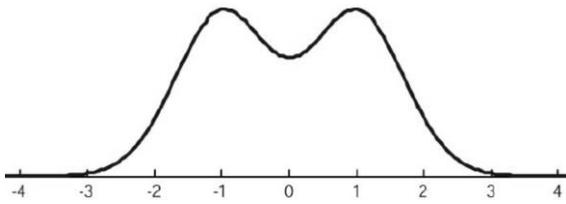


Figure 18 : distribution idéale de l'asymétrie pour un trait donné en présence d'antisymétrie



Figure 19 : *Uca panacea* (Heard 1982)

La quantification de l'AF a été appliquée à tout un panel d'organismes, aussi bien animaux que végétaux, pour quantifier le stress résultant d'une multitude de facteurs. La communauté scientifique est cependant partagée quant à la validité ou au bien-fondé de cette méthode. La quantification de l'AF a en effet souvent été remise en question puisque qu'un facteur de stress précis n'engendre pas forcément de l'asymétrie fluctuante chez chaque espèce. De même, pour une espèce donnée, les différents facteurs de stress (génétique, nutritionnel, climatique) n'engendrent pas forcément tous de l'asymétrie fluctuante. Enfin, dans des conditions de stress similaires, seules certaines structures morphologiques développent de l'asymétrie fluctuante sans que cela soit le cas pour d'autres. On considère donc l'asymétrie fluctuante comme une méthode « stress specific », « species specific » ainsi que « trait specific » (Graham et al. 2010).

Il existe cependant des domaines scientifiques pour lesquels cette méthode a souvent été utilisée avec des résultats intéressants. C'est le cas notamment en biogéographie, dans des contextes similaires à celui présenté dans cette thèse. En effet, différents auteurs ont mis en évidence des niveaux d'AF plus importants dans les populations marginales d'une aire de distribution par rapport aux populations plus centrales. C'est le cas notamment pour le silène visqueux (*Silene viscaria*), une plante à fleurs de la famille des Caryophyllaceae. Les auteurs de cette étude ont observé des niveaux d'AF supérieurs dans les populations marginales par rapport aux populations centrales de leur aire de distribution. Leur étude statistique explique ce résultat notamment par la faible taille et le faible taux d'hétérozygotie qui caractérisent ces populations marginales (Siikamäki and Lammi 1998). Similairement, Cornelissen and Stiling (2010), qui ont travaillé sur base de la morphologie des feuilles de deux espèces de chênes

américains (*Quercus myrtifolia* and *Quercus chapmanii*) au sein de 40 sites répartis sur une surface de 170 000 km², ont eux aussi mis en évidence des niveaux d'AF plus élevés dans les populations périphériques. Hagen et al. (2008) ont travaillé quant à eux le long d'une aire de distribution, celle du bouleau pubescent (*Betula pubescens*) mais selon un gradient altitudinal plutôt que latitudinal cette fois. Ils ont mis en évidence une augmentation linéaire du niveau d'AF avec l'altitude, soulignant ainsi le stress provoqué par les conditions climatiques plus rudes présentes à hautes altitudes. Le bouleau pubescent a d'ailleurs servi d'espèce modèle pour plusieurs autres études sur l'AF. En effet, la pollution (Kozlov et al. 1996), la présence d'herbivores (Lempa et al. 2000) ainsi que l'hybridation (Wilsey et al. 1998) représentent tous des facteurs qui ont été associés avec des niveaux élevés d'AF.

L'AF a aussi été appliquée à des espèces animales. C'est le cas de la Perdrix choukar (*Alectoris chukar*), dont l'asymétrie a été étudiée sur un gradient environnemental de 320km dans son aire de distribution. Les auteurs y ont observé une augmentation de différentes variables d'asymétrie du centre vers la périphérie de l'aire de distribution (Kark 2001).

L'asymétrie fluctuante a bien sûr aussi été proposée comme méthode d'étude chez l'être humain. On distingue ainsi deux principaux types d'étude, celles s'appliquant aux personnes vivantes et celle basées sur du matériel fossile. La morphométrie appliquée aux crânes fossiles représente potentiellement un outil très intéressant en archéologie.

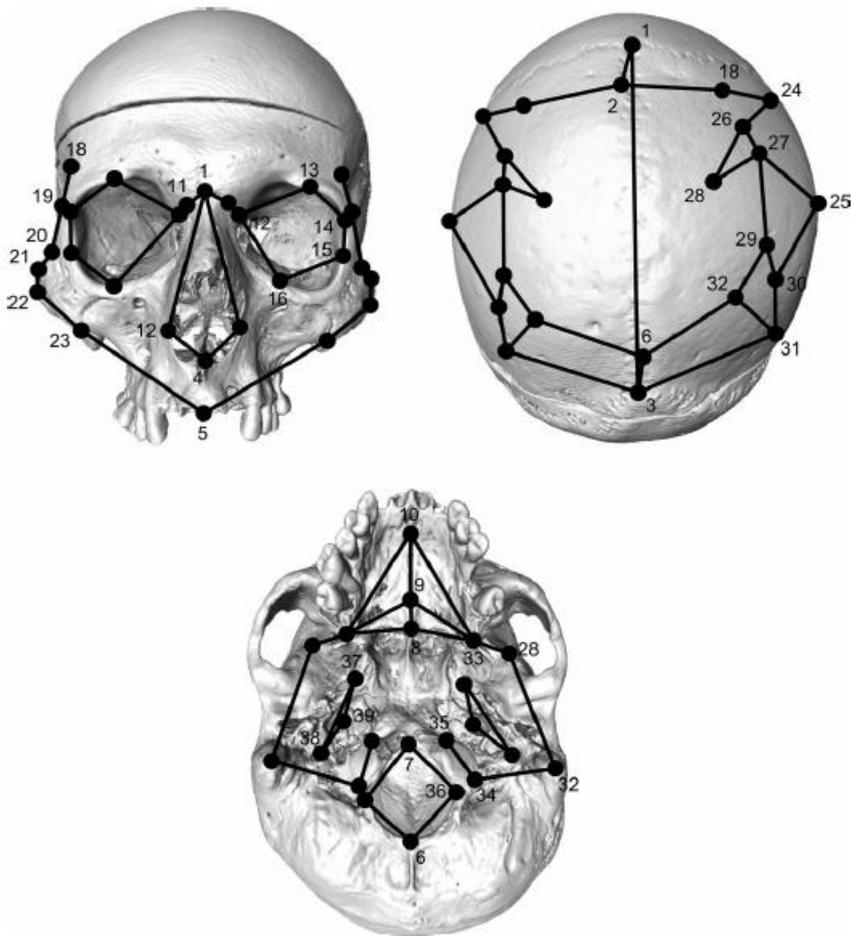


Figure 20 : exemple de placement de repères dans les trois dimensions sur des crânes fossiles humains. (Bigoni et al. 2013)

Deleon (2007) s'est notamment focalisé sur des crânes provenant de populations médiévales nubiennes ayant vécu à deux périodes différentes, la première de 550 à 850 *apr. J.-C.*, et la seconde de 850 à 1500 *apr. J.-C.* (fig. 20). Les résultats obtenus indiquent un niveau d'asymétrie significativement supérieur des crânes provenant de la plus ancienne des deux périodes par rapport à la seconde, suggérant que les individus ayant vécu à cette époque étaient soumis à des stress nutritionnels et environnementaux plus importants que ceux ayant vécu entre 850 et 1500 *apr. J.-C.*. Ces résultats sont corroborés par des preuves indépendantes indiquant un niveau de santé moindre des populations humaines de l'époque la plus ancienne.

Ces études constituent des exemples choisis, pour lesquels l'asymétrie fluctuante s'est révélée être un outil efficace permettant la confirmation des hypothèses de départ. Il faut cependant garder en tête que l'AF est considérée comme « stress/species/trait – specific » et, qu'en conséquence, il existe beaucoup d'études publiées, et sûrement encore plus d'études non publiées, pour lesquelles aucune différence d'AF n'a pu être mise en évidence malgré des protocoles expérimentaux rigoureux. D'autres études ont, quant à elles, produit des résultats allant à l'encontre des prédictions de départ. C'est le cas notamment pour les deux études suivantes :

La première porte sur les niveaux d'AF de crânes retrouvés dans des tombes médiévales de République Tchèque (Bigoni et al. 2013). Des crânes ayant appartenu à des personnes des plus hautes classes de la société, situées dans l'enceinte fortifiée de la structure médiévale, ont été comparés avec d'autres, provenant de personnes issues des classes plus basses, situés en dehors des fortifications. Des résultats différents furent obtenus selon le genre. En ce qui concerne les hommes, aucune différence significative dans l'AF des crânes ne fut mise à jour entre les deux classes socio-économiques. Les femmes, au contraire, présentaient de manière surprenante un niveau d'AF plus important lorsqu'elles provenaient de l'extérieur des fortifications plutôt que de l'intérieur.

Tout aussi surprenants furent les résultats obtenus par Kujanová et al. (2008) qui comparèrent le niveau d'AF de populations médiévales d'Europe centrale avec leurs homologues vivant actuellement dans la même région. Ils découvrirent en effet que les populations médiévales présenteraient des niveaux d'AF inférieurs aux populations actuelles, suggérant que ces dernières étaient soumises à des stress plus intenses que les populations ayant vécu un millénaire plus tôt.

Enfin, pour achever la présentation de la méthode de quantification de l'asymétrie fluctuante, terminons par ces trois études qui illustrent le caractère pour le moins étonnant de certains domaines auxquels l'AF a déjà été appliquée. La première est une étude publiée en 2005 dans *Nature*, ayant mis en évidence, chez un échantillon d'hommes et de femmes jamaïcains, une corrélation entre le niveau d'AF et la faculté de danser. D'après cette article, les femmes évalueraient mieux la danse des hommes lorsque ceux-ci sont plus symétriques (Brown et al. 2005). Cette étude fut cependant rétractée en 2013 suite à des doutes quant à l'intégrité du protocole expérimental utilisé. Les deux études suivantes ont, quant à elles, fait le lien entre l'AF et l'orientation sexuelle de leurs sujets. Rahman (2005) a ainsi mesuré l'AF de différentes structures morphologiques et mis en évidence que les individus homosexuels présentaient un ratio inférieur des longueurs entre le second et le quatrième doigt de la main droite. Similairement, Miller et al. (2008), avançant que l'orientation sexuelle tout comme l'AF seraient tous les deux dus à des perturbations prénatales, ont eux aussi observé une corrélation entre orientation sexuelle et AF, avec des niveaux d'AF significativement supérieurs chez les personnes homosexuelles.

La pertinence et le bien-fondé de telles recherches sont cependant laissés à la discrétion du lecteur...

1.2.5) Niveau de santé

Une idée largement répandue consiste à penser que le niveau de santé moyen des individus décroît au fur et à mesure que l'on se rapproche du bord de l'aire de distribution d'une espèce. Cette hypothèse se base sur le fait que les individus des populations périphériques vivent généralement dans des conditions environnementales suboptimales par rapport aux populations plus centrales. Sexton et al. (2009) ont compilé plus d'une centaine d'étude sur le sujet et leurs observations généralisées ne soutiennent que partiellement cette hypothèse. Ils expliquent ce résultat par le fait que les individus de populations périphériques peuvent tout de même présenter un niveau de santé élevé s'ils résident dans des habitats favorables, même si ceux-ci deviennent plus rares vers la périphérie de l'aire de distribution.

Évaluer le niveau de santé d'un animal n'est pas tâche aisée. Une multitude de méthodes existent, dont la facilité d'utilisation varie d'une espèce à l'autre. Dans ce travail, deux méthodes ont été utilisées, dont la première consiste à calculer l'indice corporel de l'individu. Cet indice est abondamment utilisé dans la littérature (Leary et al. 2004, Bleeker et al. 2005, Cabezas et al. 2007, Sparkman and Palacios 2009). Il rend compte de la quantité de réserves énergétiques (sous forme de graisses) à disposition de l'animal et se base sur le fait que des animaux en bonne condition sont supposés posséder de plus larges réserves énergétiques par rapport à des animaux en moins bonne condition (Schulte-Hostedde et al. 2001). Cet indice corporel peut être obtenu selon différentes méthodes, mais ici, c'est le résidu de la régression du poids de l'animal sur sa taille qui a été calculé, d'après Schulte-Hostedde et al. (2005).

La seconde méthode d'évaluation du niveau de santé a consisté à mesurer le poids de la rate de l'individu. Cet organe joue un rôle prépondérant dans le système immunitaire en étant impliqué dans la production de lymphocytes, éléments clé dans le combat contre les infections. Partant de l'hypothèse selon laquelle une grosse rate produit plus de lymphocytes (Nunn 2002), le développement de cette rate peut ainsi constituer un investissement du surplus d'énergie à disposition de l'animal dans son système immunitaire (Vicente et al. 2007, Lutermann and Bennett 2008, Schulte-Hostedde and Elsasser 2011).

1.3) Objectifs de la thèse

L'influence des différents facteurs biotiques détaillés précédemment reste à ce jour assez floue pour expliquer la distribution des espèces et leur faculté de dispersion. Afin de mieux comprendre l'influence relative de ces différents facteurs, nous avons donc choisi d'utiliser comme modèle biologique le cas de l'expansion de la souris à pattes blanches au Québec.

Cette thèse a ainsi eu pour premier objectif l'étude des facteurs biotiques influençant l'évolution de l'aire de distribution de la souris à pattes blanches. La surveillance de cette espèce est en effet prioritaire vu son rôle de réservoir principal de la maladie de Lyme en Amérique du Nord. Les différents paramètres investigués ont été (1) la diversité génétique, (2) la prévalence en parasites, (3) la prévalence en bactéries, et les niveaux de (4) stress et de (5) santé. Ces paramètres ont été étudiés au sein de plusieurs sites d'échantillonnage répartis dans le sud du Québec, certains en bordure d'aire de distribution, correspondant à des populations récemment installées, et d'autres dans des régions plus australes, correspondant quant à eux à des populations installées depuis plusieurs années, voire, plusieurs dizaines d'années. L'obtention de ces données a ainsi permis de tester les deux hypothèses développées précédemment, à savoir, la central marginal hypothesis et l'enemy-release hypothesis. Nous espérons ainsi être en mesure d'évaluer le niveau de santé général de ces populations périphériques, afin d'en déduire si l'espèce est capable ou non de s'adapter à ce nouvel environnement et, par là même, de poursuivre le déplacement de son aire de distribution encore plus vers le Nord. Ce scénario serait bien entendu critique en termes de santé publique puisque cela signifierait que la maladie de Lyme poursuivrait son émergence dans des zones encore plus nordiques qu'à l'heure actuelle.

Au-delà de cet objectif principal, chacun des quatre points d'étude principaux (génétique, bactériologie, parasitologie, étude du stress) a été étoffé par un objectif secondaire.

La partie génétique du projet a été enrichie par des échantillons de tissus de souris à pattes blanches provenant de musées américains dont les résultats d'analyse ont été intégrés à la recherche. Ces échantillons proviennent de sites situés dans des aires beaucoup plus centrales, telle la région de Boston et la région des Grands Lacs. L'ajout d'échantillons a eu pour but d'augmenter le gradient géographique, permettant ainsi de tester des hypothèses biogéographiques à plus grande échelle. Nous nous sommes d'abord focalisés sur l'histoire phylogéographique de l'espèce en Amérique du Nord, en considérant un marqueur génétique sélectionné (gène DRB du MHC) et un marqueur neutre (Cyt. B). Nous nous sommes ensuite intéressés à tester la central-marginal hypothesis, selon laquelle il existerait un gradient géographique croissant de diversité génétique des zones périphériques vers

les zones plus centrales de l'aire de distribution, et ce, pour les deux mêmes marqueurs. Nous avons enfin fait le lien entre génétique et parasitologie en explorant les processus de sélection opérés par les parasites sur la structure génétique de la souris à pattes blanches.

Le volet parasitologie de ce travail s'est vu agrémenté d'un article reprenant une description complète de la faune helminthe parasitant les souris à pattes blanches québécoises. Une courte étude a aussi permis d'évaluer l'effet de la présence des parasites internes mais aussi externes sur différentes variables de santé de la souris à pattes blanches.

En ce qui concerne l'étude bactériologique, l'accent fut mis sur l'utilisation de la méthode de séquençage nouvelle génération et la mise au point d'un protocole permettant une détection optimale de l'agent bactérien responsable de la maladie de Lyme. Ce protocole a aussi permis de caractériser le microbiome du foie des souris à pattes blanches. Un lien a ensuite pu être fait entre l'étude génétique et l'étude bactériologique puisque nous avons testé l'effet du génotype des souris sur leurs assemblages microbiens en comparant les microbiomes de souris appartenant aux deux lignées génétiques bien différenciées.

Enfin, après avoir comparé les niveaux de stress des populations selon leur degré de périphérie, nous avons comparé les scores individuels obtenus par les quatre méthodes d'évaluation du stress à long terme - l'asymétrie fluctuante du crâne et des mâchoires, la taille des glandes surrénales et la quantification des corticostéroïdes capillaires - afin de déterminer la cohérence de ces quatre méthodes.

1.4) Espèce étudiée : *Peromyscus leucopus*



Figure 21 : Souris à pattes blanches adulte (*Peromyscus leucopus*) ; Source : <http://wildlifeofct.com/white-footed%20mouse.html>

1.4.1) Généralités

La souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) est une espèce de rongeurs de la sous famille des Sigmodontinae appartenant à la famille des Cricetidae, au même titre que les Arvicolinae (campagnols, lemmings, rats musqués), ou les Cricetinae (hamsters) (Musser 2005). Son emplacement dans le règne animal au sein de l'ordre des rongeurs est illustré dans l'arbre phylogénétique à la figure 22 (Michaux et al. 2001):

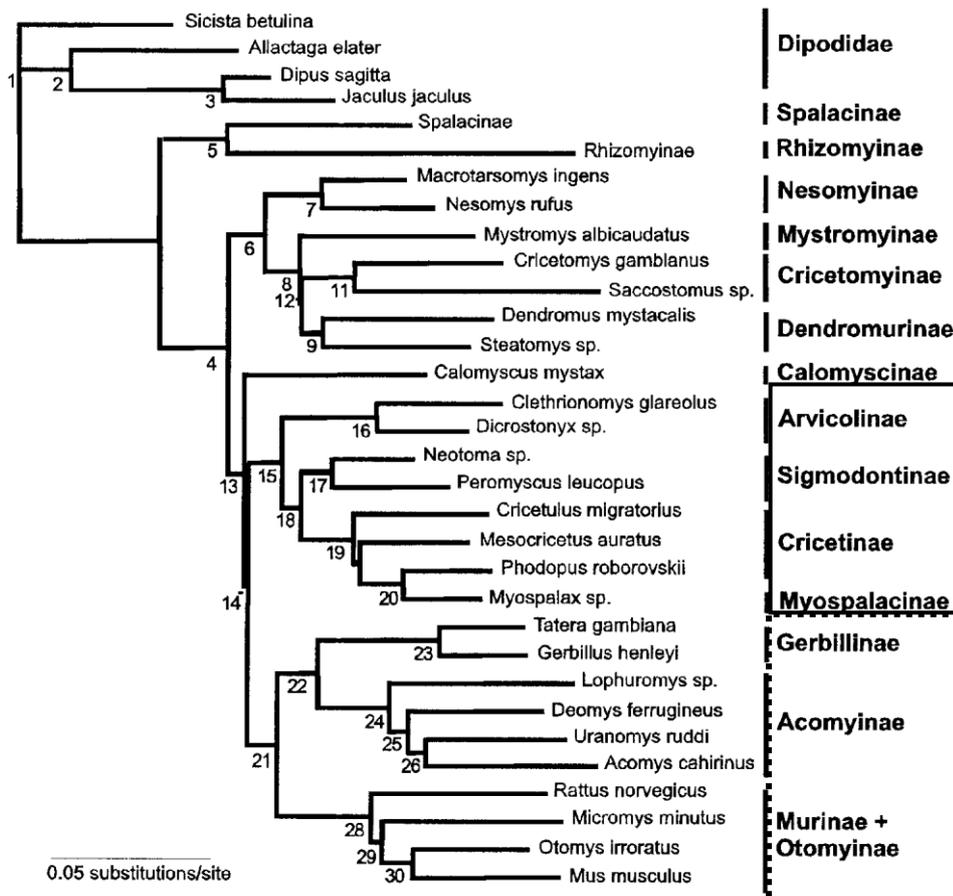


Figure 22 : Arbre synthétisant la phylogénie de l'ordre des rongeurs sur base des gènes LCAT et vWF. Les cadres en trait-plein et en pointillés correspondent respectivement aux familles des Cricetidae et des Muridae (Michaux et al. 2001).

Le genre *Peromyscus* abrite 72 espèces différentes, toutes distribuées sur le continent américain (Bradley et al. 2007). Une phylogénie du genre a été établie par Bradley et al. (2007) (fig. 23). Les membres du genre *Peromyscus* ont servi d'organismes modèles pour bon nombre d'études dans des

domaines de recherche aussi divers et variés que l'écologie (Kaufman 1989 , Turney et al. 2014), le comportement (Wolff 1989 , Sharp et al. 2015), la physiologie (MacMillen 1989 , Zhao and Marler 2016), la biologie du développement et de la reproduction (Millar 1989), la biochimie (Zheng et al. 1993, Dudley and Winston 1995), l'étude des allozymes (Zimmerman et al. 1975, Rogers 2005), la cytogénétique (Sudman et al. 1989, McAllister and Greenbaum 1997), la spéciation (Zimmerman et al. 1978), la parasitologie (Falcón-Ordaz et al. 2016), l'embryologie (Davis and Keisler 2016), la biogéographie (Sullivan et al. 1990, Ledevin and Millien 2013, Fiset et al. 2015), la métagénomique (Baxter et al. 2015) et bien d'autres encore. Dans une review qu'ils consacrent au genre, Dewey and Dawson (2001) se réfèrent aux *Peromyscus* en tant que « *Drosophila* de la mammologie nord-américaine ». L'aire de distribution de la souris à pattes blanches, peut être observée sur la figure 24. Celle-ci s'étend du Mexique jusqu'au sud du Canada (de l'Alberta jusqu'au Québec). Aux Etats-Unis, on la retrouve du Midwest jusqu'à la côte Est. Elle est cependant absente de la Floride.

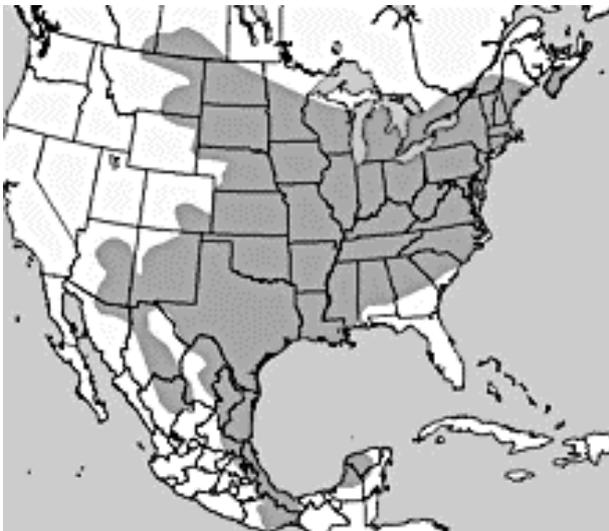


Figure 24 : Aire de distribution de *Peromyscus leucopus*.
Source : http://naturalhistory.si.edu/mna/image_info.cfm?species_id=268

On retrouve les plus fortes densités d'individus de souris à pattes blanches au sein des forêts dominées par les feuillus ainsi que dans les champs broussailleux. Elle constitue ainsi l'espèce de rongeur la plus abondante pour ces types d'habitat dans le nord-est des Etats-Unis. Nupp and Swihart (2005) ont observé que la densité des souris était inversement proportionnelle à la surface de la zone boisée. Ils ont ainsi enregistré les densités les plus élevées (200 adultes/ha) dans des petits bois de surface inférieure à un demi-hectare. Grâce à son adaptabilité, l'espèce est aussi capable de vivre en zone agricole ou faiblement urbanisée ainsi que dans les broussailles des environnements semi-désertiques. L'espèce se caractérise par une taille adulte totale variant de 150 à 205mm. La queue seule peut mesurer de 65 à 95mm. Le poids chez l'adulte varie de 15 à 25g. Le pelage, gris chez les juvéniles, évolue par la suite vers un brun pâle ou rougeâtre dorsalement, tandis que la partie ventrale et les

pattes deviennent blanches. Sur une base morphologique, *Peromyscus leucopus* peut être extrêmement difficile, voire impossible, à distinguer des autres espèces du même genre. Cela est vrai en particulier pour des espèces comme *P. maniculatus*, *P. eremicus*, *P. polionotus* et *P. gossypinus* (Lackey et al. 1985).

La période de reproduction des populations situées dans la partie nord de l'aire de distribution est saisonnière, avec un premier pic au printemps et un second en automne. Dans le sud de son aire de distribution, comme au Texas ou au Mexique, les souris se reproduisent cependant tout au long de l'année. La période de gestation varie entre 22 et 28 jours. Elle peut être augmentée d'un maximum de 14 jours supplémentaires pour les femelles déjà allaitantes. Les portées sont au nombre de 2 à 4 par an, constituées chacune de 2 à 9 jeunes. Les jeunes naissent aveugles et acquièrent la vision après 12 jours. Les femelles s'occupent de leur progéniture jusqu'à leur sevrage qui intervient en général 3 semaines après la naissance. Les jeunes deviennent sexuellement matures en moyenne après 44 jours. L'espérance de vie est d'un an en milieu naturel mais certains spécimens de laboratoire ont déjà vécu plus de 3 ans (Lackey et al. 1985).

Les souris à pattes blanches sont principalement nocturnes, avec des pics d'activité à l'aube et au crépuscule. Elles sont capables de grimper aux arbres et de traverser des petits cours d'eau (Klee and Barrett. 2004). Elles sont solitaires et territoriales, bien que leur territoire puisse chevaucher ceux d'individus voisins. La taille moyenne d'un territoire est estimée à 0.1 hectare mais varie d'une saison à l'autre. Elle est minimale en hiver et maximale en période de reproduction. Pendant cette période, le territoire des mâles peut recouvrir ceux de plusieurs femelles, leur permettant de se reproduire avec plusieurs d'entre elles (Gaitan and Millien 2016). Les souris à pattes blanches sont omnivores, se nourrissant principalement de graines et de végétation verte, et aussi, en moindre mesure, de fruits, de champignons et d'insectes (Lackey et al. 1985). C'est lorsque les températures avoisinent les 5° pour la première fois de l'année que le comportement de construction de nid est le plus intense (Glaser and Lustick 1975). Les nids sont alors construits avec du matériel trouvé à proximité comme des mousses, de l'écorce, des herbes, des feuilles, etc... Pendant l'hiver des régions les plus froides de leur aire de distribution, la plupart des souris se rassemblent par groupes de 2 à 6 individus et peuvent parfois entrer en torpeur. Le manque de nourriture combiné avec les basses températures (< 3°) seraient des facteurs stimulant ce comportement (Morhardt and Hudson 1966). Les phases de torpeur durent au minimum 3h et ont lieu généralement le matin. Leur température corporelle descend alors de 35° jusqu'à un minimum observé de 17°, tandis que leur rythme cardiaque peut chuter de 700bpm jusqu'à 60bpm (Gaertner et al. 1973).

Les densités de population de souris à pattes blanches pendant un été donné semblent observer une cyclicité dépendante de la quantité de graines produites lors de l'automne précédent. Ce phénomène est surtout marqué dans la partie nord de l'aire de distribution où les hivers sont plus rudes. Dans ces régions, ce sont principalement les productions exceptionnelles de glands du chêne rouge d'Amérique (*Quercus rubra*) couplées à des températures hivernales clémentes qui importent (Wang et al. 2008). En effet, une surproduction de graines à l'automne permettrait aux souris d'augmenter leur taux de survie hivernale en stockant de plus grandes quantités de nourriture pendant l'hiver. Un nombre exceptionnellement élevé de souris ayant ainsi survécu peut alors se reproduire, provoquant dès lors une explosion démographique par effet boule de neige l'été suivant (Wolff 1996).

1.4.2) Maladie de Lyme

1.4.2.1) Histoire et écologie de la maladie de Lyme

La souris à pattes blanches est bien connue des écologistes et des épidémiologistes pour le rôle central qu'elle joue dans le cycle de transmission de la maladie de Lyme en Amérique du Nord. Cette maladie doit son nom à un petit village du Connecticut où elle a été suspectée pour la première fois en 1975 (Steere et al. 2004). Des épidémiologistes avaient été alertés à l'époque par la prévalence exceptionnellement élevée d'arthrite rhumatoïde chez les enfants du village. L'enquête épidémiologique a rapporté qu'un important pourcentage des enfants touchés se rappelaient avoir été mordus par une tique dans les quatre mois précédant leurs symptômes. Ceux-ci se souvenaient aussi parfois de l'apparition d'un érythème migrant au niveau de la morsure. Le nom d' « arthrite de Lyme » a ainsi été choisi par les épidémiologistes qui soupçonnaient déjà une origine infectieuse à la maladie, sans pour autant pouvoir en identifier l'agent causal précis (Steere et al. 1977). Par la suite, d'autres symptômes liés à la maladie ont été identifiés, comme des troubles neurologiques, des complications cardiaques ou encore des paralysies partielles. L'arthrite de Lyme fut alors renommée « maladie de Lyme ». En 1981, Willy Burgdorfer (1925-2014), entomologiste et bactériologiste américain, parvient à identifier et à cultiver l'agent infectieux : une bactérie spirochète fréquemment trouvée dans la salive des tiques *Ixodes scapularis* (Burgdorfer et al. 1982). Cette bactérie sera ensuite nommée en son honneur *Borrelia burgdorferi*. Plus tard, on découvrit plus d'une trentaine d'autres espèces de *Borrelia*, provoquant des symptômes plus ou moins similaires à ceux provoqués par *Borrelia burgdorferi*. La borréliose est donc une zoonose, transmise dans la grande majorité des cas par la morsure d'une tique du genre *Ixodes*. L'espèce d'*Ixodes* impliquée diffère selon la région géographique. Ainsi, le vecteur principal dans le nord et l'est des Etats-Unis est *Ixodes scapularis* tandis que dans l'Ouest, c'est *Ixodes pacificus* qui prédomine. En Europe et en Asie, ce sont respectivement *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus* qui constituent les réservoirs principaux (Kurtenbach 2006). Certaines espèces de moustiques (Kosik-Bogacka et al. 2007), ont déjà été identifiées comme vecteurs

potentiels, dans une moindre mesure cependant. A l'heure d'aujourd'hui, Il n'existe pas d'article dans la littérature attestant de l'efficacité des aoutâts, des mouches ou encore des puces comme vecteur de la maladie de Lyme, bien que cela ait été plusieurs fois suggéré.

Le cycle classique d'infection de la maladie de Lyme aux Etats-Unis implique donc un vecteur, la tique, mais aussi un ou plusieurs réservoirs. *Ixodes scapularis* se nourrit à trois reprises dans sa vie, une première fois au stade larvaire, une seconde au stade nymphal et une dernière au stade adulte. Chaque repas constitue donc autant d'opportunités pour la tique de se contaminer en se nourrissant sur un hôte infecté. La tique, une fois infectée, peut alors à son tour transmettre la bactérie lors de son (ses) prochain(s) repas. C'est dans ce cas de figure que l'homme peut contracter la maladie de Lyme. *Ixodes scapularis* est une espèce plutôt généraliste, c'est à dire qu'elle ne se nourrit pas sur une espèce hôte en particulier. Elle a cependant tendance à préférer les petits rongeurs lors des stades larvaire et nymphal et plutôt les grands mammifères au stade adulte, sur lesquels elle effectue aussi sa reproduction.

La prévalence de la *Borrelia* au sein des tiques varie grandement d'une région à une autre, en fonction de l'environnement, des conditions climatiques ainsi que de la présence d'espèces réservoirs, indispensables au maintien de la bactérie dans les populations vectrices. Une étude belge a mesuré la prévalence de *Borrelia* spp. sur l'ensemble du territoire belge auprès de plus de 2000 tiques collectées sur des chiens et chats comme étant égale à 10% (Claerebout et al. 2013). Une autre étude s'est quant à elle focalisée sur des tiques collectées en forêt dans la région de Mons. Les auteurs y ont observé une prévalence allant de 2.8 à 21.6% selon les sites, pour une prévalence globale de 12% auprès des 524 tiques collectées (Kesteman et al. 2010). Reye et al. (2010) ont évalué eux aussi la prévalence de *Borrelia* spp., auprès de 1394 tiques *I. ricinus* collectées à travers le Luxembourg. D'après leur travail, le grand duché présenterait une prévalence de 11.3%, ce qui est relativement similaire aux chiffres belges. Rauter and Hartung (2005) ont quant à eux compilé des données provenant de plusieurs études et en ont publié une carte européenne (Fig. 25) permettant de visualiser la prévalence en *Borrelia* spp. dans ces différents territoires. On y constate que certaines régions présentent des prévalences supérieures à 30% !

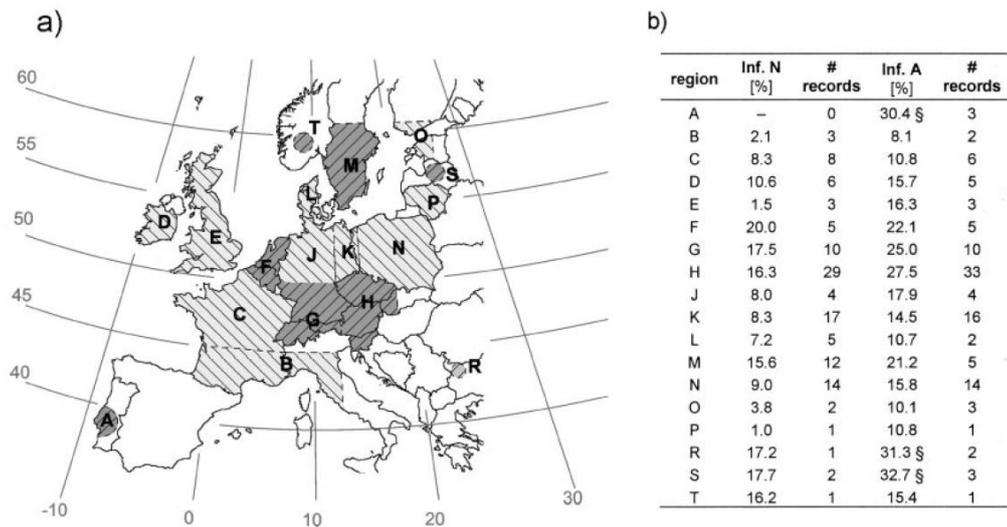


Figure 25 : (a) Map of the defined regions. Areas with low infection rates (nymphs, <11%; adults, <20%) are indicated by light gray; areas with higher infection rates are indicated by dark gray. (b) Regions and means of the rates of infection of nymphs (Inf. N) and adults (Inf. A). The number of records used for every region is indicated. A section sign indicates that the infection rates were extremely high (>30%) (Rauter and Hartung (2005).

Au Canada, le niveau de prévalence des tiques varie lui aussi d'une province à l'autre comme on peut le constater dans le tableau 1 (Dibernardo et al. 2014). Des valeurs plus élevées ont cependant été enregistrées plus au Sud, dans certains états américains avec des valeurs approchant les 25% dans l'état de New-York en 2014 (Wroblewski et al. 2017)

Province	number of sampled ticks	Number (%) of infected ticks by <i>B. burgdorferi</i>
Alberta	87	12 (13,8)
Manitoba	170	15 (8,8)
Ontario	2591	411 (15,9)
New Brunswick	366	25 (6,8)
Newfoundland & Labrador	33	9 (27,3)
Nova Scotia	34	4 (11,8)
Prince Edward Island	178	17 (9,6)
Quebec	1479	203 (13,7)
Total adults	4778	676 (14,1)
Total Nymphs	139	16 (11,5)
Total	4938	696 (14,1)

Tableau 1 : Nombre de tiques échantillonnées et pourcentage de tiques infectées par *B. burgdorferi*. Données de 2012 (Dibernardo et al. 2014)

1.4.2.2) La maladie de Lyme chez l'Homme

Présente dans 65 pays, la maladie de Lyme est la plus fréquente de toutes les maladies vectorielles transmises à l'Homme dans l'hémisphère nord. La maladie de Lyme est la zoonose infectieuse la plus

prévalente aux États-Unis (CDC 1997, Steere et al. 2004, Turney et al. 2014). Chaque année près de 30.000 cas y sont déclarés, dont la majorité est concentrée dans les états du Mid-West et du Nord-Est (<http://www.cdc.gov/lyme/stats/humancases.html>). Un récent rapport du Center for Disease Control avance même que ce chiffre pourrait être grandement inférieur au nombre de nouveaux cas effectifs, qui pourrait avoisiner plutôt les 300.000 (Nelson et al. 2015). L'émergence de la maladie de Lyme au Canada constitue un problème de santé public grandissant (Ogden et al. 2009, Ferrouillet et al. 2014). Au Canada, la maladie de Lyme est une maladie à déclaration obligatoire, et le nombre de cas humains recensés est passé de 144 en 2009 à 917 en 2015 (<https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/maladie-lyme/surveillance-maladie-lyme.html>). En Europe, la maladie de Lyme est déjà bien établie depuis des années, et la prévalence de celle-ci au sein de la population humaine ainsi que de la faune sauvage est bien supérieure à celle du Canada. En Belgique, 2257 et 1561 cas positifs de maladie de Lyme ont été reportés en 2014 et 2015 (Rebolledo et al. 2016). En France, l'incidence nationale est estimée par le Réseau Sentinelles, à 33.202 cas en 2015 et est stable depuis 2009. Il existe une grande disparité géographique avec des incidences plus élevées dans l'est et le centre de la France. Au Québec, comme en Europe, l'incidence de la maladie de Lyme augmente et les zones à risques sont identifiées à des latitudes de plus en plus élevées, suite aux hivers plus doux favorisant la survie des réservoirs et des vecteurs de la maladie (Simon et al. 2014, Mysterud et al. 2016).

1.4.3) Compétence de réservoir de la souris à pattes blanches

1.4.3.1) Maladie de Lyme

Pour qu'une tique acquière la *Borrelia*, il faut que celle-ci se nourrisse sur un hôte contaminé, capable de lui transférer la bactérie. Chaque espèce hôte présente ainsi une certaine compétence de réservoir que l'on peut définir selon trois axes : (1) le réservoir compétent est facilement infecté par la maladie, (2) la bactérie doit pouvoir se maintenir longtemps au sein de son organisme et, finalement, (3) la bactérie doit ensuite être facilement transférable à d'autres individus (Richter et al. 2000). Les différentes espèces animales n'ont pas toutes la même compétence de réservoir. En Amérique du Nord, *P. leucopus* est considérée comme le réservoir le plus compétent (Donahue et al. 1987, Mather et al. 1989, Ostfeld 2011). Cela pour plusieurs raisons, aussi bien physiologiques que comportementales, pouvant être illustrées selon les trois axes définis ci-dessus. Tout d'abord, (1) il a été montré lors d'une étude de terrain que les individus appartenant à l'espèce *Peromyscus leucopus* étaient, parmi les petits mammifères, ceux qui portaient le plus de tiques attachées (Mather et al. 1989). La grande mobilité des souris à pattes blanches favorisant le nombre de rencontres potentielles

de tiques, associée à une inefficacité de ces souris à retirer ces parasites de leur pelage, pourraient constituer des facteurs favorisant ce nombre élevé de tiques attachées par individu. Ensuite, (2) d'autres auteurs ont mis en évidence la persistance importante de la bactérie au sein de cette espèce (Donahue et al. 1987). En effet, celles-ci deviennent infectieuses pour les tiques quelques jours seulement après la primo-infection et le resteront pendant des mois. Des expériences en laboratoire ont ainsi mis en évidence le caractère infectieux de certains spécimens plus de 6 mois après la primo-infection. L'évolution de l'infectiosité est illustrée sur la figure 26. On constate que celle-ci atteint un maximum après 2 semaines puis diminue progressivement. La longue persistance de la *Borrelia* au sein de la souris à pattes blanche est un facteur clé expliquant le succès du cycle d'infection de la maladie, et ce, particulièrement dans les régions où la phénologie des tiques est asynchrone. C'est le cas notamment dans le nord-est des Etats-Unis ainsi qu'au Québec où les tiques à différents stades de développement se nourrissent à des périodes de l'année décalées. En effet, dans ces régions, les nymphes sont actives principalement à la fin du printemps tandis que les larves se nourrissent plutôt vers la fin de l'été.

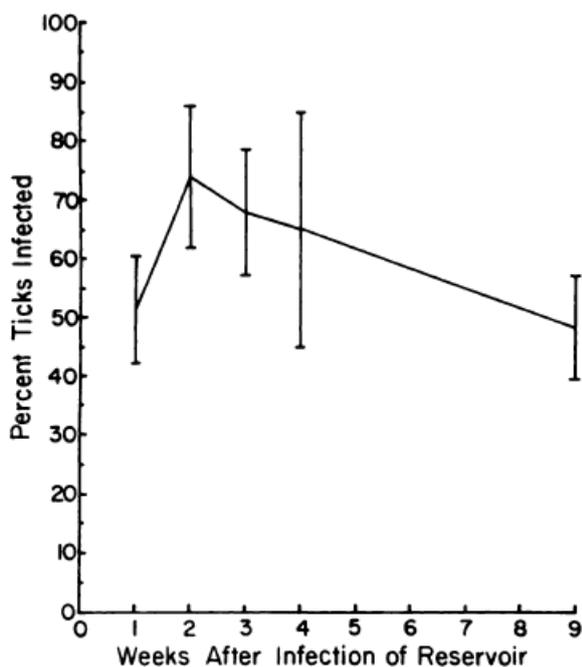


Figure 26 : durée d'infectiosité de 5 souris à pattes blanches infectées par la *Borrelia* pour des larves *Ixodes dammini*. Les écarts-types sont affichés sous forme de lignes verticales (Donahue et al. 1987).

Enfin, (3) les souris à pattes blanches seraient capable d'infecter jusqu'à 90% des tiques se nourrissant sur elles (Mather et al. 1989). Il semblerait, de plus, que la bactérie n'altère pas, ou tout du moins très peu, la santé des souris contaminées. En effet, une étude de laboratoire (Schwanz et al. 2011) a montré que les souris contaminées, bien que produisant des anticorps contre *Borrelia burgdorferi*, ne présentent pas un taux de globules blancs plus élevé par rapport aux souris non infectées. En outre, le

statut infecté ou non n'influence en rien l'activité de déplacement des souris (Schwanz et al. 2011). Ce dernier point est tout particulièrement important quand on sait que la stratégie de prédation des tiques consiste à se positionner sur les herbes hautes et à attendre le passage d'une proie potentielle. *Borrelia burgdorferi* dépend donc de la mobilité de la souris à pattes blanches pour que son cycle d'infection se déroule de manière optimale (Voordouw et al. 2015).

Le fait que la souris à pattes blanches demeure infectée pour une longue durée sans toutefois en pâtir laisse percevoir une stratégie immunitaire de tolérance de la bactérie plutôt que de résistance à celle-ci. Alors que la stratégie de résistance consiste à détecter et supprimer des pathogènes, la stratégie de tolérance tend plutôt à réduire les impacts négatifs de ceux-ci sur la santé de l'hôte. Puisque les pathogènes peuvent affecter à peu près n'importe quel processus physiologique, la stratégie de tolérance ne se limite pas à un seul mécanisme de protection mais à tout un spectre de processus physiologiques visant à la protection des différents organes contre les dommages induits par les pathogènes (Medzhitov et al. 2012). Puisque la souris à pattes blanches ne cherche pas à se débarrasser de la bactérie, cela implique des conséquences sur tout l'écosystème dans lequel elle évolue car elle agit alors tel un nid de bactéries en mouvement, capable de contaminer à peu près toutes les tiques se nourrissant sur elle.

En comparaison, des espèces de laboratoire telles que le hamster (*Mesocricetus auratus*) ou le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) sont apparus comme des réservoirs bien moins compétents (Lindsay et al. 1997). Les lapins, par exemple, sont devenus infectieux mais ont perdu ce caractère dans les deux semaines. Les hamsters, quant à eux, restaient infectieux plus longtemps, mais devenaient progressivement immunisés aux tiques, ces derniers devenant incapables de s'engorger puis de muer. Dans la nature, la compétence de réservoir a été étudiée chez plusieurs autres espèces telles que le Tamia rayé (*Tamias striatus*), le campagnol des prés (*Microtus pennsylvanius*), les musaraignes (*Sorex*), les écureuils (*Sciurus*), mais aucune d'elle ne surpassait la souris à pattes blanches comme réservoir de la maladie de Lyme (Lindsay et al. 1997).

A cette compétence intrinsèque de réservoir la plus élevée, s'ajoute le fait que la souris à pattes blanches est aussi l'espèce de rongeur la plus abondante en milieu forestier fragmenté (Nupp and Swihart 2005), renforçant d'autant plus cette caractéristique de réservoir le plus important de la maladie.

1.4.3.2) Autres maladies

La *Borrelia* n'est pas la seule bactérie pathogène pour laquelle la souris à pattes blanches constitue un important réservoir. En effet, elle véhicule aussi d'autres bactéries appartenant à des genres tels que *Bartonella* ou encore *Ehrlichia* (Hofmeister et al. 1998).

Bartonella est un genre bactérien contenant plus d'une trentaine d'espèces, dont certaines sont connues pour être pathogènes pour l'homme (Buffet et al. 2013). Les maladies provoquées par ces espèces sont appelées des bartonelloses. Parmi celles-ci, on retrouve notamment la maladie des griffes du chat (provoquée par *Bartonella henselae*) ou encore la fièvre des tranchées (provoquée par *Bartonella quintana*). L'espèce associée à *P. leucopus* est *Bartonella vinsonii subsp. Arupensis*. Elle est elle-aussi pathogène pour l'homme. Les symptômes induits par les bartonelloses sont assez variés et incluent, entre autres, fièvres, myocardites, endocardites et lymphadénites.

Ehrlichia chaffeensis est un pathogène bactérien responsable de l'anaplasmose humaine et pour lequel *P. leucopus* constitue aussi un réservoir important (Telford et al. 1996). Cette bactérie intracellulaire se localise à l'intérieur des phagosomes des leucocytes et provoque des symptômes grippaux aigus ainsi qu'une diminution du taux de globules blancs et de plaquettes. D'après la littérature, le taux de mortalité lié à l'anaplasmose serait de 7 à 10 % .

La souris à pattes blanches est aussi connue pour son rôle de réservoir de maladies non bactériennes. C'est le cas par exemple pour la babéiose humaine, provoquée par un protozoaire, *Babesia microti* (Hofmeister et al. 1998). Ce parasite intraérythrocytaire peut engendrer chez l'homme de fortes fièvres, une hémoglobinurie, une anémie hémolytique et, dans les cas sévères, la maladie peut évoluer vers un coma précédant la mort (Vannier et al. 2008). C'est le cas aussi pour le syndrome pulmonaire à hantavirus, une maladie provoquée par des virus de la famille des *Buynaviridæ* et dont le taux de mortalité chez les personnes contaminées avoisine les 30% (Bi et al. 2008).

1.4.4) Pathogènes et prédateurs de la souris à pattes blanches

Les populations de souris à pattes blanches sont régulées par bon nombre d'espèces prédatrices et pathogènes. Les prédateurs connus de la souris à pattes-blanches sont la belette (*Mustela nivalis*), le vison d'Amérique (*Neovison vison*), le renard roux (*Vulpes vulpes*) et le renard gris (*Urocyon cinereoargenteus*), la mouffette rayée (*Mephitis mephitis*), le raton laveur (*Procyon lotor*), le chat (*Felis catus*) et certaines espèces de couleuvres comme la couleuvre brune (*Storeria dekayi*) ou la couleuvre rayée (*Thamnophis sirtalis*), toutes les deux présentes au Québec. Parmi les prédateurs ailés, on retrouve la chouette rayée (*Strix varia*), le grand-duc d'Amérique (*Bubo virginianus*), le hibou moyen duc (*Asio otus*), l'effraie des clochers (*Tyto alba*), le petit-duc maculé (*Megascops asio*), ou encore la buse à queue rousse (*Buteo jamaicensis*) (Morin et al. 2002).

Les parasites intestinaux constituent un type de pathogènes pouvant affecter grandement la santé de leurs hôtes. La souris à pattes blanches est connue pour en abriter plusieurs espèces. La littérature recense à ce jour 31 espèces de parasites intestinaux ayant déjà été observées chez *P. leucopus* (tab. 2), parmi lesquels, nématodes, cestodes et trématodes.

espèce parasite de <i>P. leucopus</i>	référence associée	espèce parasite de <i>P. leucopus (suite)</i>	référence associée (suite)
<i>Alaria mustelae</i> Bosma, 1931	(Bosma 1931)	<i>Hymenolepis benetti</i>	(Barker et al. 1987)
<i>Ascaris</i> spp	(Brown and Fuller 2006)	<i>Isopora</i> spp	(Brown and Fuller 2006)
<i>Baylisascaris procyonis</i> (Stefanski & Zarnowski, 1951)	(Sheppard and Kazacos 1997)	<i>Nippostrongylus muris</i>	(Boren 1993)
<i>Brachylaima peromysci</i>	(Vandegrift and Hudson 2009)	<i>Paruterina rauschi</i>	(Zenchak and Hall 1971)
<i>Brachylaima thompsoni</i>	(Barger and Hnida 2008)	<i>physaloptera</i> sp	(Barker et al. 1987)
<i>Brachylaima virginianum</i>	(Zenchak and Hall 1971)	<i>Pterygodermatites</i> spp	(Zenchak and Hall 1971)
<i>Capillaria hepatica</i>	(Zenchak and Hall 1971)	<i>Pterygodermatites coloradensis</i>	(Barker et al. 1987) (Harkema 1936, Vandegrift and Hudson 2009)
<i>Capillaria americana</i> Read 1949	(Vandegrift and Hudson 2009) (Zenchak and Hall 1971)	<i>Pterygodermatites peromysci</i> Lichtenfels, 1970	(Luong et al. 2011) (Garcia-Prieto et al. 2012)
<i>Eimeria Arizonensis</i>	(Brown and Fuller 2006)	<i>rictularia coloradensis</i>	(Barker et al. 1987) (Harkema 1936, Vandegrift and Hudson 2009)
<i>Eimeria delicata</i>	(Brown and Fuller 2006)	<i>Schistosomatium douthitti</i> (Cort,1915)	(Zenchak and Hall 1971)
<i>Eimeria langebarteli</i>	(Reduker et al. 1985)	<i>Syphacia (Seuratoxyuris) peromysci</i> Harkema, 1936	(Boren 1993) (Harkema 1936) (Zenchak and Hall 1971, Vandegrift and Hudson 2009)
<i>entosiphonus thompsoni</i>	(Harkema 1936)	<i>Taenia multiceps</i> Leske, 1780	(Argumedo 1997)
<i>Euryhalmis squamula</i>	(Zenchak and Hall 1971)	<i>Taenia mustelae</i> Gmelin, 1790	(Zenchak and Hall 1971)
<i>Giarda microti</i>	(Harkema 1936)	<i>Trichinella spiralis</i> (Owen, 1835)	(Martin et al. 1968) (Minchella et al. 1994)
<i>Heligmosomoides vandergrifti</i>	(Vandegrift and Hudson 2009)	<i>Trichuris</i> sp	(Boren 1993)
<i>Hymenolepis</i> spp	(Zenchak and Hall 1971, Brown and Fuller 2006, Vandegrift and Hudson 2009)		

Tableau 2 : Espèces parasites connues de *P. leucopus* et références associées.

1.5) Zone d'étude

La zone d'étude principale de ce travail se situe dans le sud de la province du Québec au Canada. Les sites d'échantillonnage se répartissent autour de la ville de Montréal dans la région de la Montérégie principalement et également dans les régions de Lanaudière, des Laurentides, de la Mauricie et du Centre du Québec. Tous les sites se situent au sein de l'écorégion des basses terres du fleuve Saint-Laurent. Celle-ci se caractérise par des étés chauds et des hivers froids et neigeux. La température annuelle moyenne est de l'ordre de 5° tandis que les températures moyennes estivale et hivernale sont égales à 16.5° et -7° respectivement. Les précipitations annuelles varient entre 800 et 1000mm (EcoRegions_Working_Group 1989). Les forêts sont dominées par l'érable à sucre (*Acer saccharum*), le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), la pruche de l'Est (*Tsuga canadensis*) et le pin blanc (*Pinus strobus*). On y trouve aussi d'autres espèces telles que le hêtre à grandes feuilles (*Fagus grandifolia*), le pin rouge (*Pinus resinosa*), le thuya occidental (*Thuja occidentalis*), le chêne rouge (*Quercus rubra*), l'érable rouge (*Acer rubrum*), le frêne noir (*Fraxinus nigra*), l'épinette blanche (*Picea glauca*) et le mélèze laricin (*Larix laricina*) (EcoRegions_Working_Group 1989). La majorité du paysage est constituée cependant de cultures intensives (60% de la surface totale), dont les productions principales sont le maïs, le soja et le foin cultivé. La souris à pattes blanche étant forestière, la plupart des sites de capture correspondent à des petits patchs forestiers entourés de cultures (fig 27 & 28). Le degré de périphérie des populations, souvent employé dans ce travail a été calculé de 3 manière différentes, en utilisant : (1) la latitude, (2) la distance de chaque population à la population la plus australe, (3) la distance de chaque population à la population la plus australe au sein de la même lignées génétique.

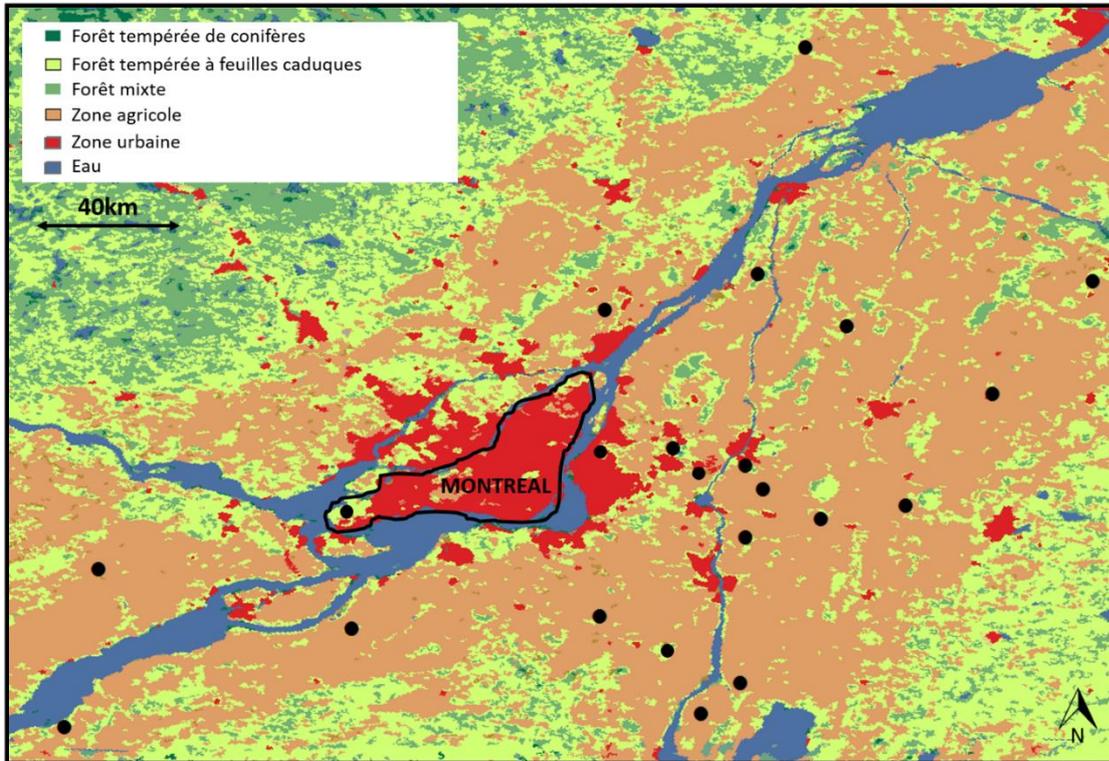


Figure 27 : Utilisation des sols de la zone d'étude québécoise. Source : Commission for Environmental Cooperation



Figure 28 : Environnement type de la zone d'échantillonnage québécoise. Crédits photos : google map ; maxxum100.com.

Des tissus de *P. leucopus* provenant de collections de musées américaines (Smithsonian Institution National Museum of Natural History and Harvard Museum of Natural History) ont par la suite complété l'échantillonnage et agrandi la zone d'étude (fig. 29).

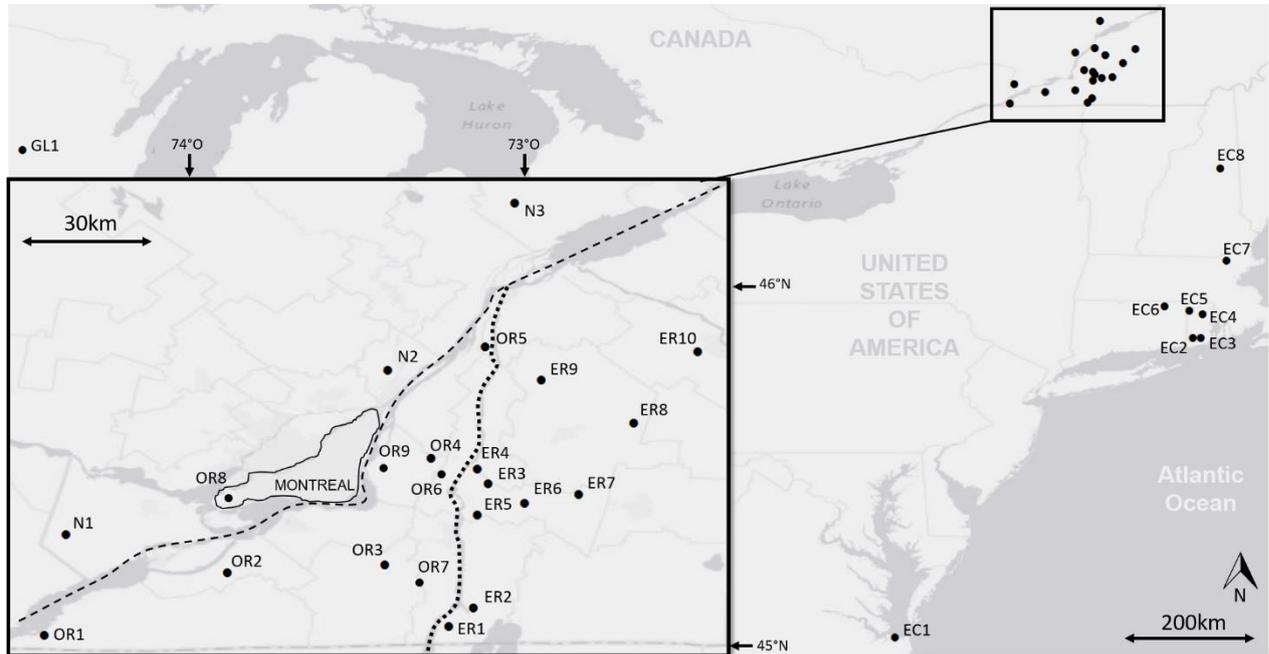


Figure 29 : Carte des sites d'échantillonnage.

1.6) Contexte méthodologique

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation de plusieurs outils méthodologiques. Voici une présentation de ceux-ci.

1.6.1) Récolte des échantillons



Figure 30 : piège Sherman

Les animaux ont tous été capturés à l'aide de pièges Sherman (fig. 30). 160 de ceux-ci étaient placés en début de semaine, en grilles de 40 pièges, séparés de 10 mètres les uns des autres. L'appât utilisé était constitué d'une mixture de flocons d'avoine et de beurre d'arachide. Les souris à pattes blanches étant nocturnes, les pièges étaient appâtés le soir puis vérifiés le matin. Les individus capturés ont ensuite été directement euthanasiés et ce, quelle que soit l'espèce à laquelle ils appartenaient. L'après-midi était consacrée à la dissection des individus capturés. Pour chaque animal,

la taille du corps, de la queue, des pieds postérieurs et des oreilles ainsi que le poids total furent mesurés et enregistrés. Dans le cas des souris à pattes blanches, on récolta les poumons, le foie, le cœur, les reins, la rate, le tractus digestif ainsi qu'une petite quantité de poils dans des tubes Eppendorf séparés. La taille et le poids des rates ont été enregistrés. Enfin, Les têtes ont été coupées lors du retour au laboratoire et soumises à une colonie de *Dermestidae* afin de nettoyer le crâne et les mâchoires de tous tissus, dans le but de procéder à des analyses morphométriques.

1.6.2) Mesures de stress

Trois variables ont été utilisées pour évaluer le niveau de stress à long terme des souris à pattes blanches : le poids des glandes surrénales, le niveau d'asymétrie fluctuante et la concentration de corticostérone dans les poils.

Les glandes surrénales furent tout d'abord séchées dans un four à 90° pendant 24h, puis pesées avec une balance de précision 0.01mg (Gaitan and Millien 2016).

Pour quantifier l'asymétrie fluctuante, la face ventrale du crâne ainsi que la surface externe des deux mâchoires ont été photographiées à l'aide d'un microscope relié à une caméra. Des repères ont été placés numériquement sur chaque image et deux superpositions procrustes ont ensuite été effectuées, une pour les crânes et l'autre pour les mâchoires (voir figures S1 et S2 de l'article 4). Cette technique permet d'extraire l'information de la forme uniquement, en retranchant les composants de variation dus à la taille, à la position et à l'orientation (Goodall 1991). Un programme informatique appelé MorphoJ (Klingenberg 2011) a ensuite permis de quantifier l'asymétrie fluctuante pour chaque crâne et pour chaque couple de mâchoires. Pour ce faire, c'est la distance procrustéenne qui a été utilisée, correspondant à la racine carrée de la somme des distances au carré entre chaque repère et son repère miroir.

La dernière méthode d'évaluation du stress à long terme a consisté à quantifier la corticostérone présente dans les poils selon un protocole adapté de celui de Macbeth et al. (2010). Les poils ont été collectés à l'aide d'une paire de ciseaux, en prenant soin de ne pas arracher le bulbe. Ces poils ont ensuite été nettoyés à l'aide d'une solution de méthanol afin d'y retirer tous résidus d'urine ou de fèces qui auraient pu s'y déposer car ils contiennent eux aussi des traces d'hormones stéroïdes. Les poils ont ensuite été réduits en poudre à l'aide d'un tissue-lyser puis immergés dans du méthanol HPLC pendant 24h. Le surnageant résultant de la centrifugation de cette solution a ensuite été séché à l'aide d'un Evaporac (Cole and Palmer) sous un flux d'azote. Les échantillons ainsi séchés ont finalement été reconstitués dans 1ml de buffer et 50µl de cette solution ont été analysés en duplicat avec un kit EIA de corticostérone (Oxford biomedical Research EA-66) en suivant le protocole proposé par le fabricant.

1.6.3) Parasitologie

Le tractus gastrique complet de chaque souris a été ouvert depuis l'estomac jusqu'à l'anus. Le contenu, ainsi que les parois de l'estomac et des intestins ont été minutieusement examinés sous binoculaire et chaque parasite découvert a été récupéré. Tous les parasites ont ensuite été classés par morphotype puis identifiés sur base de critères morphométriques, voire génétiques lorsque cela s'est avéré nécessaire, en utilisant le marqueur CO1. Le pelage des souris a aussi été minutieusement examiné pour y détecter et collecter tous parasites externes pouvant s'y trouver.

1.6.4) Génétique

Différents gènes d'intérêt ont été séquencés tout au long de ce travail avec, pour chacun d'eux, un objectif propre. Avec le séquençage du gène du Cytochrome b, un gène mitochondrial dit neutre (voir section 2.1), notre objectif a été de retracer la phylogéographie de la souris à pattes blanches dans les régions du Québec et du Nord-Est des Etats-Unis. Le gène DRB du complexe majeur d'histocompatibilité de type II a aussi étudié. Il s'agit d'un gène nucléaire dit sélectionné (voir section 2.1) de par son rôle dans la reconnaissance des pathogènes, et plus particulièrement des parasites helminthes. Son séquençage a permis non seulement de faire le lien entre génotype et prévalence en parasites mais aussi d'étudier la phylogéographie de l'espèce selon un marqueur génétique différent. Enfin le gène 16S, codant pour l'ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes a été lui aussi séquencé, dans le but d'identifier les bactéries présentes au sein des tissus de souris. Alors que le gène du Cytb a été séquencé par la méthode Sanger, les gènes DRB et 16S ont eux été séquencés via la plateforme de séquençage nouvelle génération (NGS) Miseq d'Illumina.

1.6.4.1) Séquençage nouvelle génération

Le séquençage nouvelle génération nécessite plusieurs étapes préliminaires dont les principales sont l'extraction de l'ADN, la première PCR, la première purification, la seconde PCR, la seconde purification et, enfin, la quantification de l'ADN et la création du pool équimolaire qui servira d'échantillon final pour le séquençage à proprement parler.

Extraction de l'ADN

La première étape a donc constitué à extraire l'ADN à partir de tissus de souris (foies essentiellement). Puisqu'un des objectifs nécessitait de l'ADN bactérien, quelques étapes supplémentaires ont dû être effectuées par rapport au protocole d'extraction classique afin d'extraire aussi l'ADN des bactéries gram + et – présent dans les tissus. Le protocole d'extraction utilisé a d'abord consisté à hacher finement les tissus à l'aide d'instruments stérilisés en prenant soin de ne pas utiliser la surface extérieure des tissus de manière à minimiser les contaminations qui auraient pu survenir lors de la

dissection. Puisque seuls 25mg de tissus peuvent être utilisés pour le protocole, le fait de hacher finement le tissu a permis d'homogénéiser l'échantillon afin que celui-ci soit le plus représentatif possible de l'ensemble du tissu. Une étape de lyse chimique a suivi, employant du lysozyme, une hydrolase extraite de l'œuf ayant la capacité de détruire la paroi bactérienne. Une autre étape de lyse, physique cette fois, a ensuite été effectuée, consistant à faire subir aux échantillons des cycles de gel/dégel afin de détruire les membranes des cellules animales et bactériennes grâce à la formation de cristaux de glace. Le reste du protocole d'extraction a été effectué selon les instructions fournies par le fabricant.

Amplification des marqueurs génétiques

La première amplification en chaîne par polymérase (PCR) a visé à amplifier les différents gènes d'intérêt. Pour ce faire, des amorces d'ADN spécifiques à ces gènes ont été utilisées. Pour le gène 16S, ce sont les primers 784F (5'-AGGATTAGATACCCTGGTA -3') et 1061R (5'- CRRACGAGCTGACGAC -3'), originalement décrits par Andersson (2008) et couplés avec les adaptateurs illumina qui ont été utilisés. Pour le gène DRB, ce sont des versions modifiées des primers JS1 (5'-GAGTGTCATTTCTACAACGGGAC-3') et JS2 (5'- GATCCCGTAGTTGTGTGTGCA -3'), eux aussi couplés avec les adaptateurs illumina qui ont été employés. L'amplification d'ADN nécessite la répétition de cycles de dénaturation, d'appariement et d'élongation, chacun caractérisé par des températures différentes. Une première étape de purification de l'ADN a ensuite été requise afin de supprimer les restes d'amorces et les éventuels dimères que ceux-ci auraient pu former. Cette étape a nécessité l'utilisation de microbilles magnétiques sur lesquelles les fragments d'ADN se fixent, alors que les déchets sont eux éliminés.

Une seconde réaction PCR est par la suite déclenchée, dans le but d'attacher les tags (courtes séquences de quelques bases seulement) qui permettent l'attribution des séquences obtenues à l'échantillon d'origine. Chaque échantillon se voit donc attribuer un tag forward et un tag reverse et c'est la combinaison de ces deux tags, unique pour chaque échantillon, qui permet ensuite l'attribution de la séquence.

Une seconde étape de purification d'ADN est ensuite effectuée avec les mêmes objectifs que la première.

Puisque la plateforme de séquençage Miseq nécessite un échantillon composite de tous les échantillons en équimolarité, on procède à une étape de quantification de l'ADN pour chacun des échantillons. Ce procédé utilise le PicoGreen, un réactif fluorescent se liant à l'ADN double brin. Un fluorimètre permet alors de mesurer cette fluorescence et d'en déduire la quantité d'ADN qui lui est associée. Une fois les concentrations d'ADN connues pour chaque échantillon, on procède à des

dilutions, de sorte que tous les échantillons puissent ensuite être mis en commun dans un seul tube en respectant l'équimolarité.

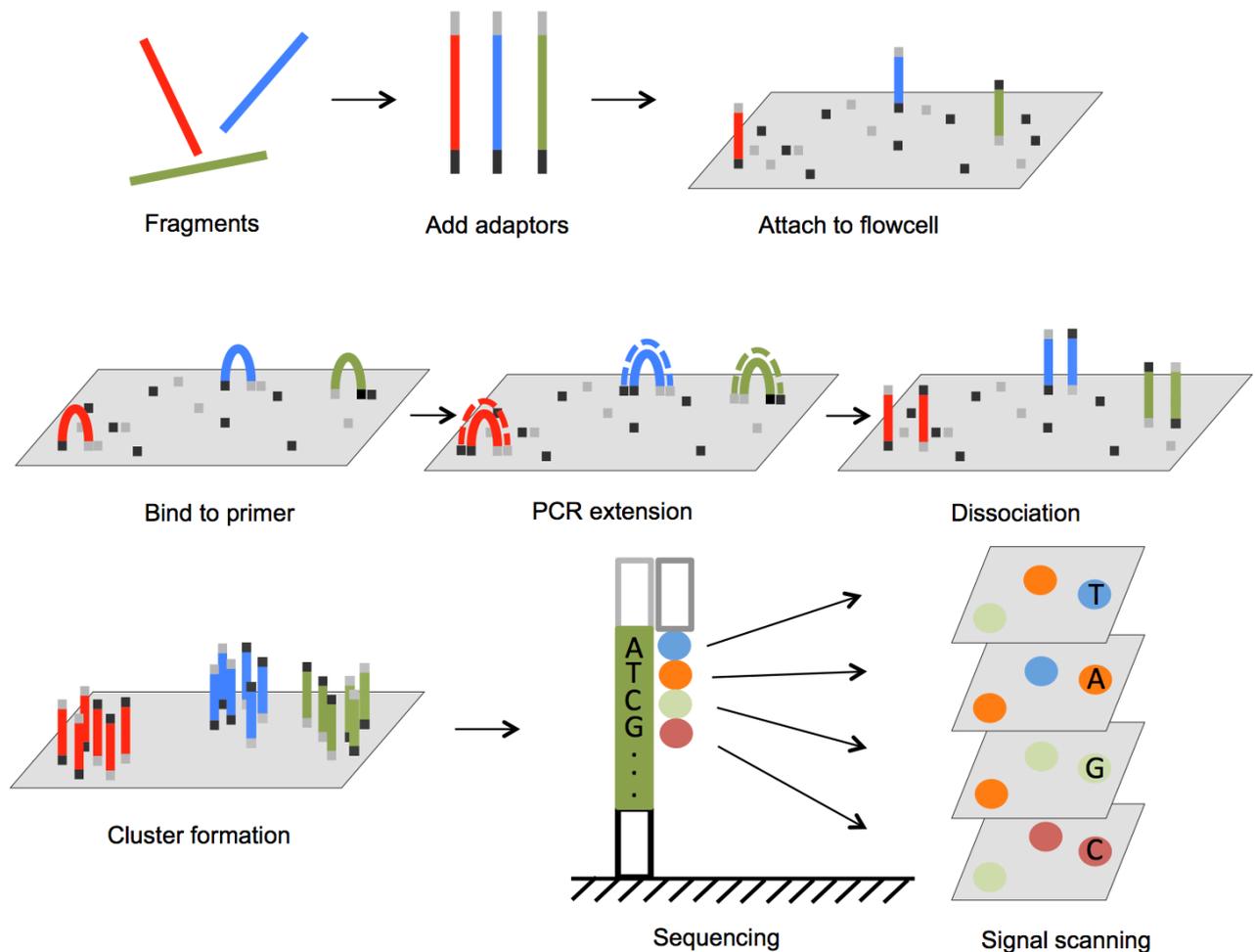


Figure 31 : Principe du séquençage Illumina. Source : (Lu et al. 2015)

L'échantillon composite est alors versé sur une surface solide appelée « flow cell », sur laquelle les différents brins d'ADN vont se lier (fig. 31). S'ensuit une étape d'amplification en ponts des fragments d'ADN qui entraîne la création de groupes de séquences similaires. Une amorce de séquençage universelle vient alors hybrider sur chacun de ces brins d'ADN nouvellement synthétisés permettant l'extension d'une seule base à chaque cycle par l'utilisation de nucléotides modifiés et marqués de fluorescence de couleurs différentes pour les 4 bases. A chaque cycle une image est enregistrée puis analysée par le séquenceur afin de déterminer quelle est la base qui a été ajoutée. On obtient ainsi au final plusieurs milliers de séquences par échantillon.

1.6.4.2) Séquençage Sanger

Le gène du cytochrome b a été séquençé par la méthode Sanger. Au préalable, une extraction d'adn et une PCR classiques sont nécessaires. Les primers utilisés correspondent au primers H6/L7 décrits

par Kocher et al. (1989). Les produits PCR ont ensuite été envoyés chez MACROGEN en vue de leur séquençage par la méthode Sanger (fig. 32). Cette méthode est basée sur l'utilisation de 4 didésoxyribonucléotides, qui sont similaires aux 4 désoxyribonucléotides classiques (A-C-G-T) mais en diffèrent par deux propriétés particulières principales. Ils sont fluorescents (4 fluorescences différentes) et ils ont la particularité d'être des terminateurs de chaînes. Ainsi, une fois qu'ils sont incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Après une multitude d'opérations de polymérisation de l'ADN, il en résulte donc un mélange de fragments d'ADN de tailles différentes, qui se terminent tous par un didésoxyribonucléotide fluorescent. Ces fragments sont ensuite séparés et classés par ordre de taille grâce à une électrophorèse. Enfin, la lecture de la séquence de fluorescence nous indique la séquence effective de nucléotides.

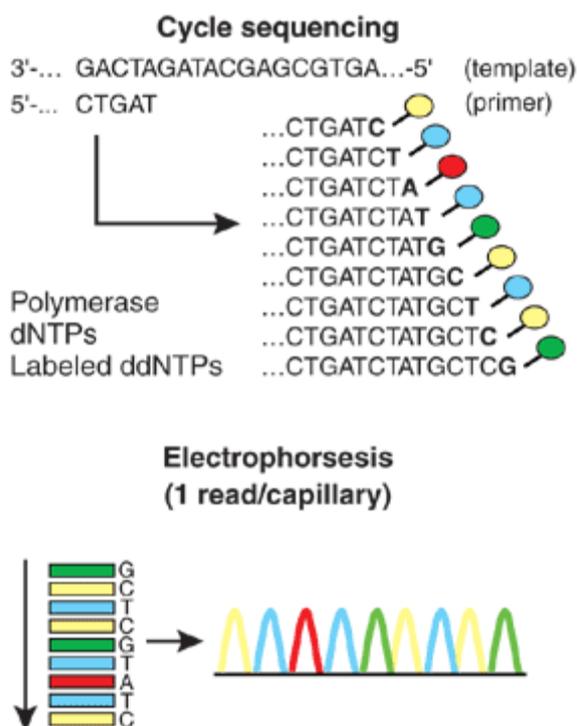


Figure 32 : Principe du séquençage Sanger (Shendure and Ji 2008).

1.6.5) Traitement bio-informatique

L'énorme quantité d'informations récoltée nécessite un traitement bio-informatique avant analyse. En effet, le séquençage n'est pas dénué d'erreurs, il convient donc de se défaisser des séquences erronées, puis de transformer les séquences adéquates en informations pertinentes pour l'étude en cours. Ce traitement informatique se fait sur des grappes de serveurs informatiques (clusters), sortes de super-ordinateurs pilotés à distance, à partir d'un script regroupant les différentes fonctions utilisées dans ce traitement. Pour ce travail, nous avons utilisé le cluster NIC4 du Consortium des

Équipements de Calcul Intensif (CECI), financé par le FNRS. Pour mieux illustrer ceci, le script utilisé pour le traitement bio-informatique des données du séquençage 16S est détaillé ci-dessous :

Chaque échantillon est représenté par un brin forward et un brin reverse. Exemple : l'échantillon nommé 16s-164_S193 retourne donc deux fichiers zippés :

16s-164_S193_L001_R1_001.fastq.gz et 16s-164_S193_L001_R2_001.fastq.gz.

Le traitement informatique consiste en une boucle de plusieurs fonctions se répétant pour chaque échantillon. La première étape consiste donc à créer un vecteur (appelé ici « sample ») comportant le nom de chaque échantillon :

```
sample=(16s-164_S193_ 16s-165_S194_ 16s-166_S195_ etc...)
```

Il faut aussi entrer les chemins d'accès aux différents répertoires :

```
DIR2=/home/users/a/d/adrien
```

```
DIR=/scratch/ulg/GENPMA/adrien/françois/juin2016/RunJuin201616S
```

```
DIR3=/scratch/ulg/GENPMA/adrien/françois/juin2016/RunJuin201616S/txt
```

Pour chaque N allant de 0 à 400 (= chaque échantillon du vecteur « sample »), on effectuera la boucle suivante.

```
for ((N=0 ; N<=400 ; N++)) ;  
do
```

Décompression des fichiers forward et reverse

```
gunzip ${Dir}/${sample[N]}L001_R1_001.fastq.gz
```

```
gunzip ${Dir}/${sample[N]}L001_R2_001.fastq.gz
```

Appariement des brins forward et reverse avec la condition que la zone d'appariement soit égale à 10 bases minimum, et que 8 bases sur les 10 s'apparient correctement.

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/fastq-join -m 10 -p 8 ${Dir}/${sample[N]}L001_R1_001.fastq  
${Dir}/${sample[N]}L001_R2_001.fastq -o ${Dir}/${sample[N]}joint.fastq ;
```

Suppression des séquences dont la taille est inférieure à 275 bases.

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/fastq-mcf -0 -l 275 n/a ${Dir}/${sample[N]}joint.fastq -o  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275.fastq
```

Suppression des 21 premières et des 19 dernières bases, correspondant aux amorces forward et reverse.

```
fastx_trimmer -f 21 -Q 33 -i ${Dir}/${sample[N]}joint_tr275.fastq | fastx_trimmer -t 19 -Q 33 -o  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np.fastq
```

Filtrage de qualité : chaque base de chaque séquence est accompagnée d'un indice de qualité qui tient compte de la probabilité qu'une erreur existe dans l'attribution de cette base. Dans ce cas, la séquence est conservée si 90% de bases ont une qualité égale ou supérieure à Q30, ce qui signifie qu'il n'y a qu'une chance sur mille que cette base soit erronée.

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/fastq_quality_filter -v -q 30 -p 90 -i  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np.fastq -o ${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt.fastq
```

Déréplication du fichier. Permet de regrouper ensemble les séquences analogues réduisant ainsi significativement la taille du fichier.

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/usearch8.0.1623_i86linux32 -derep_fulllength  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt.fastq -fastaout ${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-  
derep.fasta -sizeout
```

Classement des séquences par ordre d'occurrence

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/usearch8.0.1623_i86linux32 -sortbysize  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep.fasta -fastaout ${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-  
derep-class.fasta -minsize 1
```

Comparaison des séquences à une base de données de séquences chimériques connues et suppression de celles-ci. Ces chimères, qui sont en fait des artefacts créés lors du processus d'amplification, correspondent à la fusion de deux brins d'ADN différents. Il est important de s'en débarrasser puisqu'elles n'ont aucune identité biologique réelle.

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/usearch8.0.1623_i86linux32 -uchime_ref  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class.fasta -db ${DIR2}/gold.fa -nonchimeras  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class-nonchim.fasta -chimeras ${Dir}/${sample[N]}-  
chimeraq.fasta -strand plus
```

Création d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU) par regroupement des séquences présentant un seuil de similarité supérieur à 97%.

```
/home/users/a/d/adrien/.local/bin/usearch8.0.1623_i86linux32 -cluster_otus  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class-nonchim.fasta -otus  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class-nonchim-clust.fasta -sizein -sizeout
```

Comparaison des OTUs à une base de données de séquences 16S afin de leur attribuer une taxonomie correspondante (Wang et al. 2007). La fonction est ici paramétrée de sorte qu'un taxon est attribué si le seuil de confiance est au moins de 80%. Si ce seuil n'est pas atteint, la séquence est attribuée au taxon d'ordre supérieur.

```
/home/users/a/d/adrien/rdp_classifier_2.10.1/dist/classifier.jar classify -c 0.8 -o  
${DIR3}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class-nonchim-clust-classified.txt -h  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class-nonchim-clust-hier.txt  
${Dir}/${sample[N]}joint_tr275_np_filt-derep-class-nonchim-clust.fasta
```

Fin de la boucle
done

Une fois les séquences nettoyées et identifiées taxonomiquement, il convient de prêter attention aux différents contrôles négatifs. Il en existe de trois sortes : les blancs d'extraction, les blancs de PCR1 et les blancs de PCR2. Ces contrôles négatifs vont nous permettre de distinguer les OTUs provenant des différents réactifs et contaminations éventuelles de celles présentes effectivement dans le tissu analysé. La règle utilisée ici consiste à ne garder que les séquences dont l'abondance relative est 10x supérieure à celle de tous les blancs. Ce critère est assez restrictif mais il a l'avantage d'éliminer toute possibilité qu'une OTU d'origine étrangère s'imisce dans les résultats finaux.

Chapitre 2 : Structure génétique (gène sélectionné et gène neutre)

2.1) Avant-propos

Une large part de ce travail a été consacrée à l'étude de la structure et de la diversité génétique de la souris à pattes blanches. Pour ce faire, deux marqueurs génétiques ont été utilisés. Le premier, le gène DRB du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II, est un gène codant pour une partie d'une protéine transmembranaire jouant un rôle prépondérant dans le système immunitaire. Ce gène est dit sélectionné car il peut potentiellement conférer à son hôte un avantage sélectif. En effet, certains allèles DRB permettent une meilleure détection des pathogènes, autorisant ainsi une meilleure survie à leur hôte. Le second marqueur utilisé dans notre étude, le gène mitochondrial du cytochrome B est quant à lui plutôt considéré comme un marqueur génétique neutre puisqu'il n'est censé conférer aucun avantage sélectif à son hôte. L'étude de ces deux marqueurs a été effectuée dans un premier temps à l'échelle québécoise et a eu pour objectifs de répondre à ces deux questions :

1. Existe-t-il une structure génétique particulière entre les populations de souris à pattes blanches vivant dans le sud du Québec ?
2. Existe-t-il un gradient de diversité génétique entre les populations québécoises les plus australes et celles situées le plus au nord comme prédit par la central-marginal hypothesis?

L'ajout d'échantillons provenant de localités situées dans des régions plus méridionales, aux États-Unis, a ensuite permis d'étudier les processus génétiques selon un gradient géographique plus large, avec pour objectif de répondre à d'autres questions, à savoir :

3. Quelles sont les origines des différentes lignées génétiques québécoises mis en évidence précédemment?
4. Existe-t-il un gradient de diversité génétique entre les populations des États-Unis et les populations québécoises ?
5. Le marqueur neutre ainsi que le marqueur sélectionné donnent-ils des signaux similaires ?
6. Si ce n'est pas le cas, quel phénomène pourrait expliquer les différences observées ?

Les points 1 et 2, focalisés à l'échelle géographique du Québec sont brièvement discutés ci-dessous (sous chapitre 2.2), tandis que les points 3, 4, 5 et 6 sont abordés en détail dans l'article 1 (sous chapitre 2.3).

2.2) Etude à l'échelle du Québec

Le logiciel STRUCTURE a permis de mettre en évidence, pour les deux marqueurs génétiques, l'existence des deux mêmes lignées génétiques bien différenciés (losanges et étoiles), séparées géographiquement par le fleuve Saint-Laurent, qui joue ainsi le rôle de barrière génétique efficace. De plus, le marqueur MHC nous renvoie des données plus précises encore puisqu'il permet la ségrégation des populations du sud du Saint-Laurent selon un groupe de populations situées à l'ouest de la rivière Richelieu et un autre groupe de populations situées à l'est de cette même rivière (fig. 1). Ces résultats confirment les précédentes études menées dans le même contexte mais basées sur d'autres marqueurs, qu'ils soient microsatellites (Rogic et al. 2013) ou bien morphométriques (Ledevin and Millien 2013).

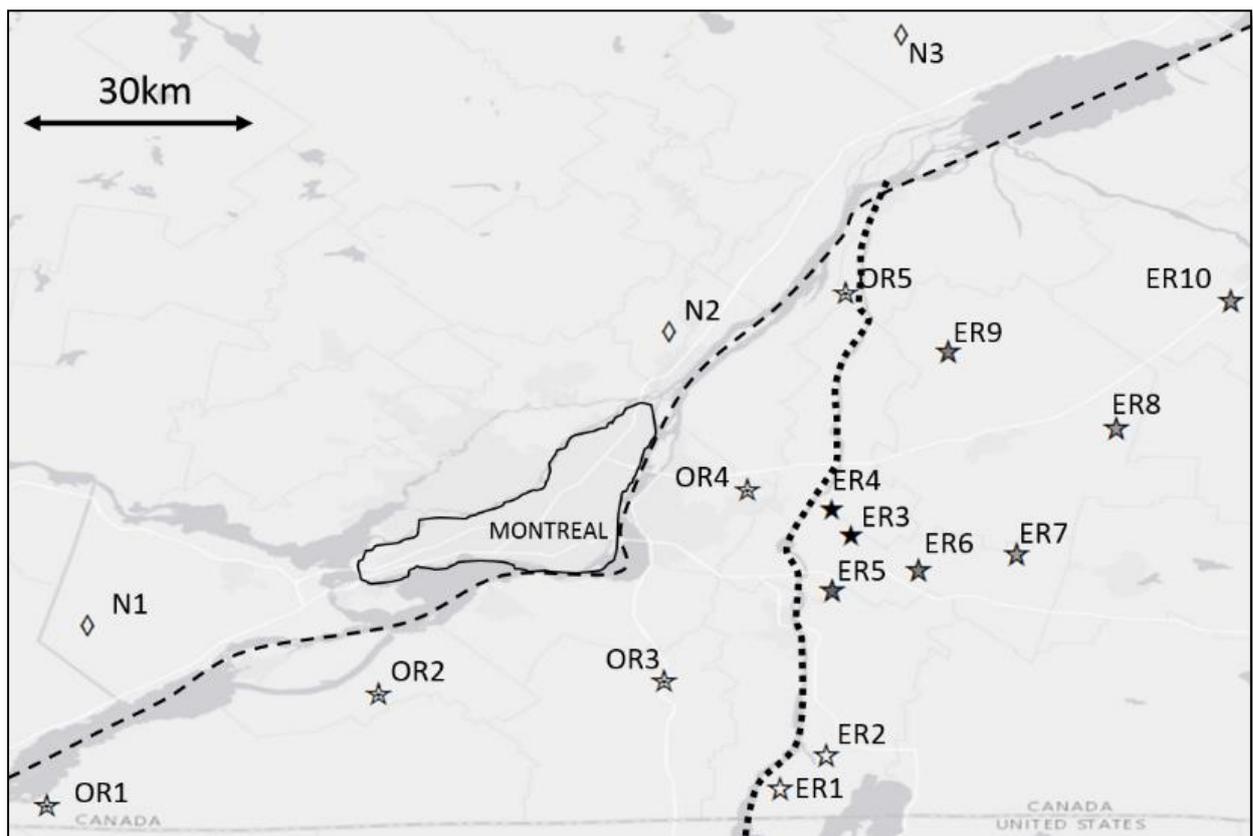


Figure 1 : carte des sites d'échantillonnage. Les symboles correspondent aux groupes de populations identifiés par STRUCTURE pour le marqueur MHC..

La diversité génétique a été calculée pour le marqueur DRB selon 3 méthodes (figs. 2a-b-c). La richesse allélique raréfiée, en utilisant la fonction RAREFY du package R Vegan (Oksanen 2013) selon la méthode proposée par Hurlbert (1971) ainsi que les diversités haplotypiques et nucléotidiques, calculée par l'intermédiaire du programme DNASP (Librado and Rozas 2009). Les populations sont classées par ordre de latitude croissante.

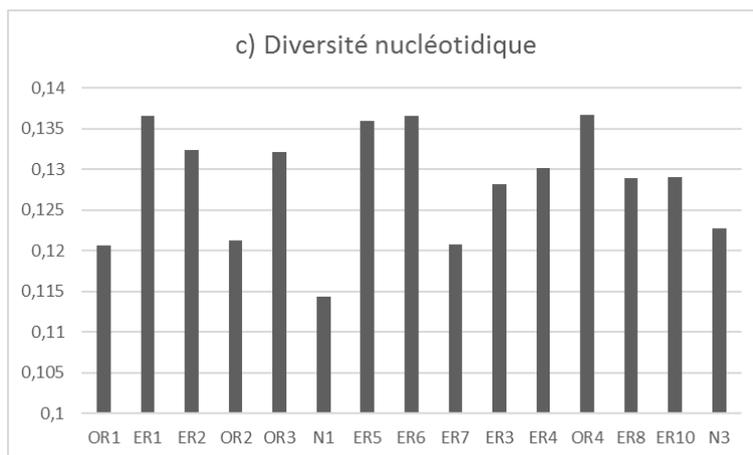
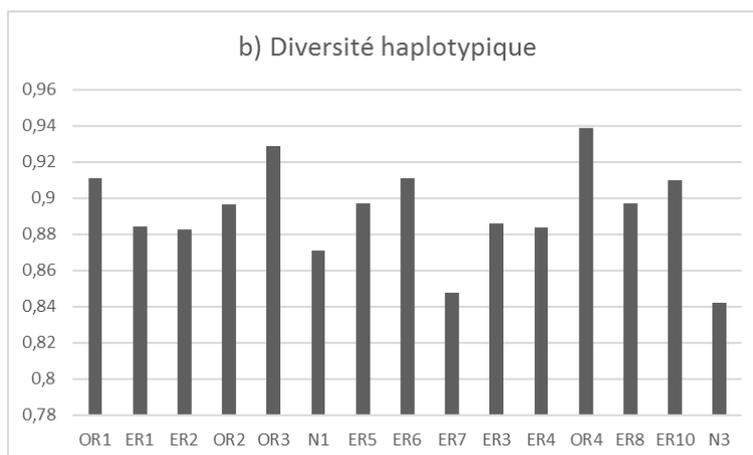
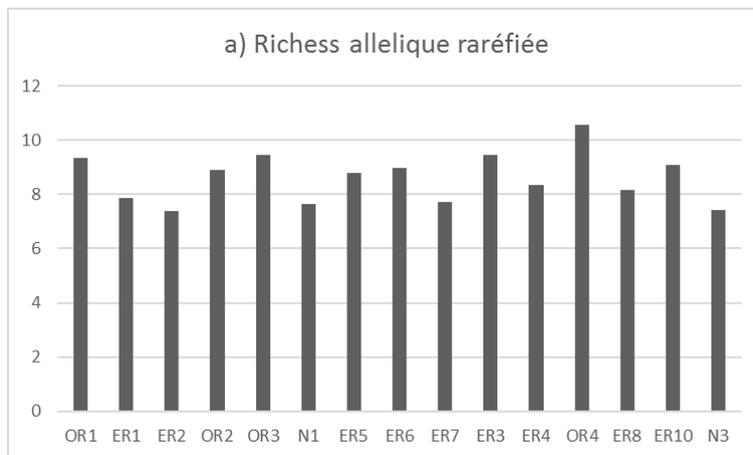


Figure 2 : diversité génétique calculée pour le marqueur DRB selon 3 méthodes : (a) Richesse allelique raréfiée, (b) diversité haplotypique et (c) diversité nucléotidique

Bien que la population la plus nordique (N3) présente la plus faible diversité haplotypique, aucune autre tendance n'a pu être mise en évidence. En effet, l'autre population la plus nordique, ER10, présente une diversité supérieure à la moyenne générale, et ce pour les trois variables investiguées. De plus, aucune relation entre la diversité génétique et le degré de périphérie des populations n'a pu être soulignée, et ce quelle que soit la variable employée.

Ces résultats permettent ainsi de conclure qu'à cette échelle géographique, le gradient de diversité génétique décroissant vers la périphérie de l'aire de distribution prédit par la "central-marginal hypothesis", n'apparaît pas. Ceci peut s'expliquer d'une part, par le gradient géographique qui pourrait s'avérer trop court pour observer de tels processus. D'autre part, le gène DRB étant un marqueur sélectionné, des processus de sélection pourraient intervenir, maintenant ainsi une diversité élevée même dans les zones les plus périphériques de l'aire de distribution. Ces processus sont étudiés plus en détail dans l'article 1.

2.3) Article 1 : Etude à large échelle géographique

Cette étude correspond à l'article 1 de cette thèse qui se trouve résumé ci dessous.

La diversité génétique est supposée diminuer du centre vers la périphérie de l'aire de distribution d'une espèce. Cette diminution est généralement associée à des processus dits neutres. Cependant, des phénomènes de sélection peuvent aussi altérer la diversité des gènes sélectionnés, comme ceux associés au système immunitaire. C'est donc une combinaison de ces processus neutres et sélectionnés qui est supposée affecter la distribution spatiale de tels marqueurs génétiques, bien qu'on ne connaisse pas l'importance relative de ces deux types de processus. Dans cet article, nous avons comparé la diversité d'un marqueur neutre (le gène mitochondrial codant pour le cytochrome b) et d'un marqueur sélectionné (le gène DRB du complexe majeur d'histocompatibilité de type II) au sein de populations de souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) situées au Québec et dans le nord-est des États-Unis. Sur base du marqueur neutre, deux lignées différentes ont été mises en évidence. Une première se distribuant de la côte Est des États-Unis jusqu'à la rive sud du Saint-Laurent au Québec, et une seconde rassemblant les individus de la région des Grands Lacs avec ceux de la rive nord du Saint-Laurent. Un patron phylogéographique différent a été observé avec le marqueur DRB. Cette disparité serait causée par la pression de sélection opérée par les parasites helminthes. Conformément à ce que prédit la « central-marginal hypothesis », nous avons confirmé que l'expansion géographique des deux lignées s'accompagne d'une perte de diversité génétique neutre vers la périphérie de l'aire de distribution. Similairement, une perte de diversité a aussi été observée en ce qui concerne le marqueur DRB, ce qui pourrait s'expliquer aussi bien par un phénomène appelé le « genetic drift » que par un autre phénomène appelé « positive frequency dependent selection ». Cette perte de diversité génétique en bordure d'aire de distribution pourrait ralentir l'expansion de *P. leucopus*, en contrebalançant l'effet positif que le réchauffement climatique confère à la survie de cette espèce à ces latitudes élevées.

Effects of parasite and historic driven selection on the diversity and structure of a MHC-II gene in a small mammal species (*Peromyscus leucopus*) undergoing range expansion

A. André^{1,2}  · V. Millien² · M. Galan³ · A. Ribas⁴ · J. R. Michaux^{1,5}

Received: 21 December 2016 / Accepted: 26 April 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract Genetic diversity may decrease from the centre to the margin of a species distribution range due to neutral stochastic processes. Selection may also alter genetic diversity in non-neutral markers, such as genes associated with the immune system. Both neutral processes and selection on the immune system are thus expected to affect the spatial distribution of such markers, but the relative strength of each has been scarcely studied. Here, we compared the diversity of a neutral marker (mitochondrial cytochrome *b*) and a selected marker (DRB gene from the MHC-II), in eastern-North American populations of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*), a species known for its role of main reservoir of the Lyme disease. We observed distinct phylogeographic patterns with these two markers, which may be the result of selection pressure acting upon the DRB gene. As predicted by the central marginal hypothesis, we observed a loss of neutral genetic diversity toward the margin of the species distribution. A decrease in diversity was also observed for the DRB gene, likely due to genetic drift and positive selection operated by helminth parasites. Such a loss in genetic diversity at the range margin may slow down the ongoing expansion of *P. leucopus*, by counterbalancing the effect of global warming on the mouse survival at higher latitude.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10682-017-9898-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ A. André
adrien.andre@ulg.ac.be

¹ Conservation Genetics Laboratory, University of Liège, Boulevard du Rectorat 26, 4000 Liège, Belgium

² Redpath Museum, McGill University, 859 Sherbrooke West, Montreal, QC H3A 0C4, Canada

³ INRA, UMR CBGP, (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), Campus International de Baillarguet CS 30016, 34988 Montpellier-sur-Lez Cedex, France

⁴ Section of Parasitology, Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, 08028 Barcelona, Spain

⁵ CIRAD, UR AGIRs, 34398 Montpellier, France

Keywords Cytochrome-b gene · Major histocompatibility complex diversity · *Peromyscus leucopus* · Helminths

Introduction

Genetic diversity across populations of a species is generally not homogeneously distributed throughout the species range, and distinct processes drive such heterogeneity (Johansson et al. 2006; Eckert et al. 2008; Excoffier et al. 2009; Adams and Hadly 2012; Lau et al. 2014; Chen et al. 2015; Kohyama et al. 2015). The central marginal hypothesis (Prakash et al. 1969; Brussard 1984) states that genetic diversity decreases from the core to the margin of a species distribution range, with effective population size and gene flow decreasing in populations towards the range margin. Peripheral populations also tend to encounter more founder events (Hewitt 1999) and severe population bottlenecks (Nei et al. 1975), further reducing their genetic diversity (Hoffmann and Blows 1994). Climate warming that followed the last glacial maximum also had an impact on the current pattern of genetic diversity within a species range, and populations located today within their former glacial refuges are generally characterised by higher levels of genetic diversity than populations found in post glacial recolonised regions (refuge theory) (Michaux et al. 2003). In their review representing 115 plant and animal species (Eckert et al. 2008) detected the expected decline in diversity in peripheral populations for 64.2% of the studied species. Another review, published more recently by Pironon et al. (2016), found conflicting results as they observed that only 38% (43/114) of the studies conducted after 2008 provided evidences for the expected decline in genetic diversity.

While such spatial variation in genetic diversity have been reported for neutral markers such as mitochondrial DNA gene sequences (Adams and Hadly 2012) or nuclear microsatellite genotyping (Gassert et al. 2013; Johansson et al. 2006), selection can further alter genetic diversity in non-neutral markers. Of particular interest are genes associated with the immune system, considering that evolutionary processes associated with pathogen resistance can deeply shape the pattern of genetic diversity in such markers (Sommer 2005; Oliver et al. 2009; Turner et al. 2011; Zhang and He 2013). Major histocompatibility complex (MHC) genes play a key role in the immunity in mammals and are among the most polymorphic loci in vertebrates (Klein 1987). Their diversity is maintained by pathogen-driven balancing selection (Spurgin and Richardson 2010), mediated by two main processes. First, under the heterozygous advantage hypothesis (Doherty and Zinkernagel 1975; Hughes and Nei 1989; Hedrick 2012), individuals with a higher allelic richness are able to recognize and fight a wider array of pathogens, which increases their survival rate. Second, under the rare allele advantage hypothesis (Takahata and Nei 1990), rare alleles confer to their host a selective advantage due to the coevolution between hosts and parasites. The most resistant alleles are indeed supposed to be favoured and spread into the population, while parasites tend to evolve to evade the recognition of these most common alleles, favouring the hosts with rare alleles. Both neutral processes and pathogen-driven selection are thus expected to affect the spatial distribution in MHC diversity in mammal species, but the relative strength of each has been scarcely studied. Here, we addressed this question by comparing the DRB gene (MHC-II) diversity in populations of the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) at its northern range margin in southern Quebec (Canada) and in more central regions of its range in the USA.

Over the last decades, *P. leucopus* has been shifting northward its northern range limit into Southern Quebec at a rate of 10 km per year, in response to global warming (Roy-Dufresne et al. 2013). A recent study of neutral markers in populations of *P. leucopus* from Southern Quebec hypothesized the effect of post-glacial recolonization on the current pattern of genetic diversity in the region (Fiset et al. 2015). A combination of five mitochondrial and nuclear sequences revealed two distinct lineages of *P. leucopus* in Southern Quebec separated by the Saint-Lawrence River, that were assigned to clades identified in the North-Eastern and Central USA (Fiset et al. 2015; Rowe et al. 2006). At a smaller geographic scale, major landscape barriers such as rivers and roads are limiting gene flow and modulating the pattern of ongoing range expansion in *P. leucopus* (Rogic et al. 2013; Marrotte et al. 2014; Leo et al. submitted). The monitoring of *P. leucopus* dispersal is of prime interest because this species is often considered as being the main reservoir for Lyme disease in eastern-North America (Ostfeld 2011). It is indeed the species that has the better success rate at transmitting the *Borrelia* to feeding ticks (Mather 1993). An improved understanding of *P. leucopus* genetic structure and diversity would therefore allow a better evaluation of the Lyme disease expansion risks in Quebec.

Here, we investigated the pattern of DRB and *Cytb* gene diversity at a larger spatial scale than previous studies (Rogic et al. 2013; Fiset et al. 2015), and tested for a gradient of decreasing genetic diversity from the core region (North USA) to recently colonized regions in southern Quebec, as predicted by the central margin hypothesis. We also investigated the effect of past climate change and post-glacial recolonization by performing a phylogeographic analysis on the DRB and cytochrome B mitochondrial genes. The comparison of the genetic structure in a neutral (*Cytb*) and a selected (DRB) marker allowed to better estimate the relative effects of past climate change and ongoing selection on the DRB gene in a species undergoing rapid range expansion. To assess the potential for pathogen-driven selection in *P. leucopus* in the most northern part of its range, we quantified helminth diversity and evaluated the relationship between infection rate and DRB diversity pattern in Quebec.

Materials and methods

Field sampling and museum specimens

Field sampling included 18 sites during the summers 2011–2014 across the Montérégie and Estrie regions in Southern Quebec, and located on the northern and southern shores of the Saint-Lawrence river (Table 1). The Richelieu river is located south of the St Lawrence river and runs in a north–south direction. At each site, 160 Sherman traps were placed every 10 meters in 4 grids of 4 × 10 traps. Traps were baited with a mixture of oat and peanut butter late afternoon and checked the following morning for three consecutive nights. A total of 407 *Peromyscus* sp. individuals were collected and identified to the species level using species-specific primers as described in Rogic et al. (2013). All samples were dissected on site and gastrointestinal tracts were stored frozen for subsequent analyses in the laboratory, few months later. All procedures were approved by the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (SEG Permit #2011-05-15-014-00-S-F, #2012-07-16-1417-16-17-SF, #2013-07-04-14-16-17-SF and #2014-05-02-1638-05-16-SF) and McGill University Animal Care Committee (AUP#5420). We also obtained tissue samples (collected from 1980 to 2012) for 115 additional individuals from the Smithsonian

Table 1 Sample sizes for the analyses of the DRB and *Cytb* genes, as well as parasite screening at each of the 27 study sites

Site	Origin	Latitude N	Longitude W	Sample size		
				DRB	<i>Cytb</i>	Parasitology
GL1	USA	44.337508	89.382786	11	16	–
EC1	USA	36.915910	76.190741	18	1	–
EC2	USA	41.470692	71.698295	9	7	–
EC3	USA	41.473861	71.575224	18	6	–
EC4	USA	41.838283	71.539904	9	–	–
EC5	USA	41.892183	71.746949	13	9	–
EC6	USA	41.952682	72.123793	13	–	–
EC7	USA	42.647981	71.185085	15	–	–
EC8	USA	44.049466	71.273830	9	1	–
N1	Quebec	45.330541	74.394675	28	6	19
N2	Quebec	45.811591	73.463493	4	3	–
N3	Quebec	46.299909	73.093551	32	10	21
OR1	Quebec	45.036707	74.458869	30	3	21
OR2	Quebec	45.219070	73.928670	39	–	18
OR3	Quebec	45.241740	73.471424	19	1	19
OR4	Quebec	45.554397	73.336828	21	10	18
OR5	Quebec	45.878411	73.180910	4	5	–
ER1	Quebec	45.062074	73.284884	37	10	20
ER2	Quebec	45.117930	73.212812	15	6	10
ER3	Quebec	45.478300	73.171917	30	–	–
ER4	Quebec	45.521833	73.203283	30	1	–
ER5	Quebec	45.389050	73.203167	16	–	–
ER6	Quebec	45.423350	73.064050	26	–	–
ER7	Quebec	45.448116	72.907767	20	2	–
ER8	Quebec	45.655675	72.748593	14	–	–
ER9	Quebec	45.782053	73.016718	6	–	–
ER10	Quebec	45.864644	72.563806	36	1	19

Northern (N1–N3) and southern (OR 1–5 and ER 1–10) shores of the St Lawrence river, southern Quebec, Canada. GL1: Great Lakes, EC 1–8: East Coast, USA

Institution, National Museum of Natural History, and the Harvard Museum of Natural History collections for 9 additional sites in the USA from the East Coast (Virginia, Connecticut, Rhode Island, Massachusetts, New Hampshire) and the Great Lakes region (Table 1). These samples were all collected using Sherman traps too.

DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted from tissue samples (liver, muscle or ear) using the DNeasyTM Tissue Kit (Qiagen[®], Hilden) following the manufacturer's protocol from the QIAcube (Qiagen[®], Hilden).

Major histocompatibility complex DRB gene

Amplification of the DRB exon 2 gene was performed on 522 *P. leucopus* individuals (Table 1). Two batches of samples were sequenced at two different times using a 454 GS-FLX pyrosequencer (Roche) and an Illumina MiSeq sequencer. To check for congruency of the results, eight samples were processed using both sequencing methods.

454 GS-FLX sequencing

The second exon of the Mhc-Drb class II encoding the ligand-binding domain of the protein was amplified and sequenced in 213 individuals from 16 localities. We used a modified version of the primers JS1 (5'-GAGTGTCATTTCTACAACGGGAC-3') and JS2 (5'-GATCCCGTAGTTGTGTGTGCA-3'), which amplify a 172-bp fragment (excluding primers) of exon 2 from the DRB gene in several mammal species, with the addition of individual-specific MIDS (multiplex identifiers) and adaptors required for emPCR and 454 sequencing (Galan et al. 2010). PCRs were performed following the procedure detailed in Galan et al. (2010). The SESAME software (Sequence Sorter and Amplicon Explorer) (Meglecz et al. 2011) was used to sort sequences, identify and discard artefactual variants, and generate the haplotypes and individual genotypes. Gene duplication is common in MHC genes, and, in theory, an individual can have more than two alleles. However, this was ruled out for several rodent species using the same PCR primers (Galan et al. 2010). Furthermore, *Peromyscus* individuals used here had a maximum of two alleles amplified by these PCR primers.

Illumina MiSeq sequencing

For the second batch of samples (317 individuals from 21 localities), the same gene specific primers JS1 and JS2 were used but with the Illumina specific adaptors in 5' position (Forward: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG; Reverse GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG). All PCRs were performed in a reaction volume of 25 µl, each containing 5 µl of fidelity buffer, 0.75 µl of dNTP, 0.75 µl of each primer, 0.25 µl of KAPA HiFi Hotstart Dna polymerase (KAPA Biosystems), 12.5 µl of pure grade water (GE Healthcare—Hyclone) and 5 µl of DNA. Thermocycling was carried out on a Mastercycler Gradient (Eppendorf) with an initial denaturation step of 5 min à 95° followed by 30 cycles of 30 s denaturation at 98 °C, 30 s annealing at 60° and 30 s elongation at 72° finished with a 10-min elongation at 72° and stopped by cooling down at 4 °C. Twenty-five µl of PCR products were purified using 20 µl of Agencourt AMPure XP beads and following the manufacturer protocol with the following change: purified products were eluted in a final volume of 25 µl of 10 nM Tris pH 8.5 instead of 50 µl. A second PCR was conducted using Nextera Index Kit to attach the dual indices and the Illumina sequencing adaptors. Twenty-four indices were distributed horizontally and 16 indices were distributed vertically in order to individually tag 384 samples. These PCR reactions were performed in a reaction volume of 50 µl, containing 5 µl of each index primer, 10 µl of Fidelity buffer, 1.5 µl of dNTP, 23 µl of pure water (GE Healthcare—Hyclone), 0.5 µl of KAPA HiFi Hotstart Dna polymerase (KAPA Biosystems) and 5 µl of purified DNA product. Thermocycling was carried out on the same thermocycler with an initial denaturation step of 3 min à 95° followed by 8 cycles of 30 s denaturation at 95 °C, 30 s annealing at 55 °C and 30 s elongation at 72 °C finished with a 5-min elongation at

72 °C and stopped by cooling down at 4 °C. A second purification was conducted using 45 µl of PCR2 product and 50 µl of Agencourt AMPure XP beads following the manufacturer protocol. Purified products were quantified using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit according to the manufacturer protocol and a fluorimeter (FilterMax F3, Molecular Devices). Following this step quantified product have been pooled in equimolarity before being sent to the GIGA Genomics platform (ULg) for sequencing using an Illumina MiSeq V2 benchtop sequencer. Raw sequences were cleaned using a script consisting in a mix of Fastx-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) and USEARCH (Edgar 2010) functions. Briefly, the paired-end reads presenting an overlap of at least 10 bases long with a maximum difference of 8% were joined. Primers were removed, each sequence were filtered so that only the sequences with at least 95% of the bases presenting a quality superior to Q30 were kept. We used once again the SESAME software to generate the individual genotypes.

Mitochondrial cytochrome b gene

In order to compare the genetic structure obtained with the selected MHC genes with those based on neutral markers, we selected a subset of 98 *P. leucopus* individuals distributed throughout the studied area and corresponding to putative refuge areas as well as to newly colonised regions. Indeed, such sampling size corresponds to those generally used for phylogeographic studies performed at this geographic scale (Michaux et al. 2005; Mouton et al. 2016). We sequenced the mitochondrial cytochrome *b* for all these samples (Table 1). Indeed, this gene is generally considered as a neutral marker, upon which selection should be weak or absent. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using universal primers H6/L7 described by Kocher et al. (1989) in a reaction volume of 25 µl, each containing 10 µl of Multiplex PCR kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), 2.5 µl of each primer (initial concentration: 10 µM), 8 µl of pure grade water (GE Healthcare—Hyclone) and 2 µl of DNA. Thermocycling was carried out on a Mastercycler Gradient (Eppendorf) with the following cycling conditions: one activation step at 94 °C for 4 min followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 1 min 30 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were then sent to the MACROGEN society for Sanger sequencing.

Parasite screening

Guts from a subset of 165 mice belonging to populations sampled on the northern and southern shores of the St Lawrence river in southern Quebec were screened for helminth parasites using a binocular microscope. These samples are representative of the entire range in Québec and sampling size corresponds to those generally used in parasitology studies (Froeschke and Sommer 2005; Harf and Sommer 2005; Schad et al. 2005). Unfortunately, guts were not available for the American samples. All helminths were identified by their morphology and morphometry according to the literature. Parasites from the same species were grouped together and counted. The infection rate was computed as the percentage of hosts infected by at least one parasite.

Genetic analyses

Mitochondrial *Cytb* sequences were aligned using the Sequence Scanner software (V1.0; Applied-BiosystemsTM). Ambiguous base pairs were removed at the beginning and the end of the sequences. Mega6 version 6.06 (Tamura et al. 2013) was used to align the resulting sequences and find the best nucleotide substitution model. We used Mega6 and Mr Bayes to draw phylogenetic trees based on maximum likelihood (1000 bootstrap resampling) and Bayesian inferences. Two cytochrome *b* sequences of *P. maniculatus* sequences from NCBI (accession numbers DQ385642 and DQ385706) were used as outgroups.

DRB sequences were aligned using Mega version 6.06 (Tamura et al. 2013). The STRUCTURE software version 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) was used to identify the number of putative genetic clusters (K) within our 27 sampling sites. A range of $K = 1$ to $K = 10$ with 10 replicates for each K was assessed with a length of burnin period of 100,000 and a number of MCMC reps after burnin of 1,000,000. The number of genetic clusters was inferred using delta K (Evanno et al. 2005) in STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012), and individuals were assigned to a cluster if their probability of membership was higher than 0.6. This analysis was performed again separately on the two subgroups identified by the first Structure analysis to putatively detect some substructures. Rates of nonsynonymous (dN) and synonymous base pair substitutions (dS) were calculated with Mega version 6.06, using the model originally described by Nei and Gojobori (1986) with the Jukes and Cantor (1969) correction for multiple substitutions (Musolf et al. 2004; Froeschke and Sommer 2005). These rates were computed separately for the antigen binding sites (ABS) and for the non-antigen binding sites (non-ABS) as defined by Brown et al. (1993). The difference between dN and dS was assessed using a z-test calculated following the formula: $Z = (dN - dS) / \text{SQRT}(\text{Var}(dS) + \text{Var}(dN))$ (Tamura et al. 2013). To determine whether there is a relationship between heterozygosity and infection, we performed Chi square tests on individuals representing the entire range in Quebec.

Genetic diversity was computed separately for the *Cytb* and DRB genes for four groups of populations corresponding to the range centre and to the range margin from the two lineages detected in the *Cytb* phylogeny: GL (great lakes region population), NSSLR (populations from the North Shore of the Saint-Lawrence River), EC (populations from the American East Coast) and SSSLR (populations from the South Shore of the Saint-Lawrence River). For this analysis, the EC group was limited to populations EC2 to EC5. Indeed, mice from populations EC1 to EC8 have been captured over a 32 years period throughout a geographical range of 900 km. By limiting this group to EC2 to EC5, we decreased the time period to 2 years and the geographical gradient to 50 km (4 years and 175 km for SSSLR). By doing so, we avoid comparing diversity data that would have been artificially increased owing to large sampling differences. DRB and *Cytb* genetic diversities were measured using the haplotype (h) diversity, computed using the DNASP software (Librado and Rozas 2009). Differences in diversity between core and marginal populations were assessed separately for the two lineages defined by Structure and for the two genes using unpaired Student t-tests.

Results

Cytochrome *b* genetic structure

The *Cytb* gene from a subset of 98 specimens from 18 localities distributed throughout the studied area was successfully sequenced and 37 different haplotypes were detected in our samples (Table S1). Both the Bayesian Information and the corrected Akaike Information Criteria, selected the Hasegawa-Kishino-Yano plus Gamma model as the best model for nucleotide substitution. We obtained the same global structure using Maximum-likelihood and Bayesian inference methods, with two distinct genetic lineages, with a high level of robustness (ML posterior probability/BI bootstrap value for the two clades: 63/0.75 and 90/1) (Fig. 1). The first lineage grouped populations from the NSSLR regions with the Great lakes population; the second one grouped the SSSLR and the EC populations together (Fig. 2). No further structure was detected within each of these two lineages.

DRB genetic structure

The eight samples processed using both Illumina and 454 based protocols returned the exact same results, confirming the congruency between the two methods. The DRB gene exon 2 was successfully sequenced for 522 specimens in which we detected a total of 81 different alleles labelled following the nomenclature of Klein et al. (1990) from Pele-DRB*001 to Pele-DRB*081 (Table S1). No more than two alleles were found in any individual, suggesting that no duplication event occurred. The most common allele was found at a frequency of 9.5%.

STRUCTURE analysis identified two main clusters among our 27 populations. The first cluster was formed by the NSSLR, GL and EC populations (hereafter DRB-1 cluster), while the second one grouped all 15 SSSLR populations together (DRB-2 cluster) (Fig. 3). Sub-structuring was present within the DRB-1 cluster with the presence of two sub-clusters. The first one (DRB-1a) aggregated the GL and EC populations, while the second cluster (DRB-1b) grouped the three NSSLR populations. Likewise, Structure identified three sub-clusters within the DRB-2 cluster. The first one (DRB-2a) aggregated all populations west of the Richelieu River while both the second and the third clusters (DRB-2b and 2c) comprised populations from the Eastern side of this river (Fig. 3).

Helminth diversity

We detected 9 different helminth species in the 165 *P. leucopus* samples from the 9 analysed localities in southern Quebec (four species of trematode, one nematode cyst, one cestode, one Acantocephala, one *Syphacia* sp., and one *Aspiculuris* sp.). The most common parasite was the nematode *Syphacia* sp., which was present in nearly 20% of the screened mice. The remaining species were present in 1–10% of the individuals. In total, 37% of the screened mice were positive for at least one species and 10% of the sampled individuals presented a co-infection with more than one species. The infection rate in each population ranged from 15.8% in ER 10 to 63.2% in N1.

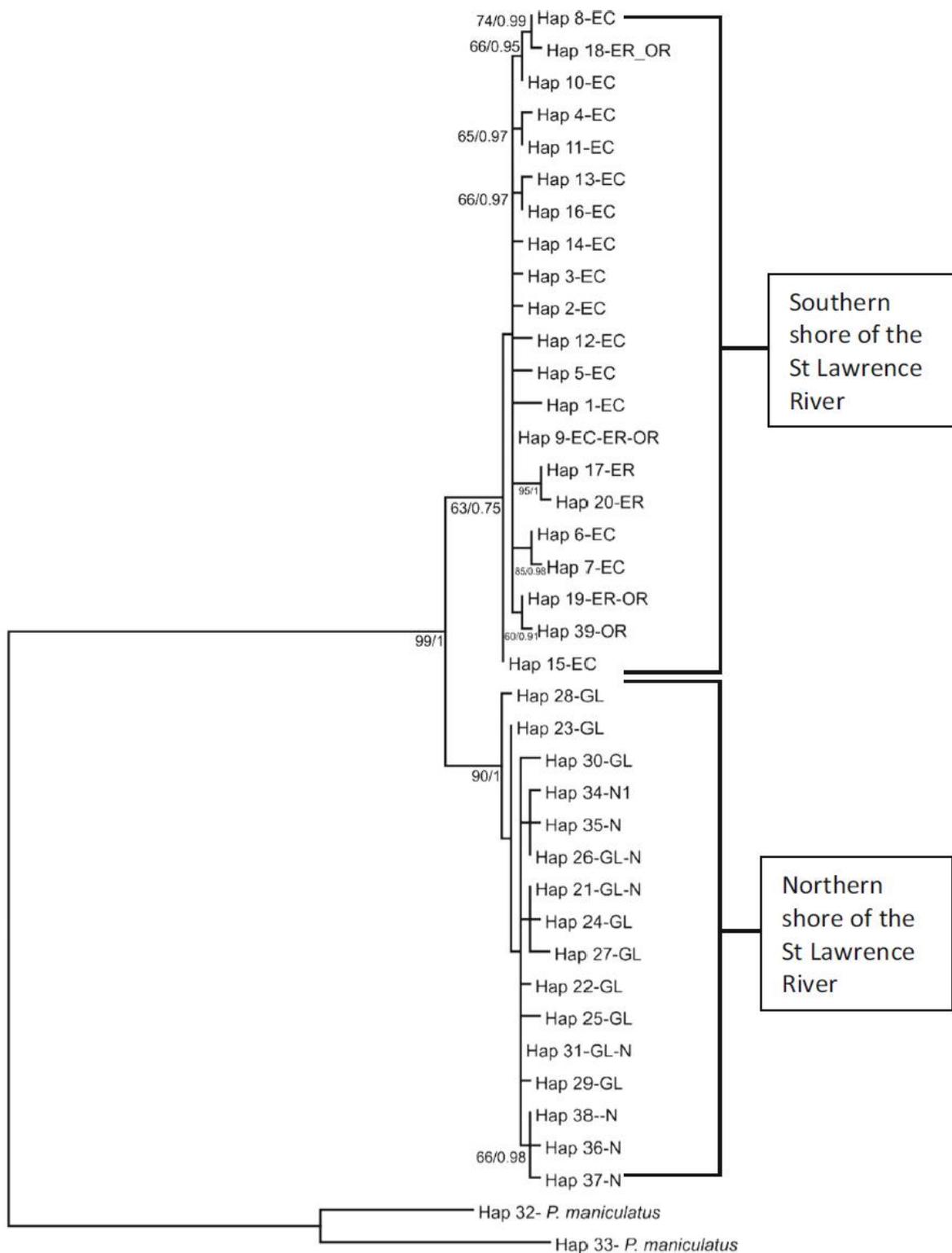


Fig. 1 Phylogenetic relationships based on Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) among mitochondrial gene cytochrome b sequences. Values at branch nodes correspond to bootstrap support (% , 1000 pseudoreplicates) obtained with the ML analyses and to posterior probabilities obtained with the BI analyses. Haplotypes are named by a number followed by the site where they are present. Abbreviations for sites are as in Table 1

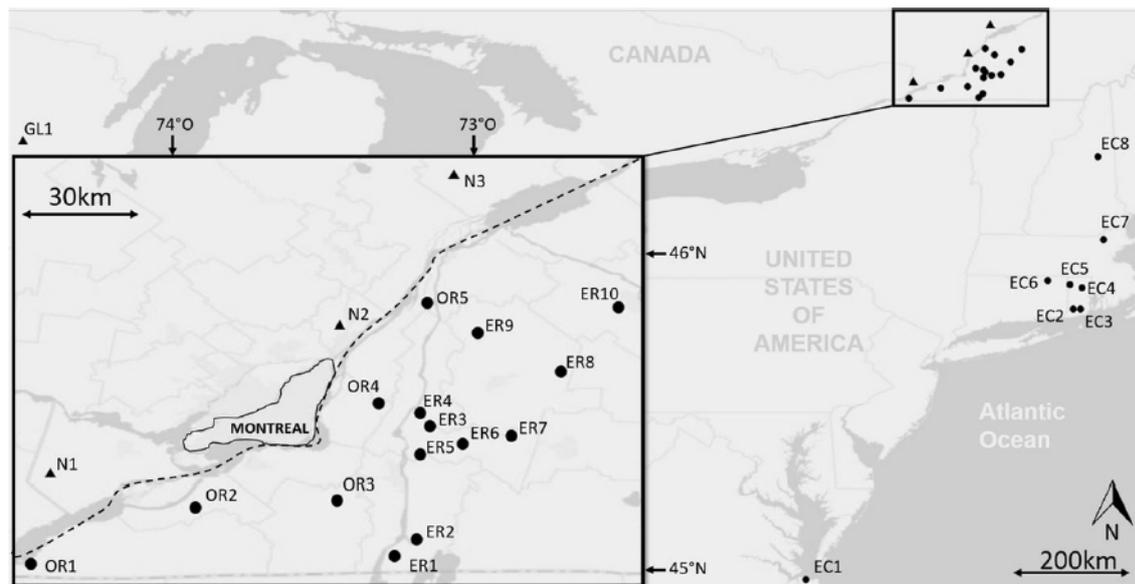


Fig. 2 Pattern of genetic diversity in the *Cytb* sequence, characterized by two distinct lineages separating sites on the northern shore of the St Lawrence river (triangles) from sites on the southern shore (circles). The Saint-Lawrence river is represented by the dashed line. Abbreviations for sites are as in Table 1

Signature of selection acting on DRB

The 13 amino acids in the ABS (antigen binding sites) region were all polymorphic, whereas only 13 amino-acids out of 42 (31%) were variable in the non-ABS region. The rate of non-synonymous substitutions (dN) was 2.82 times higher than the rate of synonymous substitutions (dS) in the ABS region ($z = 5.307$; $p < 0.001$). In the non-ABS region, the rate of non-synonymous substitutions (dN) did not differ from the rate of synonymous substitutions (dS) ($z = 1.33$; $p = 0.186$; Table 2).

The proportion of individuals infected with helminths did not differ between individuals with a DRB homozygote genotype and individuals with a DRB heterozygote genotype (36.6%; $N = 41$ and 35.5%; $N = 124$, respectively; $\chi^2 = 0.0163$; $p = 0.90$). The 104 individuals carrying one or two of the five most common alleles had a mean infection rate of 26.9%. This is significantly lower than the infection rate from the 100 individuals carrying one or two of the 23 rarest alleles (mean infection rate of 44%; $\chi^2 = 6.5$, $p = 0.01$).

Within the northern lineage, haplotype diversity for the *Cytb* and DRB was larger in the core population GL than in the marginal populations NSSLR ($t = 6.43$; $p < 0.0001$ and $t = 14.54$; $p < 0.0001$, respectively; Table 3). A similar pattern was apparent for the southern lineage when comparing haplotype diversity between the core populations EC and the marginal populations SSSLR ($t = 13.77$; $p < 0.0001$ and $t = 29.14$; $p < 0.0001$ for the *Cytb* and DRB, respectively; Table 3).

Discussion

Here, we investigated the genetic structure of north-eastern American populations of *P. leucopus* using two genetic markers: one considered as neutral, the mitochondrial cytochrome *b*; the other considered as under selection, the Major Histocompatibility Complex

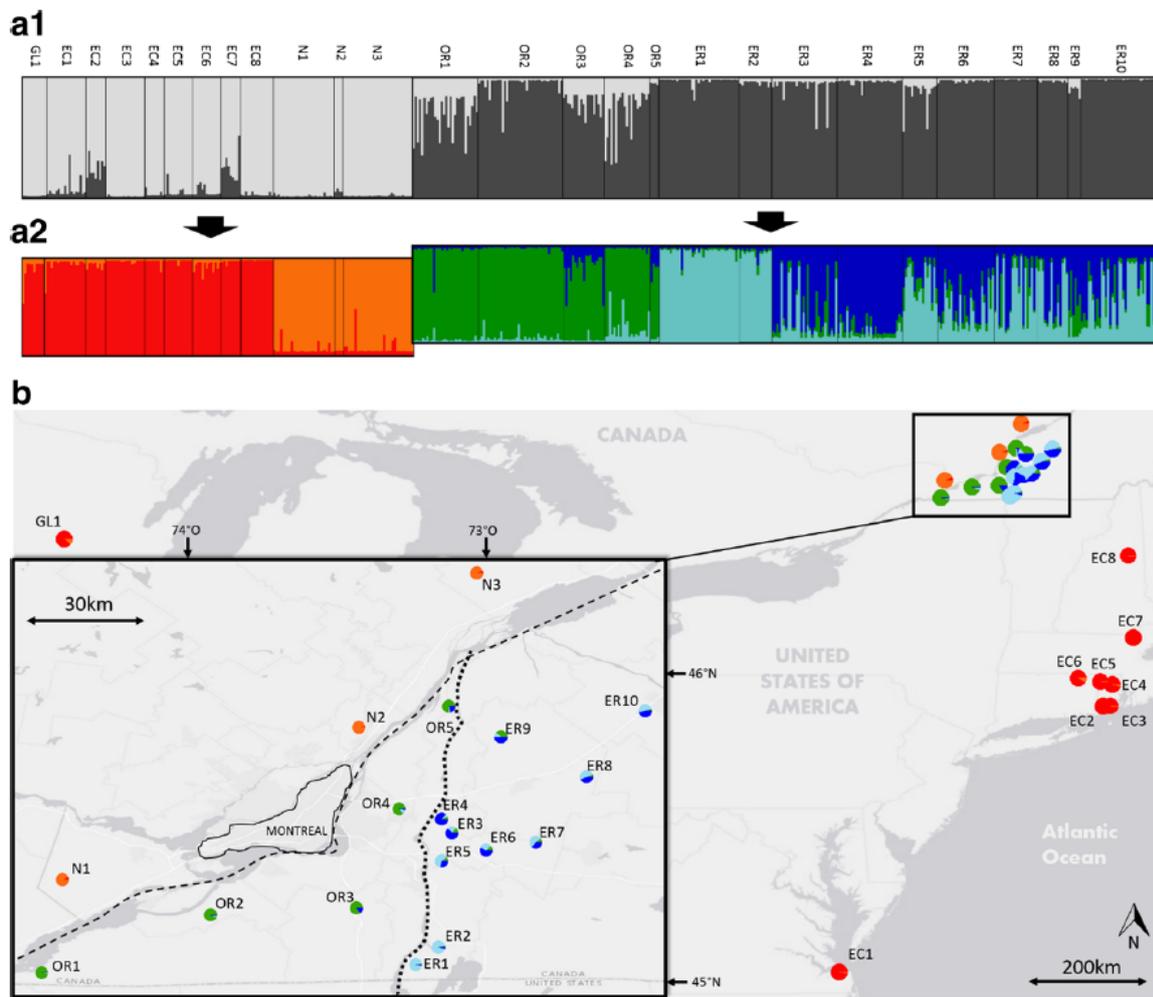


Fig. 3 Patterns of genetic diversity in the DRB sequences. **a1** Structure analysis on all populations showing two distinct clusters; *light gray*: populations from the NSSLR, GL and EC regions, *dark grey*: populations from the SSSLR region. **a2** Further sub-structure is observed within these two initial clusters. **b** Geographical distribution of the 5 genetic sub-clusters. The Saint-Lawrence and Richelieu rivers are represented by the *dashed and dotted lines*, respectively

Table 2 Estimated Rate (\pm SE) of non-synonymous (dN) and synonymous (dS) substitutions for Antigen-Binding Sites (ABS) and Non-Antigen-Binding-Sites (non-ABS) for the DRB gene; N: number of codons, *p*: probability that dN and dS are different using a z-test, where $z = (dN - dS)/\text{SQRT}(\text{Var}(dS) + \text{Var}(dN))$

Position	N	dN	dS	dN/dS	<i>p</i>
ABS	13	0.482 \pm 0.089	0.171 \pm 0.088	2.82	0.001
Non-ABS	43	0.1 \pm 0.027	0.087 \pm 0.026	1.15	0.186
ALL	56	0.173 \pm 0.032	0.105 \pm 0.027	1.65	0.001

DRB exon2 genes. We found that the spatial genetic structure was not congruent in these two genes, which may be the result of parasite-driven selection acting upon the DRB gene. In both genes, however, we detected a decrease in genetic diversity from the most central populations towards the species distribution margin.

Table 3 Haplotype (h) diversity (\pm SD) within the two lineages for the *Cytb* and the DRB genes; N: sample size; N(h): haplotype number

Lineage	Population	Cyt B			DRB		
		N	N(h)	h	N	N(h)	h
Northern	GL	16	12	0.942 \pm 0.048	11	15	0.961 \pm 0.024
	NSSLR	19	9	0.848 \pm 0.059	64	20	0.9 \pm 0.01
Southern	EC	24	15	0.891 \pm 0.057	49	38	0.957 \pm 0.01
	SSSLR	35	6	0.637 \pm 0.077	343	37	0.937 \pm 0.003

Population genetic structure

The mitochondrial cytochrome *b* sequences revealed two distinct genetic lineages of *P. leucopus* in our study area. The first lineage grouped all individuals from the northern shore of the St Lawrence river in Quebec with the population from the Great Lakes region. The second lineage comprised all populations from the southern shore of the St Lawrence river in Quebec and populations from the East Coast region.

This result confirms at a highly larger geographic scale, the pattern previously found using a combination of five mitochondrial and nuclear sequences, including the *Cytb* from populations from southern Quebec, where the St-Lawrence River acted as a barrier between two distinct genetic lineages (Fiset et al. 2015). Three major clusters for *P. leucopus* were also evidenced across the United States based on mitochondrial DNA markers (Rowe et al. 2006): A North-Eastern, a Central Western and a Western lineage. Our larger sampling of cytochrome *b* sequences, including now populations from south of Quebec, provides new evidence for the existence of two distinct glacial refugia in the Northern USA probably associated with two distinct post-glacial recolonization routes into Southern Quebec, as hypothesized in Fiset et al. (2015). Under this scenario, *P. leucopus* populations currently occurring on the northern shore of the St Lawrence river would be the result of a West-East recolonization originating from refuge populations in the Great Lakes region, while populations occurring in southern Quebec, south of the St Lawrence river would have originated from the East Coast region of the United States.

Our results obtained with the DRB marker differ markedly from those obtained with the *Cytb*. With the DRB gene, we still detected two distinct clusters, but surprisingly populations from the East Coast appeared closer to populations from the northern shore of the St Lawrence river and the population from the Great Lakes region, than to populations from the southern shore of the St Lawrence river. Further sub-structure was detected among the populations south of the St Lawrence river, with an effect of the Richelieu river, as previously shown using neutral microsatellite markers (Rogic et al. 2013; Marrotte et al. 2014) and based on the morphological variation in skull shape (Ledevin and Millien 2013).

The discrepancy between the two genetic markers we studied may be due to differing selection processes acting upon the two genes. The mitochondrial cytochrome *b* gene is generally considered as a neutral marker, upon which selection should be weak or absent. This gene is thus expected to reflect the phylogeographical structure of the species, rather than local adaptation. By contrast, the DRB gene is generally considered to be under selection, particularly for functions related to the immune system and resistance to pathogens and parasites. The geographic structure obtained with this last marker may

therefore reflect different selection pressures operated by pathogens, and in the case of the DRB gene, particularly by macroparasites such as helminths.

Selection process on the DRB gene

At the sequence level, the rate of nonsynonymous substitutions (dN) was 2.82 times higher than the rate of synonymous substitutions (dS) in the ABS regions, while these substitution rates did not differ in the non-ABS region. This result provides evidence for a general positive selection having acted on the DRB gene over historical scales and at a large geographic scale. This would partly explain the discrepancy observed between *Cytb* and DRB phylogenies. However, other processes would also have happened at a more contemporary scale and would have increased selection pressures on the DRB marker. For example, many studies evidenced, signatures of contemporary selection acting on immune system genes. The high degree of diversity in MHC genes has often been explained by balancing selection processes acted by parasites and pathogens (Quinnell et al. 2003; Harf and Sommer 2005; Schad et al. 2005; Zhang and He 2013). This mode of selection usually results from two main mechanisms, the heterozygous advantage and the rare allele advantage (or negative frequency dependent selection). Under the heterozygous advantage hypothesis, heterozygous animals should be able to recognize a broader range of pathogens, presenting thereby lower infection rates. Our data however did not support this hypothesis with respect to helminth resistance, as infection rate was identical between homozygous and heterozygous individuals. Although this hypothesis has received empirical support for MHC genes (Penn et al. 2002; Froeschke and Sommer 2005; Worley et al. 2010) and for other genes such as the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) (Schroeder et al. 1995; Common et al. 2004), our results are similar to those obtained by Meyer-Lucht and Sommer (2005) and by Schad et al. (2005) who did not detect any heterozygous advantage in their study on yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) and Malagasy mouse lemurs (*Microcebus murinus*) and their respective nematodes. Another mechanism for balancing selection is the rare allele advantage hypothesis. It assumes that the evolution of new parasite and pathogen phenotypes reduces the fitness of common host genotypes, providing a selective advantage to rare genotypes. In other words, alleles that provide better immunity against parasites increase in frequency within a population (Parham and Ohta 1996), until parasites get adapted to those specific alleles, which may become a disadvantage for the host. Our data did not support this hypothesis either, as we found that common alleles were associated with lower infection rates than rare alleles, suggesting a positive selection. Again, this result is quite unusual, as most similar studies found evidence of negative frequency dependent selection (Quinnell et al. 2003; Harf and Sommer 2005; Schad et al. 2005; Zhang and He 2013). This difference may be due to the source of data we used, considering that the populations we sampled for parasites were all from the northern edge of the distribution range of *P. leucopus*, which is known to have only recently colonized this region (Roy-Dufresne et al. 2013). While parasites move along during range shift of their hosts, a time lag may be observed between parasites and their hosts (Phillips et al. 2010). Thus, even though parasites were detected in our sampled populations, they may not have adapted yet to the most common alleles, a process expected to occur locally with a delay, following the establishment of populations of hosts in newly colonized areas.

In summary, while we found a clear signal for historical positive selection on the DRB gene using the rates of nonsynonymous and synonymous substitutions, a more contemporary process, the positive selection, may also explain the discrepancy between the results we obtained with the *Cytb* and the DRB.

Genetic diversity and range expansion

The central-marginal hypothesis states that for a given species, population genetic diversity decreases from the centre to the edge of their distribution range. Even though this hypothesis does not constitute a general rule, as suggested by Eckert et al. (2008) and by Pironon et al. (2016), this pattern was detected in several species including *Podarcis muralis* (Gassert et al. 2013), *Rana temporaria* (Johansson et al. 2006) or *Gypsophila fastigiata* (Lönn and Prentice 2002). In line with these results, the genetic diversity in both the *Cytb* and DRB sequences for *P. leucopus* showed the expected decrease within both genetic lineages: from the Great Lakes to the northern shore of the St Lawrence, and from the US East Coast to the southern Quebec region south of the St Lawrence river. In eastern-North America, the species is known to expand its range at a rate of 10–15 km per year (Roy-Dufresne et al. 2013; Myers et al. 2009). Our data confirms that this expansion is associated with a loss of neutral as well as selected genetic diversity and may be explained by neutral processes such as genetic drift as observed in (Zeisset and Beebee 2014). The detected loss of DRB genetic diversity may furthermore be explained by an additional process, the positive selection that we observed on the margin of the species distribution. Indeed, in our data, common alleles were correlated to lower infection rate when compared to rare alleles, which may grant to their host a selective advantage, favouring the dominance of these common alleles in the next generations, hence decreasing the DRB genetic diversity.

Such a loss in genetic diversity at the range margin may potentially slow down the ongoing expansion of *P. leucopus*, by counterbalancing the positive effect of global warming on the mouse survival at higher latitude. However, field observations over the last decade, recording the presence of white footed mice at higher latitude year after year (Roy-Dufresne et al. 2013), tend to prove that global warming remain the major factor driving the expansion of the species. This warrants further research, as the rate and pattern of emergence of Lyme disease in Southern Quebec is dependent on the expansion rate of *P. leucopus* in the region (Simon et al. 2014).

Data accessibility

The *Cytb* sequences have been deposited in Genbank under the Accession Numbers KX784130 to KX784166. Both *Cytb* and DRB sequences can be found in the supplementary table (Table S1).

Acknowledgements We thank the Smithsonian National Museum of Natural History and the Harvard Museum of Natural History for the loan of some tissue samples. We thank S. Leo, S. Turney, field assistants and land owners. Computational resources were provided by the CBGP HPC computational platform, and by the Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI) funded by the Fonds de la Recherche Scientifique de Belgique (F.R.S.-FNRS) under Grant No. 2.5020.11. This work was supported by Belgian FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) fellowship to AA and to JRM and by financial grants from the Belgian FRS-FNRS (“credits pour brefs séjours à l’étranger”) to AA and JRM, and from the “Patrimoine de l’université de Liège” to AA. VM is supported by a NSERC DG Grant (RGPIN/341918-2012).

References

Adams RI, Hadly EA (2012) Genetic diversity within vertebrate species is greater at lower latitudes. *Evol Ecol* 27:133–143

- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364(6432):33–39
- Brussard PF (1984) Geographic patterns and environmental gradients: the central-marginal model in *Drosophila* revisited. *Annu Rev Ecol Syst* 15:25–64
- Chen W, Bei Y, Li H (2015) Genetic variation of the major histocompatibility complex (MHC class II B gene) in the threatened Hume's pheasant, *Syrnaticus humiae*. *PLoS ONE* 10:e0116499
- Common J, Di W, Davies D, Kelsell D (2004) Further evidence for heterozygote advantage of GJB2 deafness mutations: a link with cell survival. *J Med Genet* 41:573–575
- Doherty PC, Zinkernagel RM (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256:50–52
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol* 17:1170–1188
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansions. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:481–501
- Fiset J, Tessier N, Millien V, Lapointe FJ (2015) Phylogeographic structure of the white-footed mouse and the deer mouse, two Lyme disease reservoir hosts in Quebec. *PLoS ONE* 10:e0144112
- Froeschke G, Sommer S (2005) MHC class II DRB variability and parasite load in the striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Mol Biol Evol* 22:1254–1259
- Gaitan J, Millien V (2016) Stress level, parasite load, and movement pattern in a small mammal reservoir host for Lyme disease. *Can J Zool* 94:565–573
- Galan M, Guivier E, Caraux G, Charbonnel N, Cosson JF (2010) A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in large-scale studies. *BMC Genom* 11(1):296
- Gassert F, Schulte U, Husemann M, Ulrich W, Rödder D, Hochkirch A, Engel E, Meyer J, Habel JC, Parmakelis A (2013) From southern refugia to the northern range margin: genetic population structure of the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *J Biogeogr* 40(8):1475–1489
- Harf R, Sommer S (2005) Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. *Mol Ecol* 14:85–91
- Hedrick PW (2012) What is the evidence for heterozygote advantage selection? *Trends Ecol Evol* 27:698–704
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68:87–112
- Hoffmann AA, Blows MW (1994) Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends Ecol Evol* 9:223–227
- Hughes AL, Nei M (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:958–962
- Johansson M, Primmer CR, Merila J (2006) History vs. current demography: explaining the genetic population structure of the common frog (*Rana temporaria*). *Mol Ecol* 15:975–983
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. *Academy Press, New York*
- Klein J (1987) Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Hum Immunol* 19:155–162
- Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, Gyllensten UB, Heise ER, Jones PP, Parham P, Wakeland EK, Watkins DI (1990) Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics* 31:217–219
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6196–6200
- Kohyama TI, Omote K, Nishida C, Takenaka T, Saito K, Fujimoto S, Masuda R (2015) Spatial and temporal variation at major histocompatibility complex class IIB genes in the endangered Blakiston's fish owl. *Zool Lett* 1:13
- Lau Q, Jaratlerdsiri W, Griffith JE, Gongora J, Higgins DP (2014) MHC class II diversity of koala (*Phascolarctos cinereus*) populations across their range. *Heredity* 113:287–296
- Ledevin R, Millien V (2013) Congruent morphological and genetic differentiation as a signature of range expansion in a fragmented landscape. *Ecol Evol* 3:4172–4182

- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Lönn M, Prentice HC (2002) Gene diversity and demographic turnover in central and peripheral populations of the perennial herb *Gypsophila fastigiata*. *Oikos* 99:489–498
- Marrotte RR, Gonzalez A, Millien V (2014) Landscape resistance and habitat combine to provide an optimal model of genetic structure and connectivity at the range margin of a small mammal. *Mol Ecol* 23:3983–3998
- Mather TN (1993) The dynamics of spirochete transmission between ticks and vertebrates. Ecology and environmental management of Lyme disease. Rutgers University Press, New Brunswick, pp 43–62
- Meglec E, Piry S, Desmarais E, Galan M, Gilles A, Guivier E, Pech N, Martin JF (2011) SESAME (SEquence Sorter & AMplicon Explorer): genotyping based on high-throughput multiplex amplicon sequencing. *Bioinformatics* 27:277–278
- Meyer-Lucht Y, Sommer S (2005) MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Mol Ecol* 14:2233–2243
- Michaux JR, Magnanou E, Paradis E, Nieberding C, Libois R (2003) Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Mol Ecol* 12:685–697
- Michaux JR, Libois R, Filippucci MG (2005) So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellownecked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*), in the Western Palearctic region. *Heredity* 94:52–63
- Mouton A, Mortelliti A, Grill A, Sara M, Kryštufek B, Juškaitis R, Latinne A, Amori G, Randi E, Büchner S, Schulz B, Ehlers S, Lang J, Adamik P, Verbeylen G, Dorenbosch M, Trout R, Elmeros M, Aloise G, Mazzoti S, Matur F, Poitevin F, Michaux JR (2017) Evolutionary history and species delimitations: a case study of the hazel dormouse, *Muscardinus avellanarius*. *Conserv Genet* 18(1):181–196
- Musolf K, Meyer-Lucht Y, Sommer S (2004) Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). *Immunogenetics* 56:420–426
- Myers P, Lundrigan BL, Hoffman SMG, Haraminac AP, Seto SH (2009) Climate-induced changes in the small mammal communities of the Northern Great Lakes Region. *Glob Change Biol* 15:1434–1454
- Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3:418–426
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1–10
- Oliver MK, Lambin X, Cornulier T, Pieltney SB (2009) Spatio-temporal variation in the strength and mode of selection acting on major histocompatibility complex diversity in water vole (*Arvicola terrestris*) metapopulations. *Mol Ecol* 18:80–92
- Ostfeld RS (2011) Lyme disease: the ecology of a complex system. Oxford University Press, Oxford, p 216
- Parham P, Ohta T (1996) Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67–74
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK (2002) MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11260–11264
- Phillips BL, Kelehear C, Pizzatto L, Brown GP, Barton D, Shine R (2010) Parasites and pathogens lag behind their host during periods of host range advance. *Ecology* 91:872–881
- Pironon S, Papuga G, Vilellas J, Angert AL, García MB, Thompson JD (2016) Geographic variation in genetic and demographic performance: new insights from an old biogeographical paradigm. *Biol Rev*. doi:10.1111/brv.12313
- Prakash S, Lewontin RC, Hubby JL (1969) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 61:841–858
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945–959
- Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE (2003) Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 55:23–28
- Rogic A, Tessier N, Legendre P, Lapointe FJ, Millien V (2013) Genetic structure of the white-footed mouse in the context of the emergence of Lyme disease in southern Quebec. *Ecol Evol* 3:2075–2088
- Rowe KC, Heske EJ, Paige KN (2006) Comparative phylogeography of eastern chipmunks and white-footed mice in relation to the individualistic nature of species. *Mol Ecol* 15:4003–4020
- Roy-Dufresne E, Logan T, Simon JA, Chmura GL, Millien V (2013) Poleward expansion of the white-footed mouse *Peromyscus leucopus* under climate change: implications for the spread of Lyme disease. *PLoS ONE* 8:e80724

- Schad J, Ganzhorn JU, Sommer S (2005) Parasite burden and constitution of major histocompatibility complex in the Malagasy mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Evolution* 59:439–450
- Schroeder SA, Gaughan DM, Swift M (1995) Protection against bronchial asthma by CFTR [Delta]F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Nat Med* 1:703–705
- Simon JA, Marrotte RR, Desrosiers N, Fiset J, Gaitan J, Gonzalez A, Koffi JK, Lapointe F-J, Leighton PA, Lindsay LR, Logan T, Milord F, Ogden NH, Rogic A, Roy-Dufresne E, Suter D, Tessier N, Millien V (2014) Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evol Appl* 7:750–764
- Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool* 2:16. doi:10.1186/1742-9994-2-16
- Spurgin LG, Richardson DS (2010) How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 277(1684):979–988
- Takahata N, Nei M (1990) Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124:967–978
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Turner AK, Begon M, Jackson JA, Bradley JE, Paterson S (2011) Genetic diversity in cytokines associated with immune variation and resistance to multiple pathogens in a natural rodent population. *PLoS Genet* 7:e1002343
- Worley K, Collet J, Spurgin LG, Cornwallis C, Pizzari T, Richardson DS (2010) MHC heterozygosity and survival in red junglefowl. *Mol Ecol* 19:3064–3075
- Zeisset I, Beebee TJ (2014) Drift rather than selection dominates MHC class II allelic diversity patterns at the biogeographical range scale in natterjack toads *Bufo calamita*. *PLoS ONE* 9:e100176
- Zhang M, He H (2013) Parasite-mediated selection of major histocompatibility complex variability in wild brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) from Inner Mongolia, China. *BMC Evol Biol* 13:149

Chapitre 3 : Parasitologie



3.1) Avant propos

Les relations hôtes-pathogènes sont connues pour jouer un rôle significatif dans le dynamisme des aires de distribution (Hochberg and Ives 1999, Holt and Keitt 2000). Dans ce chapitre, nous avons d’abord procédé à une description de la faune helminthe parasitant les individus *P. leucopus* dans la région du sud du Québec. **Cet aspect constitue le premier objectif de ce chapitre et le sujet de l’article 2 (point 3.2).** Nous avons par la suite étudié la prévalence en parasites internes et externes chez la souris à pattes blanches et ce, dans plusieurs populations québécoises. L’objectif initial était de déterminer s’il existait, dans le sud du Québec, une différence significative entre la prévalence en parasites des populations périphériques par rapport aux populations plus centrales. En effet, deux théories principales s’opposent en regard de la prévalence en pathogènes et parasites le long d’une aire de distribution (fig. 1). La Central-Marginal Hypothesis affirme que puisque la diversité génétique est supposée diminuer du centre vers la périphérie de l’aire de distribution, les populations en marge de cette aire de distribution devraient par conséquent être moins bien armées pour combattre une vaste gamme de pathogènes. On conclut ainsi de ce postulat que la prévalence en parasites et pathogènes devrait être supérieure dans les populations situées en bordure d’aire de distribution par rapport aux populations plus centrales, ce qui induirait une diminution du niveau de santé des individus vers la périphérie de l’aire de distribution. A l’opposé, l’enemy-release hypothesis (ou parasite-release hypothesis) soutient que les individus colonisant de nouveaux territoires en bordure d’aire de distribution ne sont pas forcément suivis par leurs ennemis (e.g. parasites) ancestraux. Selon cette théorie, la prévalence en parasites et pathogènes devrait donc être plus faible en bordure d’aire de distribution que dans les zones plus centrales, favorisant un niveau de santé plus élevé des populations de souris vers la périphérie de leur aire de distribution.

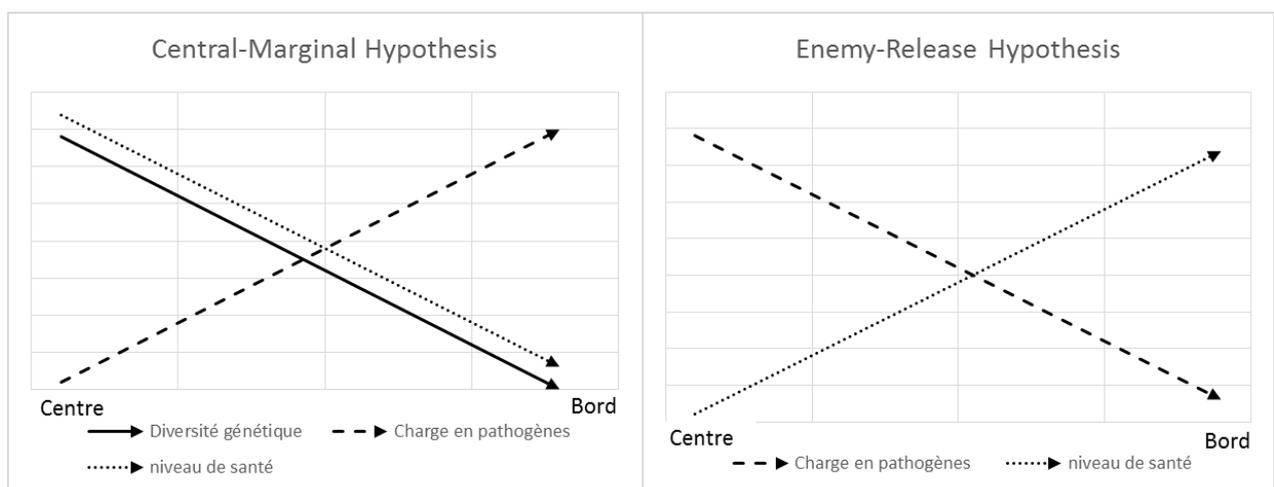


Figure 1 : Principes généraux des deux hypothèses étudiées.

Le second objectif de ce chapitre (point 3.3) a donc été de tester ces deux hypothèses au niveau de notre zone d'étude. Enfin, la troisième partie de ce chapitre (point 3.4) a consisté à rechercher si ces parasites, internes ou externes, avaient un quelconque effet observable sur le niveau de santé des souris à pattes blanches. L'exploration de ces trois points a ainsi eu pour but de mieux évaluer la pression parasitaire exercée sur les souris des zones périphériques.

3.2 Article 2

Résumé: *Peromyscus leucopus* est considéré comme étant le réservoir principal de la maladie de Lyme en Amérique du Nord. L'espèce est actuellement en pleine expansion vers le Nord et la communauté helminthe parasitant ces individus pourrait jouer un rôle non négligeable dans cette expansion. Jusqu'à aujourd'hui, aucune information n'était disponible quant aux parasites intestinaux hébergés par les populations de *P. leucopus* dans la limite nord de leur distribution. L'objectif de cette étude a donc été de caractériser la communauté helminthe au sein des souris à pattes blanches dans le sud du Québec. 9 taxons différents de parasites helminthes gastro-intestinaux ont été collectés à partir de 163 individus *P. leucopus*. Le parasite le plus commun était *Syphacia peromysci*, présent dans 20.1% des individus. Enfin, le séquençage du gène Cytochrome c oxidase I auprès de trois espèces de parasites (*Syphacia peromysci*, *Aspiculuris* sp. and an Acanthocephalan) a apporté une information inédite sur leur phylogénie.

HELMINTHS OF THE WHITE-FOOTED MOUSE (*PEROMYSCUS LEUCOPUS*) ALONG ITS EXPANDING RANGE IN QUEBEC.

A. André^{1,2*}, A. Ribas^{3*}, V. Millien², J.R. Michaux^{1,4}

¹ Conservation Genetics laboratory, University of Liège, Boulevard du Rectorat 26, 4000 Liège, Belgium

² Redpath Museum, McGill University, 859 Sherbrooke West, Montreal (QC) H3A 0C4, Canada

³ Section of Parasitology, Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, 08028 Barcelona, Spain

⁴ CIRAD, UR AGIRs, F-34398 Montpellier, France

Key-words: Syphacia; parasitology ; *Peromyscus leucopus* ; Canada ; expansion

Corresponding author: Adrien André

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

The white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) is considered as being the principal reservoir for Lyme disease in North America. This rodent species is currently shifting its distribution northward in Canada and the helminth community harbored by the species may play an important role in this process by accelerating or hindering this expansion. Up to now, no information was available concerning the gastrointestinal parasites carried in peripheral population from Canada. The aim of this study was therefore to characterize the helminth community harbored by *P. leucopus* in its expanding range in southern Quebec. We recovered nine distinct helminth taxa out of 163 *P. leucopus* individuals. The most prevalent species was *Syphacia peromysci*, found in 20.1% of the mice. Our study also brings new insight to the helminths phylogeny with the sequencing of the Cytochrome c oxidase I (CO1) gene from 3 helminth species (*Syphacia peromysci*, *Aspiculuris* sp. and an acanthocephalan species).

INTRODUCTION

The white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) is currently expanding its northern range limit northward toward Southern Quebec at a rate of 10 km per year, in response to global warming (Roy-Dufresne *et al.* 2013). Climatic factors are known to be critical factors driving such distribution shifts (Parmesan and Yohe 2003; Root *et al.* 2003). Biotic factors may also play a significant role, as proposed by the enemy-release hypothesis (also known as the parasite-release hypothesis) (Mack *et al.* 2000; Keane and Crawley 2002; Torchin *et al.* 2003; Diagne *et al.* 2016). This theory states that individuals colonizing new territories might not be necessarily followed by their historical enemies, leading to released parasite charges for individuals living on the margin of the species distribution. Ultimately, this drop of parasite charges could lead to an acceleration of the species colonization process (Keane and Crawley 2002). Studies have shown that the presence of helminth parasites may have a negative effect on rodent population dynamics (Deter *et al.* 2008; Schwanz 2008). In the concrete case of *P. leucopus*, the gastrointestinal helminths can play a role in destabilizing mouse populations by decreasing their body condition as well as disturbing their breeding (Vandegrift *et al.* 2008 ; Vandegrift and Hudson 2009). Moreover, Brown and Fuller (2006) observed that white-footed mice harboring intestinal parasites had higher levels of corticosterone (stress indicator hormone) than those that did not harbor any. Those studies point out the importance of helminth community harbored by *P. leucopus* individuals as a key factor for the current species distribution northward shift.

Collecting helminth information has become especially interesting since *P. leucopus* is considered as being the major reservoir for Lyme disease in North-America (Ostfeld 2010), and that its arrival in naïve regions may cause critical public health issues. Despite the relevance of studying parasitic worms for understanding the species population dynamics, only a limited amount of information is currently available in the literature: from the early work of Harkema (1936) in North Carolina (54 rodents analysed) to more recent studies like the ones of Lichtenfels and Haley (1968) in Maryland (73 individuals); Zenchak and Hall (1971) in Virginia (120 mice examined); and the study of Barker *et al.*

(1987) in Southern Illinois (109 specimens). The most recent helminthological study (Brown and Fuller 2006) was based on the detection of helminth eggs in faeces in Kentucky. Finally, some other studies (Oswald 1958 ; Beasley *et al.* 2013) gave very limited information on helminth species harboured by the white-footed mouse. Consequently, we are still far from a proper knowledge of the helminth communities of *P. leucopus* and the lack of information becomes greater in the expansion range of this rodent. The aim of the present study was therefore to explore the helminth community in peripheral populations of the white-footed mouse (*P. leucopus*) in Quebec (Canada).

MATERIAL AND METHODS

A total of 169 white-footed mice (*P. leucopus*) were trapped at 9 field sites across the Montérégie and Estrie regions in southern Quebec, Canada (Fig. 1; Tab. 1): N1-N3 (North side of the St. Lawrence River, Northern genetic cluster); OR1-2-3-4 (Western side of the Richelieu River) and ER1-2-10 (Eastern side of the Richelieu River). At each site, 160 Sherman traps were placed every 10 meters in grids of 40 traps, during the summers of 2013 and 2014. The traps were baited with a mixture of oat and peanut butter in late afternoon and checked the following morning for three consecutive nights. *Peromyscus* individuals were identified to the species level using species-specific primers as described in Rogic *et al.* (2013). Gastrointestinal tracts of *P. leucopus* were extracted in the field and stored frozen for subsequent analyses. All procedures were approved by the “Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec” (SEG permits 2013-07-04-14-16-17-SF and 2014-05-02-1638-05-16-SF), and McGill University Animal Care Committee (AUP5420).

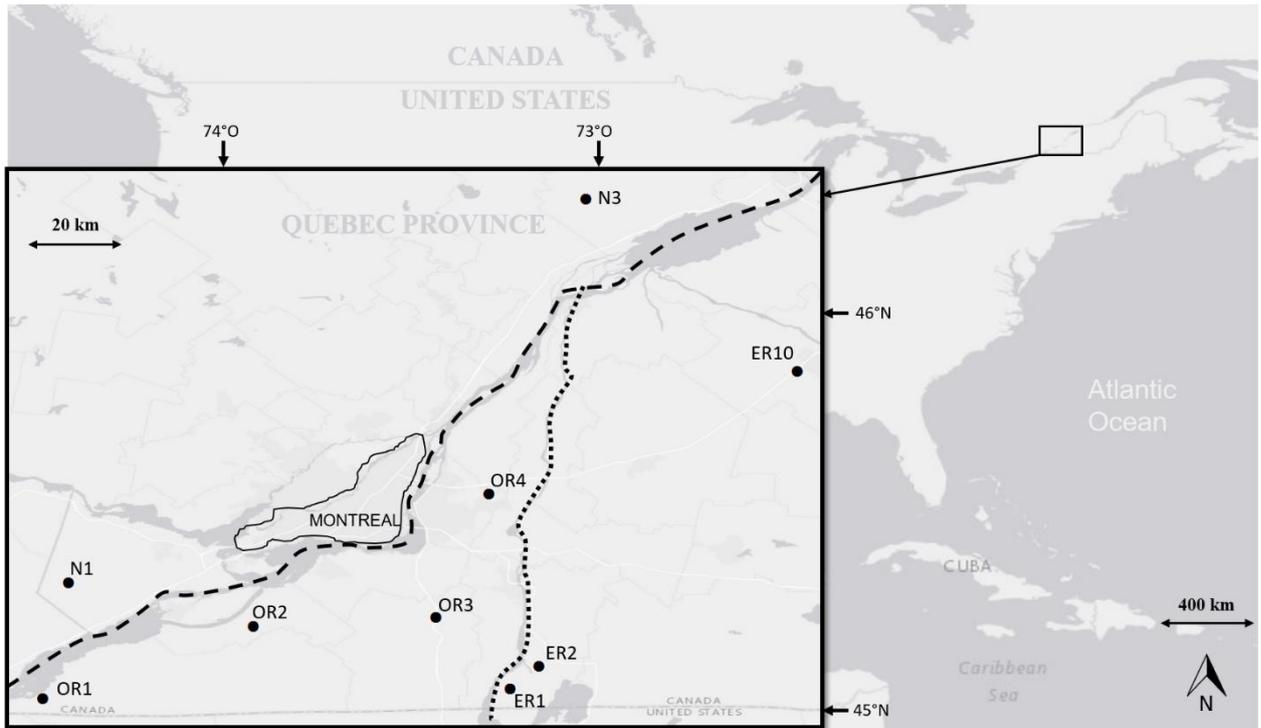


Figure 1 : Distribution map of the sampling locations for *Peromyscus leucopus* in Canada.

Sampling location	latitude	longitude	sampling size
ER1	45.06207	-73.284884	20
ER2	45.11793	-73.212812	10
ER10	45.86464	-72.563806	20
N1	45.33054	-74.394675	28
N3	46.29990	-73.093551	20
OR1	45.03670	-74.458869	21
OR2	45.21907	-73.928670	20
OR3	45.24174	-73.471424	19
OR4	45.55439	-73.336827	20

Table 1: Sampling locations of *Peromyscus leucopus* in Canada.

Gastrointestinal tracts (stomach, small intestine, cecum, and colon) were dissected under a binocular microscope for the survey of helminths. Parasites collected were then fixed in 70% cold alcohol. Nematodes and acanthocephalans were mounted temporarily in Amann lactophenol. Cestodes were stained with Semichon acetocarmine, dehydrated in alcohol, cleared in xylene and mounted in Canada balsam. Trematodes were dehydrated through a series of graded ethanol, cleared with xylene and mounted in Canada balsam directly or after staining in Semichon. All helminths were identified by their morphology and morphometry according to the literature. Descriptive parameters and confidence intervals were calculated using Quantitative parasitology (Reiczigel, J Rózsa 2005). A molecular study was performed for three helminths (*Syphacia*, *Aspiculuris* and the acanthocephalan species). Genomic DNA was extracted from minced parasite individuals using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden) following the manufacturer's protocol from the QIAcube (Qiagen®, Hilden). Cytochrome c oxidase I (CO1) gene was amplified in a polymerase chain reaction (PCR) using a different couple of primers for each morphotype. *Aspiculuris* : 5'-GGTTTTTTGGTCATCCTGAGG-3'; 5'-CAAAACCAACAGTAAACATATG-3' (Behnke *et al.* 2015). *Syphacia* : 5'-TGGTCTGGTTTTGTTGGTAGTT-3'; 5'-AACCACCCAACGTAAACATAAAA-3' (Okamoto *et al.* 2007). Acanthocephala: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' ; 5'-GGTTTTTTGGTCATCCTGAGG-3' (Folmer *et al.* 1994). These PCRs were carried in a total volume of 25µl, including 10µl of Multiplex (Qiagen, Hilden, Germany), 2.5µl of each primer, 2µl of DNA and 8µl of pure grade water (GE Healthcare – Hyclone). PCR conditions for the *Syphacia* and the acanthocephalan morphotypes were as follows: 5 min initial denaturation at 94°C, followed by 38 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 50°C and 1 min at 74°C. Post-PCR extension was carried out for 5 min at 74°C. PCR conditions for the *Aspiculuris* morphotype were: 5 min initial denaturation at 94°C, followed by 38 cycles of 15 sec at 94°C, 20 sec at 60°C and 20 sec at 74°C. Post-PCR extension was carried out for 5 min at 74°C. A scanning electronic microscope (SEM) was used to examine the cephalic plate of *Syphacia* (fig. 3). These specimens were mounted on stubs with adhesive tape and colloidal silver, sputter-coated with gold and examined using a JEOL JSM-6460LV at 10 kV. Mega6 version 6.06 (Tamura *et al.* 2013) was used to produce sequence alignments between both our *S. peromysci* and *Aspiculuris*

sp. sequences as well as several other Oxyuroidea sequences and one Filarioidea sequence as outgroup, obtained from NCBI. We used Mr. Bayes to draw a phylogenetic tree based on Bayesian inferences.

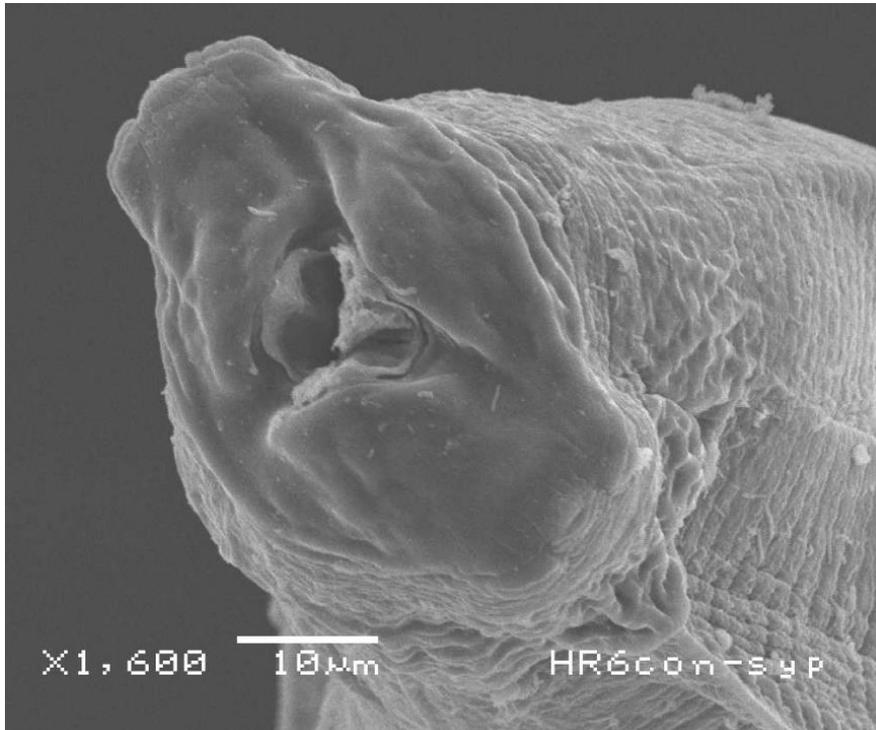


Figure 3 : Apical view of *Syphacia peromysci*.

RESULTS

Using morphological identifications, a total of nine helminth taxa were recovered from the 169 trapped rodents across our studied area with a general prevalence of 36.1%. The isolated helminths showed prevalence (%); Clopper-Pearson confidence interval (CI); general mean intensity (MI) as follows: 4 trematode species: *Plagiorchis* sp. (10.1%; 6.0-15.6; 4.00) ; *Fibricola cratera* (3.0%; 0.01-6.8; 4.60); *Brachylaima thompsoni* (1.8%; 0.4-5.1; 1.67); Brachylaimid sp. metacercariae (0.6%; 0.0-3.3; 4.00); A species of Cestoda: *Hymenolepis* sp. (3.6%; 1.3-7.6; 1.00) ; Three nematodes species: *Syphacia peromysci* (20.1%; 14.4-27.0; 63.18); *Aspiculuris* sp. (6.5%; 3.3-11.3; 8.00); undetermined nematode cyst (3.6%; 1.3-7.6; 35.17); one acanthocephalan species (0.6%; 0.0-3.3; 1.00).

Molecular identifications were performed for 3 helminth species. The sequences have been deposited on Genbank. Results showed that the *Aspicularis* specimens collected from *P. leucopus* in Quebec showed 14 nucleotide differences among 188 sites with *A. tetraptera* (7.45%) and 11 nucleotide differences of 142 sites with *A. americana* (7.75%) found in *P. leucopus* from Pennsylvania. Therefore, our specimens should remain as innominate species, clustering with *A. tetraptera*.

The *S. peromysci* specimens collected in this study did not cluster with other *Syphacia* species (Fig 2). Moreover, the Blast performed on NCBI returned no match higher than 86% of identity with a *S. frederici* sequence (accession number: AB282593.1)

Finally, the best match for our acanthocephalan sequence occurred with a *Moniliformis* sequence (accession number: KU206783.1), with an identity score of 81%.

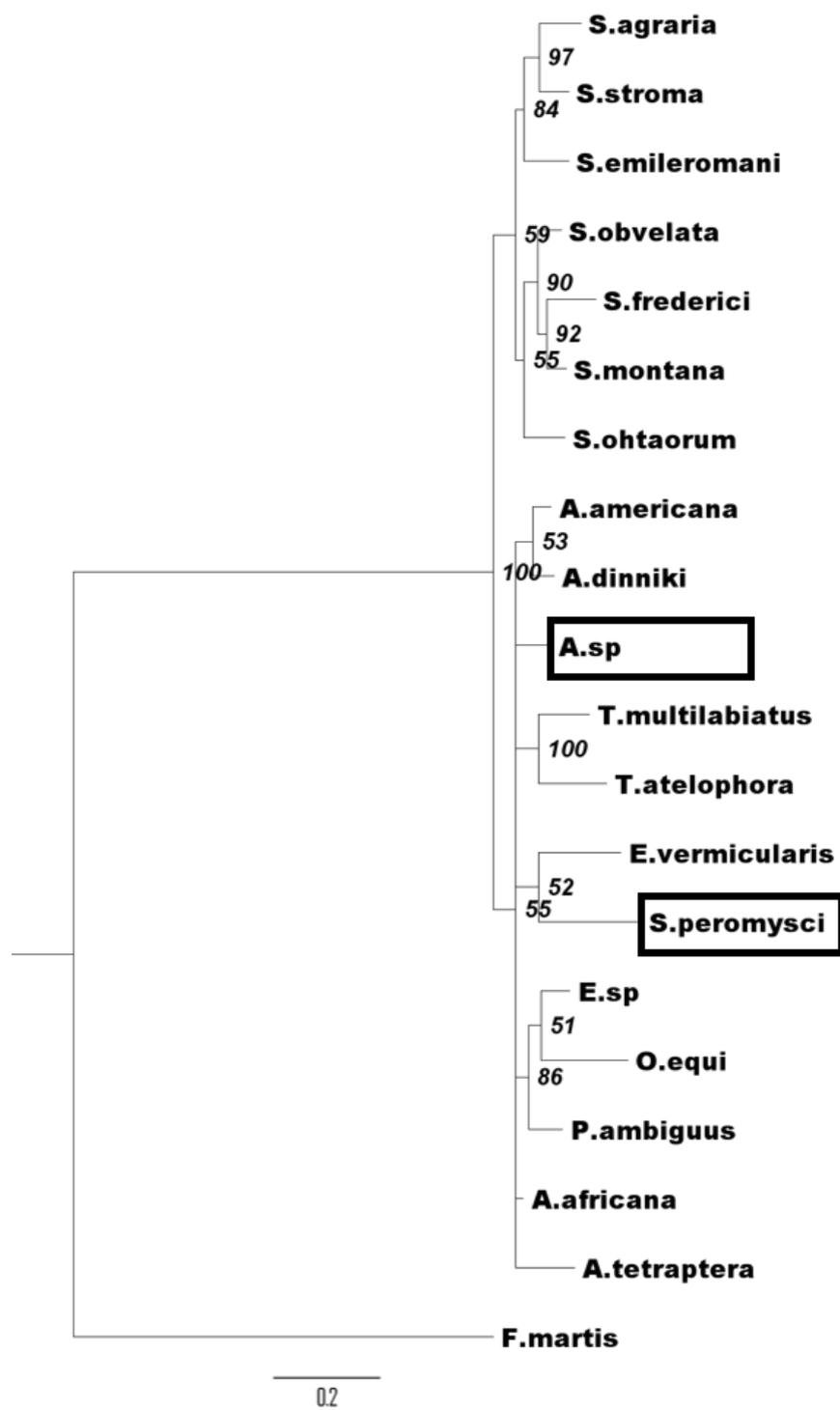


Figure 2 : Phylogenetic tree based on Bayesian inference with the Cytochrome c oxidase I (CO1) gene

DISCUSSION

The helminth community of *P. leucopus* in Quebec showed a considerable diversity of species (9 species) compared with the four helminth species observed in the study from Harkema (1936). Two out of these species (*B. thompsoni* and *S. peromysci*) were also present in our current study. Out of the nine species recorded by Zenchak and Hall (1971), the pinworm *S. peromysci* was the only species shared with our study. No helminth species were shared with the study by Barker *et al.* 1987) nor with the most recent one from Brown and Fuller (2006). Despite the presence of the genus *Hymenolepis* in the two latter surveys as well as in ours, the complexity of the group prevented us from confirming that it was the same species (Makarikov *et al.* 2015).

Four digenean species were collected, including *Brachylaima thompsoni*, a brachylaimid metacercariae, *Fibricola cratera* and *Plagiorchis* sp. The first one is usually found parasitizing shrews in North America (Rausch and Tiner 1949; Barker *et al.* 1987) with terrestrial gastropods being the second intermediate hosts. This trematode was already reported in *P. leucopus* from North Carolina and Michigan (compiled by Kennedy (1987)) as well as in other rodents in North America. The metacercaria of the brachylaimid collected from our individual could not be identified at species level by its morphological traits. Taking into account the presence of the above-mentioned trematodes in the mouse guts, we can conclude that the ingestion of gastropods by *P. leucopus* should not be exceptional. The genus *Fibricola lucida* (LaRue and Bosma, 1927) was already reported in *Peromyscus gossypinus* (Kinsella 1991) as well as in *Oryzomys palustris* (Kinsella 1988), both time in Florida. This trematode had also been reported in carnivores like *Didelphis virginiana* and *Mustela vison* (Schell 1985). The genus *Fibricola* uses tadpoles and frogs as infective intermediate hosts (Chandler 1942), so the presence of *P. leucopus* may be sometimes associated to humid habitats and probably to the presence of carnivores that will help maintaining this trematode life cycle. *Plagiorchis* species have already been reported in North American rodents and are known to be acquired by the ingestion of arthropods (Whitaker 1963). The limited value of metrical and morphological traits, as well as the low

host specificity of the adult stage (Dyer 1970) prevented us from performing an identification at species level. The presence in the *P. leucopus* guts of these trematode species, characterized by such diverse intermediary hosts confirm thereby the very generalist nature lent to the species (Lackey *et al.* 1985). Several nematode species have been collected too. Among them, *Syphacia peromysci*, from the Oxyuroidea superfamily, was the most commonly collected parasite species. This species was originally reported by Harkema (1936) in *P. leucopus* individuals from North Carolina in the United States. *Syphacia peromysci* individuals have also been found in other *Peromyscus* species like *P. difficilis*, a Mexican endemic species (Falcón-Ordaz *et al.* 2016) as well as in *P. gossypinus* and *P. polionotus* from Florida (Kinsella 1991) and *P. maniculatus* from Utah (Grundmann and Frandsen 1960). In the original description of *S. peromysci* (Harkema 1936) the shape of cephalic plate is not detailed, our specimen corresponds rather to the description published by Kruidenier *et al.* (1961). The SEM picture (Fig 3) from the female apical view allows the observation of an elongated cephalic plate, differently shaped than the one found in *S. peromysci* individuals collected from *P. difficilis*, suggesting that *S. peromysci* might actually be a complex of species.

Our study brings out the first molecular data on a *Syphacia* specimen collected on the American continent. However, according to the phylogenetic tree (fig. 2), our *Syphacia* sequence did not cluster well with the other *Syphacia* sequences reported in the literature. These deposited sequences all belonged to the Palearctic region, which might explain the great distances between these sequences and ours. The *Syphacia* genus therefore appears to be paraphyletic, with Nearctic species well differentiated from species collected in the Palearctic region. Further genetic studies including several markers should thus be required to validate the taxonomic status of North American *Syphacia* specimens assigned by metrical and morphological characters. A better understanding of the degree of specificity of this pinworm in different rodent species would require a wider sampling effort. Another oxyuroid helminth species was recovered from our *P. leucopus* samples and was identified as belonging to the genus *Aspiculuris*. These specimens appeared to be genetically differing from *A. tetraptera* as well as from *A. americana* (Fig. 2) that were both found in commensal introduced rodents

(*Rattus* and *Mus*) across Europe (Behnke *et al.* 2015). A wider spectrum of rodent hosts from our studied area would be required for a better understanding of the two recovered oxyuroid host distributions, to elucidate if these are parasites acquired by the invasion of *P. leucopus* in Quebec or if it is the result from naïve rodent “spillback” (Kelly *et al.* 2009).

Because of the limited values of available description for the identification of *Hymenolepis* species as well as the existence of at least 56 distinct *Hymenolepis* species recorded in *Peromyscus* throughout the Nearctic region (Makarikov *et al.* 2015), we were unable to perform a proper identification of our specimen up to the species level.

The single acanthocephalan specimen collected could not be precisely determined neither, taking in consideration the limitation of material for the morphological study. This phylum remains poorly represented in the genetic databases, therefore the genetically closest listed specimen belonged to the *Moniliformis* genus. Our sequence will however constitute a reference point for further studies.

Conclusion

Our study highlighted the high degree of diversity in the helminth community carried by *P. leucopus* in its expanding range in Quebec. Further studies should focus on comparing the results obtained here in *P. leucopus*' expanding range with regions where the species is installed for decades. This would allow testing the parasite release hypothesis in a context where major public health issues might depend on the success of *P. leucopus* colonization in southern Quebec.

Acknowledgements

We thank S. Poonlaphdecha from Udon Thani University for logistical support, S. Turney, S. Leo, field assistants and land owners. This work was supported by Belgian FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) fellowship to AA and to JRM and by financial grants from the Belgian FRS-FNRS (“credits pour brefs séjours à l’étranger”) to AA and JRM, and from the “Patrimoine de l’université de Liège” to AA. VM is supported by a NSERC DG grant (RGPIN/341918-2012).

REFERENCES

- Barker, CM, WG Dyer, and GA Feldhamer. 1987. “Helminths of *Peromyscus Leucopus*, *P. Maniculatus*, and *Blarina Carolinensis* from Southern Illinois.” *Transactions of the Illinois State Academy of Science* 80 (1–2): 119–27.
- Beasley, J. C., T. S. Eagan, L. K. Page, C. A. Hennessy, and O. E. Rhodes. 2013. “*Baylisascaris Procyonis* Infection in White-Footed Mice: Predicting Patterns of Infection from Landscape Habitat Attributes.” *Journal of Parasitology* 99 (5): 743–47. doi:10.1645/GE-2887.1.
- Behnke, J. M., A. Stewart, A. Bajer, M. Grzybek, P. D. Harris, A. Lowe, A. Ribas, L. Smales, and K. J. Vandegrift. 2015. “Bank Voles (*Myodes Glareolus*) and House Mice (*Mus Musculus Musculus*; *M. M. Domesticus*) in Europe Are Each Parasitized by Their Own Distinct Species of *Aspicularis* (Nematoda, Oxyurida).” *Parasitology* 142 (12). Cambridge University Press: 1493–1505. doi:10.1017/S0031182015000864.
- Brown, T.T., and C.A. Fuller. 2006. “Stress and Parasitism of White-Footed Mice (*Peromyscus Leucopus*) in Dry and Floodplain Environments.” *Canadian Journal of Zoology* 84 (12): 1833–39. doi:10.1139/z06-183.
- Chandler, A.C. 1942. “The Morphology and Life Cycle of a New Strigeid, *Fibricola Texensis*, Parasitic in Raccoons.” *Transactions of the American Microscopical Society* 61 (2): 156–167. doi:10.2307/3222843.
- Deter, Julie, Nathalie Charbonnel, Jean-François Cosson, and Serge Morand. 2008. “Regulation of Vole Populations by the Nematode *Trichuris Arvicolae*: Insights from Modelling.” *European Journal of Wildlife Research* 54 (1). Springer-Verlag: 60–70. doi:10.1007/s10344-007-0110-6.

- Diagne, Christophe, Alexis Ribas, Nathalie Charbonnel, Ambroise Dalecky, Caroline Tatard, Philippe Gauthier, Voitto Haukisalml, *et al.* 2016. "Parasites and Invasions: Changes in Gastrointestinal Helminth Assemblages in Invasive and Native Rodents in Senegal." *International Journal for Parasitology* 46 (13–14): 857–69. doi:10.1016/j.ijpara.2016.07.007.
- Dyer, WG. 1970. "Helminths of the Striped Skunk, *Mephitis Mephitis* Schreber, in North Dakota." *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 37 (1): 92–93.
- Falcón-Ordaz, Jorge, Jesús A. Fernández, and Belén Aline Ruíz-Vázquez. 2016. "Distribution Extension of *Syphacia* (*Seuratoxyuris*) *Peromysci* Harkema, 1936 (Nematoda, Syphaciinae) Parasitizing the Rock Mouse, *Peromyscus Difficilis* (J. A. Allen, 1891) (Rodentia, Neotominae) in Central Mexico." *Check List* 12 (3): 1912. doi:10.15560/12.3.1912.
- Fiset, Jessica, Nathalie Tessier, Virginie Millien, and Francois-Joseph Lapointe. 2015. "Phylogeographic Structure of the White-Footed Mouse and the Deer Mouse, Two Lyme Disease Reservoir Hosts in Québec." *PloS One* 10 (12): e0144112. doi:10.1371/journal.pone.0144112.
- Folmer, O, M Black, W Hoeh, R Lutz, and R Vrijenhoek. 1994. "DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates." *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294–99.
- Grundmann, A W, and J C Frandsen. 1960. "Definitive Host Relationships of the Helminth Parasites of the Deer Mouse, *Peromyscus Maniculatus*, in the Bonneville Basin of Utah." *The Journal of Parasitology* 46 (December): 673–77.
- Harkema, R. 1936. "The Parasites of Some North Carolina Rodents." *Ecological Monographs* 6 (2): 151–232.
- Kelly, D W, R A Paterson, C R Townsend, R Poulin, and D M Tompkins. 2009. "Parasite Spillover: A Neglected Concept in Invasion Ecology?" *Ecology* 90 (8): 2047–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739367>.
- Keane RM, Crawley MJ. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* 17:164-170.
- Kennedy, Murray J. 1987. *Synopsis of the Digenea of Mammals of North America*. Edmonton, Alta. : Alberta Agriculture, Animal Health Division,. doi:10.5962/bhl.title.110488.

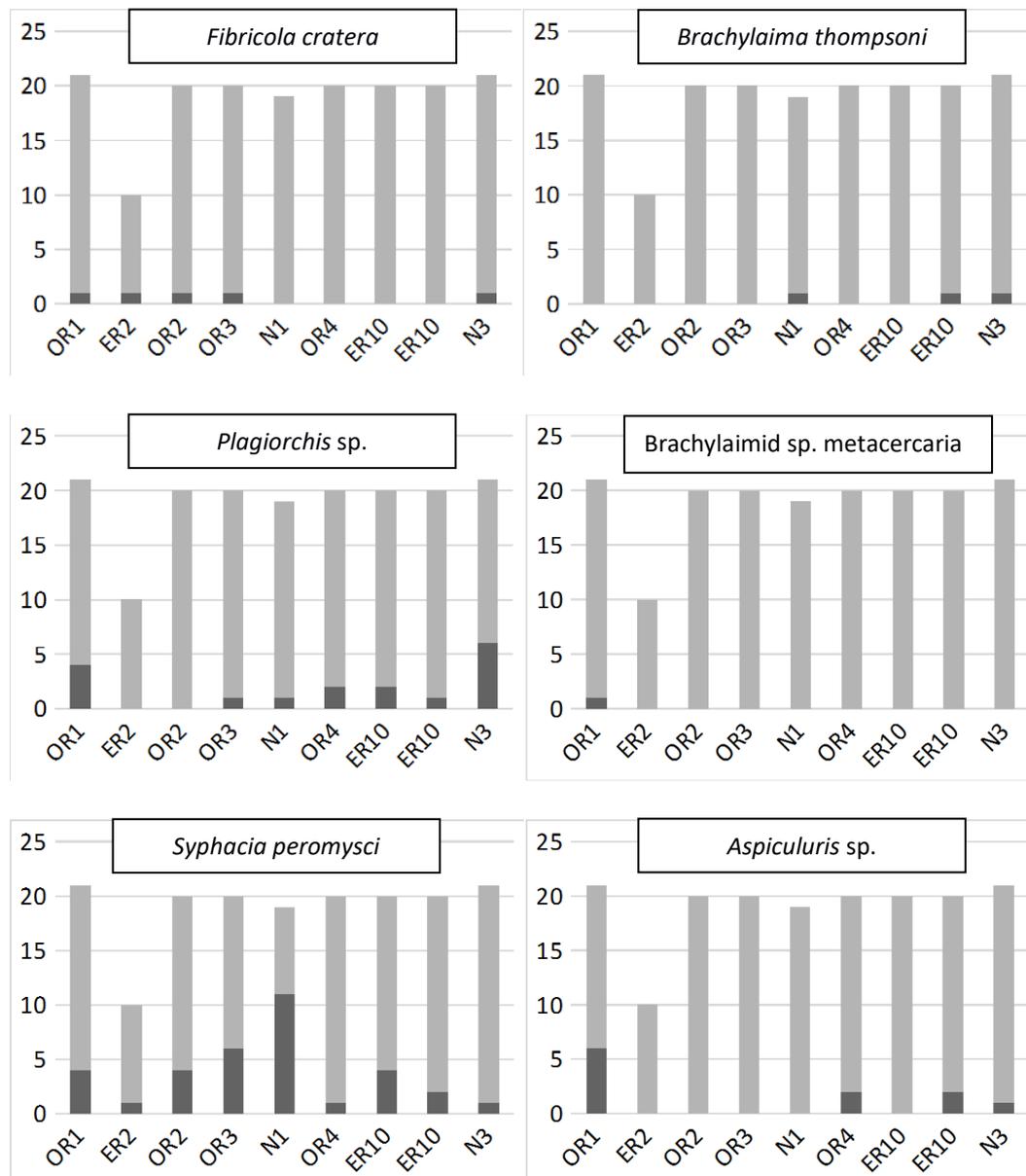
- Kinsella, J M. 1988. "Comparison of Helminths of Rice Rats, *Oryzomys Palustris*, from Freshwater and Saltwater Marshes of Florida." *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 55 (2): 275–80.
- Kinsella, J. M. (1991). Comparison of helminths of three species of mice, *Podomys floridanus*, *Peromyscus gossypinus*, and *Peromyscus polionotus*, from southern Florida. *Canadian Journal of Zoology*, 69(12), 3078-3083.
- Kruidenier, F. J., K. N. Mehra, and R. Harkema. 1961. "Comparative Studies of *Syphacia Peromysci* and *S. Samorodini* (Nematoda: Oxyuridae)." *The Journal of Parasitology* 47 (1): 47. doi:10.2307/3274974.
- Lackey JA, Huckaby DG, Ormiston BG. 1985. *Peromyscus leucopus*. *Mammalian Species American Society of Mammalogists* 247:1-10.
- Lichtenfels, JR, and AJ Haley. 1968. "New Host Records of Intestinal Nematodes of Maryland Rodents and Suppression of *Capillaria Bonnevillei* Grimdmann and Frandsen, 1960 as a Synonym of *C. Americana* Read, 1949." *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 35 (2): 206–11.
- Mack RN, Simberloff D, Mark Lonsdale W, Evans H, Clout M, Bazzaz FA. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological applications* 10:689-710.
- Makarikov, Arseny A, Todd N Nims, Kurt E Galbreath, and Eric P Hoberg. 2015. "Hymenolepis Folkertsi N. Sp. (Eucestoda: Hymenolepididae) in the Oldfield Mouse *Peromyscus Polionotus* (Wagner) (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) from the Southeastern Nearctic with Comments on Tapeworm Faunal Diversity among Deer Mice." *Parasitology Research* 114 (6): 2107–17. doi:10.1007/s00436-015-4399-x.
- Okamoto, Munehiro, Hayato Urushima, Masahiro Iwasa, and Hideo Hasegawa. 2007. "Phylogenetic Relationships of Rodent Pinworms (Genus *Syphacia*) in Japan Inferred from Mitochondrial CO1 Gene Sequences." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 69 (5): 545–47.
- Oswald, V. H. 1958. "Studies on *Rictularia Coloradensis* Hall 1916 (Nema Toda: Thelaziidae). II Development in the Definitive Host." *Transactions of the American Microscopical Society* 77 (413–422).
- Ostfeld, R. (2010). *Lyme disease: the ecology of a complex system*. OUP USA.

- Parmesan C, Yohe G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *nature* 421:37-42.
- Rausch, RL, and J Tiner. 1949. "Studies on the Parasitic Helminths of the North Central States. II. Helminths of Voles (*Microtus* Spp.). Preliminary Report." *American Midland Naturalist* 41 (3): 665–94.
- Reiczigel, J Rózsa, L. 2005. "Quantitative Parasitology 3.0." Budapest.
- Rogic, Anita, Nathalie Tessier, Pierre Legendre, François-Joseph Lapointe, and Virginie Millien. 2013. "Genetic Structure of the White-Footed Mouse in the Context of the Emergence of Lyme Disease in Southern Québec." *Ecology and Evolution* 3 (7): 2075–88. doi:10.1002/ece3.620.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *nature* 421:57-60.
- Schell, SC. 1985. *Handbook of the Trematodes of North America North of Mexico*. Moscow, Idaho: University Press of Idaho.
- Schwanz, Lisa E. 2008. "Chronic Parasitic Infection Alters Reproductive Output in Deer Mice." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62 (8). Springer-Verlag: 1351–58. doi:10.1007/s00265-008-0563-y.
- Swanson, Katherine I, and Douglas E Norris. 2008. "Presence of Multiple Variants of *Borrelia burgdorferi* in the Natural Reservoir *Peromyscus leucopus* throughout a Transmission Season." *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.) 8 (3). Mary Ann Liebert, Inc.: 397–405. doi:10.1089/vbz.2007.0222.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
- Torchin ME, Lafferty KD, Dobson AP, McKenzie VJ, Kuris AM. 2003. Introduced species and their missing parasites. *nature* 421:628-630.
- Vandegrift, Kurt J., and Peter J. Hudson. 2009. "Could Parasites Destabilize Mouse Populations? The Potential Role of Pterygodermatites *Peromysci* in the Population Dynamics of Free-Living Mice, *Peromyscus leucopus*." *International Journal for Parasitology* 39 (11): 1253–62. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.025.

- Vandegrift, Kurt J., Thomas R. Raffel, and Peter J. Hudson. 2008. "Parasites Prevent Summer Breeding in White-Footed Mice, *Peromyscus Leucopus*." *Ecology* 89 (8). Ecological Society of America: 2251–58. doi:10.1890/07-1935.1.
- Whitaker, JO. 1963. "A Study of the Meadow Jumping Mouse, *Zapus Hudsonius* (Zimmerman), in Central New York." *Ecological Monographs* 33 (3): 215–54.
- Zenchak, J J, and J E Hall. 1971. "Helminths from *Peromyscus Leucopus* and *P. Maniculatus* in West Virginia." *The Journal of Parasitology* 57 (3): 542.

3.3 Prévalences en parasites internes et externes de la souris à pattes blanches dans le sud du Québec

Neuf espèces de parasites internes et cinq espèces de parasites externes ont été observées chez les souris à pattes blanches capturées lors des étés 2013 et 2014. La figure 2 illustre la prévalence de ces différents parasites au sein des populations étudiées. Les populations y sont classées par ordre croissant de latitude. Ces prévalences sont aussi incluses dans les tableaux 1 et 2. Le tableau 3 résume les deux tableaux précédents en regroupant la richesse spécifique observée, la richesse spécifique extrapolée par la méthode de Jackknife ainsi que la prévalence des parasites internes, des parasites externes ainsi que de l'ensemble des parasites pour chaque population.



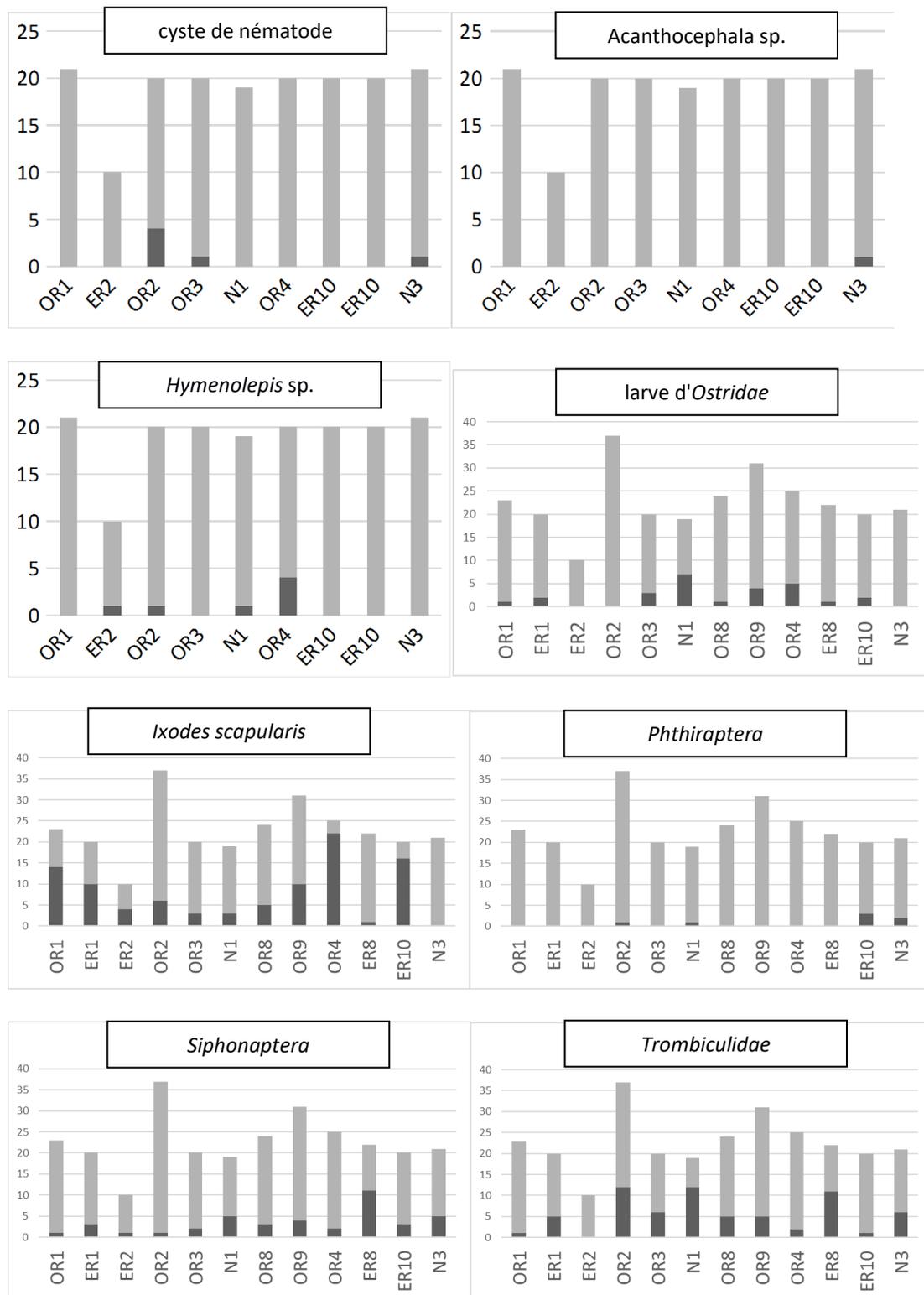


Figure 2 : prévalences des parasites internes et externes au sein des différentes populations étudiées.

Site	sample size	prevalence (%)				
		<i>Ixodes scapularis</i>	Trombiculidae	Siphonaptera	Phthiraptera	larve d'Ostridae
OR1	23	61	4,3	4,3	0	4,3
ER1	20	50	25	15	0	10
ER2	10	40	0	10	0	0
OR2	37	16	32,4	2,7	2,7	0
OR3	20	15	30	10	0	15
N1	19	16	63,2	26,3	5,3	36,8
OR8	24	21	20,8	12,5	0	4,2
OR4	25	88	8	8	0	20
OR9	31	32	16,1	12,9	0	12,9
ER8	22	5	50	50	0	4,5
ER10	20	80	5	15	15	10
N3	21	0	28,6	23,8	9,5	0

Tableau 1 : prévalences (en %) des parasites externes au sein des différentes populations

Site	Sample size	Prevalence (%)								
		<i>Fibricola cratera</i>	<i>Brachylaima thompsoni</i>	<i>Plagiorchis</i> sp.	Brachylaimid sp. metacercaria	<i>Syphacia peromysci</i>	<i>Aspiculuris</i> sp.	Nématode cyst	Acanthocephala sp.	<i>Hymenolepis</i> sp.
OR1	21	4,8	0	19	4,8	19	28,6	0	0	0
ER1	20	0	5	5	0	10	10	0	0	0
ER2	10	10	0	0	0	10	0	0	0	10
OR2	20	5	0	0	0	20	0	20	0	5
OR3	20	5	0	5	0	30	0	5	0	0
N1	19	0	5,3	5,3	0	57,9	0	0	0	5,3
OR4	20	0	0	10	0	5	10	0	0	20
ER10	20	0	0	10	0	20	0	0	0	0
N3	21	4,8	4,8	28,6	0	4,8	4,8	4,8	4,8	0

Tableau 2 : prévalences (en %) des parasites internes au sein des différentes populations

Site	sample size	Helminth parasites			External parasites			Total		
		Observed species richness	Jackknife index	Prevalence (%)	Observed species richness	Jackknife index	Prevalence (%)	Observed species richness	Jackknife index	Prevalence (%)
OR1	21	5	6,90 ± 1,35	42,86	4	6,86 ± 1,65	66,67	9	13,76 ± 2,54	76,19
ER1	20	4	5,90 ± 1,34	25,00	4	4,00 ± 0,00	70,00	8	9,90 ± 1,34	80,00
ER2	10	2	3,80 ± 1,27	20,00	2	2,90 ± 0,90	40,00	4	6,70 ± 1,56	50,00
OR2	20	4	5,90 ± 1,34	35,00	3	3,95 ± 0,95	50,00	7	9,85 ± 1,65	70,00
OR3	20	4	6,85 ± 2,15	30,00	4	4,00 ± 0,00	50,00	8	10,85 ± 2,15	65,00
N1	19	4	6,84 ± 2,14	63,16	5	5,95 ± 0,95	84,21	9	12,79 ± 3,05	94,74
OR4	20	4	4,95 ± 0,95	40,00	4	5,90 ± 1,34	95,00	8	10,85 ± 1,65	95,00
ER10	19	2	2,95 ± 0,95	15,79	5	5,95 ± 0,95	84,21	7	8,89 ± 1,34	84,21
N3	21	7	12,71 ± 2,71	38,10	3	3,00 ± 0,00	47,62	10	15,71 ± 2,71	66,67

Tableau 3 : Diversités et prévalences (en %) des parasites internes et externes au sein des différentes populations

Il est intéressant de constater que la population N3, qui est la population la plus périphérique est aussi celle qui comporte la plus haute diversité en terme de parasites avec dix espèces présentes sur les quatorze ayant été observées sur la totalité de l'échantillonnage (table 3). Ceci est encore plus flagrant lorsque l'on se focalise uniquement sur les parasites helminthes où sept des neuf espèces se retrouvent dans la population en question. Si l'on se focalise sur l'indice de diversité Jackknife pour les parasites helminthes, il est significativement supérieur pour la population N3 par rapport aux autres populations. Quant à la population périphérique, ER10, elle présente, au contraire, une diversité en parasites parmi les plus faibles recensées. La proportion d'individus parasités n'est pas significativement différente au sein des deux populations périphériques (N3 et ER10) par rapport aux autres populations.

Contrairement à ce qu'avance la central marginal hypothesis, aucune relation significative n'a pu être mise en évidence entre la diversité en parasites et la diversité génétique. Enfin il n'existe pas non plus de corrélation entre la latitude ou le degré de périphérie (calculé comme la distance entre chaque population et la population la plus périphérique de la lignée à laquelle elle appartient (N3 pour la lignée au nord du Saint-Laurent, ER10 pour la lignée au sud du Saint-Laurent)) et la diversité ou la prévalence en parasites. Nous ne pouvons ainsi confirmer ni la parasite-release hypothesis, ni la central-marginal hypothesis. Comme ce fut le cas dans le chapitre précédent, la taille restreinte du gradient géographique de l'étude pourrait éventuellement être à l'origine de cette absence de signal entre les populations périphériques et centrales. L'incorporation dans de futures études d'échantillons provenant de régions plus australes devrait permettre de vérifier les deux hypothèses à plus large échelle.

3.4 Impact des parasites sur le niveau de santé des souris

hôtes.

Les parasites, par définition, vivent au détriment de leur hôte et peuvent provoquer chez ceux-ci des troubles plus ou moins importants. Il a notamment été montré que certains parasites peuvent affecter négativement l'indice corporel et la physiologie (Hawlana et al. 2006, Lourenço and Palmeirim 2007), la reproduction (Fitze et al. 2004, Hillegass et al. 2010), ou encore différents aspects comportementaux tels que la dispersion (Brown and Brown 1992) ou la recherche de nourriture (Raveh et al. 2011). Dans ce sous-chapitre, nous avons étudié les conséquences de la présence des parasites internes et externes

auprès de plusieurs variables de stress et de santé (détaillées aux points 1.2.4 et 1.2.5.) afin de mieux appréhender l'impact possible de ces parasites sur la santé des souris. Nous sommes conscients que d'autres variables de santé, telles qu'un dosage sanguin de la protéine C réactive (CRP) auraient pu se montrer plus adaptées pour répondre à cette question mais cette information s'est révélée logistiquement trop compliquée à obtenir. Pour des raisons statistiques, seules les espèces de parasites présentes chez dix hôtes ou plus ont été incluses dans l'étude. Des tests t de Student entre groupes d'hôtes parasités et non parasités ont ainsi été réalisés pour les variables de santé normalement distribuées. Dans les cas où ces variables ne remplissaient pas les conditions de normalité malgré transformation, des tests non-paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney ont été préférés. Le tableau 3 résume les résultats obtenus.

	<i>Ixodes scapularis</i>	Siphonaptera	Larves D'Oestridae	Trombiculidae	<i>Plagiorchis</i> sp.	<i>Syphacia peromysci</i>
indice corporel	109/309 ; p = 0,0005	41/309 ; p = 0,12	33/309 ; p = 0,02	71/309 ; p = 0,055	16/170 ; p = 0.1757	33/170 ; p = 0.2284
corticoستيرون capillaire	39/82 ; p = 0,86	9/82	13/82 ; p = 0,23	17/82 ; p = 0,51	8/74	9/74
poids des glandes surrénales	58/128 ; p = 0,39	14/128 ; p = 0,17	18/128 ; p = 0,05	26/128 ; p = 0,04	12/107 ; p = 0,88	16/107 ; p = 0,80
poids de la rate	109/214 ; p = 0,27	41/214 ; p = 0,58	33/214 ; p < 0,0001	71/214 ; p = 0,81	12/99 ; p = 0,77	15/99 ; p = 0,69
Asymétrie fluctuante du crâne	59/125 ; p = 0,86	12/125 ; p = 0,56	16/125 ; p = 0,12	25/125 ; p = 0,57	12/103 ; p = 0,46	16/103 ; p = 0,86
Asymétrie fluctuante de la mâchoire	60/122 ; p = 0,41	10/122 ; p = 0,82	16/122 ; p = 0,18	23/122 ; p = 0,85	11/100 ; p = 0,88	15/100 ; p = 0,26

Tableau 3 : effets de la présence de parasites sur différentes variables de santé. individus infectés/individus étudiés ; p-value du test t de Student ou du test de W.M.W.

***Ixodes scapularis* :**

35% des individus *P. leucopus* collectés lors des étés 2013 et 2014 étaient parasités par des tiques appartenant à l'espèce *Ixodes scapularis*. Cette prévalence diffère significativement selon le sexe, avec un taux de 44.4% de souris mâles parasitées, contre seulement 21.3% de femelles ($\chi^2 = 17.216$; $p = 0.00003$). Cette différence, déjà observée dans des études précédentes (Ostfeld et al. 1996), est à mettre en relation avec la taille du territoire qui est généralement plus importante chez les mâles que chez les femelles (Stickel 1968), augmentant ainsi la probabilité de rencontre de tiques. Les souris parasitées par des tiques présentent des indices corporels significativement inférieurs aux souris non parasitées. Cette différence est observable en se focalisant aussi bien sur les mâles que sur les

femelles. Ainsi, la présence de tiques aurait bien un effet négatif observable sur le niveau de santé de leur hôte. Ce résultat contraste avec les études de Ostfeld et al. (1996) et de Hersh et al. (2014) qui ont toutes les deux montré une corrélation positive entre la présence de tique et la survie de leur hôte. D'après ces auteurs, l'apparente indifférence des souris à la charge parasitaire en tiques contribuerait de manière non négligeable à l'efficacité de *P. leucopus* en tant que réservoir de la maladie de Lyme. Nos données, collectées dans la zone périphérique de l'aire de distribution de la souris à pattes blanches montrent que les souris de ces régions sont au contraire, impactées négativement par la présence de tiques. Cette conclusion concorde avec celle avancée par Gaitan and Millien (2016) qui avaient observé une diminution du taux de mouvement et du taux d'excursion chez les souris parasitées par *Ixodes scapularis*.

Dans les régions plus centrales où Ostfeld et al. (1996) et Hersh et al. (2014) ont travaillé, les tiques opéraient un effet synergique en faveur de la propagation de la maladie de Lyme puisqu'elles favorisaient, d'une part, la survie de l'espèce réservoir (*P. leucopus*) qu'elles parasitaient et que, d'autre part, elles constituaient le vecteur principal de la bactérie. D'après nos propres données, nous pouvons affirmer que cet effet synergique ne semble cependant plus exister en bordure d'aire de distribution de la souris à pattes blanches.

Larves d'*Oestridae* :

Un phénomène d'hyperplasie de la rate significativement liée à la présence de larves d'*Oestridae* a également été observé. De plus, il semblerait que le degré d'hyperplasie de la rate d'un individu soit directement lié au nombre de larves d'*Oestridae* retrouvées dans le corps de celui-ci. La figure 3 illustre très bien cette observation.

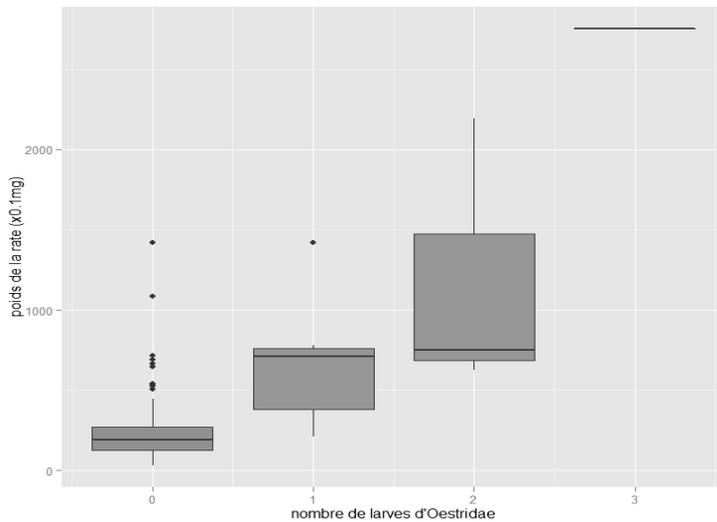


Figure 3 : poids (en dixième de milligrammes) de la rate en fonction du nombre de larve

Certaines valeurs apparaissent comme aberrantes dans le groupe des souris non-infectées. Ces valeurs proviennent très probablement de souris préalablement parasitées mais dont la larve aurait déjà éclos. La cicatrisation se faisant très rapidement, il est très possible que ces souris n'aient pas été signalées comme parasitées lors de leur dissection. Cette hyperplasie de la rate due à la présence de larves d'Oestridae a déjà été renseignée dans la littérature (Gonçalves et al. 2009). Elle correspondrait à une augmentation de la production de lymphocytes permettant de combattre le parasite (Morand and Poulin 2000). Un autre résultat intéressant réside dans le fait que les souris parasitées présentaient un indice corporel supérieur à celui des souris non parasitées. Cela va pourtant à l'encontre de la croyance générale prétendant que les parasites, par définition, constituent une nuisance pour leur hôte. Une étude précédente menée par Burns et al. (2005) a présenté des conclusions similaires. En effet, leurs travaux ont montré une augmentation du taux de survie chez les souris parasitées. Les auteurs expliquent cela par une réorganisation de la stratégie de vie des souris parasitées, favorisant la survie, au détriment de la reproduction. Les larves d'Oestridae constitueraient donc un type de parasite dont les nuisances s'appliquent au niveau de la population, plutôt qu'à l'hôte lui-même. D'autres hypothèses pourraient expliquer cette différence d'indice corporel observée dans nos données chez les souris parasitées par des larves d'Oestridae. La première serait qu'une sélection d'hôte particulièrement vigoureux soit effectuée par les mouches adultes pour y déposer leurs œufs. On sait cependant que les œufs de ces espèces sont déposés dans l'environnement et que c'est le passage de la souris à proximité de ces œufs fraîchement éclos qui permet aux jeunes larves de pénétrer dans l'organisme de leur hôte (Xia and Millar 1990). Il n'y a donc aucun processus de sélection par les parasites eux-mêmes, si ce n'est qu'ils ont plus tendance à se retrouver au sein des individus les plus mobiles. Une seconde hypothèse pourrait résider dans le fait que seules les souris les plus vigoureuses survivent au parasitage, ce qui tronquerait les résultats de captures, et augmenterait artificiellement

la moyenne des indices corporels des souris parasitées. Le décès précoce de souris dû au parasitage par des larves d'Oestridae n'a cependant jamais été reporté dans la littérature.



Figure 3 : Larves d'Oestridae tentant de s'extraire du corps sans vie d'une souris à pattes blanches.

Trombiculidae :

Nos données montrent que la présence de Trombiculidae parasitant les souris à pattes blanches provoquerait chez celles-ci une hyperplasie des glandes surrénales, caractéristique d'un niveau de stress élevé. Aucune différence de prévalence selon le sexe des souris parasitées n'a été observée. Ces parasites se distribuent généralement au niveau de l'oreille des souris. Dans notre étude, le nombre maximal de parasites retrouvés sur une seule souris dépassait les 100 individus. Ces parasites, bien que non identifiés spécifiquement, font partie de la même famille que les aoûtats, espèce connue pour les dermatites qu'elle provoque. Il est dès lors possible d'imaginer que la présence de ces parasites puisse provoquer chez leurs hôtes un inconfort pouvant se traduire par une augmentation du stress comme cela a été montré dans l'article de Philips (2000).

Autres relations :

L'absence de toute autre relation statistiquement significative peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, les effectifs d'individus infectés par un parasite spécifique étaient souvent insuffisants pour effectuer les tests statistiques de manière recevable. De plus, le fait de travailler avec des animaux sauvages capturés dans leur environnement ne nous a pas permis de contrôler ou d'enregistrer tous les facteurs pouvant influencer le niveau de santé des souris. Ainsi, l'effet de tel ou tel parasite sur une certaine variable aurait très bien pu être caché, voire au contraire artificiellement amplifié par la

présence d'un autre facteur impactant la même variable. Des variables telles que la densité de souris à pattes blanches, ou leur niveau d'inflammation sont toutes les deux des variables assez difficiles à obtenir sur le terrain, mais qui peuvent jouer un rôle primordial dans le niveau de stress. De plus, un décalage temporel pourrait exister entre le stress quantifié par une des méthodes utilisées et le stress causé par les parasites présents au moment de la capture de l'animal. L'asymétrie fluctuante (méthode d'évaluation du stress à long terme détaillée dans le chapitre 5) illustre bien cette problématique puisque cette variable est censée rendre compte du niveau de stress subi par l'animal lors de sa phase de croissance osseuse. Il est donc évident que la présence de parasites, aussi nombreux soient-ils, n'ait aucun effet sur cette variable dès lors que leur présence demeure relativement récente.

Chapitre 4 : Bactériologie

4.1 Avant-propos

La souris à pattes blanches est très connue des écologistes et des épidémiologistes pour son rôle de réservoir principal de la maladie de Lyme en Amérique du Nord. Au Canada comme aux États-Unis, des laboratoires spécialisés étudient la prévalence de la bactérie au sein des populations de *P. leucopus* et d'autres rongeurs, afin de comprendre les mécanismes d'émergence de la maladie et d'identifier ses foyers d'infection. Récemment, des co-infections ont été détectées entre la borréliose et d'autres zoonoses, comme la bartonellose ou la babésiose. Dans ce chapitre, nous avons mis à profit la technologie de séquençage de nouvelle génération et l'avons appliquée à la détection des bactéries présentes au sein des individus *P. leucopus*. Nous nous sommes fixés comme objectif principal d'établir un protocole permettant une détection plus fine des différentes bactéries pathogènes chez l'homme et pour lesquelles *P. leucopus* est un réservoir avéré. Une fois le protocole au point, les résultats produits ont permis de caractériser le microbiome de différents organes de la souris et d'identifier les foyers d'infection de la maladie de Lyme ainsi que de la bartonellose.

Un de nos objectifs initiaux était également de comparer la diversité en bactéries pathogènes entre les populations périphériques et les populations plus centrales, comme pour l'étude parasitologique, afin de vérifier l'enemy-release hypothesis ou la central-marginal hypothesis, mais cette approche ne se serait pas montrée pertinente, pour les raisons suivantes :

- Il aurait tout d'abord fallu trouver un moyen efficace d'évaluer la pathogénicité des souches bactériennes, afin de ne se focaliser que sur les bactéries pathogènes. En effet, une certaine proportion d'un microbiome est composée de bactéries commensales voire symbiotiques, dépendamment du type d'organe étudié. Des études de microbiomes intestinaux humains ont par exemple mis en évidence une relation positive entre diversité microbienne et différentes variables liées à la santé, soulignant l'effet bénéfique d'une flore bactérienne diversifiée (Cho and Blaser 2012). De plus, notre protocole a permis d'identifier les souches bactériennes jusqu'à leur genre. Or, au sein d'un même genre, des bactéries appartenant à des espèces distinctes peuvent présenter des nocivités complètement différentes. Le genre *Yersinia*, en est un bon exemple puisqu'il abrite la bactérie responsable de la peste, *Y. pestis*, au même titre que *Y. intermedia*, une bactérie inoffensive pour l'homme. Il aurait donc plutôt convenu d'estimer la nocivité des bactéries sur base des OTUs découvertes, mais le nombre très élevé d'OTUs identifiées (plus de 19.000) aurait rendu ce travail statistique compliqué et peu pertinent scientifiquement parlant étant donné la faible prévalence de chacune de ces OTUs.

- La seconde raison correspond à une limitation d'ordre technique. En effet, la méthode NGS ne permet pas de comparer les charges bactériennes entre différents individus. Cela est dû au fait que certaines bactéries sont plus difficiles à lyser que d'autres, libérant ainsi plus difficilement leur ADN. De plus, les deux réactions PCR utilisées lors des analyses NGS peuvent elles aussi introduire un biais en multipliant certaines séquences plus que d'autres. Enfin, la méthode utilisée nécessite une homogénéisation des concentrations ADN avant le séquençage à proprement parler, rendant encore plus difficile l'obtention de résultats quantitatifs. Les analyses NGS permettent ainsi actuellement d'apporter une information qualitative sur les communautés bactériennes présentes dans un échantillon, mais elles ne permettent pas de donner une information quantitative fiable. Il est ainsi seulement possible d'approcher la concentration d'une souche bactérienne par rapport à une autre au sein d'un même échantillon en comparant le nombre de séquences obtenues mais, là encore, les résultats sont à prendre avec précaution.

Malgré ces diverses limitations, l'étude de la diversité bactérienne de la souris à pattes blanches s'est avérée très intéressante et a généré des résultats prometteurs. Les principaux foyers d'infection de zoonoses bactériennes telles que la maladie de Lyme ou la bartonellose ont ainsi pu être mis en évidence. Les données récoltées dans le cadre de cette étude ont par ailleurs servi à établir un protocole de détection de la maladie de Lyme chez la souris plus efficace que celui utilisé jusqu'alors par les organismes de surveillance de ces maladies. **Tous ces résultats sont repris dans l'article n°3.**

4.2) Article 3

Résumé :

La grande majorité des études de microbiomes se focalisent sur les intestins. Une large proportion des bactéries détectées est donc de type commensale. Dans cet article, nous proposons d'effectuer pour la première fois une analyse du microbiome du foie, en utilisant la technologie de séquençage nouvelle génération comme outil pour la détection des souches bactériennes pathogènes. Nous avons utilisé le réservoir principal de la maladie de Lyme comme espèce modèle (*P. leucopus*) et nous avons séquencé les régions V5-V6 du gène 16S. Le microbiome du foie s'est avéré être dominé par des bactéries du genre *Lactobacillus*. Nous avons observé lors de nos analyses qu'une large proportion d'individus était contaminée par *Bartonella vinsonii arupensis*, une bactérie pathogène pour l'humain, responsable d'endocardites. Notre protocole s'est avéré plus efficace dans la détection de *Borrelia burgdorferi*, en comparaison avec les méthodes classiques utilisées par les programmes de surveillance de la maladie. Nous avons notamment mis en évidence, et ce pour la première fois, la présence de la *Borrelia* dans un mammifère sur la rive nord du St-Laurent, confirmant par là les modèles prédisant la propagation de la maladie de Lyme vers le Nord. Enfin, nous avons comparé les microbiomes d'individus appartenant à deux clusters génétiques différenciés, situés de part et d'autre du St-Laurent mais nous n'avons trouvé aucun effet du génotype de l'hôte sur les assemblages microbiens.



Research paper

Liver microbiome of *Peromyscus leucopus*, a key reservoir host species for emerging infectious diseases in North AmericaA. André^{a,b,*}, A. Mouton^a, V. Millien^b, J. Michaux^{a,c}^a Conservation Genetics Laboratory, University of Liège, Boulevard du Rectorat 26, 4000 Liège, Belgium^b Redpath Museum, McGill University, 859 Sherbrooke West, Montreal, QC H3A 0C4, Canada^c CIRAD, UR AGIRs, F-34398 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2016

Received in revised form 31 March 2017

Accepted 11 April 2017

Available online 13 April 2017

Keywords:

16S

NGS

Peromyscus leucopus

Microbiome

*Borrelia**Bartonella*

ABSTRACT

Microbiome studies generally focus on the gut microbiome, which is composed of a large proportion of commensal bacteria. Here we propose a first analysis of the liver microbiome using next generation sequencing as a tool to detect potentially pathogenic strains. We used *Peromyscus leucopus*, the main reservoir host species of Lyme disease in eastern North America, as a model and sequenced V5–V6 regions of the 16S gene from 18 populations in southern Quebec (Canada). The *Lactobacillus* genus was found to dominate the liver microbiome. We also detected a large proportion of individuals infected by *Bartonella vinsonii arupensis*, a human pathogenic bacteria responsible for endocarditis, as well as *Borrelia burgdorferi*, the pathogen responsible for Lyme disease in North America. We then compared the microbiomes among two *P. leucopus* genetic clusters occurring on either side of the St. Lawrence River, and did not detect any effect of the host genotype on their liver microbiome assemblage. Finally, we report, for the first time, the presence of *B. burgdorferi* in a small mammal host from the northern side of the St. Lawrence River, in support of models that have predicted the northern spread of Lyme disease in Canada.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As many as 6 out of 10 emerging infectious diseases worldwide are zoonotic, which means they are spread by wildlife (Johnson et al., 2015). Infectious diseases cause 9.6 million human deaths yearly (Lozano et al., 2013), while zoonoses represent over 1 billion cases of human illness (Karesh et al., 2012). Salmonellosis, avian flu, Lyme disease, West Nile virus, Dengue, malaria or chikungunya are among the most common zoonotic diseases. The latter three are endemic to the tropics, while the others can also be contracted in temperate regions.

With the recent development of next generation sequencing (NGS) techniques, microbiome-based studies have become increasingly common, allowing direct detection of bacteria without the need to go through any culture steps (Weinstock, 2012). An overwhelming majority of microbiome studies have focused on the gut microbiome, while other organs such as lung, liver or spleen are underrepresented (Can et al., 2014; Yun et al., 2014; Dickson and Huffnagle, 2015). Furthermore, only a few studies have been conducted on wild species' microbiomes (Phillips et al., 2012; Linnenbrink et al., 2013; Minard et al., 2015; Sanders et al., 2015). Yet NGS techniques represent a very promising tool for monitoring the emergence and spread of zoonotic

diseases through the direct detection of pathogens in vectors and reservoirs.

Here we screened the microbiome of a common disease reservoir, the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*), a key species in the epidemiology of Lyme disease in eastern North America (Ostfeld et al., 2014). The white-footed mouse is a rodent host for the black-legged tick (*Ixodes scapularis*), the vector of *Borrelia burgdorferi*, the pathogen causing Lyme disease in North America. The white-footed mouse is a highly competent reservoir for *B. burgdorferi*, and can transmit *B. burgdorferi* back to ticks feeding on it in >90% of cases (Mather et al., 1989). *Peromyscus leucopus* is also a reservoir for other human pathogens such as *Bartonella* sp. and *Babesia* sp. (Hofmeister et al., 1998). The *Bartonella* genus in particular was found to be highly prevalent in *P. leucopus* individuals from Minnesota and Wisconsin (Hofmeister et al., 1998).

The white-footed mouse is a widespread rodent species that is found throughout most of eastern North America (Lackey et al., 1985), and the northern limit of its distribution range is shifting rapidly into southern Quebec at an estimated rate of 10 km/yr in response to global warming (Roy-Dufresne et al., 2013). This rapid range expansion is a public health concern in southern Canada as it drives the emergence of new pathogens into naïve regions, including that which causes Lyme disease (Simon et al., 2014). Human cases of Lyme disease have increased over the last decade in Canada, i.e. up to 707 in 2015. In Quebec, the first endemic human case was detected in 2008 and the number of yearly

* Corresponding author at: Conservation Genetics Laboratory, University of Liège, Boulevard du Rectorat 26, 4000 Liège, Belgium.

E-mail address: adrien.andre@ulg.ac.be (A. André).

reported cases rose to 160 in 2015 (Gaulin et al., 2016). Monitoring of the bacterial pathogens via *P. leucopus* can thus provide public health agencies in the region with critical information not only for known emerging diseases such as Lyme disease, but also potentially for other emerging pathogens that may not have been detected by disease surveillance programs.

The evolutionary history of a host can be an important driver of their pathogens' dynamics, and distinct host lineages may carry different strains of pathogens that have co-evolved with their respective hosts. A number of recent studies have highlighted the existence of two well differentiated lineages of *P. leucopus* occurring on both sides of the St. Lawrence River in Quebec. These two lineages are distinct in their genetic background (Fiset et al., 2015; Leo et al. in revision; André et al. submitted), but also in their skull morphology (Ledevin and Millien, 2013). Given the significant differentiation of *P. leucopus* from either side of the St. Lawrence River, these populations likely represent two distinct lineages that split several million years ago (Fiset et al., 2015). Both lineages are currently increasing in abundance in southern Quebec and their distribution is shifting along a north-east axis (Roy-Dufresne et al., 2013).

Evidence of the differentiation of bacterial communities across distinct host lineages has been reported for the gut microbiome in humans (Goodrich et al., 2014), apes (Ochman et al., 2010) and bats (Phillips et al., 2012). The gut microbiome is, however, largely composed of commensal bacteria (Goodrich et al., 2014), and consequently may not be the best organ for studying pathogenic strains. Moreover, the gut microbiome is influenced by its host's diet (Turnbaugh et al., 2009), thus reducing the potential effects of the host genotype on the bacterial assemblages. Here we therefore focused on the liver microbiome in *P. leucopus*, an organ without any direct contact with the outer environment nor with allochthonous material. Finally, since the mechanism of *B. burgdorferi* infection on its reservoir host is very complex (Ebady et al., 2016; Gulia-Nuss et al., 2016), we also focused our analyses on lung and spleen samples from *P. leucopus* individuals that had tested positive in PCR screening of heart tissues (Leo et al. in revision), as well as from *P. leucopus* individuals in which we had detected *Borrelia* sp. in the liver using NGS.

This is the first study to characterize bacterial communities inhabiting the liver ecosystem of *P. leucopus* using next generation sequencing. Besides the detection of a number of pathogens of public health interest, we identified *Bartonella* samples to the species level and tested the hypothesis that different *Bartonella* species are associated with distinct *Borrelia* strains, as previously reported (Hofmeister et al., 1998). Active pathogen surveillance studies in Canada are based on PCR analysis of heart tissue samples from small mammal hosts (e.g. Simon et al., 2014). Here we also screened other tissues that might be equally or more susceptible to infection, such as lung and spleen tissues from known infected *P. leucopus* individuals. Finally, we tested the hypothesis that the two distinct host lineages of *P. leucopus* in our study area carried different *B. burgdorferi* strains that could in turn have different levels of pathogenicity. The findings of our study should thus help in refining infectious disease surveillance and management programs by better characterizing the current human pathogen landscape across southern Quebec.

2. Material and methods

2.1. Field sampling

White-footed mice were trapped at 18 field sites across the Montérégie and Estrie regions in southern Quebec (Fig. 1): N1–N3 (northern side of the St. Lawrence River, northern genetic cluster); OR1–OR5 (western side of the Richelieu River) and ER (eastern side of the Richelieu River), both of which characterized the southern genetic cluster (Fiset et al., 2015; André et al. submitted). At each site, 160 Sherman traps were placed every 10 m in grids of 40 traps during the

summer of 2013 and 2014. The traps were baited with a mixture of oats and peanut butter in the late afternoon and checked the following morning for three consecutive nights. Captured animals were euthanized with an overdose of isoflurane, followed by cervical dislocation. *Peromyscus* individuals were identified to the species level using species-specific primers, as described in Rogic et al. (2013), to distinguish them from *P. maniculatus* individuals. All procedures were approved by the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (SEG permits #2013-07-04-14-16-17-SF and #2014-05-02-1638-05-16-SF), and the McGill University Animal Care Committee (AUP#5420).

2.2. Genetic analysis

2.2.1. DNA extraction

Total DNA was extracted from liver ($N = 203$, Table 1), lung ($N = 12$) and spleen ($N = 12$) tissue samples using the DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen®, Hilden) according to a protocol designed for bacterial DNA harvesting. The protocol is described in detail in the Supporting Information.

2.2.2. 16s gene sequencing

We amplified a ~142 bp fragment of the 16S rRNA variable regions 5 and 6 (V5–V6) using the 784F-1061R primer pair originally designed by Andersson et al. (2008), coupled with Illumina overhang adapters. One negative extraction control was added to every batch of 24 samples, and two additional negative controls were added for the PCR steps. A mock community sample (HM-783D, BEI resources) containing genomic DNA from 20 bacterial strains, at concentrations ranging from 0.6 to 1400 pg/μl, was also added in triplicate to confirm the reliability of our method. PCR products were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Life Sciences, IN, USA). Purified amplicons were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Thermo Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's protocol on a fluorimeter (FilterMax F3, Molecular Devices). Quantified products were then pooled at equimolarity and sent to the GIGA Genomics platform (ULg) for sequencing on an ILLUMINA MiSeq V2 benchtop sequencer. The complete protocol is described in the Supporting Information.

2.3. Bioinformatics

Raw sequences were processed using a script consisting of a mix of FASTX Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit; 23-09-16) and USEARCH (Edgar, 2010) functions. Briefly, the paired-end reads were joined on their overlapping ends. The overlap had to be at least 10 bases long with an 8% maximum difference. Primers were removed and sequences were filtered to keep only those with at least 90% of the bases with a quality index greater than Q30. Chimeric sequences were detected and discarded using the uchime_ref function (Edgar et al., 2011) combined with the chimera.slayer reference database from the Broad Microbiome Utilities (Haas et al., 2011). Operational taxonomic unit (OUT) clustering was performed using the cluster_otus function from usearch package (Edgar, 2010), with an OTU radius of 3%. As pointed out by Salter et al. (2014), some sequences may be the result of contaminants present in the extraction or PCR reagents. OTUs were therefore not included in subsequent analyses when their relative abundance was not at least 10-fold greater than in any of the negative controls, according to Minard et al. (2015). This filter is quite restrictive and might silence a few OTUs actually present in some samples, but it has the advantage of silencing false-positive taxa. The remaining OTUs were assigned to their corresponding genus using the RDP-classifier tool (version 2.10.1) (Wang et al., 2007), with an assignment confidence cutoff of 0.8.

As the number of resulting sequences per sample ranged from 12 to 111,572, we standardized the number of sequences per sample to account for the effects of uneven sampling on the community metrics.

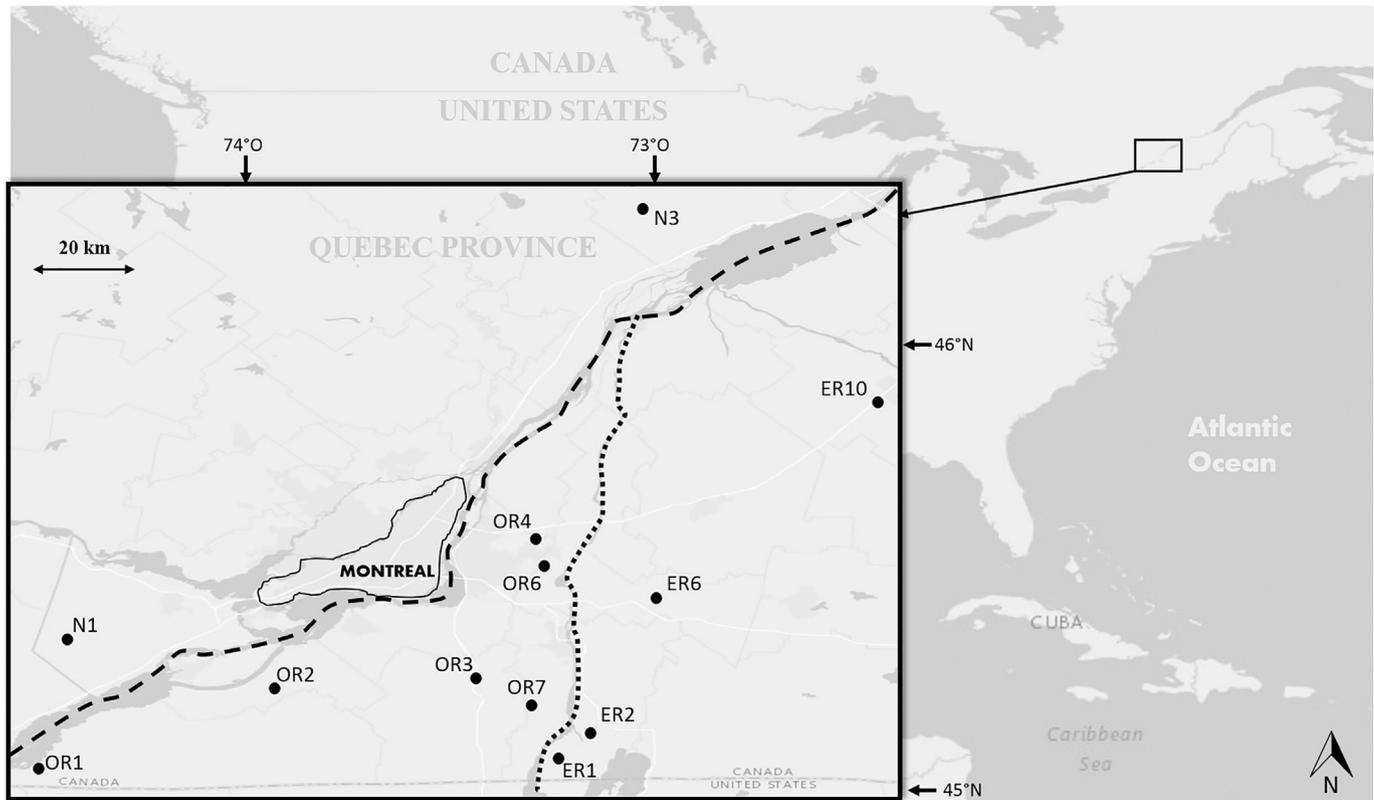


Fig. 1. Distribution of the sampling sites. (N1, N3: northern genetic cluster; OR1, OR2, OR3, OR4, OR6, OR7, ER2, ER6, ER10: southern genetic cluster). The Saint-Lawrence and Richelieu rivers are represented by the dashed and dotted lines respectively.

Samples with a number of reads above a threshold value of 1000 were subsampled to this threshold value using the `rarefy` function from the VEGAN (Oksanen et al., 2013) R package (R Core Team, 2016).

Samples from individuals that tested positive for *B. burgdorferi* in a PCR analysis on heart tissues (Leo et al., in revision), or presenting more than two sequences attributed to *Borrelia* sp. in our first analysis, were selected for a second analysis. This time, liver, lung and spleen tissues were processed for these individuals according to the protocol detailed above.

2.4. *Bartonella* species identification

Twenty DNA extracts identified as carrying *Bartonella* strains were used as starting material for species identification according to the protocol developed by Maggi and Breitschwerdt (2005). Briefly, a PCR was performed using 321s (5' AGA TGA TGA TCC CAA GCC TTC TGG 3') and

Table 1
Sample size (*N*) and occurrence of *Borrelia* sp. and *Bartonella* sp. within each sampling site.

Site	<i>N</i>	Occurrence	
		<i>Borrelia</i>	<i>Bartonella</i>
N1	18	0	10
N3	21	1	7
ER1	20	1	9
ER2	10	1	2
ER6	8	0	2
ER10	20	4	6
OR1	23	5	10
OR2	35	1	23
OR3	19	0	7
OR4	24	5	6
OR6	2	1	0
OR7	3	1	1
Total	203	20	83

983as (5' TGT TCT YAC AAC AAT GAT GAT G 3') oligonucleotides as sense and antisense primers. This primer pair was designed to distinguish the different species from the genus according to their amplicon sizes. PCR products were visualized on a polyacrylamide gel and sent to Eurofins Genomics (Ebensburg, Germany) for Sanger sequencing.

2.5. Statistical analysis

We assessed the dissimilarity between liver microbiomes across individuals using four distinct metrics. The Bray-Curtis dissimilarity index is based on weighting taxon abundance, while the Jaccard distance relies on presence/absence only. The weighted and unweighted UniFrac indices are also based on weighting taxon abundance and presence/absence, respectively, but they incorporate the phylogenetic distances between bacterial communities by comparing the unique vs. shared branch lengths underlying these communities (Lozupone and Knight, 2005). According to Linnenbrink et al. (2013), permutational multivariate analysis of variance was then performed on these four dissimilarity matrices using the `Adonis` function from the VEGAN R package (Oksanen et al., 2013) to detect significant differences in the microbiomes between the two *P. leucopus* genetic lineages (Fiset et al., 2015; André et al., submitted).

A heatmap was drawn up to plot the rarefied abundances from the 60 most prevalent genera in each sample using the `plot_heatmap` function (Rajaram and Oono, 2010) in the `phyloseq` package (McMurdie and Holmes, 2013) on R (R Core Team, 2016). We also produced a barplot representing the abundances and prevalences of the most common genera using the `barplot` function. We then further explored the *P. leucopus* infection pattern with two specific emerging pathogens, i.e. *Borrelia* sp. and *Bartonella* sp. The association between *Borrelia* sp. and *Bartonella* sp. occurrences was tested using Kendall's correlation test. To determine the most suitable organ for *Borrelia* sp. detection, a Wilcoxon signed-rank test was performed to highlight any significant

difference in the number of *Borrelia* sequences detected among the lung, liver and spleen tissues sampled. We then assessed the effects of the infection intensity (number of *Bartonella* sp. sequences per infected mouse) on the infection prevalence (proportion of mice infected by *Bartonella* sp.) at each sampling site with a linear model using the `lm` function in R. Two sampling sites with less than eight individuals were not included in this latter analysis. Due to small sample size, this last analysis was not completed for *Borrelia* sp.

3. Results

Three replicates of mock community samples containing known concentrations of genomic DNA from 20 bacterial strains were sequenced. All of them gave consistent results (Table S1): 17 of the 20 different strains originally included in the sample were detected. The three undetected strains were present at the lowest concentrations. Therefore, our protocol allowed bacterial DNA detection and identification to the genus level as long as its concentration in the DNA extract was at least 3.2 pg/μl, and provided that the sequence was included in the reference database.

3.1. Liver microbiome

Following the raw data processing, we obtained 5,003,515 sequences belonging to 22,854 distinct OTUs. Using our negative controls, we discarded 3775 contaminant OTUs, thus leaving 1,665,384 uncontaminated sequences. The rate of discarded contaminant sequences reached 66.7% of the processed sequences. Among the uncontaminated sequences, 1,098,461 were successfully attributed to the genus level and used for subsequent analyses. Table S2 (Supporting Information) presents the number of sequences for each sample after each main processing step. The number of sequences per sample ranged from 12 to 111,572. Although a correlation was noted between the sequence initial input and final output ($\text{cor} = 0.6$), the uneven sequence output was mainly based on the contaminant read rate. A highly significant correlation (0.83) was found between the sample total processing rate and the contaminant sequence rate. Because all samples were carefully processed according to the same laboratory protocol in strictly similar conditions, these disparities in the contaminant sequence rate were more likely due to low bacterial DNA concentrations within the liver rather than high contaminating bacterial DNA concentrations. This disparity between liver bacterial DNA concentrations might therefore have been the result of high bacterial infection in some liver samples and relatively low rates in others. Further research would nevertheless be required to confirm this hypothesis.

The rarefied dataset returned 469 bacterial genera, 13 of which presented a read number >1% of the total rarefied abundance. Overall, no clear distinction between the two *P. leucopus* lineages was apparent based on their microbiome (Fig. 2). The most abundant genus in our samples was *Lactobacillus* (accounting for 22.3% of the total number of reads), followed by *Bartonella* (19%), *Staphylococcus* (7%) and *Gemella* (6.2%) (Fig. 2). All other genera accounted for <2% of the total number of reads (Fig. 3). The most prevalent genera were *Staphylococcus* and *Lactobacillus*, both present in 66% of the samples. 60 other genera were present in >10% of the samples (Fig. 3).

We further explored the *Bartonella* sp. and *Borrelia* sp. infection patterns in our liver samples (Table 1). The proportion of *Bartonella*-positive mice within each sampling site increased with the number of *Bartonella* reads per positive mouse, regardless of whether we considered the mean ($F = 22.1$, $p = 0.0015$, $r^2 = 0.73$, Fig. 4) or median ($F = 11.06$, $p = 0.01044$, $r^2 = 0.58$, Fig. 4) intensities. No association was found between *Bartonella* and *Borrelia* occurrences (Kendall's tau = -0.049 , $p = 0.49$). We then used a specific primer pair for *Bartonella* on 20 randomly selected *Bartonella*-positive samples. Each of the tested samples showed the same amplicon size on polyacrylamide gel (data not shown), revealing the presence of a single species

(Maggi and Breitschwerdt, 2005). Sanger sequencing was performed in duplicate and the 381 bp sequences obtained matched the deposited *Bartonella vinsonii arupensis* subspecies by 98%.

3.2. Effect of host phylogeny on the liver microbiome

Three of the four computed distances (Table 2) (Jaccard, Bray-Curtis and weighted UniFrac) did not show any significant difference between the two distinct genetic clusters among the bacterial communities. The unweighted UniFrac index did return a significant difference, but with a very small r^2 value (Table 2).

3.3. *Borrelia burgdorferi* prevalence across different organs

Analyses performed at the Public Health Agency of Canada on heart tissue samples from our specimens and using a nested PCR protocol targeting two *Borrelia*-specific markers (e.g. Ogden et al., 2011) led to the detection of six mice infected by *B. burgdorferi* (Table 3). Our analysis of liver tissues confirmed the detection of *Borrelia* sp. in four out of these six individuals and enabled detection of an additional 14 infected mice, including two mice that returned positive results only before the rarefaction step. A complementary analysis was then conducted on mice previously detected as *Borrelia*-positive by PCR and on those presenting more than two sequences attributed to *Borrelia* sp. in the present study, but here DNA extracted from lung and spleen tissues was used. Out of the three tested organs, the lungs appeared to be the best choice for detecting *Borrelia* sp. Their sequencing led to the detection of 11 of the 12 positive samples tested with, the highest number of *Borrelia* sp. sequences detected, as compared to the liver (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.042$) and spleen (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.007$) finding. The liver and spleen sequencing led to the detection of only 10 and 5 infected mice, respectively, out of the 12 analysed, with no significant difference in the number of *Borrelia* sp. sequences detected between the two organs (Wilcoxon signed-rank test, $p = 0.056$).

4. Discussion

Our main objective was to characterize the liver microbial community in *P. leucopus* individuals. We further explored infection patterns in *Bartonella* and *Borrelia* genera and examined the effect of the host phylogeny on the liver microbiome.

Our study highlighted the importance of including negative controls in NGS protocols, as 66.7% of the total number of processed reads were diagnosed as contaminant and were therefore discarded. The dominance of contaminant reads in our study confirmed the relatively low microbial biomass present in liver tissues (Salter et al., 2014). To avoid drawing erroneous conclusions, we therefore recommend systematic inclusion of several negative control samples in study designs involving low microbial biomass samples. The mock community sample processing results confirmed the reliability of our protocol, and we were able to detect DNA of all bacterial strains originally present in our samples at above 3.2 pg/μl concentration. Furthermore, once the contaminants were discarded, no additional DNA was detected in our samples, thereby validating our protocol.

We found that *Lactobacillus* sp. dominated the liver microbiome of *P. leucopus*. These bacteria were the most abundant genus among all samples (22.3% of the total number of reads), followed by *Bartonella* (19%), *Staphylococcus* (7%) and *Gemella* (6.2%). All other genera were represented by <2% of the total number of reads. In addition to being the most abundant genus detected within the samples, *Lactobacillus* was also the most prevalent genus between samples, with 60% of all mouse liver tissues found to be *Lactobacillus*-positive.

Lactobacillus is a genus of gram-positive facultative anaerobic bacteria belonging to the Firmicutes phylum. It was reported to be the third most abundant genus in both *P. leucopus* and *P. maniculatus gracilis* gut microbiota (Baxter et al., 2015), while also being the most abundant

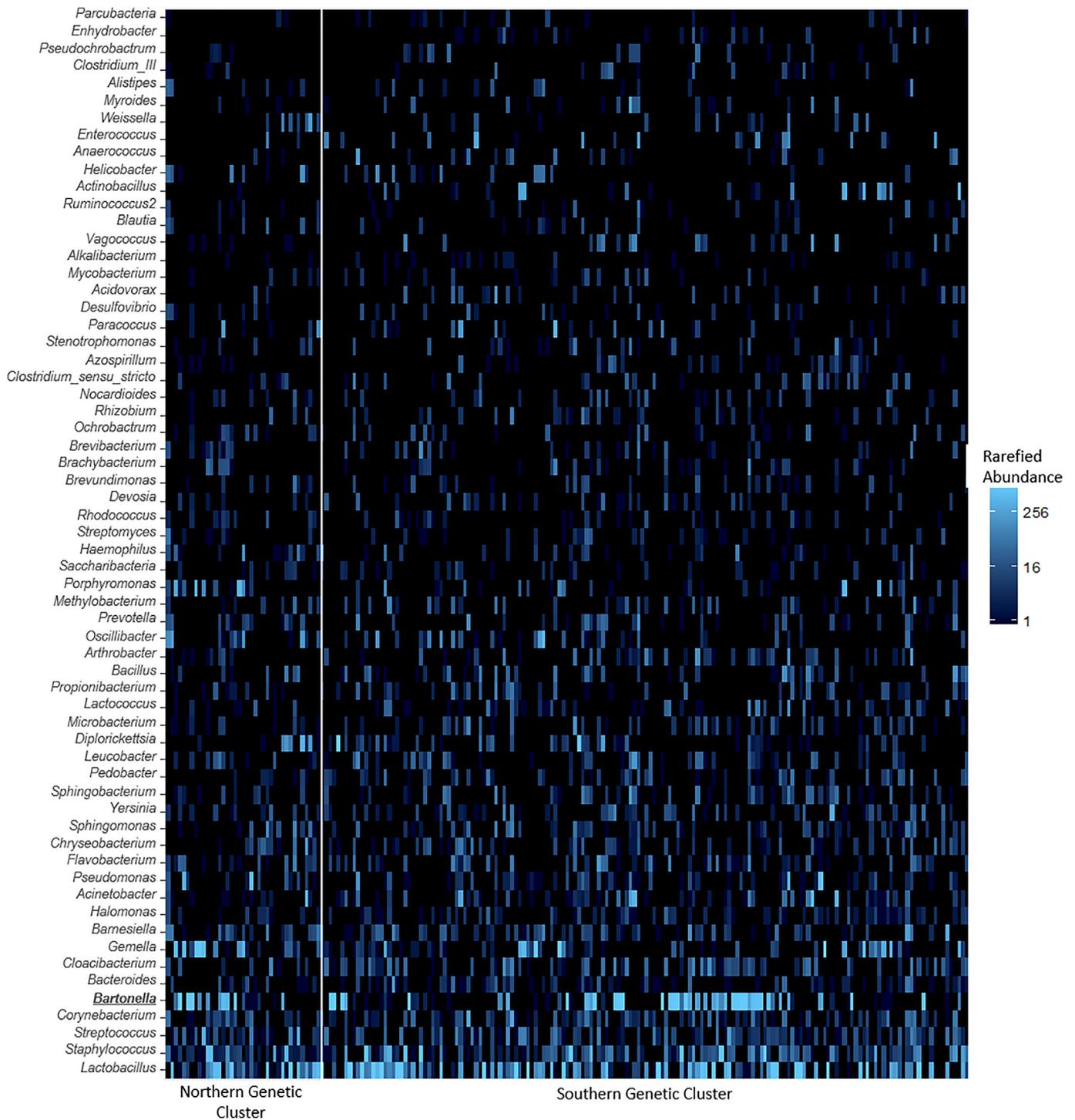


Fig. 2. Heatmap representing the rarefied abundances from the most abundant genera in each sample. Genera are arranged in order of increasing prevalence from the top to the bottom. Samples on the x axis are ordered according to the genetic cluster they belong to.

bacterium genus in human vaginal microbiota (Nardis et al., 2013). Little is known about its role in the gut microbiota. Walter (2008) suggested that only a small number of *Lactobacillus* species are true inhabitants of the mammalian intestinal tract and argued that these bacteria are mostly allochthonous members derived from fermented food. *Lactobacillus* species have a clearer role in human vaginal microbiota, i.e. protecting the vaginal ecosystem by competing with other microorganisms for nutrients and adherence to the vaginal epithelium, lowering the vaginal pH, producing lactic acid and other organic acids, producing antimicrobial substances, and modulating the local immune system (Aroutcheva et al., 2001). Since the liver has no direct contact

with the outside environment, its *Lactobacillus* community is less likely to be allochthonous and may play a similar protection role.

Bartonella was the second most abundant genus found among all of our liver samples. This genus contains >23 different species (Edouard et al., 2015), at least 11 of which are known to be pathogenic for humans, with infections producing a wide range of symptoms, especially endocarditis and high fever (Breitschwerdt and Kordick, 2000). It is transmitted by blood-sucking arthropods, such as ticks or fleas, and the reservoir hosts are generally mammal species. Here, Sanger sequencing revealed 98% identity with the deposited *B. vinsonii arupensis* subspecies, which is known to be pathogenic for humans, with a few cases of infection

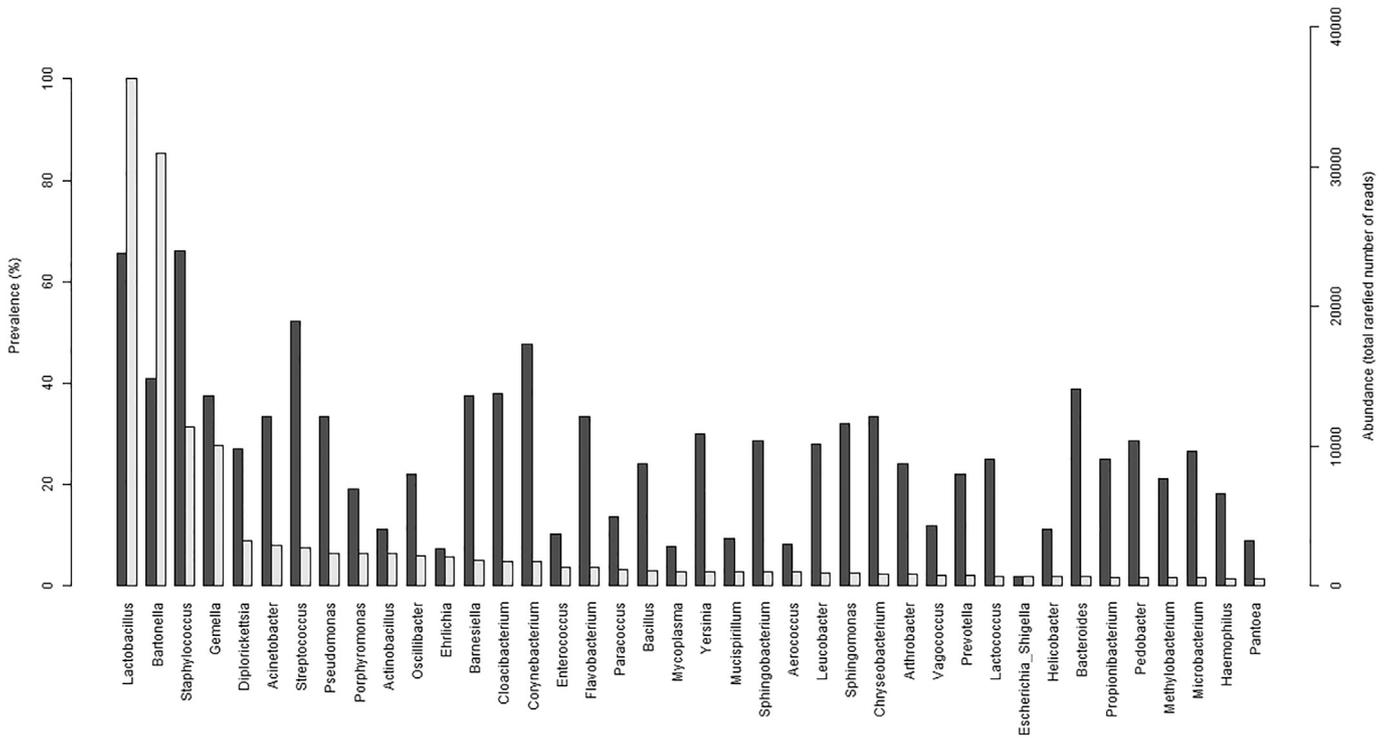


Fig. 3. Prevalence (dark grey bars; left axis) and abundance (light grey bars; right axis), of the genera with a total abundance >2% of the total number of rarefied reads.

reported in Wyoming (Welch et al., 1999), Europe (Fenollar et al., 2005; Melzi et al., 2015) and Thailand (Bai et al., 2012). Reported clinical symptoms include fever, chill, fatigue, myalgia, icterus, headache and hepatic pain. This *Bartonella* subspecies has also been observed in 84.2% of 737 captured deer mice (*Peromyscus maniculatus*) in a study performed in Colorado (Bai et al., 2011). This high prevalence was explained by the high persistency of the bacteria, with infection lasting more than a year in some individuals. In our study, the overall prevalence was 40.9%, but varied across sampling sites, with values ranging from 0 to 65.7%. Interestingly, the infection intensity among infected individuals (measured by the rarefied number of *Bartonella* reads) was positively correlated to the proportion of infected mice at the sampling site. Hence, sites with the highest number of infected mice also contained the most infected mice. This was not surprising given that

Bartonellosis is a disease mostly transmitted by blood-sucking arthropod vectors (Bai et al., 2011). The latter are more likely to acquire bacteria from highly infected mice during the feeding process, and thus more susceptible to infect other mice, which in turn could also transmit the disease, leading to exponential spreading of the contagious bacteria.

Contrary to the findings of a study focused on *P. leucopus* populations from upper midwestern USA (Hofmeister et al., 1998), we found no associations between *Bartonella* and *Borrelia* infection prevalences. The strict association between a *Bartonella* species closely related to *B. vinsonii*, and *B. burgdorferi* reported by Hofmeister et al. (1998) may therefore have been dependent on the *Bartonella* species involved, and the findings would thus not be applicable to the entire genus.

Active Lyme disease surveillance in Canada involves the analysis of heart tissue samples from small mammal hosts (e.g. Simon et al.,

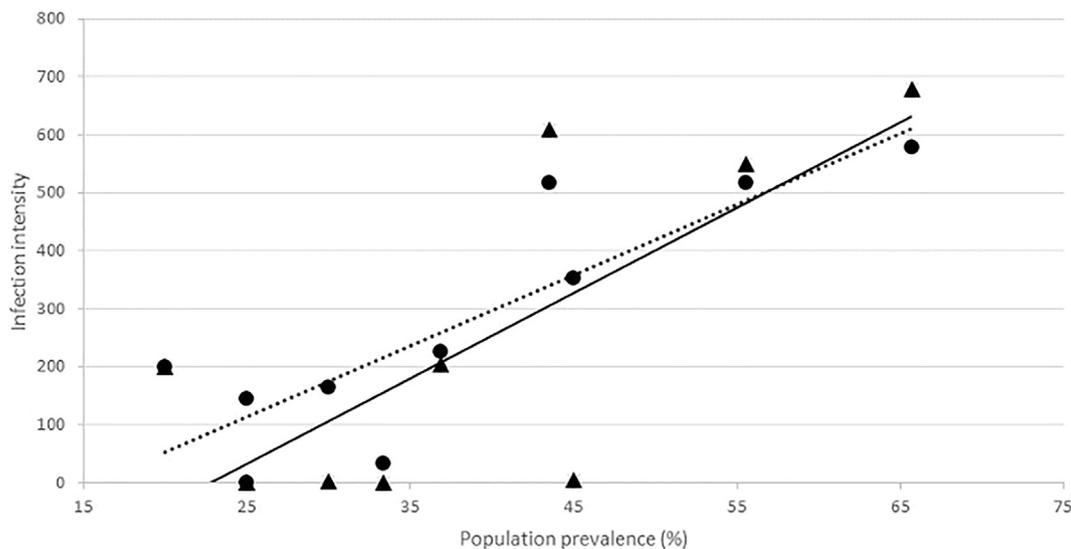


Fig. 4. Relation between the prevalence of *Bartonella* within each population and the mean (circles, dashed line; $y = 12,205x - 190.25$; $r^2 = 0.73$) and median (triangles, solid line; $y = 14,698x - 333.46$; $r^2 = 0.58$) *Bartonella* infection intensities within infected mice.

Table 2

Summary of PERMANOVAs performed on the four dissimilarity matrices between the two genetic clades.

Dissimilarity index	p-Value	r ²
Bray-Curtis	0.236	0.006
Jaccard	0.275	0.006
Weighted Unifrac	0.550	0.004
Unweighted Unifrac	0.044	0.007

2014), and six of our *P. leucopus* individuals tested positive for *B. burgdorferi* via this analysis. Here, based on liver DNA extracts and using NGS methods, we detected *Borrelia* sp. in only four out of these six individuals. However, we detected 14 additional infected mice (Table 3). The number of *Borrelia* sequences obtained for these latter samples were sometimes very low, which may explain why a PCR-based method would not detect them. The *Borrelia* concentration within a given infected individual could therefore vary across organs, depending on the infection stage or on the differential dissemination pattern, as suggested by Dykhuizen et al. (2008). We thus performed a second analysis on the six individuals that tested positive for *B. burgdorferi* by PCR, as well as six individuals that presented more than two *Borrelia* sequences in our sequencing. We performed this second analysis using DNA extracted from two additional organs, i.e. lung and spleen, which are often used in epidemiology studies (Casswall et al., 2010; Galan et al., 2016). The spleen analysis only confirmed the presence of *Borrelia* in 5 out of the 12 samples. By contrast, our lung analysis confirmed the presence of *Borrelia* in 11 out of the 12 samples. Moreover, for a given individual, there were significantly more *Borrelia* sequences in the lung than in the spleen or the liver, indicating the higher sensitivity of lung tissues.

These results—although based on a small number of samples, sometimes with only a few *Borrelia* sequences per sample—should be considered with caution. However, they do suggest that out of the three tested organs, the lung would be the best candidate for *Borrelia* detection and should therefore be used in future studies until another organ generates better results. We also hypothesize that additional infected samples would have been detected if lung tissues had been used as starting material for the entire sample set.

The high *Borrelia* concentration found in lung tissue may have been due to the migration of bacteria from other neighboring tissues rather than to contamination from the respiratory tract, as such an infection

Table 3

Borrelia sp. detection using PCR targeting two markers for *B. burgdorferi*, and rarefied number of *Borrelia* reads within livers (up to 3 replicates), spleens and lungs using NGS. (*) = number of reads before the rarefaction step but silenced after it. (/) = not tested.

Sample	Classic PCR	Liver1	Liver2	Liver3	Spleen	Lung
1630	Positive	12	0	0	0	952
1667		44	10	0	0	971
1710		0	1	0	0	98
1793		227	49	/	0	403
1954		0	/	/	0	581
1970		165	186	/	25	45
1555	Negative	3	0	/	0	19
1595		37	0	/	72	8
1717		21	0	/	11	80
1719		5	0	/	0	2
1783		28	4	/	1	0
1792		22	19	/	6	477
1615		1	/	/	/	/
1835		1	/	/	/	/
1951		1	/	/	/	/
1957		2	/	/	/	/
1971		1	/	/	/	/
2009		2	/	/	/	/
1455		6*	/	/	/	/
1631		2*	/	/	/	/

process has yet to be documented (Ostfeld, 2011). However, it is not clear why *Borrelia* strains appear to have a physiological affinity for lung tissue.

Moreover, out of the 20 *Borrelia*-infected mice, one had been captured on the northern side of the St. Lawrence River, which represents the first detection of *Borrelia* in a small mammal host in this area. *Borrelia burgdorferi* was detected in this area in questing ticks (Simon et al., 2014), but these pests were likely from an adventitious population brought into southern Quebec by migratory birds and that it did not acquire the pathogen locally (Leo et al., 2016). By contrast, because of its more limited dispersal ability, the detection of one infected *P. leucopus* individual on the northern side of the St. Lawrence River supports model predictions of the potential northern spread of Lyme disease in Canada, while also indicating that *B. burgdorferi* transmission cycles are becoming endemic in areas previously free of the pathogen (Simon et al., 2014).

Microbiome composition is determined by three factors: microbial immigration, microbial elimination, and the relative reproduction rates of its members (Dickson and Huffnagle, 2015). Microbial immigration may be the result of the direct input of bacteria from the outer environment, through feeding (Lynch et al., 2009), breathing (Gibson et al., 2003), or from insect vector bites (Radolf et al., 2012). It also may be the result of internal migration by active or passive processes between organs (Balzan et al., 2007). Lastly, some bacteria are known to be vertically transmitted (Ley et al., 2005).

In the gut and lungs, i.e. the two most studied organs with regard to their microbiomes in mammals, a large proportion of microbial immigration occurs during the feeding and breathing processes. In comparison, the liver has no direct opening or contact with the outer environment. Its microbiome is thus probably less influenced by the outer environment and would instead be the result of internal bacterial translocation and vertical transmission. Hence, and due to the fact that microbial elimination is a task managed by the host immune system, which is highly dependent on the host genetic makeup, we expected to find a greater effect of the host phylogeny on the liver than on the gut microbiome composition. Two previous studies (Fiset et al., 2015; André et al. submitted) based on several mitochondrial DNA markers as well as on the major histocompatibility complex DRB marker, highlighted the presence of two genetically distinct clusters of *P. leucopus* in southern Quebec, separated by the St. Lawrence River. These two genetic clusters have evolved separately for at least 2 Ma (Fiset et al., 2015) and populations from the two clusters are located only few kilometers apart under similar environmental conditions. Contrary to our expectations, we did not detect any major differences in the liver microbiome composition between these populations. Out of the four differentiation measures we used, only one revealed a significant, yet rather low, difference. This apparent lack of an effect of the host genetic structure and evolutionary history on the liver microbiome is consistent with the findings of a study of wild European *M. musculus* populations, in which genetic differentiation explained only 6% of the total variation with regard to the caecal mucosa-associated bacterial community, while no significant influence was observed on the caecal content community (Linnenbrink et al., 2013). Similar results were obtained at a slightly larger scale by Baxter et al. (2015) who reported that intra- and inter-individual variations masked interspecific variation in the gut microbiota of sympatric *Peromyscus* populations. Studies that have detected a marked effect of the host phylogeny were conducted on a much broader scale, comparing gut microbiota across orders (Phillips et al., 2012) and families (hominids) (Ochman et al., 2010). Yet, even at these broad scales, different species sharing a common environment have been found to have convergent gut microbiota (Moeller et al., 2013). Among our *P. leucopus* populations, the lack of effect of genetic structure on their liver microbiome composition is in line with this conclusion, and may be the result of indirect environmental immigration into the liver. The two *P. leucopus* clusters in our study were geographically very close and inhabited a similar environment. Bacterial

strains from the environment might have entered the body of these mice via the digestive or respiratory tract to then migrate to the liver by active or passive translocation pathways. In summary, differentiation between the two *P. leucopus* genetic clusters did not have any significant effect on the liver microbiome and horizontal transmission from the environment may therefore be a stronger factor in shaping liver bacteria communities.

5. Conclusion

In this study, we characterized the liver microbiome from *Peromyscus leucopus* individuals, dominated by the *Lactobacillus* genus. Our NGS method combined with the use of multiple organs appeared to be more effective for the detection of *B. burgdorferi*. We highlighted, for the first time, the presence of the bacteria in a small mammal host from the northern side of the St. Lawrence River, confirming model findings predicting the northern spread of Lyme disease in Canada. We also detected *Bartonella* strains at a high prevalence and identified them as being members of the *B. vinsonii arupensis* subspecies. Finally, we found almost no effect of the host genotype on the liver microbiome between the two genetic clusters of mice separated by at least 2 Ma.

Data accessibility

All fastq files were deposited at EMBL European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession number ERP018195.

Acknowledgements

We thank S. Leo, S. Turney, field assistants and land owners. We also thank R. Lindsay (PHAC) for initial *Borrelia* screening. Computational resources were provided by the CIBG HPC computational platform, and by the Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI) funded by the Fonds de la Recherche Scientifique de Belgique (F.R.S.-FNRS) under Grant No. 2.5020.11. The following reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH as part of the Human Microbiome Project: Genomic DNA from Microbial Mock Community B (Staggered, Low Concentration), v5.2L, for 16S rRNA Gene Sequencing, HM-783D. This work was supported by Belgian FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) fellowship to AA and to JRM and by financial grants from the Belgian FRS-FNRS (“credits pour brefs séjours à l'étranger”) to AA and JRM, and from the “Patrimoine de l'université de Liège” to AA. VM is supported by a NSERC Discovery Grant (RGPIN/341918-2012).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.011>.

References

- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., Engstrand, L., 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS one* 3 (7) e2836.
- Aroucheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J.A., Gurguis, A., Faro, S., 2001. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185, 375–379.
- Bai, Y., Calisher, C.H., Kosoy, M.Y., Root, J.J., Doty, J.B., 2011. Persistent infection or successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1728–1731.
- Bai, Y., Kosoy, M.Y., Diaz, M.H., Winchell, J., Baggett, H., Maloney, S.A., Boonmar, S., Bhengsi, S., Sawatwong, P., Peruski, L.F., 2012. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* Humans, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 989–991.
- Balzan, S., De Almeida Quadros, C., De Cleva, R., Zilberstein, B., Ceconello, I., 2007. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 464–471.
- Baxter, N.T., Wan, J.J., Schubert, A.M., Jenior, M.L., Myers, P., Schloss, P.D., 2015. Intra- and interindividual variations mask interspecies variation in the microbiota of sympatric *peromyscus* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 396–404.
- Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L., 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 428–438.
- Can, I., Javan, G.T., Pozhitkov, A.E., Noble, P.A., 2014. Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *J. Microbiol. Methods* 106, 1–7.
- Casswall, T.H., Nemeth, A., Nilsson, L., Wadstrom, T., Nilsson, H.O., 2010. *Helicobacter* species DNA in liver and gastric tissues in children and adolescents with chronic liver disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 45, 160–167.
- Dickson, R.P., Huffnagle, G.B., 2015. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathog.* 11, e1004923.
- Dykhuizen, D.E., Brisson, D., Sandigursky, S., Wormser, G.P., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Schwartz, I., 2008. The propensity of different *Borrelia burgdorferi* sensu stricto genotypes to cause disseminated infections in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78 (5), 806–810.
- Ebady, R., Niddam, A.F., Boczula, A.E., Kim, Y.R., Gupta, N., Tang, T.T., Moriarty, T.J., 2016. Biomechanics of *Borrelia burgdorferi* vascular interactions. *Cell Reports* 16 (10), 2593–2604.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200.
- Edouard, S., Nabet, C., Lepidi, H., Fournier, P.E., Raoult, D., 2015. *Bartonella*, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. *J. Clin. Microbiol.* 53, 824–829.
- Fenollar, F., Sire, S., Raoult, D., 2005. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. *J. Clin. Microbiol.* 43, 945–947.
- Fiset, J., Tessier, N., Millien, V., Lapointe, F.J., 2015. Phylogeographic structure of the white-footed mouse and the deer mouse, two Lyme disease reservoir hosts in Quebec. *PLoS One* 10, e0144112.
- Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., Dehne-Garcia, A., Loiseau, A., Tatar, C., Tamisier, L., Vayssier-Taussat, M., Vignes, H., Cosson, J.-F., Birk, H., 2016. 16S rRNA Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife. *mSystems* 1 (e00032-00016).
- Gaulin, C., Leblanc, M.A., Mercier, M., Valiquette, L., Bédard, D., Markowski, F., Lambert, L., Petit, G., Poirier, B., Picard, I., 2016. Flash vigie. Bulletin québécois de vigie, de surveillance et d'intervention en protection de la santé publique 11.
- Gibson, R.L., Burns, J.L., Ramsey, B.W., 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 918–951.
- Goodrich, Julia K., Waters, Jillian L., Poole, Angela C., Sutter, Jessica L., Koren, O., Blekhan, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, Jordana T., Spector, Timothy D., Clark, Andrew G., Ley, Ruth E., 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799.
- Gulia-Nuss, M., Nuss, A.B., Meyer, J.M., Sonenshine, D.E., Roe, R.M., Waterhouse, R.M., Sattelle, D.B., de la Fuente, J., Ribeiro, J.M., Megy, K., Thimmapuram, J., Miller, J.R., Walenz, B.P., Koren, S., Hostetler, J.B., Thiagarajan, M., Joardar, V.S., Hannick, L.L., Bidwell, S., Hammond, M.P., Young, S., Zeng, Q., Abrudan, J.L., Almeida, F.C., Ayllón, N., Bhide, K., Bissinger, B.W., Bonzon-Kulichenko, E., Buckingham, S.D., Caffrey, D.R., Caimano, M.J., Crosset, V., Driscoll, T., Gilbert, D., Gillespie, J.J., Giraldo-Calderón, G.I., Grabowski, J.M., Jiang, D., Khalil, S.M.S., Kim, D., Kocan, K.M., Koçi, J., Kuhn, R.J., Kurtti, T.J., Lees, K., Lang, E.G., Kennedy, R.C., Kwon, H., Perera, R., Qi, Y., Radolf, J.D., Sakamoto, J.M., Sánchez-Gracia, A., Severo, M.S., Silverman, N., Šimo, L., Tojo, M., Tornador, C., Van Zee, J.P., Vázquez, J., Vieira, F.G., Villar, M., Wespiser, A.R., Yang, Y., Zhu, J., Arensburg, P., Pietrantoni, P.V., Barker, S.C., Shao, R., Zdobnov, E.M., Hauser, F., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Park, Y., Rozas, J., Benton, R., Pedra, J.H.F., Nelson, D.R., Unger, M.F., Tubio, J.M.C., Tu, Z., Robertson, H.M., Shumway, M., Sutton, G., Wortman, J.R., Lawson, D., Wikel, S.K., Nene, V.M., Fraser, C.M., Collins, F.H., Birren, B., Nelson, K.E., Caler, E., Hill, C.A., 2016. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat. Commun.* 7, 10507.
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21, 494–504.
- Hofmeister, E.K., Kolbert, C.P., Abdulkarim, A.S., Magera, J.M., Hopkins, M.K., Uhl, J.R., Ambyaye, A., Telford 3rd, S.R., Cockerill 3rd, F.R., Persing, D.H., 1998. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. *J. Infect. Dis.* 177, 409–416.
- Johnson, P.T.J., De Roode, J.C., Fenton, A., 2015. Why infectious disease research needs community ecology. *Science* 349.
- Karesh, W.B.D., Andy, Lloyd-Smith, James O., Lubroth, Juan, Dixon, Matthew A., Bennett, Malcolm, Aldrich, Stephen, Harrington Pierre, T.F., Loh, Elizabeth H., Machalaba, Catherine C., Thomas, Mathew Jason, Heymann, David L., 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Publ. Health Resour. Pap.* 296.
- Lackey, J.A., Huckaby, D.G., Ormiston, B.G., 1985. *Peromyscus leucopus*. *Mamm. Species Am. Soc. Mammalogists* 247, 1–10.
- Ledevine, R., Millien, V., 2013. Congruent morphological and genetic differentiation as a signature of range expansion in a fragmented landscape. *Ecol. Evol.* 3, 4172–4182.
- Leo, S.T., Gonzalez, A., Millien, V., 2016. Genetic signature of range expansion in a disease vector. *J. Hered.* <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esw073>.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11070–11075.
- Linnenbrink, M., Wang, J., Hardouin, E.A., Kunzel, S., Metzler, D., Baines, J.F., 2013. The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. *Mol. Ecol.* 22, 1904–1916.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., et al., 2013. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 380, 2095.

- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235.
- Lynch, M.F., Tauxe, R.V., Hedberg, C.W., 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137, 307–315.
- Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1171–1176.
- Mather, T.N., Wilson, M.L., Moore, S.J., Ribeiro, J.M.C., Spielman, A., 1989. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am. J. Epidemiol.* 130, 143–150.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8 (4).
- Melzi, M.L., Ferrari, G.M., D'Adda, A., Bovo, G., Foresti, S., Cavallero, A., Biondi, A., 2015. Hepatic granulomatous lesions caused by systemic *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* infection in a child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34 (12), 1416–1417.
- Minard, G., Tran, F.H., Van, V.T., Goubert, C., Bellet, C., Lambert, G., Kim, K.L., Thuy, T.H., Mavingui, P., Valiente Moro, C., 2015. French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Front. Microbiol.* 6, 970.
- Moeller, A.H., Peeters, M., Ndjango, J.B., Li, Y., Hahn, B.H., Ochman, H., 2013. Sympatric chimpanzees and gorillas harbor convergent gut microbial communities. *Genome Res.* 23, 1715–1720.
- Nardis, C., Mosca, L., Mastromarino, P., 2013. Vaginal Microbiota and Viral Sexually Transmitted Diseases.
- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B., Peeters, M., 2010. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol.* 8 (11).
- Ogden, N.H., Margos, G., Aanensen, D.M., Drebot, M.A., Feil, E.J., Hanincova, K., ... Lindsay, L.R., 2011. Investigation of genotypes of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks collected during surveillance in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (10), 3244–3254.
- Oksanen, J.B., Guillaume, Kindt, Roeland, Legendre, Pierre, Minchin, Peter, O'Hara, R.B., Gavin, Simpson, L., Solymos, Peter, Henry, M., Stevens, H., Wagner, Helene, 2013. vegan: Community Ecology Package (R package version 2.0-9).
- Ostfeld, R.S., 2011. Lyme Disease: The Ecology of a Complex System. Oxford University Press, p. 216.
- Ostfeld, R.S., Levi, T., Jolles, A.E., Martin, L.B., Hosseini, P.R., Keesing, F., 2014. Life history and demographic drivers of reservoir competence for three tick-borne zoonotic pathogens. *PLoS One* 9, e107387.
- Phillips, C.D., Phelan, G., Dowd, S.E., McDonough, M.M., Ferguson, A.W., Delton Hanson, J., Siles, L., Ordonez-Garza, N., San Francisco, M., Baker, R.J., 2012. Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history, physiology and geography. *Mol. Ecol.* 21, 2617–2627.
- Radolf, J.D., Caimano, M.J., Stevenson, B., Hu, L.T., 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease *Spirochaetes*. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 87–99.
- Rajaram, S., Oono, Y., 2010. NeatMap-non-clustering heat map alternatives in R. *BMC bioinformatics* 11 (1), 45.
- Rogic, A., Tessier, N., Legendre, P., Lapointe, F.J., Millien, V., 2013. Genetic structure of the white-footed mouse in the context of the emergence of Lyme disease in southern Quebec. *Ecol. Evol.* 3, 2075–2088.
- Roy-Dufresne, E., Logan, T., Simon, J.A., Chmura, G.L., Millien, V., 2013. Poleward expansion of the white-footed mouse *Peromyscus leucopus* under climate change: implications for the spread of Lyme disease. *PLoS One* 8, e80724.
- Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N.J., Walker, A.W., 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 12, 1–12.
- Sanders, J.G., Beichman, A.C., Roman, J., Scott, J.J., Emerson, D., McCarthy, J.J., Girguis, P.R., 2015. Baleen whales host a unique gut microbiome with similarities to both carnivores and herbivores. *Nat. Commun.* 6, 8285.
- Simon, J.A., Marrotte, R.R., Desrosiers, N., Fiset, J., Gaitan, J., Gonzalez, A., Koffi, J.K., Lapointe, F.-J., Leighton, P.A., Lindsay, L.R., Logan, T., Milord, F., Ogden, N.H., Rogic, A., Roy-Dufresne, E., Suter, D., Tessier, N., Millien, V., 2014. Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evol. Appl.* 7, 750–764.
- R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org>.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1.
- Walter, J., 2008. Ecological role of *Lactobacilli* in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4985–4996.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- Weinstock, G.M., 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 489, 250–256.
- Welch, D.F., C., K., Hofmeister, E.K., Persing, D.H., Robison, D.A., Steigerwalt, A.G., 1999. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2598–2601.
- Yun, Y., Srinivas, G., Kuenzel, S., Linnenbrink, M., Alnahas, S., Bruce, K.D., Steinhoff, U., Baines, J.F., Schaible, U.E., 2014. Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PLoS One* 9, e113466.

Chapitre 5 : Niveau de stress

5.1) Avant-propos et résumé de l'article 4

Ce cinquième chapitre se focalise sur les niveaux de stress subis par les souris à pattes blanches. Deux objectifs majeurs ont été poursuivis et constituent le sujet principal de l'article quatre.

Le niveau de stress à long terme (NSLT) est souvent utilisé dans la littérature pour évaluer le niveau de bien-être ou de santé des animaux sauvages et dépend d'une multitude de facteurs. Un NSLT élevé peut être dû notamment à des conditions climatiques difficiles (Barton 2002, Weingrill et al. 2004), des carences alimentaires (Chapman et al. 2006), une pression élevée des parasites (Brown and Fuller 2006) ou des prédateurs (Boonstra et al. 1998, Creel et al. 2009), etc...

Le premier objectif de ce chapitre a consisté à comparer les méthodes d'évaluation de stress à long terme, en vérifiant la cohérence des valeurs obtenues. Quatre mesures de NSLT ont été utilisées. La première est relative à la concentration de corticostérone dans les poils, la seconde se base sur le poids des glandes surrénales, tandis que les deux dernières reposent sur la quantification de l'asymétrie fluctuante. Nos résultats ont montré qu'aucune corrélation statistiquement significative n'a pu être mise en évidence, ce qui est assez surprenant puisque ces méthodes sont toutes les quatre supposées mesurer des niveaux de stress à long terme. Cette absence de cohérence dans les résultats peut néanmoins se comprendre si l'on se focalise sur ce que mesurent effectivement les différentes méthodes d'évaluation du stress à long terme. La méthode de quantification de la corticostérone renvoie un niveau de stress moyen apparu tout au long de la période de pousse du poil, qui oscille autour de quelques semaines avant la capture de l'animal. Le poids des glandes surrénales est lui aussi censé correspondre au niveau de stress subi par dans les récentes semaines. L'asymétrie fluctuante constitue quant à elle une méthode rendant compte du niveau de stress subi pendant la période prénatale ainsi que dans les premières semaines de développement de l'individu. Le manque de cohérence entre les résultats obtenus pourrait donc être dû au fait que ces méthodes mesurent des niveaux de stress correspondant à des périodes différentes. L'incongruence des résultats entre les deux méthodes basées sur l'asymétrie fluctuante est encore plus surprenante mais confirme l'hypothèse selon laquelle l'asymétrie fluctuante est une méthode dont les résultats sont dépendants du trait morphologique étudié puisque les crânes et mâchoires de mêmes individus n'ont pas donné de résultats cohérents. Notre étude appelle donc à la vigilance lorsqu'il s'agit de choisir une méthode d'évaluation du stress et souligne la nécessité d'utiliser des méthodes ayant subi un processus de validation préalable.

Le second objectif de ce chapitre visait à déterminer s'il existait une différence significative dans les NSLT des souris à pattes blanches québécoises selon le degré de périphérie des populations auxquelles elles appartiennent. En effet, un NSLT plus élevé dans certaines populations pourrait constituer un signal attestant de la rudesse de l'environnement ou de la difficulté d'acclimatation des animaux y résidant. Parmi les 4 mesures utilisées, seule une relation positive entre le poids des glandes surrénales et la latitude s'est avérée significative. Les trois autres mesures ont mis en évidence des NSLT homogènes entre les différentes populations étudiées. Cette homogénéité quasi généralisée des résultats laisse à penser que les conditions dans lesquelles évoluent les populations périphériques ne seraient pas plus rudes comparativement à celles auxquelles sont soumises les populations plus centrales. Ceci n'est guère surprenant si l'on se remémore les résultats relatifs aux parasites ainsi qu'à la diversité génétique, qui étaient eux aussi homogènes sur toute la zone d'étude. Cette homogénéité dans les résultats observés pourrait donc n'être due qu'à la faible étendue du gradient géographique étudié. Une façon alternative d'interpréter cette homogénéité dans les NSLT obtenus, consisterait à l'expliquer par la grande faculté d'adaptation de la souris à pattes blanches. En effet, le caractère très généraliste de l'espèce aurait pu permettre aux souris à pattes blanches de s'acclimater à des conditions environnementales plus rudes, en modifiant leur régime alimentaire ou leur comportement afin de maximiser leur survie à ces hautes latitudes.

5.2) Article 4

Long-term stress level in a small mammal species undergoing range expansion

A. André^{1,2}, J. Gaitan², J.R. Michaux^{1,3}, V. Millien²

¹ Conservation Genetics laboratory, University of Liège, Boulevard du Rectorat 26, 4000 Liège, Belgium

² Redpath Museum, McGill University, 859 Sherbrooke West, Montreal (QC) H3A 0C4, Canada

³ CIRAD, UR AGIRs, F-34398 Montpellier, France

Key-words: Fluctuating asymmetry; stress ; *Peromyscus leucopus* ; Canada ; corticosterone ; glucocorticoids

Corresponding author: Adrien André

Abstract

Climate change is currently altering species distribution ranges. In the cases of disease reservoir species, the impacts of these range shifts may promote the emergence of diseases in naïve regions. Evaluating the long-term stress level in wild species undergoing range expansion may help better understanding how species cope with the changing environment. Here, we focused on the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*), a small mammal species considered as the main reservoir for Lyme disease in North-America and whose distribution range is rapidly shifting northward. We evaluated long-term stress level in several populations of *P. leucopus* in Quebec (Canada), from the edge of the species distribution to more core populations. First, we tested the hypothesis that populations at the range margin would be under higher stress than more established populations in the southern region of our study area. We also compared four long-term stress measures to evaluate the congruence between these commonly used methods. We did not detect any significant geographical trend in stress level across our study populations of *P. leucopus*. More importantly, we found no clear congruence among the four measures of stress we used, thus pointing to the possibility that these four commonly used methods are not equivalent.

INTRODUCTION

Climate warming is currently occurring at an unprecedented rate (Rahmstorf *et al.* 2007), and human activities are considered the strongest drivers of climate change (Ellis *et al.* 2013). Over the last decades, global average temperature has drastically increased (Hansen *et al.* 2010; Ji *et al.* 2014), and the ten warmest years in the 134-year record all have occurred since year 2000, with the exception of 1998 (NASA Goddard Institute for Space Studies). Furthermore, the year 2016 ranked as the warmest on record (GISTEMP-Team 2017). Species are responding to these rapid changes in the environment, many of them by altering their distribution range (Root *et al.* 2003; Parmesan 2006). Species differ in their ability to cope with environmental changes (Hill *et al.* 2002), and there is ample evidence for local extinction (Pounds *et al.* 2006), range contraction (Flousek *et al.* 2015), expansion (Thomas & Lennon 1999) or range shift (Perry *et al.* 2005).

Distribution range shifts or range expansion constitute a major concern for public health as the invasion of disease vector or reservoir species can promote the emergence of diseases in naïve regions (Patz *et al.* 2005). The emergence of Lyme borreliosis in Canada is an example of the effects of the poleward expansion of both the vector and main reservoir host species on the pattern and rate of an infectious disease spread (Simon *et al.* 2014). Lyme disease in North-America is characterized by an infectious cycle involving one main vector (the black-legged tick, *Ixodes scapularis*) and a main reservoir host (the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*) (Radolf *et al.* 2012). Each year, about 30,000 human cases are diagnosed in the United States, with most of them discovered in the North-Eastern states (<http://www.cdc.gov/lyme/stats/>). A recent report from the Center for Disease Control even suggested that this number could be significantly lower than the number of new effective cases per year, which would exceed 300,000 (Nelson *et al.* 2015). Further North, *P. leucopus* is increasing its northern range limit into southern Quebec at a rate of 10km/year (Roy-Dufresne *et al.* 2013), while *I. scapularis* is predicted to expand its range poleward at an even larger rate (Leighton *et al.* 2012). The expansion of these two species northward across south-eastern Canada is driving the rapid emergence of Lyme disease in these regions. The number of human cases in Quebec is much lower than in endemic regions of the United States, but is rapidly growing over the years, from the first endemic case in 2008 to over 160 in 2015 (www.inspq.qc.ca/zoonoses/maladie-de-lyme). It is thus critical to better understand the pattern of range expansion of *P. leucopus*, as the rate at which it is increasing in abundance and getting established in a region is determinant for Lyme disease prevalence in that region.

Stress level of an individual can vary greatly in response to habitat disturbance or environmental change, and is related to the distribution of a species through its effect on local

abundance, home range area or dispersal rate (Gaitan & Millien 2016). Elevated stress level can lead to the reallocation of an individual's resources toward an activity that will enhance its short-term survival, such as foraging for feeding or escaping from predators, at the expense of allocating resources to territorial defense, reproduction or immunity (Sapolsky *et al.* 2000). This shift may decrease the fitness of the individual and its long-term survival (Charbonnel *et al.* 2008). For these reasons, stress levels are commonly monitored in ecological or conservation studies. Two theories aim at explaining the variation in health status along a gradient from the center to the edge of a species distribution. First, the central-marginal theory states that species are increasingly maladapted to an environment that deteriorates from optimal conditions at the center of their distribution to the edges of their range (Brown 1984; Brown *et al.* 1995; Eckert *et al.* 2008; Sexton *et al.* 2009). Suboptimal biotic or abiotic conditions may lead to lower abundance or poorer condition of individuals at the edge of the species range (Brown *et al.* 1995; Sagarin & Gaines 2002). This is most notable in temperate species for which individuals occurring at higher latitude are under harsher climatic and habitat conditions, such as colder or longer winter or decrease in food resources. Accordingly, populations at the edge of a species distribution should present larger stress level compared with more central populations (Kark 2001; Cornelissen & Stiling 2010). Another theory, the enemy-released hypothesis, states that as a species is expanding from its historical range, it may not be necessarily followed by its pathogens, resulting in individuals in better health in marginal populations compared to core populations (Keane 2002; Torchin *et al.* 2002). Accordingly, marginal populations should present lower stress level than more central ones. While under the central-margin hypothesis, the rate of range expansion is expected to be limited by environmental conditions, a lower burden of parasites and pathogens in marginal populations may increase the ability of individuals at the most northern limit of the range of a species to disperse, and thus increase the rate of range expansion in this species. The two drivers may very well act simultaneously upon marginal populations, and determining the relative strength of each in *P. leucopus* individuals in southern Quebec will help better understanding the pattern and rate of range expansion in this species, and therefore, of Lyme disease emergence in the region.

There are different methods for estimating stress level, most of them relying on the measurement of physiological (Sheriff *et al.* 2011) or morphological (Leary & Allendorf 1989) traits. The most commonly used methods allow the measurement of short-term stress level by evaluating changes in the activity of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical system through the measurement of glucocorticoid or metabolite concentrations in plasma, saliva, urine, or faeces (Sheriff *et al.* 2011). In ecological and conservation studies focusing on wildlife, the estimation of long-term stress level is generally preferred as the capture and handling of the studied individual have no significant effect on long term stress level while it may affect short-term stress level (Ashley *et al.*

2011). An estimate of long-term stress level can be derived from the quantification of the main glucocorticoid hormone in rodents, the corticosterone, extracted from the hair matrix. This measure returns averaged stress levels underwent during the entire hair growing period (Meyer & Novak 2012). The adrenal gland mass is also reflecting long-term stress level, as chronic stress may induce hyperplasia in the adrenal glands (Ulrich-Lai *et al.* 2006). Finally, the level of fluctuating asymmetry in a bilateral skeletal structure have also been used to estimate the level of stress in an individual. Individuals living in a stressful environment may develop an asymmetry between the left and right sides of their anatomy during their development (Leary & Allendorf 1989; Parsons 1990) and this asymmetry can be quantified using morphometric methods (Klingenberg *et al.* 2002). To our knowledge, the comparison of fluctuating asymmetry levels with physiological measures of stress, such as corticosteroids or the adrenal gland mass had never been done.

The main aim of our study was therefore to use four distinct methods of estimation of long-term stress level in a widespread species, the white-footed mouse (*P. leucopus*), currently undergoing rapid range expansion into Southern Quebec. We tested the hypothesis that stress level in this species is increasing towards the northern range limit of its range (the central-margin hypothesis). We also evaluated the congruence among the three distinct methods we used to estimate stress level in *P. leucopus* (hair corticosterone level, adrenal gland mass and fluctuating asymmetry in skeletal structures), as a mean of evaluating their effectiveness and reliability as a measure of stress.

MATERIAL AND METHODS

Field sampling

We sampled twelve white-footed mouse populations between June and August in 2011, 2012 and 2013 across Southern Quebec, between 45.04°N and 46.30°N latitude (fig. 1). Populations ER10, south of the St Lawrence river, and N3, north of the St Lawrence, were considered to be at the species range margin as no *P. leucopus* individual was captured further north during our field surveys. At each trapping site, 160 Sherman traps were placed every 10 meters in grids of 40 traps. The traps were baited with a mixture of oat and peanut butter in the late afternoon and checked the following morning for three consecutive nights. *Peromyscus* individuals were identified to the species level using species-specific primers as described by Rogic *et al.* (2013). All procedures were approved by the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (SEG Permit #2011-05-15-014-00-S-F SEG, #2012-07-16-1417-16-17-SF and #2013-07-04-14-16-17-SF), and McGill University Animal Care Committee (AUP#5420).

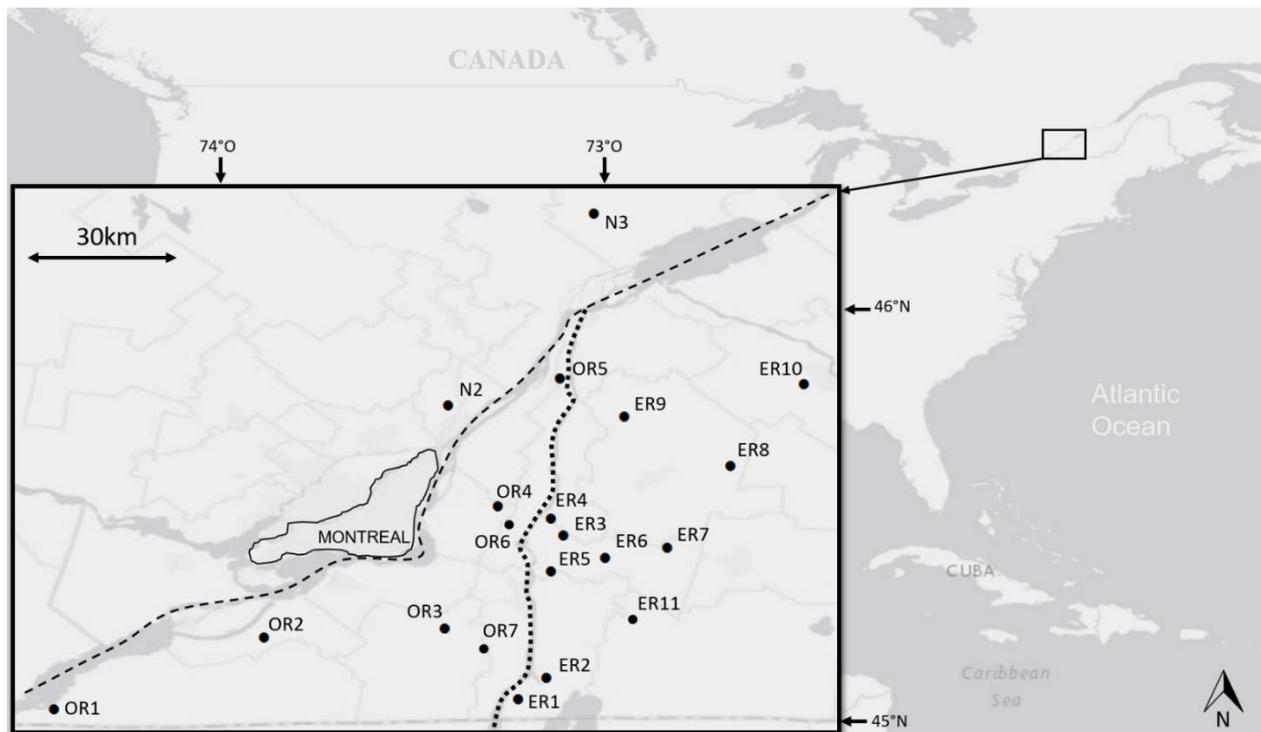


Figure 1 : Distribution of the sampling sites. (N2,N3 : northern genetic cluster ; OR1, OR2, OR3, OR4, OR5, OR6, OR7 : Southwestern genetic cluster ; ER1, ER2, ER3, ER4, ER5, ER6, ER7, ER8, ER9, ER10, ER11 : Southeastern genetic cluster). The Saint-Lawrence and Richelieu rivers are represented by the dashed and dotted lines respectively.

The populations of *P. leucopus* in Southern Quebec belong to three distinct post-glacial lineages that are today separated by water bodies (Fiset et al 2015; Andre et al 2017). The most northern lineage expanded from a central glacial refugium, and colonized the regions north of the St-Lawrence river. Two additional lineages are occurring on the southern side of the St Lawrence river, separated by the Richelieu river, and expanded from a Southeastern glacial refugium. We thus assigned each of our populations to three distinct lineages (North, South-West and South-East). These three lineages are currently expanding into Southern Quebec along a Southwestern-Northeastern direction. We then calculated the shortest Euclidean distance from each site to the most Southern site in our study area within each lineage (Northern lineage: N1; Southwestern lineage: OR1; Southeastern lineage: ER1) using the package geosphere in R (Hijmans 2016). Populations located at the highest latitude or the most distant population from these three southern locations are thus the most peripheral, close to the range edge of the distribution of *P. leucopus* in southern Quebec.

Estimation of long-term stress level

Hair corticosterone. We measured the amount of corticosterone in hair samples from a subset of individuals trapped in 2013. The measurements were taken from 81 specimens from eight distinct populations across our study area (Table 1). Hairs were collected by fur-clipping the rump of each individual as close as possible to the skin. The surface of the sample was washed, since it may have been soiled with urine or feces that also contain steroid hormones when the animal was in the trap. We used a protocol adapted from Macbeth *et al.* (2010) (protocol detailed in the supplementary material). Because no validation of the method has ever been performed for *P. leucopus*, a parallelism test between authentic corticosterone standards and serially diluted hair extract was performed to detect immunological similarities between the standard and sample hormones (Plikaytis *et al.* 1994).

Mass of the adrenal glands. We then measured the mass of the adrenal glands, which are known to be larger in stressed individuals (Ulrich-Lai *et al.* 2006). The analyses were performed on 128 specimens from twelve different populations including the 8 populations selected for the corticosterone assay. Adrenal glands were extracted from the trapped animals and conserved in ethanol. They were then dried at 90°C for 24 hours and weighed with a precision scale to the nearest 0.00001g (Gaitan & Millien 2016).

Site	Hair corticosterone	Adrenal gland mass	Skull FA score	Lower jaw FA score
ER1	10	20	36	32
ER2	8	8	13	13
ER3	0	0	29	25
ER4	0	0	25	22
ER5	0	0	18	14
ER6	8	7	28	25
ER7	0	0	20	15
ER8	0	0	14	13
ER9	0	0	7	7
ER10	11	11	30	29
ER11	0	4	7	7
N2	0	0	5	4
N3	12	19	32	31
OR1	0	4	11	11
OR2	10	12	19	19
OR3	7	15	15	13
OR4	10	9	10	10
OR5	0	0	4	4
OR6	0	5	5	5
OR7	0	5	5	5
Total	76	119	333	304

Table 1 : samples size for the 4 long-term stress level variables used in this study.

Fluctuating asymmetry in skull shape. We measured the level of fluctuating asymmetry in the shape of the skull and the lower jaw from our sampled individuals. The measurements were taken for 21 populations (including de 12 populations from the previous method), on a total of 333 and 311 individuals for the skull and the lower jaw, respectively (Table 1). Pictures of the ventral side of the skull and the labial side from the left and right lower jaws were taken using a Lumenera Infinity 1 digital camera mounted on a Leica MS5 stereomicroscope coupled with a Leica $\times 0.32$ Achromat lens. Two-dimensions landmarks were digitized using TPS Dig software (Rohlf 1999). Three unpaired and twenty-two paired landmarks were located on the ventral cranial side (fig. S1) and 8 landmarks were located on the labial side of the right lower jaws and their corresponding mirrored left lower jaws image (fig. S2). Measurement error was assessed by digitizing three times 25 and 42 samples randomly selected for skulls and lower jaws, respectively. Two separate procrustes superimpositions were then performed for skulls and lower jaws using Morpho J software (Klingenberg 2011) followed by procrustes ANOVAs to detect the effects of individual, directional asymmetry and fluctuating asymmetry in the skulls and lower jaws configurations (Klingenberg *et al.* 2002). Individual FA scores

were computed with MorphoJ software, using the procrustes distance, which corresponds to a measure of absolute shape differences and treats shape deviations from the sample mean equally, regardless of their direction (Dryden 1998). The data was checked for the presence of allometry (Palmer & Strobeck 2003), the symmetric variation due to variation in size, by regressing individual FA scores on centroid size.

	N	Mean	SE	Min	Max
HC	76	14.3	1.3	0.5	56.5
AGM	119	1.23	0.04	0.25	2.65
SFA	333	0.0070	0.0001	0.0038	0.0161
LJFA	304	0.0204	0.0005	0.0082	0.0609

Table 2 : Summary statistics for the 4 long-term stress level variables. HC : hair corticosterone; AGM : Adrenal gland mass; SFA : skull fluctuating asymmetry; LJFA : lower jaw fluctuating asymmetry; N: sample size; Mean: mean value; SE: standard error of the mean; Min: minimum; Max: maximum.

Statistical analyses

Prior to all analyses, we calculated the residuals of the adrenal gland mass against body mass as in Gaitan and Millien (2016). We also applied a square transformation to the variable cortisol level and a logarithmic transformation to both fluctuating asymmetry variables.

Sexual dimorphism and congruence among the four LSTL evaluation methods. We first tested for sexual dimorphism in the four stress variables we used to estimate long-term stress level (hair cortisol, adrenal gland mass and fluctuating asymmetry in the skull and the lower jaw) with a mean comparison t-test using the stats package in R (R Core Team 2017). To evaluate the congruence among the four distinct stress variables, we then performed multiple pairwise Pearson correlation tests adjusted with a Bonferonni correction using the package psych in R (Revelle 2017).

Geographical gradients in stress levels. We first tested for a difference in long term stress level across sites with linear models for each stress level variable and included the variables Site, Sex and Body mass as independent variables. We further tested the hypothesis that long-term stress level is increasing towards the range edge of *P. leucopus* in Southern Quebec with mixed effect models, by including in the models the variable Site as a random effect and the variables Latitude, Distance to the most southern site (within each lineage), Body mass and Sex as fixed effects. We ran distinct models for each stress variable separately and Body mass was not included as a factor in the models for the adrenal gland size, as this variable was already corrected for body-mass. Similarly, Sex was not included

in the models with fluctuating asymmetry as a response variable (skull and lower jaw), as no sexual dimorphism was detected for these two variables. We used the packages lme4 (Bates *et al.* 2015) and lmerTest (Kuznetsova *et al.* 2016) in R for all modeling.

RESULTS

Long-term stress level estimates

Hair corticosterone quantification. Intra and inter assay coefficients of variation were respectively 13.95% (n=108) and 12.48% (n=5). Results from serially diluted extracts of hair were parallel ($r^2 = 0.95$, $p < 0.001$) with results from serially diluted cortisol standards provided with the EIA kit (fig. S3). This latter result confirms the validation of the method used here. The corticosterone concentrations in hair ranged from 0.5 to 56.5 pg/mg of hair with a mean \pm SEM of 14.3 \pm 1.3 pg/mg (table 2).

Adrenal gland mass. AGM ranged from 0.00025 to 0.00265g with a mean \pm SEM of 0,001237891g \pm 4,2258E-05 (Gaitan & Millien 2016; table 2).

Fluctuating asymmetry. Procrustes ANOVA on skull and lower jaws were performed separately and results showed highly significant FA (Individual \cdot Side interaction), DA (Side effect), and difference among individuals. The measurement error for skull and lower jaws were estimated and mean squares of FA, DA, and individual variation were found to exceed the error component, indicating that the contribution of measurement error to overall shape variation was not significant. Skull Procrustes fluctuating asymmetry scores ranged from 0,00351744 to 0,01678106 with a mean \pm SEM of 0,00709536 \pm 0,000120888. Lower jaws Procrustes fluctuating asymmetry scores ranged from 0,00820775 to 0,06088595 with a mean \pm SEM of 0,02039891 \pm 0,000453688 (table 2). No significant allometric effect was detected ($p > 0.05$).

Sexual dimorphism and congruence among the three long-term stress level evaluation methods

Sexual dimorphism was apparent in two of our stress variables: males had a larger adrenal gland mass ($t = -3.71$, $p < 0.0005$), while females tended to have a higher level in cortisol level ($t = 2.94$, $p < 0.0068$). Furthermore, there was no significant correlation between the individual stress levels obtained by the distinct LTSL evaluation methods (all $p > 0.05$)(fig. 2).

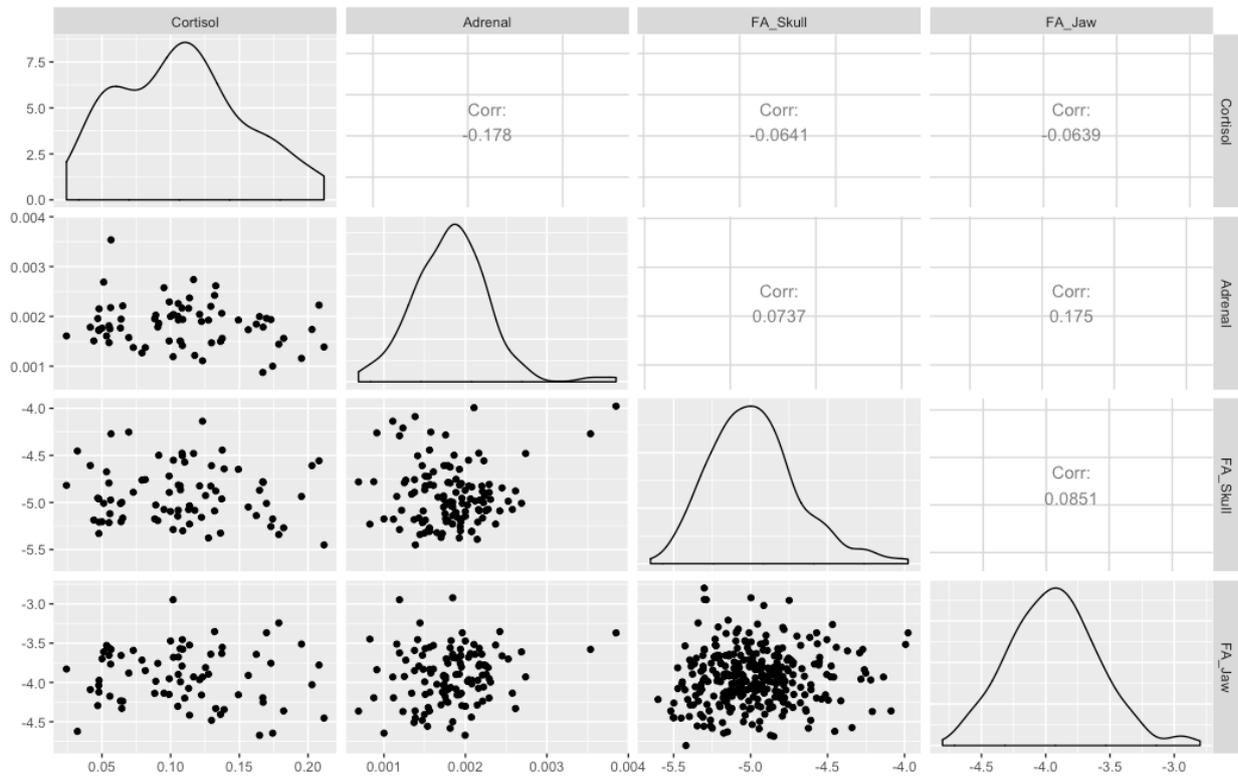


figure 2 : correlogram of the 4 long-term stress level variables.

Geographical variation in long term stress level

The *P. leucopus* populations in our study did not present any significant differences in stress level, except for the mass of the adrenal gland (Table 3). There was no significant effect of the distance to the most southern site within each lineage for any of the stress variable we used. (Table 4). Latitude did not have any significant effect either, except for one the models: individuals had a larger adrenal glands at higher latitude (fig. 3, Table 4).

		Sum Sq	Mean Sq	NumDF	F.value	Pr(>F)
HC	Site	0.01203	0.00171	7	0.9533	0.47256
	Sex	0.02250	0.02250	1	12.4854	0.00076
	Weight	0.00378	0.00378	1	2.1010	0.15201
AGM	Site	5.6330e-06	5.1209e-07	11	2.8123	0.00295
	Sex	1.7066e-06	1.7066e-06	1	9.3726	0.00279
SFA	Site	0.7585	0.039922	19	0.4585	0.9763
	Weight	0.1101	0.110106	1	1.2647	0.2616
LJFA	Site	0.393	0.19638	2	1.6188	0.1999
	Weight	0.220	0.21986	1	1.8123	0.1792

Table 3 : Analysis of Variance investigating the relative effects of Site, Sex and Weight on the 4 long-term stress variables

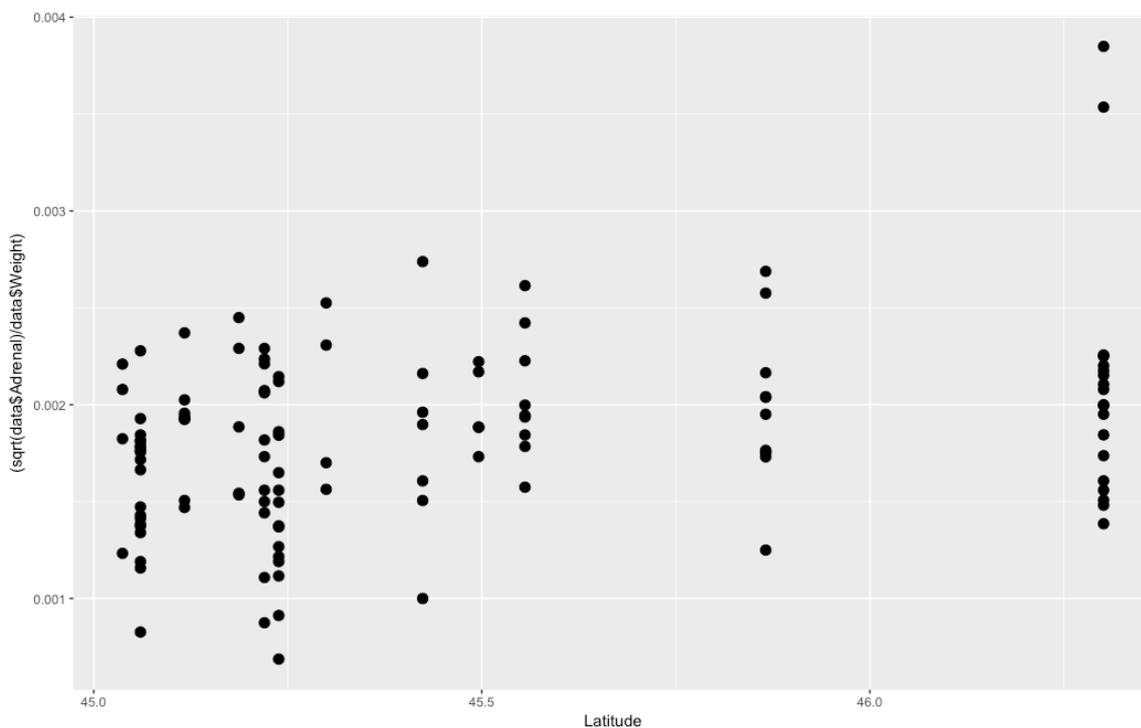


Figure 3 : Distribution of the adrenal gland mass values in relation with latitude.

		Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F.value	Pr(>F)
HC	Latitude	0.00132	0.00132	1	4.374	0.7343	0.43592
	Distance	0.00209	0.00209	1	4.091	1.1606	0.34072
	Sex	0.01504	0.01504	1	68.041	8.3471	0.00517
	Weight	0.00208	0.00208	1	69.228	1.1548	0.28628
AGM	Latitude	1.2767e-06	1.2767e-06	1	5.176	7.1308	0.04281
	Distance	2.0490e-08	2.0490e-08	1	8.115	0.1144	0.74372
	Sex	2.3785e-06	2.3785e-06	1	130.654	13.2852	0.00038
SFA	Latitude	0.04957	0.04957	1	328	0.58999	0.4430
	Distance	0.16701	0.16701	1	328	1.98756	0.1595
	Weight	0.15885	0.15885	1	328	1.89042	0.1701
LJFA	Latitude	0.13696	0.13696	1	299	1.1269	0.2893
	Distance	0.13903	0.13903	1	299	1.1439	0.2857
	Weight	0.23161	0.23161	1	299	1.9056	0.1685

Table 4 : Mixed effect models testing for the effect of lineage, latitude and distance to the most southern site (overall, and within each lineage) on the four variables we used to estimate long-term stress levels. The variable Site was included as a random effect in all models

DISCUSSION

Congruence among the four LSTL evaluation methods

The first objective of our study was to compare individual long-term stress level estimates obtained using three distinct methods. Interestingly, no correlation between these variables was detected. Furthermore, we observed opposed sexual dimorphism between the hair corticosterone and the adrenal gland mass variables. These results are much surprising, as we should expect to find a correlation between variables that are all expected to measure long-term stress levels. One might argue that these methods do not actually measure the same traits. Fluctuating asymmetry, for example is the result of skeleton's development imperfections caused by some stress during the growth of the animal (Leary & Allendorf 1989; Parsons 1990), whereas hair cortisol and adrenal gland mass are representative of the stress level endured by the animal in the few weeks preceding the capture of the animal (Ulrich-Lai *et al.* 2006 ; Mastromonaco *et al.* 2014). As a result, one individual could have lived in an environment with a certain degree of stress during its early development, and could have been captured at a period where the animal underwent a different degree of stress. Different stress levels

would have therefore been measured, depending on the method used. Such pattern would appear for example in animals born during a certain period of the year characterized by harsher conditions inducing a high degree of fluctuating asymmetry in their morphology, but who would be captured in summer, when environmental conditions are more favorable, generating lower corticosterone concentrations. Furthermore, the effectiveness of the fluctuating asymmetry method as a proxy for stress level has been questioned (Bjorksten *et al.* 2000). Studies have found that this method that gathered both positive and negative results should be considered as being species-specific, stress-specific and trait-specific (Leung 1996). The literature abounds with papers (Brakefield *et al.* 1997 ; Campbell *et al.* 1998 ; Roy *et al.* 1999 ; Woods *et al.* 1999) in which FA correlates with stress for a particular trait but not for others, even if these traits are functionally linked. It is also important to keep in mind that FA measures were originally meant to quantify stress at the population level rather than at the individual level (Knierim *et al.* 2007), which might explain the observed discrepancies between the methods. In contrast, stress evaluation methods based on glucocorticoid quantification may be more reliable, as they have been through more validation studies under controlled conditions (Dickerson & Kemeny 2004; Romero 2004; Charmandari *et al.* 2005; Cook 2012). Unfortunately, these validations haven't been applied yet to hair corticosterone, which is still a recent technique. Validation studies should also be conducted for the method based on the adrenal gland mass as it might constitute a promising and affordable method. Our results thus confirm the need for caution when evaluating long-term stress level in wildlife, and point to the necessity to select the right proxy and traits, depending on the hypothesis tested.

Spatial heterogeneity in the long term stress levels

The central marginal hypothesis states that individuals are expected to be increasingly maladapted to an environment that varies from the center to the edges of their range (Brown 1984; Brown *et al.* 1995; Eckert *et al.* 2008; Sexton *et al.* 2009). Using three distinct methods for stress evaluation, we could validate the central marginal hypothesis, for one of the variables we used to estimate stress level: the relative mass of the adrenal gland increased with latitude across our study area. For the other two methods we used to evaluate stress level (hair corticosterone and fluctuating asymmetry in the skull and lower jaw), we did not detect any significant relation between the latitude and the long term stress level. We did not detect any significant effect of the distance to the most southern site within each lineage on any of our stress level variable.

We attribute this relative homogeneity in the stress levels to lack of power and relatively low sample sizes for each of our lineages (e.g. only two sites in the northern lineage). Furthermore, our study area covers a south-west / north-east gradient of approximately 200 km, which might not be enough to

capture subtle variation in stress level. The white-footed mouse occurs across much of Northeastern USA, down from Mexico up to Southern Canada. One might argue that all individuals occurring across Southern Quebec where the populations are still rapidly expanding, are all under relatively large stress, when compared to individuals south of the American border, closer to the core of the distribution range of the species. Increasing the breadth of our sampling area would allow to test this hypothesis. Previous studies covering a much larger area than our study area can be found in the literature. Liebl & Martin (2012, 2013) studied the invasion of an introduced songbird on an 885 km gradient and detected a higher corticosterone level in peripheral populations. Similarly, Kark (2001) and Cornelissen & Stiling (2010), who worked respectively on *Alectoris chukar* on a 322 km gradient and on two *Quercus* species on a 850 km gradient, found more asymmetric specimens for the external populations as compared to central ones. Yet, Siikamäki & Lammi (1998) found more asymmetric plant specimens of *Lychnis viscaria* in marginal populations, on a studied range as short as 150 km.

The absence of elevated stress level as estimated by hair cortisol or fluctuating asymmetry could also be driven by the adaptive potential of the white-footed mouse for these specific phenotypic traits, where recently established populations would already be well adapted to their novel environment. Given its generalist behavior (Lackey 1985), and current rapid rate of expansion into southern Quebec (Roy-Dufresne et al 2013), it is reasonable to expect the white-footed mouse to possess a large adaptive potential. This last hypothesis is in line with the results of niche models that are predicting the future expansion of the white-footed mouse into Quebec under climate warming (Roy-Dufresne et al 2013, Simon et al 2014). This is especially concerning for Public Health in the region, as the white-footed mouse is the main reservoir species for the pathogen causing Lyme disease, *B. burgdorferi*. The geographical range shift and expansion in Southern Quebec of *P. leucopus*, a reservoir species which is reputedly asymptomatic when carrying *B. burgdorferi* (Schwanz et al. 2011) and very competent for this pathogen transmission (Donahue et al. 1987), combined with an apparent lack of additional stress in expanding populations all are critical triggers likely favouring the rapid emergence of Lyme disease in the region.

Acknowledgements

We thank S. Turney, S. Leo, field and lab assistants and land owners. This work was supported by Belgian FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) fellowship to AA and to JRM and by financial grants from the Belgian FRS-FNRS (“credits pour brefs séjours à l’étranger”) to AA and JRM, and from the “Patrimoine de l’université de Liège” to AA. VM is supported by a NSERC DG grant (RGPIN/341918-2012).

Supplementary material :

Hair corticosterone quantification protocol : Five consecutive 3 minutes washes were performed using 0.04ml of fresh methanol/mg of hair on a slow rotator. Washed hair samples were then dried on a bench top for 3 days. Hair samples were subsequently weighed three times using a precision scale (scale name reference) and the mean of the three measures was recorded. Finally, hair samples were ground to a fine powder using a 5mm stainless steel ball in a tissue Lyser2 machine from Qiagen at 30Hz for 2 min. Ground hair samples were immersed in 0.5ml of HPLC methanol and placed in a shaking incubator for 24 hours. Samples were then centrifuged and the supernatant collected and transferred to a glass 12mm test tube. The samples were rinsed two times by adding 0.5ml of fresh methanol and collecting the subsequent supernatant in order to collect the remaining steroids. Pooled supernatants were dried using an Evaporac device (Cole & Palmer) at 38 °C under a gentle stream of nitrogen gas. The sides of the tubes were rinsed with 2 consecutive methanol washes of 0.4ml and 0.3 ml, and then dried once again with the Evaporac device. Finally, the dried samples were reconstituted in 1ml of the Elisa kit extraction buffer and 50ul of this solution were analyzed in duplicate with a corticosterone EIA Kit (Oxford biomedical Research EA-66), following the protocol proposed by the manufacturer. According to it, cross-reactivity of the anti- body used for the corticosterone kit is as follows: Corticosterone (100.0%), Deoxycorticosterone (38.0%), 6-Hydroxycorticosterone (19.0%), Progesterone (5.1%), Tetrahydrocorticosterone 2.7%, Prednisolone 1.5%, Cortisol (1.1%), Pregnenolone (0.85%), 11-Epicorticosterone (0.78%). All other hormones and intermediates tested by the manufacturer exhibited cross-reactivity of < 0.3%. The limit of detection of this assay is 0.05 ng/ml.

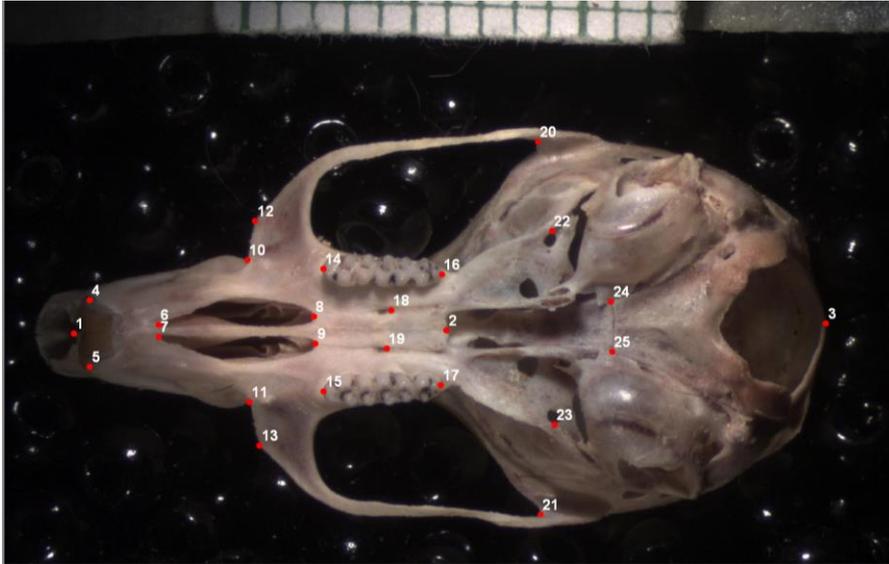


Figure S1 : Landmark configuration on the ventral side of the white-footed mouse's skull. (1) Mid-point on premaxilla, between anterior part of the incisors; (2) Median point on the posterior margin of the palate; (3) caudal end of the occipital foramen in the midline (opisthion); (4–5) Upper lateral extremity of the incisor alveolus; (6–7) Anterior extremity of the incisive foramen; (8–9) Posterior extremity of the incisive foramen ; (10–11) Insertion of the maxillary arm on the rostrum; (12–13) Angle inflexion on the maxillary arm; (14–15) Anterior extremity of the dental tooth row; (16–17) Posterior extremity of the dental tooth row ; ; (18–19) Posterior palatine foramen; (20–21) Anterior maximum of curvature of the squamosal; (22–23) caudal end of the alar foramen on the wing of basisphenoid bone; (24–25) Meeting point between the basisphenoid, basioccipital and tympanic bulla.



Figure S2: Landmark configuration on the external side of the white footed mouse's mandible : (1) apex of coronoid process ; (2) anterior edge of alveolar process ; (3) mental foramen ; (4) superior point on mandibular symphysis ; (5) most posterior visible point of the incisor ; (6) tip of mandibular angle ; (7) most posterior point of the condyloid process on the left side of the mandible ; (8) anterior edge of the condyloid apophysis

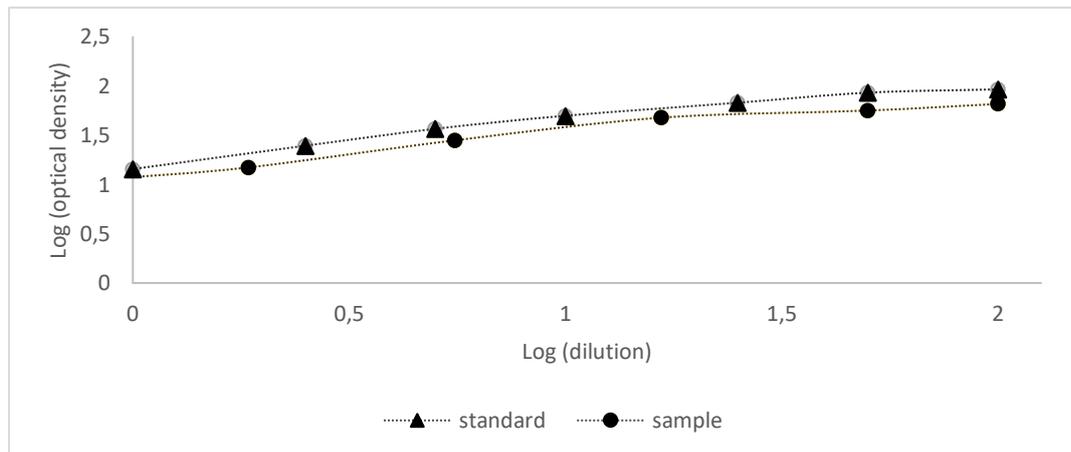


Figure S3 : Parallelism test between serially diluted extracts and serially diluted cortisol standards

References

- Ashley NT, Barboza PS, Macbeth BJ, Janz DM, Cattet MR, Booth RK, Wasser SK. 2011. Glucocorticosteroid concentrations in feces and hair of captive caribou and reindeer following adrenocorticotrophic hormone challenge. *Gen Comp Endocrinol* 172:382-391.
- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01. R package version 2.0-33. <https://CRAN.R-project.org/package=lmerTest>
- Bjorksten T.A., K. Fowler and A. Pomiankowski. 2000. What does sexual trait FA tell us about stress? *Trends in Ecology and Evolution* 15(4) 163-166.
- Brakefield P.M. Phenotypic plasticity and fluctuating asymmetry as responses to environmental stress in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*, Birkhäuser Verlag (1997), pp. 65–78
- Brown JH. 1984. On the Relationship between Abundance and Distribution of Species. *The American Naturalist* 124:255-279.
- Brown JH, Mehlman DW, Stevens GC. 1995. Spatial variation in abundance. *Ecology* 76:2028-2043.
- Campbell W.B., *et al.* Thermally induced chronic developmental stress in coho salmon – integrating measures of mortality, early growth and developmental instability. *Oikos*, 81 (1998), pp. 398–410
- Charbonnel N, Chaval Y, Berthier K, Deter J, Morand S, Palme R, Cosson JF. 2008. Stress and demographic decline: a potential effect mediated by impairment of reproduction and immune function in cyclic vole populations. *Physiol Biochem Zool* 81:63-73.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. In. *Annual Review of Physiology*. p. 259-284.
- Cook NJ. 2012. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science* 92:227-259.
- Cornelissen T, Stiling P. 2010. Small variations over large scales: Fluctuating asymmetry over the range of two oak species. *International Journal of Plant Sciences* 171:303-309.
- Dickerson SS, Kemeny ME. 2004. Acute stressors and cortisol responses: A theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological Bulletin* 130:355-391.

- Donahue, J. G., J. Piesman, and A. Spielman. 1987. Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36:92-96.
- Dryden K.V. 1998. *Statistical Shape Analysis*.
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol* 17:1170-1188.
- Ellis EC, Kaplan JO, Fuller DQ, Vavrus S, Goldewijk KK, Verburg PH. 2013. Used planet: A global history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:7978-7985.
- Emilie Roy-Dufresne TL, Julie A. Simon, Gail L. Chmura, Virginie Millien. 2013. Poleward Expansion of the White-Footed Mouse (*Peromyscus leucopus*) under Climate Change: Implications for the Spread of Lyme Disease.
- Flousek J, Telenský T, Hanzelka J, Reif J. 2015. Population trends of central European montane birds provide evidence for adverse impacts of climate change on high-altitude species. *PLoS ONE* 10.
- GISTEMP-Team. 2016. GISS Surface Temperature Analysis (GISTEMP).
- Hansen J, Ruedy R, Sato M, Lo K. 2010. Global surface temperature change. *Reviews of Geophysics* 48.
- Hill JK, Thomas CD, Fox R, Telfer MG, Willis SG, Asher J, Huntley B. 2002. Responses of butterflies to twentieth century climate warming: Implications for future ranges. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269:2163-2171.
- Hijmans RJ, (2016). *geosphere: Spherical Trigonometry*. R package version 1.5-5. <https://CRAN.R-project.org/package=geosphere>
- Ji F, Wu Z, Huang J, Chassignet EP. 2014. Evolution of land surface air temperature trend. *Nature Climate Change* 4:462-466.
- Kark S. 2001. Shifts in bilateral asymmetry within a distribution range: The case of the chukar partridge. *Evolution* 55:2088-2096.
- Keane. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11:353-357.
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56:1909-1920.
- Knierim U, Van Dongen S, Forkman B, Tuytens FAM, Špinko M, Campo JL, Weissengruber GE. 2007. Fluctuating asymmetry as an animal welfare indicator — A review of methodology and validity. *Physiology & Behavior* 92:398-421.
- Kuznetsova A., Brockhoff P.B., Christensen R.H.B. (2016). *ImerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models*.
- Lackey J.A., and B.G. Ormiston. 1985. *Peromyscus leucopus*. *Mammalian Species American Society of Mammalogists* 247:1-10.
- Leary RF, Allendorf FW. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4:214-217.
- Leighton PA, Koffi JK, Pelcat Y, Lindsay LR, Ogden NH. 2012. Predicting the speed of tick invasion: an empirical model of range expansion for the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. *Journal of Applied Ecology* 49:457-464.

- Leung BBB. 1996. Fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness: Effects of trait type as revealed by meta-analysis. *Écoscience* 3:400-406.
- Levene H. 1960. Robust tests for equality of variances¹. *Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling* 2:278-292.
- Liebl AL, Martin LB. 2012. Exploratory behaviour and stressor hyper-responsiveness facilitate range expansion of an introduced songbird. *Proc Biol Sci* 279:4375-4381.
- Liebl AL, Martin LB. 2013. Stress hormone receptors change as range expansion progresses in house sparrows. *Biology Letters* 9:20130181-20130181.
- Macbeth BJ, Cattet MRL, Stenhouse GB, Gibeau ML, Janz DM. 2010. Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): considerations with implications for other wildlife. *Canadian Journal of Zoology* 88:935-949.
- Mastromonaco GF, Gunn K, McCurdy-Adams H, Edwards DB, Schulte-Hostedde AI. 2014. Validation and use of hair cortisol as a measure of chronic stress in eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Conservation Physiology* 2:cou055-cou055.
- Meyer JS, Novak MA. 2012. Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 153:4120-4127.
- Palmer AR, Strobeck C. 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak M, editor. *Fluctuating asymmetry analyses revisited" in developmental Instability (DI): Causes and Consequences*.
- Parmesan C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37:637-669.
- Parsons PA. 1990. Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:131-145.
- Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA. 2005. Impact of regional climate change on human health. *nature* 438:310-317.
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD. 2005. Ecology: Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 308:1912-1915.
- Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM. 1994. Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. *J Clin Microbiol* 32:2441-2447.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R *et al.* 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *nature* 439:161-167.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. 2012. Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology* 10:87-99.
- Rahmstorf S, Cazenave A, Church JA, Hansen JE, Keeling RF, Parker DE, Somerville RCJ. 2007. Recent Climate Observations Compared to Projections. *Science* 316:709-709.
- Revelle, W. (2017) psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, <https://CRAN.R-project.org/package=psych> Version = 1.7.5.
- Rogic A, Tessier N, Legendre P, Lapointe FJ, Millien V. 2013. Genetic structure of the white-footed mouse in the context of the emergence of Lyme disease in southern Quebec. *Ecol Evol* 3:2075-2088.

- Rohlf FJ. 1999. TpsDig2, version 2.16.
- Romero LM. 2004. Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution* 19:249-255.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *nature* 421:57-60.
- Roy B.A. and Stanton M.L.. Asymmetry of wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae) in response to severe physiological stresses. *J. Evol. Biol.*, 12 (1999), pp. 440–449
- Royston P. 1982. Algorithm AS 181: The W test for Normality. *Applied Statistics* 31:176-180.
- Sagarin RD, Gaines SD. 2002. The 'abundant centre' distribution: To what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters* 5:137-147.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* 21:55-89.
- Schwanz, L. E., M. J. Voordouw, D. Brisson, and R. S. Ostfeld. 2011. *Borrelia burgdorferi* has minimal impact on the lyme disease reservoir host *peromyscus leucopus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11:117-124.
- Sexton JP, McIntyre PJ, Angert AL, Rice KJ. 2009. Evolution and ecology of species range limits. In. p. 415-436.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166:869-887.
- Siikamäki P, Lammi A. 1998. Fluctuating asymmetry in central and marginal populations of *Lychnis viscaria* in relation to genetic and environmental factors. *Evolution* 52:1285-1292.
- Simon JA, Marrotte RR, Desrosiers N, Fiset J, Gaitan J, Gonzalez A, Koffi JK, Lapointe F-J, Leighton PA, Lindsay LR *et al.* 2014. Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evolutionary Applications* 7:750-764.
- Thomas CD, Lennon JJ. 1999. Birds extend their ranges northwards [4]. *nature* 399:213.
- Torchin ME, Lafferty KD, Kuris AM. 2002. Parasites and marine invasions. *Parasitology* 124:S137-S151.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 291:E965-E973.
- Woods R.E., et al. The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability and stress: a multiply replicated experiment on combined stresses in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53 (1999), pp. 493–505

Chapitre 6 : Niveau de santé

Selon les hypothèses envisagées, la santé des individus en bordure d'aire de distribution est supposée être meilleure (parasite release hypothesis) ou moins bonne (central-marginal hypothesis) par rapport aux individus des régions plus centrales. Dans ce court chapitre, nous avons comparé les niveaux moyens de santé des individus dans différentes populations québécoises.

Différentes méthodes existent pour estimer le niveau de santé générale d'un individu. Dans ce travail, nous avons choisi de nous focaliser sur deux mètriques facilement intégrables dans le protocole suivi sur le terrain. La première a consisté à calculer l'indice corporel de l'individu. Cet indice rend compte de la quantité de réserves énergétiques sous forme de graisse à disposition de l'animal. Elle se base sur le fait que des animaux en bonne condition sont supposés posséder de plus larges réserves énergétiques par rapport à des animaux en moins bonne condition (Schulte-Hostedde et al. 2001). Dans ce travail, nous avons calculé cet indice en utilisant le résidu de la régression du poids de l'animal sur sa taille d'après une méthode définie par Schulte-Hostedde et al. (2005).

La seconde méthode utilisée pour approcher le niveau de santé a consisté à mesurer le poids de la rate. Le développement de la rate peut en effet constituer un investissement du surplus d'énergie à disposition de l'animal dans son système immunitaire. Il a été montré dans le chapitre 3 que la présence de larves d'Oestridae induisait une hyperplasie très marquée de la rate. Dans le présent chapitre, seuls les individus possédant des rates inférieures à 50 mg ont été intégrés dans le jeu de données. Ce seuil, défini arbitrairement, semble correspondre au poids maximum que la rate peut atteindre sans parasitisme (fig. 1). Seules les populations contenant au moins 9 individus ont été conservées. Puisqu'un lien de corrélation existait entre poids de la rate et poids du corps, c'est le poids relatif de la rate qui a été utilisé, calculé comme le résidu de la régression du poids de la rate (transformé via la fonction logarithmique pour satisfaire aux conditions de normalité) sur le poids du corps.

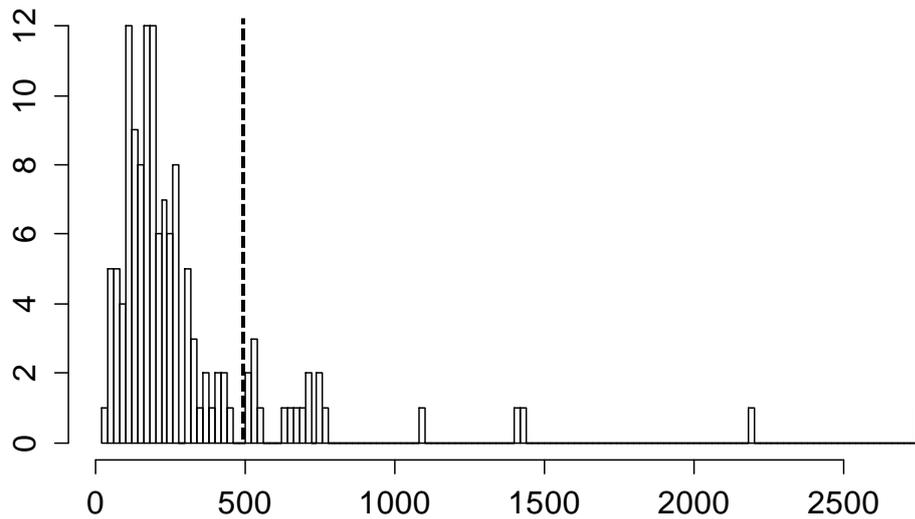


Figure 1 : Histogramme des fréquences (en %) du poids des rates (en dixième de milligrammes). ligne pointillée : seuil des 50mg au dessus duquel les rates appartiennent à des individus parasités par des larves d'Oestridae.

Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre l'indice corporel des souris à pattes blanches et le degré de périphérie des populations auxquelles elles appartiennent. ($p > 0.05$) (fig. 2). De plus, les deux populations les plus périphériques, ER10 et N3 ne se distinguent pas significativement des autres populations plus centrales (student t-test p-value > 0.05). L'homogénéité de ces résultats s'accorde donc avec l'homogénéité des autres paramètres investigués dans les précédents chapitres de cette thèse, que ce soit la diversité génétique, la prévalence en parasites ou les niveaux de stress à long terme.

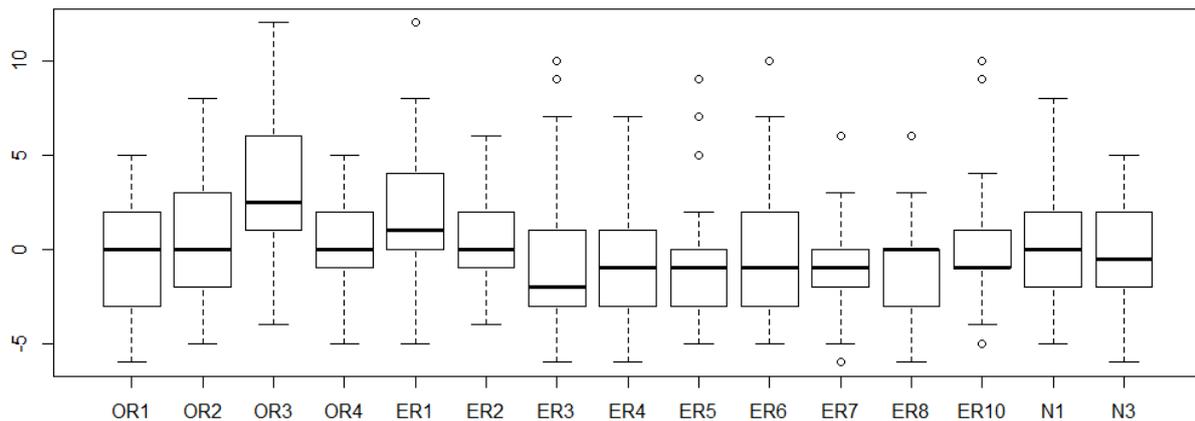


Figure 2 : Boxplot des indices corporels par site d'échantillonnage.

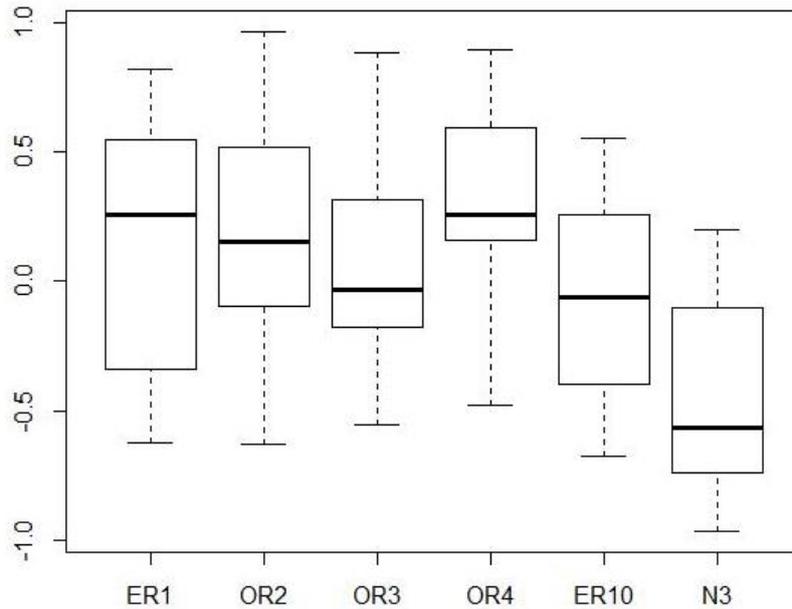


Figure 3 : Boxplot du poids relatif des rates par site

En ce qui concerne le poids relatif des rates, il est intéressant de constater que N3, qui est la population située le plus au nord, possède les rates dont le poids relatif est le plus faible (Student t-test p-value < 0.0001). Le poids relatif des rates est de plus significativement associé à la latitude (Table 1)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Latitude	1	4,1239	4,1239	21,121	1,55E-05
Residuals	82	16,0108	0,1953		

Table 1 : ANOVA examinant les effets relatifs de la latitude sur le poids relatif des rates.

La combinaison des résultats obtenus à partir des rates et des indices corporels peut s'interpréter de deux façons : la première selon laquelle les populations les plus périphériques auraient correctement pu s'adapter à leur nouvel environnement, comme le laissent présager leurs indices corporels, similaires à ceux des populations plus centrales. La seconde s'appuierait sur le fait que cette adaptation fut assez coûteuse, au détriment de surplus d'énergie à investir dans le système immunitaire, ce qui s'est traduit par des poids relatifs de rates plus faibles. Cette interprétation est cependant à prendre avec précaution, étant donné le faible échantillonnage à disposition pour les mesures de rates.

Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives



7.1) Facteurs biotiques et potentiel d'expansion de la souris à pattes blanches au Québec.

Dans ce travail, nous avons étudié différents facteurs biotiques pouvant jouer un rôle effectif dans l'expansion géographique d'une espèce. Nous avons utilisé comme espèce modèle la souris à pattes blanches, dont l'aire de distribution dans le sud du Québec est connue pour s'étendre vers le Nord d'une dizaine de kilomètres par an. Nous nous sommes focalisés sur des paramètres tels que la structure ainsi que la diversité génétique, la prévalence en bactéries et en parasites, les niveaux de stress à long terme ou encore l'indice corporel. Nous avons étudié ces facteurs biotiques au sein de plusieurs populations québécoises de souris à pattes blanches avec pour objectif d'évaluer le potentiel d'expansion de l'espèce. Cette problématique est cruciale dans le contexte actuel de par le rôle de la souris à pattes blanches en tant que réservoir principal de la maladie de Lyme. En effet, une diversité génétique moindre ou une augmentation de la prévalence en parasites dans les populations périphériques pourrait constituer un frein non négligeable à la progression géographique de l'espèce. À l'opposé, une diminution de la pression parasitaire dans ces populations périphériques pourrait, au contraire, favoriser la progression vers le Nord de la souris à pattes blanches ainsi que des maladies qui lui sont associées.

Il s'est avéré que la diversité génétique, le niveau de stress à long terme ainsi que la prévalence en parasites présentaient tous les trois des valeurs homogènes entre les différentes populations québécoises, qu'elles se trouvent dans les zones périphériques ou dans les zones plus centrales (à l'exception du poids des glandes surrénales qui présentaient une relation significative avec la latitude). Une première explication quant à l'homogénéité quasi généralisée de ces résultats pourrait résider dans la taille du gradient d'étude. En effet, la distance maximale séparant deux populations, n'étant que de 180 km, il est probable que l'homogénéité des résultats soit due à ce gradient d'étude trop faible qui ne laisserait pas apparaître de différences suffisantes entre les populations.

Une autre explication potentielle pourrait résider dans la grande faculté d'adaptation de la souris à pattes blanche qui, par sa nature généraliste, aurait pu adapter sa physiologie et son comportement aux conditions plus rudes, propres à l'environnement caractérisant la zone périphérique de l'aire de distribution de l'espèce. Dans ce cas de figure, cela signifierait que l'espèce, ne présentant aucun signe physiologique d'essoufflement, serait parfaitement à même de poursuivre son expansion géographique vers le Nord.

Une augmentation du gradient d'étude permettrait sûrement de mieux répondre à cette question en comparant des populations séparées par plusieurs centaines de kilomètres. Cette stratégie a été développée dans le chapitre 2 dans le cadre de l'étude génétique. Une nette diminution de la diversité génétique a ainsi été mise en évidence dans les populations québécoises par rapport aux populations plus centrales des États-Unis. Cette diminution de la diversité génétique a, de plus, été observée aussi bien pour le marqueur neutre (*cytb*) que pour le marqueur sélectionné (DRB).

Une perspective intéressante consisterait donc à étudier les niveaux de santé et de stress ainsi que les prévalences en parasites d'individus appartenant à des populations plus centrales afin de les comparer avec les données obtenues dans la région québécoise. En effet, la diversité génétique constitue un indicateur indirect seulement de la santé d'une population au contraire de l'indice corporel, du niveau de stress ou de la prévalence en parasites qui ont, quant à eux, des répercussions plus directes sur le niveau de santé.

Si l'homogénéité observée dans les différents paramètres à l'échelle québécoise se confirmait à une plus grande échelle, cela confirmerait l'excellente faculté d'adaptation de la souris à pattes blanches, et laisserait présager une poursuite de l'expansion géographique de l'espèce vers le Nord. Il serait ainsi fort probable que la maladie de Lyme poursuive elle aussi sa progression vers le Nord pour peu que l'autre espèce associée à la maladie de Lyme, la tique vectrice *Ixodes scapularis*, soit elle aussi capable d'étendre son aire de distribution vers le Nord. Ce scénario est tout à fait concevable (Leighton et al. 2012), d'autant plus que nos recherches ont démontré pour la première fois la présence d'un mammifère contaminé dans une région au nord du fleuve St-Laurent

Le scénario alternatif pouvant être envisagé correspond à l'hypothèse selon laquelle les populations de souris à pattes blanches présenteraient des signes d'épuisement dans la région québécoise. Nous avons par exemple démontré dans le chapitre 2 que les populations périphériques présentaient des diversités génétiques plus faibles, que ce soit pour des marqueurs neutres mais aussi pour des marqueurs sélectionnés. L'affaiblissement des populations périphériques pourrait donc aussi se traduire par des indices corporels ou des prévalences en parasites plus faibles ainsi que des niveaux de stress plus élevés par rapport aux zones plus centrales. Dans ce cas de figure, la progression de *P. leucopus* vers le Nord pourrait être fortement ralentie, voir entravée, freinant ainsi l'émergence de la maladie de Lyme au Québec.

7.2) Structure génétique de la souris à pattes blanches.

Cette thèse a aussi permis la résolution d'objectifs secondaires. En travaillant sur base d'un marqueur génétique neutre de *P. leucopus*, nous avons mis en évidence l'existence de deux grandes lignées de part et d'autre du St-Laurent. Une première se distribuant de la côte Est des États-Unis jusqu'à la rive sud du St-Laurent au Québec, et une seconde rassemblant les individus de la région des grands lacs avec ceux de la rive nord du St-Laurent. Ces résultats confirment l'étude précédemment menée par Fiset et al. (2015) qui avaient travaillé sur base d'une combinaison de cinq marqueurs mitochondriaux et nucléaires et avaient mis en évidence cette même séparation par le fleuve St-Laurent. Nos données, qui incluent également des populations américaines, démontrent l'existence de deux refuges glaciaires distincts en Amérique du Nord, probablement associés à deux routes distinctes de recolonisation post-glaciaire vers le sud du Québec. Selon ce scénario, les populations de *P. leucopus* situées sur la rive nord du St-Laurent proviendraient d'une recolonisation ouest-est depuis des populations refuges de la région des Grands Lacs tandis que les populations de la rive sud du St-Laurent dériveraient de populations de la côte Est des États-Unis. Nos données confirment ainsi l'existence de plusieurs lignées américaines de souris à pattes blanches, initialement proposées par Rowe (2006). Nos données collectées sur base du marqueur sélectionné DRB à l'échelle de l'Amérique du Nord ont, quant à elles, mis en évidence un patron phylogéographique légèrement différent. Cette disparité serait causée par la pression de sélection opérée par les parasites helminthes. A l'échelle québécoise, les données obtenues pour le marqueur DRB confirment l'existence de deux sous-lignées au sud du St-Laurent, séparées par le canal Richelieu et référencées dans les études de Ledevin and Millien (2013) et de Fiset et al. (2015).

7.3) Parasitologie de la souris à pattes blanches

Dans le chapitre réservé à l'étude parasitologique, nous avons mis en évidence l'existence de plusieurs espèces de parasites internes et externes chez *P. leucopus*. L'espèce d'helminthe la plus fréquemment observée s'est avérée être *Syphacia peromysci* (présente dans 20.1% des souris étudiées). Cette espèce a été identifiée sur base de caractères morphologiques. L'analyse phylogénétique effectuée dans ce travail semble cependant suggérer que cette espèce différerait de manière substantielle par rapport aux autres espèces du genre *Syphacia*. Il conviendrait dès lors d'effectuer une étude phylogénétique plus poussée qui permettrait de remettre en question l'appartenance de cette espèce au genre *Syphacia*. Nous n'avons pas

enregistré d'effet négatif observable de la présence de ce parasite sur son hôte. En ce qui concerne les parasites externes, l'espèce de tique *Ixodes scapularis* a été retrouvée le plus fréquemment (sur 35% des souris collectées). Celle-ci s'est avérée responsable d'une diminution de l'indice corporel auprès des hôtes infectés. Enfin, nous avons confirmé l'existence d'un phénomène d'hyperplasie de la rate chez les hôtes parasités par des larves d'Oestridae. L'existence d'une augmentation de l'indice corporel chez les souris parasitées par ces larves, déjà renseignée dans la littérature, pourrait être le résultat d'une réallocation du potentiel énergétique vers la survie de l'animal, au détriment de sa reproduction.

7.4) Bactériologie de la souris à pattes blanches

Nous nous sommes basés sur la technologie de séquençage nouvelle génération pour caractériser le microbiome du foie de la souris à pattes blanches. Celui-ci s'est montré dominé par des bactéries du genre *Lactobacillus*. De plus, une large proportion d'individus s'est avérée être contaminée par *Bartonella vinsonii arupensis*, une bactérie pathogène, responsable d'endocardites chez l'humain.

Notre protocole s'est avéré plus efficace pour la détection de *Borrelia burgdorferi*, en comparaison avec les méthodes classiques utilisées par les programmes de surveillance de la maladie. L'utilisation de tissus de poumon plutôt que de foie a notamment permis d'augmenter encore plus la sensibilité du diagnostic. Nous avons mis en évidence, et ce pour la première fois, la présence de la *Borrelia* dans un mammifère au nord du fleuve Saint-Laurent, confirmant par là les modèles prédisant la propagation de la maladie de Lyme vers le Nord. La présence d'une souris contaminée par la maladie de Lyme au nord du Saint-Laurent soulève dès lors deux questions importantes : d'où provient cette souris ? Et, surtout, d'où provient la *Borrelia* l'ayant infectée puisque aucun autre mammifère contaminé n'a jamais été enregistré dans cette région ? L'étude phylogéographique de la souris à pattes blanches détaillée dans le chapitre 2 permet facilement de répondre à la première question. L'absence de signal d'admixture entre les lignées situées de part et d'autre du Saint-Laurent nous défend d'imaginer que cette souris ait traversé le Saint-Laurent. Tout porte donc à croire qu'elle appartient plutôt à une lignée provenant de la région des Grands Lacs ayant effectué une migration Ouest-Est. Quant à la provenance de la bactérie, plusieurs scénarios sont envisageables. La bactérie pourrait tout d'abord provenir d'une série de contaminations proche en proche depuis un foyer situé dans la région des Grands Lacs. Ce scénario semble cependant peu crédible car aucun autre mammifère n'a été identifié comme infecté au nord du Saint-Laurent. Le scénario alternatif consiste à imaginer que la *Borrelia* proviendrait de la rive sud du Saint-Laurent. On sait que ni les tiques ni les souris

ne sont capables de traverser le fleuve, ce n'est cependant pas le cas des oiseaux. Si ceux-ci sont de piètres réservoirs de la maladie de Lyme, ils pourraient cependant avoir joué le rôle de transporteur du vecteur *Ixodes scapularis*, comme suggéré par Leo et al. (2016). Ayant traversé le Saint-Laurent, ces tiques infectées auraient ensuite été en mesure de contaminer les souris locales. Effectuer une étude phylogéographique centrée sur la *Borrelia*, et incluant la souche retrouvée au nord du Saint-Laurent ainsi que celles situées au sud du Saint-Laurent et dans la région des Grands Lacs constituerait un moyen efficace de déterminer lequel des deux scénarios évoqués est à l'origine de l'émergence de la maladie au nord du Saint-Laurent.

Enfin, l'étude bactériologique nous a permis de comparer les microbiomes d'individus appartenant à deux lignées génétiques différenciées, situées de part et d'autre du St-Laurent mais nous n'avons trouvé aucun effet du génotype de l'hôte sur les assemblages microbiens.

7.5) Comparaison des méthodes d'évaluation du stress à long terme

Nous avons enfin testé trois méthodes d'évaluation du stress à long terme dans le but de vérifier la congruence des résultats obtenus. Dans ce chapitre, l'asymétrie fluctuante de la mâchoire inférieure d'une part et du crâne d'autre part, le poids des glandes surrénales ainsi que la corticostérone capillaire ont été quantifiés. De manière surprenante, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre ces quatre variables censées mesurer chacune des valeurs de stress à long terme. Une première explication pourrait résider dans le fait que ces méthodes rendent compte du niveau de stress sur des périodes différentes. En effet, l'asymétrie fluctuante est le résultat de stress subis durant la croissance de l'animal, tandis que les corticostéroïdes capillaires mesurés correspondent au stress subi durant une période correspondant à la pousse du poil, c'est-à-dire durant les récentes semaines. Quant au poids des glandes surrénales, celui-ci correspondrait à un stress représentatif des derniers jours, voire des dernière semaines avant la capture. Tenant compte de cette information, il semble dès lors cohérent d'obtenir des résultats différents quand on sait que le stress subi par ces animaux n'est pas forcément le même d'une saison à l'autre. En effet, les conditions climatiques et la disponibilité des ressources alimentaires peuvent grandement varier d'un mois à l'autre, influençant ainsi significativement le niveau de stress des individus. À cela s'ajoute le fait que l'asymétrie fluctuante est considérée par beaucoup d'auteurs comme étant dépendantes du type de stress subi par l'animal mais aussi de la partie anatomique étudiée. Ceci pourrait donc expliquer l'absence de

corrélation entre nos deux mesures d'asymétrie fluctuante basées sur deux structures anatomiques distinctes. À notre sens, l'utilisation de la méthode basée sur les corticostéroïdes capillaires apparaît comme la technique la plus pertinente pour l'étude du stress d'individus sauvages. En effet, la méthode est non-invasive puisque seuls quelques milligrammes de poils sont nécessaires, pouvant être récupérés dans l'environnement ou sur des pièges à poils, sans perturber l'animal. De plus, cette nouvelle technique est adaptée à partir de méthodes de quantification de cortisol sanguins, urinaires ou fécaux, déjà existantes et largement acceptées par la communauté scientifique. Son seul défaut réside dans le prix très élevé des manipulations nécessaires par rapport aux trois autres méthodes qui ne coûtent en comparaison pour ainsi dire rien, mais qui nécessitent tout de même le sacrifice de l'animal. Notre étude s'ajoute aussi à la longue liste d'études émettant des réserves quant à la pertinence de l'utilisation de l'asymétrie fluctuante, qui de par son caractère stress- et trait- specific, peut potentiellement démontrer une chose et son inverse pour peu que l'on utilise une structure anatomique ou une autre. Quant à l'utilisation des glandes surrénales comme méthode d'évaluation du stress, nous ne pouvons qu'encourager la poursuite d'études afin de valider au mieux cette méthode qui a pour défaut la nécessaire euthanasie de l'animal, mais a l'avantage d'être relativement facile et peu onéreuse à réaliser.

7.6) Comment réduire l'émergence de la maladie de Lyme dans le paysage québécois ?

Puisque nos données ne permettent pas à l'heure actuelle de conclure à un ralentissement futur de la progression de la maladie de Lyme au Québec, il convient de réfléchir à des actions pouvant permettre d'entraver cette émergence. Différents plans d'actions ont déjà été tentés par le passé pour tenter de diminuer l'occurrence de la maladie de Lyme, sans grand succès toutefois.

Un vaccin américain, nommé Lymerix, a d'abord été commercialisé en 1999 par la firme SmithKline Beecham. Celui-ci ne cibait que l'espèce *B. Burgdorferi* sensu stricto, la seule espèce présente aux États-Unis. Le vaccin a cependant été retiré du marché par la firme elle-même en 2002. En cause, plusieurs cas gênants et très médiatisés d'effets secondaires qui auraient miné la popularité du produit. En 2012, la firme Baxter a démarré des essais cliniques pour un vaccin européen contre la maladie de Lyme ; projet abandonné depuis, pour des raisons qui n'ont pas été communiquées. Enfin, une firme française, Valneva, a été autorisée à développer des tests cliniques qui auront lieu dès cette année à la fois aux États-Unis et

en Belgique. Si les vaccins humains ont essuyé plusieurs échecs, ce n'est pas le cas pour les vaccins canins : deux produits sont actuellement commercialisés (Nobivac, Merilym) et leur efficacité serait satisfaisante (LaFleur et al. 2009).

D'autres équipes de chercheurs ont plutôt essayé de prendre le problème à sa racine. Ils ont en effet mis au point des vaccins destinés à être inoculés aux réservoirs de la maladie, afin d'enrayer le cycle enzootique. Ainsi, Tsao et al. (2004) ont injecté un vaccin par voie sous-cutanée à 928 souris préalablement capturées en forêt. L'année suivant le déploiement de ce vaccin, la prévalence de *B. Burgdorferi* au sein des nymphes d'*I. scapularis* était réduite de 24%. Cette diminution, bien qu'encourageante, semble minime lorsqu'on la met en contraste avec l'effort de travail requis pour la vaccination. Partant de ce constat Richer et al. (2014) se sont plutôt dirigés vers une inoculation orale en utilisant des appâts à base de gruaux. La distribution de 79104 unités d'appât sur une période totale de 5 ans a généré une réduction substantielle de la prévalence nymphale de 76%. Des traitements anti-acariens visant à réduire la densité de tiques ont aussi été testés avec succès. L'utilisation d'un acaricide sur des cerfs de Virginie (*Odocoileus virginianus*), un hôte primordial pour la reproduction des tiques adultes, a permis de réduire la densité des nymphes infectées de 68% (Hoen et al. 2009). Un autre acaricide, mélangé à de l'appât à destination des petits mammifères cette fois, a aussi été testé. Après trois années de traitement, l'abondance des tiques *I. scapularis* a été réduite de 77%. D'après Gomes-Solecki (2014), la combinaison de la vaccination et du traitement acaricide de populations de micromammifères serait donc potentiellement la meilleure solution pour diminuer en premier lieu la densité des tiques porteuses de *B. Burgdorferi* et donc par la suite le risque de contamination des populations humaines. Il faut cependant garder en tête que l'utilisation d'acaricides, même s'ils sont dans ce cas ciblés, car dispensés sous forme d'appâts aux mammifères, reste un risque pour la biodiversité puisqu'ils peuvent toucher d'autres acariens indispensables aux écosystèmes forestiers.

D'autres solutions visant à réduire l'incidence de la maladie de Lyme chez l'humain devraient cependant continuer à être envisagées. On sait par exemple que la souris à pattes blanches est le réservoir le plus compétent parmi les autres espèces de micromammifères des forêts nord-américaines. Il a notamment été montré que les forêts abritant la plus grande biodiversité en termes de micromammifères étaient aussi celles qui présentaient les plus faibles prévalences en termes de tiques contaminées (LoGiudice et al. 2003, Bouchard et al. 2013). Ceci s'explique par le fait que dans ces forêts, seule une faible proportion des tiques se nourrissent sur des réservoirs compétents, diminuant ainsi la proportion de tiques acquérant la bactérie. Ce phénomène est appelé l'effet de dilution. Partant de ce principe, s'il était possible, d'une manière ou d'une autre, d'augmenter la diversité en micromammifères ou, tout du moins, de diminuer la densité de *P.*

leucopus par rapport aux autres espèces de micromammifères, il y aurait de fortes chances pour que la proportion de tiques infectées s'en voit diminuée. Rétablir la biodiversité dans un écosystème est loin d'être chose aisée. Des aménagements de corridors écologiques ont déjà été réalisés dans certaines régions du globe, favorisant la mobilité des espèces et un meilleur brassage génétique entre les populations au sein d'une même espèce (Gonzalez et al. 1998, Gilbert-Norton et al. 2010). Dans notre cas cependant, l'aménagement d'un tel couloir pourrait aussi accélérer la migration des tiques et des souris vers le Nord et ne constitue dès lors pas une solution optimale. La réintroduction d'espèces prédatrices nocturnes pourrait éventuellement permettre de diminuer la densité de la souris à pattes blanches, par rapport à d'autres espèces diurnes telles que l'écureuil gris (*Sciurus carolinensis*) ou le tamia rayé (*Tamias striatus*) dont les compétences de réservoir sont bien moindres. Cette méthode a été utilisée avec succès sur l'île de Mayotte, où la simple mise en place de nichoirs à rapaces nocturnes avait favorisé l'augmentation de la population de chouettes, jouant un rôle très positif dans la régulation du rat (Michaux J.R. 1996). Aucune étude n'a toutefois encore été publiée sur le sujet au Québec. Il faut donc rester prudent quant à ces méthodes visant à introduire ou à réintroduire des espèces : vu la complexité des écosystèmes, l'effet obtenu pourrait ne pas être celui originalement escompté, comme ce fut le cas plusieurs fois par le passé (Koch 2003, Louda et al. 2003).

La complexité de cette recherche de solutions visant à enrayer l'émergence de la maladie de Lyme ne fait que souligner la nécessité de maintenir un milieu équilibré, ce qui n'est malheureusement plus le cas dans de nombreuses régions du Québec, et particulièrement au sud du St-Laurent. La dégradation des écosystèmes au profit d'une agriculture intensive ne laisse plus place qu'à de petits massifs forestiers. Ces derniers sont caractérisés par un rapport périmètre/surface plus élevés favorisant les espèces de lisières forestières, dont fait partie la souris à pattes blanches. Cette dégradation des écosystèmes au profit d'une agriculture intensive constitue probablement un des facteurs-clés accélérant l'émergence de la maladie de Lyme. Il est difficile d'imaginer à l'heure actuelle une réorganisation des surfaces arables pour favoriser le retour de plus gros massifs forestiers permettant, par effet de dilution, une diminution de la densité de la souris à pattes blanches. Il est cependant encore temps de protéger les forêts au nord du Saint-Laurent, qui, par leurs larges surfaces, pourraient entraver, ou tout le moins ralentir, l'expansion de la maladie.

Tenter de diminuer l'incidence de la maladie de Lyme chez l'humain par divers moyens est un enjeu crucial, mais la mise au point d'un diagnostic efficace de cette maladie l'est tout autant. Une large partie de ce travail a consisté à la mise à profit des récentes améliorations des technologies de séquençage à haut débit en vue de leur application pour améliorer la détection de la maladie de Lyme. Ce faisant, nous avons pu

confirmer la présence de la *Borrelia* dans les 6 échantillons de souris préalablement détectés positifs par la méthode PCR classiquement utilisée par les organismes de surveillance de la maladie de Lyme. Mais notre méthode nous a surtout permis de détecter la bactérie auprès de 14 individus supplémentaires, et ce à partir de tissus de foies. L'utilisation des poumons comme tissus de départ s'est avérée une solution encore plus efficace avec des nombres de séquences de *Borrelia* obtenues beaucoup plus élevés. Il y a donc fort à parier que des individus supplémentaires auraient pu être diagnostiqués positifs si cet organe avait été utilisé sur l'ensemble des échantillons.

Ces résultats sont extrêmement encourageants puisqu'ils pourraient déboucher sur des progrès décisifs dans le cadre de la détection de la maladie de Lyme chez l'homme. En effet, les méthodes diagnostiques utilisées à l'heure actuelle souffrent d'un manque de sensibilité aussi bien que de spécificité (Rapport "*La borreliose de Lyme*", Haut Conseil de la santé publique, 2014). Celles-ci se basent sur un diagnostic sérologique visant à détecter les anticorps par un test ELISA d'abord, puis par une confirmation à l'aide d'un Western Blot dans les cas d'ELISA positif. Plusieurs études ont cependant démontré la présence d'un nombre élevé de faux-négatifs, plaçant la sensibilité de ces tests sous la barre des 50% (Aguero-Rosenfeld et al. 2005, Stanek et al. 2012). En conséquence, une personne contaminée par la maladie de Lyme qui se fait tester aujourd'hui à l'hôpital n'a qu'une chance sur deux de se voir effectivement diagnostiquée comme porteuse de la maladie de Lyme. Ce manque de fiabilité s'explique par plusieurs raisons. Tout d'abord, il existe au sein du genre *Borrelia* une dizaine d'espèces différentes, caractérisées par des antigènes pouvant être spécifiques à l'espèce, communs au genre *Borrelia* voire même communs à d'autres bactéries spirochètes, notamment aux espèces du genre *Treponema* dont fait partie l'agent responsable de la syphilis (Raoult et al. 1989). La mise au point de réactifs ELISA spécifiques s'en voit donc grandement compliquée. De plus, le développement de l'immunité chez un patient contaminé par la *Borrelia* diffère d'un individu à l'autre. En effet, dans la première phase de la maladie, les anticorps IgM n'apparaissent que 2 à 6 semaines après la morsure de la tique et ce, dans seulement 40 à 60 % des cas. Au cours de la seconde phase de la maladie, définie par la neuroborreliose aigue, les anticorps ne sont présents dans 70 à 90 % des cas (Wilske 2003, Steere et al. 2008). Le manque de fiabilité des tests sérologiques utilisés actuellement dans les hôpitaux constitue donc un problème critique pour les patients : ils ne se verront pas offrir de traitement dans l'immédiat, alors que cette maladie est d'autant plus facilement traitée quand le patient qui la contracte est pris en charge tôt (Embers et al. 2012).

Des méthodes de détection directe de la *Borrelia*, basées sur des PCRs ont aussi été mises au point, mais là encore, des problèmes de sensibilité existent. Ceci s'explique par le fait que le nombre de bactéries

présentes au niveau des sites biologiques prélevés peut être très faible et donc indétectable via des PCRs classiques. La méthode que nous avons développée dans ce travail, basée sur l'utilisation du séquençage nouvelle génération, permet de résoudre ce problème de sensibilité en multipliant le nombre de séquences obtenues, permettant de la sorte une détection beaucoup plus fine de la bactérie. De plus, l'utilisation d'amorces dégénérées induit l'amplification de l'ADN bactérien quelle que soit l'espèce présente. Ceci est intéressant non seulement en regard de l'hétérogénéité du genre *Borrelia*, mais aussi et surtout pour la caractérisation des co-infections. En effet, des cas de co-infection entre la *Borrelia* et la *Bartonella* ou la *Babesia* sont de plus en plus souvent rapportées dans la littérature. Notre méthode est capable, sans aucun frais ni étapes supplémentaires, de détecter ces autres souches bactériennes. Qui plus est, la démocratisation du prix de ces techniques, couplée à la possibilité de mettre en commun une multitude d'échantillons, rend possible l'utilisation de ces méthodes pour un coût ne dépassant pas forcément celui d'un diagnostic sérologique.

7.7) Conclusion générale

Les résultats généraux ressortant de cette étude ont démontré :

- Plusieurs origines de la souris à pattes blanches au Québec
- Une diversité génétique inférieure pour les marqueurs neutres et sélectionnés en bordure d'aire de distribution (Québec) par rapport aux zones plus centrales (Etats-Unis).
- Une homogénéité quasi généralisée des variables de diversité génétique, de charge parasitaire, et des niveaux de santé et de stress entre les populations québécoises.
- L'absence de corrélation entre les différentes méthodes d'évaluation du stress à long terme.
- L'existence de neuf espèces de parasites helminthes dans les populations de souris québécoises.
- Les prévalences en parasites internes et externes dominées par *Syphacia peromysci* et par *Ixodes scapularis*.
- L'efficacité de l'utilisation de la méthode de séquençage nouvelle génération pour le diagnostic de la maladie de Lyme.
- La présence, pour la première fois, d'un mammifère contaminé par la *Borrelia* au nord du fleuve Saint-Laurent
- La grande prévalence de la *Bartonella* dans les populations de souris à pattes blanches québécoises
- L'absence d'effet du génotype de l'hôte sur les assemblages microbiens à l'échelle intra-spécifique.

L'ensemble de ces résultats a permis d'apporter des informations inédites concernant la biologie de la souris à pattes blanches. Ces résultats ont également démontré l'importance d'un échantillonnage distribué sur un large gradient latitudinal pour étudier le phénomène d'expansion vers le Nord de cette espèce. Enfin, ils ont démontré l'intérêt d'une approche multidisciplinaire pour aborder ce type de question complexe, soumise à l'action de nombreux facteurs biotiques et abiotiques.

Bibliographie

- Aguero-Rosenfeld, M. E., G. Wang, I. Schwartz, and G. P. Wormser. 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical microbiology reviews* **18**:484-509.
- Andersson, A. L., M; Jakobsson, H; Backhed, F; Nyre´n, P. 2008. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS ONE*.
- Argumedo, R. L. 1997. Catálogo de la colección nacional de helmintos. UNAM.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Barger, M. A., and J. A. Hnida. 2008. Survey of Trematodes from Terrestrial Gastropods and Small Mammals in Southeastern Nebraska, U.S.A. *Comparative Parasitology* **75**:308-314.
- Barker, C. M., W. G. Dyer, and G. A. Feldhamer. 1987. Helminths of *Peromyscus leucopus*, *P. maniculatus*, and *Blarina carolinensis* from southern Illinois.
- Barton, B. A. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* **42**:517-525.
- Baxter, N. T., J. J. Wan, A. M. Schubert, M. L. Jenior, P. Myers, and P. D. Schloss. 2015. Intra- and interindividual variations mask interspecies variation in the microbiota of sympatric peromyscus populations. *Appl Environ Microbiol* **81**:396-404.
- Bi, Z., P. B. Formenty, and C. E. Roth. 2008. Hantavirus infection: a review and global update. *J Infect Dev Ctries* **2**:3-23.
- Bigoni, L., V. Krajíček, V. Sládek, P. Velemínský, and J. Velemínská. 2013. Skull shape asymmetry and the socioeconomic structure of an early medieval central european society. *American Journal of Physical Anthropology* **150**:349-364.
- Bitton, P. P., and B. A. Graham. 2015. Change in wing morphology of the European starling during and after colonization of North America. *Journal of Zoology* **295**:254-260.
- Bleeker, M., S. A. Kingma, I. Szentirmai, T. Székely, and J. Komdeur. 2005. Body condition and clutch desertion in penduline tit *Remiz pendulinus*. *Behaviour* **142**:1465-1478.
- Bloch, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch, and K. O. Stetter. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* **1**:14-21.
- Boonstra, R. 2005. Equipped for life: The adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Mammalogy* **86**:236-247.
- Boonstra, R., D. Hik, G. R. Singleton, and A. Tlnnikov. 1998. The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecological Monographs* **68**:371-394.
- Boren, J. C. 1993. Responses of Intestinal Nematodes in White-footed Mouse (*Peromyscus leucopus*) Populations to Rangeland Modification. Pages 39-44 *in* Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.
- Bosma, N. J. 1931. *Alaria mustelae* sp. Nov., a trematode requiring four hosts. *Science* **74**:521-522.

- Bouchard, C., G. Beauchamp, P. A. Leighton, R. Lindsay, D. Belanger, and N. H. Ogden. 2013. Does high biodiversity reduce the risk of Lyme disease invasion? *Parasit Vectors* **6**:195.
- Bradley, R. D., N. D. Durish, D. S. Rogers, J. R. Miller, M. D. Engstrom, and C. W. Kilpatrick. 2007. TOWARD A MOLECULAR PHYLOGENY FOR PEROMYSCUS: EVIDENCE FROM MITOCHONDRIAL CYTOCHROME-b SEQUENCES. *J Mammal* **88**:1146-1159.
- Briers, R. A. 2003. Range limits and parasite prevalence in a freshwater snail. *Proc Biol Sci* **270 Suppl 2**:S178-180.
- Brown, C. R., and M. B. Brown. 1992. Ectoparasitism as a cause of natal dispersal in cliff swallows. *Ecology* **73**:1718-1723.
- Brown, T. T., and C. A. Fuller. 2006. Stress and parasitism of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in dry and floodplain environments. *Canadian Journal of Zoology* **84**:1833-1839.
- Brown, W. M., L. Cronk, K. Grochow, A. Jacobson, C. K. Liu, Z. Popovic, and R. Trivers. 2005. Dance reveals symmetry especially in young men. *nature* **438**:1148-1150.
- Brussard, P. F. 1984. Geographic Patterns and Environmental Gradients: The Central-Marginal Model in *Drosophila* Revisited. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**:25-64.
- Buffet, J. P., M. Kosoy, and M. Vayssier-Taussat. 2013. Natural history of Bartonella-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future Microbiol* **8**:1117-1128.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis. 1982. Lyme disease - A tick-borne spirochetosis? *Science* **216**:1317-1319.
- Burns, C. E., B. J. Goodwin, and R. S. Ostfeld. 2005. A prescription for longer life? Bot fly parasitism of the white-footed mouse. *Ecology* **86**:753-761.
- Busch, D. S., and L. S. Hayward. 2009. Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation* **142**:2844-2853.
- Cabezas, S., J. Blas, T. A. Marchant, and S. Moreno. 2007. Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Hormones and Behavior* **51**:313-320.
- Cann, R. L., M. Stoneking, and A. C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *nature* **325**:31-36.
- CDC. 1997. Lyme disease--United States, 1996. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **46**:531.
- Chapman, C. A., M. D. Wasserman, T. R. Gillespie, M. L. Speirs, M. J. Lawes, T. L. Saj, and T. E. Ziegler. 2006. Do food availability, parasitism, and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments? *American Journal of Physical Anthropology* **131**:525-534.
- Charmandari, E., C. Tsigos, and G. Chrousos. 2005. Endocrinology of the stress response. Pages 259-284 *Annual Review of Physiology*.
- Cho, I., and M. J. Blaser. 2012. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* **13**:260-270.
- Claerebout, E., B. Losson, C. Cochez, S. Casaert, A.-C. Dalemans, A. De Cat, M. Madder, C. Saegerman, P. Heyman, and L. Lempereur. 2013. Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit Vectors* **6**:183.

- Cornelissen, T., and P. Stiling. 2010. Small variations over large scales: Fluctuating asymmetry over the range of two oak species. *International Journal of Plant Sciences* **171**:303-309.
- Creel, S., J. A. Winnie Jr, and D. Christianson. 2009. Glucocorticoid stress hormones and the effect of predation risk on elk reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:12388-12393.
- Davis, S. W., and J. L. Keisler. 2016. Embryonic development of the deer mouse, *peromyscus maniculatus*. *PLoS ONE* **11**.
- Deleon, V. B. 2007. Fluctuating asymmetry and stress in a medieval Nubian population. *Am J Phys Anthropol* **132**:520-534.
- Dewey, M., and W. Dawson. 2001. Deer mice: “the *Drosophila*” of North American mammalogy. . *Genesis* **29**:105-109.
- Dibernardo, A., T. Cote, N. H. Ogden, and L. R. Lindsay. 2014. The prevalence of *Borrelia miyamotoi* infection, and co-infections with other *Borrelia* spp. in *Ixodes scapularis* ticks collected in Canada. *Parasit Vectors* **7**:183.
- Doherty, P. C., and R. M. Zinkernagel. 1975. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *nature* **256**:50-52.
- Donahue, J. G., J. Piesman, and A. Spielman. 1987. Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**:92-96.
- Dudley, B. F., and G. W. Winston. 1995. p-Nitrosophenol Reduction by Liver Cytosol from ADH-Positive and -Negative Deermice (*Peromyscus maniculatus*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**:879-885.
- Eckert, C. G., K. E. Samis, and S. C. Loughheed. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol* **17**:1170-1188.
- EcoRegions_Working_Group. 1989. Ecoclimatic Regions of Canada, First Approximation. *Ecological Land Classification Series* **23**:119p.
- Embers, M. E., N. R. Hasenkampf, M. B. Jacobs, and M. T. Philipp. 2012. Dynamic Longitudinal Antibody Responses during *Borrelia burgdorferi* Infection and Antibiotic Treatment of Rhesus Macaques. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI* **19**:1218-1226.
- Falcón-Ordaz, J., J. A. Fernández, and B. A. Ruíz-Vázquez. 2016. Distribution extension of *Syphacia* (*Seuratoxyuris*) *Peromysci* Harkema, 1936 (Nematoda, Syphaciinae) parasitizing the rock mouse, *peromyscus difficilis* (J. A. Allen, 1891) (Rodentia, Neotominae) in central Mexico. *Check List* **12**.
- Ferrouillet, C., A. Fortin, F. Milord, B. Serhir, K. Thivierge, A. Ravel, and C. Tremblay. 2014. Proposition d'un programme de surveillance intégré pour la maladie de Lyme et les autres maladies transmises par la tique *Ixodes scapularis* au Québec. *Institut national de santé publique du Québec*.
- Fiset, J., N. Tessier, V. Millien, and F. J. Lapointe. 2015. Phylogeographic Structure of the White-Footed Mouse and the Deer Mouse, Two Lyme Disease Reservoir Hosts in Quebec. *PLoS ONE* **10**:e0144112.
- Fitze, P., B. Tschirren, and H. Richner. 2004. Life history and fitness consequences of ectoparasites. *Journal of Animal Ecology* **73**:216-226.

- Gaertner, R. A., J. S. Hart, and O. Z. Roy. 1973. Seasonal spontaneous torpor in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Compo Biochem. Physiol* **45A**: 169-181.
- Gaitan, J., and V. Millien. 2016. Stress level, parasite load, and movement pattern in a small mammal reservoir host for Lyme disease. *Canadian Journal of Zoology*.
- Garcia-Prieto, L., J. Falcon-Ordaz, and C. Guzman-Cornejo. 2012. Helminth parasites of wild Mexican mammals: list of species, hosts and geographical distribution. *Zootaxa* **3290**:1-92.
- Gilbert-Norton, L., R. Wilson, J. R. Stevens, and K. H. Beard. 2010. A meta-analytic review of corridor effectiveness. *Conservation Biology* **24**:660-668.
- Glaser, H., and S. Lustick. 1975. Energetics and nesting behavior of the northern white-footed mouse, *Peromyscus leucopus noveboracensis*. *Physiol Zool* **48**: 105-113.
- Gomes-Solecki, M. 2014. Blocking pathogen transmission at the source: reservoir targeted OspA-based vaccines against *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**:136.
- Gonçalves, J. M., M. F. A. d. Nascimento, N. M. Breyner, V. C. Fernandes, A. M. d. Góes, and A. C. R. Leite. 2009. Spleen cell proliferation during and after skin myiasis by human bot fly *Dermatobia hominis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **51**:149-154.
- Gonzalez, A., J. Lawton, F. Gilbert, T. Blackburn, and I. Evans-Freke. 1998. Metapopulation dynamics, abundance, and distribution in a microecosystem. *Science* **281**:2045-2047.
- Goodall, C. 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*:285-339.
- Graham, J. H., S. Raz, H. Hel-Or, and E. Nevo. 2010. Fluctuating asymmetry: Methods, theory, and applications. *Symmetry* **2**:466-540.
- Hagen, S. B., R. A. Ims, N. G. Yoccoz, and O. Sørlibråten. 2008. Fluctuating asymmetry as an indicator of elevation stress and distribution limits in mountain birch (*Betula pubescens*). *Plant Ecology* **195**:157-163.
- Harkema, R. 1936. The parasites of some North Carolina rodents. *Ecol. Monogr.* **6**:151-232.
- Hawlena, H., I. Khokhlova, Z. Abramsky, and B. Krasnov. 2006. Age, intensity of infestation by flea parasites and body mass loss in a rodent host. *Parasitology* **133**:187-193.
- Heard, R. W. 1982. Guide to common tidal marsh invertebrates of the northeastern Gulf of Mexico.
- Hedrick, P. W. 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *American Naturalist*:945-964.
- Hennen, G. 2001. *Endocrinologie. De Boeck Supérieur.*
- Hersh, M. H., S. L. LaDeau, M. A. Previtali, and R. S. Ostfeld. 2014. When is a parasite not a parasite? Effects of larval tick burdens on white-footed mouse survival. *Ecology* **95**:1360-1369.
- Hillegass, M. A., J. M. Waterman, and J. D. Roth. 2010. Parasite removal increases reproductive success in a social African ground squirrel. *Behavioral Ecology*:arq041.
- Hochberg, M. E., and A. R. Ives. 1999. Can Natural Enemies Enforce Geographical Range Limits? *Ecography* **22**:268-276.
- Hoen, A. G., L. G. Rollend, M. A. Papero, J. F. Carroll, T. J. Daniels, T. N. Mather, T. L. Schulze, K. C. Stafford, 3rd, and D. Fish. 2009. Effects of tick control by acaricide self-treatment of white-tailed

- deer on host-seeking tick infection prevalence and entomologic risk for *Ixodes scapularis*-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**:431-438.
- Hofmeister, E. K., C. P. Kolbert, A. S. Abdulkarim, J. M. Magera, M. K. Hopkins, J. R. Uhl, A. Ambyaye, S. R. Telford, 3rd, F. R. Cockerill, 3rd, and D. H. Persing. 1998. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. *J Infect Dis* **177**:409-416.
- Holt, R. D., and T. H. Keitt. 2000. Alternative causes for range limits: a metapopulation perspective. *Ecology Letters* **3**:41-47.
- Hopper, J. V., A. M. Kuris, J. Lorda, S. E. Simmonds, C. White, R. F. Hechinger, and J. Veech. 2014. Reduced parasite diversity and abundance in a marine whelk in its expanded geographical range. *Journal of Biogeography*:n/a-n/a.
- Hunter, C. M., H. Caswell, M. C. Runge, E. V. Regehr, S. C. Amstrup, and I. Stirling. 2010. Climate change threatens polar bear populations: a stochastic demographic analysis. *Ecology* **91**:2883-2897.
- Hurlbert, S. H. 1971. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. *Ecology*, **52**.
- Kark, S. 2001. Shifts in bilateral asymmetry within a distribution range: The case of the chukar partridge. *Evolution* **55**:2088-2096.
- Kaufman, D. K., GA. . 1989. Population biology. In: Kirkland, GL., Jr; Layne, JN., editors. *Advances in the study of Peromyscus (Rodentia)*. Lubbock: Texas Tech University Press; p. 233-270.
- Keane, R. M., and M. J. Crawley. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:164-170.
- Keay, J. M., J. Singh, M. C. Gaunt, and T. Kaur. 2006. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: A literature review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **37**:234-244.
- Kesteman, T., C. Rossi, P. Bastien, J. Brouillard, V. Avesani, N. Olive, P. Martin, and M. Delmée. 2010. Prevalence and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes* ticks in Belgium. *Acta Clinica Belgica* **65**:319-322.
- Klee, R. V., A. C. Mahoney, C. C. Christopher, and, and G. W. Barrett. 2004. Riverine peninsulas: an experimental approach to homing in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Am. J. Phys. Anthropol.* **151**:408-413.
- Klein, J. 1986. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* **11**:353-357.
- Klingenberg, C. P., and L. R. Monteiro. 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: Implications for morphometric applications. *Syst Biol* **54**:678-688.
- Knierim, U., S. Van Dongen, B. Forkman, F. A. M. Tuytens, M. Špinková, J. L. Campo, and G. E. Weissengruber. 2007. Fluctuating asymmetry as an animal welfare indicator — A review of methodology and validity. *Physiology & Behavior* **92**:398-421.
- Koch, R. L. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science* **3**:32.

- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:6196-6200.
- Kosik-Bogacka, D. I., W. Kuźna-Grygiel, and M. Jaborowska. 2007. Ticks and mosquitoes as vectors of *Borrelia burgdorferi* s. l. in the forested areas of Szczecin. *Folia Biologica* **55**:143-146.
- Kozlov, M., B. Wilsey, J. Koricheva, and E. Haukioja. 1996. Fluctuating asymmetry of birch leaves increases under pollution impact. *Journal of Applied Ecology*:1489-1495.
- Kujanová, M., L. Bigoni, J. Velemínská, and P. Velemínský. 2008. Limb bones asymmetry and stress in medieval and recent populations of Central Europe. *International Journal of Osteoarchaeology* **18**:476-491.
- Kurtenbach, K. H., K; Tsao, JI; Margos, G; Fish, D; Ogden, NH. 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Microbiol*.
- Lackey, J. A., D. G. Huckaby, and B. G. Ormiston. 1985. *Peromyscus leucopus*. *Mammalian Species American Society of Mammalogists* **247**:1-10.
- LaFleur, R. L., J. C. Dant, T. L. Wasmoen, S. M. Callister, D. A. Jobe, S. D. Lovrich, T. F. Warner, O. Abdelmagid, and R. F. Schell. 2009. Bacterin that induces anti-OspA and anti-OspC borreliacidal antibodies provides a high level of protection against canine Lyme disease. *Clinical and Vaccine Immunology* **16**:253-259.
- Leary, C. J., T. S. Jessop, A. M. Garcia, and R. Knapp. 2004. Steroid hormone profiles and relative body condition of calling and satellite toads: implications for proximate regulation of behavior in anurans. *Behavioral Ecology* **15**:313-320.
- Ledevin, R., and V. Millien. 2013. Congruent morphological and genetic differentiation as a signature of range expansion in a fragmented landscape. *Ecology and Evolution* **3**:4172-4182.
- Leighton, P. A., J. K. Koffi, Y. Pelcat, L. R. Lindsay, and N. H. Ogden. 2012. Predicting the speed of tick invasion: an empirical model of range expansion for the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. *Journal of Applied Ecology* **49**:457-464.
- Lempa, K., J. Martel, J. Koricheva, E. Haukioja, V. Ossipov, S. Ossipova, and K. Pihlaja. 2000. Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia* **122**:354-360.
- Leo, S. S. T., A. Gonzalez, and V. Millien. 2016. The genetic signature of range expansion in a disease vector - the black-legged tick. *Journal of Heredity*.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451-1452.
- Liebl, A. L., and L. B. Martin. 2013. Stress hormone receptors change as range expansion progresses in house sparrows. *Biology Letters* **9**:20130181-20130181.
- Lindsay, L. R., I. K. Barker, G. A. Surgeoner, S. A. McEwen, and G. D. Campbell. 1997. Duration of *Borrelia burgdorferi* infectivity in white-footed mice for the tick vector *Ixodes scapularis* under laboratory and field conditions in Ontario. *Journal of wildlife diseases* **33**:766-775.

- LoGiudice, K., R. S. Ostfeld, K. A. Schmidt, and F. Keesing. 2003. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:567-571.
- Louda, S. M., R. W. Pemberton, M. T. Johnson, and P. A. Follett. 2003. Nontarget effects--the Achilles' heel of biological control? Retrospective analyses to reduce risk associated with biocontrol introductions. *Annu Rev Entomol* **48**:365-396.
- Lourenço, S. I., and J. M. Palmeirim. 2007. Can mite parasitism affect the condition of bat hosts? Implications for the social structure of colonial bats. *Journal of Zoology* **273**:161-168.
- Lu, Y., Y. Shen, W. Warren, and R. Walter. 2015. Next Generation Sequencing in Aquatic Models.
- Luong, L. T., B. A. Vigliotti, and P. J. Hudson. 2011. Strong density-dependent competition and acquired immunity constrain parasite establishment: Implications for parasite aggregation. *Int J Parasitol* **41**:505-511.
- Lutermann, H., and N. C. Bennett. 2008. Strong immune function: a benefit promoting the evolution of sociality? *Journal of Zoology* **275**:26-32.
- Macbeth, B. J., M. R. L. Cattet, G. B. Stenhouse, M. L. Gibeau, and D. M. Janz. 2010. Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): considerations with implications for other wildlife. *Canadian Journal of Zoology* **88**:935-949.
- MacMillen, R. G., T. Jr. . 1989. Adaptive physiology. In: Kirkland, GL., Jr; Layne, JN., editors. *Advances in the study of Peromyscus (Rodentia)*. Lubbock: Texas Tech University Press; p. 143-168.
- Malcolm, K. D., W. J. McShea, T. R. Van Deelen, H. J. Bacon, F. Liu, S. Putman, X. Zhu, and J. L. Brown. 2013. Analyses of fecal and hair glucocorticoids to evaluate short- and long-term stress and recovery of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*) removed from bile farms in China. *Gen Comp Endocrinol* **185**:97-106.
- Martin, R. J., P. R. Schnurrenberger, F. L. Andersen, and C.-K. Hsu. 1968. Prevalence of *Trichinella spiralis* in Wild Animals on Two Illinois Swine Farms. *The Journal of Parasitology* **54**:108-111.
- Mather, T. N., M. L. Wilson, S. I. Moore, J. M. C. Ribeiro, and A. Spielman. 1989. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *American Journal of Epidemiology* **130**:143-150.
- McAllister, B. F., and I. F. Greenbaum. 1997. How common are common fragile sites: variation of aphidicolin-induced chromosomal fragile sites in a population of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Hum Genet* **100**:182-188.
- Medzhitov, R., D. S. Schneider, and M. P. Soares. 2012. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* **335**:936-941.
- Michaux, J., A. Reyes, and C. F. 2001. Evolutionary history of the most speciose mammals: molecular phylogeny of muroid rodents. . *Mol Biol Evol* **18**: 2017-2031.
- Michaux J.R., L. P. 1996. Etude des potentialités d'une lutte biologique contre le rat sur Mayotte (îles Comores) par l'augmentation de la population de chouettes Effraies (*Tyto alba*) indigène. Département des Vertébrés (section ornithologie) du Musée Royal de l'Afrique Centrale de Tervuren et l'ORSTOM (France).
- Millar, J. 1989. Reproduction and development. In: Kirkland, GL., Jr; Layne, JN., editors. *Advances in the*

- study of *Peromyscus* (Rodentia). Lubbock: Texas Tech University Press; p. 169-232.
- Miller, S. S., H. L. Hoffmann, and B. S. Mustanski. 2008. Fluctuating Asymmetry and Sexual Orientation in Men and Women. *Archives of Sexual Behavior* **37**:150-157.
- Minchella, D. J., A. R. Eddings, and S. T. Neel. 1994. Genetic, Phenotypic, and Behavioral Variation in North American Sylvatic Isolates of *Trichinella*. *The Journal of Parasitology* **80**:696-704.
- Morand, S., and R. Poulin. 2000. Nematode parasite species richness and the evolution of spleen size in birds. *Canadian Journal of Zoology* **78**:1356-1360.
- Morhardt, E., and W. Hudson. 1966. Daily torpor induced in white-footed mice (*Peromyscus* spp.) by starvation. *nature* **212**:1046-1047.
- Morin, R., J. Jutras, N. Des Rosiers, and S. d. l. f. e. d. p. d. Q. D. d. d. l. faune. 2002. Atlas des micromammifères du Québec. [Québec]: Société de la faune et des parcs du Québec, Direction du développement de la faune.
- Musser, G., M. Carleton. 2005. Superfamily Muroidea. . *Mammal Species of the World*. Washington.
- Mysterud, A., W. R. Easterday, V. M. Stigum, A. B. Aas, E. L. Meisingset, and H. Viljugrein. 2016. Contrasting emergence of Lyme disease across ecosystems. *Nat Commun* **7**.
- Nelson, C. A., S. Saha, K. J. Kugeler, M. J. Delorey, M. B. Shankar, A. F. Hinckley, and P. S. Mead. 2015. Incidence of clinician-diagnosed Lyme disease, United States, 2005–2010. *Emerging Infectious Diseases* **21**:1625.
- Nunn, C. L. 2002. Spleen size, disease risk and sexual selection: a comparative study in primates. *Evolutionary Ecology Research* **4**:109-131.
- Nupp, T. E., and R. K. Swihart. 2005. Effect of forest patch area on population attributes of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in fragmented landscapes. *Revue canadienne de zoologie*.
- O'Brien, J. 2014. The birds of Shakespeare cause US trouble (retrieved from <http://www.bbc.com/news/magazine-27055030>). BBC News, Washington.
- Ogden, N. H., L. R. Lindsay, M. Morshed, P. N. Sockett, and H. Artsob. 2009. The emergence of Lyme disease in Canada. *Canadian Medical Association Journal* **180**:1221-1224.
- Oksanen, J. B., Guillaume ; Kindt, Roeland; Legendre, Pierre ; Minchin, Peter; O'Hara, R. B.;Gavin; Simpson,L. ; Solymos, Peter ; Henry M. ; Stevens H. ;Wagner ,Helene 2013. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-9.
- Ostfeld, R. S. 2011. *Lyme Disease: The Ecology of a Complex System*. Oxford University Press:216.
- Ostfeld, R. S., M. C. Miller, and K. R. Hazler. 1996. Causes and consequences of tick (*Ixodes scapularis*) burdens on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Journal of Mammalogy*:266-273.
- Palmer, A. R., and C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*:391-421.
- Parmesan, C., N. Ryrholm, C. Stefanescu, J. K. Hill, C. D. Thomas, H. Descimon, B. Huntley, L. Kaila, J. Kullberg, T. Tammaru, W. J. Tennent, J. A. Thomas, and M. Warren. 1999. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *nature* **399**:579-583.
- Philips, J. 2000. A review and checklist of the parasitic mites. *J. Raptor Res* **34**:210-231.

- Phillips, B. L., C. Kelehear, L. Pizzatto, G. P. Brown, D. Barton, and R. Shine. 2010. Parasites and pathogens lag behind their host during periods of host range advance. *Ecology* **91**:872-881.
- Phillips, J. C. 1928. Wild birds introduced or transplanted in North America. . United States Technical Bulletin **61**.
- Pironon, S., G. Papuga, J. Villellas, A. L. Angert, M. B. García, and J. D. Thompson. 2016. Geographic variation in genetic and demographic performance: new insights from an old biogeographical paradigm. *Biological Reviews*.
- Prakash, S., R. C. Lewontin, and J. L. Hubby. 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **61**:841-858.
- Rahman, Q. 2005. Fluctuating asymmetry, second to fourth finger length ratios and human sexual orientation. *Psychoneuroendocrinology* **30**:382-391.
- Raoult, D., K. E. Hechemy, and G. Baranton. 1989. Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis, and leptospirosis. *J Clin Microbiol* **27**:2152-2155.
- Rauter, C., and T. Hartung. 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:7203-7216.
- Raveh, A., B. P. Kotler, Z. Abramsky, and B. R. Krasnov. 2011. Driven to distraction: detecting the hidden costs of flea parasitism through foraging behaviour in gerbils. *Ecology Letters* **14**:47-51.
- Rebolledo, J., T. Lemout, A. Litzroth, and D. Van Beckhoven. 2016. Zoonoses et maladies a transmission vectorielle, Synthèse annuelle 2015. Institut scientifique de Sante publique (WIV-ISP).
- Reduker, D. W., L. Hertel, and D. W. Duszynski. 1985. *Eimeria* species (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting *Peromyscus* rodents in the southwestern United States and northern Mexico with description of a new species. *Journal of Parasitology* **71**:604-613.
- Reye, A. L., J. M. Hübschen, A. Sausy, and C. P. Muller. 2010. Prevalence and Seasonality of Tick-Borne Pathogens in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:2923-2931.
- Richer, L. M., D. Brisson, R. Melo, R. S. Ostfeld, N. Zeidner, and M. Gomes-Solecki. 2014. Reservoir targeted vaccine against *Borrelia burgdorferi*: a new strategy to prevent Lyme disease transmission. *Journal of Infectious Diseases* **209**:1972-1980.
- Richter, D., A. Spielman, N. Komar, and F. R. Matuschka. 2000. Competence of American robins as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *Emerging Infectious Diseases* **6**:133-138.
- Rogers, D. E., MD.; Arellano, E. . 2005. Phylogenetic relationships among peromyscine rodents: allozyme evidence. In: Sánchez-Cordero, V.; Medellín, RA., editors. *Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa*. México, D.F: Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, and Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.:437-449.
- Rogic, A., N. Tessier, P. Legendre, F. J. Lapointe, and V. Millien. 2013. Genetic structure of the white-footed mouse in the context of the emergence of Lyme disease in southern Quebec. *Ecol Evol* **3**:2075-2088.

- rowe. 2006. Comparative phylogeography of eastern chipmunks and white-footed mice in relation to the individualistic nature of species. *Molecular Ecology*.
- Roy-Dufresne, E., T. Logan, J. A. Simon, G. L. Chmura, and V. Millien. 2013. Poleward Expansion of the White-Footed Mouse *Peromyscus leucopus* under Climate Change: Implications for the Spread of Lyme Disease. *PLoS ONE* **8**:e80724.
- Schulte-Hostedde, A., J. Millar, and G. Hickling. 2001. Evaluating body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology* **79**:1021-1029.
- Schulte-Hostedde, A. I., and S. C. Elsasser. 2011. Spleen mass, body condition, and parasite load in male American mink (*Neovison vison*). *Journal of Mammalogy* **92**:221-226.
- Schulte-Hostedde, A. I., B. Zinner, J. S. Millar, and G. J. Hickling. 2005. Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecology* **86**:155-163.
- Schwanz, L. E., M. J. Voordouw, D. Brisson, and R. S. Ostfeld. 2011. *Borrelia burgdorferi* has minimal impact on the lyme disease reservoir host *peromyscus leucopus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**:117-124.
- Sexton, J. P., P. J. McIntyre, A. L. Angert, and K. J. Rice. 2009. Evolution and ecology of species range limits. Pages 415-436.
- Sharp, K., D. Bucci, P. K. Zelensky, A. Chesney, W. Tidhar, D. R. Broussard, and P. D. Heideman. 2015. Genetic variation in male sexual behaviour in a population of white-footed mice in relation to photoperiod. *Animal Behaviour* **104**:203-212.
- Shendure, J., and H. Ji. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech* **26**:1135-1145.
- Sheppard, C. H., and K. R. Kazacos. 1997. Susceptibility of *peromyscus leucopus* and *mus musculus* to infection with *ba ylisascaris procyonis*. *Journal of Parasitology* **83**:1104-1111.
- Sheriff, M. J., B. Dantzer, B. Delehanty, R. Palme, and R. Boonstra. 2011. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* **166**:869-887.
- Siikamäki, P., and A. Lammi. 1998. Fluctuating asymmetry in central and marginal populations of *Lychnis viscaria* in relation to genetic and environmental factors. *Evolution* **52**:1285-1292.
- Simon, J. A., R. R. Marrotte, N. Desrosiers, J. Fiset, J. Gaitan, A. Gonzalez, J. K. Koffi, F.-J. Lapointe, P. A. Leighton, L. R. Lindsay, T. Logan, F. Milord, N. H. Ogden, A. Rogic, E. Roy-Dufresne, D. Suter, N. Tessier, and V. Millien. 2014. Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evolutionary Applications* **7**:750-764.
- Sparkman, A. M., and M. G. Palacios. 2009. A test of life-history theories of immune defence in two ecotypes of the garter snake, *Thamnophis elegans*. *J Anim Ecol* **78**:1242-1248.
- Spielman, D., B. W. Brook, D. A. Briscoe, and R. Frankham. 2004. Does Inbreeding and Loss of Genetic Diversity Decrease Disease Resistance? *Conservation Genetics* **5**:439-448.
- Stanek, G., G. P. Wormser, J. Gray, and F. Strle. 2012. Lyme borreliosis. *The Lancet* **379**:461-473.
- Steere, A. C., J. Coburn, and L. Glickstein. 2004. The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation* **113**:1093-1101.

- Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele. 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* **20**:7-17.
- Steere, A. C., G. McHugh, N. Damle, and V. K. Sikand. 2008. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. *Clinical infectious diseases* **47**:188-195.
- Stringer, C. 2012. Evolution: What makes a modern human. *nature* **485**:33-35.
- Sudman, P. D., I. F. Greenbaum, D. W. Hale, and S. A. Smith. 1989. Synaptic adjustment in *Peromyscus beatae* (Rodentia: Cricetidae) heterozygous for interstitial heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* **50**:1-5.
- Sullivan, R. M., S. W. Calhoun, and I. F. Greenbaum. 1990. Geographic Variation in Genital Morphology among Insular and Mainland Populations of *Peromyscus maniculatus* and *Peromyscus oreas*. *Journal of Mammalogy* **71**:48-58.
- Takahata, N., and M. Nei. 1990. Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* **124**:967-978.
- Telford, S. R., J. E. Dawson, P. Katavolos, C. K. Warner, C. P. Kolbert, and D. H. Persing. 1996. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:6209-6214.
- Templeton, A. 2002. Out of Africa again and again. *nature* **416**:45-51.
- Torchin, M. E., K. D. Lafferty, A. P. Dobson, V. J. McKenzie, and A. M. Kuris. 2003. Introduced species and their missing parasites. *nature* **421**:628-630.
- Tsao, J. I., J. T. Wootton, J. Bunikis, M. G. Luna, D. Fish, and A. G. Barbour. 2004. An ecological approach to preventing human infection: vaccinating wild mouse reservoirs intervenes in the Lyme disease cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:18159-18164.
- Turney, S., A. Gonzalez, and V. Millien. 2014. The negative relationship between mammal host diversity and Lyme disease incidence strengthens through time. *Ecology* **95**:3244-3250.
- Ulrich-Lai, Y. M., H. F. Figueiredo, M. M. Ostrander, D. C. Choi, W. C. Engeland, and J. P. Herman. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **291**:E965-E973.
- Van Valen, L. 1962. A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution* **16**:125-142.
- Vandegrift, K. J., and P. J. Hudson. 2009. Could parasites destabilize mouse populations? The potential role of *Pterygodermatites peromysci* in the population dynamics of free-living mice, *Peromyscus leucopus*. *Int J Parasitol* **39**:1253-1262.
- Vannier, E., B. E. Gewurz, and P. J. Krause. 2008. Human Babesiosis. *Infectious disease clinics of North America* **22**:469-ix.
- Vicente, J., L. Perez-Rodriguez, and C. Gortazar. 2007. Sex, age, spleen size, and kidney fat of red deer relative to infection intensities of the lungworm *Elaphostrongylus cervi*. *Naturwissenschaften* **94**:581-587.
- Voordouw, M. J., S. Lachish, and M. Dolan. 2015. The Lyme Disease Pathogen Has No Effect on the Survival of Its Rodent Reservoir Host. *PLoS ONE*.

- Wang, G., J. O. Wolff, S. H. Vessey, N. A. Slade, J. W. Witham, J. F. Merritt, M. L. Hunter, and S. P. Elias. 2008. Comparative population dynamics of *Peromyscus leucopus* in North America: influences of climate, food, and density dependence. *Population Ecology* **51**:133-142.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**:5261-5267.
- Weingrill, T., D. A. Gray, L. Barrett, and S. P. Henzi. 2004. Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. *Hormones and Behavior* **45**:259-269.
- Willmore, K. E., C. P. Klingenberg, and B. Hallgrímsson. 2005. The relationship between fluctuating asymmetry and environmental variance in rhesus macaque skulls. *Evolution* **59**:898-909.
- Wilsey, B. J., E. Haukioja, J. Koricheva, and M. Sulkinoja. 1998. Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and elevation in tree-line birches. *Ecology* **79**:2092-2099.
- Wilske, B. 2003. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **3**:215-227.
- Wolff, J. 1989. Social behavior. In: Kirkland, GL., Jr; Layne, JN., editors. *Advances in the study of Peromyscus (Rodentia)*. Lubbock: Texas Tech University Press; . p. 271-291.
- Wolff, J. O. 1996. Population fluctuations of mast-eating rodents are correlated with production of acorns. *Journal of Mammalogy* **77**:850-856.
- Wroblewski, D., L. Gebhardt, M. A. Prusinski, L. J. Meehan, T. A. Halse, and K. A. Musser. 2017. Detection of *Borrelia miyamotoi* and other tick-borne pathogens in human clinical specimens and *Ixodes scapularis* ticks in New York State, 2012–2015. *Ticks and Tick-borne Diseases* **8**:407-411.
- Xia, X., and J. S. Millar. 1990. Infestations of wild *Peromyscus leucopus* by bot fly larvae. *Journal of Mammalogy* **71**:255-258.
- Zenchak, J. J., and J. E. Hall. 1971. Helminths from *Peromyscus leucopus* and *P. maniculatus* in West Virginia. *Journal of Parasitology* **57**:542.
- Zhao, X., and C. A. Marler. 2016. Social and physical environments as a source of individual variation in the rewarding effects of testosterone in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior* **85**:30-35.
- Zheng, Y. W., M. Bey, H. Liu, and M. R. Felder. 1993. Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse. Evidence for deletion of the gene for class I enzyme and identification of a possible new enzyme class. *J Biol Chem* **268**:24933-24939.
- Zimmerman, E. G., B. J. Hart, and C. W. Kilpatrick. 1975. Biochemical genetics of the Truei and Boylei groups of the genus *Peromyscus* (Rodentia). *Comp Biochem Physiol B* **52**:541-545.
- Zimmerman, E. G., C. W. Kilpatrick, and B. Hart. 1978. The genetics of speciation in the rodent genus *Peromyscus*. *Evolution*:565-579.

Annexes

Des collaborations effectuées dans le cadre de cette thèse ont permis l'écriture de deux articles. Pour la première étude, j'ai mis au point un protocole bio-informatique permettant l'identification du régime alimentaire de deux espèces de mammifères aquatiques sur base de leur feces. Dans le cadre de la seconde étude, mon travail a consisté à effectuer une identification sur base de marqueur génétique d'un parasite helminthe extrait du cadavre d'un vison d'Europe (*Mustela lutreola*).

Article 5 :

Is there a trophic overlap between the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* and the Eurasian water shrew *Neomys fodiens*? Comparison of diet and prey selectivity using next-generation sequencing methods

(Soumis à Mammalian biology)

Biffi M., Laffaille P., Jabiol J., André A., Gillet F., Lamothe S., Michaux J., Buisson L.

Abstract : Investigating interactions between species and especially the influence of potential competitors is crucial for a better understanding of the ecology of threatened species and the design and implementation of effective conservation strategies. In this study, the trophic interactions between two semi-aquatic mammals, the endangered Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* and the Eurasian water shrew *Neomys fodiens*, were investigated through diet analyses using next-generation sequencing methods that were combined with analyses of prey selection strategies and quantification of trophic overlap. A total of 186 faeces of *Galemys pyrenaicus* and 79 faeces of *Neomys fodiens* were collected during the summer 2015 in three catchments of the French Pyrenees and gave dietary information through molecular methods. The diet of both species was identified as highly diverse including 10 and 9 classes, 34 and 35 orders, 130 and 137 families and 223 and 239 genera, for *Galemys pyrenaicus* and *Neomys fodiens* respectively. Overall, both species exhibited rather non-selective foraging strategies as few available invertebrate families were actively targeted by the two mammals that consumed

invertebrate in accordance to their availability in streams. This supported an opportunistic foraging behaviour for the Pyrenean desman and the Eurasian water shrew. The Pianka index indicated a significant but moderate dietary overlap as the diet of the Pyrenean desman relied more on prey with aquatic stages whereas prey of the Eurasian water shrew were mainly terrestrial. No difference in the Pyrenean desman prey consumption was found in presence or absence of the Eurasian water shrew. These findings suggested that there was no apparent trophic competition between the two species in these three catchments of the French Pyrenees and that mechanisms leading to a differential use of resources allowed a “peaceful” cohabitation between the two species.

Article 6 :

First report of *Filaria martis* Gmelin, 1790 in the European mink, *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761)

Jordi Torres^{1,2} · Jordi Miquel^{1,2} · Christine Fournier-Chambrillon³ · Adrien André⁴ · Fermín Urrea Maya⁵ · Gloria Giralda Carrera⁶ · Pascal Fournier³

Received: 8 March 2016 / Accepted: 16 March 2016 / Published online: 23 March 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The riparian European mink (*Mustela lutreola*), currently surviving in only three unconnected sites in Europe, is now listed as a critically endangered species according to the IUCN. Habitat loss and degradation, anthropic mortality, interaction with the feral American mink (*Neovison vison*), and infectious diseases are among the principal causes of its decline. Surveys of helminth parasites of this host that also include focus on subcutaneous potentially pathogenic helminths such as those belonging to the genus *Filaria* are very scarce. We report here the presence of specimens of *Filaria martis* in the subcutaneous connective tissues of three *M. lutreola* individuals from Spain. This is the first finding of a subcutaneous nematode in a representative of the genus *Mustela*. The report also enlarges the known range of the definitive hosts of this nematode. These worms were mainly located in the dorsal region of mink and more rarely in the knees, elbows, and hips. Skin sloughing was only observed in

one *M. lutreola* with both septicaemia and an associated high burden of *F. martis*. Therefore, more attention should be paid to potentially pathogenic helminths when designing conservation programs dedicated to *M. lutreola*.

Keywords *Filaria martis* · *Mustela lutreola* · Spain · New host record

Introduction

The European mink, *Mustela lutreola* (L., 1761), is a small territorial riparian mustelid, which has suffered a dramatic distribution and population decline over the last century (Maran et al. 1998; Maizeret et al. 2002), being currently listed as critically endangered according to the IUCN (Maran et al. 2011). The European mink populations are currently distributed in three well-defined, unconnected areas (northern Spain and south-western France, Romania, and Belarus and Russia). These populations are still declining due to several factors including anthropic pressure (e.g., habitat loss and degradation, vehicle collisions, accidental trapping, dog predation, hunting), interspecific competition with the alien invasive American mink (*Neovison vison*, formerly *Mustela vison*), and several infectious diseases. In recent years, numerous studies on habitat use, spatial behavior, health and reproductive status, and conservation genetics have been conducted on the western population of *M. lutreola* to understand the causes of its decline and to propose conservation measures (Fournier-Chambrillon et al. 2004, 2010; Michaux et al. 2005; Zabala et al. 2006; Fournier et al. 2007, 2008; Philippa et al. 2008; Moinet et al. 2010). The highest density of *M. lutreola* in its western population was detected in 2004 in Navarre (Spain), where a health survey was thus initiated by the government, including necropsies on animals found dead in the natural

✉ Jordi Torres
jtorres@ub.edu

¹ Departament de Biologia, Sanitat i Medi ambient, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, 08028 Barcelona, Spain

² Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

³ GREGE, Route de Préchac, 33730 Villandraut, France

⁴ Laboratoire de Biologie Evolutive, Unité de Génétique de la Conservation, Université de Liège, Institut de Botanique B22, Quartier Vallée 1, Chemin de la Vallée 4, 4000 Liège, Belgium

⁵ Gestión Ambiental de Navarra S.A., Padre Adoain, 219 Bajo, 31015 Pamplona, Spain

⁶ Servicio de Conservación de la Biodiversidad del Gobierno de Navarra, C/ González Tablas 9, 31005 Pamplona, Spain

environment (Ceña et al. 2005; Fournier-Chambrillon and Fournier 2013). Earlier parasitological surveys have allowed a thorough characterization of the helminth fauna of *M. lutreola* in Europe (Shimalov et al. 1993; Sidorovich and Anisimova 1993; Torres et al. 2003, 2008), but most of the individuals surveyed were not examined for the presence of subcutaneous potentially pathogenic helminths such as those belonging to the genus *Filaria* Gmelin, 1790. Therefore, the results here presented provide novel information about the presence of these scantily known nematodes parasitizing mustelids in Europe.

Materials and methods

Carcasses of 91 *M. lutreola* specimens were collected between 1999 and 2013 in the Spanish Foral Community of Navarre (Fig. 1). They were kept frozen and then necropsied by trained veterinarians in order to determine the cause of death of each animal. A range of samples was taken at this time for genetic, virological, bacteriologic, and histological studies. When it was possible, the skin of several specimens was completely removed to enable examination for any subcutaneous lesions, but given the major traumas to which the animals were subjected by road collision (major cause of mortality), only 25 specimens could be completely examined. All the nematodes found in the subcutaneous tissues were removed and

transferred to vials containing 70 % ethanol. Some individuals were later processed using conventional techniques for nematodes (cleared in Amman's lactophenol) allowing their specific identification according to previous descriptions of *F. martis* given in Anderson (1960) and Chabaud and Mohammad (1989). Later, this identification was molecularly corroborated.

Genomic DNA was isolated from an individual worm stored in ethanol using a QIAamp DNA Mini Kit and a Qiacube (Qiagen Inc., Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions with the following minor modifications: one single elution of 50 μ l was performed with an incubation time of 3 min. A partial sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene was amplified using the primers COIintF (5-TGATTGGTGG TTTGGTAA-3) and COIintR (5-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3) designed by Casiraghi et al. (2001). PCR reactions were performed in a 25- μ l final volume under the following conditions: 2.5 μ l of each primer (10 μ M), 10 μ l of multiplex PCR Mastermix (Qiagen Inc., Hilden, Germany), 2 μ l of DNA, and 8 μ l of HyPure Molecular Biology Grade Water (VWR, Radnor, USA). The thermal profile used was as follows: an activation step at 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles (denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 52 °C for 45 s, extension at 72 °C for 90 s) and a final extension step at 72 °C for 5 min. All PCR reactions were performed with a Unocycler thermocycler (VWR, Radnor, USA). PCR products were visualized on a 1 % agarose gel. Sanger-sequencing was performed, and chromatograms were inspected visually to resolve any ambiguities. Forward and reverse sequences were aligned using Clustal-W implanted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013) and a resulting 663 bp long has been obtained. The sequence has been deposited in GenBank (accession number: KU761590) and compared to previously published GenBank sequences.

Results

The presence of several specimens of *F. martis* in the subcutaneous connective tissue was observed in three (one male and two females) adult European minks that represent a prevalence of 12.0 % (Fig. 1). The morphological and morphometric data of our *Filaria* specimens are consistent with those previously reported for this species in other hosts by Anderson (1960), Chabaud and Mohammad (1989) and Otranto et al. (2007). The molecular analysis (Fig. 2) presented a 99 % homology with the previously published GenBank 642 bp long *F. martis* sequence (AJ544880.1). Only two nematodes in the most infected *M. lutreola* specimen appeared trapped in subcutaneous membranous capsules whilst the remaining individuals occurred free in the subcutaneous tissue (Figs. 3 and 4). Nematodes were recovered mainly from the

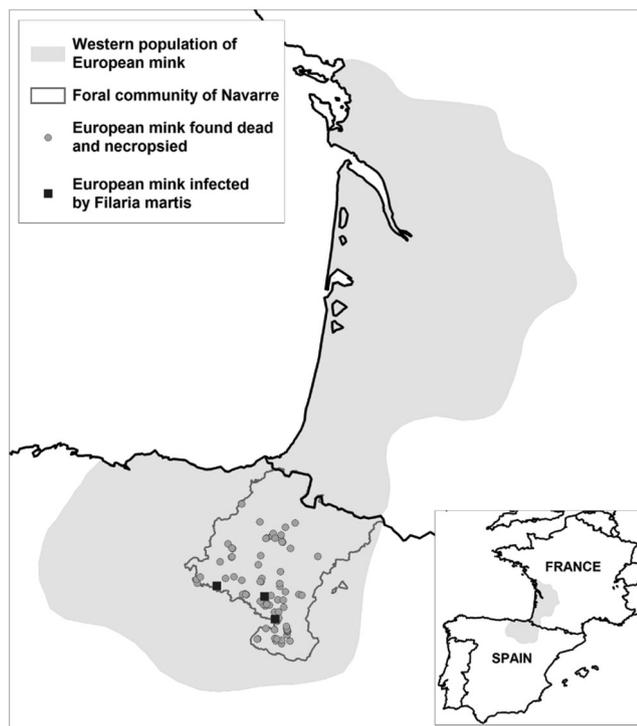


Fig. 1 Geographic distribution of the 91 European mink (*Mustela lutreola*) that were found dead in Navarre including the three individuals infected by *Filaria martis*

Filaria martis mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I

Sequence ID: [emb|AJ544880.1|](#) Length: 643 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 643 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1177 bits(637)	0.0	642/644(99%)	2/644(0%)	Plus/Plus
Query 13	GTTACCTGTTATGATTGGGTCTCCTGAGATAGCTTTTCCTCGTATTAATGCTTTATCTTT			72
Sbjct 1	GTTACCTGTTATGATTGGGTCTCCTGAGATAGCTTTTCCTCGTATTAATGCTTTATCTTT			60
Query 73	TTGGTTAACTTTAGTGGCTTTGTTTATGGTATATGGTTCtttttttttATTGGTAATGGTCC			132
Sbjct 61	TTGGTTAACTTTAGTGGCTTTGTTTATGGTATATGGTTCTTTTTTTATTGGTAATGGTCC			120
Query 133	TGGAAGTAGTTGAACCTTTATATCCTCCTTTAAGTGTGCGATGGTCATCCGGATATGTCTTT			192
Sbjct 121	TGGAAGTAGTTGAACCTTTATATCCTCCTTTAAGTGTGCGATGGTCATCCGGATATGTCTTT			180
Query 193	AGATAGAATGATTTTAAAGTTTGCATACTGTTGGGGCTGGTTCCTTTATTAGGTGCTATTAA			252
Sbjct 181	AGATAGAATGATTTTAAAGTTTGCATACTGTTGGGGCTGGTTCCTTTATTAGGTGCTATTAA			240
Query 253	TTTTATGGTTACTGTTTCAGAATATGCGTCTACAGCAGTTACTTTAGATCAGTTGAGTAT			312
Sbjct 241	TTTTATGGTTACTGTTTCAGAATATGCGTCTACAGCAGTTACTTTAGATCAGTTGAGTAT			300
Query 313	GTTTGTGGTGAACACTACTTATTTAACTTCTGTGTTAATTTTGTATCAGTACCTGTTTATAGC			372
Sbjct 301	GTTTGTGGTGAACACTACTTATTTAACTTCTGTGTTAATTTTGTATCAGTACCTGTTTATAGC			360
Query 373	TGGTTCCTTTGTTATTTTTGTTATTAGATCGTAATTTTGGTGGATCTTTTATGATTCTAG			432
Sbjct 361	TGGTTCCTTTGTTATTTTTGTTATTAGATCGTAATTTTGGTGGATCTTTTATGATTCTAG			420
Query 433	TAGTGGTGGAAAGTCCTTTACTTTATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCATCCTGAGGT			492
Sbjct 421	TAGTGGTGGAAAGTCCTTTACTTTATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCATCCTGAGGT			480
Query 493	TTATATTGTTATTTTGCCTGCTTTTGGTATTATTAGTGAGAGTGTTTTGTTTTTAACTGA			552
Sbjct 481	TTATATTGTTATTTTGCCTGCTTTTGGTATTATTAGTGAGAGTGTTTTGTTTTTAACTGA			540
Query 553	TAAGGAGCGTTTATTTGGTCATGTAAGAATGATTTTGTCTTCTATTGAATTTCTGTGTT			612
Sbjct 541	TAAGGAGCGTTTATTTGGTCATGTAAGAATGATTTTGTCTTCTATTGAATTTCTGTGTT			600
Query 613	AGGAACTTCAGTGTGGGGTCAT-CATATGTATACTGCTGGTTTA 655			
Sbjct 601	A-GAACTTCAGTGTGGGGTCATCCATATGTATACTGCTGGTTTA 643			

Fig. 2 *Filaria martis* partial mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene

dorsal region of the hosts but also from the knees, elbows, and hips. Furthermore, skin sloughing was observed in the most infected European mink, in which a septicaemia (*Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Macrococcus*) was detected.

Discussion

Nematodes belonging to the genus *Filaria* Gmelin, 1790 have long caused controversy among parasitologists. The most common subcutaneous filarial findings in mustelid carnivores were attributed to *Filaria martis* s.l. having been reported repeatedly in Europe, North America, and Japan. However,

Chabaud and Mohammad (1989) studied specimens from various hosts and reported 11 species within the genus *Filaria*.

The type species *F. martis* Gmelin, 1790 was described for the first time parasitizing *Martes martes* (formerly *Mustela martes*) in Italy and later on, it was also reported in *Martes foina* in the same country (Otranto et al. 2007). This species seemed to have a cosmopolitan pattern of distribution infecting several mammals, but nowadays, it is accepted that *F. martis* only affects Palaearctic Mustelidae species (Chabaud and Mohammad 1989). *F. martis* has been sporadically reported in *M. foina* specimens from Switzerland (Zimmerli 1981) and Spain (Sospedra 2000), but no consistent information is available about its prevalence in any host under natural conditions throughout its distribution range except for Italy (Otranto et al. 2007). The latter authors reported a



Fig. 3 Nematode trapped in a dorsolumbar subcutaneous membranous capsule on the most infected European mink

prevalence of 52.3 % in road-killed *M. foinea*, from 1997 to 2006 in the Italian province of Lecce, even though it was never found in *M. foinea* specimens from the nearby Italian province of Basilicata. To our knowledge, the present report of a filariid in *M. lutreola* constitutes the first finding of a subcutaneous nematode in this mustelid and also in any representative species of the genus *Mustela* Linnaeus, 1758. The relatively low number of specimens examined ($n=25$) does not allow any definitive conclusion about the true prevalence of *F. martis* in the current occidental population of the European mink.

Filarioids are all transmitted by haematophagous arthropods. The Filariidae elicit skin lesions and release eggs and/or larvae which attract arthropod vectors, mainly Muscidae. However, no data about the life cycle of *F. martis* are currently known, but its transmission process should be similar to that

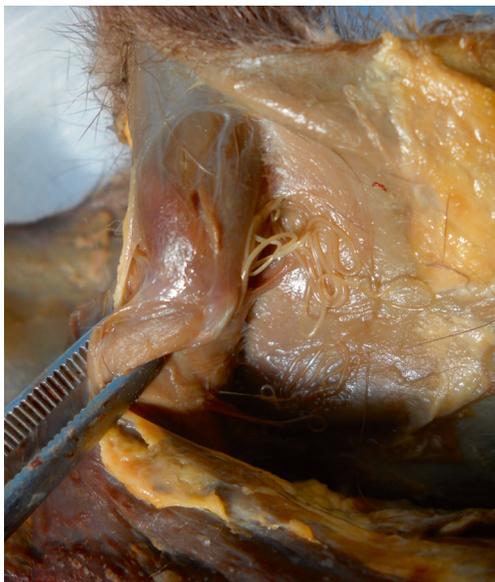


Fig. 4 Most nematodes occurred free in the subcutaneous tissue (here at the elbow)

of *F. taxideae*, the only representative of the genus *Filaria* for which reliable life cycle data are available (see Anderson 2000). The eggs of *F. taxideae*, a species that infects American badgers (*Taxidea taxus*) and striped skunks (*Mephitis mephitis*), produce skin lesions after being laid between the epidermis and the cutaneous basement membrane. The eggs and larvae become exposed at the surface of the skin, where they are available to intermediate hosts involved in transmission, that are attracted to open sores on mammals. The potential vectors, perhaps muscid dipterans attracted to lesions as pointed out by O'Toole et al. (1993), are not yet known with certainty. Otranto et al. (2007) found some *M. foinea* infected by both *F. martis* and the tick *Haemaphysalis erinacei*, but these authors could not draw any conclusions about the life cycle of *F. martis*. In all the surveys carried out on *M. lutreola* in Spain, so far, no ticks and fleas have been detected, most likely because of the time interval between host death and subsequent discovery of the carcass.

Little information is currently available about the pathology that *F. martis* can produce in its hosts, but it is known that these infections usually do not evoke a significant inflammatory response (Anderson 1960). In our study, in the most infected specimen of *M. lutreola*, on which septicaemia was detected, two nematodes were apparently trapped in subcutaneous membranous capsules, and skin sloughing was also observed in this individual.

In a broader context, it can be pointed out that nematodes of the genus *Filaria* cause a poorly known subcutaneous filariasis in mustelids and no robust data are available yet about the extent of their occurrence. However, the present report enlarges the known range of the definitive hosts of *F. martis* including now a representative of the genus *Mustela* (*M. lutreola*), which paradoxically is the more endangered and has the lowest population density of all representatives of the genus in Europe.

Concluding remarks

More attention should be paid in the future to the presence of this potentially pathogenic nematode (*F. martis*) when designing conservation programs dedicated to the critically endangered *M. lutreola*. To now, the relatively low number of *M. lutreola* specimens examined worldwide does not allow taking any robust conclusion about the true prevalence and potential pathology of *F. martis* on the current populations of this very endangered carnivore.

Acknowledgments The present study was partly supported by a Spanish grant from the “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca—AGAUR” (no. 2014 SGR 1241). The necropsies program was funded by the “Departamento de Desarrollo Rural, Medio

Ambiente y Administración Local del Gobierno de Navarra,” and the carcasses were collected by the “Sección de Hábitats y Sección de Guarderío del Gobierno de Navarra, Equipo de Biodiversidad de Gestión Ambiental de Navarra S.A.”

References

- Anderson RC (1960) A study of *Filaria martis* Gmelin, 1790 from *Martes foina* and *Pedetes caffer*. Can J Zool 38:157–167. doi:10.1139/z60-018
- Anderson RC (2000) Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CABI Publishing, Wallingford, 650 pp
- Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C (2001) A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. Parasitology 122:93–103. doi:10.1017/S0031182000007149
- Ceña JC, Bidegain I, Itoiz U, Alfaro I, Berasategui G, Ceña A, Alvarez I, López de Luzuriaga J, Sánchez D, Cano MJ, Díez N, Hidalgo R, García-Marín F, Ferreras C, Carbajal A, Sánchez-Migallón D, Gómez-Moliner B, Cabría M, Urra Maya F (2005) Estimación de la población de Visón Europeo (*Mustela lutreola*) en Navarra. 2004. Gestión Ambiental, Viveros y Repoblaciones de Navarra, S.A. & Gobierno de Navarra, 255 pp
- Chabaud AG, Mohammad MK (1989) Le genre *Filaria* Gmelin, 1790. Description de quatre espèces nouvelles. Bull Mus natn Hist nat, Paris 4^{ème} sér, 11, sect A, 1:47–59
- Fournier P, Maizeret C, Jiménez D, Chusseau JP, Aulagnier S, Spitz F (2007) Habitat utilization by sympatric European mink *Mustela lutreola* and polecats *Mustela putorius* in south-western France. Acta Theriol 52:1–12. doi:10.1007/BF03194194
- Fournier P, Maizeret C, Fournier-Chambrillon C, Ilbert N, Aulagnier S, Spitz F (2008) Spatial behaviour of European mink *Mustela lutreola* and polecat *Mustela putorius* in south-western France. Acta Theriol 53:343–354. doi:10.1007/BF03195195
- Fournier-Chambrillon C, Fournier P (2013) Seguimiento bio-sanitario de la población de visón europeo en Navarra, y particularmente de los tramos bajos del río Arga 2005–2013. In : Dossier de trabajo para el II taller de expertos para la conservación del visón europeo en Navarra. Life. Natura 2000. Territoriovison.eu. Gobierno de Navarra. Gestión ambiental de Navarra S.A., 1–191
- Fournier-Chambrillon C, Aasted B, Perrot A, Pontier D, Sauvage F, Artois M, Cassiede JM, Chauby X, Dalmolin A, Simon C, Fournier P (2004) Antibodies to Aleutian mink disease parvovirus in free-ranging European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores from southwestern France. J Wild Dis 40:394–402. doi:10.7589/0090-3558-40.3.394
- Fournier-Chambrillon C, Bifolchi A, Mazzola-Rossi E, Sourice S, Albaret M, Bray Y, Ceña JC, Urra Maya F, Agraffel T, Fournier P (2010) Reliability of stained placental scar counts in farmed American mink and application to free-ranging mustelids. J Mammal 91:818–826. doi:10.1644/09-MAMM-A-297.1
- Maizeret C, Migot P, Rosoux R, Chusseau JP, Gatelier T, Maurin H, Fournier-Chambrillon C (2002) The distribution of the European mink (*Mustela lutreola*) in France: towards a short term extinction? Mammalia 66:525–532. doi:10.1515/mamm.2002.66.4.525
- Maran T, Macdonald DW, Kruuk H, Sidorovich VE, Rozhnov VV (1998) The continuing decline of the European mink, *Mustela lutreola*: evidence for the intraguild aggression hypothesis. In: Dunstone N, Gorman ML (eds) Behaviour and ecology of riparian mammals. Cambridge University Press, Cambridge, pp 297–324
- Maran T, Skumatov D, Palazón S, Gómez A, Pödra M, Saveljev A, Kranz A, Libois R, Aulagnier S (2011) *Mustela lutreola*. In: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Accessed 11 Dec 2013
- Michaux JR, Hardly OJ, Justy F, Fournier P, Kranz A, Cabria M, Davison A, Rosoux R, Libois R (2005) Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. Mol Ecol 14:2373–2388. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02597.x
- Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplède A, Blanchard B, Descarsin V, Dumas P, Dumas Y, Coïc C, Couzi L, Fournier P (2010) Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, Viverridae) from southwestern France. J Wild Dis 46:1141–1151. doi:10.7589/0090-3558-46.4.1141
- O’Toole D, Williams ES, Welch V, Nunamaker CE, Lynn C (1993) Subepidermal vesiculobullous filarial dermatitis in free-ranging American badgers (*Taxidea taxus*). Vet Pathol 30:343–351
- Otranto D, Lia RP, Cantacessi C, Brianti E, Traversa D, Giannetto S (2007) *Filaria martis* Gmelin 1790 (Spirurida, Filariidae) affecting beech marten (*Martes foina*): morphological description and molecular characterisation of the cytochrome oxidase c subunit I. Parasitol Res 101:877–883. doi:10.1007/s00436-007-0554-3
- Philippa JD, Fournier-Chambrillon C, Fournier P, Schaefenaar W, Van de Bildt MW, Van Herweijnen R, Kuiken T, Liabeuf M, Ditcharry S, Joubert L, Bégner M, Osterhaus A (2008) Serologic survey for selected viral pathogens in endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other free-ranging mustelids in south-western France. J Wild Dis 44:791–801. doi:10.7589/0090-3558-44.4.791
- Shimalov VT, Sidorovich VY, Shimalov VV (1993) Helminths of *Mustela* inhabiting of ponds in Belarus. Vest Akad Navuk BSSR Ser Biyalagichnykh Navuk 4:96–101
- Sidorovich VE, Anisimova EI (1993) Helminth infestation in a declining population of European mink (*Mustela lutreola*) in Belarus. Small Carniv Conserv 9:16–17
- Sospedra E (2000) Sobre las vermifaunas de las especies del género *Martes* Pinel, 1792 (Carnivora: Mustelidae) en España continental e insular. PhD Thesis, University of Barcelona, 353 pp
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Torres J, Mañas S, Palazón S, Ceña JC, Miquel J, Feliu C (2003) Helminths parasites of *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761) and *M. vison* Schreber, 1777 in Spain. Acta Parasitol 48:55–59
- Torres J, Miquel J, Fournier P, Fournier-Chambrillon C, Liberge M, Fons R, Feliu C (2008) Helminth communities of the autochthonous mustelids *Mustela lutreola* and *M. putorius* and the introduced *Mustela vison* in south-western France. J Helminthol 82:349–356. doi:10.1017/S0022149X08046920
- Zabala J, Zuberogitia I, Martínez-Climent JA (2006) Factors affecting occupancy by the European mink in south-western Europe. Mammalia 3–4:193–201. doi:10.1515/MAMM.2006.051
- Zimmerli J (1981) Study of the parasites of *Martes foina* in the Vaud canton during 1980–1981. Schweiz Arch Tierheilkd 124:419–422

