

**STRUCTURE GÉNÉTIQUE ET POTENTIEL DE PROPAGATION DE LA
RAGE CHEZ DEUX MÉSOCARNIVORES VECTEURS: LE RATON
LAVEUR (*PROCYON LOTOR*) ET LA MOUFETTE RAYÉE
(*MEPHITIS MEPHITIS*)**

par

Benoit Talbot

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

**Faculté des sciences
Université de Sherbrooke**

Sherbrooke, Québec, Canada, octobre 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-91685-8

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-91685-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 7 novembre 2012

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Benoit Talbot
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Fanie Pelletier
Directrice de recherche
Département de biologie

Professeur Dany Garant
Codirecteur de recherche
Département de biologie

Monsieur Julien Mainguy
Membre
Ministère des ressources Naturelles et de la Faune

Professeur Marc Bélisle
Président rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Les animaux en dispersion sont potentiellement limités dans leurs déplacements par certains éléments du paysage, comme les hautes montagnes ou les étendues d'eau. Cette limitation dans la dispersion se répercute ensuite sur le flux de gènes, qui est le déplacement de gènes par l'intermédiaire des gamètes de l'individu qui les porte. Ainsi, il est rarement possible d'observer une uniformité génétique sur un territoire donné occupé par une population ou une espèce. Les éléments du paysage ainsi que le comportement de dispersion sont des facteurs qui peuvent influencer la structure génétique. Le paysage se définit comme une portion de territoire composé d'une mosaïque d'habitats dont l'hétérogénéité est variable. Les éléments du paysage, comme des rivières ou des montagnes, affectent chaque espèce différemment, en partie parce que la capacité de dispersion respective de chaque espèce est différente. De plus, le comportement de dispersion peut affecter la façon dont les animaux se déplacent, et peut donc aussi avoir un impact sur la structure génétique d'une population. Certains comportements amenés par un pathogène modifient la façon dont l'individu se déplace dans son environnement. Par exemple, un comportement hyperexcitable peut probablement entraîner un animal à parcourir de longues distances ou à traverser des obstacles qu'il ne tenterait pas s'il était sain. Les facteurs qui affectent la structure génétique d'une espèce hôte d'un pathogène influencent aussi le potentiel de propagation de celui-ci. Connaître ces facteurs peut nous permettre de renforcer certaines barrières naturelles potentielles contre la propagation du pathogène en érigeant une zone de contrôle à proximité. L'objectif principal de mon projet est de déterminer quels éléments du paysage sont susceptibles d'affecter le potentiel de propagation de la rage ainsi que la structuration génétique des deux vecteurs terrestres principaux de cette maladie au Canada : le raton laveur (*Procyon lotor*) et la moufette rayée (*Mephitis mephitis*).

Mon premier objectif spécifique était de déterminer le niveau de structure génétique et les éléments du paysage du Sud du Québec qui sont susceptibles d'affecter cette structure génétique chez les mouffettes rayées. J'ai aussi évalué s'il existe des effets spécifiques au sexe en comparant la structure génétique entre les mâles et les femelles. Pour ce faire, j'ai génotypé à 9 loci microsatellites 289 individus capturés dans les régions de la Montérégie et de l'Estrie, au Québec. Mes résultats montrent que la présence des rivières à fort débit et possiblement aussi des autoroutes provoquent une augmentation de la structure génétique surtout chez les femelles de cette espèce. Ces résultats suggèrent aussi que les mâles de la mouffette rayée seraient potentiellement des vecteurs plus actifs dans la propagation de la variante de la rage du raton laveur que les femelles, puisqu'ils ne semblent pas limités autant que les femelles par les éléments du paysage. Finalement, puisque les mâles ne semblent que très peu limités par les barrières potentielles du paysage, celles-ci ne peuvent pas être utilisées pour contrôler efficacement la propagation de la maladie.

Mon deuxième objectif spécifique était de déterminer s'il existe une différence de diversité et/ou de structure génétique entre des ratons laveurs testés positifs et des ratons laveurs testés négatifs pour la rage. Une telle différence serait un indice d'un comportement de déplacement différent entre ces deux groupes. Ceci peut entre autres me permettre de vérifier la validité des résultats obtenus en étudiant des individus sains d'une espèce vectrice de la maladie pour tenter d'inférer le patron de propagation de la rage du raton laveur. Mes résultats montrent que la structure génétique ne diffère pas entre les ratons laveurs sains et les ratons laveurs rabiques, indiquant un comportement de déplacement probablement similaire entre les deux groupes. Donc, les éléments du paysage auraient possiblement un effet similaire sur les ratons laveurs rabiques et sains. Les études sur la structure génétique chez des ratons laveurs sains pourraient donc fort probablement nous informer sur les couloirs de propagation potentiels de la rage du raton

laveur. Ensuite, j'ai tenté de déterminer si la diversité génétique pouvait influencer l'infection par la rage en comparant la diversité génétique à différents loci entre les animaux rabiques et sains. Une différence de diversité génétique entre les deux groupes pourrait indiquer un plus grand taux d'immigration provenant de populations adjacentes chez un des groupes. Par ailleurs, une grande diversité génétique pourrait être un élément pouvant potentiellement limiter la propagation de la rage du raton laveur. Hors, mes résultats ne supportent pas que la diversité génétique puisse influencer la probabilité d'un individu d'être infecté par la rage.

Mots-clés : Aménagement de la faune; Biologie évolutive; Écologie moléculaire; Épidémiologie; Génétique du paysage; Moufette rayée; Raton laveur.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier la Pre. Fanie Pelletier, qui a su me superviser de façon exceptionnelle. Ses conseils et commentaires m'ont dans tous les cas, et j'atteste de cela avec du recul, permis de surmonter les épreuves amenées par une maîtrise de recherche en science. Aussi, le déménagement hors de ma ville natale a été relativement difficile, mais Fanie a été d'un bon support dans ce processus. J'ai beaucoup appris avec toi, et je te remercie profondément pour ça. Le Pr. Dany Garant a été une d'une aide essentielle tout le long de ma maîtrise. Il a offert un soutien complémentaire à celui de ma directrice. Nombreux sont ses commentaires qui m'ont fait réfléchir plus longuement et de façon plus efficace. Le Dr. Julien Mainguy m'a été d'une aide principalement matérielle et logistique. Il m'a donné l'occasion d'avoir des échantillons ainsi que d'avoir des cartes géographiques sur lesquelles faire mes analyses. Ses nombreux conseils sur les manuscrits et lors des rencontres de comité m'ont également été fort utiles. Le Pr. Marc Bélisle m'a apporté de l'information et des commentaires constructifs tout le long de ma maîtrise, en plus d'apporter du soutien au projet. Merci à Hélène Presseault-Gauvin, Andréanne Lessard et Jennifer Chambers pour leur aide au laboratoire, et merci à Pierre-Olivier Benoit pour son aide lors de l'Opération Raton 2010. Merci énormément au Dr. Sébastien Rioux-Paquette pour son implication dans les analyses statistiques. Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de mes analyses moléculaires et statistiques. Merci également à tous ceux qui ont travaillé pour la récolte des échantillons et de l'élaboration des cartes, au *Ministère des Ressources naturelles et de la Faune*, à l'*Agence canadienne d'inspections des aliments* et au *Centre québécois sur la santé des animaux sauvages*. Merci au *Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada* et aux *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies*, qui m'ont offert des bourses de maîtrise. Merci également au *Fonds de recherche du Québec – Nature et*

technologies ainsi qu'aux *Chaires de recherche du Canada* pour avoir financé ce projet. J'aimerais remercier finalement Simon-Pierre Guay et Hélène Pressault-Gauvin pour leur lecture et correction du français dans ce mémoire..

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. Influence du paysage sur la structure génétique.....	1
2. Objectifs	2
3. Importance du projet.....	3
4. Biologie des espèces à l'étude.....	5
<i>4.1. Le raton laveur.....</i>	<i>5</i>
<i>4.2. La moufette rayée.....</i>	<i>6</i>
5. Distinction entre dispersion et flux de gènes	6
6. Effets de la distance et des barrières potentielles sur la structure génétique	6
<i>6.1. Effet de la distance géographique</i>	<i>7</i>
<i>6.2. Effet des barrières imperméables et semi-perméables</i>	<i>8</i>
7. Dispersion et flux de gènes biaisés selon le sexe	9
<i>7.1. Évitement de la dépression de consanguinité.....</i>	<i>10</i>
<i>7.2. Évitement de la compétition locale.....</i>	<i>11</i>
<i>7.3. Évidences de dispersion biaisée selon le sexe.....</i>	<i>11</i>
8. Étude de la propagation des maladies de la faune	13

8.1. <i>Étude d'animaux sains versus infectés</i>	13
8.2. <i>Résistance naturelle et exposition aux maladies</i>	14
9. Variante de la rage du raton laveur en Amérique du Nord	14
10. Site d'étude et échantillonnage	16
CHAPITRE 1 : LACK OF GENETIC STRUCTURE AND FEMALE-SPECIFIC EFFECTS IN A RABIES VECTOR (<i>MEPHITIS MEPHITIS</i>).....	18
Introduction de l'article.....	18
Abstract	19
Introduction	20
Materials and Methods	24
Results	30
Discussion	37
Acknowledgments	40
Supplementary material	41
CHAPITRE 2 : GENETIC STRUCTURE AND DIVERSITY OF RABID AND NONRABID RACCOONS.....	44
Introduction de l'article.....	44
Abstract	45
Introduction	46
Materials and Methods	49
Results	51
Discussion	56
Acknowledgments	57
Supplementary material	59
CONCLUSION GÉNÉRALE	60
1. Retour sur les résultats	60
1.1. <i>Structure génétique du raton laveur et de la moufette rayée au Sud du Québec</i>	60
1.2. <i>Comparaison entre animaux rabiques et sains</i>	61

2. Importance des résultats en gestion de la faune.....	64
3. Perspectives futures	65
BIBLIOGRAPHIE.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
1.1	Number of alleles (A), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, inbreeding coefficient (F_{is}), and the probability for null alleles for the nine microsatellite loci of the striped skunk (<i>Mephitis mephitis</i>) used in our study in Southern Quebec, Canada (N=289), 2009 and 2010.	32
1.2	Results of univariate and multivariate regression analyses of genetic distance matrices with the MRM (Lichstein, 2007), using 10,000 permutations, for striped skunks (<i>Mephitis mephitis</i>) originating from Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010.	35
1.3	Results of univariate and multivariate regressions analyses of genetic distance matrices with the MRM (Lichstein, 2007), using 10,000 permutations for each sex separately in striped skunks (<i>Mephitis mephitis</i>) originating from Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (P values for slopes between sexes were calculated using Student's t test).	36
S1.1	Marker name, GenBank accession number, primer sequences, fluorescence dye used (on the forward primer), repetition pattern and lengths of alleles for the nine microsatellite loci used in this study in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (Dragoo <i>et al.</i> , 2009; and Munguia-Vega <i>et al.</i> , 2009).	42
S1.2	Polymerase chain reaction reagent volume and concentrations (final volume of 10 μ L per sample with 10 ng of DNA) for the nine microsatellite loci used in this study in Southern Quebec, Canada, in	43

	2009 and 2010 (Modified from Dragoo <i>et al.</i> , 2009; and Munguia-Vega <i>et al.</i> , 2009).	
S1.3	Amplification conditions for the nine microsatellite loci used in this study in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (Modified from Dragoo <i>et al.</i> , 2009; and Munguia-Vega <i>et al.</i> , 2009).	44
2.1	Single locus analyses of observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), inbreeding coefficient (F_{IS}) and allelic richness, in rabid (+) and nonrabid (-) raccoons sampled in Southern Quebec, Canada, in 2007 and 2008 (SE are indicated in parentheses).	54

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
1.1	Map of the study area in Southern Quebec, Canada. The location of sampled striped skunk (<i>Mephitis mephitis</i>) in this study is shown by a black star for 2009 ($n = 148$) sampling year and a grey circle for 2010 ($n = 141$) sampling year. Grey shapes are major bodies of water such as rivers and lakes in and around the study area. Thin black lines represent major highways found in the study area. St Lawrence River and the 5 selected rivers for our analyses (a: Châteauguay, b: Richelieu, c: Yamaska, d: Magog, e: Saint-François) are identified on the map. The city of Montreal is also identified.	26
1.2	Number of genetic clusters observed in the study area. Mean and standard deviation of estimated ln-probabilities of data are presented for genetic clusters $K = 1$ to 5, calculated with the STRUCTURE software for striped skunks (<i>Mephitis mephitis</i>) in the study area in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010.	33
2.1	Most likely number of genetic clusters for each Markov chain Monte Carlo iteration in a study on raccoons in Southern Quebec, Canada, in 2007 and 2008.	52
2.2	Distribution of multilocus genetic parameter values calculated in 1,000 bootstrap (a-c) and jackknife (d) replicates in rabid and nonrabid raccoons sampled in Southern Quebec, Canada, in 2007 and 2008: (a) observed heterozygosity H_O ; (b) expected heterozygosity H_E ; (c) inbreeding coefficient F_{IS} ; (d) allelic richness (corrected for 60 individuals).	53

S2.1 Distribution of genotypes at microsatellite locus PLM10 (Siripunkaw 58
et al., 2008), which had marginally significant genotype-phenotype
(rabid and nonrabid) associations (see Amos and Acevedo-
Whitehouse, 2009, for details on this test), from sampled raccoons
(*Procyon lotor*) in Southern Quebec in 2007 and 2008.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Influence du paysage sur la structure génétique

Le flux de gènes est le déplacement de gènes d'un endroit à un autre par le biais des organismes qui les portent (Slatkin, 1985). Il est fortement influencé par le mouvement de dispersion des animaux (Garant *et al.*, 2007). Une variation de flux de gènes dans l'espace mène à un processus que l'on nomme la structure génétique, qui est une variation spatiale de l'identité génétique des individus (Wright, 1951; Slatkin, 1987). La structure génétique est influencée fortement par la géographie, ou paysage (Epperson, 2003; Storfer *et al.*, 2007; voir aussi Fox et Wolf, 2006, pour connaître d'autres facteurs qui peuvent influencer la structure génétique). Forman et Godron (1986) définissent le paysage comme étant une portion de territoire hétérogène composé de groupes d'écosystèmes répétés dans l'espace. Par exemple, les rivières sont des éléments du paysage, car elles sont des groupes d'écosystèmes (e.g., milieu pélagique, substrat, rives) et elles sont réparties de façon plus ou moins systématique dans le territoire. Ces éléments peuvent avoir un effet sur les déplacements des animaux, et par conséquent sur le flux de gènes. Une structure génétique est façonnée lorsque ces éléments limitent le flux de gènes (Storfer *et al.*, 2007). De plus, la structure du paysage peut affecter le flux de gènes, et par conséquent la structure génétique (voir Castric *et al.*, 2001; Funk *et al.*, 2005; Keyghobadi *et al.*, 2005). La génétique du paysage intègre la génétique des populations et l'écologie du paysage et a été élaborée pour comprendre comment le paysage affecte les échanges de matériel génétique (i.e., flux de gènes et structure génétique) en milieux naturels (Manel *et al.*, 2003).

Une modification de comportement causée par un pathogène peut aussi affecter la structure génétique. De fait, il est possible que l'infection par un pathogène engendre certains comportements chez son hôte (e.g., la rage : Leung *et al.*, 2007 et la maladie débilitante chronique : Williams, 2005). Ces comportements peuvent potentiellement modifier la façon dont l'individu se déplace (voir Bowen-Davies et Lowings, 2000a, b), et par conséquent, la façon qu'il propage ses gènes. Par le fait même, il serait possible que les éléments du paysage affectent le flux de gènes des individus infectés de façon différente qu'ils n'affectent celui des individus non infectés.

2. Objectifs

L'objectif principal de mon projet était de déterminer quels sont les facteurs qui sont les plus susceptibles de limiter la propagation de la variante de la rage du raton laveur dans le Sud du Québec, un virus affectant les populations sauvages de rats laveurs et de mouffettes rayées sur toute la Côte Est de l'Amérique du Nord. Pour atteindre cet objectif, j'ai étudié la structure et la diversité génétique des deux vecteurs de cette maladie, le raton laveur (*Procyon lotor*) et la mouffette rayée (*Mephitis mephitis*).

Le premier objectif spécifique de mon projet était d'identifier quels éléments du paysage affectent la structure génétique de la mouffette rayée. Ceci, en retour, nous a permis d'obtenir des indices sur la propagation du virus de la variante de la rage du raton laveur. Les éléments analysés étaient la distance géographique et deux types de barrières potentielles du paysage, les rivières et les routes. Puis, j'ai effectué ces analyses sur les mâles et les femelles séparément, pour vérifier la présence d'effets spécifiques au sexe.

Le second objectif spécifique de mon projet était de déterminer si la caractérisation de la structure génétique d'animaux sains peut nous permettre d'étudier la propagation de la variante de la rage du raton laveur. Pour atteindre cet objectif, j'ai vérifié s'il existait une structure génétique entre des ratons laveurs sains et des ratons laveurs infectés par ce virus. Ceci nous a informés sur une possible différence de comportement de déplacement entre les deux états; la rage étant connue pour causer l'hyperexcitabilité chez les individus qu'elle infecte. Une structure génétique différente pourrait être observée si les animaux infectés étaient plus enclins à quitter leur population d'origine et provenaient donc de populations adjacentes. J'ai aussi comparé la diversité génétique entre les deux états, puisqu'elle peut nous indiquer un plus grand taux d'immigration provenant de populations adjacentes chez un des groupes. Finalement, la diversité génétique peut possiblement influencer l'infection ou non par le virus chez cette espèce, et être ainsi un facteur limitant la propagation du virus.

3. Importance du projet

Mieux comprendre la propagation des maladies infectieuses est d'une importance cruciale pour planifier des interventions de contrôle (Ostfeld *et al.*, 2005). Puisqu'un pathogène peut causer la mort d'une grande partie d'une population d'hôtes et puisque la diversité génétique de cette population s'en trouve possiblement diminuée, il peut mettre en péril des espèces menacées d'extinction (Daszak, 2000; Daszak *et al.*, 1999; Laurenson *et al.*, 1998; Pounds *et al.*, 2006; Scott, 1988). Dans les cas où les maladies de la faune affectent la santé publique, les agences gouvernementales vont souvent investir beaucoup d'argent afin de contrôler leur propagation (Daszak, 2000; Gage *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 1992; Lui et Kendal, 1987). Par exemple, les frais associés à la prévention

de la rage aux États-Unis sont estimés entre 230 millions et 1 milliard de dollars annuellement (Rupprecht *et al.*, 1995). L'acquisition de connaissances sur la dynamique démographique et comportementale des animaux sauvages considérés comme des vecteurs de ces maladies est donc essentielle afin de prévenir l'expansion de ces maladies. Le contrôle d'une maladie est beaucoup plus facile à effectuer lorsqu'on connaît ses couloirs de propagation, puisqu'il devient alors possible de concentrer les efforts de contrôle à des endroits plus précis. Par exemple, il est possible de renforcer certaines barrières naturelles potentielles en vaccinant les animaux à proximité (Longini Jr *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2006). Puisque ce moyen d'action permet le renforcement d'une barrière naturelle, une très faible structure génétique peut tout de même nous fournir des renseignements utiles. Il est souvent difficile d'obtenir de l'information concernant la dispersion d'hôtes de maladies sur une large échelle et avec une grande taille d'échantillon, en raison des limites imposées par les outils utilisés (Bohonak, 1999; Koenig *et al.*, 1996; Proctor *et al.*, 2004). Pour cette raison, les études en écologie des maladies infectieuses utilisent souvent de l'information provenant de la génétique du paysage (Archie *et al.*, 2009).

Par ailleurs, il est important de vérifier si l'infection par un pathogène peut elle-même influencer son potentiel de propagation, par une modification drastique du comportement de dispersion de l'hôte. C'est souvent le cas avec la rage (Bowen-Davies et Lowings, 2000a, b), bien que cette modification puisse être si brève qu'elle n'aie pas d'effet majeur sur le déplacement global de l'individu (voir Greenwood *et al.*, 1997; Rosatte *et al.*, 2006). Finalement, le niveau de résistance d'une population d'hôtes à une maladie pourrait influencer sa propagation (voir King et Lively 2012). Il est donc important de comparer la diversité génétique d'individus sains et infectés au sein d'un même territoire pour vérifier si ce facteur peut influencer la probabilité d'infection.

4. Biologie des espèces à l'étude

4.1. *Le raton laveur*

Le raton laveur fait partie de l'ordre des Carnivores, dans la famille des Procyonidés. Il est nocturne et de taille moyenne parmi les mammifères (Zaveloff, 2002). Il fréquente les villes où il est observé en grandes densités (Broadfoot *et al.*, 2001; Markovchick-Nicholls *et al.*, 2008). Il est aussi fréquemment rencontré en campagne, près des bordures des champs agricoles (Barding et Nelson, 2008), où il consomme majoritairement du maïs (*Zea maize*) (Beasley et Rhodes, 2008). C'est aussi un animal qui fréquente beaucoup les forêts et les marais, où il chasse entre autres des petits mammifères, des oiseaux, des reptiles et des arthropodes (Cagle, 1949; Fritzell, 1978). Son domaine vital est estimé à environ 3,6 km² (Frey et Conover, 2006). Cet animal est originaire des Amériques, probablement d'Amérique centrale ou du Sud de l'Amérique du Nord (Koepfli *et al.*, 2007). L'espèce est composée d'au moins trois sous-espèces aux États-Unis. *P. l. lotor* est la sous-espèce qui se trouve la plus près de mon aire d'étude située dans le Sud du Québec (Cullingham *et al.*, 2008a).

4.2. *La moufette rayée*

La moufette rayée fait aussi partie de l'ordre des Carnivores, dans la famille des Mephitidés. Elle est nocturne et de taille moyenne parmi les mammifères (Rosatte et Larivière, 2003). Elle est fréquemment rencontrée dans les villes (Broadfoot *et al.*, 2001; Rosatte *et al.*, 1991) et est aussi très présente dans les environnements ruraux, surtout en bordures des champs agricoles et près des fermes (Larivière *et al.*, 1999; Larivière et

Messier, 2000). Ses principales proies sont des insectes, des petits mammifères et des oiseaux. Son domaine vital est estimé à environ 3 km² (Frey et Conover, 2006). Cet animal est originaire de l'Amérique du Nord et il a été suggéré qu'un ancêtre commun provenant de la région du Texas, aux États-Unis, ou du Nord du Mexique se serait dispersé vers le nord et y aurait formé plusieurs groupes taxonomiques. L'un de ces groupes se trouve actuellement sur la Côte de l'océan Pacifique, un second se trouve entre les cordillères des Rocheuses et le troisième se trouve dans l'Est des États-Unis et du Canada, où se trouve mon aire d'étude (Barton *et al.*, 2012).

5. Distinction entre dispersion et flux de gènes

La dispersion se définit par le mouvement des individus vers l'extérieur de sa population natale ou de son lieu de reproduction. Deux des causes évolutives possibles de la dispersion sont possiblement la consanguinité et la compétition locale (Hanski et Gaggiotti, 2004). Lorsqu'un individu se disperse pour se reproduire à un autre endroit que celui où il est né, il transfère essentiellement ses gènes entre les deux endroits. Ce processus se nomme le flux de gènes et il est fortement influencé par le mouvement de dispersion des animaux (Slatkin, 1985; Garant *et al.*, 2007). Le flux de gènes et la dispersion sont cependant différents dans le sens qu'un mouvement de dispersion ne générera pas automatiquement un flux de gènes et, en contrepartie, un faible mouvement de dispersion peut générer un relativement gros flux de gènes. Si l'animal n'arrive pas à se reproduire à sa destination finale, le flux de gènes est interrompu. Les causes possibles de ceci sont notamment les barrières intrinsèques à la reproduction, comme la non viabilité des rejetons ou des gamètes, et la sélection sexuelle, qui pourrait notamment permettre principalement aux individus locaux de se reproduire (Garant *et al.*, 2007). En contrepartie, si une population est très peu diversifiée génétiquement et que ses membres souffrent de plusieurs maladies génétiques, les gènes d'un individu venant d'ailleurs

pourraient se propager assez aisément dans cette population au cours des générations. Ceci générerait alors un très gros flux de gènes par rapport au mouvement de dispersion d'origine (Garant *et al.*, 2007).

6. Effets de la distance et des barrières potentielles sur la structure génétique

La structure génétique peut être engendrée par plusieurs éléments. La distance géographique limite les échanges entre des endroits très éloignés par rapport à des endroits à proximité les uns des autres, ce qui génère un gradient d'isolement (Wright, 1943; Slatkin, 1993). D'autres éléments, plutôt sous forme discrète, agissent comme barrières en causant des coupures abruptes dans le flux de gènes (Manel *et al.*, 2003; Storfer *et al.*, 2007), ce qui fait que les individus de part et d'autre d'une barrière seraient beaucoup plus différents génétiquement que les individus d'un même côté. L'effet possible de ces deux types d'éléments sur la structure génétique sont détaillés plus en profondeur dans les paragraphes suivants.

6.1. Effet de la distance géographique

La distance géographique a un effet d'isolement attribuable à la capacité de dispersion plus ou moins limitée de l'espèce étudiée (Wright, 1943; Slatkin, 1993). Son effet est traditionnellement mesuré en comparant une matrice de distances géographiques entre chaque paire d'individus avec une matrice de distance génétiques entre chaque paire d'individus, grâce au test de Mantel (1967). Une distance génétique est une mesure de la variation génétique entre deux individus ou populations (Nei et Roychoudhury, 1973). Un patron d'isolement par la distance est habituellement caractérisé par une distance

génétique marquée des individus aux extrêmes d'un gradient et une distance génétique diminuant à mesure que les individus considérés sont rapprochés spatialement l'un de l'autre. On s'attend à ce que la distance génétique augmente avec la distance géographique et que cette relation soit plus forte si les membres de l'espèce à l'étude ont une capacité de dispersion faible (voir Peterson and Denno, 1998). Par exemple, la distance géographique semble expliquer davantage la distance génétique de la martre d'Amérique (*Martes americana*) (Broquet *et al.*, 2006) que celle du panda géant (*Ailuropoda melanoleuca*) (Zhu *et al.*, 2010). Ceci pourrait être dû au fait que la martre semble avoir une distance de dispersion moyenne plus petite que celle du panda géant (Macdonald et Rushton, 2003; Zhan *et al.*, 2007). De plus, la distance géographique explique davantage la distance génétique du papillon alpin (*Parnassius smintheus*) (Keyghobadi *et al.*, 2005) et de l'ambystome tigré tacheté (*Ambystoma tigrinum melanostictum*), une espèce de salamandre (Spear *et al.*, 2005); que celle de la martre d'Amérique et du panda géant. Ceci s'explique en partie par le fait que les deux premiers sont des animaux ectothermes et de très petite taille, ce qui rend leur capacité de dispersion probablement moindre par rapport aux deux espèces de mammifères.

6.2. Effet des barrières imperméables ou semi-perméables

Des connaissances sur les caractéristiques biologiques d'une espèce peuvent permettre d'identifier des barrières potentielles au flux de gènes des individus de cette espèce. On observe que, lorsqu'une barrière potentielle du paysage coupe un territoire et empêche les individus de traverser, ceci amène une augmentation de la différence génétique entre les groupes de part et d'autre (Manel *et al.*, 2003; Storfer *et al.*, 2007). Entre autres, il a été montré que les chaînes de montagnes (Funk *et al.*, 2005; Zalewski *et al.*, 2009) peuvent potentiellement être des barrières infranchissables pour certaines espèces terrestres. Dans ces cas, puisque le flux de gènes est minime ou inexistant, il est possible d'observer une

structure génétique de populations, ce qui amène une divergence des populations de part et d'autres des barrières (Slatkin, 1987). Aucune structure génétique n'a cependant été observée dans des études sur des superficies variables chez le raton laveur (Root *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2012) et la mouffette rayée (Hansen *et al.*, 2003; Barton *et al.*, 2010).

Dans d'autres cas, les barrières sont semi-perméables. Ces barrières ne coupent pas totalement le flux de gènes, mais le réduisent en empêchant une grande partie des individus de les traverser et en obligeant les autres à les contourner en des points plus perméables. Une étude de Frantz *et al.* (2010) montre qu'une autoroute n'est pas imperméable au flux de gènes du blaireau européen (*Meles meles*) car aucune différenciation de population n'a été observée. Néanmoins, elle provoque une diminution de l'apparement des individus de part et d'autre. Les auteurs suggèrent que cet obstacle oblige la majorité des individus à la traverser à un endroit plus accessible. Cette barrière n'est donc pas imperméable, mais plutôt semi-perméable. Une étude de Broquet *et al.* (2006) montre que la distance euclidienne entre deux individus reflète la distance génétique chez la martre d'Amérique seulement lorsqu'il n'y a pas de coupes forestières. Le chemin passant par des zones non coupées est celui qui représente le mieux la distance génétique lorsqu'il y a présence de coupes. Ceci suggère qu'une zone forestière coupée représente une barrière potentielle au flux de gènes chez la martre d'Amérique et contraint les mouvements d'une forte proportion des individus. Puisque le flux de gènes est toujours possible, on parle ici aussi d'une barrière semi-perméable. Finalement, dans l'étude de Jensen *et al.*, (2006) sur le crabe bleu (*Callinectes sapidus*), on parle plutôt d'endroits où le terrain amènerait un coût pour le franchir qui serait beaucoup plus élevé qu'à d'autres. L'effet de barrières semi-perméables (rivières) a été étudié et observé aussi chez le raton laveur (Côté *et al.*, 2012), mais pas chez la mouffette rayée. Or, puisque l'effet de certaines barrières semi-perméables (routes et rivières) a été observé chez le blaireau européen et le raton laveur, je m'attends à observer le même phénomène chez

une espèce du même ordre (Carnivores) ayant une taille et une physionomie relativement similaires.

7. Dispersion et flux de gènes biaisés par le sexe

La dispersion et le flux de gènes sont biaisés selon le sexe chez plusieurs espèces animales. La dispersion biaisée vers les mâles semble être présente chez la majorité des espèces de mammifères (Greenwood, 1980). L'évitement de la dépression de consanguinité et de la compétition locale sont des mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène (Perrin et Mazalov, 2000). Les arguments concernant ces deux hypothèses sont présentés font suite, puis une revue de littérature sur la façon dont ces différences peuvent être observées en milieu naturel est détaillée.

7.1. Évitement de la dépression de consanguinité

Le maintien d'un taux de dispersion élevé, particulièrement si ce taux de dispersion est biaisé pour un sexe, amène une forte homogénéisation des allèles et ainsi amenuise les chances d'apparition d'un phénomène qu'on nomme la dépression de consanguinité (Pusey et Wolf, 1996). Ce phénomène survient lorsque la majorité des rejetons d'une population sont produits par des gamètes relativement peu diversifiés et sont donc homozygotes à un nombre relativement élevé de loci. Un fort taux d'homozygotie augmente les chances de voir apparaître des problèmes nuisibles à la valeur adaptative, comme la faible résistance aux maladies, à la prédation ou aux stress environnementaux (Keller et Waller, 2002). Chez la plupart des mammifères, les femelles subissent un coût à la reproduction plus élevé que les mâles. En effet, la production du lait et la gestation

leur coûtent énormément d'énergie (Clutton-Brock et Harvey, 1978). Les cas où une maladie génétique létale affecte les individus homozygotes pour un gène donné s'observent plus souvent en présence de consanguinité. Dans ces cas, la consanguinité est plus coûteuse pour les femelles que pour les mâles, car elles investissent plus dans la reproduction que ces derniers (Handley et Perrin, 2007) et l'investissement parental en énergie aux jeunes est perdu. Si les femelles effectuent un choix de partenaire, elles sélectionneront par conséquent les mâles les plus différents d'elles génétiquement. La dispersion biaisée par les mâles est alors attendue (Handley et Perrin, 2007). Puisque le choix de partenaire est ce qui semble prédominant chez les mammifères (Clutton-Brock et McAuliffe, 2009), je m'attends à observer une dispersion biaisée par les mâles chez les espèces à l'étude dans ce projet.

7.2. Évitement de la compétition locale

Chez la plupart des espèces de mammifères, puisque les femelles investissent plus de temps dans la reproduction par la gestation (Clutton-Brock et Harvey, 1978), les mâles sont limités par le nombre de femelles avec lesquelles ils peuvent s'accoupler et vont donc monopoliser soit les ressources, soit les femelles, dépendamment de l'espèce considérée (Greenwood, 1980). Si les mâles monopolisent les ressources, on pourrait possiblement observer une dispersion biaisée par les femelles (si on assume que les femelles s'accouplent avec le mâle résident), alors que s'ils monopolisent les femelles, on pourrait potentiellement observer une dispersion biaisée par les mâles (Greenwood, 1980). Chez les mammifères polygynes, la défense du partenaire sexuel est le mode de compétition le plus utilisé et on observe généralement une dispersion biaisée par les mâles (Greenwood, 1980). Cela dit, il faut souligner que plusieurs évidences suggèrent que chez des espèces de mammifères polygynes, une dispersion biaisée par les femelles peut être observée (Handley et Perrin, 2007). Finalement, la polygynie et la défense des

partenaires sexuels sont ce qui est généralement observé chez le raton laveur (Gehrt et Fritzell, 1999a) et la moufette rayée (Rosatte et Larivière, 2003), je m'attends donc à une dispersion biaisée par les mâles chez ces espèces.

7.3. Évidences de dispersion biaisée selon le sexe

Premièrement, il est possible de détecter des différences sexuelles quant à la distance de dispersion. Les individus du sexe dispersant auront en moyenne une dispersion de reproduction plus grande que ceux du sexe philopatric. Nous pourrions observer une distance géographique moyenne séparant les dyades du sexe dispersant plus élevée, comme dans une étude sur l'ours grizzli (*Ursus arctos horribilis*) de Proctor *et al.* (2004), car les individus du sexe dispersant sont poussés par compétition intra sexuelle à s'éloigner davantage des membres du même sexe. Il est aussi possible d'observer un apparemment moyen plus élevé entre les dyades du sexe philopatric. L'étude de Cullingham *et al.* (2008b) montre que, chez les ratons laveurs, les femelles vont généralement être plus apparentées entre elles que les mâles. D'autres parts, un effet plus grand de la distance géographique sur la distance génétique des individus du sexe philopatric pourrait être observé. L'étude de Ishibashi *et al.* (1997) sur le campagnol de Sundevall (*Clethrionomys rufocanus*) illustre bien ce phénomène. Les mâles semblent moins limités que les femelles à disperser sur de grandes distances. Or, ce dernier aspect est controversé dans la littérature étant donné que les différences liées au sexe en terme de dispersion sont souvent trop infimes ou trop grandes pour être observées au niveau du patron d'isolement par la distance (Balloux *et al.*, 1998).

Il est possible aussi de retrouver des différences selon le sexe quant à la perméabilité d'une barrière potentielle. On pourrait s'attendre à ce que le sexe dispersant ait tendance

à être moins limité par les barrières potentielles que le sexe philopatric. Il s'ensuit que la structure génétique du sexe dispersant aura tendance à être moins forte que celle du sexe philopatric (Goudet *et al.*, 2002; Prugnolle et de Meeus, 2002). Dans une métapopulation, nous pourrions donc observer une variance d'assignement génétique à une population (qui est la probabilité d'appartenance d'un individu à une population donnée par son bagage génétique; voir Manel *et al.*, 2005) plus élevée chez le sexe dispersant. Ceci serait possiblement dû à une plus grande proportion d'individus de ce sexe qui auraient traversé une barrière potentielle pour se retrouver dans une autre population que celle où ils sont nés. Par exemple, le fleuve Saint-Laurent est une barrière considérée quasi-infranchissable pour le tamia rayé (*Tamias striatus*), et la variance de l'assignement à une population est plus élevée chez les mâles, lequel est le sexe dispersant chez cette espèce (Chambers et Garant, 2010). Par ailleurs, à l'intérieur d'une même population, nous pourrions trouver un effet plus élevé des barrières potentielles du paysage sur la distance génétique des membres du sexe philopatric, peut-être parce que les individus de ce sexe sont moins poussés à franchir les barrières potentielles. Par exemple, la rivière Richelieu cause une plus grande augmentation de la distance génétique chez les femelles du raton laveur que chez les mâles (Côté *et al.*, 2012) et ce, alors que les femelles sont le sexe philopatric chez cette espèce.

8. Étude de la propagation des maladies de la faune

8.1. Étude d'animaux sains versus infectés

Certains pathogènes causent des comportements très marqués chez leurs hôtes, comme la rage (Leung *et al.*, 2007) et la maladie débilitante chronique (Williams, 2005). Ces changements de comportement pourraient altérer ou accentuer les déplacements des

animaux affectés modifiant ainsi la structure génétique chez ces animaux. Par exemple, des animaux infectés par la rage ayant un comportement hyperexcitable pourraient parcourir de grandes distances, comme expliqué par Bowen-Davies et Lowings (2000a, b), et se retrouver en sympatrie avec des conspécifiques avec lesquels ils partagent très peu de gènes. Pour cette raison, il serait préférable de pouvoir étudier spécifiquement les animaux infectés dans les études de génétique du paysage œuvrant à élucider les patrons de propagation d'une maladie, car les résultats seraient probablement plus précis et représentatifs. Or, les animaux infectés sont souvent trop dangereux pour être étudiés pour des raisons évidentes associées au risque d'infection. De plus, les animaux démontrant des symptômes d'une maladie infectieuse sont souvent retirés de l'état sauvage dès leur capture par les autorités gouvernementales (Rosatte *et al.*, 2001; Longini Jr *et al.*, 2005). Pour ces raisons, plusieurs études utilisent les conspécifiques sains d'un hôte d'une maladie pour inférer le patron potentiel de propagation et de transmission de cette maladie (Rees *et al.*, 2009; Vander Wal *et al.*, 2012).

8.2. Résistance naturelle et exposition aux maladies

Certaines études comparent les individus sains et malades pour vérifier si la diversité génétique ou certains allèles peuvent influencer la probabilité d'infection. Par exemple, l'hétérozygotie peut améliorer les chances de survie individuelle dans des endroits affectés par la dépression de consanguinité (Lyons *et al.*, 2009) et la présence de certains allèles peut permettre de mieux ou de moins bien combattre un pathogène (Deter *et al.*, 2008). Ces études sont particulièrement intéressantes pour les maladies dont la guérison n'est pas possible et dont le taux de mortalité une fois l'apparition des premiers symptômes est près de 100%, comme la rage (Hemachudha *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2007). Puisque la guérison n'est pas possible pour ces maladies, la prévention est l'unique recours et des traits pourraient avoir évolué en ce sens. Par exemple, le système

immunitaire et/ou le comportement face aux individus donnant des signes d'infection peuvent avoir évolué pour éviter l'infection par le virus. Finalement, la résistance naturelle à une maladie peut constituer un facteur limitant sa propagation (voir King et Lively, 2012) et peut donc potentiellement être un facteur important à considérer pour inférer le patron de propagation d'une maladie.

9. Variante de la rage du raton laveur en Amérique du Nord

Parmi les pathogènes affectant les populations sauvages, le virus de la rage en est un d'importance majeure dans l'actualité canadienne (Rosatte *et al.*, 2001; Hemachudha *et al.*, 2002). Cette maladie est originaire des populations de chauve-souris des Amériques, bien qu'elle se soit propagée dans presque tous les continents du monde (Johnson *et al.*, 2010). Un des génotypes de cette maladie, la variante de la rage du raton laveur, se propage présentement dans les populations de ratons laveurs et de mouffettes rayées de l'Est de l'Amérique du Nord (Guerra *et al.*, 2003).

Le premier raton laveur rabique a été répertorié en Floride en 1947 (Rupprecht et Smith, 1994). Plus de 30 ans plus tard, en 1981, la rage a été répertoriée dans des populations de ratons laveurs à la frontière entre la Virginie et la Virginie occidentale (Rupprecht et Smith, 1994). Par la suite, la rage s'est propagée massivement sur toute la Côte Est des États-Unis et a atteint le New Hampshire ainsi que le Massachusetts en 1992 (Rupprecht et Smith, 1994). La rage a ensuite atteint l'Ontario en 1999 (Rosatte *et al.*, 2001) et le Québec en 2006 (Rees *et al.*, 2011). Depuis 2006, le Ministère des Ressources naturelles et de la Faune (MRNF) effectue des opérations de contrôle et de surveillance de la variante de la rage du raton laveur (Rees *et al.*, 2011).

Sur toute la Côte Est des États-Unis, le raton laveur et la mouffette rayée sont considérés comme les deux espèces vectrices de la variante de la rage du raton laveur (Guerra *et al.*, 2003). Cette variante est en contact relativement fréquent avec des humains et des animaux domestiques puisque ses hôtes principaux sont parmi les espèces sauvages les plus fréquemment rencontrées en environnement urbain (Broadfoot *et al.*, 2001). En élucidant les routes potentielles de propagation de la maladie, il sera possible de mieux orienter les opérations de contrôle afin de tenter d'éviter qu'elle n'atteigne des zones urbaines importantes, où le risque de contagion des ratons laveurs et des mouffettes rayées est très élevé certes, mais aussi très élevé vers des animaux de compagnie et des humains.

10. Site d'étude et échantillonnage

Les échantillons utilisés lors de cette étude proviennent de la surveillance de la rage et des opérations de vaccination effectuées par le MRNF, le Centre québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS) et l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). Ces activités se déroulent au Sud du Québec, dans les régions administratives de la Montérégie et de l'Estrie. Tous les cas de variante de la rage du raton laveur au Québec ont été répertoriés en Montérégie. Ces activités incluent des opérations de vaccinations et des récoltes d'animaux décédés par des accidents de la route, d'animaux capturés pour le commerce de la fourrure et d'animaux suspectés d'avoir des symptômes de rage. Pour chacun des animaux échantillonnés, la localisation géographique est obtenue par un système de positionnement global. Pour les analyses génétiques, nous avons récolté une biopsie au niveau de l'oreille pour chaque échantillon sain et une biopsie de cerveau pour chaque échantillon rabique.

Pour le premier chapitre, je n'ai utilisé que les échantillons de moufettes rayées, car toutes les analyses nécessaires au premier objectif pour les ratons laveurs ont été effectuées précédemment à mon arrivée au laboratoire (voir Côté *et al.*, 2012). Il était important de corriger une possible variation temporelle, et donc il était important d'avoir la même taille d'échantillons pour chaque année d'échantillonnage et une répartition spatiale similaire entre les années. Cette méthode nous a permis d'exclure la possibilité qu'une différence en taille d'échantillon ou d'aire d'étude puisse faussement nous indiquer un effet temporel dans les patrons observés. Seuls les échantillons de 2009 et de 2010 ont été utilisés, car trop peu d'échantillons de 2007 sont disponibles et les échantillons de 2008 ont une répartition spatiale limitée à environ la moitié de celles des échantillons de 2009 et de ceux de 2010, dû à une plus faible étendue des activités durant cette année. Aussi, puisque les échantillons de 2009 et 2010 avaient une répartition agrégée dans l'espace, en raison d'opérations ciblées autour de certaines villes, j'ai utilisé un sous-échantillon sélectionné de façon aléatoire stratifiée. J'ai ainsi pu obtenir un échantillonnage homogène dans l'espace pour chacune de ces deux années.

Pour le second chapitre, j'ai utilisé tous les échantillons de ratons laveurs rabiques. Puisqu'ils ont été amassés en 2007 et 2008, j'ai utilisé les échantillons sains de ces deux années pour comparer les deux états aux mêmes années, et ainsi exclure une possible variation temporelle. Puisque tous les échantillons rabiques ont été récoltés dans une zone bien définie, je n'ai utilisé que les échantillons sains récoltés dans cette zone. Puisque je ne possède pas suffisamment d'échantillons de moufettes rayées rabiques, je n'ai pu utiliser les échantillons de moufettes pour ce chapitre.

CHAPITRE 1

LACK OF GENETIC STRUCTURE AND FEMALE-SPECIFIC EFFECT OF DISPERSAL BARRIERS IN A RABIES VECTOR, THE STRIPED SKUNK (*MEPHITIS MEPHITIS*)

Introduction de l'article

L'étude de l'effet des barrières potentielles du paysage et de la distance géographique sur la structure génétique du raton laveur a été effectuée par Côté *et al.* (2012). Le but du présent article était de mesurer l'effet de ces facteurs sur l'autre vecteur de la variante de la rage du raton laveur, la mouffette rayée. Bien que plusieurs traits morphologiques et comportementaux soient similaires entre ces deux espèces, quelques différences pourraient modifier la façon dont le paysage affecte leurs structures génétiques respectives. S'il existe des différences majeures de structure génétique entre les deux espèces, effectuer les mêmes opérations de contrôle pour les deux espèces ne serait pas adéquat. Aussi, la structure génétique de la mouffette rayée n'a été étudiée que dans deux autres études. L'une a été effectuée sur une très petite aire d'étude (< 60 km) et avec un échantillon non homogène dans l'espace (Hansen *et al.*, 2003) et la seconde n'a pas examiné l'effet des éléments du paysage sur l'appareil génétique et n'a pas vérifié les différences liées au sexe (Barton *et al.*, 2010). Donc, la présente étude permet de valider les informations suggérées par ces deux études dans un cadre de recherche relativement robuste. Mon implication dans cet article a été substantielle, car j'ai aidé lors d'une opération de vaccination en automne 2010 d'où plusieurs échantillons de l'étude proviennent. J'ai aussi effectué toutes les analyses génétiques, à l'exception de l'élaboration du protocole de laboratoire et de la conception des amorces d'ADN.

Finally, I performed most of the spatial and statistical analyses and I wrote the manuscript. Fanie Pelletier and Dany Garant, my two supervisors, provided the laboratory equipment, brought essential ideas to the functioning of the study and made multiple revisions of the manuscript. Sébastien Rioux Paquette developed the analysis method by «jackknife» which is crucial for the study, in addition to verifying the other analyses and revising the manuscript. Julien Mainguy allowed me to obtain the necessary contacts to obtain the samples and the geographical maps. He also revised the manuscript several times and brought ideas.

Lack of Genetic Structure and Female-specific Effect of Dispersal Barriers in a Rabies Vector, the Striped Skunk (*Mephitis mephitis*)

Par

Benoit Talbot, Dany Garant, Sébastien Rioux Paquette, Julien Mainguy et Fanie Pelletier

Sous presse à PLoS One (19 octobre 2012)

Abstract

Evaluating the permeability of potential barriers to movement, dispersal and gene exchanges can help describe spreading patterns of wildlife diseases. Here, we used landscape genetics methods to assess the genetic structure of the striped skunk (*Mephitis mephitis*), which is a frequent vector of rabies, a lethal zoonosis of great concern for public health. Our main objective was to identify landscape elements shaping the genetic

structure of this species in southern Québec, Canada, in an area where the raccoon rabies variant has been detected. We hypothesised that geographic distance and landscape barriers, such as highways and major rivers, would modulate genetic structure. We genotyped a total of 289 individuals sampled across a large area (22 000 km²) at 9 microsatellite loci. Genetic structure analyses identified a single genetic cluster in the study area. Major rivers and highways, however, influenced the genetic relatedness among sampled individuals. Sex-specific analyses revealed that rivers significantly limited dispersal only for females while highways only had marginal effects. Rivers and highways did not significantly affect male dispersal. These results support the contention that female skunks are more philopatric than males. Overall, our results suggest that the effects of major rivers and highways on dispersal are sex-specific and rather weak and are thus unlikely to prevent the spread of rabies within and among striped skunk populations.

Introduction

Studies investigating patterns of gene flow and dispersal among and within populations can help understand evolution on ecological time scales (reviewed in Carroll *et al.*, 2007; Garant *et al.*, 2007). Gene flow and the resulting genetic structure of populations are typically shaped by landscape heterogeneity (reviewed in Epperson, 2003; Manel *et al.*, 2003; Storfer *et al.*, 2007). For example, in addition to geographical distance, landscape barriers to animal movement, whether of natural or anthropogenic origin, have been shown to often cause a reduction in gene flow among populations (Funk *et al.*, 2005; Keyghobadi *et al.*, 2005; Poissant *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2010). Landscape genetics approaches have been developed to detect reductions in gene flow caused by these elements at different spatial scales (Guillot *et al.*, 2005; McRae and Beier, 2007; Frantz *et al.*, 2010). They offer a robust framework to improve our understanding of the evolutionary processes affecting a species in a given area, as well as insights into habitat

preferences, sex-biased dispersal and community association (Blanchong *et al.*, 2008; Porlier *et al.*, 2009; Goldberg and Waits, 2010; Selkoe *et al.*, 2010).

Recently, landscape genetic approaches have been increasingly used for applied purposes (Banks *et al.*, 2005; Cushman *et al.*, 2006; Epps *et al.*, 2007; Shirk *et al.*, 2010), especially in the study and management of wildlife diseases (Russell *et al.*, 2006; Archie *et al.*, 2009; Cullingham *et al.*, 2011). As several diseases are propagated by wild animals, identifying landscape elements that can limit or prevent gene flow can be used to better target intervention actions (Blanchong *et al.*, 2008; Rees *et al.*, 2008; Cullingham *et al.*, 2009) or to make predictions about the most probable paths for disease spread (Rees *et al.*, 2009; Cullingham *et al.*, 2011). For instance, in order to prevent further raccoon rabies in Ontario, the Ontario Ministry of Natural Resources and its partners have designated oral rabies vaccination (ORV) zones on the New York/Ontario international border along the St. Lawrence River (Rosatte *et al.*, 2001) and along the Niagara River (Rosatte *et al.*, 1997), where raccoons tested positive for rabies were euthanized. The efficiency of these ORV zones can be improved if integrated along landscape features that naturally limit disease vector dispersal. Assessing the permeability of landscape elements is therefore important for such applied purposes.

Landscape features and geographic distance may influence gene flow differently for each vector species depending on their ecology, their life-history traits, and the scale at which the system is studied. Generally, geographic distance has a stronger effect on gene flow in species with a limited dispersal potential compared to those able to disperse over great distances (e.g., Peterson and Denno, 1998). For example, pairwise geographic distance explained more of the observed genetic variation between sampling sites for the American mink (8%, *Neovison vison*) (Zalewski *et al.*, 2009), than for American martens (0.3%, *Martes americana*) (Broquet *et al.*, 2006), the latter exhibiting generally greater

average dispersal distances than the former (Macdonald and Rushton, 2003). Barriers to gene flow will also have differential permeability depending on the capacity of a species to cross or bypass them and it is thus important to characterize broad and fine scale genetic structure of each specific disease vector independently.

A fine-scale genetic structure can be detected using patterns of genetic relatedness among individuals (e.g., Coltman *et al.*, 2003; Foerster *et al.*, 2006; Côté *et al.*, 2012). Such fine-scale structure analyses are helpful to assess population kin structure (Lambin and Yoccoz, 1998) and have been shown to be linked with the rate of inbreeding (e.g., Bretman *et al.*, 2011). In addition, it allows detecting landscape features that may have sex-specific effects. Male-biased dispersal and female philopatry have been suggested as possible mechanisms for inbreeding avoidance in mammals because the direction of dispersal bias is tightly linked to the mating system (reviewed in Handley and Perrin, 2007) and most mammals are polygynous with mate defence (reviewed in Greenwood, 1980). In carnivores for instance, evidence shows that most species exhibit male-biased dispersal, as previously documented in American black bears (*Ursus americanus*) (Costello *et al.*, 2008), wolverines (*Gulo gulo*) (Cegelski *et al.*, 2003) and American mink (Zalewski *et al.*, 2009).

The main objective of this study was to assess the extent of genetic structuring in striped skunks (*Mephitis mephitis*: Mephitidae) in an area where cases of the raccoon rabies variant were found in skunks and raccoons (Rees *et al.*, 2011) in order to evaluate the permeability of landscape barriers (highway and rivers) to gene flow. The striped skunk is a medium-sized nocturnal North American mesocarnivore (Rosatte and Larivière, 2003), which is often abundant in cities (Rosatte *et al.*, 1991; Broadfoot *et al.*, 2001) and is also abundant in farmsteads and cropfield edges where prey items are abundant (Larivière *et al.*, 1999; Larivière and Messier, 2000). Home range size in this species is

generally around 3 km² (Frey and Conover, 2006). It has been suggested that striped skunks in their native North American range originated from a common ancestor in the Texas-Mexico region and expanded north into several clades, one of which is present in northeastern North America, where our study took place (Barton and Wisely, 2012). Striped skunks are known to host several strains of rabies, a zoonotic disease of great concern for public health in North America (Charlton *et al.*, 1988), including the raccoon (*Procyon lotor*) variant of the rabies virus (Guerra *et al.*, 2003). This rabies variant has been involved in one of the most important outbreaks of wildlife rabies in the United States (Rupprecht and Smith, 1994). In the last decade, rabid skunks have been found in Ontario and Québec, including in our study area (Rees *et al.*, 2011). Despite the close proximity of striped skunks to human infrastructure and the zoonotic risks involved, information is still lacking about the spatial organization and movement of this species. Identifying the determinants of the genetic structure in this species could provide insights into the potential of disease spread among striped skunk populations, which could then be used to predict the extent and most probable locations of epidemiologic outbreaks.

Specifically, we tested the hypothesis that geographic distance and landscape barriers (rivers and highways) are drivers of genetic structure in our study area. The purpose of our study is to determine if some landscape barriers can be targeted to improve efficiency of ORV zones. We hypothesized that isolation by distance (IBD) in the population would be detected, because daily movement rates of skunks are thought to be small (e.g., 1.25 km, Larivière and Messier, 1998) and dispersal is typically <3 km (Rosatte and Gunson, 1984, but see Sargeant *et al.*, 1982, for a documented distance of 119 km in a marked individual). In comparison with average distances traveled by similar-size mesocarnivores, skunks can be regarded as relatively sedentary (Bjorge *et al.*, 1981). We also predicted that large rivers (physical barriers) and roads (behavioural avoidance and sources of mortality) would limit gene flow in skunks, as previously reported in other mesocarnivores (raccoons : Cullingham *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2012, and badgers *Meles*

meles : Frantz *et al.*, 2010). Finally, we hypothesized that males are more likely to disperse than females and thus, that sex-biased dispersal could be detected indirectly through differences in observed patterns of pairwise genetic relatedness in each sex. This study uses current genetic methods to provide useful information on the dispersal behavior in a lesser known rabies vector, the striped skunk.

Materials and Methods

Ethics statement

All field operations were conducted by the personnel of the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune (MRNF) Québec government agency and its partners in a disease management perspective in areas of Québec where rabies was detected. Animal trapping and handling methods complied with the Agreement on International Humane Trapping Standards (Government of Canada, 1998). Biopsy sampling protocol was approved by the Canadian Council on Animal Care (protocol numbers are CPA-FAUNE 2009-12 and CPA-FAUNE 2010-29). Captured live animals were anesthetised by trained professionals under the supervision of a veterinarian.

Study area and sample collection

Skunks were sampled over two years in a fragmented agricultural landscape in southern Québec, Canada (45° 23' N, 72° 43' W), in an area of approximately 22 000 km² (Figure 1.1). Tissue samples used in this study were collected by the MRNF and its partner

agencies in 2009 and 2010 during the surveillance and control activities conducted against the raccoon variant of rabies, such as the recovery of roadkills for rabies testing and vaccination operations (Rees *et al.*, 2011). Each time an animal was recovered, its location was recorded using a handheld global positioning system. A skin biopsy was collected from the ear with a 2-mm punch for subsequent genetic analyses. Samples were stored in 95% ethanol until DNA extraction. Because many skunks were sampled over small areas due to control operations conducted for a specific zone (≈ 20 individuals/100 km² zones), a random subset of individuals (up to 3 individuals / 25 km²) was selected for each year to generate a balanced sample over the study area (Figure 1.1).

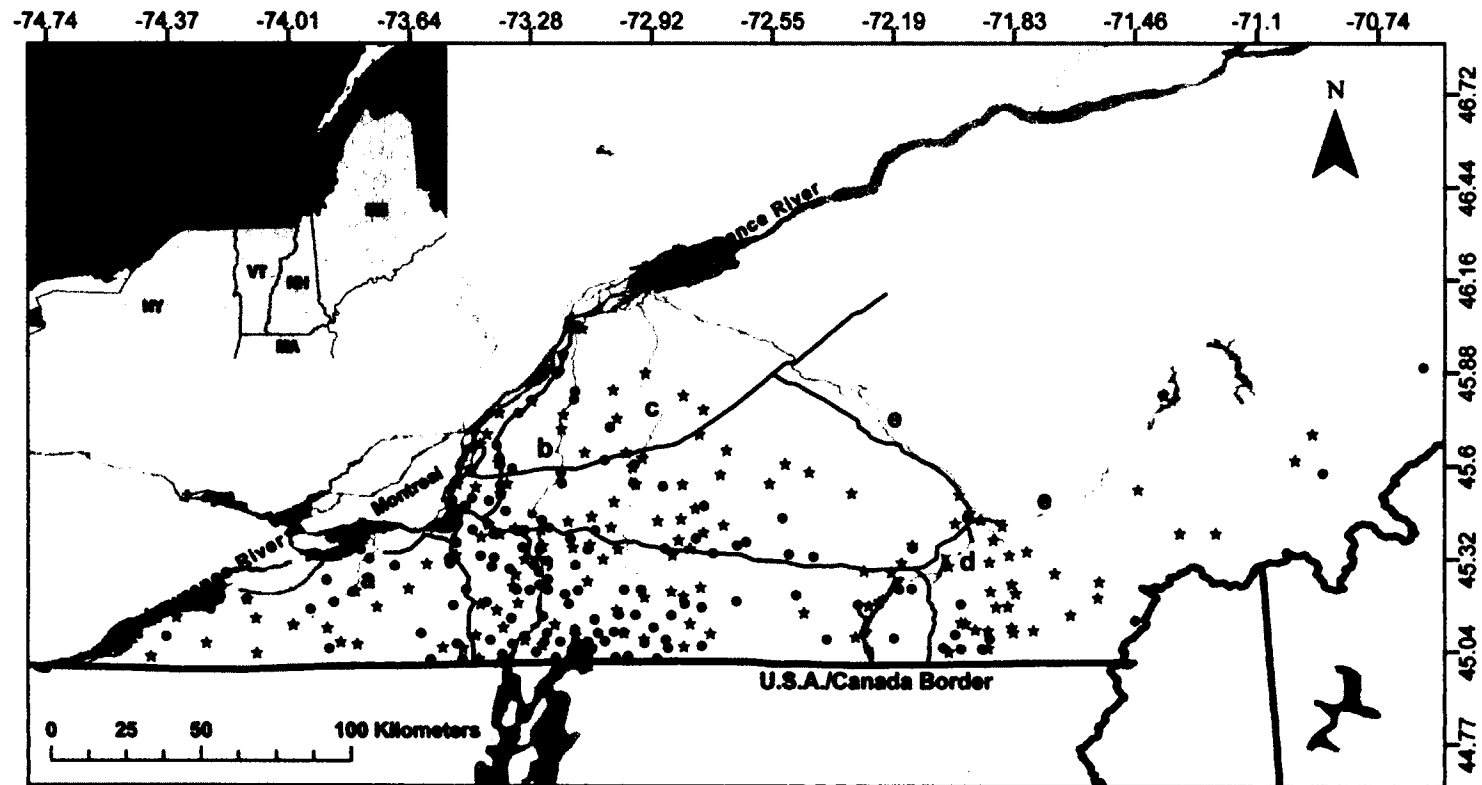


Figure 1.1. Map of the study area in Southern Quebec, Canada. The location of sampled striped skunk (*Mephitis mephitis*) in this study is shown by a black star for 2009 ($n = 148$) sampling year and a grey circle for 2010 ($n = 141$) sampling year. Grey shapes are major bodies of water such as rivers and lakes in and around the study area. Thin black lines represent major highways found in the study area. St Lawrence River and the 5 selected rivers for our analyses (a: Châteauguay, b: Richelieu, c: Yamaska, d: Magog, e: Saint-François) are identified on the map. The city of Montreal is also identified.

Landscape characterization

Major rivers and highways were mapped using aerial photographs of southern Québec provided by the MRNF (Figure 1.1) with ARCGIS 9.2 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA). Major rivers were determined based on their mean water flow (m/sec) (Schulze *et al.*, 2005). We selected rivers with a water flow greater than 0.6 m/s because they are known to maintain substantial discharge throughout the year, potentially limiting gene flow. Based on this characteristic, four rivers were retained for our analyses (rivers a, c, d and e in Figure 1.1). The Richelieu River (river b, Figure 1.1) was also considered because it was previously found to affect the genetic relatedness structure of female raccoons in this area (Côté *et al.*, 2012). Lakes in the course of each river were also taken into account. Highways were selected based on the definition provided by the Ministère des Transports du Québec, which defines major highways as being roads with high speed limit (100 km/h) and without crossroads (Figure 1.1; note that the highways considered here have no veterinary fences). To determine the number of highways and rivers separating each pair of individuals, we calculated how many times the shortest geographical distance between each pair of samples intersected with a section of a river or with a section of a highway using Hawth's Tools (an extension of ARCGIS 9).

DNA extraction and genetic analyses

DNA extraction was conducted using a salting out protocol as described in Chambers and Garant (2010). Microsatellite polymorphism was then analyzed at the following nine polymorphic loci developed specifically for striped skunks: Meph42-15, Meph22-16, Meph22-70, Meph42-73, Meme84, Meph22-14, Meme15, Meme75, Meph22-19

(Dragoo *et al.*, 2009; Munguia-Vega *et al.*, 2009); see Table S1.1 for details). DNA amplification was performed using GeneAmp System 9700 thermocyclers (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Further details on polymerase chain reaction (PCR) reagent volume, concentrations and amplification conditions for each locus are supplied in Tables S1.2 and S1.3. Genotyping was performed using an AB 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems). For each sample, a volume of 1 μ L of PCR product was added to 8.9 μ L of Hi-Di Formamide and 0.1 μ L of Genescan Liz 600 (Applied Biosystems). Allele size was scored using GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

Molecular sexing was conducted using a protocol modified from Shaw *et al.* (2003). Amplification was performed in a 25 μ l solution containing final concentrations of 0.3 μ M of each primer (LGL331 and LGL335), 0.4 mM of nucleotide triphosphate, 0.9 mM of MgCl₂, 2.5 μ g of bovine serum albumin, 1x PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris HCl, pH 8.4), 1 unit of *Taq* polymerase (Life Technologies) and 25 ng of DNA. PCR products were visualized after a 10 minutes electrophoresis migration at 300 volts on 1% agarose gels in a sodium borate buffer (10 mM NaOH pH 8.5 adjusted with H₃BO₃) with ethidium bromide. A 100-bp DNA ladder (Life Technologies) was used each time to standardize the migration.

Despite the high reliability of the method, sex could not be determined for 19% of the selected samples, possibly due to degraded DNA (some animals died several days before their recovery). Consequently, we had a smaller sample size of known-sex individuals (104 females and 129 males).

Microsatellite Polymorphism

We tested all loci for departure from Hardy-Weinberg equilibrium and calculated inbreeding coefficient (F_{is}) for each locus using the software GENEPOP 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). We also tested for linkage disequilibrium using the software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). Finally, we used CERVUS 3.0 (Marshall *et al.*, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007) to calculate the number of alleles, observed and expected heterozygosities, and to test for the presence of null alleles. Significance of these tests was assessed after Bonferroni correction (Rice, 1989).

Population Genetic Structure

To estimate the most likely number of genetic clusters in the sample, we used the Bayesian clustering software STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). We performed the analyses using a model with admixture, separate admixture coefficients (α) for each genetic cluster, allele frequencies correlated (using allele frequency prior (λ) = 1.0) among genetic clusters, and without using prior information on sampling location. For each value of K (K being the number of genetic clusters considered: from 1 to 5), we ran 10 independent models with 500,000 iterations, plus a burn-in period of 100,000 iterations. Means of the ln-probabilities of all independent runs for a given K were then calculated. We ran these analyses for all individuals together and then for each sex separately.

Relatedness Genetic Structure

To estimate the effects of landscape features on pairwise genetic relatedness among individuals, we used Multiple Regressions on distance Matrices (Lichstein, 2007). This method is an extension of Mantel tests (Mantel, 1967) and partial Mantel tests (Smouse *et al.*, 1986) with more than two explanatory matrices, and we used permutations to calculate type 1 error probability values (Legendre *et al.*, 1994). These analyses account for pseudo-replication in pairwise individual relationships and thus allow regression on distance matrices. We performed Multiple Regressions on distance Matrices analyses using the package ECODIST V1.2.2 (Goslee and Urban, 2007) in R 2.11.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), with 10,000 permutations and Pearson's correlation coefficient. Genetic distances among individuals were calculated using the pairwise genetic relatedness (r_{xy}) estimator of Wang (2002), with the program SPAGEDI V1.3 (Hardy and Vekemans, 2002). Relatedness estimators are measures of genetic similarity between pairs of individuals. In the analyses, we used $1 - r_{xy}$ to generate a pairwise genetic distance metric, as in Côté *et al.* (2012). Geographic distance (km) between each pair of individuals was measured using Hawth's Tools to account for a possible pattern of IBD in our study system. Matrices of geographic distances (km), number of major rivers, number of highways and year of sampling (to assess temporal stability) between each pair of individuals were used both in separate models (univariate analyses) and in a single model where total variance explained was parted among the four factors (multivariate analyses). We also ran the analyses for each sex separately to test for differences between sexes. In each case, we applied jackknife resampling, removing one individual from each replicate, to estimate the standard error of model coefficients following Efron and Tibshirani (1993). This allowed the computation of 95% confidence intervals. In addition, it allowed testing whether slopes estimated for each sex in multivariate models were significantly different or not, using Student's *t* test.

Results

Microsatellite Polymorphism

A total of 289 skunks were genotyped at nine microsatellites. Number of alleles identified per locus varied between 7.0 and 19.0 (mean = 11.9) and expected heterozygosity varied between 0.615 and 0.899 (mean = 0.807; see Table 1.1). We found neither a significant heterozygote deficit nor excess in our sample, and no evidence suggesting the presence of null alleles (lower than 5 %, Table 1.1) or linkage disequilibrium (results not shown).

Population Genetic Structure

The results obtained with STRUCTURE indicated that the most likely number of genetic clusters was $K=1$ (Figure 1.2), suggesting that striped skunks found in our study area were not subdivided in many distinct clusters. When sexes were analysed separately, STRUCTURE also provided evidence for $K=1$ (results not shown), suggesting that the genetic structure within each sex was similar to that detected using the whole sample.

Table 1.1. Number of alleles (A), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, inbreeding coefficient (F_{is}), and the probability for null alleles for the nine microsatellite loci of the striped skunk (*Mephitis mephitis*) used in our study in Southern Quebec, Canada (N=289), 2009 and 2010.

Locus	A	H_O	H_E	F_{is}	Null alleles
Meph42-15	7	0.578	0.615	0.060	0.033
Meph22-16	10	0.752	0.780	0.036	0.015
Meph22-70	19	0.877	0.899	0.024	0.012
Meph42-73	13	0.801	0.829	0.034	0.016
Meme84	12	0.815	0.852	0.043	0.021
Meph22-14	15	0.869	0.852	-0.019	-0.011
Meme15	9	0.751	0.765	0.018	0.012
Meme75	13	0.876	0.871	-0.005	-0.004
Meph22-19	9	0.782	0.804	0.028	0.015
Overall	11.9	0.789	0.807	0.024	N/A

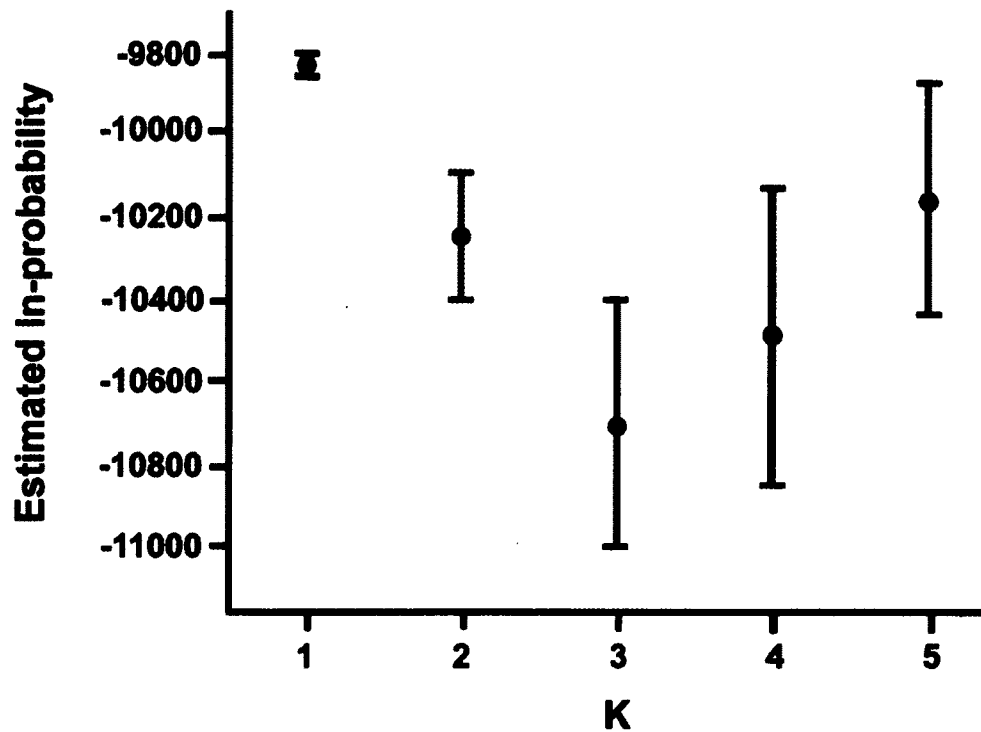


Figure 1.2. Number of genetic clusters observed in the study area. Mean and standard deviation of estimated ln-probabilities of data are presented for genetic clusters $K = 1$ to 5 , calculated with the STRUCTURE software for striped skunks (*Mephitis mephitis*) in the study area in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010.

Relatedness Genetic Structure

Univariate regression analyses showed significant relationships between geographic distance, number of major rivers, number of highways and genetic distance among individuals (models 1, 2 and 3 in Table 1.2). However, multivariate regression analysis only recovered a significant relationship for rivers and a marginally non-significant relationship for highways, whereas the effect of geographic distance was no longer significant (model 5 in Table 1.2). This loss of significance observed here is likely due to collinearity between geographic distance and barrier variables ($r = 0.705$ with number of rivers and $r = 0.451$ with number of highways). No significant effect of the year of sampling was detected (models 4 and 5 in Table 1.2).

In the analyses performed for each sex separately, differences in the association between pairwise genetic relatedness and landscape features were observed between sexes. Univariate regression analyses (models 1, 2 and 3 in Table 1.3) again showed positive and significant relationships between geographic distance, number of major rivers, number of highways and genetic distance for females, but showed only non-significant relationships for males. In females, multivariate regression analyses also showed a significant and positive effect of major rivers and a marginally non-significant and positive effect of highways on genetic distance among individuals, but no effect of geographic distance (model 5 in Table 1.3). In males, multivariate regression analyses also showed that none of the landscape features considered constituted a significant predictor of the genetic distance among males (model 5 in Table 1.3). Despite a 20-fold difference, slopes were not statistically different between sexes (Table 1.3), which is a reflection of the large standard errors for males. Again, no significant effect of the year of sampling was detected (models 4 and 5 in Table 1.3).

Table 1.2. Results of univariate and multivariate regression analyses of genetic distance matrices with the MRM (Lichstein, 2007), using 10,000 permutations, for striped skunks (*Mephitis mephitis*) originating from Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010.

Type of test	Model	Explanatory variable(s)	Slope (95% CI)	P
Univariate	1	Geographic distance	0.0002 (0.0001,0.0003)	0.026
	2	Number of rivers	0.0089 (0.0041,0.0137)	< 0.001
	3	Highways	0.0069 (0.0023,0.0115)	0.002
	4	Year	-0.0002 (-0.0045,0.0041)	0.88
Multivariate	5	Geographic distance	-2x10 ⁻⁵ (-0.0002,0.0002)	0.83
		Rivers	0.0073 (0.0008,0.0138)	0.007
		Highways	0.0051 (-0.0001,0.0103)	0.052
		Year	-0.0008 (-0.0052,0.0036)	0.59

Table 1.3. Results of univariate and multivariate regressions analyses of genetic distance matrices with the MRM (Lichstein, 2007), using 10,000 permutations for each sex separately in striped skunks (*Mephitis mephitis*) originating from Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (*P* values for slopes between sexes were calculated using Student's *t* test).

Sex		Females			Males		<i>P</i> of slope difference between sexes
Type of test	Model	Explanatory variable	Slope (95% CI)	<i>P</i>	Slope (95% CI)	<i>P</i>	
Univariate	1	Geographic distance	0.0003 (0.0001,0.0005)	0.011	0.0001 (-0.0001,0.0003)	0.27	-
	2	Number of rivers	0.0154 (0.0070,0.0238)	< 0.001	0.0048 (-0.0043,0.0139)	0.26	-
	3	Number of highways	0.0129 (0.0038,0.0220)	0.001	0.0036 (-0.0041,0.0113)	0.34	-
	4	Year	0.0059 (-0.0113,0.0231)	0.46	0.0016 (-0.0105,0.0137)	0.73	-
Multivariate	5	Geographic distance	-0.0001 (-0.0005,0.0003)	0.56	0.0001 (-0.0002,0.0004)	0.55	0.42
		Number of rivers	0.0138 (0.0025,0.0250)	0.005	0.0007 (-0.0109,0.0123)	0.89	0.11
		Number of highways	0.0088 (-0.0017,0.0193)	0.058	0.0017 (-0.0068,0.0102)	0.70	0.30
		Year	0.0053 (-0.0117,0.0223)	0.51	0.0018 (-0.0102,0.0138)	0.70	0.74

Discussion

The goal of our study was to investigate the population genetic structure of the striped skunk in a heterogeneous landscape in southern Québec, Canada. We hypothesised that geographic distance and landscape barriers, such as highways and major rivers, would create genetic structure for this species in our study area, and that structure would be greater for females than for males. Our results suggest the presence of a single genetic cluster at the spatial scale studied (22 000 km²). Using a pairwise genetic relatedness estimator at the individual level, however, we found that landscape features, such as highways and major rivers, influenced the structure of genetic relatedness between individuals and especially females. Our results thus support the contention that males disperse more than females in this species and would likely be more active vectors of rabies propagation.

Population genetic structure

Analyses performed with STRUCTURE suggested a single genetic cluster, indicating a low level of genetic differentiation over our study area. Similar results were obtained in two studies in the USA on this species. No genetic structure was found among groups of skunks in a 61.6 km² study area in Texas (Hansen *et al.*, 2003), and a more recent study also failed to find significant genetic population structure over a larger area encompassing parts of North Dakota to Oklahoma (1,250 km², Barton *et al.*, 2010). Altogether, our results and previous evidence suggest a relatively high level of gene flow among groups of skunks which prevents population differentiation over a large scale. It should also be noted that a lack of genetic structure was reported for raccoon individuals sampled in southern Québec (over the same area as in our study – see Côté *et al.*, 2012),

suggesting that admixture among groups of individuals might be a common pattern for these two mesocarnivores in this area.

Relatedness Genetic Structure

At first, univariate regression analyses assessing the effect of geographic distance on pairwise genetic relatedness revealed significant patterns of isolation by distance (lower relatedness among individuals located further apart). However, when major rivers and highways were taken into account in multivariate analyses, the IBD signal was no longer detected. In cases where past or current barriers to gene flow are present in a study area, a relationship between geographic distance and genetic distance might potentially reflect the effect of barriers to gene flow rather than the simple effect of geographic distance (e.g., Trénel *et al.*, 2008; Chambers and Garant, 2010).

We also found that major rivers and, to some extent, highways affected genetic relatedness of striped skunk individuals sampled in southern Québec and that this effect was detected in females but not in males. More specifically, female individuals located on opposite sides of these landscape elements were generally less related than individuals located on the same side. A similar effect was detected for raccoons separated by the Richelieu River in this area (river b on Figure 1.1; Côté *et al.*, 2012). Individual raccoons that were separated by the Richelieu River were more distant genetically than individuals located on the same side and this effect was detected in females, but not in males (Côté *et al.*, 2012). Our results are also similar to those reported in a study of a badger population structure in England where the presence of a large river and motorway were shown to influence patterns of relatedness among individuals (Frantz *et al.*, 2010). In this previous study, however, the possibly differential effect on both sexes was not considered.

Previous evidence, obtained from studies using live trapping and radio-tracking methods, suggested a greater dispersal in male than in female striped skunks (Sargeant *et al.*, 1982; but see also Bjorge *et al.*, 1981; Rosatte and Gunson, 1984). Furthermore, in their study of skunks in Texas, Hansen *et al.* (2003) reported that males within a given sampled group had lower average genetic similarity than females of the same group, also suggesting greater dispersal for males. Here, we found that genetic distance among males was not affected by the presence of highways and major rivers, also suggesting a stronger dispersal in males. Stronger male dispersal and female philopatry are thus also consistent with the patterns observed in the majority of mammals (reviewed in Greenwood, 1980; Handley and Perrin, 2007).

Studies of habitat selection have shown that skunks are often found near roads. For instance, Frey and Conover (2006) showed that skunks tend to include roadsides in their home range more often than by chance and Ten Hwang *et al.* (2007) found that den sites were often closer to roads than to random sites. These studies suggest that striped skunks may often attempt to cross roads. In contrast to this presumption, our results suggest a marginally positive effect of the number of roads on female genetic distance. One possible explanation for these seemingly opposing results is that the study by Frey and Conover (2006) was conducted in an area where most roads are secondary roads (Bear River Migratory Bird Refuge, United States) while here only highways (higher driving speed limit and more driving lanes) were considered in our analysis. Thus, while skunks could use areas along small roads to increase their foraging opportunities, they probably avoid crossing large highways. While this still remains to be properly tested, we suggest the existence of a threshold in the permeability of the roads under which striped skunks may attempt to cross them (e.g., width, noise, traffic flow).

Our study is the first to characterize fine-scale genetic differentiation and population structure in striped skunks over a large-spatial scale. Although we found no evidence of strong genetic structuring over the scale of our study area, our results indicate reduced dispersal across rivers and highways and suggest that the effects of these barriers mostly affect females. Our study also provides evidence for male-biased dispersal supporting the hypothesis of sex differences in dispersal in this species and thus, our results offer additional insights into the dispersal behaviour of the striped skunk.

From a disease management perspective, our results indicate that major roads and rivers are insufficient to halt or slow the spread of rabies in striped skunks. Using oral rabies vaccination over the landscape, regardless of the presence of barriers, is thus essential in an attempt to eradicate rabies.

Acknowledgments

Thanks are given to all students, trainees, research assistants and coordinators who helped in this project. Special thanks are given to Hélène Presseault-Gauvin and Jennifer Chambers for their help with laboratory work. The Centre québécois sur la santé des animaux sauvages (especially Kathleen Brown) and the MRNF (especially Pierre Canac-Marquis and Fr  d  rick Leli  vre) are also thanked for the tissue samples collected and provided for the genetic analyses conducted in this study. Finally, Paul Sunnucks, Eric Vander Wal and two anonymous reviewers offered valuable comments on the manuscript.

Supplementary material

Table S1.1. Marker name, GenBank accession number, primer sequences, fluorescence dye used (on the forward primer), repetition pattern and lengths of alleles for the nine microsatellite loci used in this study in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (Dragoo *et al.*, 2009; and Munguia-Vega *et al.*, 2009).

Marker Name	# GenBank	Primer Sequences	Dye	Repetition Pattern	Length of alleles (bp)
Meph42–15 ¹	EU623429	F: CATTGGAACGATATTCTCCCATCC R: CTGACGTTTCTCAGCTGTTTAGGAAG	PET	(CA) ¹⁵	175–195
Meph22–16 ¹	EU623424	F: GATCCCCCAAACACAAAACTATG R: GCTGGATAGCGCTGGCATG	FAM	(GT) ¹⁷	260–278
Meph22–70 ¹	EU623427	F: CAGATGCATCAGCAACGATTC R: GAGTGTTGCATTTCAGCCTGTG	VIC	(CA) ²⁴	183–231
Meph42–73 ¹	EU623432	F: AAAGGACAATCCCACAGGTCT R: TGGACATGGAATTCTGGTTG	FAM	(CA) ¹⁴	142–166
Meme84 ²	GQ453416	F: GCAAAGGATATATTTGATAAGGGATT R: AATGGCTTTGTTTCCAGCAG	NED	(CA) ¹⁵	149–176
Meph22–14 ¹	EU623423	F: CTTTTGGGTCATTAGTGCATTTATG R: GGAAAGAGGAAAGAAAACCCATG	VIC	(GT) ²⁴	241–269
Meme15 ²	GQ453410	F: CCAGGAAAGCCACTGAAAGA R: TCCTTACACGCTCCTTCTGC	VIC	(GT) ²⁰	153–169
Meme75 ²	GQ453413	F: GTGTAGCTCTTCAGAGATGGATAGG R: TTCCAGGATGAACCAGGATG	FAM	(GT) ²²	137–162
Meph22–19 ¹	EU623425	F: CAGGCATCTTTGTAGGGAAGG R: AACATTCCCGACCAGCAAC	VIC	(CA) ²²	309–331

Table S1.2. Polymerase chain reaction reagent volume and concentrations (final volume of 10 μ L per sample with 10 ng of DNA) for the nine microsatellite loci used in this study in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (Modified from Dragoo *et al.*, 2009; and Munguia-Vega *et al.*, 2009).

Reagent	Microsatellite loci				
	Meme75 Meph42-15 Meph22-70	Meph22-16 Meph42-73	Meme84 Meme15	Meph22-14	Meph22-19
PCR buffer*	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂ (mM)	2.5	2.5	3	2.5	3
dNTPs (mM)	0.08	0.08	0.08	0.14	0.08
BSA (μ g)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Forward primer (μ M)	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02
Reverse primer (μ M)	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02
<i>Taq</i> polymerase (unit)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

*1X PCR buffer 10 mM of Tris-HCl pH 9.0, 5 mM KCl, Triton X-100 1% and Tween-20 1%

Table S1.3. Amplification conditions for the nine microsatellite loci used in this study in Southern Quebec, Canada, in 2009 and 2010 (Modified from Dragoo *et al.*, 2009; and Munguia-Vega *et al.*, 2009).

PCR	Amplification conditions	Loci
1	94 °C 5 min, 40 cycles at 94 °C 30 s, 65°C 45 s, 72 °C 45 s, and 72 °C 10 min	Meph42-15, Meph22-16
2	94 °C 5 min, 30 cycles at 94 °C 30 s, 61 °C 45 s, 72 °C 45 s, and 72 °C 10 min	Meph22-70
3	94 °C 5 min, 40 cycles at 94 °C 30 s, 61 °C 45 s, 72 °C 45 s, and 72 °C 10 min	Meph42-73, Meme84, Meph22-14, Meme15
4	94 °C 5 min, 40 cycles at 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, and 72 °C 7 min	Meme75, Meph22-19

CHAPITRE 2

GENETIC STRUCTURE AND DIVERSITY AMONG RABID AND NONRABID RACCOONS

Introduction de l'article

Plusieurs études en génétique du paysage qui s'intéressent aux hôtes de maladies potentiellement graves pour la faune sauvage ou les humains se basent sur des individus sains pour éviter les zoonoses aux manipulateurs. Or, plusieurs critiques découlent du fait que le comportement d'un individu infecté par une maladie neurodégénérative, comme la rage ou la maladie débilitante chronique, puisse être très différent de celui d'un individu sain. Donc, l'objectif de cet article était, en premier lieu, de vérifier s'il y a une possibilité que cette différence de comportement modifie la structure génétique chez des individus infectés par rapport aux individus non infectés. Si tel était le cas, nous nous attendions à observer une structure génétique différente entre les individus des deux états, car les individus infectés, présentant la plupart du temps un comportement hyperexcitable, auraient tendance à parcourir de plus grandes distances, et il serait possible que ces individus aient quitté leur population d'origine. Sinon, nous nous attendions à observer aucune structure entre les deux états, car la plupart des individus proviendraient de la même population. Le deuxième aspect concerne la diversité génétique, puisqu'elle peut fournir une indication sur un taux d'immigration provenant de populations adjacentes différent entre les deux états (rabiques vs. non rabiques). Par ailleurs, la diversité génétique pourrait possiblement limiter la propagation de certaines maladies et il était intéressant de vérifier si c'est le cas pour les rats laveurs affectés par la rage. Mon

implication dans cet article a été substantielle, car j'ai récolté des biopsies de cerveaux d'individus rabiques dans un laboratoire d'étude de la rage à niveau de confinement 3 et j'ai effectué les analyses de laboratoire sur ces échantillons. Finalement, j'ai effectué certaines des analyses statistiques et écrit le manuscrit. Fanie Pelletier et Dany Garant, mes superviseurs, ont fourni le matériel de laboratoire, des idées et ont révisé plusieurs fois le manuscrit. Sébastien Rioux Paquette a effectué une grande partie des analyses statistiques, a donné des idées et a révisé le manuscrit. Julien Mainguy a permis d'obtenir les contacts nécessaires pour obtenir les échantillons, il a aussi révisé le manuscrit et a aussi apporté des idées.

Genetic Structure and Diversity Among Rabid and Nonrabid Raccoons

Par

Benoit Talbot, Dany Garant, Sébastien Rioux Paquette, Julien Mainguy et Fanie Pelletier

Soumis à Journal of Wildlife Management (9 octobre 2012)

Abstract

Population genetics studies are often conducted on uninfected hosts because acute zoonotic diseases pose significant health risks to humans and are thus more difficult to obtain. Predictions of disease spread potential thus presuppose that infected and uninfected individuals exhibit similar movement behaviors and genotypes. Here, we genotyped 84 rabid and 113 nonrabid raccoon (*Procyon lotor*) samples in an epizootic

area in Southern Quebec, Canada, over 10 microsatellite loci. We found no difference in genetic structure and genetic diversity among nonrabid and rabid raccoons (*Procyon lotor*). Our results thus validate the characterization of the genetic structure of nonrabid raccoons as a way to infer rabies propagation patterns in the wild.

Introduction

Population genetics approaches are becoming widely used in management of wildlife diseases (Real and Biek, 2007; Archie *et al.*, 2008; Biek and Real, 2010) because of their utility in assessing transmission processes (Cottam *et al.*, 2008), retracing epidemiological history (Bryant *et al.*, 2007), and identifying drivers and barriers of disease propagation (Blanchong *et al.*, 2008). Research on zoonotic wildlife diseases through the study of infected individuals imposes logistic constraints because of inherent risks of spreading highly infectious or recombinant pathogens (Haupt, 1999; Dugan *et al.*, 2008). Thus, the sampling of infected individuals is often complicated for multiple reasons (e.g., greater containment levels, neutralization of pathogens, hiring of trained professionals). Instead of directly monitoring the dispersal behaviour of infected individuals, in many cases researchers rather rely on uninfected hosts to characterize the genetic structure, to infer patterns of dispersal or to predict disease spread potential in a given population or species (Cullingham *et al.*, 2009; Rees *et al.*, 2009; Vander Wal *et al.*, 2012). The main assumption underlying this approach is that dispersal (and genetic diversity in general) is equivalent among uninfected and infected individuals. The validity of this assumption, however, still remains to be tested for several diseases and species (Biek and Real, 2010). If the probability of long-distance disease transmission is high relative to the chance of immigrating and successfully breeding, then genetic approaches aimed at quantifying gene flow among populations may underestimate disease spread. For instance, the presence of a hybrid zone acting as an important barrier

to gene flow among 2 rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) subspecies on the Iberian peninsula (Geraldès *et al.*, 2006) did not prevent nor slow the rate of spread of the rabbit hemorrhagic virus in that area (Muller *et al.*, 2009).

Rabies is a lethal zoonosis in mammals, including humans, present in most parts of the world (Rupprecht *et al.*, 2002). In the last few decades, the raccoon (*Procyon lotor*) variant of the disease has spread throughout the North American Eastern seaboard (Rupprecht and Smith, 1994). Control operations have been deployed in Southern Quebec and Ontario, Canada, since 1999 (Rosatte *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2011), and studies owing to predict its propagation pattern by means to its vectors were conducted (Rees *et al.*, 2008; Cullingham *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2012). The main concern is that around 80% of rabid individuals exhibit a hyperexcitable behavior (Leung *et al.*, 2007) which could lead to an unpredictable dispersal behavior of its hosts, well outside their usual home range (Bowen-Davies and Lowings, 2000*a, b*). However, the direct comparison of the genetic structure derived from rabid individuals to that obtained in non rabid ones has yet to be performed.

The first objective of this work was to assess whether a difference in genetic substructure pattern could be detected between rabid and nonrabid raccoons (*Procyon lotor*) from a rabies epizootic area in Southern Quebec, Canada. Only 1 genetic cluster was observed for a sample of nonrabid raccoons from the same study area in a previous study by Côté *et al.* (2012). We hypothesized that if a difference in dispersal pattern between rabid and nonrabid individuals was present, we would detect substructure in a pool of rabid and nonrabid individuals, arising from the presence of rabid individuals that would be migrants in our study area. The study area is delimited by 3 rivers, and rivers have been found to act as semipermeable barriers to raccoon gene flow, both in our study area

(Richelieu river; Côté *et al.*, 2012) and elsewhere in Northeastern North America (Smith *et al.*, 2002; Cullingham *et al.*, 2009)

Secondly, we compared genetic diversity of rabid and nonrabid raccoons using 4 metrics (observed and expected heterozygosity, allelic richness and inbreeding coefficient), as these may further reveal the presence of immigrants in the pool of individuals. Even though it is often referred to as the inbreeding coefficient, F_{IS} is first and foremost an indication of deviation from Hardy-Weinberg frequencies within subpopulations (Allendorf and Luikart, 2007), and thus we hypothesized that it may be higher in rabid individuals, similarly to expectations for the dispersing sex in sex-biased dispersal investigations (Goudet *et al.*, 2002). In addition, even though neutral microsatellite markers are generally not used towards this goal, there is a general interest in studying the possible genetic predisposition of individuals to be resistant to infections (see Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2005; Pincus *et al.*, 1971), which in turn could possibly influence disease spread (King and Lively, 2012). Studies on functional genes such as those found in the major histocompatibility complex (MHC) have shown that some specific alleles (Croisetière *et al.*, 2008), number of different alleles (Lenz *et al.*, 2009) or heterozygosity (Oliver *et al.*, 2009) can influence resistance or susceptibility against a specific pathogen or parasite. Nonetheless, either because of linkage with loci under selection or because they reflect of genome-wide heterozygosity, microsatellite loci sometimes are indicators of disease susceptibility. In a study of tuberculosis in wild boars (*Sus scrofa*), Amos and Acevedo-Whitehouse (2009) showed that the presence of a single allele at a microsatellite locus was a highly significant predictor of whether the infection was localized or spread throughout the body of the host. Additionally, heterozygote-fitness correlations have been found in phenotypic traits such as a higher resistance to pathogens and parasites (Rijks *et al.*, 2008). Thus, since we were able to collect a large sample of rabid individuals to carry out this work, we also tested for association between genotypes and rabies prevalence in the studied raccoon population.

Materials and Methods

Study area

Rabid and nonrabid raccoons were sampled by the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune (MRNF) Quebec government agency during the surveillance and control operations conducted in 2007 and 2008 in Southern Quebec (Rees *et al.*, 2011). We analysed raccoon samples collected in the area where rabid animals were found (center of sampling locations 45.15 N, 73.17 W), which is delimited by the Richelieu, St. Lawrence, St. François, and Magog Rivers, North of the U.S.A border (see also Rees *et al.*, 2011; Côté *et al.*, 2012). Collected individuals were tested for rabies according to a fluorescent antibody test at the Canadian Food Inspection Agency (CFIA).

DNA Extraction and Genetic Analyses

We conducted DNA extractions of brain or ear samples using the protocol described in Chambers and Garant (2010). We genotyped our rabies positive (n=84) and rabies-negative (n=113) samples using ten polymorphic microsatellite loci developed for raccoons. For details about the genetic analyses performed, see Côté *et al.* (2012).

Genetic structure

We used the Bayesian approach in Geneland 4.0.3 (Guillot *et al.*, 2005) to assess if a genetic substructure was present between rabid and nonrabid raccoons. We performed the analyses using 5,000,000 Markov chain Monte Carlo iterations and 5,000 of thinning, correlated allele frequencies, and no spatial model. For each iteration, we calculated the most likely number of clusters (K) between 1 to 10. Support for K=1, as found in Côté *et al.* (2012) in the same study area with nonrabid individuals, would indicate that rabid and nonrabid individuals likely represent a single genetic cluster, whereas K>1 would suggest the presence of genetic substructuring. We also employed the Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) Bayesian approach to confirm the results.

Genetic diversity

We calculated allelic richness (number of alleles corrected for sample size), observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E), and inbreeding coefficient (F_{IS}) for each locus and across all markers using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995) and the R (Venables *et al.*, 2012) library PopGenKit (Rioux Paquette, 2011). We estimated standard errors and 95% confidence intervals for multilocus H_O , H_E , and F_{IS} by using a locus bootstrapping procedure implemented in PopGenKit for each parameter in the rabid and nonrabid group (1,000 replicates). Locus resampling was chosen over bootstrapping individuals because resampling individuals is known to largely underestimate variance in population genetic parameters (e.g. Neff and Fraser, 2009). However, in order to estimate the standard error of allelic richness, jackknife replicates were computed, in which 60 individuals were retained to account for different sample sizes between groups, employing the rarefaction procedures in PopGenKit. Single-locus standard errors were estimated by bootstrapping individuals 1,000 times. All multilocus and single-locus estimates from both groups of

individuals were compared with standard *t*-tests. Additionally, as an alternative method to test whether rabid individuals showed significantly different patterns of genetic diversity, we performed a generalized linear mixed model analysis to test whether infection status had an effect on the heterozygote probability of each genotype, and controlling for the identity of the sample and the locus. This binomial mixed model was computed with the *lmer* function implemented in the R library lme4 (Bates *et al.*, 2012). Finally, we tested for genotype-phenotype associations (comparing rabid and nonrabid individuals) using the GEPHAST macro of Amos and Acevedo-Whitehouse (2009). This method not only tests for heterozygote-fitness correlations, but also looks for any association between genotypes at all markers and phenotype through chi-squared tests (Amos and Acevedo-Whitehouse, 2009).

Results

Genetic structure analysis using the Geneland approach comparing rabid and nonrabid samples supported $K=1$ as being the most likely number of genetic cluster (Figure 2.1). Only 1 genetic cluster was found in the study area despite considering rabid and nonrabid samples. Ten independent runs showed the same result. The Structure approach confirmed those results, with a mean \ln -probability of -8139.96 ± 0.10 for $K=1$ and a mean \ln -probability of -8680.46 ± 127.99 for $K=2$.

Resampling analyses did not reveal any difference between rabid and nonrabid individuals. Variation in multilocus values was similar between the 2 groups (Figure 2.2). H_O was (mean \pm SE) 0.814 ± 0.070 in nonrabid individuals and 0.827 ± 0.076 in rabid ones ($P = 0.90$); H_E was respectively 0.836 ± 0.063 and 0.846 ± 0.055 ($P = 0.90$); F_{IS} was 0.032 ± 0.021 and 0.055 ± 0.019 ($P = 0.89$); and allelic richness (corrected for 60

individuals) was 11.85 ± 0.72 and 12.05 ± 0.47 ($P = 0.82$). None of the comparisons for each marker were significant; those are indicated in Table 2.1. The generalized linear mixed model analysis showed no significant effect of infection status on the heterozygote probability across all markers (coefficient = 0.08 ± 0.12 ; $P = 0.51$). Genotype-phenotype association tests suggested that genotypic frequencies were different for marker PLM10 ($P = 0.024$), although this result was not significant following a Bonferroni correction (see Figure S2.1 for distribution of genotypes at marker PLM10).

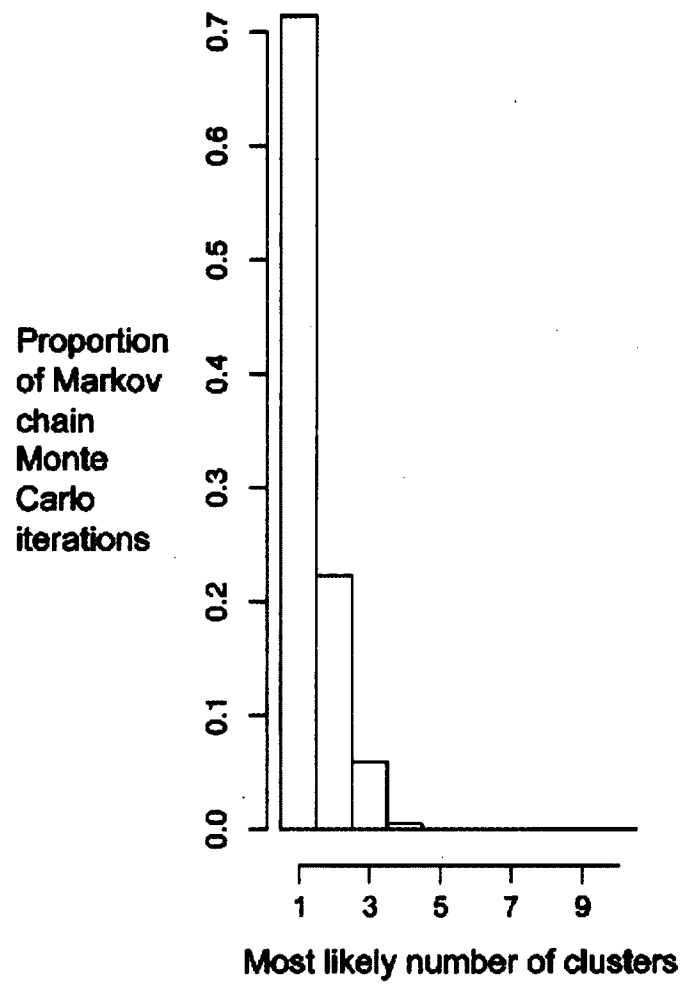


Figure 2.1. Most likely number of genetic clusters for each Markov chain Monte Carlo iteration in a study on raccoons in Southern Quebec, Canada, in 2007 and 2008.

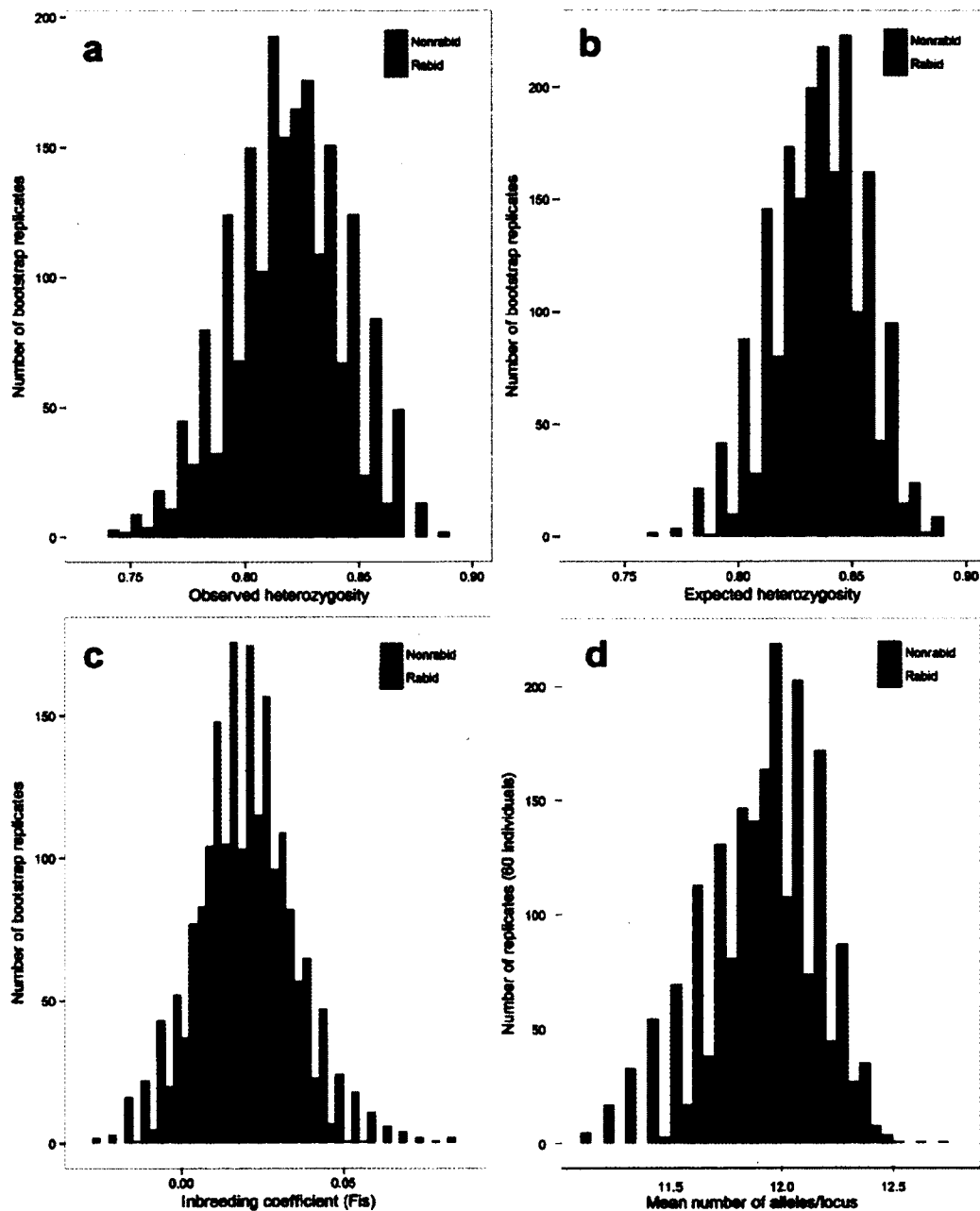


Figure 2.2. Distribution of multilocus genetic parameter values calculated in 1,000 bootstrap (a-c) and jackknife (d) replicates in rabid and nonrabid raccoons sampled in Southern Quebec, Canada, in 2007 and 2008: (a) observed heterozygosity H_O ; (b) expected heterozygosity H_E ; (c) inbreeding coefficient F_{IS} ; (d) allelic richness (corrected for 60 individuals).

Table 2.1. Single locus analyses of observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), inbreeding coefficient (F_{IS}) and allelic richness, in rabid (+) and nonrabid (-) raccoons sampled in Southern Quebec, Canada, in 2007 and 2008 (SE are indicated in parentheses).

Locus	H_O		H_E		F_{IS}		Allelic richness	
	+	-	+	-	+	-	+	-
	0.763	0.733	0.765	0.760	0.003	0.035	5.00	5.58
PLM06	(0.048)	(0.041)	(0.010)	(0.013)	(0.055)	(0.055)	(0.00)	(0.49)
	0.878	0.896	0.881	0.880	0.004	-0.019	12.70	12.18
PLOM2	(0.043)	(0.025)	(0.009)	(0.006)	(0.033)	(0.033)	(0.48)	(0.74)
	0.819	0.778	0.806	0.806	-0.016	0.035	6.00	6.00
PLOM3	(0.042)	(0.045)	(0.006)	(0.007)	(0.049)	(0.048)	(0.03)	(0.05)
	0.651	0.688	0.766	0.711	0.151	0.032	9.38	9.73
PLM20	(0.052)	(0.044)	(0.024)	(0.030)	(0.065)	(0.049)	(0.69)	(0.49)
	0.857	0.894	0.932	0.931	0.080	0.040	20.30	19.85
PLO2117	(0.034)	(0.033)	(0.006)	(0.004)	(0.040)	(0.030)	(0.70)	(0.96)
	0.892	0.815	0.893	0.894	0.002	0.089	15.33	14.22
PLOM15	(0.031)	(0.041)	(0.011)	(0.009)	(0.038)	(0.041)	(0.70)	(0.75)
	0.869	0.892	0.894	0.867	0.028	-0.028	19.59	21.20
PLO214	(0.039)	(0.031)	(0.010)	(0.010)	(0.039)	(0.034)	(0.99)	(1.74)
	0.753	0.748	0.805	0.787	0.065	0.051	7.00	6.42
PLOM17	(0.054)	(0.050)	(0.015)	(0.008)	(0.057)	(0.054)	(0.03)	(0.60)
	0.904	0.850	0.867	0.866	-0.042	0.018	9.73	9.46
PLM10	(0.031)	(0.031)	(0.010)	(0.007)	(0.036)	(0.040)	(0.44)	(0.57)
	0.872	0.845	0.853	0.847	-0.022	0.001	15.51	13.89
PLOM20	(0.038)	(0.038)	(0.014)	(0.013)	(0.040)	(0.040)	(0.62)	(0.83)

Discussion

Our analyses revealed no genetic substructuring among rabid and nonrabid raccoons from a rabies epizootic area in Southern Quebec, Canada. The lack of genetic structuring among rabid and nonrabid raccoons in our study area supported the assumption that patterns of gene flow among nonrabid hosts can reasonably be used to make inferences about terrestrial rabies spread in the wild. Our results are in accordance with previous observations on the movements of nonrabid and rabid raccoons (Rosatte *et al.*, 2006) suggesting that movement distances were not different between rabid and nonrabid animals. This is however one of the first studies to compare the genetic structure of rabid and nonrabid animals pertaining rabies.

Given the drastic changes in behavior of rabid animals (Leung *et al.*, 2007), these results might be surprising at first. However, the incubation period for rabies usually lasts between 1 and 3 months, with a mean of 5 weeks calculated for raccoons in Eastern Ontario, Canada (Tinline *et al.*, 2002), and during this period the rabid animal is asymptomatic and will likely act in similar manner to nonrabid individuals (see Rosatte *et al.*, 2006). Once the first signs of rabies infection appear, death is usually rapid. Thus, during the time lapse between the infection and occurrence of the first symptoms, a rabid animal has probably the same propensity to disperse as a nonrabid individual. We suggest that inferences stemming from population genetics studies relying on nonrabid individuals can potentially reflect the disease spread potential in wildlife. Although it remains to be tested, such conclusion is probably applicable to other terrestrial rabies vectors, and probably also to diseases characterized by long incubation and short morbidity periods, such as the chronic wasting disease (Williams, 2005).

In our study, rabid and nonrabid raccoons exhibited no difference in genetic diversity. Thus, rabid immigrant raccoons are unlikely to have dispersed into our study area. Associations between susceptibility or resistance to rabies and presence of specific MHC class II DRB alleles have been previously documented in raccoons (Srithayakumar *et al.*, 2011). Here, 1 locus showed a marginally significant correlation between infection status and genotype (Figure S2.1). Linkage disequilibrium between a MHC locus (or another immunity-related gene) and a microsatellite locus could possibly support this result (see Amos and Acevedo-Whitehouse, 2009; Hunt *et al.*, 2000). Future studies involving both more neutral markers and comparing genetic diversity of rabid vs. nonrabid individuals at functional markers, such as the MHC, are needed to assess the generality of our findings. While studies on the selective pressure of pathogens or parasites on functional genes in the wild are relatively common in other taxa (see Dionne *et al.*, 2009; Loiseau *et al.*, 2011, for examples), much less is done on large mammal species, including carnivores (but see Hedrick *et al.*, 2003; Castro-Prieto *et al.*, 2011).

Our results validate the approach of characterizing the genetic structure of nonrabid individuals to study the effects of landscape on the propagation of rabies in raccoons in the wild. This result is especially valuable to wildlife managers, as it suggests that such indirect evaluation of the risks of rabies spread can help better targeting areas where control activities should be performed (Russell *et al.*, 2006). Also, such ‘validation’ should be conducted for other host and disease combinations in the wild to assess the generality of our findings across a broad range of management scenarios.

Acknowledgements

We are grateful to all the students, trainees, research assistants and coordinators

who helped in this project. We are grateful to H. Presseault-Gauvin and J. Chambers for laboratory work. We also thank the MRNF, the CFIA, and the Centre québécois sur la santé des animaux sauvages for the tissue samples collected and rabies testing. This work was supported by a team research grant from the Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies to D. Fortin, D. Garant, J. Mainguy, and F. Pelletier and by the Canada Research Chair in Evolutionary Demography and Conservation (F. Pelletier) from Canada Foundation for Innovation. B. Talbot was funded by scholarships from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies fellowships.

Supplementary Material

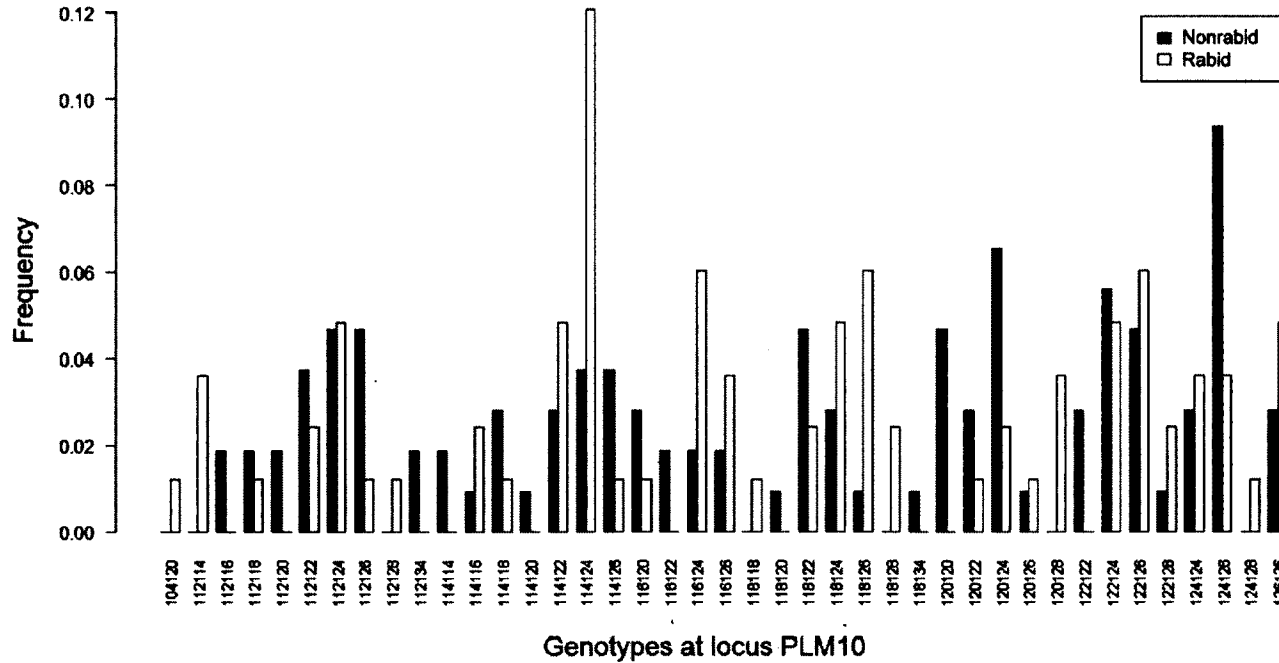


Figure S2.1. Distribution of genotypes at microsatellite locus PLM10 (Siripunkaw *et al.*, 2008), which had marginally significant genotype-phenotype (rabid and nonrabid) associations (see Amos and Acevedo-Whitehouse, 2009, for details on this test), from sampled raccoons (*Procyon lotor*) in Southern Quebec in 2007 and 2008.

CONCLUSION GÉNÉRALE

1. Retour sur les résultats

1.1. Structure génétique du raton laveur et de la moufette rayée au Sud du Québec

Les résultats de mon premier chapitre, ainsi que ceux de Côté *et al.*, (2012) concernant les analyses de structure génétique populationnelle, montrent que le Sud du Québec ne comporte pas plusieurs populations de ratons laveurs et de moufettes rayées, ce qui signifie qu'aucune barrière aux mouvements potentielle du paysage ne coupe totalement le flux de gènes dans cette région et ce, pour les deux espèces. Une perméabilité différente entre deux rivières sur le flux de gènes des ratons laveurs avait été rapportée par Cullingham *et al.* (2009) dans la région des Grands Lacs. Bien que la rivière Niagara semblait amener une différenciation de population, ce n'était pas le cas du fleuve Saint-Laurent. Le même phénomène concernant les routes a été montré chez le coyote (*Canis latrans*), une autre espèce de mésocarnivore, par Riley *et al.* (2006). Alors qu'une autoroute du Sud-Ouest des États-Unis causait une certaine différenciation, une route secondaire n'en causait presque pas. Aussi, les rivières Platte et Missouri (dans la région des Grandes Plaines des États-Unis) ne semblent pas affecter la structure génétique de la moufette rayée (Barton *et al.*, 2010). Il semble donc, en accord avec la littérature sur ces deux espèces, que les rivières et les autoroutes du Sud du Québec ne soient pas des barrières suffisamment efficaces pour couper le flux de gènes des ratons laveurs et des moufettes rayées.

Les résultats de mon premier chapitre, ainsi que ceux de Côté *et al.* (2012) concernant l'apparemment génétique, montrent par ailleurs un effet de certaines barrières potentielles du paysage, les autoroutes et les rivières, sur la structure génétique d'apparemment de la mouffette rayée et du raton laveur. Ces éléments du paysage n'amènent pas de différenciation de population, car ils ne causent pas une coupure dans le flux de gènes. Toutefois, ils semblent réduire le flux de gènes, possiblement en l'obligeant à passer à certains endroits bien précis, plus perméables, comme des ponts ou des viaducs. Ce phénomène est bien expliqué dans deux études sur deux autres espèces de mésocarnivores, la martre d'Amérique (Broquet *et al.*, 2006) et le blaireau européen (Frantz *et al.*, 2010). Il se pourrait aussi que l'effet observé soit dû à une structure du paysage près des rivières et des routes qui influence les déplacements, et donc la structure génétique, chez le raton laveur et la mouffette rayée. Les résultats pour chaque sexe montrent que ces effets sont beaucoup plus forts chez les femelles des deux espèces. L'effet des barrières naturelles potentielles sur la structure génétique du raton laveur et de la mouffette rayée semble être surtout présent chez les femelles et très peu chez les mâles. Ceci concorde bien avec un scénario de dispersion biaisée selon le sexe chez les deux espèces, où les mâles effectuent une dispersion beaucoup plus grande que les femelles, résultat attendu chez la plupart des mammifères (Handley et Perrin, 2007). Aussi, ces résultats concordent avec certaines autres études, qui montraient aussi une dispersion biaisée par les mâles et une philopatrie des femelles (ratons laveurs : Dharmarajan *et al.*, 2009; mouffettes rayées : Hansen *et al.*, 2003). Bref, les barrières potentielles du paysage ont un effet surtout sur les femelles du raton laveur et de la mouffette rayée, sous-jacent à une philopatrie plus forte chez les femelles de ces deux espèces.

1.2. Comparaison entre animaux rabiques et sains

Les résultats de mon deuxième chapitre montrent qu'il n'existe pas de structure génétique entre les ratons laveurs rabiques et les ratons laveurs sains. Ceci suggère que le comportement de déplacement n'est probablement pas différent entre les deux états. Un animal qui est affecté par la rage va, dans environ 80% des cas (taux calculé chez le chien), être atteint de la forme encéphalitique de la maladie et avoir un comportement hyperexcitable (Leung *et al.*, 2007). Ces comportements pourraient affecter fortement la façon dont l'animal va se déplacer dans le paysage probablement en augmentant la distance parcourue (Bowen-Davies et Lowings, 2000a, b), affectant ainsi la structure génétique chez ces animaux. Les ratons laveurs et les mouffettes rayées infectés du Sud du Québec auraient donc plus de chances de provenir d'un endroit très éloigné que les animaux non rabiques, ce qui amènerait une structure génétique entre certains ratons laveurs rabiques et les ratons laveurs non rabiques. En revanche, lorsqu'un animal est infecté par la rage, il y a la plupart du temps une phase d'incubation du virus asymptomatique qui peut s'échelonner sur une très longue période. La phase morbide, quant à elle, est beaucoup moins longue (Hemachudha *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2007). Un animal testé positif pour la rage n'aura son comportement de déplacement altéré que dans un court intervalle de temps entre l'infection et le décès. C'est probablement pour cette raison que la plupart des ratons laveurs rabiques capturés dans une étude en Ontario parcouraient des distances similaires à celles des ratons laveurs non rabiques (Rosatte *et al.*, 2006). Selon mes résultats, il semble que le comportement de déplacement modifié dans cette courte période ne soit pas suffisant pour amener une structure génétique entre les animaux rabiques et sains. Donc, puisque les ratons laveurs sains ont un comportement de déplacement probablement similaire à celui des ratons laveurs rabiques, il est possible de les utiliser pour déterminer les routes de propagation les plus probables de la variante de la rage du raton laveur de laquelle ils sont des vecteurs. En bref, ces résultats suggèrent qu'il était approprié d'utiliser les données génétiques provenant d'animaux sains pour étudier le potentiel de propagation de la maladie, en supposant que ce qui a été observé ici chez les ratons laveurs s'applique également aux mouffettes.

Les résultats de mon deuxième chapitre montrent aussi que les rats laveurs rabiques et sains ont une diversité génétique non significativement différente, mesurée par la richesse allélique, l'hétérozygotie observée, l'hétérozygotie attendue et le coefficient de consanguinité. Une différence de diversité génétique entre les deux groupes pourrait être une indication d'une immigration provenant de populations adjacentes plus grande chez un de ces groupes. Par exemple, si les rats laveurs rabiques proviennent de plus d'une population alors que les rats laveurs non rabiques n'en proviennent que d'une seule, les rats laveurs rabiques montreront une diversité génétique moyenne plus élevée. Ce phénomène est souvent observé entre les mâles et les femelles, chez une espèce où il existe une dispersion biaisée pour un sexe (Prugnolle *et al.*, 2002). De plus, la susceptibilité des individus avec un fort taux d'homozygotie à l'infection par certaines maladies ou parasites est souvent observée (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Une plus grande diversité génétique chez les rats laveurs non rabiques pourrait être une indication d'une plus grande résistance à l'infection ou à l'exposition. De plus, certains allèles d'un gène codant pour une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) semblent pouvoir influencer la réponse immunitaire des rats laveurs contre la rage (Srihayakumar *et al.*, 2011). Les gènes du CMH permettent la formation d'une molécule qui se trouve sur chaque cellule de l'organisme chez les vertébrés supérieurs et qui signale au système immunitaire tout changement interne dans la cellule, comme l'invasion par un corps étranger (Doherty et Zinkernagel, 1975). Un locus microsatellite utilisé dans mon étude aurait pu être en déséquilibre de liaison avec ce gène du CMH ou un autre qui est bénéfique dans la réponse immunitaire (ou encore à la propension à s'exposer au virus) des rats laveurs contre la rage. Dans ce cas, nous aurions potentiellement pu observer une proportion différente de certains allèles de ce locus microsatellite entre les deux états. Or, les résultats de mon étude ne supportent pas que la diversité génétique ou qu'un locus en particulier puissent affecter la probabilité d'infection par la rage, bien que pour ce dernier point il semble y avoir une tendance au locus PLM10.

2. Importance des résultats en gestion de la faune

D'emblée, les résultats de mon projet ainsi que ceux de Côté *et al.* (2012) suggèrent une forte capacité de dispersion chez les ratons laveurs et les moufettes rayées, puisque dans toute l'aire d'étude (22 000 km²), aucune barrière n'était imperméable au flux de gènes de ces deux espèces. Cette information est importante en ce qui a trait à la propagation de la rage, car nous avons ainsi une meilleure idée de l'efficacité de ces vecteurs à propager la maladie. Aussi, les résultats montrent des évidences de dispersion biaisée par les mâles. Donc, il semble que les mâles des deux espèces vectrices sont beaucoup plus actifs que les femelles. Si des actions ciblées sur un sexe en particulier deviennent possibles dans le futur, cette information peut aider à contrôler plus efficacement la maladie. Dans cette optique, il serait intéressant de vérifier si un des sexes a plus de chances d'être atteint de la rage que l'autre. Finalement, mes résultats suggèrent que l'utilisation des barrières aux mouvements potentielles pour améliorer l'efficacité des zones de vaccination contre la rage, comme proposé par Russell *et al.* (2006), est pour l'instant limitée.

Ensuite, les résultats obtenus dans les études de la structure génétique chez le raton laveur et la moufette rayée au Sud du Québec l'ont été grâce à des animaux non infectés par la variante de la rage du raton laveur. Il semble que le comportement de ces animaux soit représentatif de celui des animaux rabiques, et donc que les résultats obtenus précédemment sont valides pour inférer le potentiel de propagation de la variante de la rage du raton laveur. Cette information permet de diminuer les difficultés et les risques associés à l'étude des patrons de propagation de la rage, mais peut-être aussi à d'autres maladies infectieuses ayant une longue période d'incubation par rapport à une courte période symptomatique, comme la maladie débilitante chronique (Williams, 2005).

Enfin, bien que les résultats de mon étude ne supportent pas l'hypothèse de résistance naturelle à la rage chez les rats laveurs, il serait intéressant de poursuivre ce type d'étude. La façon que la diversité génétique ou la présence de certains allèles au CMH peuvent influencer la propagation de la rage offrent des avenues intéressantes pour étudier la résistance naturelle à une maladie ancienne qui cause la mortalité chez presque tous les animaux qu'elle infecte. La résistance naturelle possible des animaux face à une maladie peut potentiellement être un élément limitant à la propagation de cette maladie dans les populations sauvages, comme détaillé dans l'article de revue de King et Lively (2012).

3. Perspectives futures

La prochaine étape en lien avec les études de la structure génétique chez le raton laveur et la mouffette rayée sera de déterminer l'effet d'éléments du paysage relativement plus complexes que ceux analysés jusqu'à maintenant (e.g., proportion de forêts, de milieux humides) sur la structure génétique de ces deux espèces. Par exemple, les rats laveurs semblent éviter l'intérieur des champs (Fritzell 1978; Glueck *et al.*, 1988), et les mouffettes rayées semblent éviter les vastes parcelles de forêts et de milieux humides (Larivière et Messier, 2000). La structure du paysage pourrait également avoir un effet sur les déplacements de ces deux espèces. Par exemple, les deux espèces sont connues pour fortement fréquenter les bordures entre les champs et les forêts (rats laveurs : Dijk et Thompson, 2000; Barding et Nelson, 2008; mouffette rayée : Larivière et Messier, 2000; Ten Hwang *et al.*, 2007). Ces éléments ont le potentiel de pouvoir mieux expliquer les déplacements des deux vecteurs terrestres principaux de la rage dans le Sud du Québec que des éléments discontinus comme les barrières potentielles du paysage.

Plusieurs études montrent que l'ajout de variables du paysage plus complexes peut permettre d'améliorer le pouvoir explicatif d'un modèle (Spear *et al.*, 2005; Vignieri, 2005; Zalewski *et al.*, 2009). Les résultats découlant de l'étude de ces éléments pourraient donc être d'autant plus utiles dans le contrôle de la maladie. L'étude des effets d'éléments complexes du paysage (i.e., autres que les barrières potentielles et la distance géographique) sur la structure génétique est par ailleurs relativement peu développée pour le moment. Elle sera donc possiblement bien accueillie dans la littérature scientifique, en plus d'apporter de l'information utile en gestion de la faune et des maladies infectieuses. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier s'il existe une structure génétique pour un ou plusieurs gènes codants dans le Sud du Québec. Parmi les gènes codants, ceux du CMH sont intéressants, car ils interviennent dans la réponse immunitaire. Comparer la structure génétique obtenue avec le CMH avec celle des loci microsatellites pourrait nous informer sur la présence d'une sélection opérant sur les loci au CMH. Puisque les maladies sont une des causes majeures de mortalité chez les rats laveurs (Gehrt et Fritzell, 1999b) et les moufettes rayées (Davidson et Nettles, 1997), l'étude du CMH et des historiques épidémiques de certaines maladies de la faune pourraient constituer des avenues intéressantes.

Une prochaine étape importante concernant la comparaison entre les rats laveurs rabiques et sains serait d'augmenter le nombre de loci microsatellites utilisés pour vérifier de façon plus approfondie si la dépression de consanguinité, la présence d'allèles délétères ou d'allèles bénéfiques peuvent influencer la probabilité qu'un individu soit atteint de la rage. Cette information pourrait améliorer la façon que nous pourrions contrôler la propagation de la maladie. Aussi, si les loci microsatellites montrent des évidences suggérant que la présence de certains allèles influence l'infection par la rage, il serait intéressant de comparer la diversité génétique de ces loci avec celle de certains gènes fonctionnels influençant la réponse immunitaire contre la rage, comme ceux du CMH. Ensuite, il serait intéressant de connaître le mécanisme moléculaire de ces allèles

en cause permettant au virus de la rage d'infecter son hôte plus facilement, dans le cas d'un allèle délétère, ou permettant au système immunitaire de l'hôte de combattre plus efficacement le virus, dans le cas d'un allèle bénéfique. Cette information pourrait permettre d'améliorer les chances de survie des individus infectés par la rage, qu'ils soient des animaux de la faune, de compagnie, du bétail ou encore des humains.

BIBLIOGRAPHIE

- Acevedo-Whitehouse, K., F. Gulland, D. Greig and W. Amos. (2003). Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422, 35.
- Acevedo-Whitehouse, K., J. Vicente J., Gortazar C., U. Höfle, I. G. Fernandez-De-Mera and W. Amos (2005). Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol. Ecol.* 14, 3209-3217.
- Allendorf, F. W. and G. Luikart (2007). Conservation and the genetics of populations. (Malden, Blackwell Publishin Inc.).
- Amos, W. and K. Acevedo-Whitehouse (2009). A new test for genotype-fitness associations reveals a single microsatellite allele that strongly predicts the nature of tuberculosis infections in wild boar. *Mol. Ecol. Res.* 9, 1102-1111.
- Archie, E., G. Luikart and V. Ezenwa (2009). Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Tr. Ecol. Evol.* 24, 21-30.
- Balloux, F., J. Goudet and N. Perrin (1998). Breeding system and genetic variance in the monogamous, semi-social shrew, *Crocidura russula*. *Evolution* 52, 1230-1235.
- Banks, S. C., D. B. Lindenmayer, S. J. Ward and A. C. Taylor (2005). The effects of habitat fragmentation via forestry plantation establishment on spatial genotypic structure in the small marsupial carnivore, *Antechinus agilis*. *Mol. Ecol.* 14: 1667-1680.
- Barding, E. E. and T. A. Nelson (2008). Raccoons use habitat edges in Northern Illinois. *Am. Midl. Nat.* 159, 394-402.
- Barton, H., A. Gregory, R. Davis, C. Hanlon and S. Wisely (2010). Contrasting landscape epidemiology of two sympatric rabies virus strains. *Mol. Ecol.* 19, 2725-2738.
- Barton, H. D. and S. M. Wisely (2012). Phylogeography of striped skunks (*Mephitis mephitis*) in North America: Pleistocene dispersal and contemporary population structure. *J. Mammal.* 93, 38-51.
- Bates, D., M. Maechler and B. Bolker (2012). Linear mixed-effects models using S4 classes, version 0.999999-0. (Vienna, The R Foundation for Statistical Computing).

- Beasley, J. C. and O. E. Rhodes Jr. (2008). Relationships between raccoon abundance and crop damage. *Hum. Wildl. Inter.* 2, 248-259.
- Biek, R., and L. A. Real (2010). The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Mol. Ecol.* 19: 3515-3531.
- Bjorge, R., J. Gunson and W. Samuel (1981). Population characteristics and movements of striped skunks (*Mephitis mephitis*) in central Alberta. *Can. Field-Nat.* 95, 149-155.
- Blanchong, J., M. Samuel, K. Scribner, B. Weckworth, J. Langenberg and K. Filcek (2008). Landscape genetics and the spatial distribution of chronic wasting disease. *Biol. Lett.* 4, 130-133.
- Blouin, M. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Tr. Ecol. Evol.* 18, 503-511.
- Bohonak, A. (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *Quart. Rev. Biol.* 74, 21-45.
- Bowen-Davies, J. and P. Lowings (2000a). Current perspectives on rabies. 1. The biology of rabies and rabies-related viruses. In *Pract.* 22, 118-124.
- Bowen-Davies, J. and P. Lowings (2000b). Current perspectives on rabies. 2. Review of classical rabies and its control. In *Pract.* 22, 170-175.
- Bretman, A., R. Rodriguez-Munoz, C. Walling, J. Slate and T. Tregenza (2011). Fine-scale population structure, inbreeding risk and avoidance in a wild insect population. *Mol. Ecol.* 20, 3045-3055.
- Broadfoot, J., R. Rosatte and D. O'Leary (2001). Raccoon and skunk population models for urban disease control planning in Ontario, Canada. *Ecol. Appl.* 11, 295-303.
- Broquet, T., N. Ray, E. Petit, J. M. Fryxell and F. Burel (2006). Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landsc. Ecol.* 21, 877-889.
- Bryant, J. E., E. C. Holmes and A. D. T. Barrett (2007). Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 3, 668-673.
- Cagle, F. (1949). Notes on the raccoon, *Procyon lotor megalodous* Lowery. *J. Mammal.* 30, 45-47.

Carroll, S. P., A. P. Hendry, D. N. Reznick and C. W. Fox (2007). Evolution on ecological time-scales. *Funct. Ecol.* *21*, 387-393.

Castric, v., F. Bonney and L. Bernatchez (2001). Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook char, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution* *55*, 1016-1028.

Castro-Prieto, A., B. Wachter and S. Sommer (2011). Cheetah paradigm revisited: MHC diversity in the world's largest free-ranging population. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 1455-1468.

Cegelski, C. C., L. P. Waits, and N. J. Anderson (2003). Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Mol. Ecol.* *12*, 2907-2918.

Chambers, J., and D. Garant (2010). Determinants of population genetic structure in eastern chipmunks (*Tamias striatus*), the role of landscape barriers and sex-biased dispersal. *J. Hered.* *101*, 413-422.

Charlton, K., W. Webster, G. Casey and C. Rupprecht (1988). Skunk rabies. *Rev. Infect. Dis.* *10*, S626-S628.

Clutton-Brock, T. and P. Harvey (1978). Mammals, resources and reproductive strategies. *Nature* *273*, 191-195.

Clutton-Brock, T. and K. McAuliffe (2009). Female mate choice in mammals. *Quart. Rev. Biol.* *84*, 3-27.

Coltman, D. W., J. G. Pilkington and J. M. Pemberton (2003). Fine-scale genetic structure in a free-living ungulate population. *Mol. Ecol.* *12*, 733-742.

Costello, C. M., S. R. Creel, S. T. Kalinowski, N. V. Vu and H. B. Quigley (2008). Sex-biased natal dispersal and inbreeding avoidance in American black bears as revealed by spatial genetic analyses. *Mol. Ecol.* *17*, 4713-4723.

Côté, H., D. Garant, K. Robert, J. Mainguy and F. Pelletier (2012). Genetic structure and rabies spread potential in raccoons, the role of landscape barriers and sex-biased dispersal. *Evol. Appl.* *5*, 393-404.

Cottam, E. M., G. Thébaud, J. Wadsworth, J. Gloster, L. Mansley, D. J. Paton, D. P. King and D. T. Haydon (2008). Integrating genetic and epidemiological data to determine transmission pathways of foot-and-mouth disease virus. *Proc. R. Soc. B* *275*, 887-895.

- Croisetiere, S., P. Tarte, L. Bernatchez and P. Belhumeur (2008). Identification of MHC class II beta resistance/susceptibility alleles to *Aeromonas salmonicida* in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Mol. Immunol.* *45*, 3107-3116.
- Cullingham, C. I., C. J. Kyle, B. A. Pond and B. N. White (2008a). Genetic structure of raccoons in eastern North America based on mtDNA: implications for subspecies designation and rabies disease dynamics. *Can. J. Zool.* *86*, 947-958.
- Cullingham, C. I., B. Pond, C. J. Kyle, E. Rees, R. Rosatte and B. N. White (2008b). Combining direct and indirect genetic methods to estimate dispersal for informing wildlife disease management decisions. *Mol. Ecol.* *17*, 4874-4886.
- Cullingham, C. I., C. J. Kyle, B. A. Pond, E. Rees and B. N. White (2009). Differential permeability of rivers to raccoon gene flow corresponds to rabies incidence in Ontario, Canada. *Mol. Ecol.* *18*, 43-53.
- Cullingham, C. I., E. H. Merrill, M. J. Pybus, T. K. Bollinger, G. A. Wilson and D. W. Coltman (2011). Broad and fine-scale genetic analysis of white-tailed deer populations: estimating the relative risk of chronic wasting disease spread. *Evol. Appl.* *4*, 116-131.
- Cushman, S. A., K. S. McKelvey, J. Hayden and M. K. Schwartz (2006). Gene flow in complex landscapes: testing multiple hypotheses with causal modeling. *Am. Nat.* *168*: 486-499.
- Daszak, P. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* *287*, 1756-1756.
- Daszak, P., L. Berger, A. Cunningham, A. Hyatt, D. Green and R. Speare (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg. Infect. Dis.* *5*, 735-748.
- Davidson, W., V. Nettles (1997). *Field manual of wildlife diseases in the Southeastern United States*, 2nd ed. (Athens: University of Georgia, Athens).
- Deter, J., J. Bryja, Y. Chaval, M. Galan, H. Henttonen, J. Laakkonen, L. Voutilainen, O. Vapalahti, A. Vaheri, A. Salvador, S. Morand, J. Cosson and N. Charbonnel (2008). Association between the DQA MHC class II gene and Puumala virus infection in *Myodes glareolus*, the bank vole. *Infect. Genet. Evol.* *8*, 450-458.
- Dharmarajan, G., J. C. Beasley, J. A. Fike, O. E. Rhodes Jr (2009). Population genetic structure of raccoons (*Procyon lotor*) inhabiting a highly fragmented landscape. *Can. J. Zool.* *87*, 814-824.

- Dijak, W. D. and F. R. Thompson III (2000). Landscape and edge effects on the distribution of mammalian predators in Missouri. *J. Wildl. Manag.* *64*, 209-216.
- Dionne, M., K. M. Miller, J. J. Dodson and L. Bernatchez (2009). MHC standing genetic variation and pathogen resistance in wild Atlantic salmon. *Phil. Trans. R. Soc. B* *364*, 1555-1565.
- Doherty, P. C. and R. M. Zinkernagel (1975). A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* *305*, 1406-1409.
- Dragoo, J., K. Coan, K. Moore, S. Henke, R. Fleischer and S. Wisely (2009). Polymorphic microsatellite markers for the striped skunk, *Mephitis mephitis*, and other mephitids. *Mol. Ecol. Res.* *9*, 383-385.
- Dugan, V. G., R. Chen, D. J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky, E. Ghedin, J. Nolting, D. E. Swayne, J. A. Runstadler, G. M. Happ, D. A. Senne, R. Wang, R. D. Slemons, E. C. Holmes and J. K. Taubenberger (2008). The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog.* *4*, 1-9.
- Efron, B. and R. Tibshirani (1986). Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Statist. Sci.* *1*, 54-75.
- Epperson, B. K. (2003). *Geographical Genetics*. (New Jersey, Princeton University Press).
- Epps, C. W., J. D. Wehausen, V. C. Bleich, S. G. Torres and J. S. Brashares (2007). Optimizing dispersal and corridor models using landscape genetics. *J. Appl. Ecol.* *44*: 714-724.
- Foerster, K., M. Valcu, A. Johnsen and B. Kempenaers (2006). A spatial genetic structure and effects of relatedness on mate choice in a wild bird population. *Mol. Ecol.* *15*, 4555-4567.
- Forman, R. T. and M. Godron (1986). *Landscape ecology*. (New Jersey, John Wiley & Sons Inc.).
- Fox, C. W. and J. B. Wolf (2006). *Evolutionary genetics: concepts and case studies*. (Oxford, Oxford University Press).
- Frantz, A. C., L. C. Pope, T. R. Etherington, G. J. Wilson and T. Burke (2010). Using isolation-by-distance-based approaches to assess the barrier effect of linear landscape elements on badger (*Meles meles*) dispersal. *Mol. Ecol.* *19*, 1663-1674.

- Frey, S. and M. Conover (2006). Habitat use by meso-predators in a corridor environment. *J. Wildl. Manag.* *70*, 1111-1118.
- Fritzell, E. K. (1978). Habitat use by prairie raccoons during the waterfowl breeding season. *J. Wildl. Manag.* *42*, 118-127.
- Funk, W., M. Blouin, P. Corn, B. Maxell, D. Pilliod, S. Amish and F. Allendorf (2005). Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Mol. Ecol.* *14*, 483-496.
- Gage, K., D. Dennis, K. Orloski, P. Ettestad, T. Brown, P. Reynolds, W. Pape, C. Fritz, L. Carter and J. Stein (2000). Cases of cat-associated human plague in the western US, 1977-1998. *Clin. Infect. Dis.* *30*, 893-900.
- Garant, D., S. Forde and A. Hendry (2007). The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. *Funct. Ecol.* *21*, 434-443.
- Gehrt, S. D. and E. K. Fritzell (1999a). Behavioral aspects of the raccoon mating system: determinants of consortship success. *Anim. Behav.* *57*, 593-601.
- Gehrt, S. D. and E. K. Fritzell (1999b). Survivorship of a nonharvested raccoon population in South Texas. *J. Wildl. Manag.* *63*, 889-894.
- Geraldes, A., N. Ferrand and M. W. Nachman (2006). Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics* *173*, 919-933.
- Glueck, T. F., W. R. Clark and R. D. Andrews (1988). Raccoon movement and habitat use during the fur harvest season. *Wildl. Soc. Bull.* *16*, 6-11.
- Goldberg, C. and L. Waits (2010). Comparative landscape genetics of two pond-breeding amphibian species in a highly modified agricultural landscape. *Mol. Ecol.* *19*, 3650-3663.
- Goslee, S. C. and D. L. Urban (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *J. Statist. Softw.* *22*, 1-19.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* *86*, 485-486.
- Goudet, J., N. Perrin and P. Waser (2002). Tests for sex-biased dispersal using biparentally inherited genetic markers. *Mol. Ecol.* *11*, 1103-1114.

- Greenwood, P.J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim. Behav.* 28, 1140-1162.
- Greenwood, R., W. Newton, G. Pearson and G. Schamber (1997). Population and movement characteristics of radio-collared striped skunks in North Dakota during an epizootic of rabies. *J. Wildl. Dis.* 33, 226-241.
- Guerra, M., A. Curns, C. Rupprecht, C. Hanlon, J. Krebs and J. Childs (2003). Skunk and raccoon rabies in the eastern United States: temporal and spatial analysis. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1143-1150.
- Guillot, G., F. Mortier and A. Estoup (2005). Geneland: a program for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* 5, 712-715.
- Handley, L. and N. Perrin (2007). Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Mol. Ecol.* 16, 1559-1578.
- Hansen, L., N. Mathews, R. Hansen, B. Vander Lee and R. Lutz (2003). Genetic structure in striped skunks (*Mephitis mephitis*) on the Southern High Plains of Texas. *West. N. Am. Nat.* 63, 80-87.
- Hanski, I. A. and O. E. Gaggiotti (2004). Ecology, genetics and evolution of metapopulations (San Diego/London, Academic Press Inc.).
- Hardy, O. and X. Vekemans (2002). SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2, 618-620.
- Haupt, W. (1999). Rabies - risk of exposure and current trends in prevention of human cases. *Vaccine* 17, 1742-1749.
- Hedrick, P. W., R. N. Lee and C. Buchanan (2003). Canine parvovirus enteritis, canine distemper, and major histocompatibility complex genetic variation in Mexican wolves. *J. Wildl. Dis.* 39, 909-913.
- Hemachudha, T., J. Laothamatas and C. Rupprecht (2002). Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol.* 1, 101-109.
- Hunt, L. E., M. R. Eichenberger, R. Petras and S. Galandiuk (2000). Use of a microsatellite marker in predicting dysplasia in ulcerative colitis. *Arch. Surg.* 135, 582-585.

- Ishibashi, Y., T. Saitoh, S. Abe and M. C. Yoshida (1997). Sex-related spatial kin structure in a spring population of grey-sided voles *Clethrionomys rufocanus* as revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Mol. Ecol.* *6*, 63-71.
- Jensen, O. P., M. C. Christman and T. J. Miller (2006). Landscape-based geostatistics: a case study of the distribution of blue crab in Chesapeake Bay. *Environmetrics* *17*, 605-621.
- Johnson, N., A. Vos, C. Freuling, N. Tordo, A. Fooks and T. Muller (2010). Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Vet. Microbiol.* *142*, 151-159.
- Kalinowski, S., M. Taper and T. Marshall (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* *16*, 1099-1106.
- Keller, L. F. and D. M. Waller (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Tr. Ecol. Evol.* *17*, 230-241.
- Keyghobadi, N., J. Roland and C. Strobeck (2005). Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Mol. Ecol.* *14*, 1897-1909.
- King, K. C. and C. M. Lively (2012) Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations? *Heredity* *109*, 199-203.
- Koenig, W., D. VanVuren and P. Hooge (1996). Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Tr. Ecol. Evol.* *11*, 514-517.
- Koepfli, K. P., M. E. Gompper, E. Eizirik, C. C. Ho, L. Linden, J. E. Maldonado and R. K. Wayne (2006). Phylogeny of the Procyonidae (Mammalia: Carnivora): molecules, morphology and the Great American Interchange. *Mol. Phylogenet. Evol.* *43*, 1076-1095.
- Lambin, X. and N. G. Yoccoz (1998). The impact of population kin-structure on nestling survival in Townsend's voles, *Microtus townsendii*. *J. Anim. Ecol.* *67*, 1-16.
- Larivière, S. and F. Messier (1998). Spatial organization of a prairie striped skunk population during the waterfowl nesting season. *J. Wildl. Manag.* *62*, 199-204.
- Larivière, S., L. Walton and F. Messier (1999). Selection by striped skunks (*Mephitis mephitis*) of farmsteads and buildings as denning sites. *Am. Midl. Nat.* *142*, 96-101.
- Larivière, S. and F. Messier (2000). Habitat selection and use of edges by striped skunks in the Canadian prairies. *Can. J. Zool.* *78*, 366-372.

- Laurenson, K., C. Sillero-Zubiri, H. Thompson, F. Shiferaw, S. Thirgood and J. Malcolm (1998). Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Anim. Conserv.* *1*, 273-280.
- Legendre, P., F. Lapointe and P. Casgrain (1994). Modeling brain evolution from behavior: a permutational regression approach. *Evolution* *48*, 1487-1499.
- Lenz, T., K. Wells, M. Pfeiffer and S. Sommer (2009). Diverse MHC IIB allele repertoire increases parasite resistance and body condition in the Long-tailed giant rat (*Leopoldamys sabanus*). *BMC Evol. Biol.* *9*, 269-281.
- Leung, A. K. C., H. D. Davies, K. L. E. Hon (2007). Rabies: epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. *Adv. Ther.* *24*, 1340-1347.
- Lichstein, J. W. (2007). Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. *Plant Ecol.* *188*, 117-131.
- Loiseau, C., R. Zoorob, A. Robert, O. Chastel, R. Julliard and G. Sorci (2011). *Plasmodium relictum* infection and MHC diversity in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Proc. R. Soc. B* *278*, 1264-1272.
- Longini Jr, I. M., A. Nizam, S. Xu, K. Ungchusak, W. Hanshaworakul, D. A. T. Cummings and M. E. Halloran (2005). Containing pandemic influenza at the source. *Science* *309*, 1083-1087.
- Lopez, A., P. Miranda, E. Tejada and D. Fishbein (1992). Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. *Lancet* *339*, 408-411.
- Lui, K. and A. Kendal (1987). Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. *Am. J. Public Health* *77*, 712-716.
- Lyons, E. J., A. J. Frodsham, L. Zhang, A. V. S. Hill and W. Amos (2009). Consanguinity and susceptibility to infectious diseases in humans. *Biol. Lett.* *5*, 574-576.
- Macdonald, D. W., Rushton S. (2003). Modelling space use and dispersal of mammals in real landscapes: a tool for conservation. *J. Biogeogr.* *30*, 607-620.
- Manel, S., M. Schwartz, G. Luikart and P. Taberlet (2003). Landscape genetics, combining landscape ecology and population genetics. *Tr. Ecol. Evol.* *18*, 189-197.
- Manel, S., O. E. Gaggiotti and R. S. Waples (2005). Assignments methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Tr. Ecol. Evol.* *20*, 136-142.

- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209-220.
- Markovchick-Nicholls, L., H. M. Regan, D. H. Deutschman, A. Widyanata, B. Martin, L. Noreke and T. A. Hunt (2008). Relationships between human disturbance and wildlife land use in urban habitat fragments. *Conserv. Biol.* 22, 99-109.
- Marshall, T., J. Slate, L. Kruuk and J. Pemberton (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639-655.
- McRae, B. H. and P. Beier (2007). Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 19885-19890.
- Muller, A., J. Freitas, E. Silva, G. Le Gall-Reculé, F. Zwingelstein, J. Abrantes, P. J. Esteves, P. C. Alves, W. van der Loo, J. Kolodziejek, N. Nowotny and G. Thompson (2009). Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 135, 368-373.
- Munguia-Vega, A., M. Rheudem and M. Culver (2009). Ten new microsatellite loci for the striped skunk (*Mephitis mephitis*). *Conserv. Genet. Res.* 1, 437-439.
- Neff, B. D. and B. A. Fraser (2009). A program to compare genetic differentiation statistics across loci using resampling of individuals and loci. *Mol. Ecol. Res.* 10, 546-550.
- Nei, M. and A. K. Roychoudhury (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76, 379-390.
- Oliver, M., S. Telfer and S. Piertney (2009). Major histocompatibility complex (MHC) heterozygote superiority to natural multi-parasite infections in the water vole (*Arvicola terrestris*). *Proc. R. Soc. B* 276, 1119-1128.
- Ostfeld, R., G. Glass and F. Keesing (2005). Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Tr. Ecol. Evol.* 20, 328-336.
- Perrin, N. and V. Mazalov (2000). Local competition, inbreeding, and the evolution of sex-biased dispersal. *Am. Nat.* 155, 116-127.
- Peterson, M. A. and R. F. Denno (1998). The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. *Am. Nat.* 152, 428-446.

- Pincus, T., W. P. Rowe and F. Lilly (1971). A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. II. Apparent identity to a major locus described for resistance to friend murine leukemia virus. *J. Exp. Med.* *133*, 1234-1241.
- Poissant, J., T. W. Knight and M. M. Ferguson (2005). Nonequilibrium conditions following landscape rearrangement: the relative contribution of past and current hydrological landscapes on the genetic structure of a stream-dwelling fish. *Mol. Ecol.* *14*, 1321-1331.
- Porlier, M., M. Belisle and D. Garant (2009). Non-random distribution of individual genetic diversity along an environmental gradient. *Phil. Trans. R. Soc. B* *364*, 1543-1554.
- Pounds, J., M. Bustamante, L. Coloma, J. Consuegra, M. Fogden, P. Foster, E. La Marca, K. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S. Ron, G. Sanchez-Azofeifa, C. Still and B. Young (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* *439*, 161-167.
- Pritchard, J., M. Stephens and P. Donnelly (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* *155*, 945-959.
- Proctor, M., B. McLellan, C. Strobeck and R. Barclay (2004). Gender-specific dispersal distances of grizzly bears estimated by genetic analysis. *Can. J. Zool.* *82*, 1108-1118.
- Prugnolle, F. and T. de Meeus (2002). Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity* *88*, 161-165.
- Pusey, A. and M. Wolf (1996). Inbreeding avoidance in animals. *Tr. Ecol. Evol.* *11*, 201-206.
- Raymond, M. and F. Rousset (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* *86*, 248-249.
- Real, L. A. and R. Biek (2007). Spatial dynamics and genetics of infectious diseases on heterogeneous landscapes. *J. R. Soc. Interf.* *4*, 935-948.
- Rees, E., B. Pond, C. Cullingham, R. Tinline, D. Ball, C. Kyle and B. White (2008). Assessing a landscape barrier using genetic simulation modelling: implications for raccoon rabies management. *Prev. Vet. Med.* *86*, 107-123.
- Rees, E., B. Pond, C. Cullingham, R. Tinline, D. Ball, C. Kyle and B. White (2009). Landscape modelling spatial bottlenecks: implications for raccoon rabies disease spread. *Biol. Lett.* *5*, 387-390.

Rees, E. E., D. Bélanger, F. Lelièvre, N. Coté and L. Lambert (2011). Targeted surveillance of raccoon rabies in Québec, Canada. *J. Wildl. Manag.* 75, 1406-1416.

Rice, W. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.

Rijks, J. M., J. I. Hoffman, T. Kuiken, A. D. M. E. Osterhaus and W. Amos (2008). Heterozygosity and lungworm burden in harbour seals (*Phoca vitulina*). *Heredity* 100, 587-593.

Riley, S., J. Pollinger, R. Sauvajot, E. York, C. Bromley, T. Fuller and R. Wayne (2006). A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Mol. Ecol.* 15, 1733-1741.

Rioux Paquette, S. 2012. Useful functions for (batch) file conversion and data resampling in microsatellite datasets, version 1.0. (Vienna, The R Foundation for Statistical Computing).

Root, J. J., R. B. Puskas, J. W. Fischer, C. B. Swope, M. A. Neubaum, S. A. Reeder and A. J. Piaggio. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 583-588.

Rosatte, R. and J. Gunson (1984). Dispersal and home range of striped skunks (*Mephitis mephitis*) in an area of population reduction in southern Alberta. *Can. Field-Nat.* 98, 315-319.

Rosatte, R., M. Power, C. MacInnes (1991). Ecology of urban skunks, raccoons and foxes in Metropolitan Toronto. In *Wildlife conservation in metropolitan environments*, L. Adams and D. Leedy, eds. (Columbia: National Institute for Urban Wildlife), pp. 31-38.

Rosatte, R. C., C. D. MacInnes, R. T. Williams and O. Williams (1997). A proactive prevention strategy for raccoon rabies in Ontario, Canada. *Wildl. Soc. Bull.* 25, 110-116.

Rosatte, R., D. Donovan, M. Allan, L. Howes, A. Silver, K. Bennett, C. MacInnes, C. Davies, A. Wandeler and B. Radford (2001). Emergency response to raccoon rabies introduction into Ontario. *J. Wildl. Dis.* 37, 265-279.

Rosatte, R., S. Larivière (2003). Skunks. In *Wild mammals of North America: biology, management, and conservation*, G. Feldhammer, B. Thompson, J. Chapman, eds. (Baltimore: John Hopkins University Press), pp. 692-707.

Rosatte, R., K. Sobey, D. Donovan, L. Bruce, M. Allan, A. Silver, K. Bennett, M. Gibson, H. Simpson, C. Davies, A. Wandeler and F. Muldoon (2006). Behavior, movements, and demographics of rabid raccoons in Ontario, Canada: management implications. *J. Wildl. Dis.* 42, 589-605.

- Rupprecht, C. and J. Smith (1994). Raccoon rabies - the reemergence of a epizootic in a densely populated area. *Sem. Virol.* 5, 155-164.
- Rupprecht, C., J. Smith, M. Fekadu and J. Childs (1995). The ascension of wildlife rabies - a cause for public-health concern or intervention. *Emerg. Infect. Dis.* 1, 107-114.
- Rupprecht, C. E., C. A. Hanlon and T. Hemachudha (2002). Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2, 101-109.
- Russell, C. A., L. A. Real and D. L. Smith (2006). Spatial control of rabies on heterogeneous landscapes. *PLoS One* 1, 1-7.
- Sargeant, A., R. Greenwood, J. Piehl and W. Bicknell (1982). Recurrence, mortality, and dispersal of prairie striped skunks, *Mephitis mephitis*, and implications to rabies epizootiology. *Can. Field-Nat.* 96, 312-316.
- Schulze, K., M. Hunger and P. Döll (2005). Simulating river flow velocity on global scale. *Adv. Geosci.* 5, 133-136.
- Scott, M. E. (1988). The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. *Conserv. Biol.* 2, 40-56.
- Selkoe, K., J. Watson, C. White, T. Ben Horin, M. Iacchei, S. Mitarai, D. Siegel, S. Gaines and R. Toonen (2010). Taking the chaos out of genetic patchiness: seascape genetics reveals ecological and oceanographic drivers of genetic patterns in three temperate reef species. *Mol. Ecol.* 19, 3708-3726.
- Shaw, C., P. Wilson and B. White (2003). A reliable molecular method of gender determination for mammals. *J. Mammal.* 84, 123-128.
- Shirk, A. J., D. O. Wallin, S. A. Cushman, C. G. Rice and K. I. Warheit (2010). Inferring landscape effects on gene flow: a new model selection framework. *Mol. Ecol.* 19: 3603-3619.
- Siripunkaw, C., C. Kongrit, K. Faries, R. J. Monello, M. E. Gompper and L. S. Eggert (2008). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the raccoon (*Procyon lotor*). *Mol. Ecol. Res.* 8, 199-201.
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16, 393-430.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787-792.

Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264-279.

Smith, D. L., B. Lucey, L. A. Waller, J. E. Childs and L. A. Real (2002). Predicting the spatial dynamics of rabies epidemics on heterogeneous landscapes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99, 3668-3672.

Smouse, P., J. Long and R. Sokal (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. *Syst. Zool.* 35, 627-632.

Spear, S., C. Peterson, M. Matocq and A. Storfer (2005). Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Mol. Ecol.* 14, 2553-2564.

Srithayakumar, V., S. Castillo, R. C. Rosatte and C. J. Kyle (2011). MHC class II DRB diversity in raccoons (*Procyon lotor*) reveals associations with raccoon rabies virus (Lyssavirus). *Immunogenetics* 63, 103-113.

Storfer, A., M. Murphy, J. Evans, C. Goldberg, S. Robinson, S. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling and L. Waits (2007). Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* 98, 128-142.

Ten Hwang, Y., S. Lariviere and F. Messier (2007). Local- and landscape-level den selection of striped skunks on the Canadian prairies. *Can. J. Zool.* 85, 33-39.

Tinline, R., R. Rosatte and C. MacInnes (2002). Estimating the incubation period of raccoon rabies: a time-space clustering approach. *Prev. Vet. Med.* 56, 89-103.

Trénel, P., M. M. Hansen, S. Normand and F. Borchsenius (2008). Landscape genetics, historical isolation and cross-Andean gene flow in the wax palm, *Ceroxylon echinulatum* (Arecaceae). *Mol. Ecol.* 17, 3528-3540.

Vander Wal, E., P. C. Paquet and J. A. Andrés (2012). Influence of landscape and social interactions on transmission of disease in a social cervid. *Mol. Ecol.* 21, 1271-1282.

Venables, W. N., D. M. Smith and the R Core Team (2012). An introduction to R, version 2.15.1. (Vienna, The R Foundation for Statistical Computing).

Vignieri, S. (2005). Streams over mountains: influence of riparian connectivity on gene flow in the Pacific jumping mouse (*Zapus trinotatus*). *Mol. Ecol.* 14, 1925-1937.

Wang, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160, 1203-1215.

Williams, E. S. (2005). Chronic wasting disease. *Vet. Pathol.* *42*, 530-549.

Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* *28*, 114-138.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eug.* *15*, 323-354.

Zalewski, A., S. Piertney, H. Zalewska and X. Lambin (2009). Landscape barriers reduce gene flow in an invasive carnivore: geographical and local genetic structure of American mink in Scotland. *Mol. Ecol.* *18*, 1601-1615.

Zeveloff, S. I. (2002). *Raccoons: a natural history* (Vancouver: UBC Press).

Zhan, X. J., Z. J. Zhang, H. Wu, B. Goossens, M. Li, S. W. Jiang, M. W. Bruford and F. W. Wei (2007). Molecular analysis of dispersal in giant pandas. *Mol. Ecol.* *16*, 3792-3800.

Zhu, L., X. Zhan, T. Meng, S. Zhang and F. Wei (2010). Landscape features influence gene flow as measured by cost-distance and genetic analyses: a case study for giant pandas in the Daxiangling and Xiaoxiangling Mountains. *BMC Genet.* *11*, 72-82.