

INFLUENCE DU PAYSAGE SUR LA STRUCTURE
GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE RATONS LAVEURS
(*PROCYON LOTOR*) DANS LE SUD DU QUÉBEC

par

Héloïse Côté

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

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2011



**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: 978-0-494-83677-4**

**Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-83677-4**

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 10 août 2011

*le jury a accepté le mémoire de Madame Héloïse Côté
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 externe
Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune**

**Professeur Marc Bélisle
Président rapporteur
Département de biologie**

SOMMAIRE

La rage du raton laveur (*Procyon lotor*) est une zoonose particulièrement préoccupante, car son principal vecteur est souvent retrouvé à proximité des milieux urbains et, par conséquent, les risques de transmission de la rage par contact avec les humains ou les animaux domestiques sont accrus. La compréhension de la dynamique des mouvements des hôtes associés à des maladies infectieuses ainsi que l'identification des barrières naturelles à la migration des hôtes et au flux de gènes sont essentielles au développement de stratégies efficaces de contrôle. Au Québec, une centaine de cas de rage du raton laveur ont été détectés à l'est de la rivière Richelieu depuis 2006, ce qui porte à croire que la structure de paysage de cette région pourrait être une barrière au mouvement de ce mammifère. L'objectif principal de cette étude est d'identifier la structure génétique des populations de ratons laveurs au Québec et de déterminer les barrières potentielles au flux génique. Pour ce faire, mon projet de recherche explore la structure génétique des ratons laveurs à l'aide de 10 marqueurs microsatellites sur une zone d'étude de 21 300 km² dans le Sud du Québec, au Canada. Les résultats indiquent une valeur de différenciation génétique (F_{st}) de 0,009 entre les individus à l'est et les individus à l'ouest de la rivière Richelieu. La rivière semble être l'élément du paysage à l'origine de cette différenciation chez cette espèce et principalement chez les femelles. L'étude a également permis de mettre en évidence le facteur d'isolement par la distance à grande échelle entre les populations du Québec et également que l'île d'Orléans présente une richesse allélique faible en comparaison aux autres sites étudiés, ce qui suggère la présence d'un effet fondateur à cet endroit. En conclusion, mes travaux suggèrent que certaines rivières, en fonction de plusieurs facteurs comme leur largeur ou leur débit, peuvent être intégrées dans le cadre d'un plan de lutte contre la propagation de la rage. Ces rivières peuvent agir comme barrières naturelles, mais doivent être utilisées avec précaution, car elles ne sont pas complètement imperméables aux mouvements des individus.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout spécialement ma directrice de recherche, Fanie Pelletier, pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité tout au long de ma maîtrise. Également, un grand merci à mon co-directeur, Dany Garant, pour ses commentaires et suggestions pertinents, son assiduité et son savoir hors pair en génétique! Merci à mes conseillers Julien Mainguy du ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (MRNF) et Marc Bélisle, professeur à l'Université de Sherbrooke, qui ont su porter un regard différent sur ma recherche, m'aiguiller, poser des questions pertinentes et mener des discussions intéressantes lors de nos rencontres. Merci beaucoup à Jennifer Chambers et Karine Robert qui m'ont grandement aidée pour les aspects laboratoire et génétique de ma recherche sur le raton laveur. Merci également pour les belles journées en leur compagnie au Mont Orford à la recherche de rats laveurs et pour leur participation à « Opération Raton ». Merci aux étudiants et assistants de recherche qui nous ont aidés sur le terrain pour la récolte de données. Merci à tous les membres de mon laboratoire pour votre soutien et les beaux moments passés en votre compagnie au cours de ces deux années.

Merci à la vétérinaire Isabelle Rémillard et aux techniciens du MRNF et du Centre québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS), qui ont collecté les données nécessaires à cette recherche; au trappeur M. Gilles Côté; pour les échantillons de l'île d'Orléans; et à Pierre Canac-Marquis et Frédérick Lelièvre, pour la prise d'échantillons et de données provenant des opérations de capture et de surveillance de la rage du raton laveur. Un gros merci à ma famille, principalement à Luc Godin et à mes parents, et à mes amis pour leur soutien, leurs encouragements et leur présence tout au long de ces deux années! Merci aux organismes subventionnaires qui ont financé ce projet : Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), Fondation canadienne pour l'innovation (FCI), Chaire de recherche du Canada en démographie évolutive et conservation et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES	vii
INTRODUCTION.....	1
Génétique du paysage.....	2
Génétique épidémiologique.....	3
Outils moléculaires.....	5
Historique de la rage.....	6
Génétique épidémiologique appliquée à la rage du raton laveur.....	7
Dispersion biaisée par le sexe.....	9
Espèce à l'étude et domaines vitaux.....	10
Objectifs de recherche.....	11
CHAPITRE 1.....	13
Linking population genetic structure and rabies spread in raccoons.....	13
Introduction de l'article.....	13
Authors Affiliations.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCTION.....	16
MATERIALS AND METHODS.....	19
Study area and sampling.....	19
DNA extraction and microsatellites analyses.....	21
Data analysis.....	21
RRV monitoring area.....	21
Comparisons between RRV monitoring and peripheral areas.....	22
RESULT.....	25
Microsatellite polymorphism.....	25
Genetic differentiation analyses.....	25
RRV monitoring area.....	25
Comparison between RRV monitoring and peripheral areas.....	28
DISCUSSION.....	30
RRV monitoring area population genetic structure.....	30
Comparison between RRV monitoring and peripheral areas.....	32
ACKNOWLEDGMENTS.....	34
CONCLUSION.....	37
Analyses de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur.....	37
Comparaison entre la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur et les zones périphériques.....	38
Contribution et innovation.....	39
SUPPORTING INFORMATION.....	35
BIBLIOGRAPHIE.....	43

LISTE DES TABLEAUX

1.	Sample sizes of genotyped individuals with observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, allelic richness (A_R) and inbreeding coefficient (F_{IS}) for sites sampled in southern Quebec, Canada. The number of females and males genotyped for each site are presented in parentheses (F, M).....	24
2.	Mantel and Partial Mantel tests results for the correlations between the geographic distance (km) and the presence of the Richelieu River with the pairwise estimated genetic relatedness (Wang, 2002) among individual raccoons sampled in the RRV surveillance zone in southern Quebec, Canada. The percentage of variation explained by the models (r^2), the slopes (β), the partial correlation coefficients (r) and their associated P -values are reported.	27
3.	Genetic differentiation (pairwise F_{ST} values) estimated with FSTAT between all sampled sites in southern Quebec, Canada (above the diagonal) and geographic distance (in km) among sites (below the diagonal). Note that all F_{ST} values are significant ($P < 0.05$).	29
4.	GenBank accession number, primer sequences 5' and 3' (type of fluorescence indicated before the sequence of the primer 5' or 3'), repetition pattern, allele size (in base pairs - bp), and annealing temperature (T_a) for microsatellite loci used in this study. The loci were selected based on their polymorphism and their size (Cullingham et al. 2006; Fike et al. 2007; Siripunkaw et al. 2008).	35
5.	Polymerase chain reaction reagents mixes (final volume of 10 uL per sample) for the ten microsatellite loci used in this study.....	36

LISTE DES FIGURES

1. Map of the study area in southern Quebec, Canada, showing the location of the documented cases of the raccoon rabies variant (RRV) by the enhanced provincial surveillance program and the Canadian Food Inspection Agency passive surveillance program (i.e., following human and pet post-exposure investigations) in raccoons in 2006 (filled circles, n=4), 2007 (filled triangles, n=59) and 2008 (filled square, n=26). 18
2. Location of the samples obtained from the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Sites for the comparison between RRV monitoring and peripheral areas are also represented (from West to East): Montréal (45.54°, -73.63°), Charron Island (45.58°, -73.48°), Lanaudière (45.80°, -73.47°), Orléans Island (46.90°, -71.01°). Note that sample sizes for these sites are reported in the Materials and Methods section. 20
3. Mean estimated likelihood (ln-probability) of genetic clusters ($K = 1$ to 4) obtained from STRUCTURE analyses within the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Mean of five replicated analyses per cluster are presented with their standard deviations. 26

INTRODUCTION

L'étude des maladies de la faune constitue une branche de recherche importante en épidémiologie. Plusieurs pays se préoccupent de plus en plus du risque sanitaire que peuvent représenter les zoonoses des espèces sauvages pour la santé publique (World Health Organization, 2010). Les zoonoses présentes chez les espèces sauvages sont très importantes à considérer et peuvent avoir de sérieuses répercussions sur la démographie de ces espèces, et également être transmises aux animaux domestiques et aux êtres humains (Gauthier-Clerc and Thomas, 2010). Plusieurs pays ont développé des programmes d'épidémiosurveillance efficaces pour les animaux sauvages. Par exemple, la France fut le premier pays à développer un tel programme suite à l'apparition de la rage vulpine en 1968 (Gauthier-Clerc and Thomas, 2010).

Le développement des maladies infectieuses comporte, dans tous les cas, trois étapes importantes : l'infection au cours de laquelle l'agent intègre son hôte; la phase de multiplication où il se reproduit; et finalement, la propagation où les descendants de l'agent infectieux quittent son hôte pour infecter d'autres individus. Ce sont trois étapes clés du cycle de vie de l'agent infectieux, qui est également, dans la majorité des cas, dépendant de ses vecteurs (Gauthier-Clerc and Thomas, 2010). Bien comprendre les différents aspects de vie de l'hôte principal en lien avec les maladies infectieuses dont il peut être vecteur est primordial afin de contrer leur progression et de diminuer les risques pour la santé publique. Pour ce faire, les chercheurs peuvent, entre autres, se servir d'outils de recherche novateurs (Archie *et al.*, 2009).

La génétique des populations et la génétique du paysage sont des outils puissants pour quantifier la dynamique des maladies de la faune dans une région géographique donnée (Anderson and May, 1991). En effet, l'hétérogénéité de la structure du paysage peut grandement affecter la structure de population d'une espèce dans un territoire donné (Frantz *et al.*, 2009). Les structures naturelles et artificielles de l'habitat peuvent affecter la répartition des hôtes des maladies infectieuses et, par conséquent, la répartition de ces maladies (Archie *et al.*, 2009). Pour étudier ce phénomène, les chercheurs se servent de la génétique du paysage.

Génétique du paysage

La génétique du paysage est une discipline qui intègre des concepts tels que la génétique des populations, l'écologie du paysage, la géographie et les statistiques spatiales (Holderegger and Wagner, 2006). Elle permet de déterminer la structure des populations entre différentes échelles géographiques et de comprendre comment le paysage et les processus écologiques (dispersion, migration, etc.) affectent les patrons de mouvements et l'adaptation des individus en milieu naturel (Holderegger and Wagner, 2006). La génétique du paysage permet d'avoir de l'information sur les interactions entre les caractéristiques du paysage et les forces évolutives telles que le flux de gènes, la dérive génétique et la sélection. Le flux de gènes se définit comme la circulation des copies d'un gène dans une population, avec ou sans déplacement permanent des individus, alors que la dispersion est la translocation permanente des individus entre les populations, avec ou sans transfert durable de copies d'un gène dans la population bénéficiaire (Palsboll *et al.*, 2010). Les données de génétique du paysage aident à comprendre les processus de microévolution qui génèrent la structure génétique d'une espèce (Biek and Real, 2010). La connaissance des discontinuités génétiques est nécessaire aux biologistes de l'évolution et aux écologistes pour comprendre comment les mouvements des individus ou des gamètes influencent la structure génétique d'une population.

Les récents développements en génétique moléculaire, l'existence de nouveaux outils statistiques (géostatistique, maximum de vraisemblance et approche bayésienne) et les ordinateurs puissants ont permis l'émergence du champ d'études de la génétique du paysage (Manel *et al.*, 2003). Les deux étapes clés de cette approche sont la détection et la localisation des discontinuités génétiques entre les populations ainsi que la corrélation de ces discontinuités avec le paysage et les caractéristiques de l'environnement, tels les montagnes (Trénel *et al.*, 2008), les rivières (Cullingham *et al.*, 2009), les routes ou les gradients environnementaux (Guillot *et al.*, 2005; Manel *et al.*, 2003). La génétique du paysage implique un échantillonnage aléatoire des individus à travers la zone d'étude, et pas seulement l'échantillonnage de certains individus de chacune des populations préalablement identifiées (Manel *et al.*, 2003). Les logiciels statistiques, tels que STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), sont plus efficaces lorsque les individus sont uniformément répartis dans l'espace que lorsqu'ils sont divisés en sous-groupes (Frantz *et al.*, 2009).

La génétique du paysage peut aider à répondre à plusieurs questions spécifiques sur une espèce telles que déterminer les niveaux de différenciation génétique entre les individus d'une population, ou identifier les corridors de dispersion de cette population. À titre d'exemple, une étude menée par Neaves *et al.* (2009) dans le Sud de l'Australie a permis d'évaluer la structure génétique de population chez un grand mammifère, le kangourou gris (*Macropus fuliginosus*), et de déterminer l'effet de la plaine de Nullarbor sur la structure génétique contemporaine de ce mammifère. L'étude a permis d'identifier quatre unités génétiques distinctes sur le continent, ainsi qu'une unité insulaire sur Kangaroo Island. La plaine du Nullarbor a également été un obstacle historique à la dispersion chez cette espèce. Ces résultats donnent un aperçu de l'histoire biogéographique du Sud de l'Australie pour le kangourou gris, et révèlent que la structuration génétique des espèces peut être grandement influencée par des caractéristiques du paysage relativement mineures, comme des variations dans la composition de l'habitat.

Récemment, des approches de génétique du paysage ont été utilisées afin de prédire le potentiel de propagation de certaines maladies dans un territoire donné (Archie *et al.*, 2009). Ce champ de recherche se nomme la génétique épidémiologique. Il permet de corréler la génétique du paysage avec la structure des populations hôtes de la maladie et de déterminer les voies de propagation de la maladie les plus probables.

Génétique épidémiologique

Les modèles prédisant la propagation des maladies infectieuses sont souvent trop simples pour prédire précisément la propagation des maladies reliées à la faune (Blanchong *et al.*, 2008). En effet, il peut être difficile de bien comprendre la répercussion de l'hétérogénéité spatiale dans la distribution des maladies des espèces sauvages (Biek and Real, 2010). Par contre, cette compréhension est essentielle pour l'identification des populations les plus à risque d'infection et la conception de méthodes de surveillance et de contrôle efficaces (Blanchong *et al.*, 2008). Certaines variables environnementales (rivières, montagnes, caractéristiques du paysage, etc.) peuvent contribuer à l'émergence, à la distribution et à la persistance des maladies infectieuses sur un territoire hétérogène, ou au contraire freiner leur propagation.

Comprendre les risques de transmission des maladies en fonction de la répartition spatiale des individus, elle-même liée à la distribution des ressources, est primordial pour prévoir leur progression et les contrôler efficacement (Ostfeld *et al.*, 2005). Plusieurs maladies infectieuses touchant les animaux sauvages ont le potentiel d'affecter la santé humaine (par exemple, H5N1, la rage) (Anderson and May, 1991). Prédire « pourquoi », « où » et « dans quelle mesure » se dispersent les hôtes de la maladie sont des questions clés pour les gestionnaires de la faune et les agences de santé publique afin de contrer leur expansion (Anderson and May, 1991; Cullingham, 2007). Par exemple, selon l'étude menée par Bourhy *et al.* (1999), la propagation de la rage du renard (*Vulpes vulpes*) en Europe peut être contenue dans une certaine mesure par des barrières physiques naturelles qui permettent de limiter la circulation des hôtes infectés. C'est le cas de la rivière Vistula en Pologne qui peut aider à contenir la propagation de la rage, car elle est une barrière naturelle aux mouvements des renards.

Combiner la génétique du paysage et la génétique épidémiologique permet donc de bien comprendre la dynamique de dispersion de la maladie en fonction de leurs hôtes (Ostfeld *et al.*, 2005). Pour ce faire, la propagation potentielle de maladies infectieuses à travers un paysage est évaluée en examinant la structure génétique des populations hôtes. Ensuite, la répartition géographique des animaux infectés est appliquée à la structure génétique. La corrélation entre ces deux points est étudiée (Childs *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002).

Jusqu'ici, certaines études ont utilisé la méthode de l'épidémiologie du paysage et ont permis de constater que la variabilité dans la propagation de la maladie est souvent associée à la proximité des rivières, des montagnes et des routes (Blanchong *et al.*, 2008; Childs *et al.*, 2000; Neaves *et al.*, 2009; Russel *et al.*, 2006). À titre d'exemple, la recherche sur la maladie du dépérissement chronique (MDC) (Blanchong *et al.*, 2008) a montré que, pour le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), les rivières et les routes ont une influence significative sur le flux de gènes. Pour cette étude, les chercheurs ont déterminé la structure génétique des cerfs de Virginie afin de voir si les modèles de flux de gènes pouvaient expliquer la distribution spatiale de la MDC dans le Centre-Sud du Wisconsin (États-Unis). Leurs résultats suggèrent que la rivière Wisconsin a une grande influence sur la dispersion des gènes et donc de la maladie. Les auteurs concluent également qu'avec une bonne sélection de marqueurs microsatellites, la génétique épidémiologique peut être un outil efficace pour identifier la

connectivité entre les populations infectées et celles non infectées en fonction des caractéristiques du paysage. Par conséquent, l'identification des obstacles à la connectivité des populations permet de cibler davantage les zones prioritaires d'intervention pour le contrôle des maladies.

Outils moléculaires

Les marqueurs moléculaires comme les microsatellites et les « AFLPs » (amplified fragment length polymorphism) peuvent être utilisés pour estimer de nombreux paramètres d'intérêts pour les écologistes (Storfer *et al.*, 2010). Le taux de migration, la taille des populations, les goulots d'étranglement et les liens de parenté sont des exemples de sujets auxquels les marqueurs moléculaires peuvent amener considérablement de réponses (Selkoe and Toonen, 2006).

Les microsatellites sont entre autres utilisés dans les programmes de cartographie pour établir des liens de parenté entre les individus, et effectuer des études plus classiques sur la structure génétique des populations. Ils servent également aux épidémiologistes (Jarne and Lagoda, 1996). Un microsatellite est un fragment neutre de l'ADN nucléaire contenant des séquences d'une à six paires de base répétées en tandem, flanqué de segments d'ADN non répétitif (Selkoe and Toonen, 2006). Ils sont trouvés en grande quantité dans le génome de beaucoup de taxons. Les microsatellites possèdent un taux de polymorphisme très élevé causé par les erreurs fréquentes lors de la réplication de l'ADN (Selkoe and Toonen, 2006). De plus, les régions flanquantes (ADN non répétitif) des microsatellites sont des régions très conservées, ce qui permet l'utilisation de sondes spécifiques et l'amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR). C'est par conséquent l'outil adéquat pour étudier la dispersion des hôtes de maladies infectieuses.

Historique de la rage

La première description connue de la rage remonte environ à 500 av. J.-C. par Démocritus (Krebs *et al.*, 1995). Il s'agit d'un virus neurotrope de la famille des Rabdoviridea et du genre Lyssavirus qui connaît une distribution planétaire, à l'exception de quelques îles et endroits inaccessibles ou inhospitaliers pour la vie sauvage potentiellement hôte (Krebs *et al.*, 1995). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe la rage au dixième rang mondial des décès par infection chez les humains (World Health Organization, 2010). Chaque année, environ 55 000 personnes meurent de ce virus dans les pays en voie de développement où il est principalement véhiculé par les chiens (World Health Organization, 2010). La rage est une zoonose qui cause une encéphalomyélite aiguë. Cette maladie est généralement transmise par la morsure d'un animal infecté ou encore par le contact avec la salive d'un animal atteint sur une coupure, une plaie ouverte, une abrasion de la peau ou sur une muqueuse (Krebs *et al.*, 1995). Les premiers symptômes apparaissent entre 30 et 90 jours après la contagion, mais cette période est très variable. Lorsque les premiers symptômes apparaissent, l'issue est habituellement fatale (Krebs *et al.*, 1995). Dans les pays industrialisés, grâce aux programmes de vaccination des animaux domestiques, la maladie est principalement véhiculée par les animaux sauvages tels que le renard roux (*Vulpes vulpes*), le renard arctique (*Alopex lagopus*), les chauves-souris (famille des Vespertilionidea), la moutonnette rayée (*Mephitis mephitis*) et le raton laveur (*Procyon lotor*). Au Québec, le virus de la rage se divise en trois variants antigéniques distinctes : celui du renard arctique, celui de la chauve-souris et maintenant celui du raton laveur (Canac-Marquis *et al.*, 2007). Normalement, les différents variants de la rage sont responsables de la transmission entre les individus au sein d'une même espèce. La rage peut tout de même affecter d'autres espèces, mais la chaîne de transmission est alors généralement courte.

C'est au cours des années 1970, en Floride (États-Unis), que le variant de la rage du raton laveur aurait été identifié pour la première fois (Dobson, 2000). En 1976, le North Carolina Hunting Club a importé des ratons laveurs de la Floride en Virginie afin de pratiquer la chasse (Nettles *et al.*, 1979). Certains ratons laveurs importés étaient porteurs de la rage et l'ont transmise à la population locale créant un deuxième foyer d'infection (Dobson, 2000). En 1977, dans l'Ouest de l'État de Virginie, est répertoriée la première confirmation du variant de

la souche de rage du raton laveur (Centers for disease control and prevention, 1994). L'épidémie s'est ensuite rapidement propagée dans les États du Centre-Est et du Nord-Est des États-Unis pour atteindre l'État de New York en 1990 et celui du New Hampshire en 1992 (Centers for disease control and prevention, 1994). En 1990, aux États-Unis, le raton laveur a supplanté la mouffette rayée comme vecteur principal de la rage du raton laveur (Centers for disease control and prevention, 1994). Le gouvernement américain doit déboursier annuellement entre 230 millions et un milliard de dollars pour le contrôle de la rage et les traitements post-expositions au virus (Rupprecht *et al.*, 1995). L'épidémie de rage a atteint la frontière du Québec à une vitesse moyenne de propagation vers le nord de 30 à 50 kilomètres par année (Dobson, 2000). C'est en 1999 que l'Ontario a vu apparaître ses premiers cas de rage du raton laveur (Rosatte *et al.*, 2001). En dépit de la mise en place en 1999 d'un programme de prévention de l'entrée de la rage, le Québec, exempt de rage pendant plusieurs années, voit son premier cas apparaître en 2006 en Montérégie (Canac-Marquis *et al.*, 2007). En 2007, 59 ratons laveurs ont été testés positifs au Québec et 26 autres, en 2008 (ministère des Ressources naturelles et de la Faune, 2009). Aucun cas n'a été détecté chez le raton laveur en 2009 et 2010. Selon l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA), les ratons laveurs et les mouffettes rayées représentaient 54 % des cas de rage diagnostiqués chez les animaux sauvages en 2008 (www.inspection.gc.ca).

Génétique épidémiologique appliquée à la rage du raton laveur

Comprendre la dynamique des mouvements du raton laveur ainsi que la présence de barrières naturelles à la migration et au flux génique est critique pour l'établissement d'une stratégie de lutte efficace contre la rage. De nombreux auteurs stipulent qu'il peut y avoir des barrières qui arrêtent, ou du moins ralentissent, l'expansion de la rage (Biek and Real, 2010; Cullingham *et al.*, 2008; Rees *et al.* 2009). Des preuves moléculaires suggèrent d'ailleurs que les rivières sont des barrières naturelles efficaces à la dispersion de la rage (Bourhy *et al.*, 1999). Ces études amènent par ailleurs plusieurs questionnements, notamment comment les interventions de contrôle de la maladie peuvent être déployées afin de tirer avantage de la structure hétérogène du paysage; pourquoi et comment les individus se dispersent selon la configuration du paysage. Selon le modèle de l'expansion de la rage fait par Russel *et al.*

(2006), la stratégie la plus efficace pour réduire la propagation de la rage est de créer, grâce au largage d'appâts vaccinaux, des barrières vaccinales de chaque côté des barrières naturelles, et ainsi d'empêcher la contamination d'une population exempte de rage par l'arrivée d'un individu infecté. La décision de l'emplacement et de la taille de ces barrières vaccinales est critique pour le succès des opérations (Cullingham *et al.*, 2009). Une étude menée en Ontario a d'ailleurs permis de montrer que la rivière Niagara est une barrière efficace à la dispersion des ratons laveurs entre cette province et l'État de New York (Cullingham *et al.*, 2009). L'hypothèse de cette étude était que des différences dans la dynamique de dispersion des ratons laveurs expliqueraient des patrons de dispersion de la rage différents entre la rivière Niagara et le fleuve Saint-Laurent, en Ontario. Afin d'étudier l'effet de ces rivières sur la dispersion des ratons laveurs, ils ont déterminé la structure génétique de 1 468 ratons laveurs dans les régions du Saint-Laurent et du Niagara. Pour la rivière Niagara, la présence de deux populations de ratons laveurs a été déterminée. La position de ces deux populations correspondait à celles de l'État de New York et de l'Ontario. Pour le Saint-Laurent, aucune structure n'a été déterminée au sein de la population. Par conséquent, l'analyse suggère que la rivière Niagara réduit le flux de gènes entre l'Ontario et l'État de New York. L'efficacité des rivières comme barrière à la dispersion du raton laveur pourrait être grandement liée à la présence de glace en hiver et au débit de la rivière (Cullingham *et al.*, 2009). L'habitat et les ressources disponibles autour de la barrière naturelle pourraient également être des facteurs importants quant à la probabilité et à la distance de dispersion des individus. Plus l'habitat est favorable et les ressources (ex : nourriture) disponibles, moins les individus semblent se disperser sur de longues distances. Par conséquent, la probabilité de franchir la rivière diminue. Par exemple, les environnements urbains, qui sont riches en ressources alimentaires, peuvent supporter une plus grande densité de ratons laveurs qu'un environnement rural, où les mouvements des individus doivent être plus importants pour acquérir de la nourriture (Cullingham *et al.*, 2008).

Comme l'a montré l'étude menée par Cullingham *et al.* (2009), la capacité de dispersion des ratons laveurs peut être associée à la perméabilité des rivières. Les ratons laveurs peuvent utiliser trois moyens pour traverser une rivière : premièrement, ils peuvent traverser les ponts par eux-mêmes ou en s'introduisant à bord d'un véhicule; deuxièmement, ils peuvent profiter

de la présence de la glace en hiver; et finalement, ils peuvent traverser la rivière à la nage (Cullingham *et al.*, 2009).

Dispersion biaisée par le sexe

De nombreuses espèces sont fidèles à leur lieu de naissance ou à leur population d'origine. Ce phénomène est connu sous le nom de philopatrie. Par contre, chez la plupart de ces espèces, un sexe est plus philopatric que l'autre. Chez les mammifères, ce sont principalement les femelles qui semblent philopatrics alors que les mâles se dispersent sur de longues distances (Greenwood, 1980). Par exemple, l'étude menée par González-Suárez *et al.*, (2009) sur l'otarie de Californie (*Zalophus californianus*) au Mexique a montré des évidences de dispersions biaisées vers les mâles. Ces derniers se dispersent en moyenne 6,75 fois plus fréquemment que les femelles. Les femelles otaries montrent des niveaux de différenciation génétique plus élevés entre elles que les mâles, puisque leur dispersion avec les colonies plus éloignées est plus limitée et plus rare (González-Suárez *et al.*, 2009). La distance parcourue par les mammifères lors de la dispersion natale est un élément fondamental pour l'étude de la démographie. Par ailleurs, les dispersions sur de longues distances influencent grandement la structure de population et favorise la colonisation d'un nouveau milieu par une espèce (Greenwood, 1980).

Pour ce qui est des rats laveurs étudiés en Ontario, 80 % des jeunes se dispersent en général sur une distance de moins de 3 km (Cullingham, 2007). Bien qu'ils ne se déplacent généralement pas sur un grand territoire, certains ont déjà été observés à plus de 200 km de leur point d'origine (Rosatte *et al.*, 2007). Les distances de dispersion des rats laveurs semblent grandement liées à leur sexe et à leurs habitats (Prange *et al.*, 2003; Rosatte *et al.*, 2007). Les jeunes restent avec leur mère durant le premier hiver dans une proportion de 75 % et aucun de ces jeunes n'est actif sexuellement la première année (Gehrt and Fritzell, 1998a). Selon une étude de Puskas *et al.* (2010), la distance de dispersion des jeunes rats laveurs est en moyenne de 1,61 km lors du premier automne en Pennsylvanie. Selon l'étude menée par Dhamarjaman, en l'absence de barrières majeures, environ 10 % des rats laveurs vont se disperser sur une distance de plus de 20 km. Pour ce qui est des jeunes mâles rats laveurs,

les causes de la dispersion sont probablement multifactorielles. Ils peuvent émigrer volontairement ou être chassés par les parents ou d'autres adultes (Gehrt and Fritzell, 1998a). Les femelles se dispersent généralement sur de courtes distances. L'étude menée par Dhamarjaman *et al.* (2009) en Indiana a mis en évidence que 50 % des mâles et 81 % des femelles se dispersent sur moins de 5 km. Fréquemment, lorsque les territoires de deux femelles se chevauchent, il s'agit d'une paire mère-fille (Gehrt and Fritzell, 1998). « Pourquoi » et « à quelle distance » un individu se disperse sont de grandes questions dont les réponses dépendent à la fois de sa capacité individuelle et du contexte du paysage. La dispersion selon le sexe est un paramètre important pour comprendre et gérer adéquatement les populations qui peuvent être les hôtes de maladies infectieuses comme le cerf de Virginie, le renard roux ou le raton laveur. C'est également un des paramètres les plus difficiles à mesurer (Cullingham, 2007).

Espèce à l'étude et domaines vitaux

Le raton laveur fait partie de la famille des Procyonidea et est une espèce endémique à l'Amérique. La longévité moyenne des ratons laveurs en milieu naturel est de 3,1 ans selon l'étude de Johnson (1970), avec un maximum de longévité d'environ 16 ans (Lotze and Anderson, 1979). Au Québec, la période d'accouplement a lieu au printemps (entre février et avril) (Fanie Pelletier, données non publiées). Les femelles sont les seules qui participent à l'élevage et aux soins des jeunes. Dans une portée, le nombre moyen de jeunes se situe entre 2 et 4,8 en fonction de la latitude et de la masse corporelle de la femelle (Ritke, 1990), avec une proportion égale de mâles et de femelles (Lotze and Anderson, 1979). Les ratons laveurs ne font pas partie des vrais hibernants, car leur métabolisme ne présente pas de variations substantielles pendant les mois de dormance, et ils sont actifs très tôt au printemps (Lotze and Anderson, 1979). La densité de population estimée peut être très variable en fonction du paysage et de la disponibilité des ressources, allant de 3,4 à 13,6 individus/km² dans le Sud de l'Ontario (Rosatte *et al.*, 2010) jusqu'à 181 individus/km² près du lac Érié (Urban, 1970). C'est un mammifère omnivore et opportuniste dont la diète est principalement constituée de fruits, d'invertébrés, de petits mammifères, d'œufs, de carcasses, de déchets domestiques et de céréales selon le milieu (Novak *et al.*, 1987).

Généralement, la superficie du domaine vital occupé par les femelles varie de 1 à 4 km² et peut varier selon la disponibilité des ressources; tandis que celui des mâles est environ quatre fois plus grand (Gehrt and Fritzell, 1998a). Les ratons laveurs montrent un seuil de tolérance très variable vis-à-vis de leurs congénères, allant de la tolérance complète à la territorialité stricte (Gehrt and Fritzell, 1998a). Normalement, l'espace utilisé par les femelles est influencé par la disponibilité des ressources alimentaires et la proximité d'un milieu aquatique. L'espace utilisé par les mâles est fonction à la fois de leur habileté à exploiter ces mêmes ressources et également à s'accoupler avec les femelles (Pitt *et al.*, 2008). Lorsque les ressources alimentaires sont concentrées dans un territoire, on observe un comportement de regroupement chez les ratons laveurs (Prange *et al.*, 2003). Lors de ces regroupements, si la densité de femelles augmente également, la capacité d'un mâle à les monopoliser tous diminue. La formation de coalition de mâles permet de diminuer la compétition. Ces mâles peuvent ainsi sécuriser l'accès à plus de femelles par mâle (Pitt *et al.*, 2008). Le domaine vital des individus peut aussi varier en fonction de la dynamique saisonnière et par le fait que les mâles soient plus gros que les femelles (Gehrt *et al.*, 1997).

Objectifs de recherche

La compréhension de la dynamique des mouvements des hôtes associés à des maladies infectieuses, ainsi que l'identification des barrières naturelles à leur dispersion et au flux de gènes sont essentielles au développement de stratégies efficaces de contrôle. La rage du raton laveur est une zoonose particulièrement préoccupante pour la santé publique, car son principal vecteur est souvent retrouvé à proximité des milieux urbains, et les risques de transmission du virus directement aux humains ou aux animaux domestiques sont accrus. Depuis 2006, une centaine de cas de rage du raton laveur ont été répertoriés dans le Sud du Québec à l'est de la rivière Richelieu. L'objectif principal de cette étude est d'identifier la structure génétique des populations de ratons laveurs au Québec et les barrières potentielles au flux génique dans le contexte du contrôle de l'épizootie du variant de la rage du raton laveur.

Pour ce faire, mon projet de recherche a porté plus particulièrement sur l'étude de la structure génétique des ratons laveurs à l'aide de 10 marqueurs microsatellites polymorphiques sur une

zone d'étude hétérogène de 21 300 km² dans le Sud du Québec. Tout d'abord, j'ai identifié la structure génétique des populations ainsi que les barrières potentielles au flux génique chez les rats laveurs dans la zone d'étude. Deuxièmement, j'ai évalué l'effet de la distance géographique et des barrières du paysage (rivières, autoroutes, etc.) sur la structure génétique observée. Finalement, j'ai évalué si la dispersion biaisée pour les mâles, typique chez les mammifères, se produit également pour cette espèce au Québec et j'ai identifié les voies d'expansion les plus probables de la rage dans cette région. Mes résultats auront des répercussions importantes pour les interventions de contrôle de cette maladie au Québec. Ainsi, l'identification de la structure génétique des rats laveurs permettra de mettre en évidence les barrières aux mouvements des rats laveurs, et des zones de contrôle pourront être construites de chaque côté des barrières naturelles pour limiter la propagation de la rage.

Dans le cas de la rage, identifier les barrières aux mouvements du raton laveur peut être primordial pour freiner sa vitesse de propagation puisqu'elles pourraient limiter les échanges entre les populations de part et d'autre de la barrière. La vaccination des rats laveurs se fait présentement à l'échelle de tout le Sud du Québec à l'aide d'appâts vaccinaux. Connaître les barrières naturelles à la dispersion des rats laveurs ainsi que l'emplacement des différentes populations au Québec est d'une importance capitale afin d'optimiser les opérations de contrôle et, par conséquent, de freiner leur propagation. Une analyse a d'abord été menée dans la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur au Sud du Québec afin de détailler la structure de population sur ce territoire où les cas de rage ont été répertoriés. Par la suite, une analyse des zones périphériques a permis de mettre en perspective les résultats obtenus. La diversité génétique des rats laveurs aux différents sites échantillonnés a été analysée afin de déterminer la différenciation génétique, à grande échelle, au Québec. L'analyse des zones périphériques a également permis de donner une idée du potentiel de propagation de la rage du raton laveur à plus grande échelle.

CHAPITRE 1

Linking population genetic structure and rabies spread in raccoons

Introduction de l'article

L'étude des populations de rats laveurs dans le Sud du Québec est d'une très grande importance afin de parfaire nos connaissances sur ce mammifère et de pallier la progression de la rage au Québec. La caractérisation des mouvements des hôtes de maladies infectieuses en fonction des caractéristiques du paysage est souvent la clé qui permet de prédire la dispersion de ces maladies sur un territoire. Bien connaître la probabilité de dispersion de ces maladies permet de développer des méthodes de prévention proactives. L'objectif de cette recherche était de déterminer la structure de population des rats laveurs dans le Sud du Québec, d'identifier la présence de barrières naturelles possibles entre les différentes populations et de déterminer s'il y avait évidence de dispersion biaisée par le sexe chez cette espèce. Mon étude est la première à vérifier la présence de barrières aux mouvements des rats laveurs au Québec et permettra au gouvernement de mieux cibler les opérations de contrôle de la rage du raton laveur.

Mes contributions à la réalisation de cet article incluent la sélection des échantillons, les manipulations génétiques de laboratoire, les analyses statistiques, quelques sorties sur le terrain et la rédaction de la première version de ce mémoire. Fanie Pelletier et Dany Garant y ont également contribué en révisant le manuscrit ainsi que par leur soutien et leurs judicieux conseils. Nous visons le périodique *Evolutionary Applications* pour la publication de ce manuscrit.

Linking population genetic structure and rabies spread in raccoons

Héloïse Côté^{1,2}, Dany Garant¹, Karine Robert^{1,2}, Julien Mainguy³, Fanie Pelletier^{1,2*}

Running head: Genetic structure and raccoon rabies

Authors Affiliations

¹ Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500, boulevard de l'université, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1.

² Canada Research Chair in Evolutionary Demography and Conservation, Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500, boulevard de l'Université, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1.

³ Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Direction de l'expertise sur la faune et ses habitats, Service de la biodiversité et des maladies de la faune, 880, chemin Sainte-Foy, 2^e étage, Québec, Québec, Canada, G1S 4X4.

ABSTRACT

Identifying natural barriers to movements of hosts associated with infectious diseases is essential to develop effective control strategies. Raccoon rabies variant (RRV) is a zoonose of concern for humans because its main vector, the raccoon (*Procyon lotor*), is found near urban areas. In Quebec, all cases of raccoon rabies variant (RRV) found in raccoons since 2006 were detected on the eastern side of the Richelieu River, suggesting that this river acts as a barrier to movement. The main objectives of this study were to characterize the genetic structure of raccoon populations and to specifically assess the effect of the Richelieu River on the population structure in southern Quebec, Canada. We also evaluated whether spread potential was different depending on sex and at a larger spatial scale in Quebec. Our analyses revealed a weak signal of genetic differentiation among individuals located on each side of the Richelieu River. However, our data also supported the presence of a single genetic cluster, as well as evidences of isolation by distance (IBD) among individuals of both genders within the area, suggesting a weak genetic substructuring. Our results thus suggest that rivers might not always efficiently restrain raccoon's movements and spread of RRV.

Key words: genetic differentiation, landscape genetics, isolation-by-distance, microsatellites, *Procyon lotor*, raccoon rabies variant

INTRODUCTION

Understanding how environmental variables contribute to the emergence, distribution and persistence of infectious diseases is crucial to effectively predict and control their spread (Ostfeld *et al.* 2005). As several infectious diseases affecting animals are transmittable to humans (e.g. H5N1, rabies), predicting "why", "where" and "how far" host disperses are key questions for wildlife managers and health agencies (Anderson and May, 1991; Cullingham, 2007). Typically, the effect of environmental variables on animal population structure is assessed using landscape genetics methods which provide information on the relationships between landscape features and potential for gene flow (Manel *et al.* 2003; Holderegger and Wagner, 2006). As infectious diseases depends on their hosts for dispersal (Grenfell and Dobson, 1995), several authors suggested that approaches from landscape genetics could be used to understand the potential for diseases spread (Biek *et al.* 2007; Blanchong *et al.* 2008; Archie *et al.* 2009; Biek and Real, 2010). As a result, studies of landscape epidemiology have recently surfaced in the literature. By merging landscape genetics and epidemiology analyses, such studies assess the dynamic movements of host species, identify the presence of natural barriers to migration and gene flow, and provide important insights to build effective strategies for diseases control (Cullingham *et al.* 2009; Storfer *et al.* 2010).

Landscape epidemiology can be especially useful in case where a particular disease is associated with one or few hosts or vectors (Frantz *et al.* 2009). The approach has two main steps. First, the potential spread of infectious diseases across a landscape is evaluated by looking at the host species genetic structure. To do so, genetic discontinuities between populations are detected and their correlations with landscape and environmental features are explored (Archie *et al.* 2009). Then, the geographic distribution of infected animals is mapped over the genetic structure and potential correlation between these two are investigated (Childs *et al.* 2000; Smith *et al.* 2002), 2002). Patterns of disease spread and genetic discontinuities of the vector species are expected to correlate together and with landscape characteristics (Biek and Real, 2010). Recent studies that applied landscape epidemiology methods suggest that the variability in the disease progression can often be explained by the presence of rivers, mountains and roads (Childs *et al.* 2000; Russel *et al.* 2006; Blanchong *et al.* 2008; Neaves *et al.* 2009). For example, research on the prevalence of chronic wasting disease (CWD) in

white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) found that the presence of rivers and highways significantly reduced the extent of gene flow and limited the spread of CWD (Blanchong et al. 2008). Pattern of sex-specific dispersal can also influence the spatial genetic structure of a host population (Lawson Handley and Perrin, 2007). In mammals, for example, most species have polygamous or promiscuous mating systems, where juvenile and adult males have a higher probability of dispersal compared to adult females (Greenwood, 1980). Yet, few studies of landscape epidemiology have incorporated landscape variables and sex-specific patterns of dispersal to predict host population structure and risks of disease spread.

Rabies is an important infectious disease with more than 55 000 human deaths every year (World Health Organization 2010). While most of the cases are diagnosed in developing countries (World Health Organization 2010), rabies is a great concern for public health agencies worldwide. For example, in the USA, the costs for control of rabies and post-exposition treatment are estimated between 230 million and 1 billion US dollars annually (Rupprecht et al. 1995). In particular, the raccoon rabies variant (RRV) has been in constant northward progression in North America over the last 4 decades (Curtis, 1999). RRV is problematic because the distribution range of his main host (the raccoon, *Procyon lotor*) is linked to human presence which increase the risk of spread to domestic animals and humans (Cullingham et al. 2009). In Canada, the first cases of the disease were found in 1999 in Ontario (Rosatte et al. 2001), in 2000 in New Brunswick and in 2006 in Québec (Figure 1). Government agencies are thus aiming to develop cost-efficient methods to control the spread of this disease in wild populations and limits its negative impact on public health and finances.

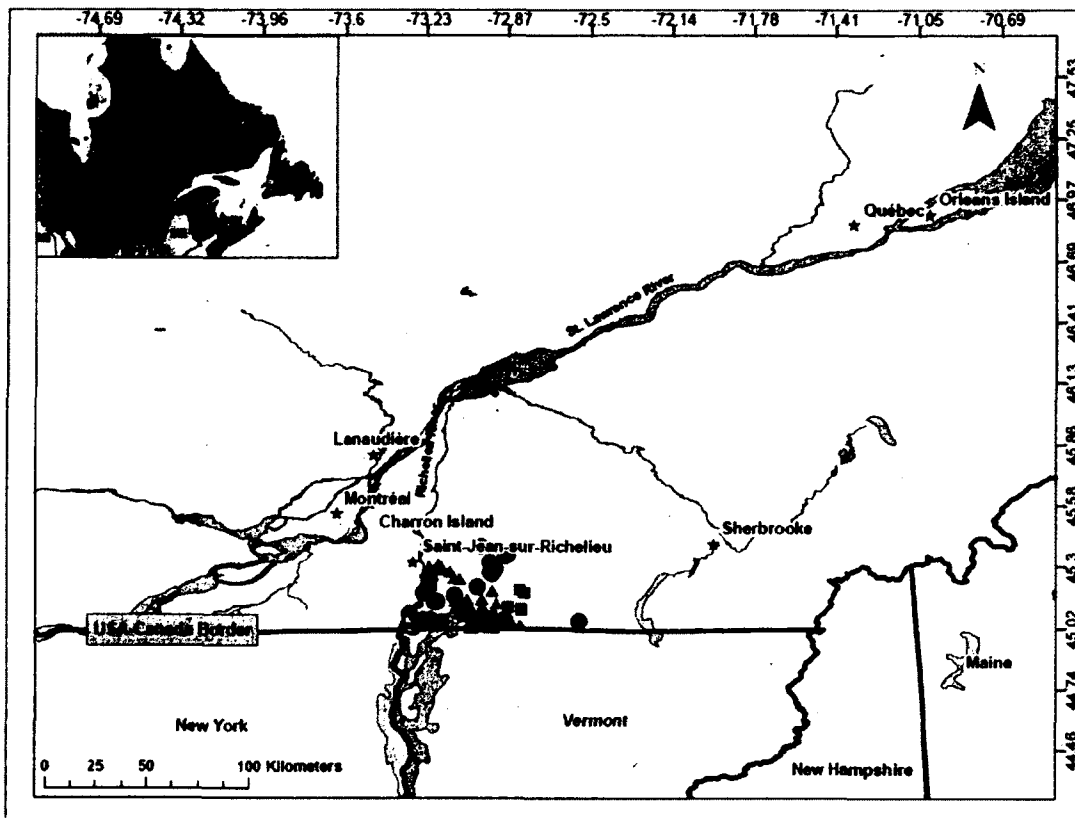


Figure 1 Map of the study area in southern Quebec, Canada, showing the location of the documented cases of the raccoon rabies variant (RRV) by the enhanced provincial surveillance program and the Canadian Food Inspection Agency passive surveillance program (i.e., following human and pet post-exposure investigations) in raccoons in 2006 (filled squares, n=4), 2007 (filled triangles, n=59) and 2008 (filled circles, n=26).

Recent molecular evidences suggest that rivers are natural barriers to effective dispersal of terrestrial hosts potentially carrying rabies. Indeed, Cullingham et al. (2009) reported reduced gene flow across the Niagara River between Ontario (Canada) and New York (USA), implying that raccoons ability to disperse could be associated with the permeability of the river to animal movement. In Ontario, authorities mechanically prevent ice formation during winter on the Niagara River, keeping a water flow important all year-round (Cullingham et al. 2009). Thus, the extent to which rivers can limit raccoon movements, and thus effectively be

reinforced with vaccination to be used as immunological barrier to control this disease, remains unclear. This is especially true in temperate regions where ice formation occurs in winter and facilitates animal movement. In Quebec, all cases of raccoon rabies variant (RRV) found in raccoons since 2006 were detected on the eastern side of the Richelieu River (see Figure 1 – hereafter referred to as the RRV monitoring area), suggesting that this river acts as a potential barrier to movement for this species. Here, we applied landscape genetic methods to investigate the potential RRV spread in raccoons in this area. We first used microsatellite markers to assess the population genetic structure of raccoons in the RRV monitoring area. We then evaluated whether disease spread potential (due to differences in movements between genders) was different depending on sex by assessing patterns of isolation by distance and the effect of the Richelieu River on the structure of relatedness detected for males and females. Then, we explored the genetic structure of raccoons at a larger spatial scale to get a better understanding of animal dispersal around the infected zone (the RRV monitoring area) and to evaluate the potential for rabies spread in the province of Quebec. To do so, we quantified the extent of genetic diversity and population structuring found in sites located in peripheral area compared to that of the RRV monitoring area.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sampling

Our main study area is located in southern Quebec, Canada, and covers approximately 21 300 km². It is bordered North and West by the St. Lawrence River, and South by the USA border with the states of New York, Vermont, New Hampshire and Maine (Figure 1). We randomly selected a subsample of raccoons for genetic analyses from all samples collected by the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune of Quebec (MRNFQ) and its partners during monitoring and control activities against RRV in raccoon such as the recovery of road killed animals and field tests of the oral vaccination efficiency (Rees et al. in press) in 2008 and 2009. Location of each animal collected was obtained using handheld global positioning system (GPS) and 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 extractions. The sex of each

animal collected was assessed both during field manipulations and using molecular techniques as described in Shaw et al. (2003) (Table 1). We used 273 animals genotyped from the RRV monitoring zone (Figure 2) to conduct our so-called ‘RRV monitoring area’ analyses. We also genotyped an additional 149 samples that were collected from areas peripheral to the zone where RRV cases were found to explore the genetic structure at a larger spatial scale. Sites samples in the peripheral areas include 3 sites on islands in the St. Lawrence River (Montréal (n=20), Charron (n=29) and Orléans (n=52)) and one site on the North shore of the St. Lawrence River (Lanaudière, n=48).

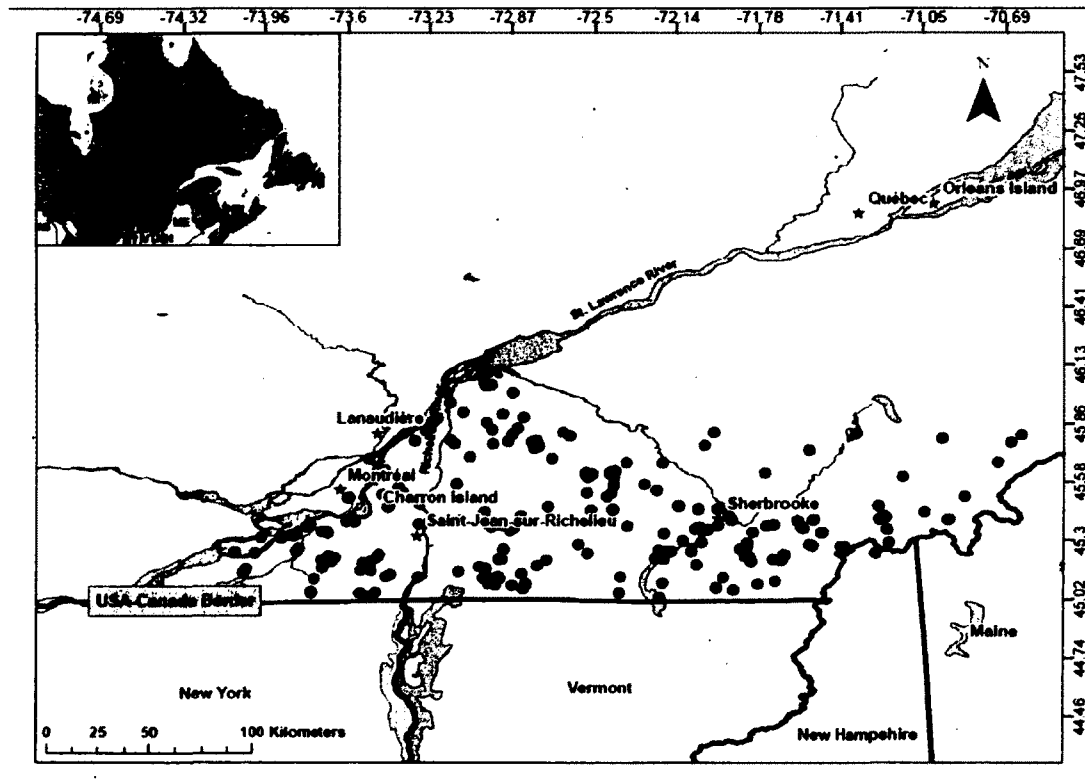


Figure 2: Location of the samples obtained from the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Sites for the comparison between RRV monitoring and peripheral areas are also represented (from West to East): Montréal (45.54°, -73.63°), Charron Island (45.58°, -73.48°), Lanaudière (45.80°, -73.47°), Orléans Island (46.90°, -71.01°). Note that sample sizes for these sites are reported in the Materials and Methods section.

DNA extraction and microsatellites analyses

DNA was extracted using a salting out protocol as described in Chambers and Garant (2010). The following ten microsatellite loci, developed specifically for raccoons, were selected based on their size and polymorphism (see Tables S1 and S2 for details about loci and their amplification): PLO-M2, PLO-M3, PLO-M15, PLO-M17, PLO-M20, PLO2-14, PLO2-117, PLM06, PLM10 and PLM20 (Cullingham et al. 2006; Fike et al. 2007; Siripunkaw et al. 2008).

Microsatellite loci amplification was performed using GeneAmp 9700 thermocyclers (Applied Biosystems). The amplification conditions were: 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 30 sec, annealing temperature (T_a) for 1 min (see Table S2), 72°C for 1 min and a final extension at 65°C for 45 min. PCR products were visualized using an AB 3130 capillary DNA sequencer (Applied Biosystems). 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 the software Genemapper version 4.0 (Applied Biosystems).

Data analysis

We tested all loci for departure from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium, and obtained observed and expected heterozygosity for each loci and sites using the software GenePop version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). We used the software FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 1995) to calculate allelic richness. Finally, we used CERVUS version 3.0.3 (Marshall et al. 1998; Kalinowski et al. 2007) to assess the presence of null alleles.

RRV monitoring area

We first quantified the extent of genetic differentiation among groups located on each side of the Richelieu River by calculating F_{st} among them using FSTAT (Goudet, 1995). We then used the bayesian clustering software STRUCTURE version 2.3.3 in order to estimate the

most likely number of genetic clusters in the RRV monitoring area (Pritchard et al. 2000). We performed the analyses using a model with admixture, separate α for each population, and allele frequencies correlated (using $\lambda = 1.0$) among genetic clusters, and without using prior information on sampling location. For each value of K (number of clusters: from 1 to 4), we ran five independent models with 250 000 iterations, plus a burnin period of 100 000 iterations. Means of the ln-probabilities of all independent runs for a given K were then calculated. Since the highest value of mean ln-probability was obtained for K = 1, no further analyses were performed in order to determine the most probable number of clusters.

To further identify the relative importance of factors shaping the spatial genetic distribution of individuals in the landscape, we assessed the effect of linear geographic distance and that of the Richelieu River. We used SPAGeDI version 1.3 (Hardy and Vekemans, 2002) to estimate pairwise genetic relatedness (R_{xy}) between all sampled individuals with Wang's estimator (Wang, 2002). We also calculated the geographic distance (km) among individuals using the extension Hawth's tool in ArcGIS version 3.2.2. The presence of isolation by distance (IBD) among individuals was assessed using Mantel tests (Mantel, 1967) implemented in FSTAT. We conducted analyses over all individuals and then separately for each sex to assess whether potential for RRV spread differs according to gender. We then used Partial Mantel tests implemented in FSTAT to establish the strength and significance of the partial correlations between the presence of the Richelieu River, the geographic distance and the pattern of observed genetic differentiation among individuals. Again, these tests were performed over all individuals and separately for each sex to assess whether spread potential and effect of barriers were different depending on gender.

Comparisons between RRV monitoring and peripheral areas

We compared allelic richness, observed heterozygosity and F_{IS} among sites using analyses of variance (ANOVAs) in the software R (Nocture et al. 1998; Crawley, 2007; R Core Development Team, 2008). We also calculated pairwise genetic differentiation among sites using F_{ST} . Again, we tested for IBD but this time assessing the relationships between the genetic differentiation (F_{ST}) and geographical distance (km) among sites. As individuals from

each group were distributed over a large territory, we used the central sampling point of each group to calculate the geographical distances between them.

Table 1: Sample sizes of genotyped individuals with observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, allelic richness (A_R) and inbreeding coefficient (F_{IS}) for sites sampled in southern Quebec, Canada. The number of females and males genotyped for each site are presented in parentheses (F, M).

		North shore of St. Lawrence River	Orléans Island	Montréal	Charron Island	RRV monitoring area
Locus	Sample size	48 (27, 21)	52 (25,27)	20 (11, 9)	29 (13,16)	273 (121, 152)
PLOM15	H_O	0.88	0.73	0.90	0.71	0.87
	H_E	0.88	0.73	0.79	0.71	0.86
	A_R Rich.	10.62	5.94	9.00	8.56	11.32
	F_{IS}	0.001	0.009	-0.101	0.011	-0.012
PLO2-117	H_O	0.94	0.90	1.00	0.90	0.86
	H_E	0.91	0.83	0.90	0.88	0.92
	A_R	14.48	10.04	13.00	12.23	15.79
	F_{IS}	-0.025	-0.074	-0.092	-0.007	0.059
PLOM3	H_O	0.71	0.67	0.65	0.65	0.78
	H_E	0.78	0.75	0.75	0.64	0.80
	A_R Rich.	5.60	4.77	6.00	4.90	5.65
	F_{IS}	0.087	0.118	0.158	-0.002	0.010
PLOM 20	H_O	0.88	0.71	0.90	0.90	0.83
	H_E	0.88	0.72	0.83	0.86	0.89
	A_R Rich.	11.98	7.70	11.00	12.01	12.29
	F_{IS}	0.01	0.024	-0.054	-0.022	0.054
PLO2-14	H_O	0.83	0.75	0.90	0.72	0.88
	H_E	0.84	0.75	0.88	0.83	0.89
	A_R	11.09	9.73	13.00	11.54	13.64
	F_{IS}	0.017	0.013	-0.003	0.161	0.002
PLOM2	H_O	0.81	0.90	0.80	0.82	0.89
	H_E	0.81	0.78	0.75	0.83	0.88
	A_R Rich.	9.74	6.36	9.00	7.91	10.40
	F_{IS}	-0.006	-0.143	-0.036	0.035	0.002
PLOM17	H_O	0.73	0.58	0.75	0.79	0.77
	H_E	0.74	0.69	0.67	0.78	0.81
	A_R Rich.	5.32	5.71	5.00	5.99	6.28
	F_{IS}	0.013	0.177	-0.100	0.003	0.052
PLM06	H_O	0.55	0.91	0.80	0.59	0.68
	H_E	0.69	0.73	0.68	0.67	0.74
	A_R Rich.	3.85	4.62	4.00	3.69	5.08
	F_{IS}	0.195	-0.225	-0.156	0.142	0.096
PLM10	H_O	0.88	0.81	0.85	0.75	0.83
	H_E	0.85	0.78	0.82	0.71	0.86
	A_R	7.88	5.76	8.00	7.32	9.02
	F_{IS}	-0.025	-0.027	-0.013	-0.034	0.029
PLM20	H_O	0.69	0.73	0.70	0.48	0.73
	H_E	0.74	0.72	0.74	0.65	0.76
	A_R Rich.	7.70	5.79	9.00	7.27	7.81
	F_{IS}	0.066	-0.011	0.081	0.279	0.065

RESULT

Microsatellite polymorphism

A total of 422 raccoons were genotyped at ten microsatellites (Table 1). All loci were highly polymorphic, exhibiting from 7 to 37 alleles per locus with an average of 17.1 (\pm 10.3 SD). Observed heterozygosity per locus ranged from 0.66 to 0.92 (Table 1). Expected heterozygosity ranged from 0.72 for PLM-06 to 0.93 for PLO2-117. Overall F_{IS} within each sampling sites ranged from -0.031 (Montréal) to 0.053 (Charron Island) (Table 1). F_{IS} were significantly higher than expected in both Charron Island ($P=0.035$) and in the RRV area samples ($F_{IS} = -0.035$, $P=0.001$). No significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium was detected after Bonferroni correction. Null alleles were found at low frequencies within our data (less than 5%).

Genetic differentiation analyses

RRV monitoring area

The level of genetic differentiation estimated between the individuals sampled respectively on the East and West sides of the Richelieu River was low but highly significant ($F_{ST}= 0.009$, $P < 0.001$). Yet, STRUCTURE analyses indicated the presence of a single genetic cluster within the RRV monitoring area ($K=1$, estimated likelihood = -11413.2; Figure 3).

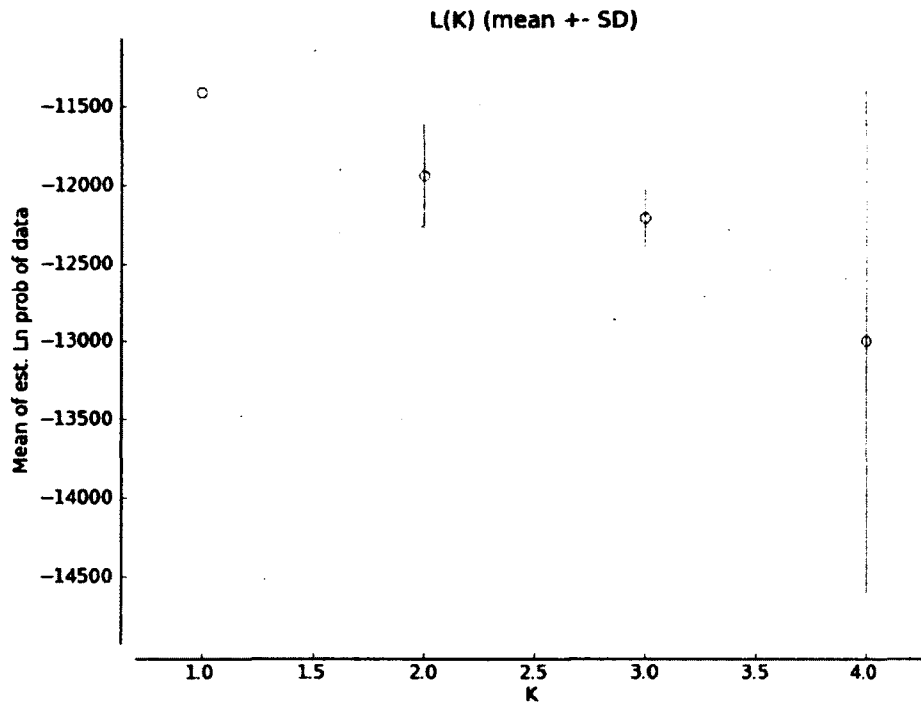


Figure 3: Mean estimated likelihood (ln-probability) of genetic clusters ($K = 1$ to 4) obtained from STRUCTURE analyses within the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Mean of five replicated analyses per cluster are presented with their standard deviations.

Mantel tests conducted on all the sampled individuals in the RRV monitoring area revealed that raccoon pairs that were more genetically related were also geographically closer to each other, although this correlation disappeared when the analyses were conducted on both sexes separately (Table 2). The results of the Partial Mantel tests suggest that animals located on the same side of the Richelieu River were more genetically related than individuals found on opposite sides. Pattern of IBD disappeared after accounting for the presence of the river (Table 2). Analyses conducted in each sex separately suggest that the presence of the Richelieu River affects males and females differently. Females located on the same side of the river were significantly more related than females located on opposite sides, whereas no differences were found in males (Table 2).

Table 2: Mantel and Partial Mantel tests results for the correlations between the geographic distance (km) and the presence of the Richelieu River with the pairwise estimated genetic relatedness (Wang, 2002) among individual raccoons sampled in the RRV surveillance zone in southern Quebec, Canada. The percentage of variation explained by the models (r^2), the slopes (β), the partial correlation coefficients (r) and their associated P -values are reported.

Test	r^2	Explanatory variable	β	r	P -value
Mantel tests	Overall ($r^2=0.0001$)	Geographic distance	-0.00003	-0.01109	0.04
	Females ($r^2=0.0003$)	Geographic distance	-0.00005	-0.01643	0.17
	Males ($r^2=0.0001$)	Geographic distance	-0.00002	-0.00893	0.3
Partial Mantel tests	Overall ($r^2=0.0005$)	Geographic distance	0.000001	0.01109	0.97
		Presence of Richelieu River	-0.00616	-0.01931	0.0005
	Females ($r^2=0.0014$)	Geographic distance	0.00002	0.01643	0.69
		Presence of Richelieu River	-0.01094	-0.03304	0.008
	Males ($r^2=0.0003$)	Geographic distance	-0.000003	-0.00893	0.91
		Presence of Richelieu River	-0.00420	-0.01344	0.16

Comparison between RRV monitoring and peripheral areas

To evaluate the population structure of raccoons over a larger spatial scale, we performed additional genetic analyses including a site located on the North shore of the St. Lawrence River (Lanaudière region near Montréal), three islands located on the St. Lawrence River (Montréal, Charron and Orléans Islands) and the RRV monitoring area (Figure 1, 2). The mean distance between sites was 125.5 km (range between 16-254 km) and the average F_{ST} value between them was 0.044 ± 0.006 (Table 3). The highest level of genetic differentiation was detected between Orléans and Charron Islands ($F_{ST} = 0.099$) and the lowest value was found between the Lanaudière region (North shore of the St. Lawrence River) and the Island of Montréal ($F_{ST} = 0.021$, Table 3). We found a signal of IBD among all our sites, as revealed by a significant positive correlation between the level of genetic differentiation and the geographical distance ($r = 0.64$, slope = 0.00021, $P = 0.037$).

Table 3: Genetic differentiation (pairwise F_{ST} values) estimated with FSTAT between all sampled sites in southern Quebec, Canada (above the diagonal) and geographic distance (in km) among sites (below the diagonal). Note that all F_{ST} values are significant ($P < 0.05$).

	Lanaudière	Orléans Island	Montréal	Charron Island	RRV monitoring area
Lanaudière	—	0.084	0.021	0.079	0.027
Orléans Island	226	—	0.094	0.099	0.054
Montréal	33	254	—	0.061	0.022
Charron Island	33	243	16	—	0.034
RRV monitoring area	86	200	90	74	—

Analyses comparing genetic diversity revealed that allelic richness (A_R) was significantly different among sites ($F = 13.8$, $df = 4$, $P < 0.001$). This difference was due to a lower allelic richness on Orléans Island (mean $A_R = 6.64$ alleles) than in other sites (all $P < 0.01$). On the other hand, the RRV monitoring area harbored a higher A_R compared to every other sites (mean $A_R = 9.73$ alleles, all $P < 0.05$). We found no difference in F_{IS} ($F = 1.88$, $df = 4$, $P = 0.14$) or observed heterozygosity values ($F = 2.15$, $df = 4$, $P = 0.09$) among sites.

DISCUSSION

The objective of this study was to use landscape genetic approaches to investigate whether population genetic structure is related to the RRV cases distribution documented in Quebec from 2006 to 2009 and to evaluate the potential for RRV spread in raccoons at larger scale. All RRV cases in raccoons were found on the East side of this Richelieu River suggesting that this river might restrict raccoon movements. Accordingly, we found that there was a low but significant genetic differentiation among groups located on both side of the Richelieu River. However, the river appears to be a relatively weak barrier to gene flow, as we identified a single genetic cluster within the RRV monitoring area and as we found a signal of isolation by distance among individuals over this area. Also, our larger scale investigation suggests that the genetic differentiation observed in the RRV monitoring area is relatively small. Similarly, the genetic differentiation of raccoons among islands and on the North shore of the St. Lawrence River was significant but relatively small, suggesting that in the absence of control operations RRV could potentially spread in northern areas.

RRV monitoring area population genetic structure

Previous studies based on spatial dynamics of terrestrial rabies suggested that the presence of rivers could act as natural barriers slowing the spread of this disease (Smith et al. 2002; Russel et al. 2006) and recent molecular evidence partly supported this contention (Cullingham et al. 2009). Our results also suggest that rivers may not always act as a permeable barrier to gene flow, as we detected a weak genetic substructuring in relation to the Richelieu River. This result also suggest that the Richelieu River restricted RRV spread in that area as all raccoon rabies cases in Southern Quebec were found on the East side of the Richelieu River (Figure 1). Although comparisons between F_{ST} values stemming from different studies must be made cautiously (Meirmans and Hedrick, 2011), it is interesting to note that the low level of genetic differentiation found in this study area is even weaker than the one reported in a study in the Niagara region conducted by Cullingham et al (2009). A potential explanation for these low

levels of genetic differentiation is that the presence of human infrastructure (such as bridges) could allow animals to cross natural barriers. Cullingham et al (2009), however, argued that walking or 'hitch-hiking' across bridges was unlikely to explain this low differentiation because the F_{ST} values were not associated with the number of bridges presents. In our study areas, there are five bridges and two railways that could allow raccoons to cross the Richelieu River. Moreover, raccoons are known as pest animals, often relying on domestic garbage as food sources and habitations as shelters (Rosatte et al. 2010). Thus, humans also promote raccoon movements via translocation of undesirable animals, a practice that should not be encouraged in the context of disease spread.

We also detected the presence of IBD among individuals within our study area. Indeed, we found that, on average, animals that were spatially close were also genetically more related to each other. Such pattern has been reported for other carnivore species. For example, Frantz et al. (2010) showed a strong pattern of IBD among European badgers (*Meles meles*) in western England. In our study area, however, further analyses revealed that the global pattern is weak, as no IBD is found when analyses are done on males or females separately. Female genetic structure seemed, on the other hand, mainly shaped by the presence of the Richelieu River. Indeed, a Partial Mantel test analysis indicated that, when accounting for the presence of the Richelieu River, females located on the same side of the river were more related to each other than females located on different sides. Our results thus appear concordant with previous empirical studies suggesting that female raccoons are often philopatric while males are more likely to disperse (Gehrt and Fritzell, 1998; Cullingham et al. 2009; Rosatte et al. 2010). The absence of a barrier effect of the Richelieu River for males could also be explained by the difference in mating strategies between the sexes. Indeed, as our study area is located at the northern edge of the distribution of this species (Gehrt, 2003), the mating season occurs in winter (February-March) when most major rivers are covered with ice and snow. Although raccoons are mostly inactive during winter (Pitt et al. 2008), male raccoons are more likely to move during that period when searching for mating partners (F. Pelletier unpublished results). Breeding dispersal (and therefore gene flow) of male raccoons is therefore less likely to be limited by rivers at this time of the year (Cullingham et al. 2009). Other studies on raccoons

over a heterogeneous landscape in north-central Indiana, USA, found evidence of a genetic structure over a relatively small scale and of male-biased dispersal (Dharmarajan et al. 2009). Altogether, these results emphasize the importance of considering landscape heterogeneity and behavioral differences in dispersal patterns between males and females to understand pattern of genetic differentiation in mammals, as well as their respective potential impact on disease spread.

Comparison between RRV monitoring and peripheral areas

While our analyses conducted within the RRV monitoring area provided detailed information on gene flow within the region where RRV cases have been detected in Quebec, our characterization of population genetic differentiation in relation to the peripheral area provides insights on the main potential paths for rabies propagation in Quebec. At this larger scale, we found evidence of IBD thus suggesting that long distance migrants are not common enough to prevent genetic structuring within our system. Raccoon is a medium-size omnivorous mammal and, while some specimens have already been observed at more than 200 kilometers from their point of origin (Rosatte et al. 2007), it appears that the majority of raccoons from both sexes move on considerably shorter distances that possibly maintain the rather homogeneous genetic structure observed within the Quebec RRV monitoring area. Dharmarajan et al. (2009) reported that typically, without the presence of major barriers to dispersal, approximately 10% of raccoons dispersed more than 20 km. A previous study, conducted in Pennsylvania, also found a strong signature of IBD among groups of raccoons using a landscape genetics approach (Root et al. 2009).

The greatest average level of genetic differentiation was found between Orléans Island and the other sites (mean $F_{ST} = 0.083$). Part of this differentiation is due to the distance separating Orléans Island from those other sites (mean = 231 km) and more importantly, to the fact that it is an island which further isolate the raccoons inhabiting it from those living on mainland. Orléans Island also harbored a low allelic richness, potentially suggesting a founder effect on

this Island, which might have further increased the genetic differentiation with the other sites examined in this study. Further detailed investigation with additional sampling sites located on each side of the St. Lawrence River are warranted before reaching a general conclusion on the strength of the isolation among populations and on the potential for RRV spread. Yet, our findings of significant level of genetic differentiation among populations on each side of the St. Lawrence River contrast with the previous study conducted in Ontario by Cullingham et al. (2009), in which there was no such effect. Such potentially conflicting results could likely be explained by the variation in the extent of river flow between the two study sites. In Quebec, for example, the flow of the St. Lawrence River is stronger than the stretch of river where the study was conducted in Ontario (see Cullingham et al. 2009). In winter, the flow of the St. Lawrence River in Quebec remains important and ice is generally carried away by the current, preventing both shores to be joined by an ice bridge. Additionally, the Canadian Coast Guard provides maritime traffic in the waters of the St. Lawrence River through the winter. Such measures may have an important impact on the movements of raccoons in winter and spring. However, other parameters are important to consider, such as differences in raccoon density, sex-specific dispersal patterns of animals within the available habitats of a given landscape, as well as shape differences of the landscape among study sites (Cullingham et al. 2009; Rees et al. 2009).

Potential applications to the control of rabies spread in Quebec

Identification of barriers to rabies host movements is important as this information can be used to improve disease containment strategies. Planning interventions, such as rabies vaccination (through capture or distribution of oral baits) in conjunction with natural barriers would create a better buffer zone by limiting subsequent rabies epidemics (Rosatte et al. 2001). Our research only partially supports the suggestion that large rivers can be used for that purpose, at least, in northern location. Indeed, even a large river like the Richelieu River was not affecting in a detectable manner patterns of relatedness and genetic substructuring within the RRV monitoring area, suggesting little effect on raccoon movement. Our results and those of

Cullingham et al. (2009) also suggest that the degree of permeability of a river is likely to be affected by the presence of ice in winter. This result has two main consequences for modeling and controlling the propagation of infectious diseases such as raccoon rabies. First, the presence of rivers needs to be included in investigation of potential barrier against disease spread, but this only in combination with information on the likelihood of ice-bridge formation during winter. The presence of ice bridges is likely to affect gene flow between populations and rivers with long period of ice presence should consequently have a high permeability to raccoon movements. Second, if ice bridges affect river permeability, then one should expect that the use of river to target control efforts should be more efficient in regions where ice is unlikely to form during winter. In the Quebec RRV monitoring area, the long winter period likely allows male raccoons to move from one shore to the other during the mating season, therefore increasing the risk of RRV spread, although it has not occurred so far with the help of large-scale control programs. In more northern regions, such as northeastern USA and Canada, ice breaking operations, when possible, could be useful to further control rabies spread.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to trappers, veterinaries and technicians from the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (MRNFQ), the ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) and the Centre Québécois sur la Santé des Animaux Sauvages (CQSAS) for collecting and providing samples. In particular, we thank Frédéric Lelièvre, Pierre Canac-Marquis, Isabelle Rémillard and Denis Fournier for providing samples and data from sites located in the peripheral area of the RRV monitoring area. We are also grateful to Melody Porlier, Jennifer Chambers and Hélène Presseault-Gauvin for their support and help with genetic analyses. We acknowledge the financial contribution of the MRNFQ to this research. D.G and F.P. are funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grants and the Canada Foundation for Innovation. F.P. holds the Canada Research Chair in Evolutionary Demography and Conservation. D.G. FP. and J.M are funded by a research team grant provided by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: GenBank accession number, primer sequences 5' and 3' (type of fluorescence indicated before the sequence of the primer 5' or 3'), repetition pattern, allele size (in base pairs - bp), and annealing temperature (T_a) for microsatellite loci used in this study. The loci were selected based on their polymorphism and their size (Cullingham et al. 2006; Fike et al. 2007; Siripunkaw et al. 2008).

#GenBank	Name	Primer sequences	Repetition pattern	Alleles size (bp)	T_a
DQ388432	PLO-M15	F: VIC-ACTGAGACCACTGAGC	(AGAT)13	153-203	60
		R: CAGATTTCAAGTCGATCGATG			
DQ388433	PLO2-117	F: FAM-ATATGCCGGGTCTAGGACAACACTG	(GATA)13(GT)16	274-368	56
		R: CTAGTAATATCATGAGAAGCG			
DQ388435	PLO-M3	F: NED-CTCCCATCTTCTCTTTTCG	(ATCT)15	258-281	56
		R: GTTGACAATTGCAGGACCAC			
DQ388437	PLO-M20	F: GATTCTTATGTCTCTTGGGA	(TCTA)17	170-218	54
		R: NED-AAGTGCTTCAAGAGAAAGTGC			
DQ388438	PLO2-14	F: FAM-AAGAGCGTAATAAAAGCTTAC	(GAAA)21	211-357	56
		R: CAAATAACAAGTTTCAATTTGG			
DQ388439	PLO-M2	F: GGAAAACCACAGAGAGACGG	(TCTA)7(TCTG)6 (TCTA)8	272-324	56
		R: VIC-CTTGGCACAGAGCAGAATCC			
DQ388440	PLO-M17	F: VIC-CTGCTGAGTAAGGAGTAAGG	(GTTT)3(TATC)12	203-231	56
		R: TCCCCTGTACATATTCAGGC			
EF569609	PLM06	F: NED-AAAAGTGTGCCTTTGATTACGG	(GT)24	91-119	56
		R: ATACACTGGTGGGAATGT			
EF569613	PLM10	F: FAM-ACATACCTCCACCCTACCC	(GT)22	104-134	58
		R: AAGTCCCATAGGCACACCAG			
EF569621	PLM20	F: FAM-TGTCTACTGTCCCTGCTAACTCC	(GT)12AT(GT)4	112-152	56
		R: ATCATAGTGCCCCCTCCAA			

Table S2 Polymerase chain reaction reagents mixes (final volume of 10 uL per sample) for the ten microsatellite loci used in this study.

Products	PLM20 (uL)	PLO2-117 PLOM 3 PLOM 17 PLO2-14 PLOM 20 (uL)	PLOM 15 (uL)	PLOM 2 (uL)	PLM06 PLM10 (uL)
H ₂ O	2.8	4.45	4.45	3.95	4.9
10X	1.25	1	1	1	1.25
MgCl ₂	0.75	1	1	0.5	1.2
dNTP	2.5	1.25	1.25	1.25	2.5
BSA	--	0.5	--	0.5	--
forward primer	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
reverse primer	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Taq	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
DNA (5ng/mL)	2	2	2	2	2

CONCLUSION

Analyses de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur

L'analyse de la diversité génétique a permis d'identifier la présence d'une sous-structure au sein des individus présents dans la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur à l'est et à l'ouest de la rivière Richelieu, avec une valeur de différenciation génétique faible, mais significative. En regard de la répartition des cas de rage depuis 2006, la rivière Richelieu semble être une barrière faible à la migration des ratons laveurs au Québec. La présence de glace en hiver et la translocation de ratons laveurs par les humains pourraient être deux facteurs importants qui tendent à diluer la différenciation génétique entre ces deux populations.

Lorsque l'on analyse la présence d'isolement par la distance (IBD) au Sud du Québec, on constate qu'elle est forte. Les ratons laveurs qui ont été considérés pour l'analyse de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur sont répartis sur le territoire de façon continue, et les individus qui sont près géographiquement sont également plus apparentés génétiquement. Lorsque l'IBD a été observé séparément pour les mâles et les femelles, les résultats ont montré que la tendance générale était grandement attribuable aux mâles, et qu'elle n'était pas significative pour les femelles. Par contre, la structure génétique des femelles semble grandement liée à la présence de la rivière Richelieu. Les femelles séparées par la rivière sont de fait plus éloignées génétiquement. Pour les femelles présentes du même côté de la rivière, plus elles sont près géographiquement, plus elles sont apparentées génétiquement. Par conséquent, la rivière Richelieu pourrait constituer une barrière au flux de gènes pour les femelles ratons laveurs, mais pas pour les mâles. L'étude de Dharmarajan *et al.* (2009) menée en Indiana (États-Unis) a également mis en évidence la présence d'une structure génétique chez le raton laveur et d'une différence entre la dispersion des mâles et des femelles. Pour cette étude, la tendance pourrait être expliquée en partie par le mode de reproduction du

raton laveur. En effet, une étude en cours montre que la saison de reproduction a lieu, au Québec, de février à avril et que ce sont les mâles uniquement qui sont actifs à cette période (Fanie Pelletier, données non publiées). À cette période de l'année, la glace est toujours présente sur la rivière et cette dernière ne représenterait pas une barrière à la migration.

Comparaison entre la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur et les zones périphériques

L'analyse menée au niveau de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur a permis de mieux détailler la structure de population sur le territoire où les cas de rage ont été répertoriés au Québec. L'analyse des zones périphériques permet de mettre en perspective les résultats obtenus lors de l'analyse de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur et, par conséquent, de mieux caractériser la différenciation génétique à grande échelle au Québec. Cette analyse a permis de donner une idée du potentiel de propagation de la rage du raton laveur à plus grande échelle.

Mes résultats montrent que la différenciation génétique entre les différents groupes de l'analyse des zones périphériques augmente considérablement avec la distance. La présence d'isolement par la distance a été répertoriée chez beaucoup d'espèces de mammifères (Chambers et Garant, 2010; Frantz *et al.*, 2010; González-Suárez *et al.*, 2009; Neaves *et al.*, 2009). Le fleuve Saint-Laurent semble ainsi être une barrière semi-perméable à la migration des rats laveurs. La différenciation génétique la plus élevée se situe entre l'île d'Orléans et les autres sites (moyenne $F_{ST} = 0.083$). De plus, une diversité génétique plus faible dans l'île d'Orléans et l'île Charron est apparente. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence d'un effet fondateur. L'effet fondateur est présent lorsqu'une population est créée à partir d'un nombre relativement restreint d'individus d'une autre population. En général, seule une partie de la richesse allélique de la population d'origine est préservée. Il en résulte donc que la nouvelle population est plus uniforme et moins diversifiée que la population d'origine. La

valeur la plus faible de différenciation est trouvée entre les deux populations du Sud du Québec.

Le raton laveur est un mammifère omnivore de taille moyenne chez qui les distances de dispersion sont plutôt restreintes, bien que certains individus aient déjà été observés à plus de 200 km de leur point d'origine (Rosatte *et al.*, 2007). Les distances de dispersion varient généralement entre 1 et 17 km en fonction de l'aire d'étude, du sexe et de l'âge des individus (Rosatte *et al.*, 2010). Généralement, moins de 10 % des individus se dispersent sur une distance de plus de 20 km (Dharmarajan *et al.*, 2009). L'étude montre que la migration sur de longues distances est peu fréquente dans notre aire d'étude, puisqu'elle n'est pas suffisante pour prévenir la formation de populations distinctes.

Au Québec, la Garde côtière canadienne permet le trafic maritime dans les eaux du Saint-Laurent pendant l'hiver. Par conséquent, à certains endroits sur le fleuve, il y a peu ou pas de formation de glace. Également, son débit est important et la glace est généralement emportée par le courant, ce qui empêche les deux côtés de la rive d'être rejoints par un pont de glace. L'effet de la barrière peut être plus efficace puisque les ratons laveurs ne peuvent pas traverser la rivière sur les glaces. Les résultats de différenciation génétique entre les populations de l'analyse des zones périphériques contrastent avec ceux de Cullingham *et al.* (2009) pour le fleuve en Ontario. Certaines différences présentes entre les deux sites peuvent expliquer ces résultats, notamment le débit de la rivière et l'habitat disponible pour le raton laveur de chaque côté de la rivière aux différents sites. En effet, les ratons laveurs se dispersent généralement sur de moins grandes distances lorsque l'habitat est adéquat et les ressources disponibles (Cullingham *et al.*, 2009; Rosatte *et al.*, 2010).

Contribution et innovation

Connaître les zones d'intervention prioritaires au Québec pour les opérations de contrôle de la rage est très important afin de les optimiser et de diminuer les frais d'opération. La vaccination

des hôtes contre la rage, en fonction de la présence de rivières, permettrait de créer une zone tampon et de limiter les épidémies de rage. Chaque année, à l'automne, le MRNF procède à l'épandage manuel et aérien d'appâts vaccinaux dans les zones boisées et autour des cours d'eau dans environ 150 municipalités du Sud du Québec. Quelque 960 000 appâts se retrouvent ainsi au sol afin d'immuniser les rats laveurs contre la rage. Il va sans dire que les opérations de contrôle sont très coûteuses. Puisque nos résultats indiquent la présence d'isolement par la distance chez les rats laveurs au Québec, la probabilité qu'un cas de rage se retrouve loin de la zone d'infection est peu probable à court terme. Par conséquent, déployer les opérations de contrôles à proximité des zones d'infection semble tout indiqué.

Depuis 2006, tous les cas de rage au Québec ont été répertoriés à l'est de la rivière Richelieu, et semblent provenir de l'État du Vermont (États-Unis). De nombreux cas ont été répertoriés dans cet État en 2009-2010, dont plusieurs à proximité de la frontière canadienne. L'état du Vermont a mis en place des méthodes de contrôle, notamment la distribution d'appâts vaccinaux pour les hôtes de la rage du raton laveur, mais cette action est concentrée principalement à proximité des milieux urbains. Une zone tampon entre le Québec et le Vermont est présentement en place afin d'éviter que les animaux rabiques franchissent la frontière. Le renforcement de cette barrière immunologique et un travail en étroite collaboration avec les agents responsables du contrôle de la rage au Vermont sont absolument nécessaires afin d'empêcher l'entrée de nouveaux cas de rage au Québec. En regard de la distribution des cas retrouvés au Québec et de la présence de nombreux animaux infectés répertoriés au Vermont, tout porte à croire qu'il est possible que de nouveaux cas de rage soient trouvés dans ce secteur. Puisque la rivière Richelieu est probablement une faible barrière à la dispersion, des rats laveurs rabiques pourraient éventuellement la traverser. Le suivi effectué chaque année chez les hôtes de cette maladie doit être maintenu afin de contrôler efficacement la rage au Québec.

Les résultats de cette recherche ont permis de déterminer que les rivières à faible débit avec présence de glace en hiver sont probablement des barrières à la migration des rats laveurs

femelles. Ces obstacles potentiels pourraient être utilisés pour les méthodes de lutte contre la rage, mais avec parcimonie, car elles ne semblent pas un obstacle à la migration des mâles. Les rivières à fort débit, où il n'y a pas de formation de glace en hiver, sont probablement des barrières plus efficaces à la migration des ratons laveurs. Elles pourraient donc être utilisées de façon plus sécuritaire comme zones de contrôle. Cela suggère aussi que le brisage de la glace en hiver sur les cours d'eau, lorsque les conditions le permettent et dans les secteurs où la maladie est en expansion, pourrait être utilisé comme méthode de contrôle supplémentaire. Par contre, même pour de telles rivières, la migration des ratons laveurs n'est pas complètement interrompue, ce qui souligne l'importance de maintenir d'autres types d'intervention tels que l'épandage d'appâts vaccinaux. Le gouvernement du Québec est particulièrement préoccupé par la possibilité que la rage s'introduise sur l'île de Montréal. Puisque certains échanges ont lieu entre l'île et les deux rives, la possibilité qu'un raton laveur rabique s'introduise éventuellement sur l'île de Montréal ne doit pas être écartée.

D'intéressantes perspectives de recherche futures émergent de mes travaux. Dans un premier temps, il serait pertinent d'identifier les habitats les plus fréquentés par ce mammifère. Cette connaissance est d'une importance capitale afin de bien répartir les appâts vaccinaux pour qu'ils soient consommés efficacement (Rosatte *et al.*, 2010). L'estimation des densités de ratons laveurs et de la productivité de ces habitats serait également nécessaire pour avoir une idée du potentiel de migration des individus et de la probabilité qu'ils franchissent les barrières naturelles. Une troisième perspective de recherche importante serait de vérifier si les barrières naturelles à la dispersion du raton laveur sont également des barrières à la dispersion des autres hôtes de la rage du raton laveur, notamment le renard roux et la moufette rayée. En effet, depuis 2006, 16 cas de rage ont été répertoriés chez la moufette rayée à l'est de la rivière Richelieu. Également, un cas de rage du raton laveur a été répertorié du côté ouest de la rivière Richelieu chez un renard roux, ce qui pourrait indiquer que les rivières sont des barrières moins efficaces à la dispersion de cette espèce. Donc, même en considérant que les rivières sont des barrières complètement imperméables à la dispersion des ratons laveurs, la rage pourrait tout de même se retrouver de l'autre côté des barrières naturelles grâce aux renards

roux. Une approche multi-vecteurs dans le cas de la rage du raton laveur semblerait donc être la méthode à privilégier pour un contrôle efficace de la rage au Québec.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson, R.M., and May, R.M. (1991) *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*: Oxford University Press, Oxford, UK.

Archie, E.A., Luikart, G., and Ezenwa, V.O. (2009) Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Trends Ecol. Evol.*, *24*, 21-30.

Biek, R., Henderson, J.C., Waller, L.A., Rupprecht, C.E., and Real, L.A. (2007) A high-resolution genetic signature of demographic and spacial expansion in epizootic rabies virus. *PNAS*, *104*, 7993-7998.

Biek, R., and Real, L.A. (2010) The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Mol. Ecol.*, *19*, 3515-3531.

Blanchong, J.A., Samuel, M.D., Scribner, K.T., Weckworth, B.V., Langenberg, J.A., and Filcek, K.B. (2008) Landscape genetics and the spacial distribution of chronic wasting disease. *Biol. Lett.*, *4*, 130-133.

Bourhy, H., Kissi, B., Audry, L., Smreczak, M., Sadkowska-Todys, M., Kulonen, K., Tordo, N., Zmudzinski, J.F., and Holmes, E.C. (1999) Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J. Gen. Virol.*, *80*, 2545-2557.

Canac-Marquis, P., Rioux, R., Dicaire, A., Rajotte, D., Sirois, C., Huot, M., Guérin, D., Gagnier, M., and Jolicoeur, H. (2007) Le contrôle de la rage du raton laveur en Montérégie en 2006: déroulement des opérations de terrain. *Nat. Can.*, *131*, 17-25.

Chapuis, M.-P., and Estoup, A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.*, *24*, 621-631.

Centers for disease control and prevention. (1994) Raccoon rabies epizootic - United States, 1993. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.*, *43*, 269-273.

- Chambers, J.L., and Garant, D. (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.
- Childs, J.E., Curns, A.T., Dey, M.E., Real, L.A., Feinstein, L., Bjornstad, O.N., and Krebs, J.W. (2000) Predicting the local dynamics of epizootic rabies among raccoons in the United States. *PNAS*, *97*, 13666-13671.
- Corander, J., Marttinen, P., Siren, J., and Tang, J. (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinform.*, *9*, 539.
- Crawley, M.J. (2007) *The R Book*. West Sussex, Wiley, 75, 425-426.
- Crispo, E., and Hendry, A.P. (2005) Does time since colonisation influence isolation by distance? A meta-analysis. *Conserv. Genet.*, *6*, 665-682.
- Cullingham, C.I. (2007) Analysis of the genetic structure of raccoons (*Procyon lotor*) across eastern North America: applications for wildlife disease management. Ph.D. thesis, Watershed Ecosystems Graduate Program, Trent University, Peterborough, Ont.
- Cullingham, C.I., Pond, B.A., Kyle, C.J., Rees, E.E., Rosatte R.C. and White, B.N. (2008) Combining direct and indirect genetic methods to estimate dispersal for informing wildlife disease management decisions. *Mol. Ecol.*, *17*, 4874-4886.
- Cullingham, C.I., Kyle, C.J., Pond, B.A., Rees, E.E., and White, B.N. (2009) Differential permeability of rivers to raccoon gene flow corresponds to rabies incidence in Ontario, Canada. *Mol. Ecol.*, *18*, 43-53.
- Cullingham, C.I., Kyle, C.J., and White, B.N. (2006) Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide microsatellite loci. *Mol. Ecol. Notes*, *6*, 1030-1032.
- Curtis, A. (1999) Using a spatial filter and a geographic information system to improve rabies surveillance data. *Emerg. Infect. Dis.*, *5*, 603-606.
- Dharmarajan, G., Beasley, J.C., Fike, J.A., and Rhodes, O.E. (2009) Population genetic structure of raccoons (*Procyon lotor*) inhabiting a highly fragmented landscape. *Can. J. Zool.*, *87*, 814-824.

Dobson, A. (2000) Raccoon rabies in space and time. PNAS, 97, 14041-14043.

Fike, J.A., Drauch, A.M., Beasley, J.C., Dharmarajan, G., and Jr., O.E.R. (2007) Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons *Procyon lotor*. Mol. Ecol. Notes, 7, 525-527.

Frantz, A.C., Cellina, S., Krier, A., Schley, L., and Burke, T. (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? J. App. Ecol., 46, 493-505.

Frantz, A.C., Pope, L.C., Etherington, T.R., Wilson, G.J., and Burke, T. (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.

Garant, D., Forde, S.E., and Hendry, A.P. (2007) The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. Funct. Ecol., 21, 434-443.

Gauthier-Clerc, M., and Thomas, F. (2010) Écologie de la santé et biodiversité. Bruxelles: De Boeck, pp.538.

Gehrt, S.D. (2003) Raccoons and allies. In *Wild Mammals of North America, 2nd edition*. Edited by G.A. Feldhamer, J.A. Chapman, B.C. Thompson. Johns Hopkins University Press., pp 611-634.

Gehrt, S.D., Clark, D.E., and Fritzell, E.K. (1997) Population dynamics and ecology of Virginia opossums in southern Texas. Southwest. Nat., 42, 170-176.

Gehrt, S.D., and Fritzell, E.K. (1998a) Duration of familial bonds and dispersal patterns for raccoons in south Texas. J. Mammal., 79, 859-872.

Gehrt, S.D., and Fritzell, E.K. (1998b) Resource distribution, female home range dispersion and male spacial interactions: group structure in a solitary carnivore. Anim Behav., 55, 1211-1227.

González-Suárez, M., Flatz, R., Aurióles-Gamboa, D., Hedrick, P.W., and Gerber, L.R. (2009) Isolation by distance among California sea lion populations in Mexico: redefining management stocks. Mol. Ecol., 18, 1088-1099.

Goudet, J. (1995) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*, *86*, 485-486.

Greenwood, P.J. (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim. Behav.*, *28*, 1140-1162.

Grenfell, B.T., and Dobson, A.P. (1995) Ecology of infectious diseases in natural populations. New York: Cambridge University press, pp.527.

Guillot, G., Mortier, F., and Estoup, A. (2005) Geneland: A program for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes*, *5*, 712-715.

Hardy, O.J., and Vekemans, X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes*, *2*, 618-620.

Henner, C.M., Chamberlain, M.J., Leopold, B.D., and Burger, L.W. (2004) A multi-resolution assessment of raccoon den selection. *J. Wild. Manage.*, *68*, 179-187.

Holderegger, R., and Wagner, H. (2006) A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecol.*, *21*, 793-796.

Jarne, P., and Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, *11*, 424-429.

Johnson, A.S. (1970) Biology of the raccoon (*Procyon lotor varius* Nelson and Goldman) in Alabama. *Bull. Auburn. Univ. Agric. Exp. Stn.*, *402*, 1-148.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., and Marshall, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.*, *16*, 1099-1106.

Koepfli, K.P., Gompper, M.E., Eizirik, E., Ho, C.C., Linden, L., Maldonado, J.E., and Wayne, R.K. (2007) Phylogeny of the Procyonidea (Mammalia: Carnivora): molecules, morphology and the Great American Interchange. *Mol. Phylogenet. Evol.*, *43*, 1076-1095.

- Krebs, J.W., Williams, S.M., Smith, J.S., Rupprecht, C.E., and Childs, J.E. (2003) Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000. *J. Wildl. Dis.*, *39*, 253-261.
- Krebs, J.W., Wilson, M.L., and Childs, J.E. (1995) Rabies-epidemiology, preventions, and future research. *J. Mammal.*, *76*, 681-694.
- Lawson-Handley, J.L., and Perrin, N. (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Mol. Ecol.*, *16*, 1559-1578.
- Lotze, J.H., and Anderson, S. (1979) *Procyon lotor*. *Mammal. Species*, *119*, 1-8.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., and Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.*, *18*, 189-197.
- Manni, F., Guerard, E., and Heyer, E. (2004) Geographic patterns of (genetics, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by "Monmonier's algorithm". *Hum. Biol.*, *76*, 173-190.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.*, *27*, 209-220.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., and Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, *7*, 639-655.
- Meirmans, P.G., and Hedrick, P.W. (2011) Assessing population structure: *Fst* and related measures. *Mol. Ecol. Res.*, *11*, 5-18.
- Ministère des Ressources naturelles et de la Faune. (2009) Résumé de la surveillance de la rage du raton laveur au Québec en 2008, pp 6.
- Neaves, L.E., Zenger, K.R., Prince, R.I.T., Eldridge, M.D.B., and Cooper, D.W. (2009) Landscape discontinuities influence gene flow and genetic structure in a large, vagile Australian mammal, *Macropus fuliginosus*. *Mol. Ecol.*, *18*, 3363-3378.

Nettles, V.F., Shaddock, J.H., Sikes, R.K., and Reyes, C.R. (1979) Rabies in translocated raccoons. *Am. J. Public Health*, *69*, 601-602.

Nocture, M., Cabaret, J., and Hugonnetchappelle, L. (1998) Protostrongylid Nematode Infection of Chamois (*Rupicapra Rupicapra*) At the Bauges Massif (French Alps). *Vet. Parasitol.*, *77*, 153-161.

Novak, M., Baker, J.A., Obbard, M.E., and Malloch, B. (1987) Wild furbearer management and conservation in North America. Ontario Ministry of Natural Resources and the Ontario Trappers Association.

Ostfeld, R.S., Glass, G.E., and Keesing, F. (2005) Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol. Evol.*, *20*, 328 - 336.

Palsboll, P.J., Peery, M.Z., and Bérubé, M. (2010) Detecting populations in the 'ambiguous' zone: kinship-based estimation of population structure at low genetic divergence. *Mol. Ecol. Res.*, *10*, 797-805.

Pitt, J.A., Larivière, S., and Messier, F. (2008) Social organisation and group formation of raccoons at the edge of their distribution. *J. Mammal.*, *89*, 646-653.

Prange, S., Gehrt, S.D., and Wiggers, E.P. (2003) Demographic factors contributing to high raccoon densities in urban landscapes. *J. Wildl. Manage.*, *67*, 324-333.

Prange, S., Gehrt, S.D., and Wiggers, E.P. (2004) Influences of anthropogenic resources on raccoon (*Procyon lotor*) movements and spacial distribution. *J. Mammal.*, *85*, 483-490.

Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. J. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* *155*, 945-959.

Puskas, R.B., Fisher, J.W., Swope, C.B., Dunbar, M.R., McLean, R.G., and Root, J.J. (2010) Raccoon (*Procyon lotor*) movements and dispersal associated with ridges and valleys of Pennsylvania: implications for rabies management. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, *10*, 1043-1048.

R Development Core Team. (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org> (Vienna, Austria).

- Raymond, M., and Rousset, F. (1995) GenePop (version 1.2): population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, *86*, 248-249.
- Rees, E.E., Pond, B.A., Cullingham, C.I., Tintline, R.R., Ball, D., Kyle, C.J., and White, B.N. (2009) Landscape modelling spacial bottlenecks: implications for raccoon rabies disease spread. *Biol. Lett.*, *5*, 387-390.
- Ritke, M.E. (1990) Quantitative assessment of variation in litter size of the raccoon *Procyon lotor*. *Am. Midl. Nat.* *123*, 390-398
- Root, J.J., Puskas, R.B., Fisher, J.W., Swope, C.B., Neubaum, M.A., Reeder, S.A., and Piaggio, A.J. (2009) Landscape genetics of raccoons (*Procyon lotor*) associated with ridges and valleys of Pennsylvania: implications for oral rabies vaccination programs. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, *9*, 583-588.
- Rosatte, R., Donovan, D., Allan, M., Howes, L.-A., Silver, A., Bennett, K., MacInnes, C., Davies, C., Wandeler, A., and Radford, B. (2001) Emergency response to raccoon rabies introduction into Ontario. *J. Wildl. Manage.*, *37*, 265-279.
- Rosatte, R., MacDonald, E., Sobey, K., Donovan, D., Bruce, L., Allan, M., Silver, A., Bennett, K., Brown, L., MacDonald, K., Gibson, M., Buchanan, T., Stevenson, B., Davies, C., Wandeler, A., and Muldoon, F. (2007) The elimination of raccoon rabies from Wolfe Island, Ontario: animal density and movements. *J. Wild. Dis.*, *43*, 242-250.
- Rosatte, R., Ryckman, M., Ing, K., Proceviat, S., Allan, M., Bruce, L., Donovan, D., and Davies, J.C. (2010) Density, movements, and survival of raccoons in Ontario, Canada: implications for disease spread and management. *J. Mammal.*, *91*, 122-135.
- Rosatte, R., Sobey, K., Donovan, D., Bruce, L., Allan, M., Silver, A., Bennett, K., Gibson, M., Simpson, H., Davies, C., Wandeler, A., and Muldoon, F. (2006) Behaviour, movements, and demographics of rabid raccoons in Ontario, Canada: management implications. *J. Wild. Dis.*, *42*, 589-605.
- Rupprecht, C.E., Smith, J.S., Fekadu, M., and Childs, J.E. (1995) The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? *Emerg Infect Dis.*, *1*, 107-114.

Russel, C.A., Real, L.A., and Smith, D.L. (2006) Spatial control of rabies on heterogeneous landscapes. *PLoS ONE*, *1*, e27.

Selkoe, K.A., and Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.*, *9*, 615-629.

Shaw, C.N., Wilson, P.J., and White, B.N. (2003) A reliable molecular method of gender determination for mammals. *J. Mammal.*, *84*, 123-128.

Siripunkaw, C., Kongrit, C., Faries, K.M., Monello, R.J., Gompper, M.E., and Eggert, L.S. (2008) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the raccoon (*Procyon lotor*). *Mol. Ecol. Res.*, *8*, 199-201.

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

Storfer, A., Murphy, M.A., Spear, S.F., Holderegger, R., and Waits, L.P. (2010) Landscape genetics: Where are we now? *Mol. Ecol.*, *19*, 3496-3514.

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

Urban, D. (1970) Raccoon populations, movement patterns, and predation on a managed waterfowl marsh. *J. Wild. Manag.*, *34*, 372-382.

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

Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* *38*, 1358-1370.

World Health Organization. (2010) Human and animal rabies: www.who.int/rabies/en/.

INFLUENCE DU PAYSAGE SUR LA STRUCTURE
GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE RATONS LAVEURS
(*PROCYON LOTOR*) DANS LE SUD DU QUÉBEC

par

Héloïse Côté

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

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2011



**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: 978-0-494-83677-4**

**Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-83677-4**

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 10 août 2011

*le jury a accepté le mémoire de Madame Héloïse Côté
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 externe
Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune**

**Professeur Marc Bélisle
Président rapporteur
Département de biologie**

SOMMAIRE

La rage du raton laveur (*Procyon lotor*) est une zoonose particulièrement préoccupante, car son principal vecteur est souvent retrouvé à proximité des milieux urbains et, par conséquent, les risques de transmission de la rage par contact avec les humains ou les animaux domestiques sont accrus. La compréhension de la dynamique des mouvements des hôtes associés à des maladies infectieuses ainsi que l'identification des barrières naturelles à la migration des hôtes et au flux de gènes sont essentielles au développement de stratégies efficaces de contrôle. Au Québec, une centaine de cas de rage du raton laveur ont été détectés à l'est de la rivière Richelieu depuis 2006, ce qui porte à croire que la structure de paysage de cette région pourrait être une barrière au mouvement de ce mammifère. L'objectif principal de cette étude est d'identifier la structure génétique des populations de ratons laveurs au Québec et de déterminer les barrières potentielles au flux génique. Pour ce faire, mon projet de recherche explore la structure génétique des ratons laveurs à l'aide de 10 marqueurs microsatellites sur une zone d'étude de 21 300 km² dans le Sud du Québec, au Canada. Les résultats indiquent une valeur de différenciation génétique (F_{st}) de 0,009 entre les individus à l'est et les individus à l'ouest de la rivière Richelieu. La rivière semble être l'élément du paysage à l'origine de cette différenciation chez cette espèce et principalement chez les femelles. L'étude a également permis de mettre en évidence le facteur d'isolement par la distance à grande échelle entre les populations du Québec et également que l'île d'Orléans présente une richesse allélique faible en comparaison aux autres sites étudiés, ce qui suggère la présence d'un effet fondateur à cet endroit. En conclusion, mes travaux suggèrent que certaines rivières, en fonction de plusieurs facteurs comme leur largeur ou leur débit, peuvent être intégrées dans le cadre d'un plan de lutte contre la propagation de la rage. Ces rivières peuvent agir comme barrières naturelles, mais doivent être utilisées avec précaution, car elles ne sont pas complètement imperméables aux mouvements des individus.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout spécialement ma directrice de recherche, Fanie Pelletier, pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité tout au long de ma maîtrise. Également, un grand merci à mon co-directeur, Dany Garant, pour ses commentaires et suggestions pertinents, son assiduité et son savoir hors pair en génétique! Merci à mes conseillers Julien Mainguy du ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (MRNF) et Marc Bélisle, professeur à l'Université de Sherbrooke, qui ont su porter un regard différent sur ma recherche, m'aiguiller, poser des questions pertinentes et mener des discussions intéressantes lors de nos rencontres. Merci beaucoup à Jennifer Chambers et Karine Robert qui m'ont grandement aidée pour les aspects laboratoire et génétique de ma recherche sur le raton laveur. Merci également pour les belles journées en leur compagnie au Mont Orford à la recherche de rats laveurs et pour leur participation à « Opération Raton ». Merci aux étudiants et assistants de recherche qui nous ont aidés sur le terrain pour la récolte de données. Merci à tous les membres de mon laboratoire pour votre soutien et les beaux moments passés en votre compagnie au cours de ces deux années.

Merci à la vétérinaire Isabelle Rémillard et aux techniciens du MRNF et du Centre québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS), qui ont collecté les données nécessaires à cette recherche; au trappeur M. Gilles Côté; pour les échantillons de l'île d'Orléans; et à Pierre Canac-Marquis et Frédérick Lelièvre, pour la prise d'échantillons et de données provenant des opérations de capture et de surveillance de la rage du raton laveur. Un gros merci à ma famille, principalement à Luc Godin et à mes parents, et à mes amis pour leur soutien, leurs encouragements et leur présence tout au long de ces deux années! Merci aux organismes subventionnaires qui ont financé ce projet : Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), Fondation canadienne pour l'innovation (FCI), Chaire de recherche du Canada en démographie évolutive et conservation et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES	vii
INTRODUCTION.....	1
Génétique du paysage.....	2
Génétique épidémiologique.....	3
Outils moléculaires.....	5
Historique de la rage.....	6
Génétique épidémiologique appliquée à la rage du raton laveur.....	7
Dispersion biaisée par le sexe.....	9
Espèce à l'étude et domaines vitaux.....	10
Objectifs de recherche.....	11
CHAPITRE 1.....	13
Linking population genetic structure and rabies spread in raccoons.....	13
Introduction de l'article.....	13
Authors Affiliations.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCTION.....	16
MATERIALS AND METHODS.....	19
Study area and sampling.....	19
DNA extraction and microsatellites analyses.....	21
Data analysis.....	21
RRV monitoring area.....	21
Comparisons between RRV monitoring and peripheral areas.....	22
RESULT.....	25
Microsatellite polymorphism.....	25
Genetic differentiation analyses.....	25
RRV monitoring area.....	25
Comparison between RRV monitoring and peripheral areas.....	28
DISCUSSION.....	30
RRV monitoring area population genetic structure.....	30
Comparison between RRV monitoring and peripheral areas.....	32
ACKNOWLEDGMENTS.....	34
CONCLUSION.....	37
Analyses de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur.....	37
Comparaison entre la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur et les zones périphériques.....	38
Contribution et innovation.....	39
SUPPORTING INFORMATION.....	35
BIBLIOGRAPHIE.....	43

LISTE DES TABLEAUX

1.	Sample sizes of genotyped individuals with observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, allelic richness (A_R) and inbreeding coefficient (F_{IS}) for sites sampled in southern Quebec, Canada. The number of females and males genotyped for each site are presented in parentheses (F, M).....	24
2.	Mantel and Partial Mantel tests results for the correlations between the geographic distance (km) and the presence of the Richelieu River with the pairwise estimated genetic relatedness (Wang, 2002) among individual raccoons sampled in the RRV surveillance zone in southern Quebec, Canada. The percentage of variation explained by the models (r^2), the slopes (β), the partial correlation coefficients (r) and their associated P -values are reported.	27
3.	Genetic differentiation (pairwise F_{ST} values) estimated with FSTAT between all sampled sites in southern Quebec, Canada (above the diagonal) and geographic distance (in km) among sites (below the diagonal). Note that all F_{ST} values are significant ($P < 0.05$).	29
4.	GenBank accession number, primer sequences 5' and 3' (type of fluorescence indicated before the sequence of the primer 5' or 3'), repetition pattern, allele size (in base pairs - bp), and annealing temperature (T_a) for microsatellite loci used in this study. The loci were selected based on their polymorphism and their size (Cullingham et al. 2006; Fike et al. 2007; Siripunkaw et al. 2008).	35
5.	Polymerase chain reaction reagents mixes (final volume of 10 uL per sample) for the ten microsatellite loci used in this study.....	36

LISTE DES FIGURES

1. Map of the study area in southern Quebec, Canada, showing the location of the documented cases of the raccoon rabies variant (RRV) by the enhanced provincial surveillance program and the Canadian Food Inspection Agency passive surveillance program (i.e., following human and pet post-exposure investigations) in raccoons in 2006 (filled circles, n=4), 2007 (filled triangles, n=59) and 2008 (filled square, n=26). 18
2. Location of the samples obtained from the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Sites for the comparison between RRV monitoring and peripheral areas are also represented (from West to East): Montréal (45.54°, -73.63°), Charron Island (45.58°, -73.48°), Lanaudière (45.80°, -73.47°), Orléans Island (46.90°, -71.01°). Note that sample sizes for these sites are reported in the Materials and Methods section. 20
3. Mean estimated likelihood (ln-probability) of genetic clusters ($K = 1$ to 4) obtained from STRUCTURE analyses within the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Mean of five replicated analyses per cluster are presented with their standard deviations. 26

INTRODUCTION

L'étude des maladies de la faune constitue une branche de recherche importante en épidémiologie. Plusieurs pays se préoccupent de plus en plus du risque sanitaire que peuvent représenter les zoonoses des espèces sauvages pour la santé publique (World Health Organization, 2010). Les zoonoses présentes chez les espèces sauvages sont très importantes à considérer et peuvent avoir de sérieuses répercussions sur la démographie de ces espèces, et également être transmises aux animaux domestiques et aux êtres humains (Gauthier-Clerc and Thomas, 2010). Plusieurs pays ont développé des programmes d'épidémiosurveillance efficaces pour les animaux sauvages. Par exemple, la France fut le premier pays à développer un tel programme suite à l'apparition de la rage vulpine en 1968 (Gauthier-Clerc and Thomas, 2010).

Le développement des maladies infectieuses comporte, dans tous les cas, trois étapes importantes : l'infection au cours de laquelle l'agent intègre son hôte; la phase de multiplication où il se reproduit; et finalement, la propagation où les descendants de l'agent infectieux quittent son hôte pour infecter d'autres individus. Ce sont trois étapes clés du cycle de vie de l'agent infectieux, qui est également, dans la majorité des cas, dépendant de ses vecteurs (Gauthier-Clerc and Thomas, 2010). Bien comprendre les différents aspects de vie de l'hôte principal en lien avec les maladies infectieuses dont il peut être vecteur est primordial afin de contrer leur progression et de diminuer les risques pour la santé publique. Pour ce faire, les chercheurs peuvent, entre autres, se servir d'outils de recherche novateurs (Archie *et al.*, 2009).

La génétique des populations et la génétique du paysage sont des outils puissants pour quantifier la dynamique des maladies de la faune dans une région géographique donnée (Anderson and May, 1991). En effet, l'hétérogénéité de la structure du paysage peut grandement affecter la structure de population d'une espèce dans un territoire donné (Frantz *et al.*, 2009). Les structures naturelles et artificielles de l'habitat peuvent affecter la répartition des hôtes des maladies infectieuses et, par conséquent, la répartition de ces maladies (Archie *et al.*, 2009). Pour étudier ce phénomène, les chercheurs se servent de la génétique du paysage.

Génétique du paysage

La génétique du paysage est une discipline qui intègre des concepts tels que la génétique des populations, l'écologie du paysage, la géographie et les statistiques spatiales (Holderegger and Wagner, 2006). Elle permet de déterminer la structure des populations entre différentes échelles géographiques et de comprendre comment le paysage et les processus écologiques (dispersion, migration, etc.) affectent les patrons de mouvements et l'adaptation des individus en milieu naturel (Holderegger and Wagner, 2006). La génétique du paysage permet d'avoir de l'information sur les interactions entre les caractéristiques du paysage et les forces évolutives telles que le flux de gènes, la dérive génétique et la sélection. Le flux de gènes se définit comme la circulation des copies d'un gène dans une population, avec ou sans déplacement permanent des individus, alors que la dispersion est la translocation permanente des individus entre les populations, avec ou sans transfert durable de copies d'un gène dans la population bénéficiaire (Palsboll *et al.*, 2010). Les données de génétique du paysage aident à comprendre les processus de microévolution qui génèrent la structure génétique d'une espèce (Biek and Real, 2010). La connaissance des discontinuités génétiques est nécessaire aux biologistes de l'évolution et aux écologistes pour comprendre comment les mouvements des individus ou des gamètes influencent la structure génétique d'une population.

Les récents développements en génétique moléculaire, l'existence de nouveaux outils statistiques (géostatistique, maximum de vraisemblance et approche bayésienne) et les ordinateurs puissants ont permis l'émergence du champ d'études de la génétique du paysage (Manel *et al.*, 2003). Les deux étapes clés de cette approche sont la détection et la localisation des discontinuités génétiques entre les populations ainsi que la corrélation de ces discontinuités avec le paysage et les caractéristiques de l'environnement, tels les montagnes (Trénel *et al.*, 2008), les rivières (Cullingham *et al.*, 2009), les routes ou les gradients environnementaux (Guillot *et al.*, 2005; Manel *et al.*, 2003). La génétique du paysage implique un échantillonnage aléatoire des individus à travers la zone d'étude, et pas seulement l'échantillonnage de certains individus de chacune des populations préalablement identifiées (Manel *et al.*, 2003). Les logiciels statistiques, tels que STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), sont plus efficaces lorsque les individus sont uniformément répartis dans l'espace que lorsqu'ils sont divisés en sous-groupes (Frantz *et al.*, 2009).

La génétique du paysage peut aider à répondre à plusieurs questions spécifiques sur une espèce telles que déterminer les niveaux de différenciation génétique entre les individus d'une population, ou identifier les corridors de dispersion de cette population. À titre d'exemple, une étude menée par Neaves *et al.* (2009) dans le Sud de l'Australie a permis d'évaluer la structure génétique de population chez un grand mammifère, le kangourou gris (*Macropus fuliginosus*), et de déterminer l'effet de la plaine de Nullarbor sur la structure génétique contemporaine de ce mammifère. L'étude a permis d'identifier quatre unités génétiques distinctes sur le continent, ainsi qu'une unité insulaire sur Kangaroo Island. La plaine du Nullarbor a également été un obstacle historique à la dispersion chez cette espèce. Ces résultats donnent un aperçu de l'histoire biogéographique du Sud de l'Australie pour le kangourou gris, et révèlent que la structuration génétique des espèces peut être grandement influencée par des caractéristiques du paysage relativement mineures, comme des variations dans la composition de l'habitat.

Récemment, des approches de génétique du paysage ont été utilisées afin de prédire le potentiel de propagation de certaines maladies dans un territoire donné (Archie *et al.*, 2009). Ce champ de recherche se nomme la génétique épidémiologique. Il permet de corréler la génétique du paysage avec la structure des populations hôtes de la maladie et de déterminer les voies de propagation de la maladie les plus probables.

Génétique épidémiologique

Les modèles prédisant la propagation des maladies infectieuses sont souvent trop simples pour prédire précisément la propagation des maladies reliées à la faune (Blanchong *et al.*, 2008). En effet, il peut être difficile de bien comprendre la répercussion de l'hétérogénéité spatiale dans la distribution des maladies des espèces sauvages (Biek and Real, 2010). Par contre, cette compréhension est essentielle pour l'identification des populations les plus à risque d'infection et la conception de méthodes de surveillance et de contrôle efficaces (Blanchong *et al.*, 2008). Certaines variables environnementales (rivières, montagnes, caractéristiques du paysage, etc.) peuvent contribuer à l'émergence, à la distribution et à la persistance des maladies infectieuses sur un territoire hétérogène, ou au contraire freiner leur propagation.

Comprendre les risques de transmission des maladies en fonction de la répartition spatiale des individus, elle-même liée à la distribution des ressources, est primordial pour prévoir leur progression et les contrôler efficacement (Ostfeld *et al.*, 2005). Plusieurs maladies infectieuses touchant les animaux sauvages ont le potentiel d'affecter la santé humaine (par exemple, H5N1, la rage) (Anderson and May, 1991). Prédire « pourquoi », « où » et « dans quelle mesure » se dispersent les hôtes de la maladie sont des questions clés pour les gestionnaires de la faune et les agences de santé publique afin de contrer leur expansion (Anderson and May, 1991; Cullingham, 2007). Par exemple, selon l'étude menée par Bourhy *et al.* (1999), la propagation de la rage du renard (*Vulpes vulpes*) en Europe peut être contenue dans une certaine mesure par des barrières physiques naturelles qui permettent de limiter la circulation des hôtes infectés. C'est le cas de la rivière Vistula en Pologne qui peut aider à contenir la propagation de la rage, car elle est une barrière naturelle aux mouvements des renards.

Combiner la génétique du paysage et la génétique épidémiologique permet donc de bien comprendre la dynamique de dispersion de la maladie en fonction de leurs hôtes (Ostfeld *et al.*, 2005). Pour ce faire, la propagation potentielle de maladies infectieuses à travers un paysage est évaluée en examinant la structure génétique des populations hôtes. Ensuite, la répartition géographique des animaux infectés est appliquée à la structure génétique. La corrélation entre ces deux points est étudiée (Childs *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002).

Jusqu'ici, certaines études ont utilisé la méthode de l'épidémiologie du paysage et ont permis de constater que la variabilité dans la propagation de la maladie est souvent associée à la proximité des rivières, des montagnes et des routes (Blanchong *et al.*, 2008; Childs *et al.*, 2000; Neaves *et al.*, 2009; Russel *et al.*, 2006). À titre d'exemple, la recherche sur la maladie du dépérissement chronique (MDC) (Blanchong *et al.*, 2008) a montré que, pour le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), les rivières et les routes ont une influence significative sur le flux de gènes. Pour cette étude, les chercheurs ont déterminé la structure génétique des cerfs de Virginie afin de voir si les modèles de flux de gènes pouvaient expliquer la distribution spatiale de la MDC dans le Centre-Sud du Wisconsin (États-Unis). Leurs résultats suggèrent que la rivière Wisconsin a une grande influence sur la dispersion des gènes et donc de la maladie. Les auteurs concluent également qu'avec une bonne sélection de marqueurs microsatellites, la génétique épidémiologique peut être un outil efficace pour identifier la

connectivité entre les populations infectées et celles non infectées en fonction des caractéristiques du paysage. Par conséquent, l'identification des obstacles à la connectivité des populations permet de cibler davantage les zones prioritaires d'intervention pour le contrôle des maladies.

Outils moléculaires

Les marqueurs moléculaires comme les microsatellites et les « AFLPs » (amplified fragment length polymorphism) peuvent être utilisés pour estimer de nombreux paramètres d'intérêts pour les écologistes (Storfer *et al.*, 2010). Le taux de migration, la taille des populations, les goulots d'étranglement et les liens de parenté sont des exemples de sujets auxquels les marqueurs moléculaires peuvent amener considérablement de réponses (Selkoe and Toonen, 2006).

Les microsatellites sont entre autres utilisés dans les programmes de cartographie pour établir des liens de parenté entre les individus, et effectuer des études plus classiques sur la structure génétique des populations. Ils servent également aux épidémiologistes (Jarne and Lagoda, 1996). Un microsatellite est un fragment neutre de l'ADN nucléaire contenant des séquences d'une à six paires de base répétées en tandem, flanqué de segments d'ADN non répétitif (Selkoe and Toonen, 2006). Ils sont trouvés en grande quantité dans le génome de beaucoup de taxons. Les microsatellites possèdent un taux de polymorphisme très élevé causé par les erreurs fréquentes lors de la réplication de l'ADN (Selkoe and Toonen, 2006). De plus, les régions flanquantes (ADN non répétitif) des microsatellites sont des régions très conservées, ce qui permet l'utilisation de sondes spécifiques et l'amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR). C'est par conséquent l'outil adéquat pour étudier la dispersion des hôtes de maladies infectieuses.

Historique de la rage

La première description connue de la rage remonte environ à 500 av. J.-C. par Démocritus (Krebs *et al.*, 1995). Il s'agit d'un virus neurotrope de la famille des Rabdoviridea et du genre Lyssavirus qui connaît une distribution planétaire, à l'exception de quelques îles et endroits inaccessibles ou inhospitaliers pour la vie sauvage potentiellement hôte (Krebs *et al.*, 1995). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe la rage au dixième rang mondial des décès par infection chez les humains (World Health Organization, 2010). Chaque année, environ 55 000 personnes meurent de ce virus dans les pays en voie de développement où il est principalement véhiculé par les chiens (World Health Organization, 2010). La rage est une zoonose qui cause une encéphalomyélite aiguë. Cette maladie est généralement transmise par la morsure d'un animal infecté ou encore par le contact avec la salive d'un animal atteint sur une coupure, une plaie ouverte, une abrasion de la peau ou sur une muqueuse (Krebs *et al.*, 1995). Les premiers symptômes apparaissent entre 30 et 90 jours après la contagion, mais cette période est très variable. Lorsque les premiers symptômes apparaissent, l'issue est habituellement fatale (Krebs *et al.*, 1995). Dans les pays industrialisés, grâce aux programmes de vaccination des animaux domestiques, la maladie est principalement véhiculée par les animaux sauvages tels que le renard roux (*Vulpes vulpes*), le renard arctique (*Alopex lagopus*), les chauves-souris (famille des Vespertilionidea), la moutonnette rayée (*Mephitis mephitis*) et le raton laveur (*Procyon lotor*). Au Québec, le virus de la rage se divise en trois variants antigéniques distinctes : celui du renard arctique, celui de la chauve-souris et maintenant celui du raton laveur (Canac-Marquis *et al.*, 2007). Normalement, les différents variants de la rage sont responsables de la transmission entre les individus au sein d'une même espèce. La rage peut tout de même affecter d'autres espèces, mais la chaîne de transmission est alors généralement courte.

C'est au cours des années 1970, en Floride (États-Unis), que le variant de la rage du raton laveur aurait été identifié pour la première fois (Dobson, 2000). En 1976, le North Carolina Hunting Club a importé des ratons laveurs de la Floride en Virginie afin de pratiquer la chasse (Nettles *et al.*, 1979). Certains ratons laveurs importés étaient porteurs de la rage et l'ont transmise à la population locale créant un deuxième foyer d'infection (Dobson, 2000). En 1977, dans l'Ouest de l'État de Virginie, est répertoriée la première confirmation du variant de

la souche de rage du raton laveur (Centers for disease control and prevention, 1994). L'épidémie s'est ensuite rapidement propagée dans les États du Centre-Est et du Nord-Est des États-Unis pour atteindre l'État de New York en 1990 et celui du New Hampshire en 1992 (Centers for disease control and prevention, 1994). En 1990, aux États-Unis, le raton laveur a supplanté la mouffette rayée comme vecteur principal de la rage du raton laveur (Centers for disease control and prevention, 1994). Le gouvernement américain doit déboursier annuellement entre 230 millions et un milliard de dollars pour le contrôle de la rage et les traitements post-expositions au virus (Rupprecht *et al.*, 1995). L'épidémie de rage a atteint la frontière du Québec à une vitesse moyenne de propagation vers le nord de 30 à 50 kilomètres par année (Dobson, 2000). C'est en 1999 que l'Ontario a vu apparaître ses premiers cas de rage du raton laveur (Rosatte *et al.*, 2001). En dépit de la mise en place en 1999 d'un programme de prévention de l'entrée de la rage, le Québec, exempt de rage pendant plusieurs années, voit son premier cas apparaître en 2006 en Montérégie (Canac-Marquis *et al.*, 2007). En 2007, 59 ratons laveurs ont été testés positifs au Québec et 26 autres, en 2008 (ministère des Ressources naturelles et de la Faune, 2009). Aucun cas n'a été détecté chez le raton laveur en 2009 et 2010. Selon l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA), les ratons laveurs et les mouffettes rayées représentaient 54 % des cas de rage diagnostiqués chez les animaux sauvages en 2008 (www.inspection.gc.ca).

Génétique épidémiologique appliquée à la rage du raton laveur

Comprendre la dynamique des mouvements du raton laveur ainsi que la présence de barrières naturelles à la migration et au flux génique est critique pour l'établissement d'une stratégie de lutte efficace contre la rage. De nombreux auteurs stipulent qu'il peut y avoir des barrières qui arrêtent, ou du moins ralentissent, l'expansion de la rage (Biek and Real, 2010; Cullingham *et al.*, 2008; Rees *et al.* 2009). Des preuves moléculaires suggèrent d'ailleurs que les rivières sont des barrières naturelles efficaces à la dispersion de la rage (Bourhy *et al.*, 1999). Ces études amènent par ailleurs plusieurs questionnements, notamment comment les interventions de contrôle de la maladie peuvent être déployées afin de tirer avantage de la structure hétérogène du paysage; pourquoi et comment les individus se dispersent selon la configuration du paysage. Selon le modèle de l'expansion de la rage fait par Russel *et al.*

(2006), la stratégie la plus efficace pour réduire la propagation de la rage est de créer, grâce au largage d'appâts vaccinaux, des barrières vaccinales de chaque côté des barrières naturelles, et ainsi d'empêcher la contamination d'une population exempte de rage par l'arrivée d'un individu infecté. La décision de l'emplacement et de la taille de ces barrières vaccinales est critique pour le succès des opérations (Cullingham *et al.*, 2009). Une étude menée en Ontario a d'ailleurs permis de montrer que la rivière Niagara est une barrière efficace à la dispersion des ratons laveurs entre cette province et l'État de New York (Cullingham *et al.*, 2009). L'hypothèse de cette étude était que des différences dans la dynamique de dispersion des ratons laveurs expliqueraient des patrons de dispersion de la rage différents entre la rivière Niagara et le fleuve Saint-Laurent, en Ontario. Afin d'étudier l'effet de ces rivières sur la dispersion des ratons laveurs, ils ont déterminé la structure génétique de 1 468 ratons laveurs dans les régions du Saint-Laurent et du Niagara. Pour la rivière Niagara, la présence de deux populations de ratons laveurs a été déterminée. La position de ces deux populations correspondait à celles de l'État de New York et de l'Ontario. Pour le Saint-Laurent, aucune structure n'a été déterminée au sein de la population. Par conséquent, l'analyse suggère que la rivière Niagara réduit le flux de gènes entre l'Ontario et l'État de New York. L'efficacité des rivières comme barrière à la dispersion du raton laveur pourrait être grandement liée à la présence de glace en hiver et au débit de la rivière (Cullingham *et al.*, 2009). L'habitat et les ressources disponibles autour de la barrière naturelle pourraient également être des facteurs importants quant à la probabilité et à la distance de dispersion des individus. Plus l'habitat est favorable et les ressources (ex : nourriture) disponibles, moins les individus semblent se disperser sur de longues distances. Par conséquent, la probabilité de franchir la rivière diminue. Par exemple, les environnements urbains, qui sont riches en ressources alimentaires, peuvent supporter une plus grande densité de ratons laveurs qu'un environnement rural, où les mouvements des individus doivent être plus importants pour acquérir de la nourriture (Cullingham *et al.*, 2008).

Comme l'a montré l'étude menée par Cullingham *et al.* (2009), la capacité de dispersion des ratons laveurs peut être associée à la perméabilité des rivières. Les ratons laveurs peuvent utiliser trois moyens pour traverser une rivière : premièrement, ils peuvent traverser les ponts par eux-mêmes ou en s'introduisant à bord d'un véhicule; deuxièmement, ils peuvent profiter

de la présence de la glace en hiver; et finalement, ils peuvent traverser la rivière à la nage (Cullingham *et al.*, 2009).

Dispersion biaisée par le sexe

De nombreuses espèces sont fidèles à leur lieu de naissance ou à leur population d'origine. Ce phénomène est connu sous le nom de philopatrie. Par contre, chez la plupart de ces espèces, un sexe est plus philopatric que l'autre. Chez les mammifères, ce sont principalement les femelles qui semblent philopatrics alors que les mâles se dispersent sur de longues distances (Greenwood, 1980). Par exemple, l'étude menée par González-Suárez *et al.*, (2009) sur l'otarie de Californie (*Zalophus californianus*) au Mexique a montré des évidences de dispersions biaisées vers les mâles. Ces derniers se dispersent en moyenne 6,75 fois plus fréquemment que les femelles. Les femelles otaries montrent des niveaux de différenciation génétique plus élevés entre elles que les mâles, puisque leur dispersion avec les colonies plus éloignées est plus limitée et plus rare (González-Suárez *et al.*, 2009). La distance parcourue par les mammifères lors de la dispersion natale est un élément fondamental pour l'étude de la démographie. Par ailleurs, les dispersions sur de longues distances influencent grandement la structure de population et favorise la colonisation d'un nouveau milieu par une espèce (Greenwood, 1980).

Pour ce qui est des rats laveurs étudiés en Ontario, 80 % des jeunes se dispersent en général sur une distance de moins de 3 km (Cullingham, 2007). Bien qu'ils ne se déplacent généralement pas sur un grand territoire, certains ont déjà été observés à plus de 200 km de leur point d'origine (Rosatte *et al.*, 2007). Les distances de dispersion des rats laveurs semblent grandement liées à leur sexe et à leurs habitats (Prange *et al.*, 2003; Rosatte *et al.*, 2007). Les jeunes restent avec leur mère durant le premier hiver dans une proportion de 75 % et aucun de ces jeunes n'est actif sexuellement la première année (Gehrt and Fritzell, 1998a). Selon une étude de Puskas *et al.* (2010), la distance de dispersion des jeunes rats laveurs est en moyenne de 1,61 km lors du premier automne en Pennsylvanie. Selon l'étude menée par Dhamarjaman, en l'absence de barrières majeures, environ 10 % des rats laveurs vont se disperser sur une distance de plus de 20 km. Pour ce qui est des jeunes mâles rats laveurs,

les causes de la dispersion sont probablement multifactorielles. Ils peuvent émigrer volontairement ou être chassés par les parents ou d'autres adultes (Gehrt and Fritzell, 1998a). Les femelles se dispersent généralement sur de courtes distances. L'étude menée par Dhamarjaman *et al.* (2009) en Indiana a mis en évidence que 50 % des mâles et 81 % des femelles se dispersent sur moins de 5 km. Fréquemment, lorsque les territoires de deux femelles se chevauchent, il s'agit d'une paire mère-fille (Gehrt and Fritzell, 1998). « Pourquoi » et « à quelle distance » un individu se disperse sont de grandes questions dont les réponses dépendent à la fois de sa capacité individuelle et du contexte du paysage. La dispersion selon le sexe est un paramètre important pour comprendre et gérer adéquatement les populations qui peuvent être les hôtes de maladies infectieuses comme le cerf de Virginie, le renard roux ou le raton laveur. C'est également un des paramètres les plus difficiles à mesurer (Cullingham, 2007).

Espèce à l'étude et domaines vitaux

Le raton laveur fait partie de la famille des Procyonidea et est une espèce endémique à l'Amérique. La longévité moyenne des ratons laveurs en milieu naturel est de 3,1 ans selon l'étude de Johnson (1970), avec un maximum de longévité d'environ 16 ans (Lotze and Anderson, 1979). Au Québec, la période d'accouplement a lieu au printemps (entre février et avril) (Fanie Pelletier, données non publiées). Les femelles sont les seules qui participent à l'élevage et aux soins des jeunes. Dans une portée, le nombre moyen de jeunes se situe entre 2 et 4,8 en fonction de la latitude et de la masse corporelle de la femelle (Ritke, 1990), avec une proportion égale de mâles et de femelles (Lotze and Anderson, 1979). Les ratons laveurs ne font pas partie des vrais hibernants, car leur métabolisme ne présente pas de variations substantielles pendant les mois de dormance, et ils sont actifs très tôt au printemps (Lotze and Anderson, 1979). La densité de population estimée peut être très variable en fonction du paysage et de la disponibilité des ressources, allant de 3,4 à 13,6 individus/km² dans le Sud de l'Ontario (Rosatte *et al.*, 2010) jusqu'à 181 individus/km² près du lac Érié (Urban, 1970). C'est un mammifère omnivore et opportuniste dont la diète est principalement constituée de fruits, d'invertébrés, de petits mammifères, d'œufs, de carcasses, de déchets domestiques et de céréales selon le milieu (Novak *et al.*, 1987).

Généralement, la superficie du domaine vital occupé par les femelles varie de 1 à 4 km² et peut varier selon la disponibilité des ressources; tandis que celui des mâles est environ quatre fois plus grand (Gehrt and Fritzell, 1998a). Les ratons laveurs montrent un seuil de tolérance très variable vis-à-vis de leurs congénères, allant de la tolérance complète à la territorialité stricte (Gehrt and Fritzell, 1998a). Normalement, l'espace utilisé par les femelles est influencé par la disponibilité des ressources alimentaires et la proximité d'un milieu aquatique. L'espace utilisé par les mâles est fonction à la fois de leur habileté à exploiter ces mêmes ressources et également à s'accoupler avec les femelles (Pitt *et al.*, 2008). Lorsque les ressources alimentaires sont concentrées dans un territoire, on observe un comportement de regroupement chez les ratons laveurs (Prange *et al.*, 2003). Lors de ces regroupements, si la densité de femelles augmente également, la capacité d'un mâle à les monopoliser tous diminue. La formation de coalition de mâles permet de diminuer la compétition. Ces mâles peuvent ainsi sécuriser l'accès à plus de femelles par mâle (Pitt *et al.*, 2008). Le domaine vital des individus peut aussi varier en fonction de la dynamique saisonnière et par le fait que les mâles soient plus gros que les femelles (Gehrt *et al.*, 1997).

Objectifs de recherche

La compréhension de la dynamique des mouvements des hôtes associés à des maladies infectieuses, ainsi que l'identification des barrières naturelles à leur dispersion et au flux de gènes sont essentielles au développement de stratégies efficaces de contrôle. La rage du raton laveur est une zoonose particulièrement préoccupante pour la santé publique, car son principal vecteur est souvent retrouvé à proximité des milieux urbains, et les risques de transmission du virus directement aux humains ou aux animaux domestiques sont accrus. Depuis 2006, une centaine de cas de rage du raton laveur ont été répertoriés dans le Sud du Québec à l'est de la rivière Richelieu. L'objectif principal de cette étude est d'identifier la structure génétique des populations de ratons laveurs au Québec et les barrières potentielles au flux génique dans le contexte du contrôle de l'épizootie du variant de la rage du raton laveur.

Pour ce faire, mon projet de recherche a porté plus particulièrement sur l'étude de la structure génétique des ratons laveurs à l'aide de 10 marqueurs microsatellites polymorphiques sur une

zone d'étude hétérogène de 21 300 km² dans le Sud du Québec. Tout d'abord, j'ai identifié la structure génétique des populations ainsi que les barrières potentielles au flux génique chez les rats laveurs dans la zone d'étude. Deuxièmement, j'ai évalué l'effet de la distance géographique et des barrières du paysage (rivières, autoroutes, etc.) sur la structure génétique observée. Finalement, j'ai évalué si la dispersion biaisée pour les mâles, typique chez les mammifères, se produit également pour cette espèce au Québec et j'ai identifié les voies d'expansion les plus probables de la rage dans cette région. Mes résultats auront des répercussions importantes pour les interventions de contrôle de cette maladie au Québec. Ainsi, l'identification de la structure génétique des rats laveurs permettra de mettre en évidence les barrières aux mouvements des rats laveurs, et des zones de contrôle pourront être construites de chaque côté des barrières naturelles pour limiter la propagation de la rage.

Dans le cas de la rage, identifier les barrières aux mouvements du raton laveur peut être primordial pour freiner sa vitesse de propagation puisqu'elles pourraient limiter les échanges entre les populations de part et d'autre de la barrière. La vaccination des rats laveurs se fait présentement à l'échelle de tout le Sud du Québec à l'aide d'appâts vaccinaux. Connaître les barrières naturelles à la dispersion des rats laveurs ainsi que l'emplacement des différentes populations au Québec est d'une importance capitale afin d'optimiser les opérations de contrôle et, par conséquent, de freiner leur propagation. Une analyse a d'abord été menée dans la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur au Sud du Québec afin de détailler la structure de population sur ce territoire où les cas de rage ont été répertoriés. Par la suite, une analyse des zones périphériques a permis de mettre en perspective les résultats obtenus. La diversité génétique des rats laveurs aux différents sites échantillonnés a été analysée afin de déterminer la différenciation génétique, à grande échelle, au Québec. L'analyse des zones périphériques a également permis de donner une idée du potentiel de propagation de la rage du raton laveur à plus grande échelle.

CHAPITRE 1

Linking population genetic structure and rabies spread in raccoons

Introduction de l'article

L'étude des populations de rats laveurs dans le Sud du Québec est d'une très grande importance afin de parfaire nos connaissances sur ce mammifère et de pallier la progression de la rage au Québec. La caractérisation des mouvements des hôtes de maladies infectieuses en fonction des caractéristiques du paysage est souvent la clé qui permet de prédire la dispersion de ces maladies sur un territoire. Bien connaître la probabilité de dispersion de ces maladies permet de développer des méthodes de prévention proactives. L'objectif de cette recherche était de déterminer la structure de population des rats laveurs dans le Sud du Québec, d'identifier la présence de barrières naturelles possibles entre les différentes populations et de déterminer s'il y avait évidence de dispersion biaisée par le sexe chez cette espèce. Mon étude est la première à vérifier la présence de barrières aux mouvements des rats laveurs au Québec et permettra au gouvernement de mieux cibler les opérations de contrôle de la rage du raton laveur.

Mes contributions à la réalisation de cet article incluent la sélection des échantillons, les manipulations génétiques de laboratoire, les analyses statistiques, quelques sorties sur le terrain et la rédaction de la première version de ce mémoire. Fanie Pelletier et Dany Garant y ont également contribué en révisant le manuscrit ainsi que par leur soutien et leurs judicieux conseils. Nous visons le périodique *Evolutionary Applications* pour la publication de ce manuscrit.

Linking population genetic structure and rabies spread in raccoons

Héloïse Côté^{1,2}, Dany Garant¹, Karine Robert^{1,2}, Julien Mainguy³, Fanie Pelletier^{1,2*}

Running head: Genetic structure and raccoon rabies

Authors Affiliations

¹ Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500, boulevard de l'université, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1.

² Canada Research Chair in Evolutionary Demography and Conservation, Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500, boulevard de l'Université, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1.

³ Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Direction de l'expertise sur la faune et ses habitats, Service de la biodiversité et des maladies de la faune, 880, chemin Sainte-Foy, 2^e étage, Québec, Québec, Canada, G1S 4X4.

ABSTRACT

Identifying natural barriers to movements of hosts associated with infectious diseases is essential to develop effective control strategies. Raccoon rabies variant (RRV) is a zoonose of concern for humans because its main vector, the raccoon (*Procyon lotor*), is found near urban areas. In Quebec, all cases of raccoon rabies variant (RRV) found in raccoons since 2006 were detected on the eastern side of the Richelieu River, suggesting that this river acts as a barrier to movement. The main objectives of this study were to characterize the genetic structure of raccoon populations and to specifically assess the effect of the Richelieu River on the population structure in southern Quebec, Canada. We also evaluated whether spread potential was different depending on sex and at a larger spatial scale in Quebec. Our analyses revealed a weak signal of genetic differentiation among individuals located on each side of the Richelieu River. However, our data also supported the presence of a single genetic cluster, as well as evidences of isolation by distance (IBD) among individuals of both genders within the area, suggesting a weak genetic substructuring. Our results thus suggest that rivers might not always efficiently restrain raccoon's movements and spread of RRV.

Key words: genetic differentiation, landscape genetics, isolation-by-distance, microsatellites, *Procyon lotor*, raccoon rabies variant

INTRODUCTION

Understanding how environmental variables contribute to the emergence, distribution and persistence of infectious diseases is crucial to effectively predict and control their spread (Ostfeld *et al.* 2005). As several infectious diseases affecting animals are transmittable to humans (e.g. H5N1, rabies), predicting "why", "where" and "how far" host disperses are key questions for wildlife managers and health agencies (Anderson and May, 1991; Cullingham, 2007). Typically, the effect of environmental variables on animal population structure is assessed using landscape genetics methods which provide information on the relationships between landscape features and potential for gene flow (Manel *et al.* 2003; Holderegger and Wagner, 2006). As infectious diseases depends on their hosts for dispersal (Grenfell and Dobson, 1995), several authors suggested that approaches from landscape genetics could be used to understand the potential for diseases spread (Biek *et al.* 2007; Blanchong *et al.* 2008; Archie *et al.* 2009; Biek and Real, 2010). As a result, studies of landscape epidemiology have recently surfaced in the literature. By merging landscape genetics and epidemiology analyses, such studies assess the dynamic movements of host species, identify the presence of natural barriers to migration and gene flow, and provide important insights to build effective strategies for diseases control (Cullingham *et al.* 2009; Storfer *et al.* 2010).

Landscape epidemiology can be especially useful in case where a particular disease is associated with one or few hosts or vectors (Frantz *et al.* 2009). The approach has two main steps. First, the potential spread of infectious diseases across a landscape is evaluated by looking at the host species genetic structure. To do so, genetic discontinuities between populations are detected and their correlations with landscape and environmental features are explored (Archie *et al.* 2009). Then, the geographic distribution of infected animals is mapped over the genetic structure and potential correlation between these two are investigated (Childs *et al.* 2000; Smith *et al.* 2002), 2002). Patterns of disease spread and genetic discontinuities of the vector species are expected to correlate together and with landscape characteristics (Biek and Real, 2010). Recent studies that applied landscape epidemiology methods suggest that the variability in the disease progression can often be explained by the presence of rivers, mountains and roads (Childs *et al.* 2000; Russel *et al.* 2006; Blanchong *et al.* 2008; Neaves *et al.* 2009). For example, research on the prevalence of chronic wasting disease (CWD) in

white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) found that the presence of rivers and highways significantly reduced the extent of gene flow and limited the spread of CWD (Blanchong et al. 2008). Pattern of sex-specific dispersal can also influence the spatial genetic structure of a host population (Lawson Handley and Perrin, 2007). In mammals, for example, most species have polygamous or promiscuous mating systems, where juvenile and adult males have a higher probability of dispersal compared to adult females (Greenwood, 1980). Yet, few studies of landscape epidemiology have incorporated landscape variables and sex-specific patterns of dispersal to predict host population structure and risks of disease spread.

Rabies is an important infectious disease with more than 55 000 human deaths every year (World Health Organization 2010). While most of the cases are diagnosed in developing countries (World Health Organization 2010), rabies is a great concern for public health agencies worldwide. For example, in the USA, the costs for control of rabies and post-exposition treatment are estimated between 230 million and 1 billion US dollars annually (Rupprecht et al. 1995). In particular, the raccoon rabies variant (RRV) has been in constant northward progression in North America over the last 4 decades (Curtis, 1999). RRV is problematic because the distribution range of his main host (the raccoon, *Procyon lotor*) is linked to human presence which increase the risk of spread to domestic animals and humans (Cullingham et al. 2009). In Canada, the first cases of the disease were found in 1999 in Ontario (Rosatte et al. 2001), in 2000 in New Brunswick and in 2006 in Québec (Figure 1). Government agencies are thus aiming to develop cost-efficient methods to control the spread of this disease in wild populations and limits its negative impact on public health and finances.

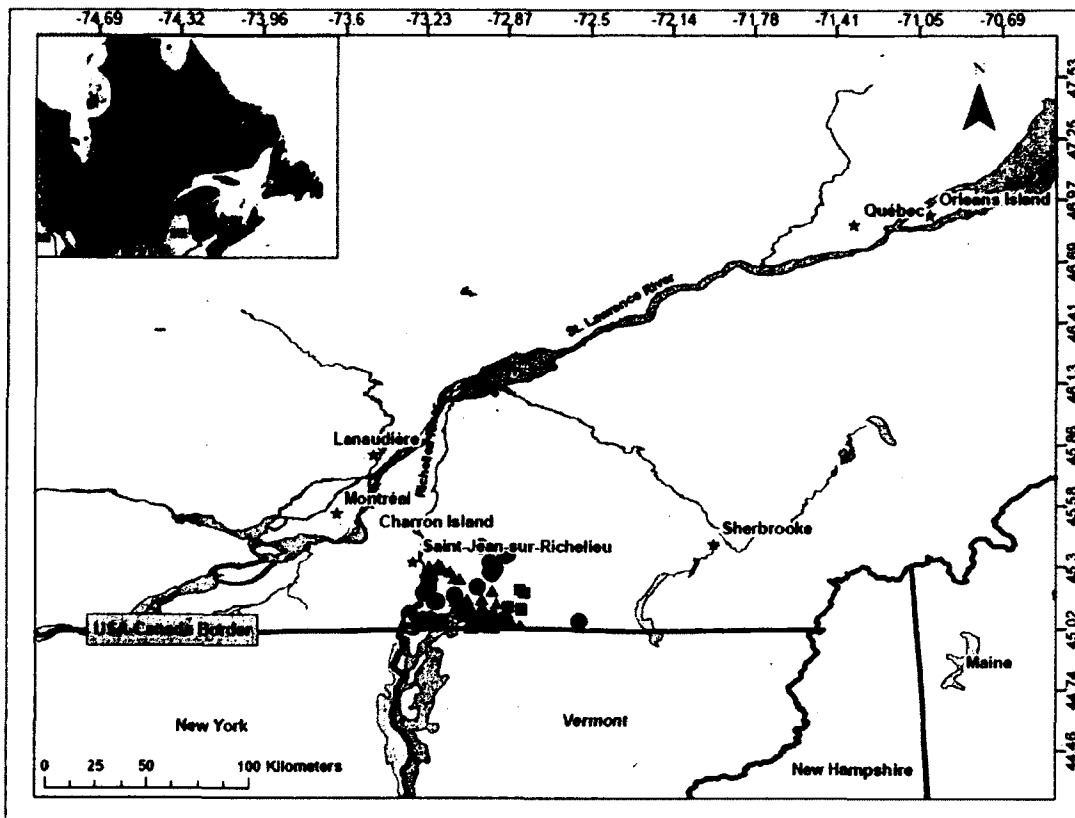


Figure 1 Map of the study area in southern Quebec, Canada, showing the location of the documented cases of the raccoon rabies variant (RRV) by the enhanced provincial surveillance program and the Canadian Food Inspection Agency passive surveillance program (i.e., following human and pet post-exposure investigations) in raccoons in 2006 (filled squares, n=4), 2007 (filled triangles, n=59) and 2008 (filled circles, n=26).

Recent molecular evidences suggest that rivers are natural barriers to effective dispersal of terrestrial hosts potentially carrying rabies. Indeed, Cullingham et al. (2009) reported reduced gene flow across the Niagara River between Ontario (Canada) and New York (USA), implying that raccoons ability to disperse could be associated with the permeability of the river to animal movement. In Ontario, authorities mechanically prevent ice formation during winter on the Niagara River, keeping a water flow important all year-round (Cullingham et al. 2009). Thus, the extent to which rivers can limit raccoon movements, and thus effectively be

reinforced with vaccination to be used as immunological barrier to control this disease, remains unclear. This is especially true in temperate regions where ice formation occurs in winter and facilitates animal movement. In Quebec, all cases of raccoon rabies variant (RRV) found in raccoons since 2006 were detected on the eastern side of the Richelieu River (see Figure 1 – hereafter referred to as the RRV monitoring area), suggesting that this river acts as a potential barrier to movement for this species. Here, we applied landscape genetic methods to investigate the potential RRV spread in raccoons in this area. We first used microsatellite markers to assess the population genetic structure of raccoons in the RRV monitoring area. We then evaluated whether disease spread potential (due to differences in movements between genders) was different depending on sex by assessing patterns of isolation by distance and the effect of the Richelieu River on the structure of relatedness detected for males and females. Then, we explored the genetic structure of raccoons at a larger spatial scale to get a better understanding of animal dispersal around the infected zone (the RRV monitoring area) and to evaluate the potential for rabies spread in the province of Quebec. To do so, we quantified the extent of genetic diversity and population structuring found in sites located in peripheral area compared to that of the RRV monitoring area.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sampling

Our main study area is located in southern Quebec, Canada, and covers approximately 21 300 km². It is bordered North and West by the St. Lawrence River, and South by the USA border with the states of New York, Vermont, New Hampshire and Maine (Figure 1). We randomly selected a subsample of raccoons for genetic analyses from all samples collected by the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune of Quebec (MRNFQ) and its partners during monitoring and control activities against RRV in raccoon such as the recovery of road killed animals and field tests of the oral vaccination efficiency (Rees et al. in press) in 2008 and 2009. Location of each animal collected was obtained using handheld global positioning system (GPS) and 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 extractions. The sex of each

animal collected was assessed both during field manipulations and using molecular techniques as described in Shaw et al. (2003) (Table 1). We used 273 animals genotyped from the RRV monitoring zone (Figure 2) to conduct our so-called ‘RRV monitoring area’ analyses. We also genotyped an additional 149 samples that were collected from areas peripheral to the zone where RRV cases were found to explore the genetic structure at a larger spatial scale. Sites samples in the peripheral areas include 3 sites on islands in the St. Lawrence River (Montréal (n=20), Charron (n=29) and Orléans (n=52)) and one site on the North shore of the St. Lawrence River (Lanaudière, n=48).

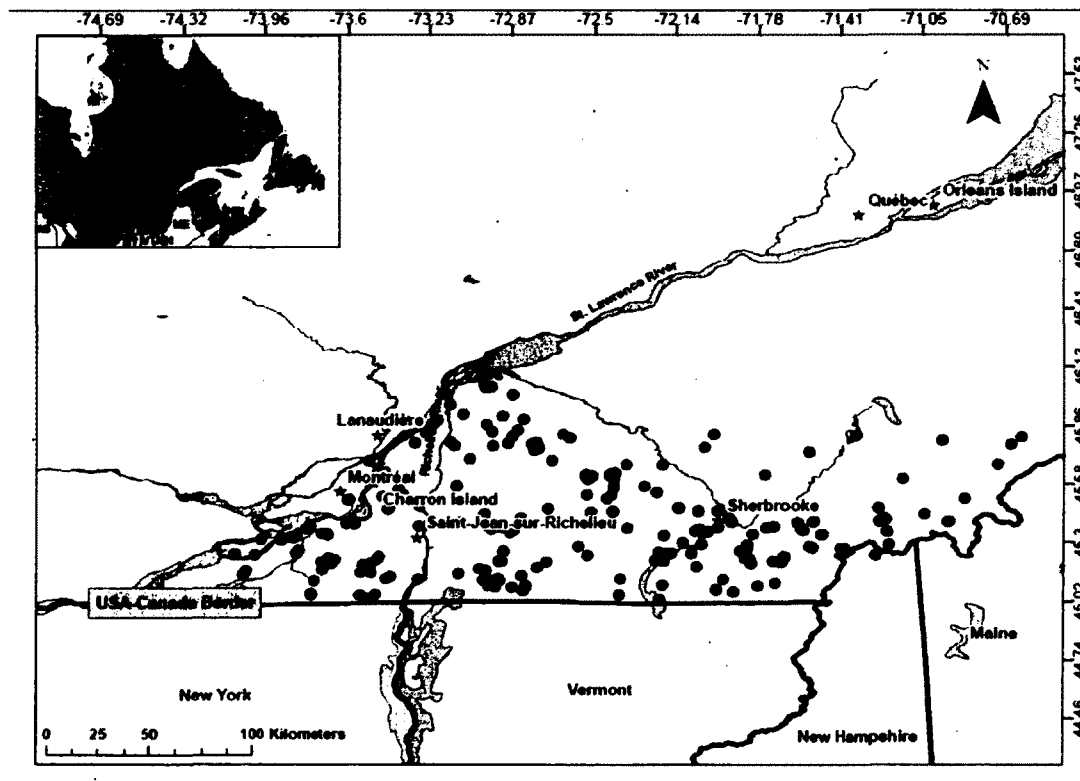


Figure 2: Location of the samples obtained from the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Sites for the comparison between RRV monitoring and peripheral areas are also represented (from West to East): Montréal (45.54°, -73.63°), Charron Island (45.58°, -73.48°), Lanaudière (45.80°, -73.47°), Orléans Island (46.90°, -71.01°). Note that sample sizes for these sites are reported in the Materials and Methods section.

DNA extraction and microsatellites analyses

DNA was extracted using a salting out protocol as described in Chambers and Garant (2010). The following ten microsatellite loci, developed specifically for raccoons, were selected based on their size and polymorphism (see Tables S1 and S2 for details about loci and their amplification): PLO-M2, PLO-M3, PLO-M15, PLO-M17, PLO-M20, PLO2-14, PLO2-117, PLM06, PLM10 and PLM20 (Cullingham et al. 2006; Fike et al. 2007; Siripunkaw et al. 2008).

Microsatellite loci amplification was performed using GeneAmp 9700 thermocyclers (Applied Biosystems). The amplification conditions were: 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 30 sec, annealing temperature (T_a) for 1 min (see Table S2), 72°C for 1 min and a final extension at 65°C for 45 min. PCR products were visualized using an AB 3130 capillary DNA sequencer (Applied Biosystems). 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 the software Genemapper version 4.0 (Applied Biosystems).

Data analysis

We tested all loci for departure from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium, and obtained observed and expected heterozygosity for each loci and sites using the software GenePop version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). We used the software FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 1995) to calculate allelic richness. Finally, we used CERVUS version 3.0.3 (Marshall et al. 1998; Kalinowski et al. 2007) to assess the presence of null alleles.

RRV monitoring area

We first quantified the extent of genetic differentiation among groups located on each side of the Richelieu River by calculating F_{st} among them using FSTAT (Goudet, 1995). We then used the bayesian clustering software STRUCTURE version 2.3.3 in order to estimate the

most likely number of genetic clusters in the RRV monitoring area (Pritchard et al. 2000). We performed the analyses using a model with admixture, separate α for each population, and allele frequencies correlated (using $\lambda = 1.0$) among genetic clusters, and without using prior information on sampling location. For each value of K (number of clusters: from 1 to 4), we ran five independent models with 250 000 iterations, plus a burnin period of 100 000 iterations. Means of the ln-probabilities of all independent runs for a given K were then calculated. Since the highest value of mean ln-probability was obtained for K = 1, no further analyses were performed in order to determine the most probable number of clusters.

To further identify the relative importance of factors shaping the spatial genetic distribution of individuals in the landscape, we assessed the effect of linear geographic distance and that of the Richelieu River. We used SPAGeDI version 1.3 (Hardy and Vekemans, 2002) to estimate pairwise genetic relatedness (R_{xy}) between all sampled individuals with Wang's estimator (Wang, 2002). We also calculated the geographic distance (km) among individuals using the extension Hawth's tool in ArcGIS version 3.2.2. The presence of isolation by distance (IBD) among individuals was assessed using Mantel tests (Mantel, 1967) implemented in FSTAT. We conducted analyses over all individuals and then separately for each sex to assess whether potential for RRV spread differs according to gender. We then used Partial Mantel tests implemented in FSTAT to establish the strength and significance of the partial correlations between the presence of the Richelieu River, the geographic distance and the pattern of observed genetic differentiation among individuals. Again, these tests were performed over all individuals and separately for each sex to assess whether spread potential and effect of barriers were different depending on gender.

Comparisons between RRV monitoring and peripheral areas

We compared allelic richness, observed heterozygosity and F_{IS} among sites using analyses of variance (ANOVAs) in the software R (Nocture et al. 1998; Crawley, 2007; R Core Development Team, 2008). We also calculated pairwise genetic differentiation among sites using F_{ST} . Again, we tested for IBD but this time assessing the relationships between the genetic differentiation (F_{ST}) and geographical distance (km) among sites. As individuals from

each group were distributed over a large territory, we used the central sampling point of each group to calculate the geographical distances between them.

Table 1: Sample sizes of genotyped individuals with observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, allelic richness (A_R) and inbreeding coefficient (F_{IS}) for sites sampled in southern Quebec, Canada. The number of females and males genotyped for each site are presented in parentheses (F, M).

		North shore of St. Lawrence River	Orléans Island	Montréal	Charron Island	RRV monitoring area
Locus	Sample size	48 (27, 21)	52 (25,27)	20 (11, 9)	29 (13,16)	273 (121, 152)
PLOM15	H_O	0.88	0.73	0.90	0.71	0.87
	H_E	0.88	0.73	0.79	0.71	0.86
	A_R Rich.	10.62	5.94	9.00	8.56	11.32
	F_{IS}	0.001	0.009	-0.101	0.011	-0.012
PLO2-117	H_O	0.94	0.90	1.00	0.90	0.86
	H_E	0.91	0.83	0.90	0.88	0.92
	A_R	14.48	10.04	13.00	12.23	15.79
	F_{IS}	-0.025	-0.074	-0.092	-0.007	0.059
PLOM3	H_O	0.71	0.67	0.65	0.65	0.78
	H_E	0.78	0.75	0.75	0.64	0.80
	A_R Rich.	5.60	4.77	6.00	4.90	5.65
	F_{IS}	0.087	0.118	0.158	-0.002	0.010
PLOM 20	H_O	0.88	0.71	0.90	0.90	0.83
	H_E	0.88	0.72	0.83	0.86	0.89
	A_R Rich.	11.98	7.70	11.00	12.01	12.29
	F_{IS}	0.01	0.024	-0.054	-0.022	0.054
PLO2-14	H_O	0.83	0.75	0.90	0.72	0.88
	H_E	0.84	0.75	0.88	0.83	0.89
	A_R	11.09	9.73	13.00	11.54	13.64
	F_{IS}	0.017	0.013	-0.003	0.161	0.002
PLOM2	H_O	0.81	0.90	0.80	0.82	0.89
	H_E	0.81	0.78	0.75	0.83	0.88
	A_R Rich.	9.74	6.36	9.00	7.91	10.40
	F_{IS}	-0.006	-0.143	-0.036	0.035	0.002
PLOM17	H_O	0.73	0.58	0.75	0.79	0.77
	H_E	0.74	0.69	0.67	0.78	0.81
	A_R Rich.	5.32	5.71	5.00	5.99	6.28
	F_{IS}	0.013	0.177	-0.100	0.003	0.052
PLM06	H_O	0.55	0.91	0.80	0.59	0.68
	H_E	0.69	0.73	0.68	0.67	0.74
	A_R Rich.	3.85	4.62	4.00	3.69	5.08
	F_{IS}	0.195	-0.225	-0.156	0.142	0.096
PLM10	H_O	0.88	0.81	0.85	0.75	0.83
	H_E	0.85	0.78	0.82	0.71	0.86
	A_R	7.88	5.76	8.00	7.32	9.02
	F_{IS}	-0.025	-0.027	-0.013	-0.034	0.029
PLM20	H_O	0.69	0.73	0.70	0.48	0.73
	H_E	0.74	0.72	0.74	0.65	0.76
	A_R Rich.	7.70	5.79	9.00	7.27	7.81
	F_{IS}	0.066	-0.011	0.081	0.279	0.065

RESULT

Microsatellite polymorphism

A total of 422 raccoons were genotyped at ten microsatellites (Table 1). All loci were highly polymorphic, exhibiting from 7 to 37 alleles per locus with an average of 17.1 (\pm 10.3 SD). Observed heterozygosity per locus ranged from 0.66 to 0.92 (Table 1). Expected heterozygosity ranged from 0.72 for PLM-06 to 0.93 for PLO2-117. Overall F_{IS} within each sampling sites ranged from -0.031 (Montréal) to 0.053 (Charron Island) (Table 1). F_{IS} were significantly higher than expected in both Charron Island ($P=0.035$) and in the RRV area samples ($F_{IS} = -0.035$, $P=0.001$). No significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium was detected after Bonferroni correction. Null alleles were found at low frequencies within our data (less than 5%).

Genetic differentiation analyses

RRV monitoring area

The level of genetic differentiation estimated between the individuals sampled respectively on the East and West sides of the Richelieu River was low but highly significant ($F_{ST}= 0.009$, $P < 0.001$). Yet, STRUCTURE analyses indicated the presence of a single genetic cluster within the RRV monitoring area ($K=1$, estimated likelihood = -11413.2; Figure 3).

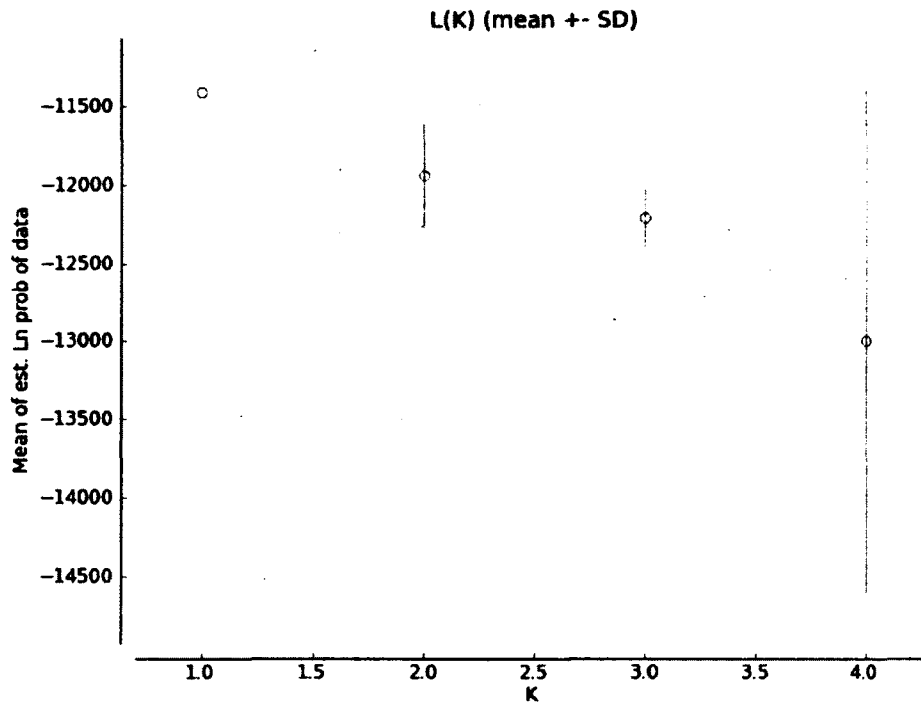


Figure 3: Mean estimated likelihood (ln-probability) of genetic clusters ($K = 1$ to 4) obtained from STRUCTURE analyses within the raccoon rabies variant (RRV) monitoring area in southern Quebec, Canada. Mean of five replicated analyses per cluster are presented with their standard deviations.

Mantel tests conducted on all the sampled individuals in the RRV monitoring area revealed that raccoon pairs that were more genetically related were also geographically closer to each other, although this correlation disappeared when the analyses were conducted on both sexes separately (Table 2). The results of the Partial Mantel tests suggest that animals located on the same side of the Richelieu River were more genetically related than individuals found on opposite sides. Pattern of IBD disappeared after accounting for the presence of the river (Table 2). Analyses conducted in each sex separately suggest that the presence of the Richelieu River affects males and females differently. Females located on the same side of the river were significantly more related than females located on opposite sides, whereas no differences were found in males (Table 2).

Table 2: Mantel and Partial Mantel tests results for the correlations between the geographic distance (km) and the presence of the Richelieu River with the pairwise estimated genetic relatedness (Wang, 2002) among individual raccoons sampled in the RRV surveillance zone in southern Quebec, Canada. The percentage of variation explained by the models (r^2), the slopes (β), the partial correlation coefficients (r) and their associated P -values are reported.

Test	r^2	Explanatory variable	β	r	P -value
Mantel tests	Overall ($r^2=0.0001$)	Geographic distance	-0.00003	-0.01109	0.04
	Females ($r^2=0.0003$)	Geographic distance	-0.00005	-0.01643	0.17
	Males ($r^2=0.0001$)	Geographic distance	-0.00002	-0.00893	0.3
Partial Mantel tests	Overall ($r^2=0.0005$)	Geographic distance	0.000001	0.01109	0.97
		Presence of Richelieu River	-0.00616	-0.01931	0.0005
	Females ($r^2=0.0014$)	Geographic distance	0.00002	0.01643	0.69
		Presence of Richelieu River	-0.01094	-0.03304	0.008
	Males ($r^2=0.0003$)	Geographic distance	-0.000003	-0.00893	0.91
		Presence of Richelieu River	-0.00420	-0.01344	0.16

Comparison between RRV monitoring and peripheral areas

To evaluate the population structure of raccoons over a larger spatial scale, we performed additional genetic analyses including a site located on the North shore of the St. Lawrence River (Lanaudière region near Montréal), three islands located on the St. Lawrence River (Montréal, Charron and Orléans Islands) and the RRV monitoring area (Figure 1, 2). The mean distance between sites was 125.5 km (range between 16-254 km) and the average F_{ST} value between them was 0.044 ± 0.006 (Table 3). The highest level of genetic differentiation was detected between Orléans and Charron Islands ($F_{ST} = 0.099$) and the lowest value was found between the Lanaudière region (North shore of the St. Lawrence River) and the Island of Montréal ($F_{ST} = 0.021$, Table 3). We found a signal of IBD among all our sites, as revealed by a significant positive correlation between the level of genetic differentiation and the geographical distance ($r = 0.64$, slope = 0.00021, $P = 0.037$).

Table 3: Genetic differentiation (pairwise F_{ST} values) estimated with FSTAT between all sampled sites in southern Quebec, Canada (above the diagonal) and geographic distance (in km) among sites (below the diagonal). Note that all F_{ST} values are significant ($P < 0.05$).

	Lanaudière	Orléans Island	Montréal	Charron Island	RRV monitoring area
Lanaudière	—	0.084	0.021	0.079	0.027
Orléans Island	226	—	0.094	0.099	0.054
Montréal	33	254	—	0.061	0.022
Charron Island	33	243	16	—	0.034
RRV monitoring area	86	200	90	74	—

Analyses comparing genetic diversity revealed that allelic richness (A_R) was significantly different among sites ($F = 13.8$, $df = 4$, $P < 0.001$). This difference was due to a lower allelic richness on Orléans Island (mean $A_R = 6.64$ alleles) than in other sites (all $P < 0.01$). On the other hand, the RRV monitoring area harbored a higher A_R compared to every other sites (mean $A_R = 9.73$ alleles, all $P < 0.05$). We found no difference in F_{IS} ($F = 1.88$, $df = 4$, $P = 0.14$) or observed heterozygosity values ($F = 2.15$, $df = 4$, $P = 0.09$) among sites.

DISCUSSION

The objective of this study was to use landscape genetic approaches to investigate whether population genetic structure is related to the RRV cases distribution documented in Quebec from 2006 to 2009 and to evaluate the potential for RRV spread in raccoons at larger scale. All RRV cases in raccoons were found on the East side of this Richelieu River suggesting that this river might restrict raccoon movements. Accordingly, we found that there was a low but significant genetic differentiation among groups located on both side of the Richelieu River. However, the river appears to be a relatively weak barrier to gene flow, as we identified a single genetic cluster within the RRV monitoring area and as we found a signal of isolation by distance among individuals over this area. Also, our larger scale investigation suggests that the genetic differentiation observed in the RRV monitoring area is relatively small. Similarly, the genetic differentiation of raccoons among islands and on the North shore of the St. Lawrence River was significant but relatively small, suggesting that in the absence of control operations RRV could potentially spread in northern areas.

RRV monitoring area population genetic structure

Previous studies based on spatial dynamics of terrestrial rabies suggested that the presence of rivers could act as natural barriers slowing the spread of this disease (Smith et al. 2002; Russel et al. 2006) and recent molecular evidence partly supported this contention (Cullingham et al. 2009). Our results also suggest that rivers may not always act as a permeable barrier to gene flow, as we detected a weak genetic substructuring in relation to the Richelieu River. This result also suggest that the Richelieu River restricted RRV spread in that area as all raccoon rabies cases in Southern Quebec were found on the East side of the Richelieu River (Figure 1). Although comparisons between F_{ST} values stemming from different studies must be made cautiously (Meirmans and Hedrick, 2011), it is interesting to note that the low level of genetic differentiation found in this study area is even weaker than the one reported in a study in the Niagara region conducted by Cullingham et al (2009). A potential explanation for these low

levels of genetic differentiation is that the presence of human infrastructure (such as bridges) could allow animals to cross natural barriers. Cullingham et al (2009), however, argued that walking or 'hitch-hiking' across bridges was unlikely to explain this low differentiation because the F_{ST} values were not associated with the number of bridges presents. In our study areas, there are five bridges and two railways that could allow raccoons to cross the Richelieu River. Moreover, raccoons are known as pest animals, often relying on domestic garbage as food sources and habitations as shelters (Rosatte et al. 2010). Thus, humans also promote raccoon movements via translocation of undesirable animals, a practice that should not be encouraged in the context of disease spread.

We also detected the presence of IBD among individuals within our study area. Indeed, we found that, on average, animals that were spatially close were also genetically more related to each other. Such pattern has been reported for other carnivore species. For example, Frantz et al. (2010) showed a strong pattern of IBD among European badgers (*Meles meles*) in western England. In our study area, however, further analyses revealed that the global pattern is weak, as no IBD is found when analyses are done on males or females separately. Female genetic structure seemed, on the other hand, mainly shaped by the presence of the Richelieu River. Indeed, a Partial Mantel test analysis indicated that, when accounting for the presence of the Richelieu River, females located on the same side of the river were more related to each other than females located on different sides. Our results thus appear concordant with previous empirical studies suggesting that female raccoons are often philopatric while males are more likely to disperse (Gehrt and Fritzell, 1998; Cullingham et al. 2009; Rosatte et al. 2010). The absence of a barrier effect of the Richelieu River for males could also be explained by the difference in mating strategies between the sexes. Indeed, as our study area is located at the northern edge of the distribution of this species (Gehrt, 2003), the mating season occurs in winter (February-March) when most major rivers are covered with ice and snow. Although raccoons are mostly inactive during winter (Pitt et al. 2008), male raccoons are more likely to move during that period when searching for mating partners (F. Pelletier unpublished results). Breeding dispersal (and therefore gene flow) of male raccoons is therefore less likely to be limited by rivers at this time of the year (Cullingham et al. 2009). Other studies on raccoons

over a heterogeneous landscape in north-central Indiana, USA, found evidence of a genetic structure over a relatively small scale and of male-biased dispersal (Dharmarajan et al. 2009). Altogether, these results emphasize the importance of considering landscape heterogeneity and behavioral differences in dispersal patterns between males and females to understand pattern of genetic differentiation in mammals, as well as their respective potential impact on disease spread.

Comparison between RRV monitoring and peripheral areas

While our analyses conducted within the RRV monitoring area provided detailed information on gene flow within the region where RRV cases have been detected in Quebec, our characterization of population genetic differentiation in relation to the peripheral area provides insights on the main potential paths for rabies propagation in Quebec. At this larger scale, we found evidence of IBD thus suggesting that long distance migrants are not common enough to prevent genetic structuring within our system. Raccoon is a medium-size omnivorous mammal and, while some specimens have already been observed at more than 200 kilometers from their point of origin (Rosatte et al. 2007), it appears that the majority of raccoons from both sexes move on considerably shorter distances that possibly maintain the rather homogeneous genetic structure observed within the Quebec RRV monitoring area. Dharmarajan et al. (2009) reported that typically, without the presence of major barriers to dispersal, approximately 10% of raccoons dispersed more than 20 km. A previous study, conducted in Pennsylvania, also found a strong signature of IBD among groups of raccoons using a landscape genetics approach (Root et al. 2009).

The greatest average level of genetic differentiation was found between Orléans Island and the other sites (mean $F_{ST} = 0.083$). Part of this differentiation is due to the distance separating Orléans Island from those other sites (mean = 231 km) and more importantly, to the fact that it is an island which further isolate the raccoons inhabiting it from those living on mainland. Orléans Island also harbored a low allelic richness, potentially suggesting a founder effect on

this Island, which might have further increased the genetic differentiation with the other sites examined in this study. Further detailed investigation with additional sampling sites located on each side of the St. Lawrence River are warranted before reaching a general conclusion on the strength of the isolation among populations and on the potential for RRV spread. Yet, our findings of significant level of genetic differentiation among populations on each side of the St. Lawrence River contrast with the previous study conducted in Ontario by Cullingham et al. (2009), in which there was no such effect. Such potentially conflicting results could likely be explained by the variation in the extent of river flow between the two study sites. In Quebec, for example, the flow of the St. Lawrence River is stronger than the stretch of river where the study was conducted in Ontario (see Cullingham et al. 2009). In winter, the flow of the St. Lawrence River in Quebec remains important and ice is generally carried away by the current, preventing both shores to be joined by an ice bridge. Additionally, the Canadian Coast Guard provides maritime traffic in the waters of the St. Lawrence Rive through the winter. Such measures may have an important impact on the movements of raccoons in winter and spring. However, other parameters are important to consider, such as differences in raccoon density, sex-specific dispersal patterns of animals within the available habitats of a given landscape, as well as shape differences of the landscape among study sites (Cullingham et al. 2009; Rees et al. 2009).

Potential applications to the control of rabies spread in Quebec

Identification of barriers to rabies host movements is important as this information can be used to improve disease containment strategies. Planning interventions, such as rabies vaccination (through capture or distribution of oral baits) in conjunction with natural barriers would create a better buffer zone by limiting subsequent rabies epidemics (Rosatte et al. 2001). Our research only partially supports the suggestion that large rivers can be used for that purpose, at least, in northern location. Indeed, even a large river like the Richelieu River was not affecting in a detectable manner patterns of relatedness and genetic substructuring within the RRV monitoring area, suggesting little effect on raccoon movement. Our results and those of

Cullingham et al. (2009) also suggest that the degree of permeability of a river is likely to be affected by the presence of ice in winter. This result has two main consequences for modeling and controlling the propagation of infectious diseases such as raccoon rabies. First, the presence of rivers needs to be included in investigation of potential barrier against disease spread, but this only in combination with information on the likelihood of ice-bridge formation during winter. The presence of ice bridges is likely to affect gene flow between populations and rivers with long period of ice presence should consequently have a high permeability to raccoon movements. Second, if ice bridges affect river permeability, then one should expect that the use of river to target control efforts should be more efficient in regions where ice is unlikely to form during winter. In the Quebec RRV monitoring area, the long winter period likely allows male raccoons to move from one shore to the other during the mating season, therefore increasing the risk of RRV spread, although it has not occurred so far with the help of large-scale control programs. In more northern regions, such as northeastern USA and Canada, ice breaking operations, when possible, could be useful to further control rabies spread.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to trappers, veterinaries and technicians from the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (MRNFQ), the ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) and the Centre Québécois sur la Santé des Animaux Sauvages (CQSAS) for collecting and providing samples. In particular, we thank Frédéric Lelièvre, Pierre Canac-Marquis, Isabelle Rémillard and Denis Fournier for providing samples and data from sites located in the peripheral area of the RRV monitoring area. We are also grateful to Melody Porlier, Jennifer Chambers and Hélène Presseault-Gauvin for their support and help with genetic analyses. We acknowledge the financial contribution of the MRNFQ to this research. D.G and F.P. are funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grants and the Canada Foundation for Innovation. F.P. holds the Canada Research Chair in Evolutionary Demography and Conservation. D.G. FP. and J.M are funded by a research team grant provided by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: GenBank accession number, primer sequences 5' and 3' (type of fluorescence indicated before the sequence of the primer 5' or 3'), repetition pattern, allele size (in base pairs - bp), and annealing temperature (T_a) for microsatellite loci used in this study. The loci were selected based on their polymorphism and their size (Cullingham et al. 2006; Fike et al. 2007; Siripunkaw et al. 2008).

#GenBank	Name	Primer sequences	Repetition pattern	Alleles size (bp)	T_a
DQ388432	PLO-M15	F: VIC-ACTGAGACCACTGAGC	(AGAT)13	153-203	60
		R: CAGATTTCAAGTCGATCGATG			
DQ388433	PLO2-117	F: FAM-ATATGCCGGGTCTAGGACAACACTG	(GATA)13(GT)16	274-368	56
		R: CTAGTAATATCATGAGAAGCG			
DQ388435	PLO-M3	F: NED-CTCCCATCTTCTCTTTTCG	(ATCT)15	258-281	56
		R: GTTGACAATTGCAGGACCAC			
DQ388437	PLO-M20	F: GATTCTTATGTCTCTTGGGA	(TCTA)17	170-218	54
		R: NED-AAGTGCTTCAAGAGAAAGTGC			
DQ388438	PLO2-14	F: FAM-AAGAGCGTAATAAAAGCTTAC	(GAAA)21	211-357	56
		R: CAAATAACAAGTTTCAATTTGG			
DQ388439	PLO-M2	F: GGAAAACCACAGAGAGACGG	(TCTA)7(TCTG)6 (TCTA)8	272-324	56
		R: VIC-CTTGGCACAGAGCAGAATCC			
DQ388440	PLO-M17	F: VIC-CTGCTGAGTAAGGAGTAAGG	(GTTT)3(TATC)12	203-231	56
		R: TCCCCTGTACATATTCAGGC			
EF569609	PLM06	F: NED-AAAAGTGTGCCTTTGATTACGG	(GT)24	91-119	56
		R: ATACACTGGTGGGAATGT			
EF569613	PLM10	F: FAM-ACATACCTCCACCCTACCC	(GT)22	104-134	58
		R: AAGTCCCATAGGCACACCAG			
EF569621	PLM20	F: FAM-TGTCTACTGTCCCTGCTAACTCC	(GT)12AT(GT)4	112-152	56
		R: ATCATAGTGCCCCCTCCAA			

Table S2 Polymerase chain reaction reagents mixes (final volume of 10 uL per sample) for the ten microsatellite loci used in this study.

Products	PLM20 (uL)	PLO2-117 PLOM 3 PLOM 17 PLO2-14 PLOM 20 (uL)	PLOM 15 (uL)	PLOM 2 (uL)	PLM06 PLM10 (uL)
H ₂ O	2.8	4.45	4.45	3.95	4.9
10X	1.25	1	1	1	1.25
MgCl ₂	0.75	1	1	0.5	1.2
dNTP	2.5	1.25	1.25	1.25	2.5
BSA	--	0.5	--	0.5	--
forward primer	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
reverse primer	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Taq	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
DNA (5ng/mL)	2	2	2	2	2

CONCLUSION

Analyses de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur

L'analyse de la diversité génétique a permis d'identifier la présence d'une sous-structure au sein des individus présents dans la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur à l'est et à l'ouest de la rivière Richelieu, avec une valeur de différenciation génétique faible, mais significative. En regard de la répartition des cas de rage depuis 2006, la rivière Richelieu semble être une barrière faible à la migration des ratons laveurs au Québec. La présence de glace en hiver et la translocation de ratons laveurs par les humains pourraient être deux facteurs importants qui tendent à diluer la différenciation génétique entre ces deux populations.

Lorsque l'on analyse la présence d'isolement par la distance (IBD) au Sud du Québec, on constate qu'elle est forte. Les ratons laveurs qui ont été considérés pour l'analyse de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur sont répartis sur le territoire de façon continue, et les individus qui sont près géographiquement sont également plus apparentés génétiquement. Lorsque l'IBD a été observé séparément pour les mâles et les femelles, les résultats ont montré que la tendance générale était grandement attribuable aux mâles, et qu'elle n'était pas significative pour les femelles. Par contre, la structure génétique des femelles semble grandement liée à la présence de la rivière Richelieu. Les femelles séparées par la rivière sont de fait plus éloignées génétiquement. Pour les femelles présentes du même côté de la rivière, plus elles sont près géographiquement, plus elles sont apparentées génétiquement. Par conséquent, la rivière Richelieu pourrait constituer une barrière au flux de gènes pour les femelles ratons laveurs, mais pas pour les mâles. L'étude de Dharmarajan *et al.* (2009) menée en Indiana (États-Unis) a également mis en évidence la présence d'une structure génétique chez le raton laveur et d'une différence entre la dispersion des mâles et des femelles. Pour cette étude, la tendance pourrait être expliquée en partie par le mode de reproduction du

raton laveur. En effet, une étude en cours montre que la saison de reproduction a lieu, au Québec, de février à avril et que ce sont les mâles uniquement qui sont actifs à cette période (Fanie Pelletier, données non publiées). À cette période de l'année, la glace est toujours présente sur la rivière et cette dernière ne représenterait pas une barrière à la migration.

Comparaison entre la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur et les zones périphériques

L'analyse menée au niveau de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur a permis de mieux détailler la structure de population sur le territoire où les cas de rage ont été répertoriés au Québec. L'analyse des zones périphériques permet de mettre en perspective les résultats obtenus lors de l'analyse de la zone de surveillance du variant de la rage du raton laveur et, par conséquent, de mieux caractériser la différenciation génétique à grande échelle au Québec. Cette analyse a permis de donner une idée du potentiel de propagation de la rage du raton laveur à plus grande échelle.

Mes résultats montrent que la différenciation génétique entre les différents groupes de l'analyse des zones périphériques augmente considérablement avec la distance. La présence d'isolement par la distance a été répertoriée chez beaucoup d'espèces de mammifères (Chambers et Garant, 2010; Frantz *et al.*, 2010; González-Suárez *et al.*, 2009; Neaves *et al.*, 2009). Le fleuve Saint-Laurent semble ainsi être une barrière semi-perméable à la migration des rats laveurs. La différenciation génétique la plus élevée se situe entre l'île d'Orléans et les autres sites (moyenne $F_{ST} = 0.083$). De plus, une diversité génétique plus faible dans l'île d'Orléans et l'île Charron est apparente. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence d'un effet fondateur. L'effet fondateur est présent lorsqu'une population est créée à partir d'un nombre relativement restreint d'individus d'une autre population. En général, seule une partie de la richesse allélique de la population d'origine est préservée. Il en résulte donc que la nouvelle population est plus uniforme et moins diversifiée que la population d'origine. La

valeur la plus faible de différenciation est trouvée entre les deux populations du Sud du Québec.

Le raton laveur est un mammifère omnivore de taille moyenne chez qui les distances de dispersion sont plutôt restreintes, bien que certains individus aient déjà été observés à plus de 200 km de leur point d'origine (Rosatte *et al.*, 2007). Les distances de dispersion varient généralement entre 1 et 17 km en fonction de l'aire d'étude, du sexe et de l'âge des individus (Rosatte *et al.*, 2010). Généralement, moins de 10 % des individus se dispersent sur une distance de plus de 20 km (Dharmarajan *et al.*, 2009). L'étude montre que la migration sur de longues distances est peu fréquente dans notre aire d'étude, puisqu'elle n'est pas suffisante pour prévenir la formation de populations distinctes.

Au Québec, la Garde côtière canadienne permet le trafic maritime dans les eaux du Saint-Laurent pendant l'hiver. Par conséquent, à certains endroits sur le fleuve, il y a peu ou pas de formation de glace. Également, son débit est important et la glace est généralement emportée par le courant, ce qui empêche les deux côtés de la rive d'être rejoints par un pont de glace. L'effet de la barrière peut être plus efficace puisque les ratons laveurs ne peuvent pas traverser la rivière sur les glaces. Les résultats de différenciation génétique entre les populations de l'analyse des zones périphériques contrastent avec ceux de Cullingham *et al.* (2009) pour le fleuve en Ontario. Certaines différences présentes entre les deux sites peuvent expliquer ces résultats, notamment le débit de la rivière et l'habitat disponible pour le raton laveur de chaque côté de la rivière aux différents sites. En effet, les ratons laveurs se dispersent généralement sur de moins grandes distances lorsque l'habitat est adéquat et les ressources disponibles (Cullingham *et al.*, 2009; Rosatte *et al.*, 2010).

Contribution et innovation

Connaître les zones d'intervention prioritaires au Québec pour les opérations de contrôle de la rage est très important afin de les optimiser et de diminuer les frais d'opération. La vaccination

des hôtes contre la rage, en fonction de la présence de rivières, permettrait de créer une zone tampon et de limiter les épidémies de rage. Chaque année, à l'automne, le MRNF procède à l'épandage manuel et aérien d'appâts vaccinaux dans les zones boisées et autour des cours d'eau dans environ 150 municipalités du Sud du Québec. Quelque 960 000 appâts se retrouvent ainsi au sol afin d'immuniser les rats laveurs contre la rage. Il va sans dire que les opérations de contrôle sont très coûteuses. Puisque nos résultats indiquent la présence d'isolement par la distance chez les rats laveurs au Québec, la probabilité qu'un cas de rage se retrouve loin de la zone d'infection est peu probable à court terme. Par conséquent, déployer les opérations de contrôles à proximité des zones d'infection semble tout indiqué.

Depuis 2006, tous les cas de rage au Québec ont été répertoriés à l'est de la rivière Richelieu, et semblent provenir de l'État du Vermont (États-Unis). De nombreux cas ont été répertoriés dans cet État en 2009-2010, dont plusieurs à proximité de la frontière canadienne. L'état du Vermont a mis en place des méthodes de contrôle, notamment la distribution d'appâts vaccinaux pour les hôtes de la rage du raton laveur, mais cette action est concentrée principalement à proximité des milieux urbains. Une zone tampon entre le Québec et le Vermont est présentement en place afin d'éviter que les animaux rabiques franchissent la frontière. Le renforcement de cette barrière immunologique et un travail en étroite collaboration avec les agents responsables du contrôle de la rage au Vermont sont absolument nécessaires afin d'empêcher l'entrée de nouveaux cas de rage au Québec. En regard de la distribution des cas retrouvés au Québec et de la présence de nombreux animaux infectés répertoriés au Vermont, tout porte à croire qu'il est possible que de nouveaux cas de rage soient trouvés dans ce secteur. Puisque la rivière Richelieu est probablement une faible barrière à la dispersion, des rats laveurs rabiques pourraient éventuellement la traverser. Le suivi effectué chaque année chez les hôtes de cette maladie doit être maintenu afin de contrôler efficacement la rage au Québec.

Les résultats de cette recherche ont permis de déterminer que les rivières à faible débit avec présence de glace en hiver sont probablement des barrières à la migration des rats laveurs

femelles. Ces obstacles potentiels pourraient être utilisés pour les méthodes de lutte contre la rage, mais avec parcimonie, car elles ne semblent pas un obstacle à la migration des mâles. Les rivières à fort débit, où il n'y a pas de formation de glace en hiver, sont probablement des barrières plus efficaces à la migration des ratons laveurs. Elles pourraient donc être utilisées de façon plus sécuritaire comme zones de contrôle. Cela suggère aussi que le brisage de la glace en hiver sur les cours d'eau, lorsque les conditions le permettent et dans les secteurs où la maladie est en expansion, pourrait être utilisé comme méthode de contrôle supplémentaire. Par contre, même pour de telles rivières, la migration des ratons laveurs n'est pas complètement interrompue, ce qui souligne l'importance de maintenir d'autres types d'intervention tels que l'épandage d'appâts vaccinaux. Le gouvernement du Québec est particulièrement préoccupé par la possibilité que la rage s'introduise sur l'île de Montréal. Puisque certains échanges ont lieu entre l'île et les deux rives, la possibilité qu'un raton laveur rabique s'introduise éventuellement sur l'île de Montréal ne doit pas être écartée.

D'intéressantes perspectives de recherche futures émergent de mes travaux. Dans un premier temps, il serait pertinent d'identifier les habitats les plus fréquentés par ce mammifère. Cette connaissance est d'une importance capitale afin de bien répartir les appâts vaccinaux pour qu'ils soient consommés efficacement (Rosatte *et al.*, 2010). L'estimation des densités de ratons laveurs et de la productivité de ces habitats serait également nécessaire pour avoir une idée du potentiel de migration des individus et de la probabilité qu'ils franchissent les barrières naturelles. Une troisième perspective de recherche importante serait de vérifier si les barrières naturelles à la dispersion du raton laveur sont également des barrières à la dispersion des autres hôtes de la rage du raton laveur, notamment le renard roux et la moufette rayée. En effet, depuis 2006, 16 cas de rage ont été répertoriés chez la moufette rayée à l'est de la rivière Richelieu. Également, un cas de rage du raton laveur a été répertorié du côté ouest de la rivière Richelieu chez un renard roux, ce qui pourrait indiquer que les rivières sont des barrières moins efficaces à la dispersion de cette espèce. Donc, même en considérant que les rivières sont des barrières complètement imperméables à la dispersion des ratons laveurs, la rage pourrait tout de même se retrouver de l'autre côté des barrières naturelles grâce aux renards

roux. Une approche multi-vecteurs dans le cas de la rage du raton laveur semblerait donc être la méthode à privilégier pour un contrôle efficace de la rage au Québec.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson, R.M., and May, R.M. (1991) *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*: Oxford University Press, Oxford, UK.

Archie, E.A., Luikart, G., and Ezenwa, V.O. (2009) Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Trends Ecol. Evol.*, *24*, 21-30.

Biek, R., Henderson, J.C., Waller, L.A., Rupprecht, C.E., and Real, L.A. (2007) A high-resolution genetic signature of demographic and spacial expansion in epizootic rabies virus. *PNAS*, *104*, 7993-7998.

Biek, R., and Real, L.A. (2010) The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Mol. Ecol.*, *19*, 3515-3531.

Blanchong, J.A., Samuel, M.D., Scribner, K.T., Weckworth, B.V., Langenberg, J.A., and Filcek, K.B. (2008) Landscape genetics and the spacial distribution of chronic wasting disease. *Biol. Lett.*, *4*, 130-133.

Bourhy, H., Kissi, B., Audry, L., Smreczak, M., Sadkowska-Todys, M., Kulonen, K., Tordo, N., Zmudzinski, J.F., and Holmes, E.C. (1999) Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J. Gen. Virol.*, *80*, 2545-2557.

Canac-Marquis, P., Rioux, R., Dicaire, A., Rajotte, D., Sirois, C., Huot, M., Guérin, D., Gagnier, M., and Jolicoeur, H. (2007) Le contrôle de la rage du raton laveur en Montérégie en 2006: déroulement des opérations de terrain. *Nat. Can.*, *131*, 17-25.

Chapuis, M.-P., and Estoup, A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.*, *24*, 621-631.

Centers for disease control and prevention. (1994) Raccoon rabies epizootic - United States, 1993. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.*, *43*, 269-273.

- Chambers, J.L., and Garant, D. (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.
- Childs, J.E., Curns, A.T., Dey, M.E., Real, L.A., Feinstein, L., Bjornstad, O.N., and Krebs, J.W. (2000) Predicting the local dynamics of epizootic rabies among raccoons in the United States. *PNAS*, *97*, 13666-13671.
- Corander, J., Marttinen, P., Siren, J., and Tang, J. (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinform.*, *9*, 539.
- Crawley, M.J. (2007) *The R Book*. West Sussex, Wiley, 75, 425-426.
- Crispo, E., and Hendry, A.P. (2005) Does time since colonisation influence isolation by distance? A meta-analysis. *Conserv. Genet.*, *6*, 665-682.
- Cullingham, C.I. (2007) Analysis of the genetic structure of raccoons (*Procyon lotor*) across eastern North America: applications for wildlife disease management. Ph.D. thesis, Watershed Ecosystems Graduate Program, Trent University, Peterborough, Ont.
- Cullingham, C.I., Pond, B.A., Kyle, C.J., Rees, E.E., Rosatte R.C. and White, B.N. (2008) Combining direct and indirect genetic methods to estimate dispersal for informing wildlife disease management decisions. *Mol. Ecol.*, *17*, 4874-4886.
- Cullingham, C.I., Kyle, C.J., Pond, B.A., Rees, E.E., and White, B.N. (2009) Differential permeability of rivers to raccoon gene flow corresponds to rabies incidence in Ontario, Canada. *Mol. Ecol.*, *18*, 43-53.
- Cullingham, C.I., Kyle, C.J., and White, B.N. (2006) Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide microsatellite loci. *Mol. Ecol. Notes*, *6*, 1030-1032.
- Curtis, A. (1999) Using a spatial filter and a geographic information system to improve rabies surveillance data. *Emerg. Infect. Dis.*, *5*, 603-606.
- Dharmarajan, G., Beasley, J.C., Fike, J.A., and Rhodes, O.E. (2009) Population genetic structure of raccoons (*Procyon lotor*) inhabiting a highly fragmented landscape. *Can. J. Zool.*, *87*, 814-824.

Dobson, A. (2000) Raccoon rabies in space and time. PNAS, 97, 14041-14043.

Fike, J.A., Drauch, A.M., Beasley, J.C., Dharmarajan, G., and Jr., O.E.R. (2007) Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons *Procyon lotor*. Mol. Ecol. Notes, 7, 525-527.

Frantz, A.C., Cellina, S., Krier, A., Schley, L., and Burke, T. (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? J. App. Ecol., 46, 493-505.

Frantz, A.C., Pope, L.C., Etherington, T.R., Wilson, G.J., and Burke, T. (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.

Garant, D., Forde, S.E., and Hendry, A.P. (2007) The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. Funct. Ecol., 21, 434-443.

Gauthier-Clerc, M., and Thomas, F. (2010) Écologie de la santé et biodiversité. Bruxelles: De Boeck, pp.538.

Gehrt, S.D. (2003) Raccoons and allies. In *Wild Mammals of North America, 2nd edition*. Edited by G.A. Feldhamer, J.A. Chapman, B.C. Thompson. Johns Hopkins University Press., pp 611-634.

Gehrt, S.D., Clark, D.E., and Fritzell, E.K. (1997) Population dynamics and ecology of Virginia opossums in southern Texas. Southwest. Nat., 42, 170-176.

Gehrt, S.D., and Fritzell, E.K. (1998a) Duration of familial bonds and dispersal patterns for raccoons in south Texas. J. Mammal., 79, 859-872.

Gehrt, S.D., and Fritzell, E.K. (1998b) Resource distribution, female home range dispersion and male spacial interactions: group structure in a solitary carnivore. Anim Behav., 55, 1211-1227.

González-Suárez, M., Flatz, R., Aurióles-Gamboa, D., Hedrick, P.W., and Gerber, L.R. (2009) Isolation by distance among California sea lion populations in Mexico: redefining management stocks. Mol. Ecol., 18, 1088-1099.

Goudet, J. (1995) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*, *86*, 485-486.

Greenwood, P.J. (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim. Behav.*, *28*, 1140-1162.

Grenfell, B.T., and Dobson, A.P. (1995) Ecology of infectious diseases in natural populations. New York: Cambridge University press, pp.527.

Guillot, G., Mortier, F., and Estoup, A. (2005) Geneland: A program for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes*, *5*, 712-715.

Hardy, O.J., and Vekemans, X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes*, *2*, 618-620.

Henner, C.M., Chamberlain, M.J., Leopold, B.D., and Burger, L.W. (2004) A multi-resolution assessment of raccoon den selection. *J. Wild. Manage.*, *68*, 179-187.

Holderegger, R., and Wagner, H. (2006) A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecol.*, *21*, 793-796.

Jarne, P., and Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, *11*, 424-429.

Johnson, A.S. (1970) Biology of the raccoon (*Procyon lotor varius* Nelson and Goldman) in Alabama. *Bull. Auburn. Univ. Agric. Exp. Stn.*, *402*, 1-148.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., and Marshall, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.*, *16*, 1099-1106.

Koepfli, K.P., Gompper, M.E., Eizirik, E., Ho, C.C., Linden, L., Maldonado, J.E., and Wayne, R.K. (2007) Phylogeny of the Procyonidea (Mammalia: Carnivora): molecules, morphology and the Great American Interchange. *Mol. Phylogenet. Evol.*, *43*, 1076-1095.

- Krebs, J.W., Williams, S.M., Smith, J.S., Rupprecht, C.E., and Childs, J.E. (2003) Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000. *J. Wildl. Dis.*, *39*, 253-261.
- Krebs, J.W., Wilson, M.L., and Childs, J.E. (1995) Rabies-epidemiology, preventions, and future research. *J. Mammal.*, *76*, 681-694.
- Lawson-Handley, J.L., and Perrin, N. (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Mol. Ecol.*, *16*, 1559-1578.
- Lotze, J.H., and Anderson, S. (1979) *Procyon lotor*. *Mammal. Species*, *119*, 1-8.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., and Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.*, *18*, 189-197.
- Manni, F., Guerard, E., and Heyer, E. (2004) Geographic patterns of (genetics, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by "Monmonier's algorithm". *Hum. Biol.*, *76*, 173-190.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.*, *27*, 209-220.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., and Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, *7*, 639-655.
- Meirmans, P.G., and Hedrick, P.W. (2011) Assessing population structure: *Fst* and related measures. *Mol. Ecol. Res.*, *11*, 5-18.
- Ministère des Ressources naturelles et de la Faune. (2009) Résumé de la surveillance de la rage du raton laveur au Québec en 2008, pp 6.
- Neaves, L.E., Zenger, K.R., Prince, R.I.T., Eldridge, M.D.B., and Cooper, D.W. (2009) Landscape discontinuities influence gene flow and genetic structure in a large, vagile Australian mammal, *Macropus fuliginosus*. *Mol. Ecol.*, *18*, 3363-3378.

Nettles, V.F., Shaddock, J.H., Sikes, R.K., and Reyes, C.R. (1979) Rabies in translocated raccoons. *Am. J. Public Health*, *69*, 601-602.

Nocture, M., Cabaret, J., and Hugonnetchappelle, L. (1998) Protostrongylid Nematode Infection of Chamois (*Rupicapra Rupicapra*) At the Bauges Massif (French Alps). *Vet. Parasitol.*, *77*, 153-161.

Novak, M., Baker, J.A., Obbard, M.E., and Malloch, B. (1987) Wild furbearer management and conservation in North America. Ontario Ministry of Natural Resources and the Ontario Trappers Association.

Ostfeld, R.S., Glass, G.E., and Keesing, F. (2005) Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol. Evol.*, *20*, 328 - 336.

Palsboll, P.J., Peery, M.Z., and Bérubé, M. (2010) Detecting populations in the 'ambiguous' zone: kinship-based estimation of population structure at low genetic divergence. *Mol. Ecol. Res.*, *10*, 797-805.

Pitt, J.A., Larivière, S., and Messier, F. (2008) Social organisation and group formation of raccoons at the edge of their distribution. *J. Mammal.*, *89*, 646-653.

Prange, S., Gehrt, S.D., and Wiggers, E.P. (2003) Demographic factors contributing to high raccoon densities in urban landscapes. *J. Wildl. Manage.*, *67*, 324-333.

Prange, S., Gehrt, S.D., and Wiggers, E.P. (2004) Influences of anthropogenic resources on raccoon (*Procyon lotor*) movements and spacial distribution. *J. Mammal.*, *85*, 483-490.

Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. J. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* *155*, 945-959.

Puskas, R.B., Fisher, J.W., Swope, C.B., Dunbar, M.R., McLean, R.G., and Root, J.J. (2010) Raccoon (*Procyon lotor*) movements and dispersal associated with ridges and valleys of Pennsylvania: implications for rabies management. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, *10*, 1043-1048.

R Development Core Team. (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org> (Vienna, Austria).

- Raymond, M., and Rousset, F. (1995) GenePop (version 1.2): population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, *86*, 248-249.
- Rees, E.E., Pond, B.A., Cullingham, C.I., Tintline, R.R., Ball, D., Kyle, C.J., and White, B.N. (2009) Landscape modelling spacial bottlenecks: implications for raccoon rabies disease spread. *Biol. Lett.*, *5*, 387-390.
- Ritke, M.E. (1990) Quantitative assessment of variation in litter size of the raccoon *Procyon lotor*. *Am. Midl. Nat.* *123*, 390-398
- Root, J.J., Puskas, R.B., Fisher, J.W., Swope, C.B., Neubaum, M.A., Reeder, S.A., and Piaggio, A.J. (2009) Landscape genetics of raccoons (*Procyon lotor*) associated with ridges and valleys of Pennsylvania: implications for oral rabies vaccination programs. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, *9*, 583-588.
- Rosatte, R., Donovan, D., Allan, M., Howes, L.-A., Silver, A., Bennett, K., MacInnes, C., Davies, C., Wandeler, A., and Radford, B. (2001) Emergency response to raccoon rabies introduction into Ontario. *J. Wildl. Manage.*, *37*, 265-279.
- Rosatte, R., MacDonald, E., Sobey, K., Donovan, D., Bruce, L., Allan, M., Silver, A., Bennett, K., Brown, L., MacDonald, K., Gibson, M., Buchanan, T., Stevenson, B., Davies, C., Wandeler, A., and Muldoon, F. (2007) The elimination of raccoon rabies from Wolfe Island, Ontario: animal density and movements. *J. Wild. Dis.*, *43*, 242-250.
- Rosatte, R., Ryckman, M., Ing, K., Proceviat, S., Allan, M., Bruce, L., Donovan, D., and Davies, J.C. (2010) Density, movements, and survival of raccoons in Ontario, Canada: implications for disease spread and management. *J. Mammal.*, *91*, 122-135.
- Rosatte, R., Sobey, K., Donovan, D., Bruce, L., Allan, M., Silver, A., Bennett, K., Gibson, M., Simpson, H., Davies, C., Wandeler, A., and Muldoon, F. (2006) Behaviour, movements, and demographics of rabid raccoons in Ontario, Canada: management implications. *J. Wild. Dis.*, *42*, 589-605.
- Rupprecht, C.E., Smith, J.S., Fekadu, M., and Childs, J.E. (1995) The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? *Emerg Infect Dis.*, *1*, 107-114.

Russel, C.A., Real, L.A., and Smith, D.L. (2006) Spatial control of rabies on heterogeneous landscapes. *PLoS ONE*, *1*, e27.

Selkoe, K.A., and Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.*, *9*, 615-629.

Shaw, C.N., Wilson, P.J., and White, B.N. (2003) A reliable molecular method of gender determination for mammals. *J. Mammal.*, *84*, 123-128.

Siripunkaw, C., Kongrit, C., Faries, K.M., Monello, R.J., Gompper, M.E., and Eggert, L.S. (2008) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the raccoon (*Procyon lotor*). *Mol. Ecol. Res.*, *8*, 199-201.

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

Storfer, A., Murphy, M.A., Spear, S.F., Holderegger, R., and Waits, L.P. (2010) Landscape genetics: Where are we now? *Mol. Ecol.*, *19*, 3496-3514.

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

Urban, D. (1970) Raccoon populations, movement patterns, and predation on a managed waterfowl marsh. *J. Wild. Manag.*, *34*, 372-382.

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

Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* *38*, 1358-1370.

World Health Organization. (2010) Human and animal rabies: www.who.int/rabies/en/.

