

Université de Montréal

**Phylogéographie comparée de la souris à pattes blanches et de la
souris sylvestre, deux vecteurs de la maladie de Lyme au Québec**

Par Jessica Fiset

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. sc.)

en sciences biologiques

Octobre 2013

© Jessica Fiset, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Phylogéographie comparée de la souris à pattes blanches et de la souris sylvestre, deux vecteurs de la maladie de Lyme au Québec

Présenté par
Jessica Fiset

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

M. Pierre Legendre	: Président-rapporteur
M. François-Joseph Lapointe	: Directeur
Mme. Virginie Millien	: Co-directrice
M. Colin Favret	: Membre du Jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

Mon étude vise à évaluer la propagation d'une zoonose en émergence au Québec, la maladie de Lyme, en conséquence du réchauffement climatique. Le pathogène responsable de cette infection, *Borrelia burgdorferi*, est transmis par l'intermédiaire d'une tique parasite, *Ixodes scapularis*, de plus en plus commune au Québec en raison de l'augmentation de la température moyenne du climat depuis les dernières décennies. Puisque la tique a une capacité de déplacement très restreinte, on s'attend à ce que sa dispersion soit liée à celle de son hôte primaire, soit la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*). Je décrirai donc d'abord les espèces impliquées, leur écologie et leur rôle dans ce système à trois niveaux (hôte/pathogène/vecteur). Puis, à l'aide de séquences d'ADN mitochondrial, je comparerai la phylogéographie des deux principales espèces de souris au Québec, la souris à pattes blanches et la souris sylvestre (*P. maniculatus*). Des analyses d'arbres et de réseaux d'haplotypes ont révélé des différences significatives dans la structure génétique et ainsi montré que les populations de *P. leucopus* seraient en expansion dans le sud du Québec. Cette étude nous a finalement permis d'émettre des hypothèses sur le patron d'établissement de la maladie de Lyme au Québec.

Mots clés français: Zoonose, maladie de Lyme, hôte primaire, *Peromyscus*, ADN mitochondrial, phylogéographie, réseaux d'haplotypes, structure génétique, population en expansion

RÉSUMÉ ANGLAIS

My study aims to assess the spread of an emerging zoonosis in Québec, Lyme disease, as a consequence of global warming. The pathogen responsible for this infection, *Borrelia burgdorferi*, is transmitted through a tick parasite, *Ixodes scapularis*, increasingly common in Québec due to the elevation of the average temperature of the atmosphere over the past decades. Since the tick has a very limited dispersal capacity, it is expected that its dispersion is linked to that of its primary host, the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). I first described the species involved, their ecology and role in this three-level system (host / pathogen / vector). Then, using mitochondrial DNA sequences, I compared the phylogeography of the two main mouse species in Québec, the white-footed mouse and the deer mouse (*P. maniculatus*). Analyses of trees and haplotype networks revealed significant differences in the genetic structure, and thus showed that populations of *P. leucopus* are expanding in southern Québec. This study finally allowed making assumptions on the pattern of establishment of Lyme disease in Québec.

Mots clés anglais: Zoonosis, Lyme disease, primary host, *Peromyscus*, mitochondrial DNA, phylogeography, haplotype networks, genetic structure, expanding populations

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	III
RÉSUMÉ ANGLAIS.....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	X
REMERCIEMENTS	XI
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
1.1. La maladie de Lyme.....	2
1.1.1. Définition	2
1.1.2. Mode de transmission	2
1.1.3. Mammifères réservoirs de <i>Borrelia</i>	3
1.2. <i>Ixodes scapularis</i>	3
1.2.1. Description	3
1.2.2. Distribution géographique	4
1.2.3. Écologie de la tique	5
1.3. <i>Peromyscus leucopus</i> et <i>P. maniculatus</i>	7
1.3.1. Description	7
1.3.2. Identification de l'espèce	8
1.3.3. Répartition géographique	8
1.3.4. Écologie	10
1.4. La phylogéographie	10
1.4.1. Méthodes et applications	10
1.4.2 La phylogéographie comparée	12
1.4.3. La phylogéographie multilocus	13
1.4.4. Phylogéographie des <i>Peromyscus</i>	14

1.5. Objectifs et hypothèses du projet	16
1.5.1. Objectif principal	16
1.5.2. Sous-objectifs	16
1.5.3. Hypothèses	16
CHAPITRE 2 - COMPARATIVE PHYLOGEOGRAPHY OF THE WHITE FOOTED MOUSE AND THE DEER MOUSE, TWO LYME DISEASE VECTORS IN QUÉBEC	18
2.1. Résumé	19
2.2. Abstract	20
2.3. Introduction	21
2.4. Materials and methods	24
2.4.1. Sampling	24
2.4.2. DNA sequences	26
2.4.3. Phylogeography	37
2.5. Results	29
2.5.1. Markers comparison	29
2.5.2. Species comparison	34
2.5.3. Ancestral divergence	37
2.6. Discussion	37
2.6.1. Congruent phylogeographic pattern	37
2.6.2. Expansion signature	38
2.6.3. Ancestral divergence	40
2.7. Conclusion	41
2.8. Acknowledgements	41
CHAPITRE 3 - CONCLUSION	42
3.1. Structure génétique	43
3.2. Implications pour <i>Borrelia</i>	44
RÉFÉRENCES	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Résumé des séquences mitochondriales les plus couramment utilisées, de l'échelle géographique et du nombre de clades significatifs obtenus dans quelques études de phylogéographie réalisées chez des espèces de souris du genre *Peromyscus* 15

Table 2.1. Geographical coordinates of the sampling sites. Numbers of white-footed mice (*P.l.*) and deer mice (*P.m.*) are also provided, along with numbers of ticks, *Ixodes scapularis* (*I.s.*) found on each species (*P.l./P.m.*) and the numbers of mice infected (*P.l./P.m.*) by *Borrelia* (*B.b.*) 25

Table 2.2. Primers for amplifying the five mtDNA regions used in this study 26

Table 2.3. Sequence lengths (pb), numbers of haplotypes, variable sites, informative sites and private haplotypes for each mitochondrial marker used in this study for *P. leucopus* and *P. maniculatus* 29

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1.** Distribution géographique de la tique du chevreuil, *Ixodes scapularis*, aux États-Unis (Centers for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov) 6
- Figure 1.2.** Cycle de développement et de reproduction de la tique du chevreuil, *Ixodes scapularis* (Centers for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov) 8
- Figure 1.3.** Distribution géographique de *Peromyscus leucopus* (en haut) et de *Peromyscus maniculatus* (en bas) (FAUNMAP database, Graham 2004) 11
- Figure 2.1.** Map of Canada showing the location of 26 of the sampling sites where mice and ticks were sampled during summer 2011 in Southern Québec (inset). The last site (Saguenay) located further north-east is not shown on this map 27
- Figure 2.2.** Phylogeographic trees constructed by neighbor-joining from 5 mitochondrial genes (D-loop, Cyt B, ATP8, 16S and COIII) for *P. leucopus* (left) and *P. maniculatus* (right). The north-shore (NS) clade is framed in grey and the south-shore (SS) in blue. Bootstrap support values are shown for the NS/SS split 35
- Figure 2.3.** Haplotype network estimated from 5 mitochondrial genes, for *P. leucopus* (left) and *P. maniculatus* (right). The different colors represent the sampling localities. North shore sites are in white-grey-black while south shore sites are in color 36
- Figure 2.4.** Population networks constructed from 5 mitochondrial genes for *P. leucopus* (left) and *P. maniculatus* (right). Dotted lines correspond to connection probabilities lower than 0.2 while solid lines represent connection probabilities of 0.2 and higher. The different colors represent the sampling localities 37

Figure 2.5. Phylogeographic trees estimated by neighbor-joining from the combined sequences of 5 mtDNA regions with corresponding haplotype networks and population networks. The north-shore clades are framed in grey and the south-shore clades in blue. Bootstrap support values are only shown for the first split. The colors in the networks correspond to different localities where deer mice (top panel) and white-footed mice (bottom panel) have been sampled..... 38

Figure 2.6. Average topological resolution of the five phylogeographic trees (Fig. 2.2) for *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*. 40

Figure 2.7. Average group diameter (left) and group purity (right) of each site for *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*. These values were computed from the corresponding haplotype networks (Fig. 2.5)..... 40

Figure 2.8. Average graph density (for the five markers) in the population networks (Fig. 2.4) for *P. leucopus* and *P. maniculatus* 41

Figure 2.9. Average node degree distribution (for the five markers) in the population networks (Fig. 2.4) for *P. leucopus* and *P. maniculatus* 41

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

°C	Degree Celcius
16S	16S (subunit) ribosomal ribonucleic acid
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ATP8	Adenosine triphosphate synthase subunit 8
Bp / pb	Base pair / Paire de base
BS	Bootstrap value
CADM	Congruence among distance matrix
COIII	Cytochrome oxydase III / Cytochrome oxidase III
Cyt B	Cytochrome B (subunit)
DLoop	Displacement loop
DNA	Deoxyribonucleic acid
km	Kilomètre, kilometer
m	Mètre, meter
m ²	Mètre carré
min	Minute
mM	Micromolar
mm	Millimètre
mtDNA	Mitochondrial desoxiribonucleic acid
NS / RN	North Shore / Rive-nord
µl	Microlitre
nb	Number
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
Sec	Second
SS / RS	South Shore / Rive-sud

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de recherche, François-Joseph Lapointe et Virginie Millien, qui ont rendu ce projet possible et qui m'avez donné la chance de cheminer en recherche. Merci infiniment François pour ta compréhension, ton support et ta confiance du début à la fin de ma maîtrise. Merci aussi pour toutes tes idées originales qui ont tant enrichi cette étude. Un grand merci Virginie, pour ta patience, ton expertise et tes encouragements.

J'exprime aussi un merci tout spécial à Nathalie Tessier, pour ma formation en laboratoire et ta grande disponibilité à répondre à toutes mes questions. Merci de m'avoir amenée sur le terrain avec toi!

Merci aussi au reste du laboratoire, Cyndi, Anita, Margo et sans oublier Louise, de votre bonne humeur et pour tous ces diners à rire! Merci à l'équipe de McGill pour l'aide précieuse sur le terrain et avec les échantillons. Merci Émilie et Cyndi de m'avoir endurée pendant tout un été!

À tous les professeurs ayant fait partie de mon comité-conseil et de mon jury de maîtrise; Bernard Angers, Anne Bruneau, Pierre Legendre et Colin Favret, merci énormément pour vos précieux conseils et votre ouverture d'esprit!

J'aimerais finalement remercier ma famille et mes amis pour leur support moral et leurs encouragements. Merci à Olivier et Simon, qui ont été présents dans tous les hauts et les bas.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. La maladie de Lyme

1.1.1. Définition

L'agent responsable de la borréliose de Lyme est une bactérie spirochète, *Borrelia burgdorferi*. Les bactéries cet ordre sont très mobiles, la membrane cytoplasmique est entourée de peptidoglycane et de flagelles, et ont une structure en tire-bouchon (Tsao 2009). Suite à la transmission à l'homme, la maladie évolue généralement par stade. Le premier est une lésion cutanée caractéristique en forme de cible au site d'infection (morsure de la tique). Le deuxième stade se produit quelques jours à quelques semaines suivant l'infection lors de la diffusion de la bactérie dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien. À ce stade, des symptômes semblables à ceux de la grippe (maux de tête, fatigue, fièvre) et des douleurs articulaires peuvent être ressentis. Au troisième stade, l'infection devient chronique et affecte tous les systèmes de l'organisme. L'arthrite est toujours le symptôme le plus commun, mais des problèmes neurologiques peuvent aussi paraître, tels des douleurs crâniennes et des paralysies partielles du visage, du diaphragme ou d'autres muscles et organes (Steere *et al.* 2004). Il est rare que la maladie soit asymptomatique chez l'humain, mais parfois la lésion cutanée n'est pas observée et les symptômes du deuxième stade ne sont pas associés à la maladie de Lyme.

1.1.2. Mode de transmission

Borrelia burgdorferi ne se transmet pas de la tique adulte à sa progéniture. Pour qu'une tique soit infectée et puisse transmettre la maladie, elle doit d'abord se nourrir sur un hôte porteur (Hanincova *et al.* 2006). La bactérie entre ensuite dans une phase de dormance de la fin de l'automne au printemps dans l'intestin de la tique jusqu'à son prochain repas (Tsao 2009). Ceci signifie que les hôtes de la tique adulte, tels que les gros mammifères, sont plus susceptibles de contracter la maladie, mais pas de la propager (Steere *et al.* 2004), puisque leur système immunitaire la combattent. Les larves et les nymphes des tiques, étant plus petites, parasitent davantage les petits animaux comme des rongeurs et des oiseaux (Sonenshine 2005). La souris à pattes blanches, *Peromyscus leucopus*, est un excellent vecteur de la borréliose de Lyme puisqu'elle en est une porteuse asymptomatique

toute sa vie une fois infectée (Hanincova *et al.* 2006), contrairement à d'autres mammifères tels les canidés, les cervidés et les humains.

1.1.3. Mammifères réservoirs de *Borrelia*

Jusqu'à maintenant, *P. leucopus* est reconnu pour être le meilleur réservoir de la bactérie chez les mammifères. Il s'agit de la seule espèce ayant été en mesure de transmettre efficacement (90%) toutes les souches de *Borrelia* aux tiques dans le cadre d'études en laboratoire (Hanincova *et al.* 2006). Les autres espèces de mammifères testées étaient le campagnol sylvestre, le tamia rayé, l'écureuil gris, le raton laveur, l'opossum de Virginie, la musaraigne cendrée, la grande musaraigne et la moufette rayée. La souris sylvestre, *Peromyscus maniculatus*, ne faisait pas partie des espèces à l'étude. Celle-ci est par contre très commune à nos latitudes (Graham 2004) et elle est très près phylogénétiquement de la souris à pattes blanches (Bradley 2007). Des études antérieures ont toutefois démontré que *P. maniculatus* serait presque aussi compétent à conserver et transmettre *Borrelia* que *P. leucopus* lorsque cette dernière est absente de la région (Rand *et al.* 1993). La maladie de Lyme ne serait donc pas limitée aux régions où *P. leucopus* est présent bien qu'il s'agisse de son réservoir primaire.

1.2. *Ixodes scapularis*

1.2.1. Description

La tique du chevreuil, *Ixodes scapularis*, est un arachnide de la famille des Ixodidae, soit des tiques dures ou à bouclier. Le genre *Ixodes* est caractérisé par une rainure formant un arc antérieur à l'anus, ainsi que par l'absence d'yeux et d'ornements scutaux (à l'arrière de la tête) (Bowman 2005). La tique du chevreuil adulte femelle mesure environ 5 mm, a un bouclier noir et un abdomen orangé. Le mâle quant à lui, a un bouclier noir-brunâtre recouvrant l'abdomen en entier. La larve mesure près de 1 mm et n'a que 6 pattes, tandis que la nymphe, possédant ses 8 pattes, mesure environ le double (Centers for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov). La femelle, une fois gorgée de sang et/ou d'œufs, a

davantage un aspect de sac gris (brunâtre à bleuté) faisant penser à une tétine sur un animal parasité.

1.2.2. Distribution géographique

La tique du chevreuil est commune et grandement répartie aux États-Unis (Fig. 1.1). Jusqu'à 1997, la seule population connue au Canada se trouvait à Longue-Pointe, en Ontario (Myers *et al.* 2009). Toutefois depuis la dernière décennie, des populations ont commencé à s'installer dans le sud du Québec, principalement en Montérégie et en Estrie en lien avec le réchauffement climatique (Ogden *et al.* 2008). En effet, la proportion d'habitats favorables pour le développement de la tique serait en hausse au Canada (Brownstein *et al.* 2005).

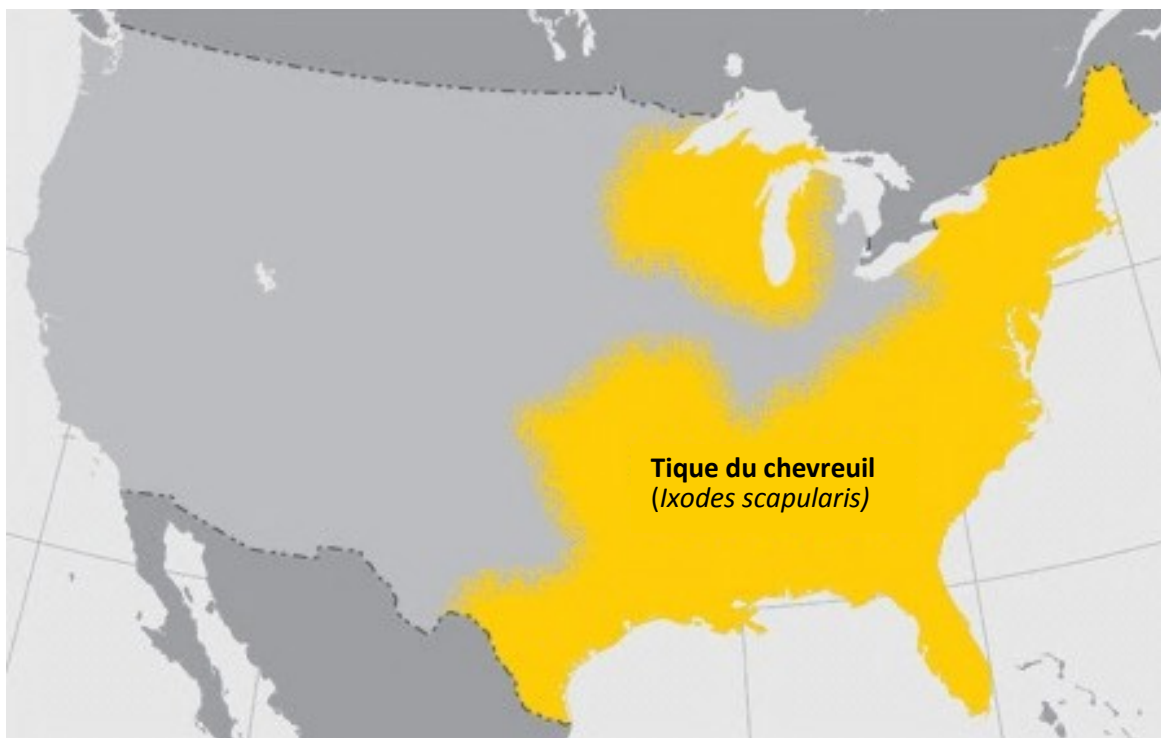


Figure 1.1. Distribution géographique de la tique du chevreuil, *Ixodes scapularis*, aux États-Unis pour l'année 2011 (Centers for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov)

1.2.3. Écologie de la tique

Les femelles adultes pondent leurs œufs au sol à la fin du printemps. Les larves éclosent durant l'été et prennent un premier repas de sang. Elles se métamorphosent ensuite en nymphes pour entrer en diapause tout l'hiver tandis que les adultes meurent. Les nymphes se nourrissent alors une deuxième fois au début de l'été avant d'acquies leur forme adulte. La fécondation a lieu à l'automne et les femelles cherchent à se nourrir principalement durant l'automne ou lors des journées chaudes d'hiver (Fig. 1.2). Les mâles adultes, quant à eux, ne se nourrissent jamais et meurent à l'hiver. La tique ne parasite généralement qu'une seule fois à chaque stade de vie. Les larves et les nymphes restent accrochées à l'animal hôte de 2 à 4 jours et les adultes jusqu'à 3 semaines (Steere *et al.* 2004, Sonenshine 2005).

Les tiques sont des chasseurs à l'affût, relativement généralistes. Elles grimpent dans la végétation, se postent au bout d'une feuille ou d'une herbe et étendent leurs membres antérieurs afin de s'agripper au premier animal passant. C'est pourquoi les larves et les nymphes, qui sont plus petites et ont un potentiel de déplacement plus réduit, parasitent davantage de petits animaux. Selon une étude de Bouchard *et al.* (2011), les souris du genre *Peromyscus* transporteraient plus de 60% des 300 larves et nymphes de tiques récoltées sur des petits mammifères, tandis que les écureuils et les tamias en auraient transporté environ 30%. Les tiques adultes, quant à elles, sont en mesure de grimper sur des arbustes et ont ainsi plus de chance de s'agripper à de grands animaux (Tsao 2009).

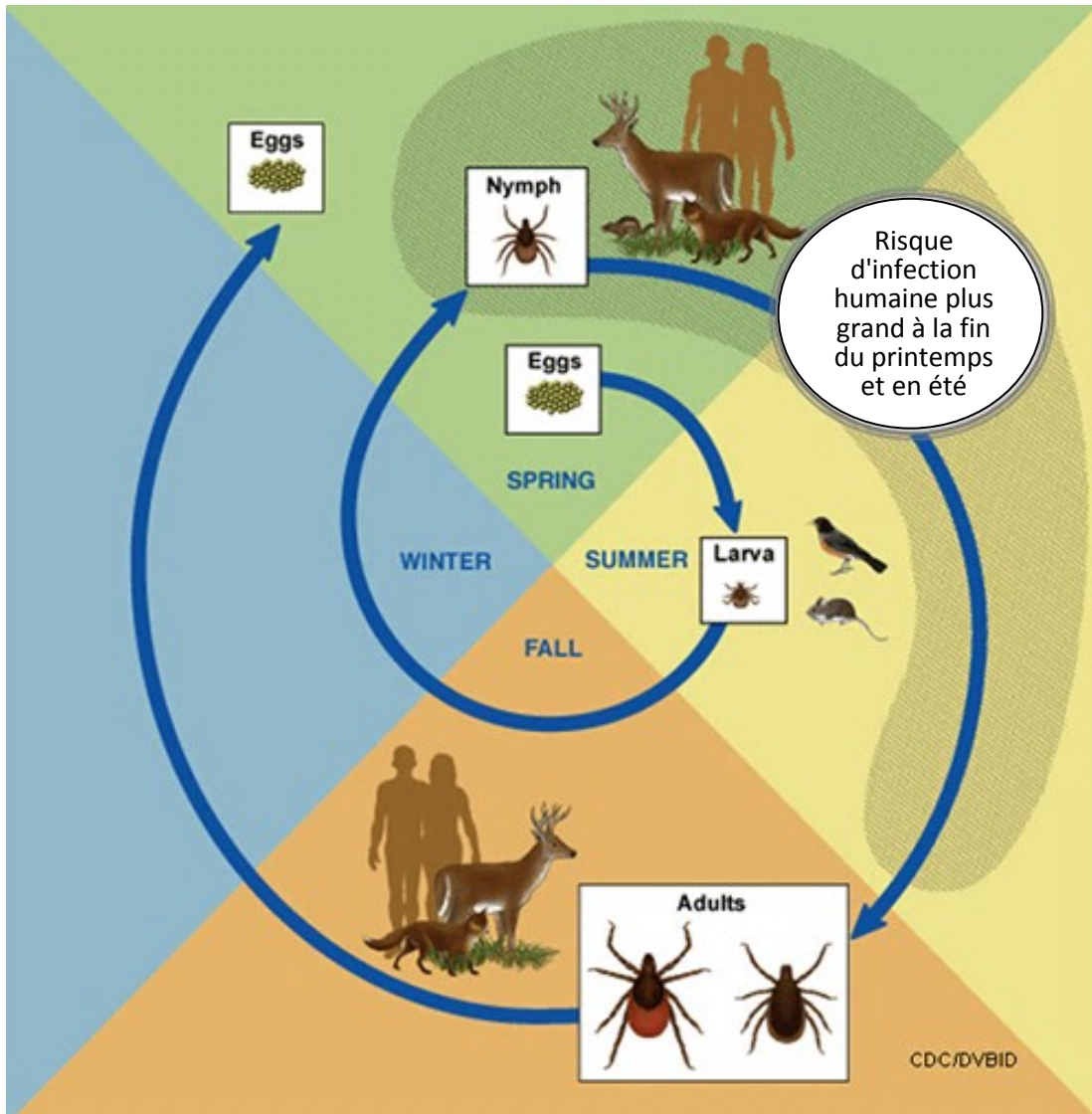


Figure 1.2. Cycle de développement et de reproduction de la tique du chevreuil, *Ixodes scapularis* (Centers for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov)

Les grands mammifères comme les canidés ou les cervidés, ainsi que les oiseaux migrateurs, sont responsables de la dispersion de la tique à grande échelle (Trout *et al.* 2009). Par contre, cela ne signifie pas que celle-ci pourra profiter des conditions nécessaires à sa reproduction, ou à sa survie hivernale, aux endroits où elle sera tombée, car elle est extrêmement dépendante de son environnement et du climat (Bunnell *et al.* 2003, Brownstein *et al.* 2005). C'est pourquoi des spécimens de tiques des trois stades (larves, nymphes et adultes) doivent être retrouvés sur un même site au moins deux années consécutives pour admettre l'établissement d'*Ixodes scapularis* dans la région selon l'Agence de la Santé Publique du Canada (Health Canada 1991).

1.3. *Peromyscus leucopus* et *P. maniculatus*

1.3.1. Description

Les souris du genre *Peromyscus* sont des rongeurs (Ordre: Rodentia) de la famille des Cricetidae. Ils font partie de la sous-famille des rats et souris du Nouveau Monde, les Sigmodontinae (McKenna & Bell 1997). *P. leucopus* et *P. maniculatus* sont des espèces-soeurs, chacune d'elle contenant plusieurs sous-espèces (Bradley 2007). Les données fossiles indiquent que ces deux espèces auraient divergé il y a approximativement 500 000 ans (Hibbard 1968).

P. leucopus peut peser entre 14 et 30 g. Elle mesure environ 90 à 105 mm de corps (incluant la tête) et de 60 à 100 mm de queue. Elle a le dos brun à brun foncé rougeâtre et le ventre et les pieds blancs (Burt & Grossenheider 1992, Stephen *et al.* 1996). *P. maniculatus*, un peu plus grosse, pèse de 18 à 35 g. Elle mesure de 70 à 100 mm de corps et de 50 à 125 mm de queue. Elle est de couleur gris pâle chamois à brun foncé rougeâtre sur le dos et a toujours la queue bicolore, blanche dessous et foncée dessus. Il s'agit de l'espèce de souris la plus commune et répandue à nos latitudes (Burt & Grossenheider 1992, Stephen *et al.* 1996). Les deux espèces sont très semblables morphologiquement et il est parfois difficile, voire impossible, de les différencier dans la nature.

1.3.2. Identification de l'espèce

Les principaux critères de différenciation sur le terrain sont au niveau de la queue. *P. maniculatus* a une queue généralement aussi longue ou plus longue que le corps, blanche ventralement et portant un pinceau. *P. leucopus* possède en général une queue plus courte que le corps, plus foncée ventralement, avec un pinceau moins bien défini et plus rare (Choate 1973, Stephen *et al.* 1996).

Toutefois, ces critères ne sont pas suffisamment fiables pour identifier l'espèce avec certitude, en plus d'être difficile à évaluer chez les juvéniles. C'est pourquoi une méthode génétique fut utilisée dans le cadre de mon étude. Une portion de la cytochrome oxydase III de l'ADN mitochondrial a été amplifiée à l'aide d'une amorce universelle et d'une amorce spécifique à chacune des deux espèces. Ainsi, une bande de 225pb a été observée sur gel d'agarose chez *P. maniculatus* comparativement à une bande de 159pb chez *P. leucopus* (Tessier *et al.* 2004).

1.3.3. Répartition géographique

Historiquement, *P. maniculatus* est la souris que nous devrions retrouver en majorité au Québec (Hooper 1968). En effet, la limite nord-est de la répartition de *P. leucopus* se trouve dans le sud du Québec (**Fig. 1.3**) (Hooper 1968). Cependant, selon une étude de Myers *et al.* (2009), *P. leucopus* aurait étendu son aire de répartition de 225 km en 15 ans au nord-est de la péninsule du Michigan. Ceci correspond à une expansion d'environ 15 km par année et une des causes les plus probables à l'origine de cette dispersion serait le réchauffement climatique (Myers *et al.* 2009).

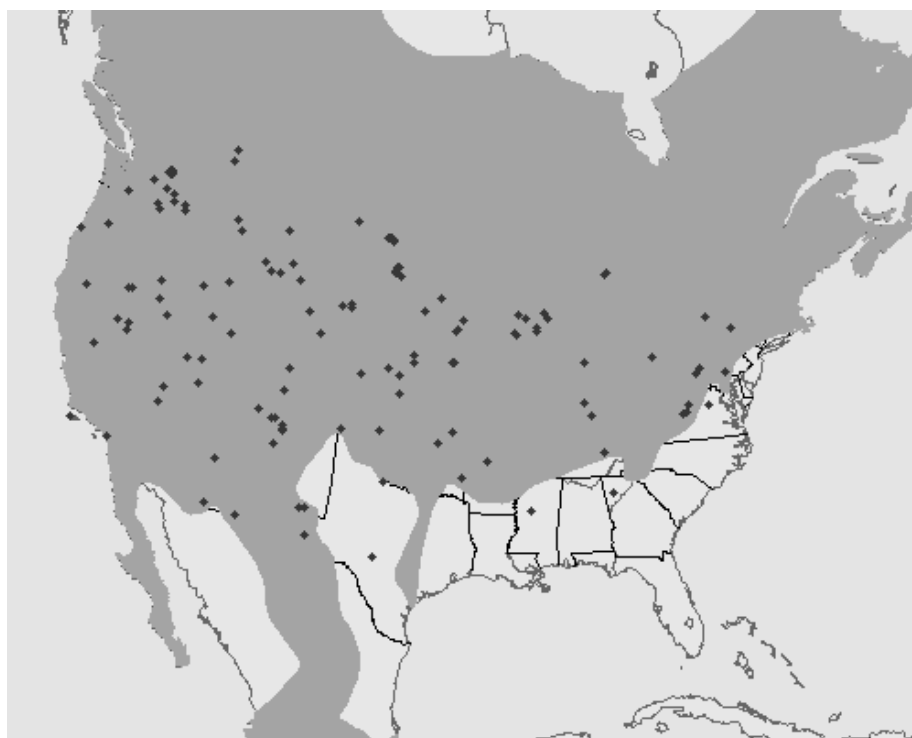
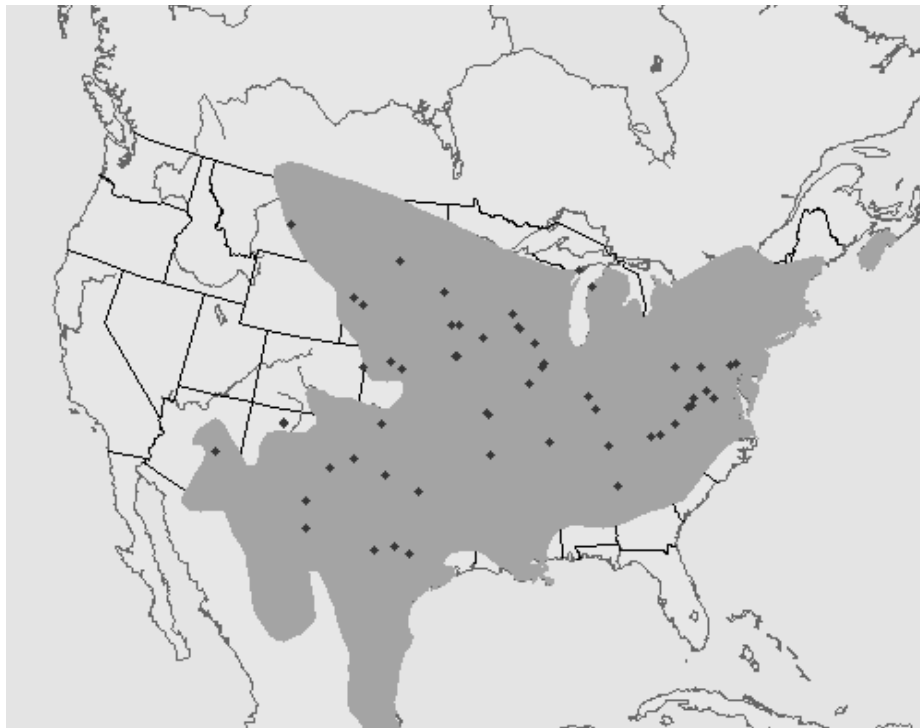


Figure 1.3. Distribution géographique (zone grise) de *Peromyscus leucopus* (en haut) et de *Peromyscus maniculatus* (en bas), les points sur les cartes représentent les mentions des espèces (FAUNMAP database, Graham 2004).

1.3.4. Écologie

P. leucopus et *P. maniculatus* vivent dans les forêts décidues et semi-boréales (Hooper 1968). On les retrouve aussi dans des zones boisées ou broussailleuses ainsi que parfois dans des clairières (Burt & Grossenheider 1992). Les deux espèces exploitent des habitats et utilisent des nids similaires. Elles se nourrissent d'arthropodes comme des lépidoptères, de fruits, de graines, de champignons et de noix (Wolff *et al.* 1985).

Le domaine vital estimé pour ces souris est de 1200 m² pour les femelles et de 1800 m² pour les mâles. Ils pourraient cependant parfois atteindre 10 000 m² (soit 100 m x 100 m). La distance de dispersion varie généralement de 0,5 à 1,5 km et est plus fréquente et plus grande chez le mâle (Furrer 1973, Van Horne 1981). Les souris peuvent aussi se disperser par la nage et seraient en mesure de traverser des étendues d'eau de plus de 230 m. Cependant, l'autre rive doit être visible pour qu'elles entreprennent ce voyage (Sheppe 1965).

Les *Peromyscus* peuvent avoir deux portées par année. La première, tôt en été, pourra donner naissance à une deuxième cohorte à la fin de la saison, tandis que les jeunes nés plus tard ne pourront se reproduire que l'année suivante. Il y a donc un chevauchement des générations chez *Peromyscus* (Lackey 1978, Wolff 1985). Le temps de gestation est de 3 à 4 semaines et le sevrage des petits presque aussi long (Svendsen 1964).

1.4. La phylogéographie

1.4.1. Méthodes et applications

La phylogéographie est une discipline étroitement liée à la biogéographie historique, qui étudie la répartition des espèces vivantes et leur évolution en fonction du terrain, du climat, des écosystèmes, etc. La phylogéographie est basée sur l'utilisation de données génétiques afin d'inférer l'évolution des lignées généalogiques en fonction de leur distribution géographique (Avice 2000, Zink 2002).

L'objectif de ce type d'analyse est de construire des arbres phylogénétiques à partir d'haplotypes (signature génétique d'une séquence non recombinante) ou de génotypes (moins utilisés en phylogéographie) retrouvés en fonction de régions géographiques. Les réseaux permettent, contrairement aux arbres, de représenter plusieurs connexions possibles pour passer d'un haplotype à un autre. Les topologies obtenues à partir de méthodes de réseaux sont probablement plus réalistes au niveau intraspécifique puisque les populations n'évoluent pas de manière strictement dichotomique, mais ont souvent plusieurs routes d'échange génétique avec les populations voisines. Les haplotypes peuvent être obtenus par séquençage ou à partir de patrons de digestion par des enzymes de restriction (Lansman *et al.* 1983). Le but est alors d'identifier des groupes à l'intérieur desquels le niveau de divergence des haplotypes est significativement plus faible qu'entre les différents groupes et de voir si ceux-ci correspondent à une région géographique particulière. Chaque haplotype est relié avec ceux desquels il a pu évoluer en indiquant sur chaque branche le nombre de mutations les séparant. Ceci permet donc de discerner la direction géographique dans laquelle les populations ont évolué (Avice 2000). Les haplotypes intérieurs auront plusieurs connexions avec les autres haplotypes retrouvés, tandis que les haplotypes extérieurs, probablement plus dérivés, n'auront qu'une ou peu de connections avec les autres (Rowe *et al.* 2006). Nous pouvons donc poser l'hypothèse que les haplotypes ayant le plus de connexions avec les autres sont les haplotypes ancestraux.

La phylogéographie peut nous permettre de comprendre des phénomènes historiques, génétiques et démographiques, tels que des fluctuations climatiques ancestrales (Sullivan *et al.* 2000) et des événements de vicariance entre les populations (Brunsfield *et al.* 2001). Il est aussi possible d'identifier les lignées ancestrales et de déterminer les voies de colonisation et l'origine des répartitions actuelles. Ainsi, il est envisageable d'inférer des patrons d'expansion visant à prévoir les distributions futures (Bermingham & Moritz 1998). Par exemple, selon une étude réalisée par Rowe *et al.* (2006), trois clades ont été observés chez *Peromyscus leucopus* et chez *Tamias striatus* à l'échelle des États-Unis. Aucune structure génétique significative n'était observable à l'intérieur de chacun des grands clades. Ceci suggère que les populations sont en expansion ou alors qu'elles se reproduisent aléatoirement et sans barrières (Slatkin & Hudson 1991). Il fut ainsi proposé

que, à cause de l'absence de barrières géographiques et au chevauchement des clades, les populations auraient pris de l'expansion à partir de trois colonies ancestrales. L'événement de vicariance aurait eu lieu lors de la période glaciaire et l'espèce aurait été divisée en une population est, une population centrale et une population ouest. Chaque groupe serait donc en expansion depuis la fin de la période glaciaire. Ceci laisse supposer que les caractéristiques géographiques et le paysage n'affecteraient pas la répartition et que les espèces se disperseraient aisément de part et d'autre des fleuves et des rivières majeures comme le Mississippi (Rowe *et al.* 2006).

1.4.2. La phylogéographie comparée

La comparaison d'arbres phylogéographiques de différentes espèces se nomme la phylogéographie comparée. Le fait que les liens phylogénétiques entre les groupes, sur une échelle spatiale, soient semblables ou différents pour deux espèces partageant une aire de répartition peut nous fournir des renseignements importants sur leur écologie et les relations interspécifiques (Arbogast & Kenagy 2001). Par exemple, les liens entre la distribution des espèces et leur environnement (habitats, climats, écosystèmes) peuvent apporter des indices considérables pour cibler nos efforts en conservation (Moritz & Faith 1998, Zink 2002). Selon Rowe *et al.* (2006), chez *P. leucopus* et *T. striatus*, au moins un des clades retrouvés (le clade ouest) serait associé à la forêt de type « Oak savannah ». Il est important de comprendre que ce clade en particulier comprend une partie de la variabilité génétique des espèces qui n'est pas retrouvée dans les autres clades. De plus, puisque ce clade semble contraint à l'intérieur de ce type de forêt pour les deux espèces, il est aisé de croire que des relations étroites sont installées entre les espèces et leur environnement.

Il est aussi fréquent d'utiliser ce type d'analyse pour l'étude de modèles de compétition, de prédation, de parasitisme, etc. La coévolution entre des espèces en étroite interaction est observée dans de tels cas par des structures phylogéographiques congruentes pour des espèces aux répartitions géographiques similaires. Par exemple, selon l'étude de Noël *et al.* (2005), une association a été observée entre deux espèces de diptères du genre *Cuterebra*

et leur hôte respectif. En effet, *Cuterebra grisea* parasite *P. maniculatus*, tandis que *C. fontinella* parasite *P. leucopus*. Une autre étude a d'ailleurs tenté d'introduire artificiellement des œufs de *C. fontinella* dans des *P. maniculatus* et ceux-ci ne se sont jamais rendus à terme, suggérant ainsi l'association exclusive du parasite et de son hôte (Shiffer 1983). Il est donc possible de prévoir la dispersion de parasites en fonction de celui de leur hôte respectif. Ceci peut être grandement utile, notamment en lutte biologique ou encore en prévention de la propagation de maladies ou d'espèces invasives (Humphrey *et al.* 2010).

1.4.3. La phylogéographie multilocus

John C. Avise a été le premier à décrire l'utilisation du génome mitochondrial dans le cadre d'analyses phylogéographiques en 1987. En effet, l'héritage uniparental (maternel) et la petite taille de ce génome lui confèrent un taux d'évolution relativement rapide. L'absence de recombinaison permet ainsi de conserver les mutations apparues dans chaque lignée, ce qui engendre un taux de polymorphisme convenable pour des analyses phylogénétiques intraspécifiques (phylogéographie). La structure de ce génome circulaire est toutefois fortement conservée à long terme, ce qui permet aussi des comparaisons interspécifiques. Dans le cas de petits mammifères comme des rongeurs, les régions les plus fréquemment utilisées sont celles du cytochrome B, de la cytochrome oxydase III et de la région de contrôle (Riddle *et al.* 2000, Sullivan *et al.* 2000, Zheng *et al.* 2003, Shipp-Pennock *et al.* 2005, Dragoo *et al.* 2006).

Toutefois, il existe certaines critiques soutenant que l'utilisation du génome mitochondrial dans de telles analyses, à cause de son héritage maternel seulement, pourrait ne pas représenter correctement l'histoire des populations (Fouquet *et al.* 2012). Par exemple, si les femelles d'une population A se croisent avec les mâles d'une population B, seul le génome de la population A sera observé au niveau des mitochondries. C'est pourquoi l'utilisation conjointe de marqueurs nucléaires est parfois conseillée en phylogéographie. Cependant, le génome nucléaire a une taille efficace (nombre minimum de reproducteurs nécessaire pour conserver les mêmes fréquences alléliques d'une

génération à l'autre dans une population sous l'influence de la dérive génique) quatre fois plus grande que le génome mitochondrial dû aux recombinaisons. Ce dernier est donc plus lent à accumuler des mutations et risque de montrer moins de variabilité au niveau intraspécifique (Brito & Edward 2008). Il est donc moins approprié pour des études à petites échelles. Les séquences répétées (ex. microsatellites) du génome nucléaire font exception et évoluent bien plus rapidement que les séquences mitochondriales. Ce type de séquence n'est toutefois pas adéquat pour la reproduction de phylogénie. La comparaison d'arbres réalisés à partir de marqueurs mitochondriaux et nucléaires pourrait révéler ce que l'on nomme la discordance cytonucléaire, si les topologies sont significativement différentes. Ce phénomène, observé au niveau des populations, nous permettrait d'observer les effets du flux génique entre les populations dans le cas où, par exemple, seuls les mâles se disperseraient (Yang & Kenagy 2009).

De plus, l'utilisation d'un seul locus pour la construction d'un arbre pourrait conduire à un résultat erroné si la sélection ou le simple hasard l'ont fait évoluer dans un sens particulier, ou si le nombre de mutations accumulé dans les séquences était insuffisant (Templeton 1998). C'est pourquoi l'utilisation de plusieurs loci et la comparaison de plusieurs arbres sont préconisées afin d'obtenir une image plus réaliste de la situation génétique (Templeton 1998). La phylogéographie multilocus peut donc nous permettre de renforcer nos résultats si l'on obtient des structures phylogénétiques semblables pour les différents marqueurs utilisés.

1.4.4. Phylogéographie chez les *Peromyscus*

En général, les études phylogéographiques chez les *Peromyscus* sont réalisées à bien plus grande échelle que celle de notre aire d'étude. Ceci permet de dissocier les grands groupes génétiques distincts d'une espèce, basés sur des événements de vicariance ancestraux. Ces types de divergence s'observent davantage à l'échelle d'un pays ou d'un continent, à l'intérieur desquels nous pouvons voir la marque des différents refuges glaciaires (Tab. 1.1). Une seule séquence mitochondriale est habituellement suffisante pour ce type de recherche. Toutefois, certaines études pour des étendues géographiques un peu

plus restreintes tentent de combiner deux marqueurs mitochondriaux pour déceler davantage de variabilité génétique et augmenter la résolution des analyses (Tab. 1.1).

Tableau 1.1. Résumé des séquences mitochondriales les plus couramment utilisées, de l'échelle géographique et du nombre de clades significatifs obtenus dans quelques études de phylogéographie réalisées chez des espèces de souris du genre *Peromyscus*.

Espèce	Locus utilisé	Taille (pb)	Région géographique	Nbre clades retrouvés	Références
<i>P. leucopus</i>	D-Loop	380	Est - États-Unis	3	Shipp-Pennock <i>et al.</i> (2005)
	D-Loop	650	Est - États-Unis	3	Rowe <i>et al.</i> (2006)
<i>P. eremicus</i>	Cyt b	450	Péninsule Californie, Désert Baja	4	Riddle <i>et al.</i> (2000)
	COIII	699			
<i>P. maniculatus</i>	D-Loop	491	Californie, Orégon, Washington	2	Yang et Kenagy (2009)
	D-Loop	393	Orégon, Washington, Vancouver	2	Zheng <i>et al.</i> (2003)
	Cyt b	479			
	Cyt b	1143	Amérique du Nord	6-10	Dragoo <i>et al.</i> (2006)

1.5. Objectifs et hypothèses du projet

1.5.1. Objectif principal

Le but de l'étude est de construire des arbres phylogéographiques de *Peromyscus leucopus* et *P. maniculatus* à partir de différents haplotypes de séquences mitochondriales. Ces arbres nous permettront d'inférer les relations entre les différentes populations échantillonnées et ainsi déterminer les barrières géographiques et le patron de dispersion des *Peromyscus* dans le sud du Québec. Nous pourrions ainsi prévoir l'expansion possible de la maladie de Lyme par l'étude de ses réservoirs principaux. Ceci pourrait nous permettre de cibler les zones potentielles à risque pour l'établissement de la borréliose de Lyme résultant du réchauffement climatique.

1.5.2. Sous-objectifs

- Comparer les différentes matrices de distances génétiques obtenues pour chacun des marqueurs mitochondriaux, ainsi que les arbres générés à partir de celles-ci, pour voir si elles sont concordantes et produire un arbre de consensus majoritaire.
- Comparer la structure génétique des deux espèces de souris afin de déceler la trace d'une expansion récente par rapport à une population longuement établie, et visualiser les routes d'échange génétique possible.
- Combiner les séquences mitochondriales de *P. leucopus* et *P. maniculatus* avec celles d'études phylogéographiques antérieures (Dragoo *et al.* 2006, Shipp-Pennock *et al.* 2005) afin de vérifier dans quels grands clades d'Amérique du Nord se retrouvent les populations échantillonnées.

1.5.3. Hypothèses

Il est probable que des divergences génétiques soient observées de part et d'autre de barrières géographiques telles des montagnes, des villes ou des rivières. Je pose l'hypothèse que le fleuve Saint-Laurent serait la principale barrière à la dispersion des

Peromyscus au sein de l'aire d'étude. Puisque *P. leucopus* et *P. maniculatus* sont des espèces très semblables morphologiquement et dans leur écologie, il est fort probable que les deux espèces rencontrent les mêmes obstacles à leur dispersion et qu'elles montrent des phylogéographies topologiquement similaires. On s'attend à retrouver des *P. leucopus* particulièrement en Montérégie et en Estrie. S'il est vrai que les *P. leucopus* sont en pleine expansion vers le nord et délogent les *P. maniculatus*, il serait probable que l'on ne retrouve des *P. maniculatus* que dans les sites plus au nord du Centre-du-Québec et sur la rive-nord du fleuve Saint-Laurent.

Il est possible que les différents marqueurs n'affichent pas tous le même niveau de variabilité. Certains risquent donc d'être peu informatifs alors que d'autres pourraient comprendre un grand nombre d'haplotypes uniques. Néanmoins, les divergences génétiques les plus importantes devraient être observées entre les mêmes régions géographiques et un arbre consensus devrait ressembler à un arbre combinant l'information obtenue par tous les marqueurs, mais avec beaucoup plus de polytomies.

Nous formulons aussi l'hypothèse que *P. maniculatus* montrera plus de divergence génétique au niveau de l'aire d'étude que *P. leucopus*. En effet, puisque *P. maniculatus* est installée depuis longtemps au Québec, les différentes populations migrent peu et elles ont eu plus de temps pour accumuler des mutations. D'autre part, *P. leucopus* est en expansion, elle migre très vite et se reproduit aléatoirement. On s'attend donc à retrouver un patron génétique plus structuré chez *P. maniculatus* comparativement à un grand nombre d'haplotypes partagés entre les individus de différents sites sur tout le territoire chez *P. leucopus*.

Finalement, les individus de chaque espèce appartiendront probablement à des clades différents. Les spécimens récoltés sur la rive sud du Saint-Laurent correspondraient au clade de la côte est des États-Unis dans les études de Dragoo *et al.* (2006) chez *P. maniculatus* et de Shipp-Pennock *et al.* (2005) chez *P. leucopus*. Les individus de la rive nord correspondraient plutôt au clade mid-ouest. Les différentes populations de souris migreraient ainsi indépendamment de part et d'autre du fleuve Saint-Laurent.

CHAPITRE 2

COMPARATIVE PHYLOGEOGRAPHY OF THE WHITE FOOTED MOUSE AND THE DEER MOUSE, TWO LYME DISEASE VECTORS IN QUÉBEC

Jessica Fiset, Nathalie Tessier, Virginie Millien and François-Joseph Lapointe (2013)
Comparative phylogeography of the white-footed mouse and the deer mouse, two Lyme
disease reservoir hosts in Québec.

2.1. Résumé

La modification de l'aire de distribution des espèces est l'une des nombreuses conséquences du changement climatique et la cause principale de l'émergence de la maladie de Lyme dans l'Est du Canada au cours de la dernière décennie. Le principal réservoir de la bactérie responsable de cette zoonose (*Borrelia burgdorferi*) est la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) dont la distribution était auparavant limitée au sud du Québec. Dans cette étude, la phylogéographie comparée de *P. leucopus* et *P. maniculatus* a été utilisée pour prédire l'éventuel patron d'expansion de la maladie de Lyme au Québec. L'analyse de plusieurs séquences de l'ADN mitochondrial et des méthodes novatrices en phylogéographie ont révélé la trace d'une expansion récente chez *P. leucopus*, qui semble déloger *P. maniculatus* tout en migrant vers le nord. Des tests statistiques calculés sur des réseaux d'haplotypes, la résolution des arbres et les réseaux de populations ont tous montré que les populations de souris sylvestre (*P. maniculatus*) exposent une forte structure génétique, tandis que la souris à pattes blanches semble partager plusieurs haplotypes et se reproduire de façon aléatoire dans la zone d'étude. En outre, la trace d'une divergence génétique significative entre les populations des deux côtés du fleuve Saint-Laurent montre que deux lignées de *P. leucopus* avec des origines ancestrales différentes migrent en parallèle. Connaissant l'étroite relation coévolutive entre les différentes souches de *Borrelia* et l'immunité spécifique de leurs hôtes réservoirs, nous prévoyons l'apparition de deux lignées distinctes de *Borrelia burgdorferi* dans le sud du Québec.

2.2. Abstract

Modification of a species range is one of many consequences of climate change and the primary cause for the emergence of the Lyme disease during the last decade in eastern Canada. The main reservoir of the bacteria responsible for this zoonosis, *Borrelia burgdorferi*, is the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*), whose range was originally limited to southern Québec. In this study, the comparative phylogeography of *P. leucopus* and *P. maniculatus* was used to predict the possible expansion pattern of the Lyme disease in Québec. The analysis of multiple mitochondrial DNA markers and innovative phylogeographic methods revealed a recent expansion of *P. leucopus*, which seems to dislodge *P. maniculatus* while migrating northwards. Statistical tests calculated on haplotypes networks, tree resolution and populations networks all showed that populations of deer mice (*P. maniculatus*) exhibited more genetic structure than white-footed mice, which seemed to share haplotypes and reproduce randomly across the study area. Furthermore, significant genetic divergence between populations of the two species on both sides of the St. Lawrence River suggests that two lineages of *P. leucopus* and *P. maniculatus* with different ancestral origins migrated in parallel. Knowing the close coevolutionary relationship between different strains of *Borrelia* and the specific immunity of their reservoir hosts, we are expecting the appearance of two distinct lineages of *Borrelia burgdorferi* in southern Québec.

2.3. Introduction

Climate change represents an actual threat that affects the structure and function of ecosystems. In the Northern Hemisphere alone, global average temperature is increasing, winters are shorter, and precipitations more abundant (Houghton *et al.* 2001). These changes may cause range expansion and contraction in species distributions, modifying in turn the composition of terrestrial and aquatic communities (McCarty 2001; Parmesan & Yohe 2003; Root *et al.* 2003; Parmesan 2006). As numerous species reach the northern or southern limit of their geographic distributions around the Great Lakes and St. Lawrence River, southern Québec represents an important transition zone and an ideal location for studying the mechanisms of range shifts (Graham 2004; Myers 2009).

In this paper, we study the range expansion of one species of *Peromyscus* mouse, in the context of the Lyme disease spread in Québec. The white-footed mouse (*P. leucopus*) is known to be the most competent reservoir of *Borrelia burgdorferi*, a spirochete bacterium responsible for this emerging zoonosis (Hanincova *et al.* 2006, Ogden *et al.* 2010). The pathogen is transmitted to humans and other animals through the bite of the blacklegged tick (*Ixodes scapularis*), which is currently expanding northward probably due to global warming (Ogden *et al.* 2008; 2010). An adult tick cannot transmit *Borrelia* to its offspring, however. For a tick to be infected, it must feed on a carrier host i.e., the primary host, *Peromyscus* mice (Hanincova *et al.* 2006). This implies that secondary hosts, such as large mammals, are likely to contract the disease by infected ticks, but not to transmit it to new ones (Steere *et al.* 2004).

The white-footed mouse is an excellent vector for Lyme disease. Unlike other mammals such as dog, deer and human, whose immune system fights it, *P. leucopus* remains an asymptomatic carrier once infected (Hanincova *et al.* 2006). It is the only species that has been able to efficiently transmit (90%) all strains of *Borrelia* to ticks. Yet, the deer mouse (*P. maniculatus*) is equally competent to maintain and transmit *Borrelia* when the white-footed mouse is absent from the region (Rand *et al.* 1993).

The deer mouse and the white-footed mouse are sister species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae), each including several subspecies (McKenna & Bell 1997, Bradley 2007). The fossil record indicates that these two species have diverged approximately 500,000 years ago (Hibbard 1968). The deer mouse is the most widespread species of mouse in North America, whereas the white-footed mouse reaches its northern limit in southern Québec (Hooper 1968, Graham 2004). Recent studies have shown a range extension of 225 km northwards over 15 years for *P. leucopus* in the northeast of the Michigan upper and lower Peninsula (Myers *et al.* 2009), corresponding to an expansion of about 15 km/year. Such rapid expansion was attributed to global warming (Myers *et al.* 2009). The deer mouse is found at much higher latitudes, and has been a resident species, dominating small mammal communities in southern Québec until a few decades ago (Grant 1976). The two mice species are extremely similar, both in ecology and morphology, the main distinctions being tail lengths and colors (Stephen *et al.* 1996). Because these highly variable characters are not reliable to accurately identify the two species, a genetic identification method is needed to tell them apart with certainty (Tessier *et al.* 2004).

Phylogeographic studies allow researchers to retrace past geographical patterns of genetic differentiation among populations. This discipline has proven particularly useful to identify historical vicariance events that have shaped current species distributions (Avice *et al.* 1987, Avice 2000). Namely, previous studies have shown similar trends in the phylogeography of *Peromyscus* mice across North-America. Genetic divergence of the D-Loop (mtDNA control region) revealed different clades of *P. leucopus* originating from different glacial refugia. One of these major clades corresponds to the East Coast of the United States, while another clade is associated with the Upper Midwest (Rowe *et al.* 2006). Similar clades were also obtained by Shipp-Pennock *et al.* (2005) based on different subspecies of *P. leucopus*. Moreover, six clades were identified for *P. maniculatus* across North America using Cytochrome B sequences (Dragoo *et al.* 2006). Here again, one clade is restricted to the East Coast of the United States, while a second one corresponds to the Upper Midwest plus Manitoba, Ontario and Québec.

Here, we propose to apply phylogeographic methods not to assess past vicariance events, but rather to detect genetic signatures caused by a recent range expansion. To do so, we used a combination of multiple mtDNA markers to resolve the phylogeography of *P. leucopus* and *P. maniculatus* in southern Québec, and we compared the two species to detect differences, if any, between observed patterns.

The use of mitochondrial DNA (mtDNA) has long been advocated in phylogeography for its rapid rate of evolution (Avice 1987). However, the use of several markers is strongly recommended, as a specific locus may be subjected to different evolutionary pressures, whether in case of natural selection or simply by stochasticity (Templeton 1998). In most phylogeographic studies of small mammals, the mtDNA markers most frequently used are Cytochrome B (Cyt B), Cytochrome Oxidase III (COIII) and the control region (D-Loop) (Riddle *et al.* 2000; Sullivan *et al.* 2000; Zheng *et al.* 2003; Shipp-Pennock *et al.* 2005; Dragoo *et al.* 2006).

In this paper, we combined these three highly polymorphic mtDNA sequences (Cyt B, COIII and D-Loop) with two others (ATP8 and 16S) in order to get maximum resolution at such a small geographic scale. We applied a range of innovative methods to evaluate: (1) if the different mtDNA markers describe the same phylogeographic pattern, (2) the degree to which the St. Lawrence River is a geographic barrier limiting dispersion of *Peromyscus*, (3) whether the expanding populations of white-footed mice display different genetic patterns than deer mice, which have long been established in Québec, and (4) to which north American clades the populations from Québec are associated with. Our results will allow to better understand the geographic patterns of range expansion of the white-footed mouse in southern Québec, and the associated spread of Lyme disease in the corresponding region.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Sampling

The sampling area was determined to cover the current known distribution of Lyme disease occurrence in Southern Québec, according to ongoing surveillance studies (Ogden *et al.* 2008; Ogden *et al.* 2010; Bouchard *et al.* 2011). It includes the southwest of the Montérégie region (high risk for Lyme disease, Ogden *et al.* 2008), as well as the northeast of the Montérégie and Estrie regions (moderate risk). A few other sites located north and south of the St. Lawrence River were also selected to cover the geographical range of *P. leucopus* in Québec. A total of 27 sites were thus selected, and sampling took place in forest patches during the summer of 2011 (Fig. 2.1). White-footed mice ($n = 94$) and deer mice ($n = 46$) were captured using Sherman live traps (Table 2.1). All specimens were preserved in ethanol 95% until delousing of ticks and tissue sampling for the genetic analyses. They now belong to the collection of the Redpath Museum, McGill University.

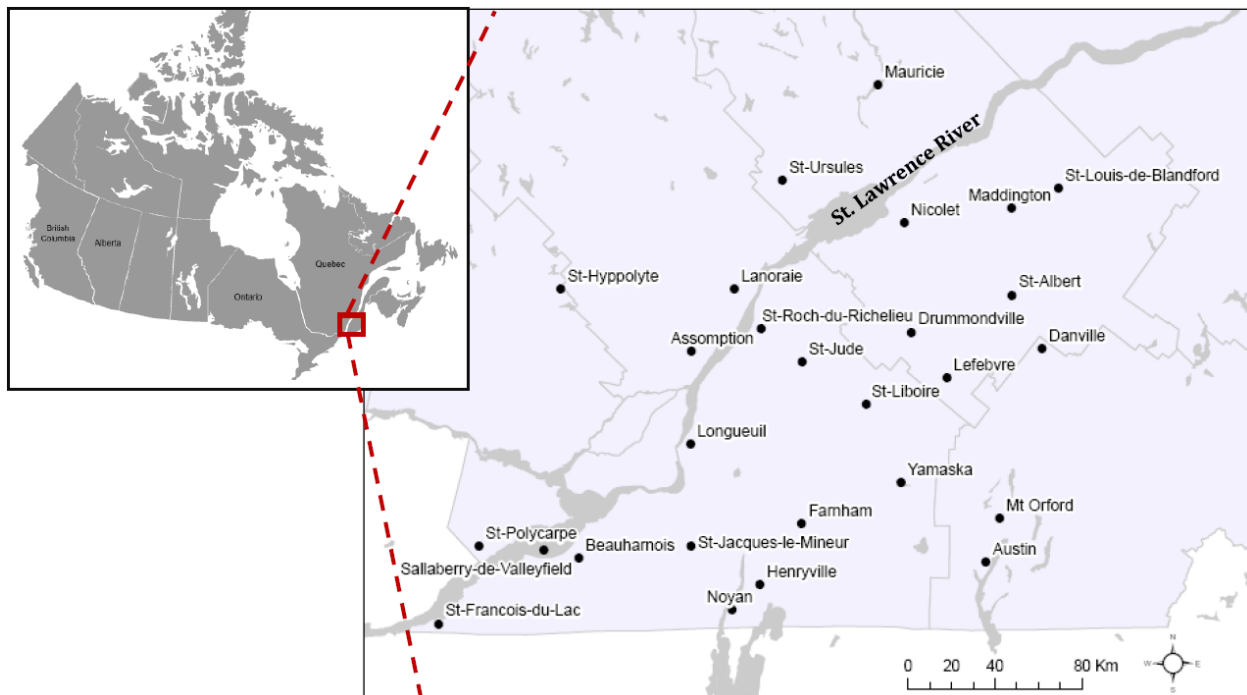


Figure 2.1. Map of Canada showing the location of 26 sites where mice and ticks were sampled during summer 2011 in Southern Québec (inset). The last site (Saguenay) located further north-east is not shown on this map.

Table 2.1. Geographical coordinates of the sampling sites. Numbers of white-footed mice (*P.l.*) and deer mice (*P.m.*) are also provided, along with numbers of ticks, *Ixodes sacpularis* (*I.s.*) found on each species (*P.l./P.m.*) and the numbers of mice infected (*P.l./P.m.*) with *Borrelia* (*B.b.*).

Site	longitude	latitude	<i>P.l.</i>	<i>P.m.</i>	<i>I.s.</i>	<i>B.b.</i>
Austin	-72.25168	45.20179	0	7	5	0
Danville	-72.02049	45.81672	0	1	0	0
Maddington	-72.14747	46.21914	0	3	0	0
Nicolet	-72.58851	46.17904	0	4	0	0
Mont-Orford	-72.21848	45.34632	0	8	0	0
St-Louis	-71.95593	46.27495	0	3	0	0
St-Albert	-72.10688	45.99504	0	2	0	0
Lanoraie	-73.29603	45.99765	0	9	0	0
Yamaska	-72.62501	45.42838	0	7	3	0
St-Hyppolyte	-74.00661	45.98768	0	1	0	0
Mauricie	-72.70098	46.57473	0	1	0	0
Saguenay	-71.06422	48.42602	0	5	0	0
Farnham	-73.01104	45.30114	4	1	62/25	0/1
Henriville	-73.21324	45.11735	6	1	3/1	3/0
Noyan	-73.28694	45.05819	7	0	4	0
Drummondville	-72.55924	45.86583	5	0	2	1/0
Lefebvre	-72.41278	45.73596	2	0	0	0
Longueuil	-73.46506	45.54722	10	0	3	0
St-François	-74.45809	45.03585	7	0	10	2/0
Beauharnois	-73.93092	45.21376	6	0	1	0
St-Jacques	-73.47244	45.24378	2	0	0	0
Sallaberry	-74.07497	45.2357	2	0	3	0
L'Assomption	-73.46648	45.81046	5	0	0	0
St-Jude	-73.01008	45.77930	7	0	0	0
St-Liboire	-72.74502	45.65769	14	0	0	0
St-Polycarpe	-74.39831	45.32790	10	0	0	0
St-Rock	-73.17940	45.87510	4	0	0	0
St-Ursule	-73.09034	46.29875	5	0	0	0

2.4.2. DNA sequences

DNA was extracted from tail tissues using the standard Quick-Lysis protocol (Olsen *et al.* 1996), and all individuals were identified to the corresponding species using species-specific primers in multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Tessier *et al.* 2004). Five mtDNA regions were then amplified with the primers described in Table 2.2. Amplifications were carried out in 50 µl volume including 5 µl of 10x reaction buffer, 4 µl of dNTP solution at 2.5 mM, 20pM of each primers, 1.5 u of Taq DNA polymerase and about 50-300 ng of DNA. The general protocol was 94°C for 1 min, 35 x (94°C for 45 sec, 54°C for 1 min 30 sec, 72°C for 45 sec) and 72°C for 7 min. Samples were sequenced at McGill University Genome Québec Innovation Centre. Sequences were visualised with program 4Peaks 1.7 (Griekspoor & Groothuis 2005) and aligned with program ClustalX 2.1 (Thompson *et al.* 1997). Ambiguous sections at the beginning and the end of each sequence were removed. Although the D-loop and Cyt B regions have been sequenced in two sections, they were combined and aligned together for the analysis. The gaps were also removed as well as repetitions susceptible to be polymerase reaction errors. Fasta folders of the alignments for each genetics marker and species are available as supplementary material on the Molecular Ecology web site.

Table 2.2. Primers for amplifying the five mtDNA regions used in this study.

Region	Name	Strand	Sequences (5'-3')	Reference
Control region (D-Loop)	L15926	Foward	CAATTCCCCGGTCTTGTA AAC C	Kocher <i>et al.</i> 1989
	H16340	Reverse	CCTGAAGTAGGA ACCAGATG	
	DL-PeroF	Foward	GTCTAATCAGCCCATGACCA	This study
	DL-PeroR	Reverse	AGCATTTTCAGTGCTTTGCT	
Cytochrome B	L14841	Foward	CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAA	Kocher <i>et al.</i> 1989
	H15149	Reverse	CCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA	
	L14553	Foward	CTACCATGAGGACAAAATATC	Sullivan <i>et al.</i> 1997
	MOUSE-TR	Reverse	TTCCATTTYTGTTTACAAGACCA	Wade 1999
ATP8	AP8-1F	Foward	GCATTAACCTTTTAAAGTTAAAAG	Johnson <i>et al.</i> 1998
	AP8-2R	Reverse	GGCGAATAGATTTTCGTTCA	
16S	16S-1F	Foward	GTGCAAAGGTAGCATAATCA	Johnson <i>et al.</i> 1998
	16S-4R	Reverse	TGTCCTGATCCAACATGAG	
COIII	L8618	Foward	TACGTATTCCACCTTCTAGTAAGCCT	Riddle 1995
	H9323	Reverse	ACTACGTCTACGAAATGTCAGTATCA	

2.4.3. Phylogeography

Phylogeographic trees were constructed separately for each species and all five mtDNA markers with the 'ape' package (Paradis *et al.* 2004) in R 2.13 (R Development Core Team 2011) using the neighbor-joining (NJ) algorithm (Saitou & Nei 1987) applied to pairwise genetic distances among individuals (function *nj*), corrected with the K2P model (Kimura 1980) for unequal base frequencies (Felsenstein & Churchill 1996). The optimal substitution model was determined with program ModelTest (Posada & Crandall 1998). For better visualization, the trees were artificially rooted on the longest branch (midpoint rooting, Farris 1972) with the R package 'phangorn' (Schliep 2011), and a majority-rule consensus was computed (function *consensus*) to identify the clades identical in most trees. The robustness of independent trees was assessed with bootstrap values (Efron & Tibshirani 1993) computed from 100 replicates, and tree resolution was measured by counting the ratio of non-zero length branches over the total number of branches. A test of congruence among distance matrix (CADM) (Legendre & Lapointe 2004, Campbell *et al.* 2011) allowed to compare the markers with one another to determine whether they identified congruent phylogeographic patterns (function *CADM.global*). A posteriori comparisons by Mantel tests (Mantel 1967) revealed further differences between pairs of markers, if any (function *CADM.post*). Based on the results of these tests, a combined analysis including all five markers was performed using the same methods as those used for the separate analyses.

Haplotype networks were then constructed with program Haplotype Viewer (Salzburger *et al.* 2011). Unlike a phylogeographic tree which links individuals, a haplotype network links genetic sequences, thus merging all unique haplotypes at a single node. Clanistic analysis was used to evaluate the clans and slices purity (Lapointe *et al.* 2010), where clans are groups obtained by cutting a single branch (bipartition), and slices are groups obtained by cutting two branches (tripartition) in an unrooted network. Clan (and slice) purity was computed by counting the number of haplotypes from each sampling site in a group divided by the size of this group (a value of one indicating that a given clan – or slice – contains only haplotypes for a single locality). Clan (and slice) diameter was also computed

as the maximum distance (number of mutations) between two haplotypes from the same locality in a group; this value was standardized by the total diameter of the network for comparison purposes. All clanistic variables were compared with a Student t-test to identify significant differences in the corresponding haplotype networks for the two mouse species.

To further detect species differences in the geographical patterns of genetic variability, population networks were computed among localities (nodes in the graph) by considering only shared haplotypes (see Dyer & Nason 2004). Namely, two populations (sites) are connected by an edge in the network only when they have at least one haplotype in common. To account for unequal sampling sizes, the connection probability was estimated with a resampling method for which a single haplotype per site was randomly prior to constructing the network. This process was repeated 1000 times to derive pairwise connection probabilities among sites, for each species and each marker. Two indices were used to compare these population networks: the graph density (the number of connections in the graph relative to the number of possible connections), and the node degree distributions (where the degree of a node is the number of edges connected to that node). These indices were compared using Student t-tests and non-parametric Mann Whitney tests, respectively.

To determine phylogeographic clades corresponding to past vicariance events, the D-loop sequences of the 94 white-footed mice included in the present study were combined with all sequences listed in Shipp-Pennock *et al.* (2005), whereas the 46 deer mice Cyt B sequences were combined with those listed in Dragoo *et al.* (2006). In each case, the combined dataset was trimmed to compare sequences of equal lengths. Phylogeographic trees at larger geographical scales were then estimated using the same method described above to identify the positions of our mice with respect to larger clades.

2.5. Results

2.5.1. Markers comparison

Except the 16S region, which is the least polymorphic in this study, all markers seem to exhibit a similar level of polymorphism (Table 2.3). Although they display different numbers of haplotypes depending on the species, the D-Loop is the only one who seems to show the same level of variability for both species. Only two major clades are well-supported (BS > 95%) in all trees. Indeed, for both species, the specimens sampled from the north shore (NS) appear to be significantly divergent from those sampled on the south shore (SS) of the St. Lawrence River (Fig. 2.2). Accordingly, the majority consensus of all five trees for each species (not shown) only contained two clades, corresponding to the north and south shores. The only exception is the two clades found in the D-loop sequence of the *P. maniculatus* from the north shore, which diverged for one more mutation than the NS and SS clades, thus modifying the position of the root in the tree. The test of congruence among distance matrix (CADM) showed that all markers were globally congruent, but pairwise comparisons identified differences between ATP8 and 16S in *P. maniculatus*. This result is echoed by incongruent haplotype networks of the corresponding markers, with north shore being included in the South Shore for the 16S (Fig. 2.3).

Table 2.3. Sequence lengths (pb), numbers of haplotypes, variable sites, informative sites and private haplotypes for each mitochondrial marker used in this study for *P. leucopus* and *P. maniculatus*.

Region	Specie	Length (pb)	Nb. haplotypes	Private haplotypes	Variable sites	Informative sites
D-Loop	<i>P. maniculatus</i>	842	36	28	49 (5.8%)	34 (4%)
	<i>P. leucopus</i>	839	21	11	45 (5.4%)	42 (5%)
Cyt B	<i>P. maniculatus</i>	990	27	18	50 (5%)	32 (3.2%)
	<i>P. leucopus</i>	990	12	3	13 (1.3%)	13 (1.3%)
ATP8	<i>P. maniculatus</i>	158	7	3	9 (5.7%)	7 (4.4%)
	<i>P. leucopus</i>	158	7	2	7 (4.4%)	5 (3.2%)
16S	<i>P. maniculatus</i>	310	10	5	8 (2.6%)	3 (1%)
	<i>P. leucopus</i>	309	5	1	4 (1.3%)	3 (1%)
COIII	<i>P. maniculatus</i>	674	26	16	40 (5.9%)	29 (4.3%)
	<i>P. leucopus</i>	626	11	4	20 (3.2%)	15 (2.4%)

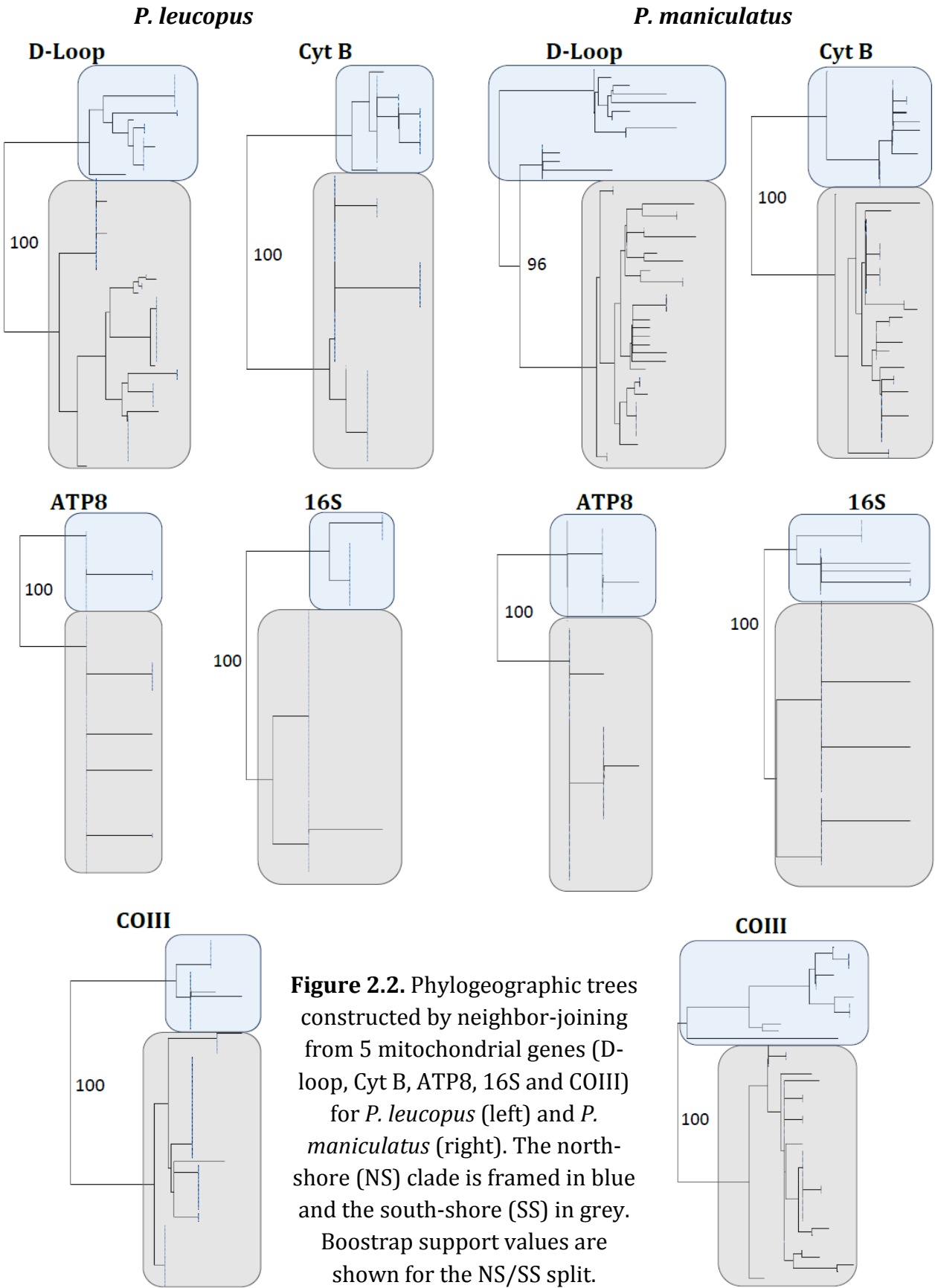
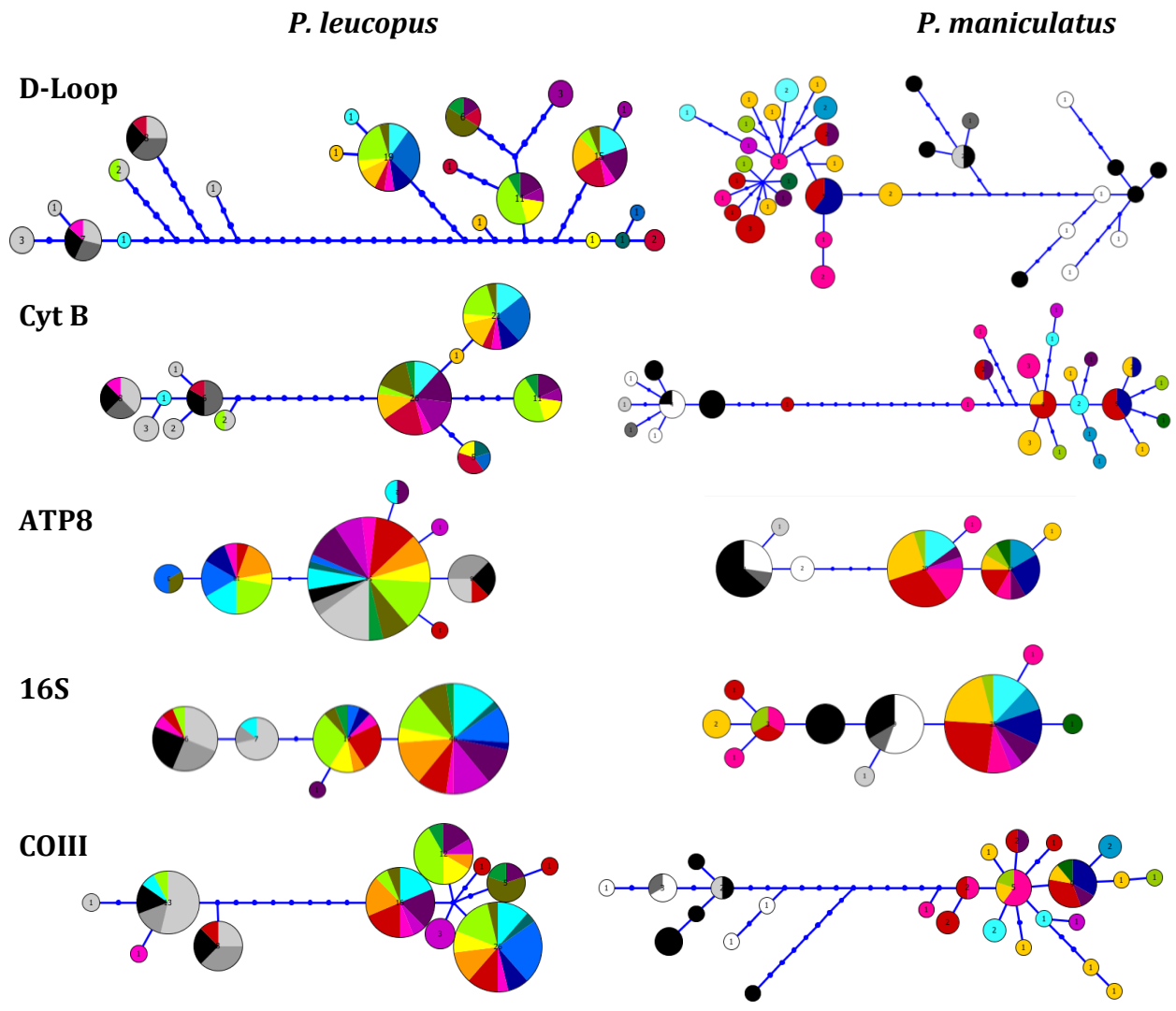


Figure 2.2. Phylogeographic trees constructed by neighbor-joining from 5 mitochondrial genes (D-loop, Cyt B, ATP8, 16S and COIII) for *P. leucopus* (left) and *P. maniculatus* (right). The north-shore (NS) clade is framed in blue and the south-shore (SS) in grey. Bootstrap support values are shown for the NS/SS split.



Legend
P. leucopus

St-Polycarpe	Grey
L'Assomption	Black
St-Ursule	Black
St-Francois	Cyan
Sallaberry	Teal
Beauharnois	Blue
St-Jacques	Dark Blue
Noyan	Purple
Henriville	Magenta
Farnham	Pink
Longueuil	Red
St-Jude	Orange
St-Roch	Yellow
St-Liboire	Light Green
Drummond	Brown
Lefebvre	Dark Green

Figure 2.3. Haplotype network estimated from 5 mitochondrial genes, for *P. leucopus* (left) and *P. maniculatus* (right). The different colors represent the sampling localities. North shore sites are on a grey-scale while south shore sites are in color.

Legend
P. maniculatus

Saguenay	Grey
Mauricie	Black
Lanoraie	Black
St-Hyppolyte	Grey
Nicolet	Cyan
Maddington	Blue
St-Louis	Dark Blue
St-Albert	Purple
Danville	Magenta
Yamaska	Pink
Mont-Orford	Red
Austin	Orange
Farnham	Light Green
Henriville	Dark Green

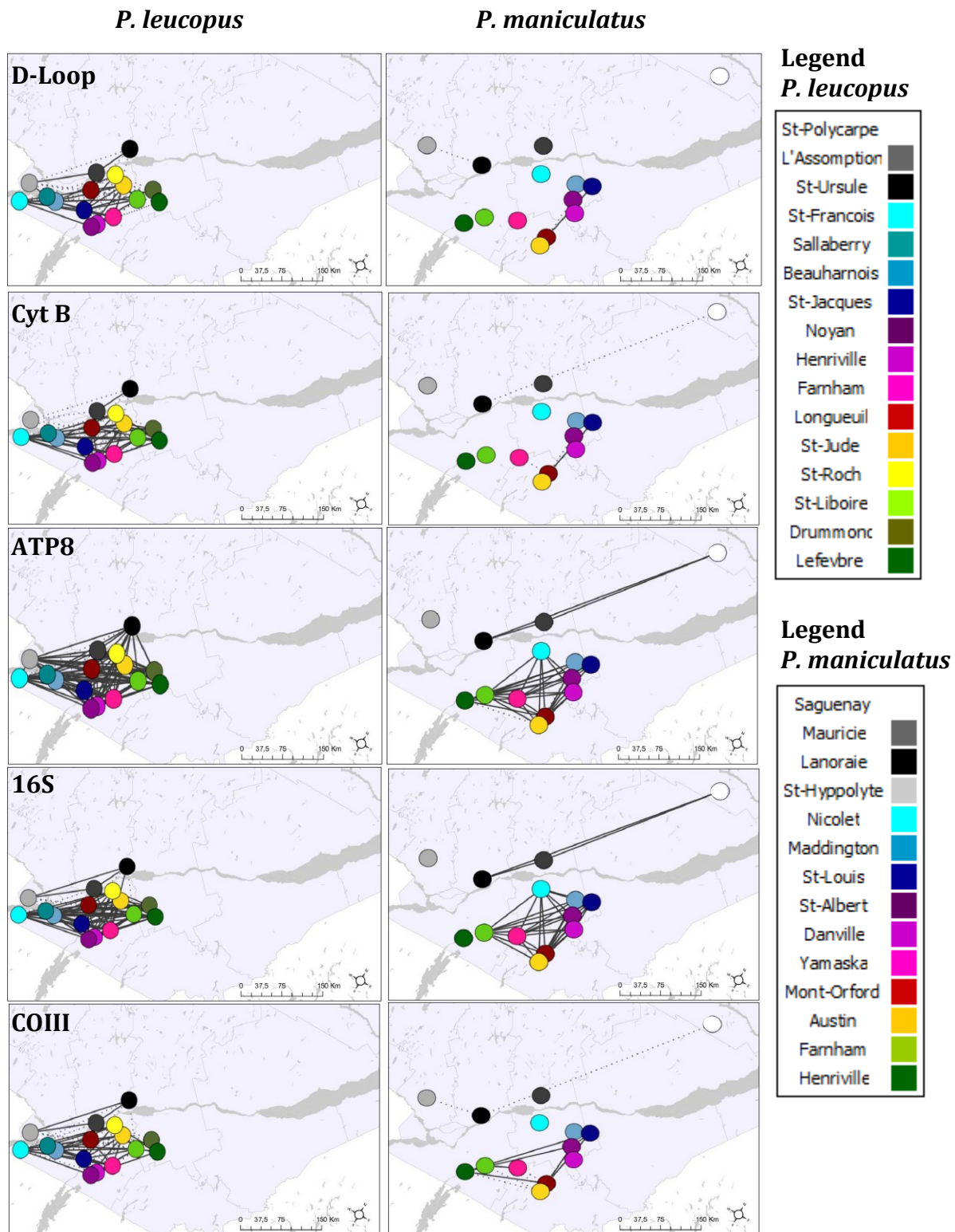
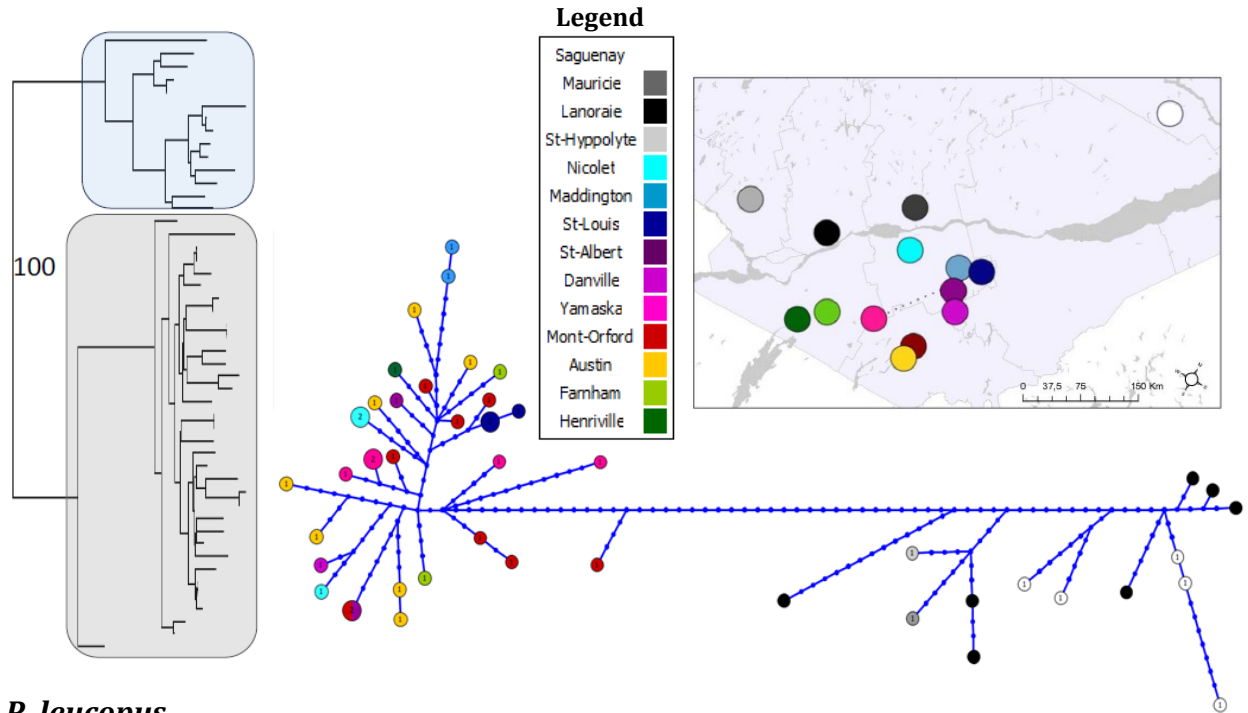


Figure 2.4. Population networks constructed from 5 mitochondrial genes for *P. leucopus* (left) and *P. maniculatus* (right). Dotted lines correspond to connection probabilities lower than 0.2 while solid lines represent connection probabilities of 0.2 and higher. The different colors represent the sampling localities.

P. maniculatus



P. leucopus

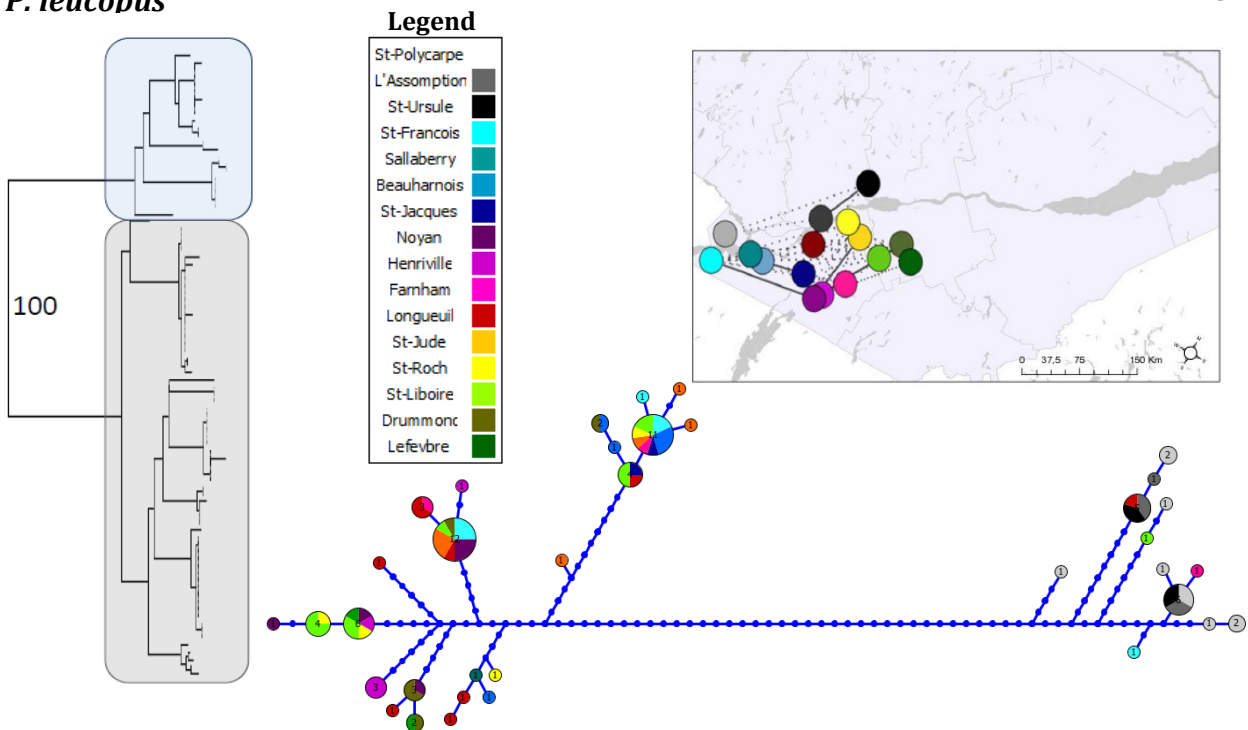


Figure 2.5. Phylogeographic trees estimated by neighbor-joining from the combined sequences of 5 mtDNA regions with corresponding haplotype networks and population networks. The north-shore clades are framed in blue and the south-shore clades in grey. Bootstrap support values are only shown for the first split. The colors in the networks correspond to different localities where deer mice (top panel) and white-footed mice (bottom panel) have been sampled.

2.5.2. Species comparison

Despite its smaller sample size, *P. maniculatus* exhibited more haplotypes than *P. leucopus* for most of the mtDNA markers (Table 2.3). This is particularly striking in the Cyt B and the COIII, which displayed much less variability in white-footed mice than the deer mice. The number of private haplotypes was also higher for *P. maniculatus* than for *P. leucopus* for all markers. Moreover, haplotypes seem to be more closely related in white-footed mice, with corresponding trees being more resolved in *P. maniculatus* than in *P. leucopus* ($t = 4.53$, $p = 0.01$, Fig. 2.2, 2.6).

The structure observed in the haplotypes networks indicated that *P. leucopus* maintains a number of shared haplotypes with all markers combined (Fig. 2.5). However, *P. maniculatus* appeared much more divergent, for each marker separately (Fig. 2.3) as well as for all markers combined (Fig. 2.5). The clanistic analysis on haplotype networks showed that the group diameters corresponding to each site were on average significantly larger in *P. leucopus* than in *P. maniculatus* ($t = 2.51$, $p = 0.021$, Fig. 2.7). Likewise, the groups including haplotypes for each site were the purest in *P. maniculatus*, showing that haplotypes were shared among a larger number of sites in *P. leucopus*. This result was significant for slices ($t = 2.53$, $p = 0.032$, Fig. 2.7), but not for clans ($t = 2.15$, $p = 0.060$).

In addition, *P. leucopus* displayed a higher graph density in the population network than *P. maniculatus* ($t = 11.39$, $p < 0.0001$, Fig. 2.4, 2.8). *P. leucopus* exhibited more nodes with a high degree (larger than 3), while *P. maniculatus* displayed nodes with very few or no connections ($\tau = 0.557$, $p = 0.001$, Fig. 2.9).

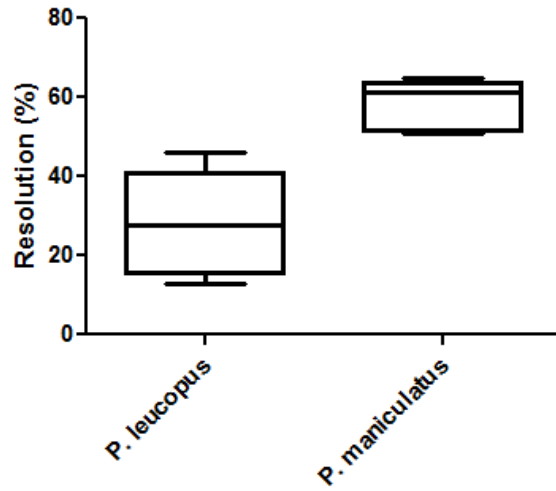


Figure 2.6. Average topological resolution of the five phylogeographic trees (Fig. 2.2) for *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*.

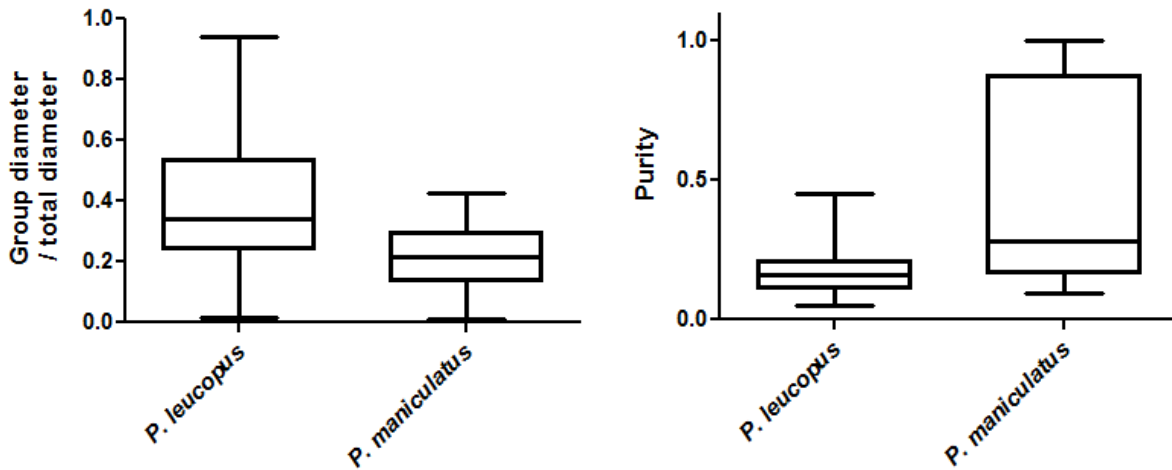


Figure 2.7. Average group diameter (left) and group purity (right) of each site for *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*. These values were computed from the corresponding haplotype networks (Fig. 2.5).

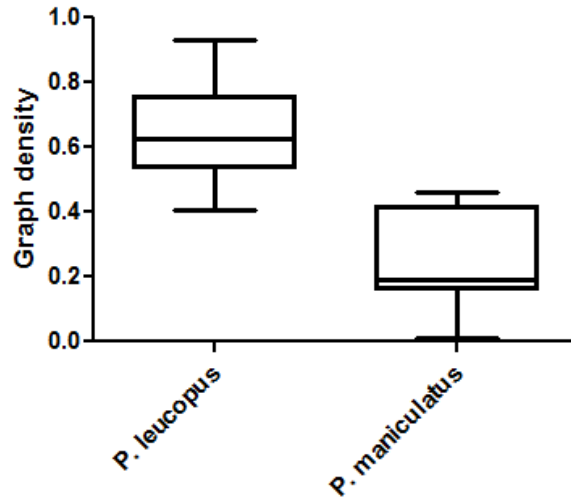


Figure 2.8. Average graph density (for the five markers) in the population networks (Fig. 2.4) for *P. leucopus* and *P. maniculatus*.

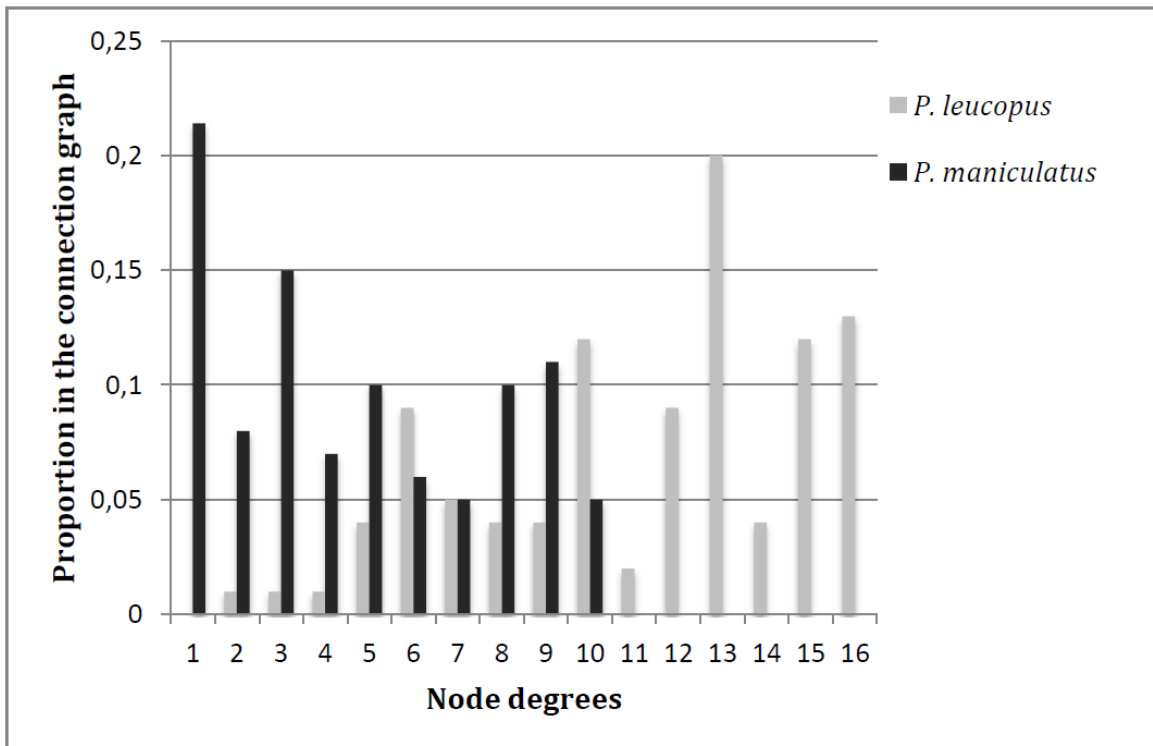


Figure 2.9. Average node degree distribution (for the five markers) in the population networks (Fig. 2.4) for *P. leucopus* and *P. maniculatus*.

2.5.3. Ancestral divergence

The same six clades were recovered as in Dragoo *et al.* (2005) when we combined our 46 Cyt B sequences for *P. maniculatus*. All individuals sampled from the south shore of the St. Lawrence River fell in the East Coast clade of Dragoo *et al.* (2005), while individuals sampled from the north shore were included in the clade originating from the Midwest and Eastern Canada (results not shown).

The same pattern was found when combining our 94 *P. leucopus* D-loop sequences with those in Shipp-Penock *et al.* (2006). White-footed mice sampled from the north shore of the St. Lawrence were included in the clade corresponding to the Midwest, whereas those sampled from the south shore corresponded to the East Coast clade (results not shown). These different clades are identified as different subspecies in Shipp-Penock *et al.* (2006).

2.6. Discussion

2.6.1. Congruent phylogeographic patterns

In this comparative analysis of phylogeographic patterns, we found that the five mtDNA markers we used were congruent, and can thus be used to distinguish mice sampled on the south shore of the St. Lawrence from those sampled on the north shore, in both species. Besides this clear separation, no obvious spatial structure, relative to the geographic distance for instance, was found. Individuals from the same site were seldom grouped together, but even less in *P. leucopus* than in *P. maniculatus*. Population structure was a little more resolved for the D-Loop, Cyt B, and COIII sequences, and this improves when all markers were combined in a single analysis (Fig. 2.5). The 16S and the ATP8 (due to its very small length) did not increase the phylogeographic signal, but nevertheless contributed to reinforce our hypothesis that the St. Lawrence River is a major geographical barrier to the dispersal of *Peromyscus* mice.

Previous phylogeographic studies found that different mtDNA sequences may not reflect precisely the coalescent histories by exhibiting varying degrees of ancestral polymorphism (Fouquet *et al.* 2012), thus supporting the necessity to use more than one marker. Here we found that the variability of the COIII marker was similar to that of another phylogeographic study on *Peromyscus* mice in Québec (Noël *et al.* 2005). Yet, the variability observed by Riddle *et al.* (2000) for Cyt B and COIII in *P. eremicus* was about ten times larger than ours, but at much larger geographical scale. Likewise, Shipp-Pennock *et al.* (2005) obtained for *P. leucopus* sequences twice as variable as ours for the D-loop in a study that included specimens sampled throughout the eastern United States and Canada. With respect to the numbers of haplotypes, Rowe *et al.* (2006) have identified approximately ten times more than we did using the D-Loop in *P. leucopus*. However, we found proportionally more haplotypes than Dragoo *et al.* (2006), based on Cyt B sequences of *P. maniculatus*. These different results illustrate the benefits of using multiple markers at smaller geographical scale, but also show that different mtDNA regions may behave differently in different species.

2.6.2. Expansion signature

We successfully detected the recent expansion of white-footed mice populations that displayed a significantly dissimilar genetic pattern to deer mice, which have long been established in Québec. Most our analyses clearly showed that *P. maniculatus* was more structured across the sampling area than *P. leucopus*. Namely, haplotypes from the same site tended to be more clustered with respect to localities in deer mice populations, than they were in white-footed mice populations. Also, most haplotypes defined by the combination of all markers are unique in *P. maniculatus*, while *P. leucopus* continues to exhibit large numbers of shared haplotypes between sites. Shared haplotypes are generally considered as ancestral retention and provide evidence for continuous migration between populations (Avice 1987; Ditchfield 2000).

The population network analyses also showed that *P. leucopus* has widespread haplotypes without barriers other than the St. Lawrence River, whereas *P. maniculatus* only shares a few haplotypes between sites. These results are consistent with a recent northern expansion of white-footed mice, as confirmed by Myers (2009) in Michigan. Other studies comparing such phylogeographic patterns for sympatric species associated genetic homogeneity throughout the sampling area to a recent expansion during favorable climatic conditions (Fouquet *et al.* 2012). Thus, the low genetic diversity in white-footed mice is consistent with a recent colonisation and a high migration rate (Polihronakis & Caterino 2010). On the other hand, the high diversity of closely related haplotypes with no clear geographic structure and the lack of apparent gene flow in deer mice suggest that these populations have inhabited the region for a relatively long time (Polihronakis & Caterino 2010). This phylogeographic pattern suggests that *P. maniculatus* only reproduce within established populations and that gene flow is limited. It can also be that interspecific competition of *Peromyscus* is driving the phylogeographic structures (Wolff 1996) and that the deer mice are excluded from territory where the white-footed mice establish.

Some studies have shown that mtDNA markers may be biased, for instance in the presence of differential male/female dispersion rate. In such cases, it is suggested to combine mtDNA regions with nuclear markers. Authors have shown, however, that using several mtDNA markers improves the detection of significant phylogeographic signals, and that they display patterns congruent with those found using nuclear markers (Bell *et al.* 2012, Fouquet *et al.* 2012). In the present study, all five markers undoubtedly support the ancestral divergence of mice populations located on the north and south shores of the St. Lawrence River. Interspecific comparisons further revealed statistical differences in the genetic patterns observed between species. Deer mice populations appear to be more structured, more diversified and more ancient than the corresponding white-footed mice populations sampled in the same area. This result, consistent with the hypothesis of a range expansion in *P. leucopus*, has important implications for the spread of Lyme disease in southern Québec. Indeed, we expect a spread of *Borrelia* with the expansion of its main reservoir host in Québec, the white footed mouse.

2.6.3. Ancestral divergence

When the sequences of the two mice species sampled in southern Québec were combined with those obtained in previous studies across North America, we found that mice from different shores of the St. Lawrence River belonged to different ancestral clades, in both species. Mice from the north shore originate from a Midwestern clade, while mice from the South shore originate from the East Coast clade. Previous studies have also shown that these clades represent different glacial refugia, which implies that they diverged at about 21,000 BP and have since then been expanding independently (Rowe *et al.* 2006). The St. Lawrence River appears to be a geographic barrier sufficiently important to maintain the original separation between these two clades. But this river will not limit the expansion of *P. leucopus* into southern Québec. On the contrary, this may foster the preservation of two distinct lineages of *P. leucopus* in Québec, and possibly different strains of *Borrelia*.

A phylogeographic pattern similar to that observed for the mice was found in *Borrelia burgdorferi* across United States. Two major lineages of *Borrelia* (Midwest and North-East) have diverged since the Late Glacial Maximum, with the collapse of vector mice populations (Margos *et al.* 2012). These lineages possess different forms of the OspC protein, an antigen against which mammals can develop immunity (Barbour & Travinsky 2010). Experimental studies have shown that mice immunity to *Borrelia* is strain specific (Schwan *et al.* 1989). Since different lineages of *Borrelia* geographically correspond to different clades of *P. leucopus* in the United States, we can hypothesize that the two different clades of *P. leucopus* in Québec will each carry their own lines of the bacteria. This could have medicinal importance because we already know that the *Borrelia burgdorferi* subspecies in Europe manifest different clinical symptoms and responses to diagnosis (Stanek & Strle 2009).

2.7. Conclusion

Our analyses revealed that a combination of markers and the application of graph-theoretical methods in comparative phylogeography allow detecting signatures of a recent expansion, even at a small geographical scale. We have successfully shown that populations of *Peromyscus leucopus* are expanding in southern Québec. While the St. Lawrence River represents a major effective barrier to the dispersion of *Peromyscus*, it will not limit the establishment of the white-footed mouse in Québec. We are actually witnessing the migration of two distinct lines of *P. leucopus* on either side of the river. Given the known coevolution between different strains of *Borrelia* and the immune system of the host reservoir, we expect that two strains of *Borrelia burgdorferi*, which diverged since the late glacial maximum, will prevail in Québec and that these strains will keep on spreading with the steady range expansion of white-footed mice. The existence of different virulence levels associated with different strains of *Borrelia* and distinct clades of white-footed mouse has significant implications for the monitoring of the emergence of Lyme disease, and the design of efficient strategies to limit the impact of this zoonosis on human populations.

2.8. Acknowledgements

We thank A. Bruneau, B. Angers, P. Legendre and C. Favret from the Université de Montréal for their advices and critical comment; C. Bouchard, É. Roy Dufresne and D. Suter for field work assistance; É. Roy-Dufresne for maps conception; M. LeCam for programming help, T. Bermingham for the Bootstrap function; the INSPQ and the many landowners who allowed sample collection. This work was supported in part by NSERC grant OGP0155251, the Québec Government (Fonds Vert, PACC26 - Ouranos) and Québec Center for Biodiversity Science (QCBS). We also acknowledge the staff at McGill University and Génome Québec for technical assistance with sequencing. All field sampling protocols were approved by the Québec government (SEG permit #2011051501400SF), McGill University Animal Care Committee (AUP#5420) and the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal (#11-054).

CHAPITRE 3

CONCLUSION

3.1. Structure génétique

Le but de ce projet était d'évaluer la propagation d'une zoonose en émergence au Québec, la maladie de Lyme, en conséquence du réchauffement climatique. Pour ce faire, nous avons analysé la structure phylogéographique de son réservoir principal, la souris à pattes blanches, qui est actuellement en expansion dans le sud du Québec. La phylogéographie de la souris à pattes blanches a été comparée à celle de son espèce sœur, abondamment répandue au Québec, soit la souris sylvestre. Des méthodes d'analyses novatrices basées sur des arbres phylogénétiques ainsi que sur des réseaux d'haplotypes et de populations ont été effectuées. Une série de séquences mitochondriales ont été utilisées afin d'aller chercher autant de variabilité génétique que possible et de déceler une structure génétique à petite échelle.

Tous les marqueurs se sont révélés efficaces pour détecter la trace d'une divergence ancestrale de part et d'autre du fleuve Saint-Laurent. Toutefois, aucun patron géographique plus fin n'a été décelé. La seule structure observable est la divergence entre les haplotypes d'un site à l'autre, plus ou moins importante selon la séquence mitochondriale et l'espèce. Des analyses statistiques sur les réseaux d'haplotypes, le degré de résolution des arbres et les connexions entre les populations ont permis de comparer la structure phylogéographique entre la souris à pattes blanches et la souris sylvestre. Les résultats montrent que *P. leucopus* affiche significativement plus d'haplotypes partagés sur toute l'aire d'étude. Par conséquent, beaucoup plus de connexions entre les sites sont observées et les arbres sont moins bien résolus. Une telle homogénéité génétique peut être associée à une expansion récente dans la région, due, par exemple, à des conditions climatiques favorables (Fouquet *et al.* 2012). Le haut taux de migration entre les sites est aussi concordant avec cette hypothèse (Polihronakis & Caterino 2010). Au contraire, la présence d'une grande diversité d'haplotypes étroitement apparentés, mais sans cohérence géographique apparente, aurait été compatible avec des populations établies depuis longtemps et montrant peu de flux génique entre les sites (Polihronakis & Caterino 2010). C'est ce que l'on observe chez *P. maniculatus*. On voit donc comment des méthodes originales en phylogéographie ont permis de déceler des différences significatives entre

deux espèces, confirmant ainsi la trace d'une expansion récente, et ce, malgré l'échelle géographique très limitée de l'aire d'étude.

3.2. Implications pour *Borrelia*

En ce qui concerne l'expansion de *Borrelia* au Québec, nous avons déterminé que deux clades de souris à pattes blanches, ayant des origines postglaciaires différentes, sont en train de coloniser le Québec. Des études antérieures à l'échelle des États-Unis ont retrouvé des clades géographiquement correspondants pour *Borrelia burgdorferi* et *Peromyscus leucopus* (Margos *et al.* 2012, Rowe *et al.* 2006). Ces différentes lignées de *Borrelia* possèdent des protéines OspC différentes, pour lesquelles les mammifères peuvent développer une immunité spécifique (Barbour & Travinsky, 2010). Le système immunitaire des souris exposées à une nouvelle souche de *Borrelia* aura tendance à réagir plus fortement (Schwan *et al.* 1989). La coévolution entre le pathogène et son hôte réservoir est donc bien connue. Nous soupçonnons donc fortement l'apparition éventuelle de deux lignées de *Borrelia* au Québec suivant les lignées de *P. leucopus* réservoir. Ceci a d'importantes implications en médecine puisqu'il est possible que ces lignées manifestent des signes cliniques différents ou ne répondent pas pareillement aux tests diagnostiques (Stanek & Strle 2009). Afin de vérifier cette hypothèse, une étude phylogéographique future devrait être réalisée sur *Borrelia* au Québec et superposée à celle de la souris à pattes blanches pour voir si les patrons spatiaux correspondent.

RÉFÉRENCES

Avice J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts

Avice J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, and N.C. Saunders (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual review of evolution and systematics*, 18: 489-522

Arbogast B. and G.J. Kenagy (2001) Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819-825

Barbour A.G. and B. Travinsky (2010) Evolution and distribution of the *ospC* Gene, a transferable serotype determinant of *Borrelia burgdorferi*. *mBio* 1: e00153-10

Bell R.C., J.B. MacKenzie, M.J. Hickerson, K.L. Chavarria, M. Cunningham, S. Williams and C. Mortiz (2012) Comparative multi-locus phylogeography confirms multiple vicariance events in co-distributed rainforest frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 991-999

Brito P.H. and S.V. Edwards (2008) Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135: 439-455

Bermingham E. and C. Moritz (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7: 367-369

Bouchard C., G. Beauchamps, S. Nguon, L. Trudel, F. Milord, L.R. Lindsay, D. Bélanger and N.H. Ogden (2011) Associations between *Ixodes scapularis* ticks and small mammal host in a newly endemic zone in southeastern Canada: implications for *Borrelia burgdorferi* transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2: 183-190

Bowman D.D. (2005) *Georgis' parasitology for veterinarians. Ninth edition*, Saunders Elsevier, Missouri

Bradley R.D., N.D. Durish, D.S. Rogers, J.R. Miller, M.D. Engstrom and C.W. Kilpatrick (2007) Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: Evidence from mitochondrial Cytochrome-*b* sequences. *Journal of Mammalogy*, 88: 1146-1159

Brownstein J.S., T.R. Holford and D. Fish (2005) Effect of climate change on Lyme disease risk in North America. *Ecohealth*, 2: 38-46

Brunsfeld S.J., J. Sullivan, D.E. Soltis, and P.S. Soltis (2001) Comparative phylogeography of north-western North America: a synthesis. Pages 319-339, in (J. Silvertown and J. Antonovics, eds.) *Integrating ecology and evolution in a spatial context*, Blackwell Science, Oxford

Bunnell J.E., S.D. Price, A. Das, T.M. Shields and G.E. Glass (2003) Geographic information systems and spatial analysis of adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in the middle Atlantic region of the U.S.A. *Journal of Medical Entomology*, 40: 570-576

Campbell V., P. Legendre, F.-J. Lapointe (2011) The performance of the Congruence Among Distance Matrices (CADM) test in phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*. 11:64

Carroll J.F. and E.T. Schmidtman (1992) Tick sweep: modification of the tick drag- method. *Journal of Medical Entomology*, 29: 352-355

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA (dernière mise-à-jour : 23 août 2011) <http://www.cdc.gov/ticks>

Choate J.R. (1973) Identification and recent distribution of white-footed mice (*Peromyscus*) in New England. *Journal of Mammalogy*, 54: 41-49

Ditchfield A.D. (2000) The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals, *Molecular Ecology*, 9: 1307-1318

Dragoo J.W., J.A. Lackey, K.E. Moore, E.P. Lessa, J.A. Cook and T.L. Yates (2006) Phylogeography of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) provides a predictive framework for research on hantavirus. *Journal of General Virology*, 87: 1997-2003

Dyer R.J. and J.D. Nason (2004). Population graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology*, 13: 1713-1727

Efron B. and R.J. Tibshirani (1993) *An Introduction to the Bootstrap*. Chapman & Hall, New York

Farris J.M. (1970) Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology*, 19: 83-92

Felsenstein J. and G.A. Churchill (1996) A Hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 93–104

Fouquet A., B.P. Noonan, M.T. Rodrigues, N. Pech, A. Gilles and N.J. Gemmell (2012) Multiple quaternary refugia in the eastern Guiana shield revealed by comparative phylogeography of 12 frog species. *Systematic Biology*, 61: 461-489

Graham W.R. (2004) FAUNMAP: an electronic database documenting late Quaternary distribution of mammal species. Available from Illinois State Museum online at <http://www.museum.state.il.us/research/faunmap/>.

Grant P.R. (1976) An 11-year study of small mammal populations at Mont St. Hilaire, Quebec. *Canadian Journal of Zoology*, 54: 2156-2173

Griekspoor A. and T. Groothuis (2005) 4peaks: a program that helps molecular biologists to visualize and edit their DNA sequence files. <http://mekentosj.com/4peaks/>

Hanincova K., K. Kurtenbach, M. Diuk-Wasser, B. Brei and D. Fish (2006) Epidemic spread of Lyme Borreliosis, Northeastern United States. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 604-611

Health Canada (1991) Consensus conference on Lyme disease. *Canada Diseases Weekly report*, 17-13: 63-70

Hibbard C.W. (1968) Paleontology. In: *Biology of Peromyscus (Rodentia)*, (J. A. King, ed.), pp. 6-26, Special Publication no. 2, American Society of Mammalogists

Hooper E.T. (1968) Classification. In: *Biology of Peromyscus (Rodentia)*, (J. A. King, ed.), pp. 27-74, Special Publication no. 2, American Society of Mammalogists

Houghton J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell and C.A. Johnson (2001) *Climate change 2001, IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) third assessment report*, Cambridge University press, New York

Humphrey P.T., D.A. Caporale and D. Brisson (2010) Uncoordinated phylogeography of *Borrelia burgdorferi* and its tick vector, *Ixodes scapularis*. *Evolution*, 64: 2653-2663

Johnson W., M. Culver, J.A. Iriarte, E. Eizirik, K.L. Seymour and S.J. O'Brien (1998) Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *Journal of Heredity*, 89: 227-232

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120

Kocher T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo and F.X. Villablanca (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6196-6200

Lackey J.A. (1978) Reproduction, growth, and development in high-latitude and low-latitude populations of *Peromyscus leucopus* (Rodentia). *Journal of Mammalogy*, 59: 69-83

Lansman R.A., J.C. Avise, C.F. Aquadro, J.F. Shapira and S.W. Daniel (1983) Extensive genetic variation in mitochondrial DNA's among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution*, 37: 1-16

Lapointe F.-J., P. Lopez, Y. Boucher, J. Koenig J and E. Baptiste (2010) Clanistics: a multi-level perspective for harvesting unrooted gene trees. *Trends in Microbiology*, 18: 341-347

Legendre P. and F.-J. Lapointe (2004) Assessing congruence among distance matrices: single-malt Scotch whiskies revisited. *Australian and New Zealand Journal of Statistics*, 46: 615-629

Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220

Margos G., J.I. Tsao, S. Castillo-Ramirez, Y.A. Girard, S.A. Hammer, A. Gatewood Hoen, R.S. Lane, S.L. Raper and N.H. Ogden (2012) Two boundaries separate *Borrelia burgdorferi* populations in North America. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 6059-6067

McCarty J.P. (2001) Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, 15: 320-331

McKenna M.C. and S.K. Bell (1997) *Classification of mammal above the species level*. Columbia University Press, New York

Moritz C. and D.P. Faith (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7: 419-429

- Myers P., B.L. Lundrigan, S.M.G. Hoffman, A.P. Haraminac and S.H. Seto (2009) Climate-induced changes in the small mammal communities of the Northern Great Lakes Regions. *Global Change Biology*, 15: 1434-1454
- Noël S., B. Angers and F.-J. Lapointe (2005) *Peromyscus* populations and their *Cuterebra* parasites display congruent phylogeographical structure. *Parasitology*, 131: 237-245
- Noël S. and F.-J. Lapointe (2010) Urban conservation genetics: study of a terrestrial salamander in the city. *Biological Conservation*, 143: 2823-2831
- Ogden N.H., L. St-Onge, I.K. Barken, S. Brazeau, M. Bigras-Poulin, D.F. Charron, C.M. Francis, A. Heagy, L.R. Lindsay, A. Maarouf, P. Michel, F. Milord, C.J. O'Callaghan, L. Trudel and R.A. Thompson (2008) Risk maps for range expansion of the Lyme disease vector, *Ixodes scapularis*, in Canada now with climate change. *International Journal of Health Geographics*, 22: 7-24
- Ogden N.H., C. Bouchard, K. Kurtenbach, G. Margos, L.R. Lindsay, L. Trudel, S. Nguon and F. Milord (2010) Active and passive surveillance and phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* elucidate the process of Lyme disease risk emergence in Canada. *Environmental Health Perspectives*, 18: 909-914
- Olsen J.B., J.K. Wenburg and P. Bentzen (1996) Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) using microsatellites. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5: 259-272
- Paradis E., J. Claude and K. Strimmer (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289-290
- Parmesan P. and G. Yohe (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421: 37-42
- Parmesan C. (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37: 637-669
- Polihronakis M. and Caterino M.S. (2010) Contrasting patterns of phylogeographic relationships in sympatric sister species of ironclad beetles (Zopheridae: *Phloeodes* spp.) in California's Transverse Ranges. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 195
- Posada D. and K.A. Crandall (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818

R Development Core Team (2011) R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

Rand P.W., E.H. Lacombe, R.P. Smith, Jr., S.M. Rich, C.W. Kilpatrick, C.A. Dragoni and D. Caporale (1993) Competence of *Peromyscus maniculatus* (Rodentia: Cricetidae) as a reservoir host for *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) in the wild. *Journal of Medical Entomology*, 30: 614-618

Riddle B.R. (1995) Molecular biogeography in the Pocket mice (*Perognathus* and *Chaetodipus*) and Grasshopper mice (*Onychomys*): the late Cenozoic development of a North American aridlands rodent guild. *Journal of Mammalogy*, 76: 283-301

Riddle B.R., D.J. Hafner and L.F. Alexander (2000) Comparative phylogeography of Baileys' Pocket mouse (*Chaetodipus baileyi*) and the *Peromyscus eremicus* species group: historical vicariations of the Baja California peninsular desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17: 161-172

Root T.L., J.T. Price, K.R. Hall, S.H. Schneider, C. Rosenzweig and J.A. Pounds (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421: 57-60

Rowe K.C., E.J. Heske, and K.N. Paige (2006) Comparative phylogeography of eastern chipmunks and white-footed mice in relation to the individualistic nature of species. *Molecular Ecology*, 15: 4003-4020

Salzburger W., G.B. Ewing and A. Von Haeseler (2011) The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20: 1952-1963

Saitou N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425

Schliep K.P. (2011) Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27: 592-593

Schwan T.G., K.K. Kime, M.E. Schrumph, J.E. Coe and W.J. Simpson (1989) Antibody response in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) experimentally infected with the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Infection and Immunity*, 57: 3445-3451

Sheppe C.N. (1965) Dispersal by swimming in *Peromyscus maniculatus*. *Journal of Mammalogy*, 46: 336-337

- Shiffer C.N. (1983) Aggregation behavior of adult *Cuterebra fontillella* (Diptera : Cuterebridae) in Pennsylvania, USA. *Journal of Medical Entomology*, 20: 365-370
- Shipp-Pennock M.A., W.D. Webster and D.W. Freshwater (2005) Systematics of the White-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) in the Mid-Atlantic region. *Journal of Mammalogy*, 86: 803-813
- Slatkin M. and R.R. Hudson (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555-562
- Sonenshine D.E. (2005) The biology of tick vectors of human disease. Pages 12-36, In *Tick-borne infections of human* (J.L. Goodman, D.T. Dennis and D.E. Sonenshine. Eds.), ASM Press, Washington, DC
- Stanek D. and F. Strle (2009) Lyme borreliosis: a European perspective on diagnosis and clinical management. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22: 450-454
- Steere A.C., J. Coburn and L. Glickstein (2004) The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113: 1093-1101
- Stephen M.R., C.W. Kilpatrick, J.L. Shippee and K.L. Crowell (1996) Morphological differentiation and identification of *Peromyscus leucopus* and *P. maniculatus* in Northeastern North America. *Journal of Mammalogy*, 77: 985-991
- Sullivan J., E. Arellano and D.S. Rogers (2000) Comparative Phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *American Naturalist*, 15: 755-768
- Svendsen G. (1964) Comparative reproduction and development in two species of mice in the genus *Peromyscus*. *Kansas Academy of Science*, 67: 527-538
- Templeton A.R. (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397
- Tessier N., S. Noël and F.-J. Lapointe (2004) A new method to discriminate the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) using species-specific primers in multiplex PCR. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 1832-1835

- Thompson J.D., J.T. Gibson, F. Plewniac, F. Jeanmougin and D.G. Higgins (1997) The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882
- Trout R.T., C.D. Steelman and A.L. Szalanski (2009) Population genetics and phylogeography of *Ixodes scapularis* from Canines and deer in Arkansas. *Southwestern Entomologist*, 34: 273-287
- Tsao J.I. (2009) Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Veterinary Research*, 40: 36
- Van Horne B. (1981) Demography of *Peromyscus maniculatus* population in seral stages of coastal coniferous forest in southeast Alaska. *Canadian Journal of Zoology*, 59: 1045-1061
- Wade N.L. (1999) Molecular systematics of neotropical deer mice of the *Peromyscus mexicanus* species group. *Graduate Department of Zoology*, University of Toronto
- Wolff J.O. (1996) Coexistence of white-footed mice and deer mice may be mediated by fluctuating environmental conditions. *Oecologia*, 108: 529-533
- Wolff J.O. (1985) Comparative population ecology of *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*. *Canadian Journal of Zoology*, 63: 1548-1555
- Yang D.-S. and G.J. Kenagy (2009) Nuclear and mitochondrial DNA reveal contrasting evolutionary processes in populations of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Molecular Ecology*, 18: 5115-5125
- Zheng X., B.S. Arbogast and G.J. Kenagy (2003) Historical demography and genetic structure of sister species: deermice (*Peromyscus*) in the North American temperate rain forest. *Molecular Ecology*, 12: 711-724
- Zink R.M. (2002) Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 953-959