

THESE

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Montpellier 2

Discipline : Evolution, Ecologie, Ressources génétiques, Paléontologie
Ecole doctorale : SIBAGHE

Charlotte TOLLENAERE

Le 2 décembre 2009

**Génétique et évolution du rat noir, *Rattus rattus*,
réservoir de la peste à Madagascar**

Dirigée par Jean-Marc DUPLANTIER

Jury composé de :

Gabriele SORCI, Directeur de Recherches CNRS.....Rapporteur
Thierry WIRTH, Directeur d'études Muséum d'Histoire Naturelle.....Rapporteur
Thierry BOULINIER, Directeur de Recherches CNRS.....Examineur
François POMPANON, Maître de Conférences, Université de Grenoble.....Examineur
Renaud VITALIS, Chargé de Recherches CNRS.....Examineur
Carine BROUAT, Chargée de Recherches IRD.....Co-Directrice de thèse
Herwig LEIRS, Professeur, Université d'Anvers, Belgique.....Membre invité

RESUME

Les pressions de sélection exercées par les pathogènes peuvent induire des changements évolutifs extrêmement rapides chez leurs hôtes. C'est probablement le cas chez le rat noir (*Rattus rattus*) à Madagascar, qui présente des populations résistantes à la peste (infection à *Yersinia pestis*) dans la zone des hauts plateaux centraux, où la peste est endémique depuis un siècle environ, tandis que les populations de la zone de basse altitude, où la maladie est absente, sont sensibles. Le rat noir est actuellement le seul réservoir possible de la maladie à Madagascar. L'objectif de ce travail est d'étudier la résistance à la peste chez *R. rattus*, car ce trait a des conséquences importantes dans la transmission et le maintien de la maladie.

Les patrons de génétique neutre sont en accord avec une colonisation unique de Madagascar par le rat noir, il y a 1000-2000 ans, en provenance de la Péninsule Arabique. Comme pour les populations humaines, des populations de rat noir se seraient d'abord installées dans les régions côtières, s'étendant ensuite sur les hauts plateaux centraux. Des travaux expérimentaux (infections contrôlées et croisements) ont permis d'étudier le phénotype de résistance et sa transmission à la descendance. La différence de niveau de résistance entre zone de peste et zone sans peste a ainsi été confirmée et étendue à d'autres localités. Enfin, des approches gènes candidats et génomiques ont conduit à l'identification de marqueurs génétiques potentiellement sous sélection divergente entre zone de peste et zone sans peste, et/ou associés à l'issue d'infections expérimentales par la peste.

Mots-clés : adaptation, génomique des populations, pathogènes, phylogéographie, *Rattus rattus*, résistance, rongeur commensal, *Yersinia pestis*, zoonose.

Genetics and evolution of the black rat (*Rattus rattus*), reservoir of plague in Madagascar

ABSTRACT

Selective pressure applied by pathogens can lead to extremely rapid evolutionary changes on their hosts. It could be the case for the black rat (*Rattus rattus*), which presents populations resistant to plague (*Yersinia pestis* infection), where plague have been endemic since about one century, whereas low altitude zone (where the disease is absent) populations are plague susceptible. The black rat is the only possible plague reservoir in Madagascar. This work aims to study plague resistance in *R. rattus*, as this trait has important consequences for the disease transmission and maintenance.

Neutral genetic patterns agree with a unique colonization of Madagascar by the the black rat, 1000-2000 years ago, from Arabian Peninsula. As for humans, rat settlement would have begun by coastal regions, and latter expanded to the central highlands. Experimental work (controlled infestations and crosses) allowed the study of the resistance phenotype and its offspring transmission. Resistance level variation between plague focus and plague-free zone was confirmed and extended to other localities. Finally candidate gene and genomic approaches lead to detect genetic markers potentially undergoing divergent selection between plague focus and plague free zone than neutral loci and/or associated with experimental plague challenge issue.

Key words : adaptation, commensal rodent, pathogens, phylogeography, *Rattus rattus*, resistance, population genomics, *Yersinia pestis*, zoonosis.

Mes remerciements vont d'abord à **Carine Brouat** qui m'a encadrée tout au long de cette thèse avec patience et pertinence, ainsi qu'à **Jean-Marc Duplantier**, toujours présent pour apporter ses connaissances sur le modèle biologique. Merci à tous les deux, pour leurs compétences très complémentaires et leur disponibilité, je n'aurais pas pu espérer un meilleur encadrement pendant ma thèse.

Sur le plan humain, cette thèse m'aura permis de découvrir un autre monde : je me rappellerai toujours de mes premiers moments à Madagascar sur le trajet aéroport - Institut Pasteur, les yeux écarquillés...

Je suis reconnaissante à l'ensemble de l'équipe 'peste' de l'Institut Pasteur de Madagascar de m'avoir permis de réaliser ces missions dans de très bonnes conditions, pour leur accueil chaleureux, ainsi que pour tout le travail effectué, que ce soit lors des missions, à l'animalerie, ou au labo. En particulier, merci à **Lila Rahalison** (Docteur Lil') dont j'admire le travail et à **Michel Ranjalahy** qui m'a beaucoup appris et sans qui les travaux expérimentaux n'auraient pas pu être entrepris. Merci à **Nirina** pour son sourire (et son accueil... ministeriel !), à tous ceux avec qui je suis partie en mission : **Claudine, Lalao, Patrick, Désiré, Noro, Mariette** et les chauffeurs : **Alfred, Olivier** et **Gilbert** nous permettant d'arpenter les routes malgaches au son de Mahaleo (ou de Françoise Hardy !)... et les autres : **Vohangy, Mino, Léa, Yolande**...

Je remercie aussi **Sandra Telfer**, pour les moments partagés à Inanantonana et son aide précieuse par la suite.

Enfin, de nombreuses personnes m'ont permis d'apprécier les séjours à Tana : les autres stagiaires de l'IPM, dont **Laetitia, Céline, Elise, Sarah** et **Khadidja**, ainsi que **José** et **Jeannot** toujours présents au bout du fil !

De retour en France, je tiens à remercier vivement **Nathalie Charbonnel** pour m'avoir initiée à la recherche en master et m'avoir suivie tout au long de la thèse en m'accompagnant de conseils judicieux et de bienveillance.

Je remercie **Gabriele Sorci, Thierry Wirth, François Pompanon Renaud Vitalis, Thierry Boulinier** et **Herwig Leirs** qui me font l'honneur de constituer mon jury.

Ma thèse aura aussi été suivie par **Thomas Guillemaud**, dont la pertinence des remarques a permis d'améliorer le manuscrit et de **Jean-François Guégan**, tous deux membres de mon comité.

Au CBGP, j'ai aussi eu le plaisir de travailler avec **Jean-François Cosson** dont l'enthousiasme a été communicatif, et avec **Réjane Streiff**, dont l'expérience sur les AFLP nous a ouvert des portes inespérées... merci aussi à **Sandrine Cros-Arteil** qui nous a transmis cette expérience en pratique.

Au labo de BM, j'ai d'abord bénéficié de la patience de **Maxime Galan**, puis de très nombreux conseils et coups de main de **Anne Loiseau** et **Caroline Tatard**, Merci beaucoup à tous les 3 ! Merci aussi à **Philippe Gauthier** au CBGP, ainsi qu'à **Frédérique Cerqueira** et **Erick Desmarais** à l'IFR.

Je remercie très vivement:

Svilena Ivanova dont les capacités d'apprentissage et le sens pratique m'ont épaté et que j'ai eu un réel plaisir à encadrer, de même que **Caroline Kakko**;

Sylvain Piry, dont la bonne humeur à mon arrivée me permettait d'oser demander n'importe quoi ! **Ambroise Dalecky**, pour ses remarques pertinentes, **Janice Britton-Davidian**, **Johan Michaux**, **Yannick Chaval**, **Josef Bryja**, **Jean-Pierre Quéré**, **Gauthier Dobigny** et l'ensemble du groupe *Mastomys* du CBGP pour des discussions instructives pendant ou en dehors des fameuses réunions annuelles;

Fabien Condamine, **Michaël Fontaine**, **Manue Jousselein**, **Michel Pascal**, **Thibault Malausa** et **Jeff Martin** qui m'ont aidé pour les analyses ou apporté des conseils pratiques...;

Marc Choisy, ainsi que **Florence Debarre** pour avoir pris le temps de discuter 'modèles' qui, j'espère, se feront un jour...

Ainsi que :

Tous mes 'colocataires' de travail: les actuels **Fabien** et **Angham** et les anciens **Stéphanie**, **Anouk**, **Adam**, **Léa** (et ses fous rires inopinés), **Michael**, **Marie-Pierre**, et les autres... qui se sont succédés au cours de ces presque 4 ans dans le bureau avec vue sur le Pic Saint Loup

Et les autres thésards et amis du CBGP, actuels et anciens, notamment **Marie** et **Manu**, qui ont supporté mes repet (et le restel) à Turin, **Astrid** et les footings à la nuit tombée, **Olivier**, **Pierre-Jean**, **Karine**, **Julie**, etc... Ainsi que ceux de Baillarguet **Elodie**, **Audrey**, **Philippe**, **Florence** et les autres organisateurs du 'printemps';

L'ensemble des personnes pas encore citées et qui font du CBGP, un lieu où l'on se sent bien et que c'est avec un grand plaisir que je rempile pour quelques mois : l'équipe du commun, notamment **Julie**, **Sylvie**, **Serge**, **Denis** ; mais aussi : **Armelle** et ses nounours, **Anne-Laure**, **Anne**, **Bruno** etc...

Enfin, un grand merci à **ma famille et mes proches** pour m'avoir encouragé au long de la thèse. Désolée à eux de n'avoir pas été aussi présente que je l'aurais voulu l'été dernier... On se rattrapera !

Merci à **Paul** pour son soutien de tous les jours dans cette entreprise même s'il ne la comprend pas toujours...

Sommaire

Préambule : écologie et évolution des maladies infectieuses.....	3
Introduction générale	6
I – L'évolution des populations d'hôtes face aux pathogènes.....	7
II- La génétique évolutive : évolution neutre et adaptation.....	11
III- La génétique de la résistance aux pathogènes chez les animaux.....	15
IV- La peste, une zoonose bactérienne.....	18
V- Le modèle biologique étudié : le rat noir et la peste à Madagascar.....	29
VI- Problématique, objectifs et plan de la thèse.....	38
Chapitre 1 : Histoire de la colonisation de Madagascar par le rat noir	40
I- Introduction.....	41
II- Etude des relations entre Madagascar et les régions voisines ou historiquement importantes.....	43
III- Etude au sein de l'île de Madagascar.....	49
IV- Conclusions et perspectives.....	54
Chapitre 2 : Approche expérimentale de la résistance à la peste chez le rat noir	56
I- Introduction.....	57
II- Infections expérimentales.....	58
III- Croisements.....	71
IV- Conclusion.....	77
Chapitre 3 : Détection de marqueurs génétiques associés à la résistance à la peste chez <i>Rattus rattus</i>	78
I- Introduction.....	79
II- Etude du gène candidat Ccr5.....	82
III- Détection de marqueurs génomiques sous sélection par la peste.....	88
IV- Détection de sélection sur un complexe multigénique candidat.....	101
V- Conclusion.....	110
Discussion générale et perspectives	112
I- Histoire de l'évolution de la résistance à la peste chez une espèce introduite, le rat noir...113	
II- Bases génétiques de la résistance à la peste chez <i>Rattus rattus</i>	116
III- Conséquences épidémiologiques de la résistance à la peste du rat noir.....	117
IV- Conclusion.....	119
Références citées	120
Annexes	142

ARTICLES

Liste des annexes

Annexe **A1** Liste des micromammifères présents à Madagascar

Annexe **A2** Méthode de génotypage utilisée pour distinguer les deux allèles du gène Ccr5.

Annexe **A3** Principe de la méthode AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Annexe **A4** Illustration de la méthode de choix des marqueurs AFLP

Annexe **A5** Protocole d'isolation et de séquençage des marqueurs AFLP

Annexe **A6** Protocole de génotypage des microsatellites liés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Liste des articles

Article I

C. Tollenaere, C. Brouat, J.-M. Duplantier, L. Rahalison, S. Rahelinirina, M. Pascal, H. Moné, G. Mouahid, H. Leirs, J.-F. Cosson (sous presse dans *Journal of Biogeography*). Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar.

Article II

C. Tollenaere, L. Rahalison, M. Ranjalahy, J.-M. Duplantier, S. Rahelinirina, S. Telfer, C. Brouat (soumis à *EcoHealth*). Susceptibility to *Yersinia pestis* experimental infection in wild *Rattus rattus*, reservoir of plague in Madagascar.

Article III

C. Tollenaere, L. Rahalison, M. Ranjalahy, S. Rahelinirina, J.-M. Duplantier, C. Brouat (2008). CCR5 polymorphism and plague resistance in natural populations of the black rat in Madagascar. *Infection, Genetics and Evolution*. 8: 891-897.

Article IV

C. Tollenaere, J.-M. Duplantier, L. Rahalison, M. Ranjalahy, C. Brouat (en révision pour *Molecular Ecology*). AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection.

Préambule :

Ecologie et évolution des maladies infectieuses

Les maladies infectieuses sont un enjeu de société important puisqu'elles sont aujourd'hui responsables de 19 % de l'ensemble de la mortalité humaine mondiale, et représentent même 53 % des décès en Afrique (WHO, 2004). Pourtant, dans les années 1950-60, les progrès liés à l'hygiène et au contrôle des vecteurs, ainsi que le développement des traitements et des vaccins, laissaient espérer une victoire de l'homme face à ses pathogènes (Snowden, 2008). Cet espoir a vu son apogée en 1979 quand l'organisation mondiale de la santé a déclaré la variole éradiquée à l'échelle mondiale. Cependant, cette confiance a été ébranlée dans les vingt dernières années par la mise en évidence du problème de la résistance des bactéries aux antibiotiques (Spellberg *et al.*, 2008), de l'émergence de certaines maladies comme le SIDA, ou la ré-émergence d'autres telles que la tuberculose (Snowden, 2008).

La nécessité de prendre en compte l'écologie et l'évolution des maladies infectieuses pour comprendre leur dynamique est de plus en plus admise (Schrag & Wiener, 1995), en particulier dans le cas des zoonoses. Ces dernières sont des infections se transmettant naturellement entre des animaux vertébrés et l'homme (définition incluant les pathogènes pour lesquels l'homme est l'hôte principal et d'autres vertébrés les hôtes occasionnels, ainsi que la situation inverse ; Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005). Les zoonoses représentent environ la moitié des maladies infectieuses humaines (816 espèces de pathogènes sur 1407 connues) et seraient plus fréquemment des maladies émergentes ou ré-émergentes que les infections proprement humaines (Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005). Comprendre la circulation des maladies dans les réservoirs sauvages est nécessaire pour gérer le risque de transmission, ce qui est actuellement reconnu au travers de l'émergence de l'écologie de la santé. Cette discipline est d'autant plus importante aujourd'hui que les changements globaux actuels influencent la dynamique des maladies infectieuses, et peuvent conduire à l'émergence de pathogènes (Lebarbenchon *et al.*, 2007 ; voir Lilley *et al.*, 1997 pour un exemple concernant l'effet de la déforestation). L'un des exemples les mieux documentés est celui de la maladie de Lyme aux Etats-Unis, où la composition de la communauté d'hôtes vertébrés détermine le risque de transmission (Ostfeld & Keesing, 2000 ; LoGiudice *et al.*, 2003 ; Logiudice *et al.*, 2008), illustrant l'importance de la biodiversité en tant que barrière à l'émergence de maladies (Dobson *et al.*, 2006).

En retour, l'écologie peut avoir besoin de comprendre les maladies infectieuses, notamment dans un but de conservation des espèces menacées (Daszak *et al.*, 2000 ; Lafferty & Gerber, 2002 ; Lebarbenchon *et al.*, 2007). L'introduction d'un pathogène peut menacer

une espèce en particulier, mais aussi modifier la structure de l'ensemble de la communauté. C'est le cas par exemple si le pathogène affecte une espèce clé (Collinge *et al.*, 2008), ou bien si le niveau de sensibilité varie selon les espèces d'hôtes, avec par exemple des espèces natives plus sensibles que des espèces introduites, ce qui facilite l'invasion (Van Riper *et al.*, 2002 ; Tompkins *et al.*, 2003). Les modifications de l'écosystème consécutives à l'introduction d'une maladie pourront en retour influencer la transmission de la maladie (Collinge *et al.*, 2008).

En plus de l'écologie, la compréhension des maladies infectieuses peut bénéficier de l'utilisation de concepts d'évolution (Stearns & Koella, 2008), bien qu'il existe encore actuellement un fossé entre les disciplines de la médecine et la biologie évolutive. En effet, les médecins prennent peu en compte l'importance de l'évolution des hôtes et des pathogènes (Nesse & Stearns, 2008), ce qui est paradoxal car un grand problème médical actuel, la résistance aux antibiotiques (Normark & Normark, 2002 ; Bergstrom & Feldgarden, 2008), est l'un des meilleurs exemples d'adaptation contemporaine, mais le mécanisme de sélection naturelle sous-jacent reste rarement cité dans les revues médicales (Antonovics *et al.*, 2007). La biologie évolutive en revanche s'est intéressée aux maladies infectieuses depuis Darwin et la prise de conscience de l'importance des applications en santé est réelle aujourd'hui (Levin *et al.*, 1999).

La biologie évolutive permet en effet d'étudier l'adaptation des hôtes et des pathogènes (Nesse & Stearns, 2008), notamment l'évolution de la virulence ou de la résistance des pathogènes aux traitements (Galvani, 2003), l'évolution des variations de la résistance / sensibilité de l'hôte (Frank, 2002), ou encore la coévolution entre les acteurs (Woolhouse, 2002). La prise en compte de ces résultats peut améliorer les stratégies de santé publique (par exemple, la prédiction d'une virulence accrue des pathogènes lors de l'utilisation de vaccins imparfaits, Gandon *et al.*, 2001). D'autre part, des méthodes développées en biologie évolutive peuvent être utiles pour l'étude des maladies infectieuses. Notamment, l'étude des relations phylogénétiques entre les pathogènes permet de retracer l'histoire (origine, dispersion géographique) des pathogènes apportant des informations sur leurs modes et routes de transmission (Nesse & Stearns, 2008 ; Archie *et al.*, 2009). L'application de ces méthodes au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) a par exemple permis de démontrer ses deux origines simiennes indépendantes (Heeney *et al.*, 2006), ou de retracer certaines voies de transmission entre patients (Ciesielski *et al.*, 1992).

Introduction générale

I – L'évolution des populations d'hôtes face aux pathogènes

1. Rapidité des changements évolutifs sous la pression exercée par les pathogènes

L'introduction d'un pathogène dans une population est une pression de sélection forte, qui peut conduire à une évolution extrêmement rapide de son hôte (Thompson, 1998 ; Altizer *et al.*, 2003 ; Parker & Gilbert, 2004). L'utilisation de la myxomatose comme agent de lutte biologique contre le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) en Australie, qui conduisait initialement à des épizooties impressionnantes (99 % de la population décimée) a ainsi montré peu d'efficacité après quelques années seulement, en conséquence d'une diminution de la virulence du virus et d'une augmentation de la résistance des lapins (Fenner & Fantini, 1999). La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a aussi vu son niveau de résistance augmenter au cours des quinze années qui suivirent l'introduction du parasite *Myxobolus cerebralis* dans un lac du Montana (Miller & Vincent, 2008).

De telles observations longitudinales de la réponse adaptative d'un hôte face à un pathogène introduit sont rarement possibles dans la nature. Une méthode d'étude alternative est le recours à l'expérimentation, qui a permis de montrer que quelques dizaines de générations peuvent suffire à une augmentation significative de la résistance, par exemple dans les populations de *Daphnia magna*, suite à l'introduction du parasite eucaryote *Octospora bayeri* (Zbinden *et al.*, 2008), ou chez la drosophile suite à l'exposition à la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Ye *et al.*, 2009).

Les traits actuels de l'hôte observés en populations naturelles peuvent aussi être interprétés comme la conséquence de l'adaptation passée face aux pathogènes. La forte mortalité du lapin européen face au virus de la myxomatose est ainsi expliquée par l'absence de co-évolution entre les deux acteurs tandis que l'hôte d'origine du virus, le lapin d'Amérique du Sud (*Sylvilagus brasiliensis*), ne développe qu'une maladie bénigne (Fenner & Fantini, 1999). Dans ce cas, l'observation actuelle résulte de la présence ou non d'une longue co-évolution entre l'hôte et le parasite. En revanche, d'autres études montrent que la structure spatiale de la résistance de l'hôte est corrélée à la présence du parasite dans l'histoire récente des populations (Kalbe & Kurtz, 2006 ; Duffy & Sivars-Becker, 2007 ; Encadré 1), ce qui suggère une évolution rapide des populations d'hôtes.

2. Sélection naturelle pour la résistance des hôtes

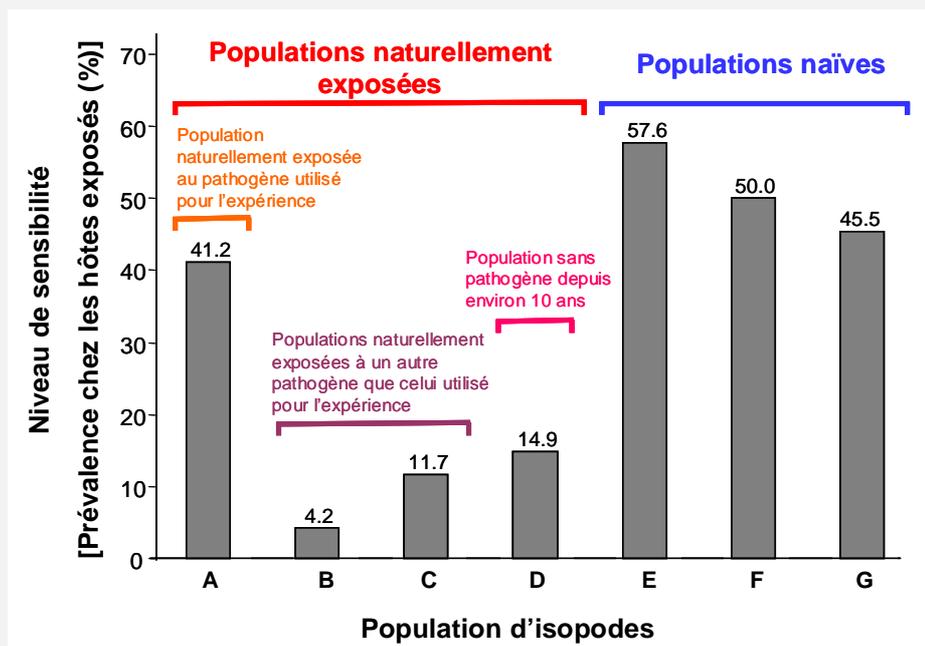
Invoquer la sélection naturelle exercée par les pathogènes sur les populations d'hôtes nécessite de considérer que la résistance / sensibilité de l'hôte est variable dans la population, qu'elle est héritable et qu'elle a un effet sur la capacité de survie et de reproduction (c'est-à-dire la valeur sélective) des variants (il faut pour cela que le parasite soit présent et virulent¹).

¹ La virulence est définie comme l'effet, en terme de diminution de la valeur sélective, qu'a le parasite sur son hôte.

Introduction

Les populations naturelles présentent généralement de la variabilité pour la résistance aux pathogènes (par exemple Webster & Woolhouse, 1998 ; Wakelin *et al.*, 2002). L'héritabilité de la résistance aux pathogènes dans les populations naturelles a été montrée par l'existence de corrélations entre les parents et leurs descendants pour le niveau de parasitisme (Moller, 1990 ; Boulinier *et al.*, 1997 ; Smith *et al.*, 1999), ou pour certaines mesures de l'immunocompétence² (Brinkhof *et al.*, 1999 ; Cotter & Wilson, 2002), ou encore par la mise en évidence d'associations entre l'infection et le type de clone de l'hôte (Little & Ebert, 1999). L'identification de gènes ou de régions chromosomiques impliqués dans la résistance a même été réalisée dans certains contextes (voir III). D'autre part, plus le taux de mortalité ou l'effet sur la fécondité dû au parasite est fort, plus l'intensité de la sélection sera forte. La virulence du pathogène influence ainsi la vitesse d'évolution de la résistance (Altizer *et al.*, 2003).

Encadré 1 Relation entre l'histoire de l'exposition des populations d'hôte au parasite et le niveau de résistance: l'exemple des isopodes (*Asellus aquaticus*) et de leurs parasites (*Acanthocephalus lucii*) en Finlande.



Des populations d'isopodes présentant différentes histoires d'exposition au parasite ont été exposées expérimentalement au parasite de façon à déterminer leur niveau de résistance / sensibilité. Les populations n'ayant jamais été exposées au parasite (naïves) sont les plus sensibles. Les populations ayant été exposées au parasite sont globalement plus résistantes ; cependant, la population d'où vient le parasite ayant servi pour l'expérience est relativement sensible, ce qui peut s'interpréter comme le résultat de l'adaptation du parasite (développement d'une virulence plus forte spécifique de la population dont il est issu).

Issu de Hasu et al. (2009)

² L'immunocompétence est une notion théorique correspondant à la capacité générale d'un individu à activer une défense immunitaire de façon à réduire l'effet de l'infection sur la valeur sélective.

En l'absence du pathogène, la résistance peut être contre-sélectionnée (Thompson, 1998 ; voir par exemple Cruz & Wiley, 1989), en conséquence d'un éventuel coût associé à la résistance (May & Anderson, 1983). En effet, les ressources disponibles n'étant pas infinies, un compromis évolutif existe pour l'hôte entre l'investissement dans les défenses contre les pathogènes et les autres fonctions, notamment la reproduction (Sheldon & Verhulst, 1996 ; Schmid-Hempel, 2003 ; Sadd & Schmid-Hempel, 2009). Ce coût de la résistance a été mis en évidence empiriquement dans différents systèmes (voir cependant Rigby *et al.*, 2002), que ce soit en évolution expérimentale (Webster & Woolhouse, 1999 ; Ye *et al.*, 2009) ou dans les populations naturelles (Duffy & Sivars-Becker, 2007). Il pourrait être la conséquence d'un compromis énergétique entre l'induction d'une réponse immunitaire et la survie ou la reproduction (voir par exemple Moret & Schmid-Hempel, 2000 ; Bonneaud *et al.*, 2003).

La sélection pour la résistance d'un hôte à un parasite sera influencée par les modalités de cette résistance. En effet, il existe différents moyens pour les hôtes de s'opposer aux effets négatifs imposés par les pathogènes (Encadré 2) et les modèles théoriques d'évolution de la résistance dépendent ainsi du type de défense : résistance au sens strict ou tolérance (Boots & Bowers, 1999 ; Roy & Kirchner, 2000 ; Boots, 2008) et des coûts associés à la résistance (Boots & Haraguchi, 1999 ; Boots & Bowers, 2004).

3. Conséquences de l'évolution de l'hôte dans la propagation / persistance des maladies

Les variations spatiales de la résistance de l'hôte peuvent influencer les possibilités d'implantation locale du pathogène, résultant en une relation négative entre résistance des hôtes et prévalence du parasite dans les populations (Laine, 2004 ; Springer, 2007). De même, au niveau intra-populationnel, l'hétérogénéité des individus hôtes face aux pathogènes a des conséquences importantes pour la diffusion et le maintien ou pas d'une maladie (Anderson & May, 1991). En particulier, la prise en compte des variations de contagiosité (Woolhouse *et al.*, 1997 ; Lloyd-Smith *et al.*, 2005) ou de sensibilité (Dwyer *et al.*, 1997) de l'hôte au sein des populations modifie les prédictions théoriques relatives à la dynamique des maladies infectieuses (par exemple pour le bombyx disparate et le virus de la polyèdrose nucléaire, Dwyer *et al.*, 1997).

De plus, l'évolution de l'hôte modifie le régime de sélection du parasite, ce qui peut conduire à une évolution de la virulence (Galvani, 2003). Par exemple, les variations individuelles de la résistance des souris affectent la compétition entre deux souches de *Plasmodium chabaudi* (de Roode *et al.*, 2004). L'effet de la variabilité de la résistance de l'hôte sur l'évolution de la virulence des parasites a cependant été peu étudié, que ce soit théoriquement (mais voir Regoes *et al.*, 2000) ou empiriquement.

Encadré 2 Quelques exemples illustrant la diversité des mécanismes de défense des hôtes face aux pathogènes.

Limitation de l'exposition	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Évitement comportemental</u> Limitation de l'exposition au parasite et ainsi du risque d'infection. Par exemple, les têtards de la grenouille taureau sont capables de détecter les congénères infectés par <i>Candida humicola</i> (signaux chimiques) et de les éviter (Kiesecker <i>et al.</i>, 1999). ▪ <u>Barrières physiques</u> Réduction du taux d'invasion de l'organisme. Par exemple, la longueur des épines du cactus <i>Echinopsis chilensis</i> lui permet de se protéger contre l'infection par la plante parasite <i>Tristerix aphyllus</i> (Medel, 2000).
Résistance au sens propre	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Défenses cellulaires constitutives empêchant l'entrée du pathogène</u> Blocage de l'entrée du pathogène (notamment les virus) dans les cellules cibles. L'absence de récepteur CCR5 empêche ainsi l'entrée du VIH dans les lymphocytes (Samson <i>et al.</i>, 1996). ▪ <u>Réponse immunitaire induite</u> Induction d'une réponse immunitaire en réponse à la présence d'un pathogène. La Drosophile induit par exemple la production de peptides anti-microbiens, l'activité phenoloxydase et la phagocytose en réaction face à la présence de la bactérie <i>Listeria monocytogenes</i> (Okado <i>et al.</i>, 2009). ▪ <u>Mémoire immunitaire</u> = Activation de la production de défenses mises en place lors d'une exposition préalable au pathogène. Par exemple, en réponse à l'infection par <i>Borrelia</i>, les mouettes tridactyles développent des anticorps qu'elles peuvent transmettre à leur descendance (Gasparini <i>et al.</i>, 2001).
Tolérance	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Capacité à limiter les effets du parasite</u> Réduction des dommages causés par les pathogènes, sans pour autant éviter leur invasion et croissance. La reproduction est ainsi anticipée chez le grillon infecté de façon à compenser les effets négatifs induits par les pathogènes (Adamo, 1999).

D'après Schulenburg *et al.* (2009)

II- La génétique évolutive : évolution neutre et adaptation

1. Les mécanismes gouvernant l'évolution des populations

La composition allélique des populations peut être modifiée sous l'effet :

- de forces évolutives neutres : la mutation (modification allélique rare et aléatoire), la dispersion (flux génique entre les populations) et la dérive génétique (échantillonnage aléatoire des allèles lors de la reproduction, dont l'effet est d'autant plus fort que la population est petite), et

- de forces évolutives adaptatives : la sélection naturelle (sélection des allèles les mieux adaptés au milieu, c'est-à-dire ceux associés à une reproduction maximale et/ou une mortalité minimale), dont il existe trois types principaux (Hurst, 2009). La sélection directionnelle (ou sélection positive ou encore darwinienne) favorise l'allèle le plus avantageux, tandis que la sélection purificatrice (ou négative) conduit à l'élimination des allèles délétères. Enfin, la sélection balancée favorise la diversité génétique et conduit à un maintien du polymorphisme.

Les forces évolutives neutres affectent tout le génome tandis que la sélection n'affecte que certains loci en particulier (Cavalli-Sforza, 1966) (Fig. 1). Cette propriété est à la base de la détection de sélection par l'approche de génomique des populations (Black *et al.*, 2001 ; Luikart *et al.*, 2003), qui consiste en l'utilisation d'un échantillonnage à l'échelle du génome pour identifier des loci singuliers, affectés par des forces évolutives propres à un locus (sélection, mutation, homogamie et recombinaison), par opposition aux loci neutres, affectés par les mécanismes agissant sur l'ensemble du génome (dérive, flux géniques et consanguinité). Les loci singuliers sont potentiellement sous sélection (voir §3) tandis que les loci neutres pourront être utilisés pour décrire l'histoire démographique des populations (voir §2).

2. Les marqueurs génétiques neutres comme témoins de l'histoire des populations

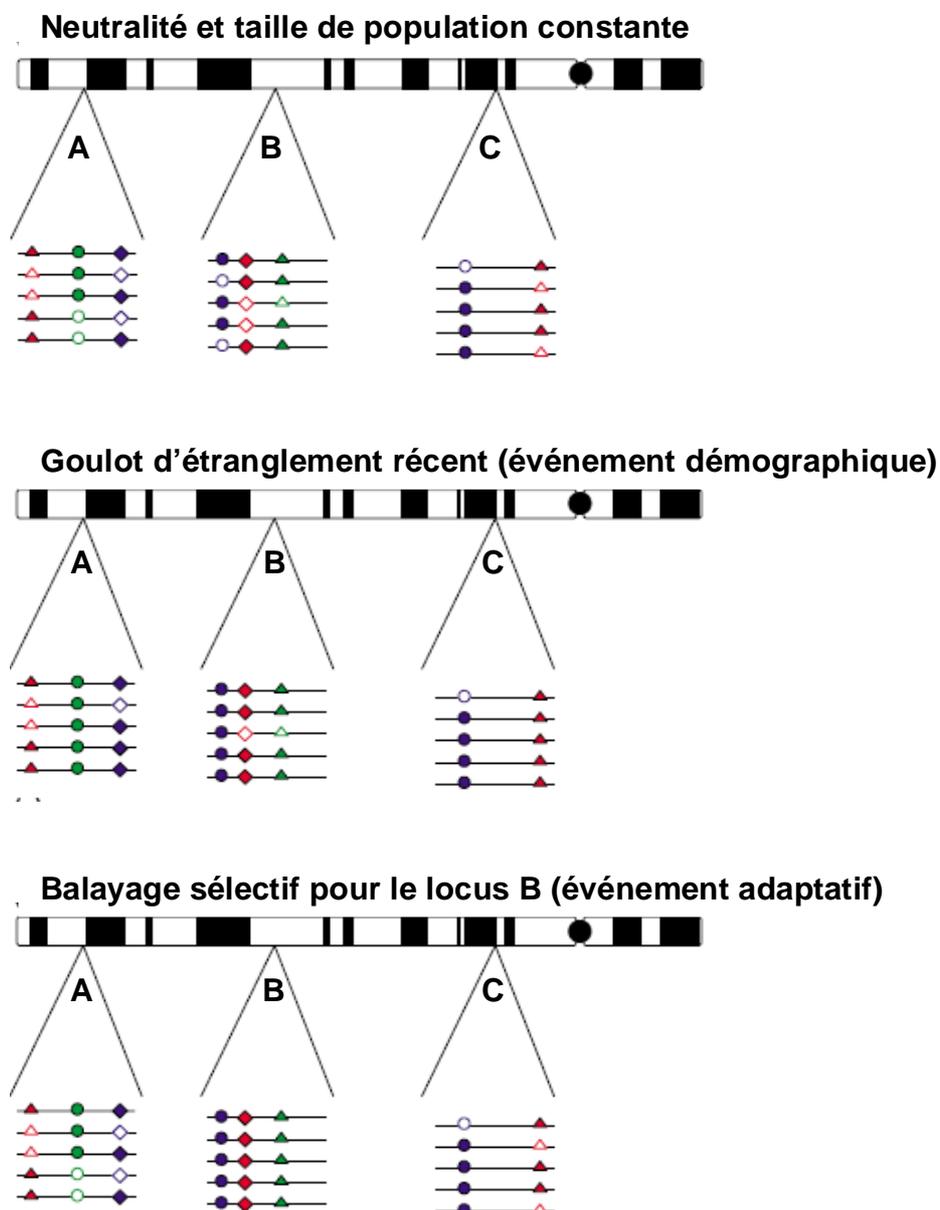
L'histoire des populations et des espèces laisse des empreintes dans leur structure génétique actuelle. L'analyse de la composition génétique des populations permet ainsi d'en retracer les événements majeurs, notamment les variations démographiques (expansion ou déclin des populations) et les événements de dispersion. Pour cela, on utilise des marqueurs supposés neutres (généralement pas affectés par la sélection naturelle), le plus souvent des séquences d'ADN mitochondrial (Avise, 2000) ou des microsatellites (Goldstein & Schlotterer, 1999).

Les outils d'analyse de génétique des populations sont aujourd'hui largement utilisés pour définir des stratégies de conservation (état d'une espèce en danger, Bertorelle *et al.*, 2009) ou de contrôle (décrire les routes de colonisation d'une espèce envahissante, Rollins *et al.*, 2006). Dans le contexte des interactions hôtes-parasites, l'utilisation des marqueurs neutres pour définir la structure génétique des différents acteurs permet par exemple d'identifier l'origine

et l'histoire épidémiologique d'une maladie, de déterminer les facteurs environnementaux gouvernant la diffusion des pathogènes, d'étudier l'éventuelle spécialisation des acteurs ou d'identifier les changements d'hôtes (de Meeus *et al.*, 2007 ; Archie *et al.*, 2009 ; voir Encadré 3). La structure génétique des populations a aussi des conséquences importantes pour la dynamique de la coévolution entre hôtes et parasites (Schulenburg *et al.*, 2009).

Figure 1 Effet des phénomènes démographiques et sélectifs sur la diversité génétique: la démographie affecte tout le génome tandis que la sélection est locus spécifique (issu de Schlotterer, 2003)

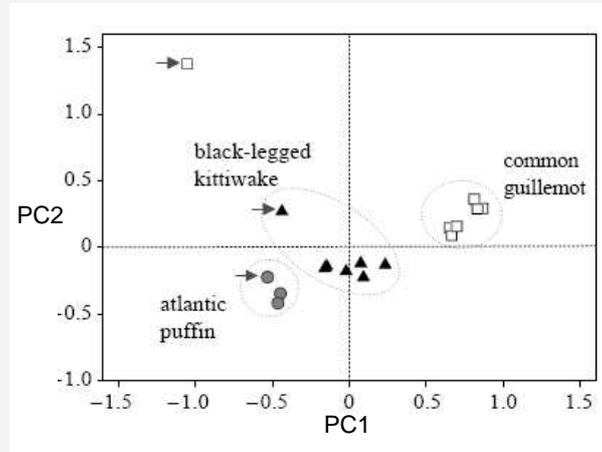
Pour chaque scénario (sélectif et démographique), trois régions du génome ont été représentées (A, B et C). Chacune de ces régions présente quelques sites polymorphes représentés par des symboles différents et dont le fond (vide ou plein) correspond à deux états alléliques.



Encadré 3 Exemples illustrant l'utilisation de marqueurs génétiques neutres (ici des microsatellites) dans le contexte des interactions hôtes / parasites pour retracer l'histoire des populations (a) ou inférer des traits d'histoire de vie (b).

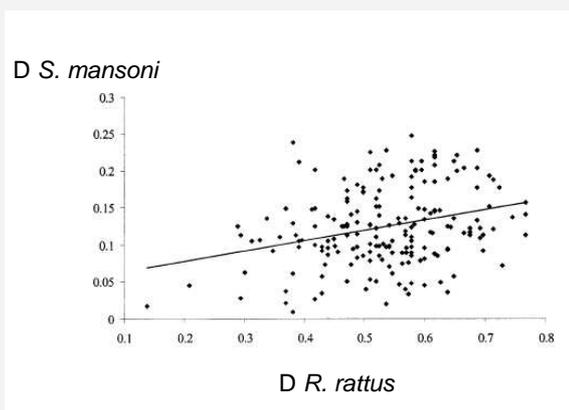
(a) Influence de la géographie et de la spécialisation à l'hôte chez les tiques (McCoy *et al.*, 2005)

La structure génétique de la tique d'oiseaux marins *Ixodes uriae* a été étudiée dans différentes populations de l'Europe du Nord par une analyse multivariée. L'hôte d'origine (chaque espèce d'oiseaux est représentée par un symbole différent) structure les populations de tiques plus que l'origine géographique (qui a aussi une influence, notamment pour la population située la plus au Nord, indiquée par les flèches). Ces résultats indiquent une spécialisation des tiques à leurs hôtes.



(b) Étude de la dispersion des schistosomes (Prugnolle *et al.*, 2005a)

La structure génétique du parasite *Schistosoma mansoni*, de son hôte intermédiaire *Biomphalaria glabrata* et de son hôte définitif *R. rattus* a été étudiée en Guadeloupe. Un patron d'isolement par la distance est observé chez le mollusque mais pas chez le parasite, ni le rat. Il existe une corrélation significative entre la distance inter-individuelle des rats et la distance entre infra-populations (individus échantillonnés dans un même rat) de schistosomes. Ces résultats sont cohérents avec une dispersion des schistosomes principalement due aux mouvements des rats.



3. La génétique de l'adaptation

Contrairement aux marqueurs neutres, les marqueurs adaptatifs sont les témoins de la sélection naturelle s'exerçant sur les traits phénotypiques dans les populations. Déterminer la base génétique des traits phénotypiques sous sélection n'est pas une tâche aisée, notamment chez les espèces non modèles. Le fait que le gène responsable de la couleur chez la phalène du bouleau reste inconnu, malgré le nombre d'études portant sur ce modèle biologique et la mise en évidence d'un déterminisme monogénique (Grant, 2004) en témoigne. Cependant, les progrès actuels de la génomique ouvrent aujourd'hui la possibilité d'étudier la génétique de l'adaptation (Thomas & Klaper, 2004 ; Vasemagi & Primmer, 2005).

Introduction

En particulier, la génomique des populations est une méthode de détermination de loci sous sélection par l'identification de marqueurs différant du reste du génome, au niveau de leur diversité ou de leur différenciation génétique (Luikart *et al.*, 2003 ; Schlotterer, 2003 ; voir les attendus Fig. 2). Cette approche permet de mettre en évidence des loci potentiellement sous sélection, sans nécessité de connaître le trait phénotypique adaptatif (par exemple, des marqueurs associés à la pression de sélection par l'altitude, Bonin *et al.*, 2006, ou à la pollution, Williams & Oleksiak, 2008), voire même sans connaître la pression de sélection (par exemple, Akey *et al.*, 2002 ; Orengo & Aguade, 2004).

D'autres tests permettent de mettre en évidence la sélection par l'étude d'un seul locus : notamment la comparaison de la distribution des fréquences des sites polymorphes avec l'attendu sous l'hypothèse neutre (Tajima, 1989) ou l'étude du ratio des mutations synonymes et non synonymes dans une séquence (McDonald & Kreitman, 1991). Enfin, l'association entre les fréquences alléliques d'un locus et des variables environnementales permettent de proposer lesquels de ces facteurs environnementaux sont de possibles pressions de sélection (Bonin *et al.*, 2007 ; voir par exemple Sezgin *et al.*, 2004).

Toutes ces méthodes se focalisent d'abord sur la génétique et peuvent donc être qualifiées d'approche 'bottom-up'. D'autres approches centrées au contraire sur le trait phénotypique sous sélection sont qualifiées de 'top-down' (Vasemagi & Primmer, 2005). Ainsi, dans le cas où le trait phénotypique sous sélection est connu, son déterminisme génétique peut être étudié par deux types de méthodes:

1) l'approche à l'échelle génomique, qui consiste à utiliser un grand nombre de marqueurs représentant l'ensemble du génome. Plusieurs stratégies peuvent alors être envisagées (Schlotterer, 2003 ; Stinchcombe & Hoekstra, 2008) :

- étude d'association génotype / phénotype en populations naturelles. Des marqueurs anonymes ont ainsi été associés à certains traits de la morphologie florale chez la violette *Viola cazortensis* (Herrera & Bazaga, 2008) ou à la taille du corps chez des anguilles (Gagnaire *et al.*, 2009).

- étude de la ségrégation des marqueurs génétiques dans des pedigrees ou des croisements expérimentaux. Par exemple, des générations de croisements en captivité ont permis de montrer que la résistance au coumafène (un raticide anticoagulant) est déterminée par un seul locus, nommé *Rw* puis identifié comme le gène *VKORC1*, chez *Rattus norvegicus* (Kohn & Pelz, 1999 ; Pelz *et al.*, 2005). Dans la population naturelle de moutons Soay de l'île de St Kilda, une étude de pedigrees a montré que la couleur du pelage est associée à une région du chromosome 2 (Beraldi *et al.*, 2006), et ce trait se révèle déterminé par une substitution dans le gène *TYRP1* (Gratten *et al.*, 2007).

2) l'approche gène candidat, qui consiste à étudier un (ou quelques) gène(s) en particulier, sur la base des connaissances préalables sur le trait phénotypique, comme les mécanismes biochimiques ou encore le déterminisme génétique chez une espèce proche (Tabor *et al.*, 2002). Par exemple, les gènes *agouti* et *Mcr1*, connus pour être impliqués dans la couleur du pelage chez la souris de laboratoire, ont été étudiés comme gènes candidats chez

un rongeur heteromyidae nord-américain (*Chaetodipus intermedius*), dont la couleur varie selon les populations en fonction de celle du substrat majoritaire (permettant un camouflage) ; quatre mutations non synonymes dans le gène Mcr1 se sont révélées parfaitement associées avec un pelage sombre dans une des deux populations présentant ce phénotype (Nachman *et al.*, 2003).

L'utilisation combinée de plusieurs approches de détermination de loci ayant une importance fonctionnelle est la meilleure façon d'obtenir des résultats fiables (Vasemagi & Primmer, 2005 ; Stinchcombe & Hoekstra, 2008 ; voir par exemple Rogers & Bernatchez, 2005).

Figure 2 Attendus théoriques sur l'effet de la sélection naturelle sur la structure génétique des populations.

Analyses inter-populationnelles : attendus au niveau de la différenciation génétique (Δ) entre deux milieux

	Locus neutre Dérive, flux génique	Locus sous sélection Sélection forte Flux génique
Milieux écologiquement divergents 	Δ_1	$\Delta > \Delta_1$
Milieux écologiquement similaires 	Δ_2	$\Delta < \Delta_2$

Analyses intra-populationnelles : attendus au niveau de la diversité génétique (D)

Neutralité	Sélection directionnelle ou purificatrice	Sélection balancée
Diversité résultant de l'équilibre mutation-dérive D_e	Diversité faible $D < D_e$	Diversité forte $D > D_e$

III- La génétique de la résistance aux pathogènes chez les animaux

La génétique de l'immunité (ou immunogénétique), initiée chez l'homme pour ses applications médicales, se développe aujourd'hui dans les populations naturelles animales. Cet essor est encouragé par les nouvelles données de génomique montrant l'importance des gènes immunitaires qui représenteraient 5 % des gènes chez les Mammifères (Trowsdale & Parham, 2004) et seraient fortement influencés par la sélection naturelle (Vallender & Lahn, 2004). Comme pour les autres traits phénotypiques (voir II-3), la génétique de la résistance / sensibilité aux pathogènes peut ainsi être étudiée par des approches génomiques ou la méthode gène candidat.

1. Approche génomique et génétique de la résistance aux pathogènes

La résistance / sensibilité aux parasites a souvent été montrée comme un trait fortement polygénique (Sorci *et al.*, 1997 ; Hill, 2001 ; Frodham & Hill, 2004). Par exemple, les variations de sensibilité des souris face aux infections bactériennes montrent l'influence de nombreux gènes et des patrons d'hérédité complexes (Lengeling *et al.*, 2001 ; Persson & Vance, 2007). Pourtant, une revue bibliographique récente des études de QTL (*Quantitative Trait Loci*) met en avant l'effet de quelques gènes sur la résistance des animaux aux pathogènes (en moyenne 2.47 ± 1.18 QTL d'effet fort, Wilfert & Schmid-Hempel, 2008). L'approche génomique a même parfois mis en évidence des gènes majeurs, comme le contrôle de l'infection par *Schistosoma mansoni* dans les populations humaines du Brésil dû à une seule région génomique (Abel *et al.*, 1991), contenant plusieurs gènes codant des cytokines³ (Marquet *et al.*, 1996).

Les différents loci interagissent entre eux (phénomène d'épistasie) pour déterminer le phénotype de résistance / sensibilité (Hirschhorn & Daly, 2005 ; Wilfert & Schmid-Hempel, 2008 ; voir par exemple Wegner *et al.*, 2008). Cependant, mettre en évidence les effets épistatiques est difficile statistiquement, et il semble que la prise en compte des effets additifs soit suffisante pour déterminer les loci importants dans la plupart des cas (Cordell, 2002).

2. Quelques gènes majeurs spécifiques

Quelques exemples de gènes jouant un rôle majeur dans la résistance / sensibilité aux pathogènes sont bien documentés chez l'homme (Quintana-Murci *et al.*, 2007), montrant que la relation 'un gène, une infection' peut se vérifier dans certains cas (Casanova & Abel, 2007). L'absence de l'antigène Duffy à la surface des érythrocytes est ainsi associée à une protection complète contre *Plasmodium vivax* (Miller *et al.*, 1976). Ce phénotype est codé par une mutation ponctuelle dans le promoteur du gène associé (Tournamille *et al.*, 1995), mutation qui est presque fixée dans les populations africaines mais rare en Europe (Hamblin *et al.*, 2002). D'autre part, un allèle mutant du gène Ccr5 confère une résistance à l'infection par le virus HIV (Samson *et al.*, 1996) et retarde la déclaration du SIDA (Dean *et al.*, 1996). Cet allèle est relativement fréquent en Europe et presque absent ailleurs, mais les mécanismes de son évolution restent débattus (Stephens *et al.*, 1998 ; Novembre *et al.*, 2005 ; Sabeti *et al.*, 2005 ; voir chapitre 3 II). Ces deux gènes sont des récepteurs de chémokines, fixant aussi le pathogène et facilitant son entrée dans les cellules ; le mécanisme de défense est donc dans les deux cas une défense cellulaire constitutive empêchant l'entrée du pathogène (Encadré 2).

Dans les populations naturelles animales, l'effet de gènes majeurs sur la résistance aux pathogènes n'a pas été documenté à ma connaissance. En revanche, les découvertes de gènes majeurs faites chez l'homme ou des animaux modèles peuvent permettre de définir des gènes candidats pouvant être étudiés dans les populations naturelles animales. Par exemple, le gène

³ Les cytokines sont un ensemble de molécules ayant un rôle dans la communication intercellulaire au sein du système immunitaire. Les principales familles de cytokines sont les interférons, les interleukines et les chémokines.

codant l'antigène Duffy est associé à l'infection par un pathogène proche des *Plasmodium* et soumis à la sélection dans les populations naturelles de babouins (Tung *et al.*, 2009).

Les gènes majeurs identifiés sont généralement spécifiques d'un pathogène en particulier, tandis que d'autres gènes affectent au contraire différents pathogènes, mais souvent avec un effet modéré (Hill, 2001).

3. Quelques gènes ayant un effet sur de nombreux pathogènes

Dans les populations naturelles, les études se sont souvent focalisées sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), un complexe multigénique fondamental dans la réponse immunitaire des Vertébrés (Janeway *et al.*, 2003). L'importance fonctionnelle du CMH dans la génétique des maladies infectieuses avait déjà été montrée chez l'homme (Hill, 2001 ; Frodham & Hill, 2004), avec par exemple l'association de certains haplotypes avec la guérison de l'hépatite B (Thursz *et al.*, 1995) ou le délai de déclaration du SIDA chez les patients séropositifs (Carrington *et al.*, 1999). L'approche gène candidat a ciblé le CMH pour étudier la résistance / sensibilité à de nombreuses infections en populations naturelles animales. Différentes études (voir Piertney & Oliver, 2006 pour une revue) ont ainsi rapporté des associations entre le contenu parasitaire et des allèles du CMH (Paterson *et al.*, 1998 ; Meyer-Lucht & Sommer, 2005) ou bien le fait d'être hétérozygote pour un gène du CMH (Froeschke & Sommer, 2005 ; Oliver *et al.*, 2009). La comparaison de la structure génétique de marqueurs neutres et de gènes du CMH montre que ces derniers sont affectés par la sélection naturelle (par exemple Landry & Bernatchez, 2001 ; Bryja *et al.*, 2007), probablement une sélection balancée exercée par les pathogènes (Piertney & Oliver, 2006).

Le CMH est ainsi impliqué dans la résistance / sensibilité à de nombreuses maladies avec en général un effet mineur. C'est aussi le cas d'autres loci, comme le gène Nramp (Natural resistance associated macrophage protein) qui est associé à la résistance à au moins trois espèces de bactéries intracellulaires (Lengeling *et al.*, 2001 ; Persson & Vance, 2007). De même, les TLR (Toll-Like Receptors) forment une famille multigénique intervenant dans l'immunité innée (Beutler *et al.*, 2006) dont le gène Tlr-4 notamment est associé à plusieurs maladies infectieuses (Agnese *et al.*, 2002 ; Schroder & Schumann, 2005) et serait sous sélection (Ferwerda *et al.*, 2007) dans les populations humaines. Ces gènes, importants dans la sensibilité à différentes maladies, mais ne faisant pas partie du CMH seront probablement de futurs gènes candidats pour les études en populations naturelles (Acevedo-Whitehouse & Cunningham, 2006). En effet, celles-ci ont rarement étudié des gènes immunitaires non CMH (mais voir Coltman *et al.*, 2001 ; Worley *et al.*, 2006 ; Jensen *et al.*, 2008), bien que les gènes du CMH et les autres gènes immunitaires interviennent chacun pour moitié dans la réponse aux pathogènes (Jepson *et al.*, 1997).

IV- La peste, une zoonose bactérienne

Bien que la peste soit avant tout une maladie des rongeurs, qui n'affecte l'homme que secondairement, c'est en tant que maladie humaine qu'elle a d'abord marqué l'histoire et qu'elle continue d'être crainte de nos jours.

1. Histoire de la peste humaine

La peste est responsable de trois pandémies extrêmement meurtrières (Baltazard, 1960 ; Zietz & Dunkelberg, 2004 ; Fig. 3) :

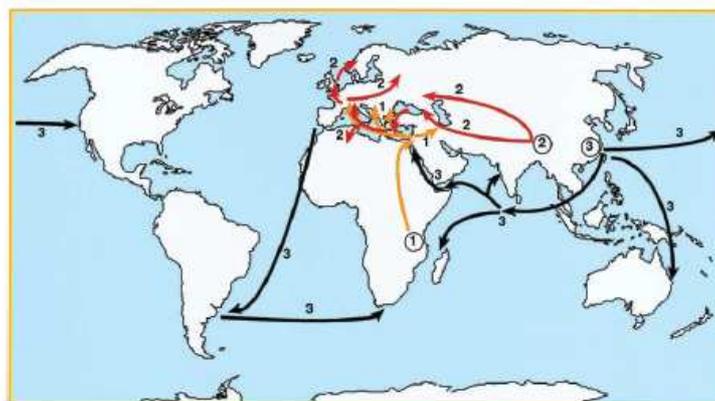
- La peste justinienne des 6-8^{ème} siècles (541-767). Importée d'Afrique de l'Est ou Centrale, elle atteint l'Égypte puis l'Europe méditerranéenne et tue jusqu'à 100 millions de personnes.

- La peste médiévale, qui s'étend sur cinq siècles (14-18^{ème} siècles), se manifestant par des épidémies périodiques. Elle vient d'Asie centrale, et touche l'Asie, l'Afrique du Nord et l'Europe, où la « Mort noire » tue 20 à 30 millions de personnes (30-40% de la population) en cinq ans (1347-1351). A cette époque, on ne sait presque rien de la maladie (Encadré 4), et il n'existe aucun traitement.

- La dernière pandémie a commencé en 1894 et sévit encore actuellement. Elle est partie de Chine (Yunnan) et a particulièrement touché l'Inde et la Chine. Le développement des moyens de transport permet à la maladie d'atteindre des continents jusqu'alors épargnés, comme l'Amérique. Elle s'étend dans l'arrière pays des zones précédemment non touchés, tandis qu'elle reste cantonnée aux ports en Europe. C'est pendant cette pandémie qu'ont été découverts les acteurs de la peste : la bactérie (*Yersinia pestis*), le rat et la puce (Encadré 4).

Figure 3 Routes empruntées par les trois pandémies meurtrières de peste (issu de Achtman *et al.*, 1999).

La peste justinienne en orange, la peste médiévale en rouge et la dernière pandémie en noir. Les origines supposées de chacune des trois pandémies sont marquées d'un cercle.



Encadré 4 La découverte des acteurs de la peste

Au cours de la seconde pandémie, au Moyen Age, les européens ignoraient tout de la peste, attribuant la maladie à un châtement divin: « Un mal qui répand la terreur, Mal que le ciel en sa fureur, Inventa pour punir les crimes de la terre » (La Fontaine). Le seul remède conseillé est « Cito, longe, tarde » (Fuis vite, loin, longtemps).

Pourtant un poème indien, Bhâgavata Purana (attribué au XII^{ème} siècle), dit «Si tu vois un rat tomber du toit et errer dans la ville comme un homme ivre, sauve-toi car la peste est à portée de ta main». De même, un poème Chinois (Yunnan) à la fin du 18^{ème} siècle « Rats morts à l'est, Rat morts à l'ouest, Comme s'ils étaient des tigres, Les gens en ont peur ».

Ce n'est qu'au cours de la dernière pandémie que les acteurs de la peste ont été identifiés.

En 1894, à Hong-Kong, Alexandre Yersin, découvre le bacille de la peste dans les bubons des malades et démontre sa capacité à tuer des rats rapidement. La bactérie ainsi isolée est d'abord nommée *Pasteurella pestis*, puis rebaptisée *Yersinia pestis*. Le rôle des rats, déjà suspecté en Asie par l'observation de mortalité murine précédant les épidémies humaines, est démontré par l'isolement du bacille chez les rats morts.

Paul-Louis Simon suspecte le rôle des puces par la relation entre la trace de leur piqûre (la phlyctène), la localisation du bubon et les symptômes précoces de la maladie. Il démontre leur rôle de vecteur par la transmission expérimentale du bacille à un rat par les puces issues d'un rat malade en 1898.

2. La peste humaine aujourd'hui

Contrairement à une idée répandue, la peste n'est pas seulement une maladie du passé, mais reste au contraire d'actualité. Elle est aujourd'hui classée parmi les infections ré-émérgentes (Chanteau *et al.*, 1998b ; Duplantier *et al.*, 2005 ; Snowden, 2008) et fait partie des trois maladies épidémiques de quarantaine (avec la fièvre jaune et le choléra) encore soumises au règlement sanitaire international et notifiables à l'Organisation Mondiale de la Santé (Dennis *et al.*, 1999). Durant la période de 1954 à 1997, la peste a touché 38 pays et 200 à 6004 cas (1875 cas / 150 décès en moyenne) ont été déclarés dans le monde chaque année (Dennis *et al.*, 1999 ; Fig. 4 et Fig. 5). Ces chiffres sont cependant sous-estimés, en conséquence d'une réticence des pays à déclarer leurs cas, et des problèmes de diagnostic.

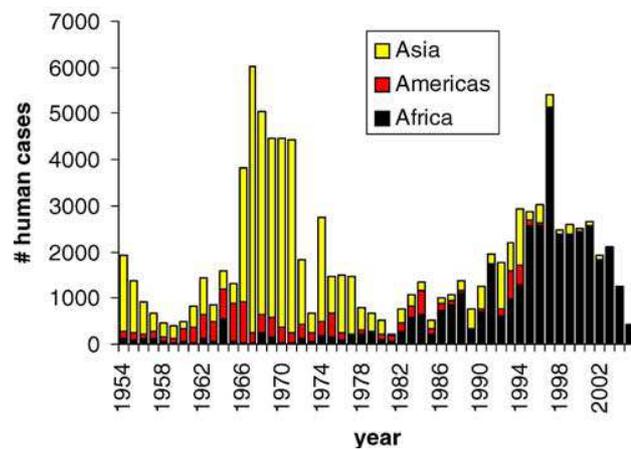
L'Afrique est de plus en plus touchée, avec une augmentation à la fois du nombre de cas et du nombre de pays déclarant des cas dans les dernières décennies (Dennis *et al.*, 1999 ; Stenseth *et al.*, 2008 ; Fig. 5). Des exemples d'épidémies récentes montrent que la géographie des cas n'est pas figée. En 1994, une épidémie recense 876 cas confirmés et 54 décès (plus une panique conduisant à l'exode d'un demi million de personnes) à Surat en Inde où aucun cas n'avait été décrit depuis 1966 (Titball & Leary, 1998). En 2003, onze cas et un décès sont recensés près d'Oran en Algérie alors que la peste était absente de ce pays depuis 50 ans (Bertherat *et al.*, 2007).

Figure 4 Répartition mondiale de la peste actuellement (issu de Gage & Kosoy, 2005)

En gris clair sont représentés les pays ayant reporté des cas entre 1970 et 2004. En gris foncé sont indiqués les foyers de peste naturels probables.



Figure 5 Nombre de cas humains rapportés par an dans le monde entre 1954 et 2005, et répartition par continent (issu de Stenseth *et al.*, 2008).



Introduction

On distingue plusieurs formes cliniques de peste (Dennis *et al.*, 1999 ; Carniel, 2002):

- La peste bubonique est la forme la plus fréquente. Elle est la conséquence d'une piqûre de puce et se caractérise par un syndrome infectieux très sévère (fièvre et dégradation profonde de l'état général) et une hypertrophie du ganglion lymphatique drainant la piqûre (bubon). La bactérie, initialement restreinte au système lymphatique peut ensuite proliférer dans le sang, conduisant à une septicémie, rapidement mortelle (moins d'une semaine). La peste bubonique est fatale dans au moins la moitié des cas non traités.

- La peste pulmonaire est très contagieuse (par les aérosols) et plus grave que la peste bubonique. Elle apparaît lors d'une contamination par voie respiratoire ou peut apparaître secondairement à partir d'une forme bubonique. La peste pulmonaire est létale à presque 100%, avec une évolution vers la mort en moins de trois jours.

- La peste septicémique est l'infection du système sanguin par *Y. pestis*. Elle peut correspondre à la phase terminale des deux formes précédentes (septicémie secondaire), mais apparaît parfois rapidement sans bubon ni infection pulmonaire (septicémie primaire).

L'antibiotique classiquement recommandé pour le traitement de la peste est la streptomycine ; les tétracyclines et le chloramphénicol peuvent aussi être utilisés, seuls ou conjugués (Carniel, 2002). Grâce à l'existence de ces traitements, le taux de mortalité est de 9.2 % des cas de peste en Afrique entre 1980 et 1997 (Dennis *et al.*, 1999). Cependant, différentes souches résistantes aux antibiotiques ont été découvertes à Madagascar (Chanteau, 2006), dont l'une, isolée en 1995, était capable de résister à huit antibiotiques (Galimand *et al.*, 1997 ; 2006). Cette multi-résistance est due à un seul plasmide, récemment acquis par conjugaison avec une autre espèce de bactérie, probablement dans le tube digestif d'une puce (Hinnebusch *et al.*, 2002 ; Galimand *et al.*, 2006). Ce plasmide étant présent chez différentes espèces de bactéries, la probabilité d'un tel événement ne semble pas négligeable, ce qui constitue un grave problème de santé publique (Welch *et al.*, 2007).

Des vaccins à base de souches atténuées ou de cellules tuées (Girard & Robic, 1934) ont été historiquement utilisés contre la peste, par exemple à Madagascar entre 1934 et 1959 (Chanteau, 2006). Ils ont ensuite été abandonnés car leur efficacité et leur innocuité n'étaient pas satisfaisantes. Aujourd'hui, bien que des essais soient en cours sur des combinaisons d'antigènes F1 et LcrV (Williamson *et al.*, 2005), il n'existe pas de vaccin réellement applicable (Titball & Williamson, 2001 ; Cornelius *et al.*, 2007).

La peste a toujours compté parmi les armes biologiques potentielles. Dès 1347, des corps de pestiférés ont été catapultés dans la ville de Caffa (Crimée) par les assiégeants mongols (Audouin-Rouzeau, 2003). Au cours du XX^{ème} siècle, différents pays ont fait des tests visant à rendre *Y. pestis* transmissible par les aérosols (Inglesby *et al.*, 2000). Aujourd'hui elle est crainte en tant que possible arme de bioterrorisme, à cause de sa forte virulence, sa relative facilité de culture et sa disponibilité du fait de la circulation dans les foyers naturels (Inglesby *et al.*, 2000 ; Prentice & Rahalison, 2007). La découverte récente de souches résistantes aux antibiotiques à Madagascar (Galimand *et al.*, 1997) n'a fait qu'exacerber cette crainte.

3. *Yersinia pestis*. Histoire évolutive

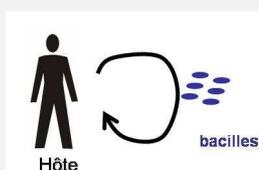
Yersinia pestis est un coccobacille Gram négatif de la famille des Entérobactéries (famille comprenant aussi *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella* notamment ; Perry & Fetherston, 1997). Elle est proche de *Y. pseudotuberculosis*, dont elle aurait divergé il y a 1 500 à 20 000 ans seulement (Achtman *et al.*, 1999). La similarité génétique de ces deux *Yersinia* est telle qu'on pourrait les classer dans la même espèce. La distinction a cependant été conservée car elles présentent une pathologie et une épidémiologie très différente, avec une transmission orofécale pour *Y. pseudotuberculosis* et vectorielle pour *Y. pestis* (Achtman *et al.*, 1999 ; Encadré 5). *Y. pestis* présente la plus forte diversité en Asie qui est donc probablement sa zone d'origine (Achtman, 2004).

Classiquement, les souches de *Y. pestis* étaient divisées en trois biovars, en fonction de leur capacité à fermenter le glycérol et à réduire le nitrate, avec chaque biovar supposé associé à une des trois pandémies (Devignat, 1951). Cependant, des souches atypiques de *Y. pestis* ne correspondent à aucun biovar et les biovars ne se révèlent pas toujours monophylétiques (Achtman *et al.*, 2004 ; Pourcel *et al.*, 2004) révélant une situation plus complexe.

Le séquençage du génome de deux souches virulentes de *Y. pestis* a été réalisé récemment (Parkhill *et al.*, 2001 ; Deng *et al.*, 2002). Bien qu'elles soient très proches génétiquement, *Y. pestis* diffère de *Y. pseudotuberculosis*, par la présence de deux plasmides et par quelques modifications chromosomiques (Hu *et al.*, 1998 ; Lindler *et al.*, 1998). La plupart des facteurs de virulence de *Y. pestis* sont portés par des plasmides.

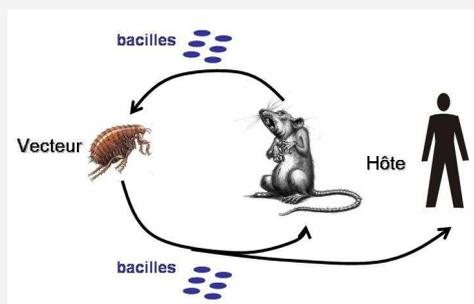
Encadré 5 Mode de transmission des pathogènes. Exemple des bactéries du genre *Yersinia*

Transmission directe



Exemples: voie orofécale: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* ;
voie pulmonaire: *Y. pestis* forme pulmonaire

Transmission par l'intermédiaire d'un vecteur



Exemple: puce: *Y. pestis* forme bubonique

Maladies à vecteurs

Parmi les nombreuses maladies à vecteurs, celles transmises par les puces (Insectes Siphonaptères) sont plutôt rares. On peut citer les bactéries responsables du typhus murin (*Rickettsia typhi*), de la tularémie (*Francisella tularensis*) ou de la maladie des griffes du chat (*Bartonella henselae*) ou encore les poxvirus à l'origine de la myxomatose chez les lapins.

Les vecteurs de maladies les plus classiques sont les moustiques (Insectes Diptères) qui véhiculent notamment le paludisme (*Plasmodium*), la fièvre jaune ou la dengue (deux arbovirus) et les tiques (Acariens Ixodida) qui transmettent par exemple la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*).

4. Transmission et pathologie

La peste est une maladie de mammifères (principalement les rongeurs, voir §5), se transmettant par des vecteurs : les puces (Encadré 5 et Fig. 7). Ces dernières transmettent la bactérie lors de l'injection de sang issu d'un hôte infecté à un hôte sain, mais le détail des mécanismes de transmission de la bactérie par les puces n'est encore pas complètement élucidé aujourd'hui.

Le mécanisme classique de transmission de la bactérie fait intervenir le 'blocage' de la puce (Bacot & Martin, 1914) qui consiste en une multiplication bactérienne située au niveau du proventricule de la puce ; *Y. pestis* forme un biofilm qui obstrue le tube digestif et empêche le sang de passer dans l'intestin de la puce (Hinnebusch *et al.*, 1998 ; Jarrett *et al.*, 2004 ; Encadré 6). La puce, alors affamée, pique fréquemment en régurgitant des bactéries à chaque piqûre, mais elle meurt rapidement du manque de nourriture. Ce phénomène de blocage, total ou partiel, du proventricule est classiquement considéré comme fondamental dans la transmission de la peste (Burroughs, 1947). Cependant, des travaux récents suggèrent que les puces non bloquées joueraient aussi un rôle très important par un mécanisme de transmission précoce, via une régurgitation de la bactérie avant la phase de multiplication au sein du proventricule de la puce (Eisen *et al.*, 2006 ; Eisen *et al.*, 2007). En effet, certaines espèces de puces impliquées dans la transmission de la peste ont de très faibles taux de blocage (Burroughs, 1947 ; Gage & Kosoy, 2005). La transmission avec blocage comprend de plus une période d'incubation de l'ordre de deux semaines (Engelthaler *et al.*, 2000), incompatible avec la rapidité de diffusion de certaines épidémies (Eisen *et al.*, 2006 ; Webb *et al.*, 2007).

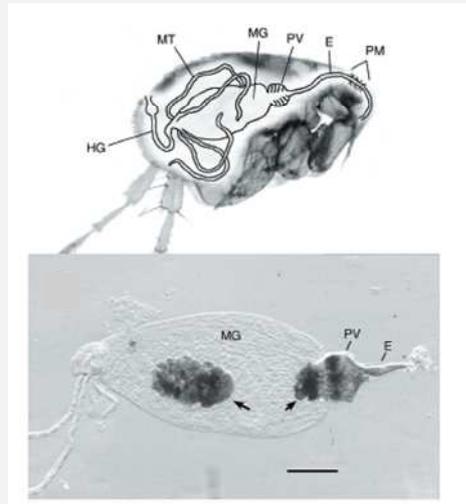
Pour être infectieuse, la puce doit se nourrir d'un sang très concentré en bactéries, et donc sur un animal en forte septicémie⁴ (environ 10^7 bactéries par mL de sang ; Engelthaler *et al.*, 2000 ; Lorange *et al.*, 2005). Des animaux arrivés à un tel stade de la maladie ne survivront généralement que quelques jours (Lorange *et al.*, 2005 ; Sebbane *et al.*, 2005). De plus, contrairement aux tiques et aux moustiques, les puces se nourrissent de façon répétée sur le même hôte et n'en changeront que lors de circonstances particulières comme la mort de l'hôte ou des contacts sociaux rapprochés, par exemple dans le nid ou le terrier (Eisen & Gage, 2009). La transmission de la peste nécessite ainsi la mort de son hôte et ne peut donc être assurée qu'en présence de rongeurs fortement sensibles (Engelthaler *et al.*, 2000 ; Hinnebusch, 2005). *Y. pestis* échappe donc à la vision classique voulant qu'un parasite n'ait pas intérêt à tuer son hôte. En réalité, les parasites évoluent vers un niveau de virulence qui maximise leur transmission (Ewald, 1983), et dans ce cas la transmission vectorielle peu efficace de *Y. pestis* (petit nombre de bactéries transmises, Lorange *et al.*, 2005 ; Encadré 6) conduit à une sélection pour une virulence accrue (Hinnebusch, 2005 ; Lorange *et al.*, 2005 ; Margolis & Levin, 2007).

⁴ Infection générale grave de l'organisme par des pathogènes ; elle consiste en une association d'une forte bactériémie (quantité de bactéries présentes dans le sang) et d'un syndrome de réaction inflammatoire systémique (température, augmentation du taux de leucocytes...)

Encadré 6 Mécanisme du blocage de la puce (*Xenopsylla cheopis*) et transmission de *Yersinia pestis*

Anatomie d'une puce

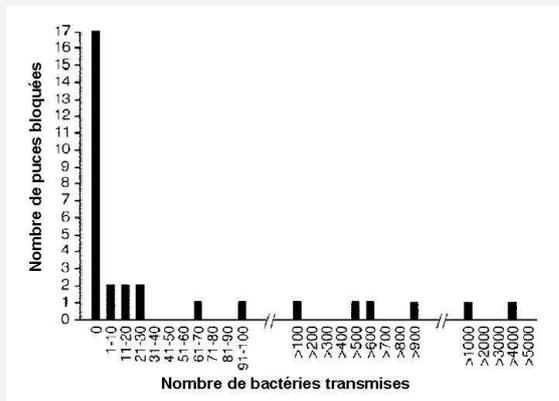
muscles qui pompent le sang vers l'intestin moyen (PM), tubes de Malpighi (MT) oesophage (E), proventricule (PV), intestin moyen (MG), intestin postérieur (HG).



Issu de Hinnebuschet al. (2005)

Tube digestif d'une puce bloquée

Microscopie montrant les amas bactériens présents au niveau du proventricule et de l'intestin moyen.



Issu de Lorange et al. (2005)

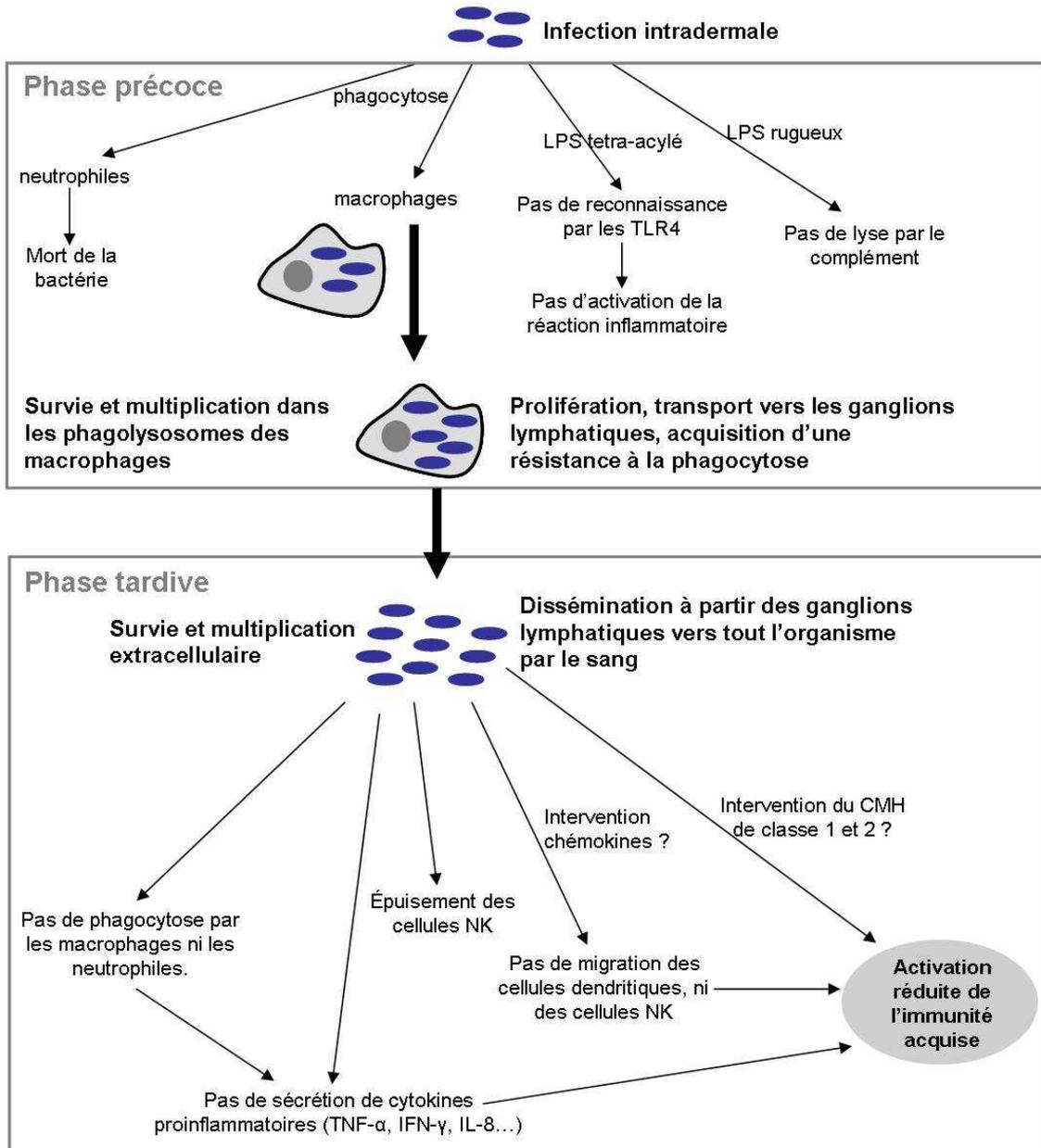
Nombre de bactéries transmises par les puces bloquées

La plupart (environ 55%) des puces bloquées ne transmettent pas la peste. Dans les cas de transmission, le nombre de bactéries inoculé est très variable (quelques unes à plus de 4000).

L'infection de l'hôte mammifère par *Y. pestis* se fait au niveau de la piqûre de la puce. La bactérie transite ensuite vers le ganglion lymphatique drainant le site d'inoculation, en survivant et se multipliant dans les macrophages (phase précoce intracellulaire ; Lukaszewski *et al.*, 2005 ; Pujol & Bliska, 2005). Elle échappe à la reconnaissance par le système immunitaire inné et à la lyse dans les phagolysosomes des macrophages (Fig. 6). Le nœud lymphatique, gonflé, devient le caractéristique bubon. Les bactéries deviennent alors extracellulaires, passent dans la circulation sanguine (phase tardive) et se multiplient rapidement (Fig. 6). L'hôte infecté présente alors une forte septicémie, conduisant rapidement vers la mort (voir Sebbane *et al.*, 2005 pour le déroulement de la pathologie chez le rat).

Contrairement aux facteurs de virulence de la bactérie, qui commencent à être bien caractérisés (Zhou & Yang, 2009), la réponse de l'hôte à *Y. pestis* a été relativement peu étudiée (Turner *et al.*, 2008).

Figure 6 Déroulement de l'infection de l'hôte mammalien par *Yersinia pestis* (d'après Li & Yang, 2008)

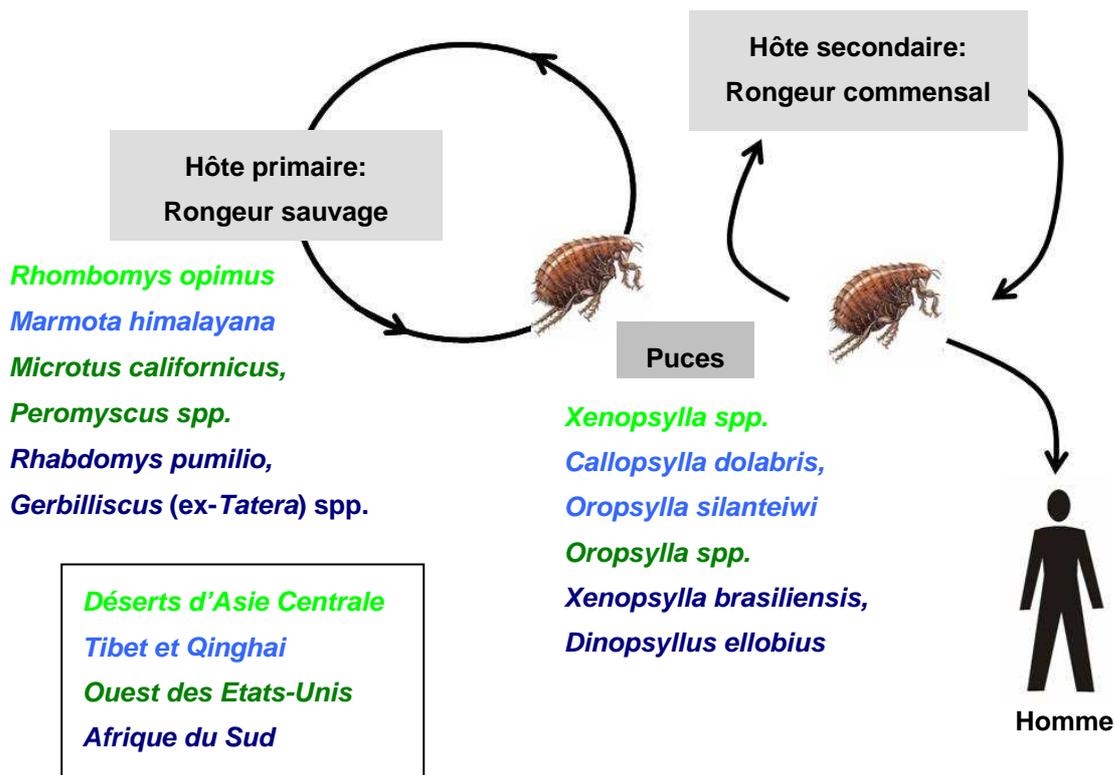


5. L'écologie de la peste

Des foyers naturels de peste couvrent 6-7% des terres émergées en Asie, Afrique et Amérique (Anisimov *et al.*, 2004 ; voir Fig. 4). Dans certains foyers, la peste circule de façon importante chez les rongeurs avec peu de cas humains. Ainsi aux Etats-Unis, les problèmes de santé publique liés à la peste sont limités, mais la peste est considérée comme un problème de conservation (Biggins & Kosoy, 2001). En effet, les écureuils terrestres (ou chiens de prairies, *Cynomys ludovicianus*), chez qui les épidémies de peste font des ravages, sont une espèce clé de l'écosystème : ils sont notamment les proies exclusives et les bâtisseurs des terriers du putois à pieds noirs (*Mustela nigripes*), une espèce gravement menacée (Hanson *et al.*, 2007).

Bien que l'épidémiologie et l'écologie de la peste, maladie emblématique, ait été étudiée pendant un siècle, de nombreux aspects de la circulation de la peste dans les foyers sauvages restent encore mal compris (Eisen & Gage, 2009). Chaque foyer pesteux présente des caractéristiques propres, mais tous ont en commun des hôtes mammifères et des puces (Siphonaptères) comme vecteurs (Fig. 7). Plus de 80 espèces de puces sont supposées capables de transmettre la peste, mais leur capacité vectorielle est variable (Hinnebusch, 2005). La puce orientale du rat (*Xenopsylla cheopis*) est considérée comme la puce pestigène par excellence en raison de sa répartition cosmopolite et de sa capacité avérée à transmettre *Y. pestis* (Burroughs, 1947). Cependant, chaque région présente des espèces de puces jouant un rôle important comme celles du genre *Oropsylla* aux Etats-Unis (Fig. 7), ou *Nosopsyllus fasciatus* en Europe durant la deuxième pandémie (Audouin-Rouzeau, 2003). L'intervention de la puce de l'homme *Pulex irritans* dans la transmission interhumaine est souvent évoquée (Drancourt *et al.*, 2006 ; Laudisoit *et al.*, 2007), bien qu'il semble clair qu'elle est un mauvais vecteur de la peste (Audouin-Rouzeau, 2003).

Plus de 200 espèces de rongeurs, mais aussi quelques lagomorphes et insectivores ont été trouvés infectés par *Y. pestis* en conditions naturelles (Dennis *et al.*, 1999 ; Gage & Kosoy, 2005). Cependant, le nombre d'espèces jouant un rôle dans la transmission et la persistance de la peste est bien plus réduit (Eisen & Gage, 2009). La transmission de *Y. pestis* nécessite la mort de l'hôte (voir §4) et donc des individus sensibles à la peste. Cependant, une population très sensible sera rapidement éradiquée par la peste. Les rongeurs résistants permettent ainsi (i) le maintien de la population d'hôte, (ii) le maintien de la population de puces par la possibilité de repas de sang non infectieux (dans le cas de puces se bloquant, voir §4), (iii) la dispersion des puces infectieuses, et (iv) la dilution du taux de contact entre puces infectieuses et hôtes sensibles. Ainsi, les populations de réservoirs présentent généralement une hétérogénéité pour la résistance à la peste (Gage & Kosoy, 2005 ; Fig. 7, voir §6). D'autre part, les hôtes doivent être fortement parasités par des puces vectrices, ce qui est le cas des rongeurs vivant dans des terriers (ou dans des nids) contenant des populations importantes de puces (Gage & Kosoy, 2005).

Figure 7 Le cycle classique de transmission de la peste.

Les principaux hôtes de *Yersinia pestis* dans quatre exemples de foyers de peste (Dennis et al., 1999 ; Gage & Kosoy, 2005)

Les déserts d'Asie Centrale (notamment au Kazakhstan) sont un foyer de peste important et très étendu. La grande gerbille (*Rhombomys opimus*, Muridae, Gerbillinae) est l'hôte principal de la peste. Sa population est au moins partiellement résistante à la peste et des mortalités massives ne sont pas observées.

En Chine, on dénombre dix foyers de peste présentant chacun des hôtes, ainsi que des variants de *Y. pestis*, différents. Par exemple, dans le vaste foyer des prairies du Tibet et Qinghai (qui est celui présentant le plus de cas humains), les hôtes primaires sont des marmottes (*Marmota himalayana*, Sciuridae, Xerinae) qui présentent une résistance partielle à la peste.

Le foyer Nord-Américain (grandes plaines de l'ouest des Etats-Unis) est issu de la dernière pandémie. Des épidémies importantes ont lieu chez des rongeurs sensibles non commensaux, les chiens de prairies (*Cynomys ludovicianus*, Sciuridae, Sciurinae). Ces rongeurs ne seraient alors que des hôtes secondaires, bien que certains auteurs supposent qu'ils pourraient assurer la persistance de la peste à eux seuls grâce à une structure spatiale permettant une progression lente des épidémies. La vision plus classique est l'intervention de populations de rongeurs résistants tels que les souris du genre *Peromyscus* (Cricetidae, Neotomyinae) ou *Onychomys leucogaster* (Cricetidae, Neotominae) ou les campagnols *Microtus californicus* (Muridae, Arvicolinae).

L'Afrique du Sud est aussi un foyer de peste récent (début du 20^{ème} siècle). Les gerbilles (*Gerbilliscus* spp. ou *Desmodillus auricularis*, Muridae, Gerbillinae) sont supposées être les réservoirs principaux, bien que la souris rayée (*Rhabdomys pumilio*, Muridae, Murinae) et les espèces du genre *Mastomys* (Muridae, Murinae) jouent probablement aussi un rôle important. Parmi ces dernières, *M. natalensis*, résistante, est présente là où la peste humaine est absente (depuis au moins 60 ans), tandis que *M. coucha*, sensible et commensale, contribue probablement à la transmission à l'homme, puisque son aire de répartition correspond avec celle des cas de peste humaine.

Les hôtes remplissant ces caractéristiques (résistance hétérogène et index pulicidien⁵ élevé), et ayant été montrés comme importants dans l'écologie de la peste, sont principalement des écureuils terrestres (sous-famille des Xerinae, tribu des Marmotini) ou des gerbilles (sous-famille des Gerbillinae) (Fig. 7). Ils constituent les hôtes enzootiques ou hôtes primaires, capables à eux seuls de maintenir la maladie, tandis que les hôtes épizootiques ou hôtes secondaires conduisent à une diffusion rapide de la maladie mais pas à son maintien à long terme (Fig. 7). Cette séparation entre cycle enzootique et épizooties est sûrement schématique (Gage & Kosoy, 2005) et semble même inappropriée dans certains cas comme par exemple pour le foyer nord-américain (Eisen & Gage, 2009 ; Fig. 7). En effet, il semble que la peste puisse se maintenir au sein de populations d'hôtes sensibles (les chiens de prairies dans le cas des Etats-Unis) structurées en métapopulation avec des épidémies ne se transmettant pas trop rapidement d'une sous-population à l'autre (Collinge *et al.*, 2005 ; Gage & Kosoy, 2005 ; Stapp *et al.*, 2008 ; Eisen & Gage, 2009). Les éléments de l'épidémiologie de la peste restant aujourd'hui mal compris incluent aussi la survie de la bactérie entre les périodes de transmission, par exemple dans le cas où la peste circule de façon saisonnière (Dennis *et al.*, 1999). Les hypothèses incluent une survie potentielle de *Y. pestis* dans le sol à long terme (Ayyadurai *et al.*, 2008 ; Eisen *et al.*, 2008) ou le maintien chez des rongeurs hibernants qui développeraient la maladie lors de la sortie de l'hibernation (Bizanov & Dobrokhotova, 2007).

6. Résistance des hôtes et épidémiologie de la peste

La nécessité d'un stade septicémique léthal pour la transmission de la peste implique un rôle fondamental des variations de résistance / sensibilité des hôtes (voir §5). Ainsi le ratio d'individus résistants (survivant à l'infection) et sensibles (mourant de peste) influence le rôle qu'une population peut jouer dans la persistance de la peste (Biggins & Kosoy, 2001 ; Gage & Kosoy, 2005). Une étude de modélisation a montré que la peste peut persister à l'état endémique pendant plusieurs années si la proportion d'individus sensibles dans la population est comprise entre 25 et 50 % (Keeling & Gilligan, 2000a ; 2000b). Les hôtes principaux de la peste (comme la grande gerbille *Rhombomys opimus* au Kazakhstan par exemple, Fig. 7) sont en général au moins partiellement résistants (Gage & Kosoy, 2005 ; Begon *et al.*, 2006). Cependant, la variabilité intraspécifique est souvent importante. La résistance des hôtes à *Y. pestis* dépend ainsi de nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, le statut physiologique et immunologique, ou encore la saison (Twigg, 1978 ; Gage & Kosoy, 2005). Des variations spatiales de résistance ont aussi été montrées au niveau intraspécifique, avec des populations résistantes dans les zones où la peste est endémique, et des populations sensibles là où la maladie est absente, chez *Microtus californicus* (Quan & Kartman, 1962) et *Onychomys leucogaster* (Thomas *et al.*, 1988) en Amérique du Nord, ou chez *Rhabdomys pumilio* en Afrique du Sud (Shepherd *et al.*, 1986b). Le déterminisme génétique de cette résistance n'a

⁵ L'index pulicidien est le nombre de puces moyen par individu d'hôte.

été étudié à notre connaissance que chez *M. californicus*, suggérant une résistance dominante et probablement polygénique (Hubbert & Goldenberg, 1970).

V- Le modèle biologique étudié : le rat noir et la peste à Madagascar

1. *Rattus rattus*, une espèce nuisible introduite partout dans le monde

Le rat noir (ou rat des greniers, ou encore rat des bateaux) *Rattus rattus* (Linnaeus 1758) est un rongeur de la famille des Muridés, sous-famille des Murinés, de la tribu des Rattini (Musser & Carleton, 2005). Le genre *Rattus* (au moins 65 espèces) a pour origine et zone de diversification l'Asie du Sud-Est (Musser & Carleton, 2005). Le rat noir *R. rattus* appartient à un complexe d'espèces (Pagès *et al.*, en révision) originaire d'Inde. Au sein de ce complexe, *R. rattus* (parfois appelé type Océanien au sein du complexe *R. rattus*) présente en général $2n = 38$ chromosomes (rarement 40), ce qui le distingue de son espèce sœur *R. tanezumi* à 42 chromosomes (Baverstock *et al.*, 1983).

L'expansion géographique des rongeurs commensaux, comme le rat noir, est fortement liée à l'histoire humaine (Searle, 2008). Les routes de colonisation empruntées par les rongeurs peuvent être retracées à partir de marqueurs génétiques supposés neutres (voir III-2) et utilisées pour en inférer les migrations humaines (voir par exemple Britton-Davidian *et al.*, 2007 ; Matisoo-Smith & Robins, 2009 ; Encadré 7). Dans le cas du rat noir, peu d'études génétiques ont été réalisées pour décrire les voies de colonisation (mais voir Abdelkrim *et al.*, 2005 ; Hingston *et al.*, 2005) et les données disponibles sont principalement historiques et archéologiques. On trouverait ainsi le rat noir en Mésopotamie au 3^{ème} millénaire avant JC (Pascal *et al.*, 2006). Il serait arrivé en Europe méditerranéenne vers les 2-4^{èmes} siècles avant JC mais serait d'abord resté cantonné aux principales routes commerciales, avant de s'étendre autour des 11-13^{èmes} siècles, profitant de la rapide expansion humaine (Audouin-Rouzeau & Vigne, 1994). La colonisation de nombreuses autres parties du monde s'est probablement faite à partir de l'Europe, comme par exemple celle des îles du Pacifique par les bateaux de Cook en 1785 (De Graaf, 1981). Aujourd'hui, le rat noir est présent sur tous les continents (Fig. 8).

Dans les zones où il a été introduit, le rat noir est responsable de nombreux préjudices pour l'homme, de la même façon que les autres espèces du genre *Rattus*. Tout d'abord, en agriculture, les rats causent des dégâts dans les stocks de nourriture et les cultures, notamment les rizières (Stenseth *et al.*, 2003 ; Meerburg *et al.*, 2009b). De plus, le rat noir pose un problème important en conservation car sa présence affecte les espèces natives, notamment les oiseaux dans les îles (Townsend *et al.*, 2006 ; Jones *et al.*, 2008). Enfin, au niveau sanitaire, les rongeurs sont les réservoirs de nombreuses pathogènes transmissibles à l'homme (Gratz, 1997 ; Mills & Childs, 1998 ; Meerburg *et al.*, 2009a). Le rat noir est en particulier impliqué dans la transmission de maladies bactériennes, comme le typhus murin (zoonose à *Rickettsia typhi* transmise par les puces) ou la leptospirose (due à la bactérie *Leptospira interrogans*), de pathologies virales, comme les fièvres hémorragiques dues aux hantavirus, ou encore

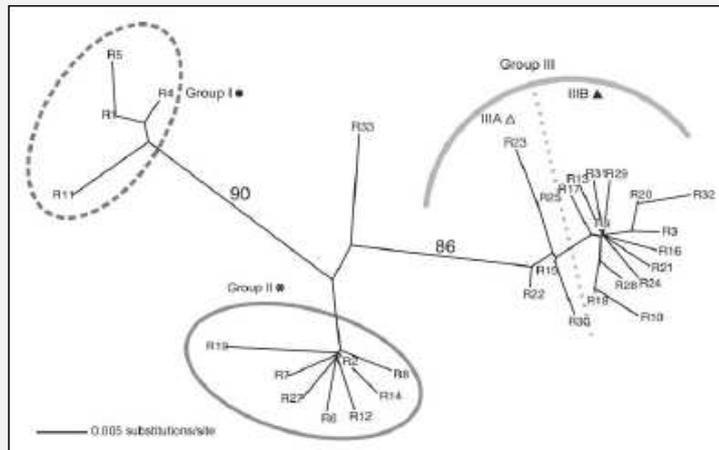
Introduction

d'infections parasitaires, comme la schistosomose (trématodes du genre *Schistosoma*) ou la leishmaniose (rhizoflagellés du genre *Leishmania*).

Encadré 7 La génétique des rats comme témoins de l'histoire humaine, l'exemple de *Rattus exulans* dans le Pacifique

L'histoire de l'installation de l'homme dans les îles du Pacifique reste un objet de débats. Le manque de diversité empêche l'étude de la génétique humaine d'apporter des réponses satisfaisantes et l'utilisation d'un *proxy* d'avère donc nécessaire. Le rat du Pacifique, *R. exulans*, était transporté intentionnellement dans les bateaux des colonisateurs pour servir de source de nourriture. La colonisation des îles du Pacifique par *R. exulans* est donc très probablement parallèle à celle de l'homme ; elle a été par l'établissement d'une phylogénie basée sur une séquence mitochondriale (environ 240pb de D-loop).

Relations phylogénétiques entre les haplotypes de *R. exulans*. Trois groupes se distinguent nettement.



Localisation géographique correspondant aux haplotypes. Une relation claire existe entre les groupes génétiques et leur localisation géographique.

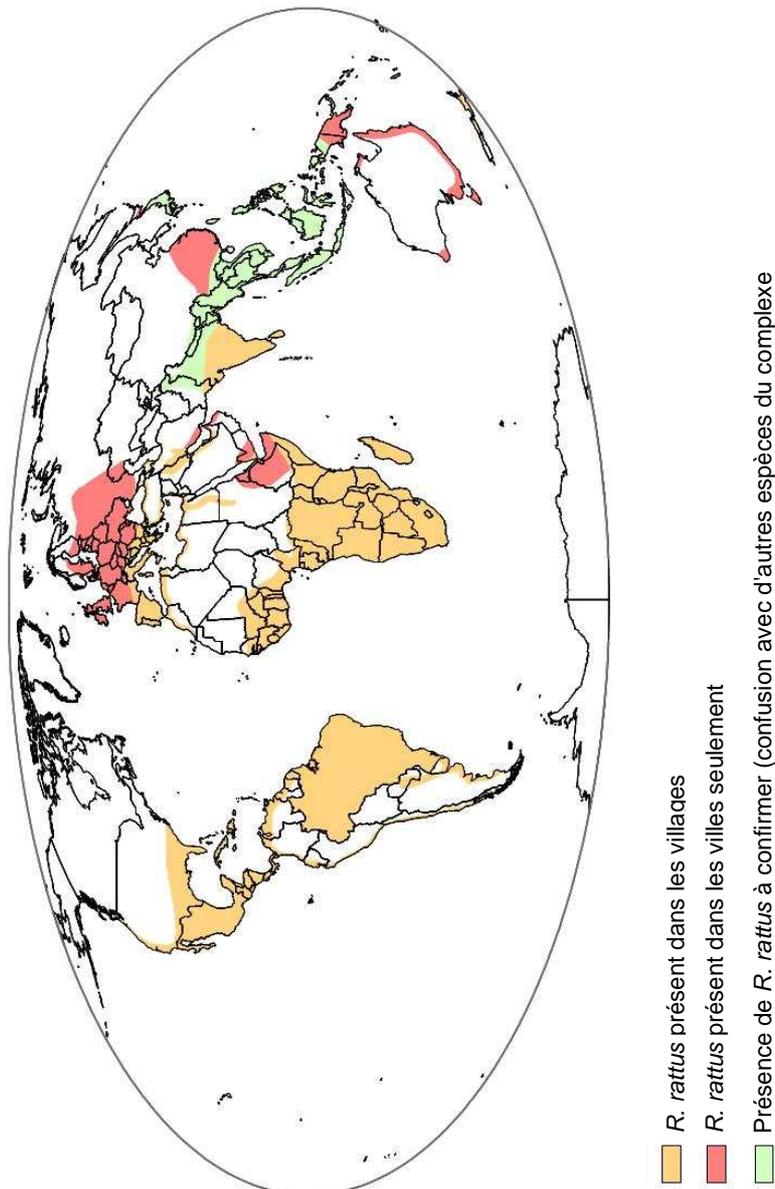
Deux introductions de *R. exulans* en Océanie ont probablement eu lieu, peut-être à partir de la même source (Halmahera ou sa région, entouré en rouge): une première introduction en Océanie proche (groupe II) et une introduction plus tardive en Océanie éloignée (groupe III). Cette seconde vague de colonisation a probablement aussi touché l'Océanie proche, mais les îles déjà occupées par des rats n'auraient pas été envahies à cause de la compétition. Étudier la génétique du rat du Pacifique permet ainsi de retracer les colonisations humaines initiales.

D'après Matisoo-Smith & Robins (2004)

A Madagascar en particulier, *R. rattus* est très abondant (voir §3) et il est responsable de sérieux problèmes en agriculture et en santé (Duplantier & Rakotondravony, 1999). De plus, cette île est l'un des points chauds de biodiversité majeurs mondiaux (10 000 espèces de plantes endémiques, Myers *et al.*, 2000) et le rat noir a un impact négatif sur les espèces endémiques (Goodman, 1995 ; Ganzhorn *et al.*, 2003 ; mais voir Ramanamanjato & Ganzhorn, 2001 ; Ganzhorn, 2003), qui peut être dû à l'introduction de pathogènes transmis aux espèces natives (Laakkonen *et al.*, 2003). Ainsi, le rat noir malgache fait partie des populations envahissantes, c'est-à-dire des populations introduites (ou non natives), établies dans un nouvel environnement qui ont un impact négatif sur l'environnement, les activités humaines ou la santé (Lee, 2002 ; Sax *et al.*, 2005).

Figure 8 Aire de répartition du rat noir, *Rattus rattus* à l'échelle mondiale.

Figure réalisée par Sylvain Piry à partir des données de piégeage de l'équipe du CBGP en Afrique et des informations issues de la littérature.



2. La peste à Madagascar

L'historique des cas humains de peste est bien documenté à Madagascar (Brygoo, 1966 ; Encadré 8). La maladie est arrivée dans le pays lors de la troisième pandémie en 1898 à Tamatave ; 288 cas sont déclarés dans cette ville de la côte est, bientôt suivis d'autres épidémies dans les grands ports malgaches (Diego-Suarez, Mahajanga Fort-Dauphin et Mananjary) jusqu'en 1907, puis de nouveau entre 1921 et 1947. Dans la capitale, Antananarivo, la peste fait son apparition en 1921 et elle s'étend ensuite rapidement sur les hauts plateaux centraux. Dans ces régions, la peste fait des ravages jusqu'au début des années 1940, à partir desquelles les campagnes de vaccination massive, l'apparition des traitements, l'utilisation des insecticides et l'assainissement des villes et des villages permettent une diminution drastique du nombre de cas (Brygoo, 1966 ; Chanteau, 2006). L'incidence de la peste est ensuite réduite et stable avec une cinquantaine de cas annuels pendant plusieurs dizaines d'années ; mais elle se remet à augmenter fortement à partir de 1989, probablement en conséquence d'une baisse du niveau de vie de la population malgache et du manque de moyen des services de santé (Chanteau *et al.*, 1998b ; Migliani *et al.*, 2006).

Aujourd'hui, Madagascar est l'un des foyers de peste les plus actifs du monde, représentant environ 40 % des cas mondiaux en 2000-2001 avec 2137 cas suspects et 179 décès (WHO, 2003). C'est aussi l'un des plus étudiés (avec les Etats-Unis et le Kazakhstan). La peste circule au dessus de 800 mètres d'altitude (zone des hauts plateaux centraux) depuis les années 1930 et dans le port de Mahajanga entre 1991 et 1999 (Fig. 9 et Encadré 9). La majorité des cas humains ont lieu dans les villages des hauts plateaux centraux (Migliani *et al.*, 2006). La forme bubonique représente 90% des cas (Migliani *et al.*, 2006) mais des épidémies de peste pulmonaire peuvent survenir exceptionnellement (Ratsitorahina *et al.*, 2000). L'incidence de la maladie présente une saisonnalité bien marquée avec une circulation entre octobre et avril dans la région des hauts plateaux (Chanteau *et al.*, 2000 ; Migliani *et al.*, 2006).

Deux espèces de puces jouent le rôle de vecteur de la peste à Madagascar (Brygoo, 1966 ; Duchemin *et al.*, 2003):

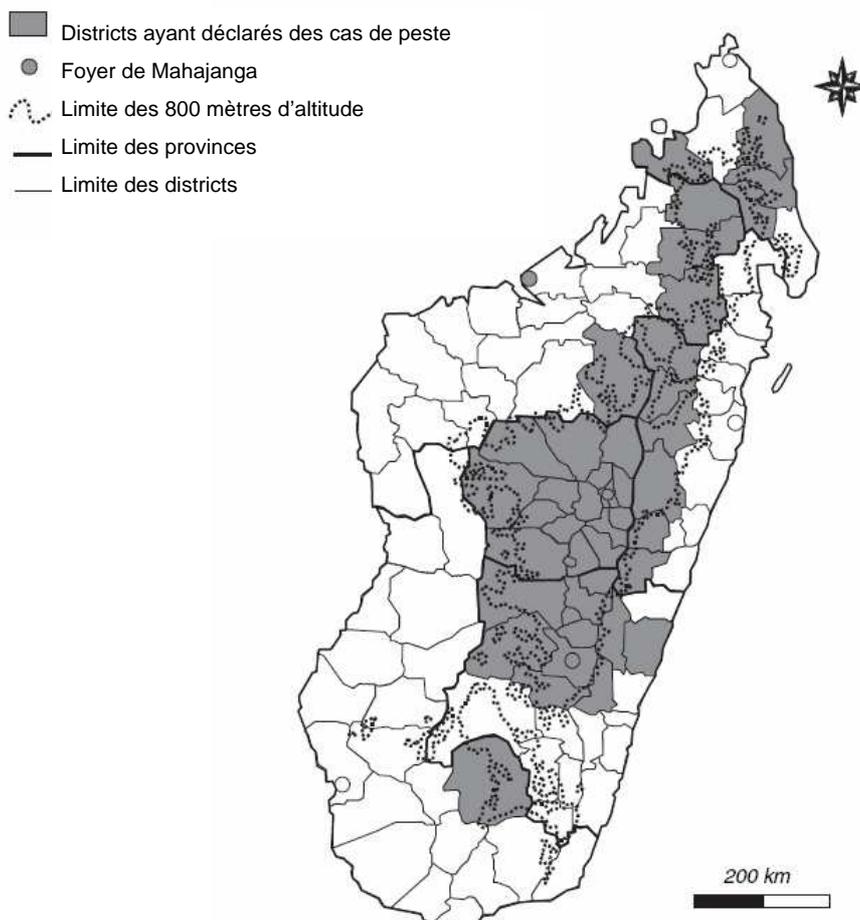
- la puce orientale du rat, *Xenopsylla cheopis* (Rothschild 1903), la puce pestigène cosmopolite, trouvée sur les rats piégés dans les maisons (94 % des puces obtenues) des villages des hauts plateaux, et ainsi très importante dans la transmission de la peste à l'homme (Duchemin, 2003). Cette puce est aussi fréquente hors de la zone d'endémie de la peste, dans les populations de rats de basse altitude.

- une puce endémique de Madagascar, *Synopsyllus fonquerniei* Wagner & Roubaud 1932, trouvée sur les rats piégés à l'extérieur (81-87 % des puces) des maisons des hauts plateaux centraux (rats des rizières et des haies). Sa capacité à s'infecter et à transmettre efficacement la peste a été montrée expérimentalement (Girard, 1942 ; Brygoo, 1967 ; Brygoo & Dodin, 1967). Sa distribution, limitée à la région située à plus de 800 mètres d'altitude, est corrélée avec la géographie de la peste à Madagascar (Duchemin, 2003). Cette puce semble

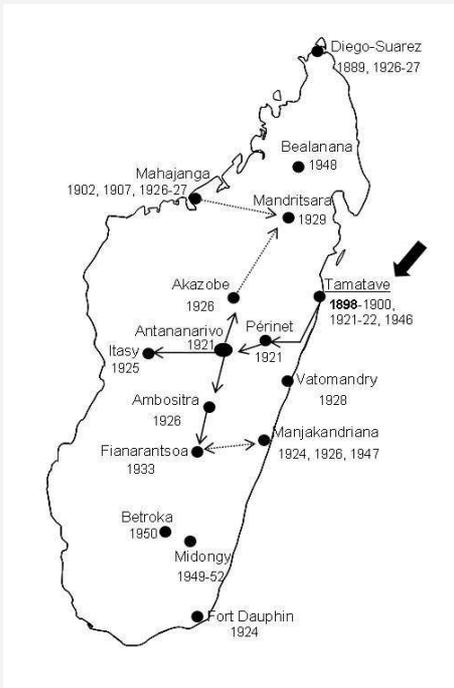
ainsi jouer un rôle important dans la circulation de la peste sur les hauts plateaux malgaches (Duchemin, 2003).

Les souches de *Y. pestis* de Madagascar (actuelles et passées) ne forment pas un groupe monophylétique (Achtman *et al.*, 1999 ; Achtman *et al.*, 2004 ; Encadré 8), ce qui peut être la conséquence d'introductions multiples, une hypothèse en accord avec les données historiques (Encadré 8). D'autre part, une diversification de *Y. pestis* au sein de Madagascar a été mise en évidence par l'apparition de nouveaux variants génétiques dans les régions d'Ambositra et Ambohimahasoia (Guiyoule *et al.*, 1997). L'analyse génétique détaillée des souches de *Y. pestis*, à une échelle locale, rendue difficile par l'homogénéité du génome du bacille de la peste, est maintenant possible grâce à des marqueurs moléculaires hypervariables (Achtman, 2008) et a été réalisée en Arizona (Girard *et al.*, 2004), mais pas encore à Madagascar. La diversité génétique des souches de peste au sein de Madagascar, qui pourrait apporter un éclairage sur l'histoire évolutive du bacille dans le pays, reste ainsi relativement mal connue.

Figure 9 Distribution des cas humains de peste à Madagascar entre 1957 et 2001 (issu de Migliani *et al.*, 2006).



Encadré 8 Histoire de la peste à Madagascar

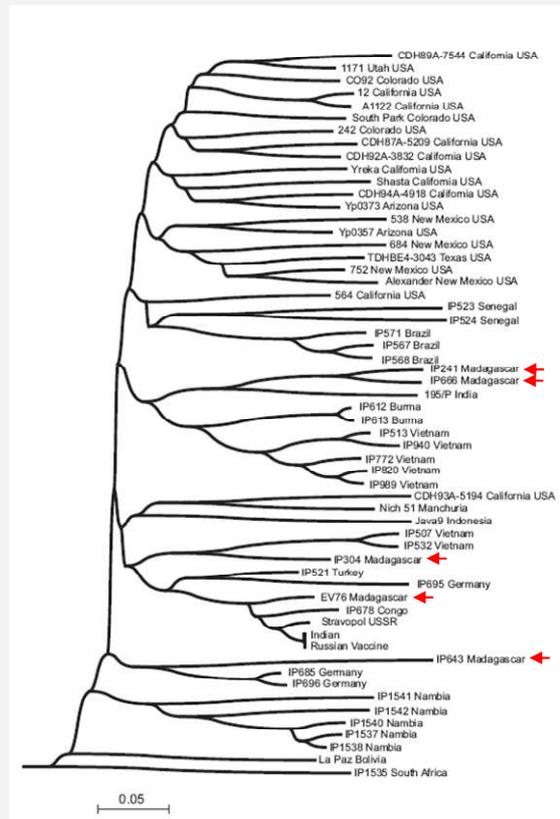


Données historiques concernant les cas humains de peste à Madagascar, témoins de l'arrivée et de la propagation de la maladie dans le pays.

Issu de Chanteau (2006)

Arbre phylogénétique des souches de *Yersinia pestis* trouvées dans les foyers originaires de la troisième pandémie (biovar *Orientalis*, souche ORI). Les souches issues de Madagascar, indiquées avec des flèches rouges, ne forment pas un groupe monophylétique.

Ainsi, bien que la rapidité d'installation de la peste à Madagascar conduise certains à proposer l'hypothèse d'une peste malgache précédant la troisième pandémie (Brygoo, 1966), des arguments biochimiques et les outils moléculaires indiquent bien la relation entre les souches de *Y. pestis* malgaches et celles transmises lors de la dernière pandémie.



Issu de Achtman et al. (2004)

3. *R. rattus*, réservoir de la peste dans villages des hauts plateaux malgaches

A Madagascar, les rongeurs ne sont représentés que par la famille des Muridés (Musser & Carleton, 2005). Il existe une sous-famille de rongeurs endémiques : les Nesomyinae (Jansa *et al.*, 1999 ; Musser & Carleton, 2005) et quelques espèces introduites (voir Annexe A1). Dans les villages des hauts plateaux malgaches où circule la peste, trois espèces de micromammifères dominent le peuplement et toutes ont été introduites : le rat noir *R. rattus*, la souris domestique *Mus musculus* et la musaraigne musquée *Suncus murinus* (Duplantier & Rakotondravony, 1999 ; Encadré 10). Le rat noir est très largement majoritaire dans cette zone, pouvant représenter jusqu'à 98 % des captures (Duplantier *et al.*, 2003). De plus, il est présent dans presque tous les habitats : maisons, cultures et forêts, et dans toutes les régions : du niveau de la mer jusqu'à plus de 2400 mètres d'altitude (Goodman, 1995 ; Duplantier & Duchemin, 2003b), malgré les contrastes écologiques très importants existant entre les différentes régions de Madagascar (Encadré 11). Il est très abondant dans les villages des hauts plateaux centraux, notamment dans les haies de sisal qui entourent les maisons (Rahelinirina & Duplantier, 1997 ; Rahelinirina, 2009, Fig. 10). Ainsi, le rat noir est la seule espèce susceptible de jouer le rôle de réservoir de la peste dans ces villages des hauts plateaux centraux où les indicateurs de circulation du bacille (cas humains et séroprévalence murine) sont forts (Brygoo, 1966 ; Duplantier *et al.*, 2003 ; mais voir Encadré 9 pour la peste circulant en forêt et le foyer du port de Mahajanga).

La réponse à la peste des populations naturelles de rat noir a été peu étudiée. Quan *et al.* (1965) ont trouvé une DL₅₀ (dose létale pour la moitié des individus) inférieure à 100 bactéries chez des *R. rattus* sauvages venant de Hawaï. Chen & Meyer (1974) rapportent cependant un niveau de résistance plus élevé en Californie, mais leur jeu de données est réduit (un rat sur dix décédé à une dose de 5550 bactéries). En général, le rat noir est plutôt considéré comme un rongeur sensible (Dennis *et al.*, 1999). Attribuer le rôle de réservoir de la peste à Madagascar à cette espèce est alors un paradoxe, mis en évidence dès 1966 (Brygoo, 1966), au vu de la persistance de la maladie sur les hauts plateaux depuis presque un siècle (Duplantier *et al.*, 2003), auquel deux hypothèses non exclusives peuvent répondre. Premièrement, la peste pourrait se maintenir dans des populations sensibles de rat noir si celles-ci sont structurées et que la maladie se transmet lentement entre les sous-populations (voir IV-5). En faveur de cette hypothèse, les populations malgaches de *R. rattus* sont structurées à petite échelle (Gilabert *et al.*, 2007 ; Rahelinirina, 2009), et les niveaux de séroprévalence peuvent être variable entre villages voire même entre milieux au sein d'un village (Dromigny, 1997 ; Rahelinirina, 2009). Deuxièmement, les populations de rat noir pourraient être résistantes à Madagascar, ce qui est étayé par des travaux expérimentaux. Rahalison *et al.* (2003) ont en effet montré qu'une population de rats noirs échantillonnée à Antananarivo (zone de peste) est très résistante (DL₅₀ d'environ 10⁵ bactéries), tandis qu'une population venant de la côte est (zone sans peste) est très sensible (DL₅₀ inférieure à 100 bactéries) à l'infection expérimentale par *Y. pestis*. La même différence a été obtenue pour des rats nés en captivité (Rahalison *et al.*, 2003), montrant que la résistance à la peste est

héréditaire. Elle serait partielle puisque des villageois relatent encore parfois l'observation historique classique de mortalités murines précédant les cas humains (Duplantier et al., 2001 ; P. Handschumacher, com. pers.)

Encadré 9 La peste à Madagascar à l'exception des villages des hauts plateaux centraux

- La peste à Mahajanga

Absente entre 1928 et 1990, la peste ré-apparaît soudainement à Mahajanga en 1991 avec 170 cas suspects. Entre 1995 et 1999, des épidémies eurent lieu chaque année durant la saison sèche (août à octobre). En 1999, des mesures drastiques d'assainissement de la ville sont prises et mettent fin aux épidémies. Les populations de micromammifères sont dominées par la musaraigne *Suncus murinus*, qui représente 75-90 % des captures. Cette espèce porte régulièrement la puce *Xenopsylla cheopis* et présente une séroprévalence élevée. La saisonnalité et les hôtes sont donc différents des villages des hauts plateaux. Les souches bactériennes de Mahajanga seraient pourtant originaires du foyer des hauts plateaux centraux.

(Boisier et al., 2002 ; Duplantier et al., 2005 ; Chanteau, 2006)

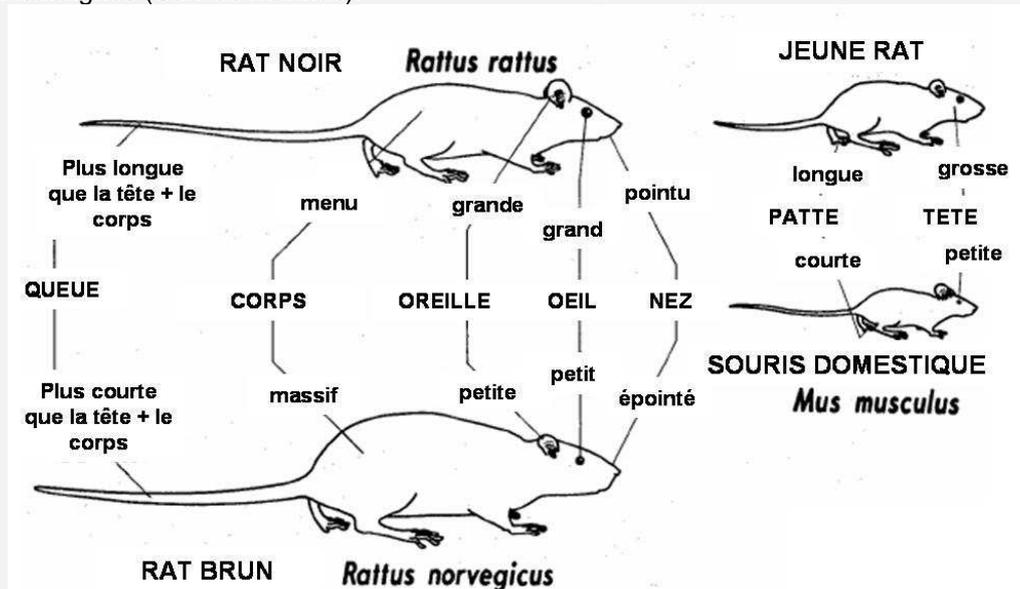
- La peste sylvatique

Des épidémies de peste ont parfois eu lieu à proximité de zones forestières à plus de 800 mètres d'altitude. Le rat noir, mais aussi des rongeurs et insectivores endémiques, tous porteurs de puces vectrices, sont trouvés dans ces forêts. Des antigènes spécifiques de la peste ont été détectés sur plusieurs espèces de Nesomyinae et une souche de *Y. pestis* a déjà été isolée sur un tenrec, *Hemicentetes nigriceps* (Annexe A1). C'est à proximité de zones forestières qu'ont été trouvées de nouvelles souches de peste. Les foyers sylvatiques présentent donc de nombreuses caractéristiques les distinguant de ceux des zones rurales. Les interactions entre les deux types de foyers restent mal connues.

(Duplantier et al., 2001 ; Duplantier et al., 2005 ; Chanteau, 2006 ; Duchemin et al., 2007)

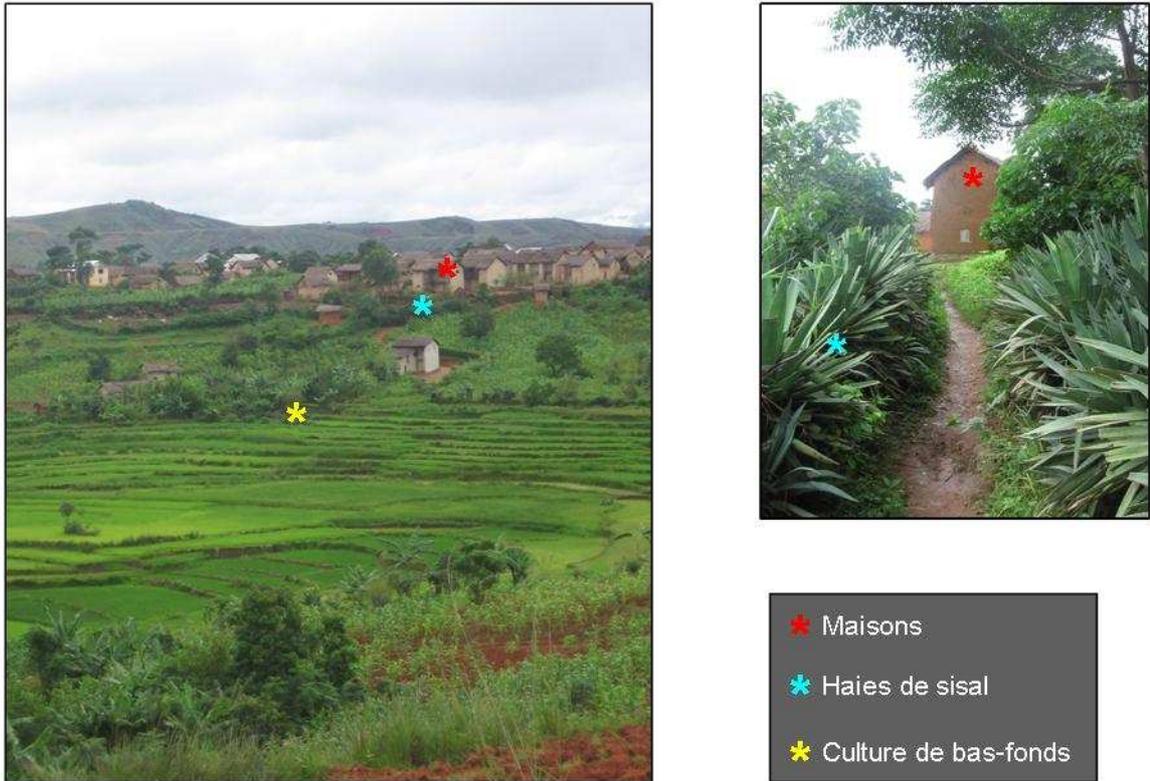
Encadré 10 Critères d'identification des rongeurs introduits à Madagascar

Le rat brun (*Rattus norvegicus*) ne se trouve que dans les villes. Dans les villages, le rat noir (*R. rattus*) est le rongeur le plus abondant, représentant environ 95 % des captures de micromammifères. Les autres espèces capturées généralement sont des souris (*Mus musculus*) et des musaraignes (*Suncus murinus*).



D'après Prince et al. (1965)

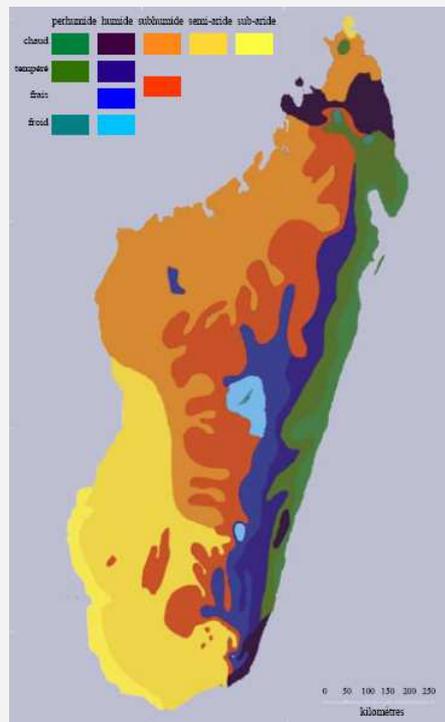
Figure 10 Photos illustrant les différents milieux des villages des hauts plateaux malgaches (ici par exemple dans la région d’Inanantonana) où le rat noir est abondant.



Encadré 11 Les principaux bioclimats rencontrés à Madagascar

L'exposition ou pas aux pluies venant de l'Océan Indien (zone est beaucoup plus humide que l'ouest) et l'altitude (chaîne montagneuse centrale nord-sud, plateaux centraux élevés et donc froids) sont les principaux facteurs déterminant les zones climatiques à Madagascar.

Ces différences climatiques, notamment les différences de pluviométrie, se traduisent par des différences de végétation.



Issu de Chanteau (2006), d'après Koechlin et al. (1974)

VI- Problématique, objectifs et plan de la thèse

Le rat noir, *Rattus rattus*, réservoir de la peste dans les villages des hauts plateaux de Madagascar, est un réservoir atypique par rapport à ceux des autres foyers de peste dans le monde. Les programmes de recherche de l'Institut de recherche pour le Développement (IRD) et de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM), visent à mieux comprendre la circulation de la peste sur les hauts plateaux malgaches, en particulier le rôle joué par le rat noir. Dans ce cadre, une piste d'investigation est l'étude des déplacements et de la structure génétique locale des rats noirs, de façon à de tester l'hypothèse d'une structuration de l'espèce réservoir permettant la persistance de la peste même chez un hôte sensible (Rahelinirina, 2009).

L'autre voie de recherche, explorée dans cette thèse, porte sur la résistance des rats noirs à la peste ; celle-ci étant une autre hypothèse pouvant expliquer la persistance de la maladie à Madagascar. En effet, les résultats de Rahalison *et al.* (2003) montrent une résistance à la peste de *R. rattus*, héritable et restreinte au foyer de peste. Cette résistance est probablement apparue récemment, en réponse à la pression de sélection exercée par les épidémies de peste sur les hauts plateaux de Madagascar. On serait alors dans le cas d'une adaptation très rapide (un siècle). Dans ce contexte, l'histoire évolutive récente du rat noir malgache expliquerait sa capacité à jouer le rôle de réservoir de la peste.

Le rat noir est une espèce introduite par l'homme à Madagascar, récemment à l'échelle évolutive, et a donc probablement subi un goulot d'étranglement lors de son introduction conduisant à une diversité génétique réduite (prédiction théorique, Nei *et al.*, 1975 ; généralement vérifiée empiriquement, Dlugosch & Parker, 2008). Or, la réponse à la sélection naturelle dépend de l'intensité de la sélection et du niveau de diversité génétique pour le trait sous sélection (Fisher, 1930 ; Crow, 2002). Il semble donc étonnant qu'une espèce introduite, et donc probablement peu diversifiée, puisse s'adapter rapidement à l'apparition d'un nouveau pathogène (Frankham, 2005 ; Wares *et al.*, 2005). Cependant, l'histoire de l'invasion influe sur les capacités d'adaptation des populations, la diversité génétique pouvant par exemple être maintenue grâce à des introductions multiples (Lockwood *et al.*, 2005 ; Facon *et al.*, 2008).

L'objectif de cette thèse est ainsi de décrire l'histoire des populations de rat noir de Madagascar et de caractériser leur résistance et le déterminisme génétique de celle-ci. Ces études pourront permettre de mieux comprendre l'évolution de cette résistance et son importance dans la capacité de l'espèce à jouer le rôle de réservoir de la maladie.

Les questions suivantes ont été abordées :

- Quelles sont les voies de la colonisation de Madagascar par le rat noir ? A quelle période celui-ci a-t-il été introduit ? Comment la structure génétique actuelle des populations reflète-t-elle l'histoire de l'expansion du rat noir à Madagascar ?

Ces questions ont été étudiées par des approches de phylogéographie et de génétique des populations détaillées dans le premier chapitre.

Introduction

- La différence de résistance observée entre une population de la zone de peste et une de la zone sans peste se confirme-t-elle dans d'autres populations de Madagascar ? Quels facteurs influencent la résistance à la peste au sein des populations des hauts plateaux centraux ? Les rats des deux zones diffèrent-ils dans leur réponse immunitaire face à l'infection ? Comment la résistance se transmet-elle dans la descendance ?

Ces questions ont été abordées en effectuant des infections expérimentales et des croisements en captivité, qui sont relatés dans le deuxième chapitre.

- Quels sont les marqueurs génétiques associés à la résistance à la peste et potentiellement sous sélection dans la zone de peste ? Certains gènes candidats interviennent-ils dans le déterminisme génétique de la résistance ?

La recherche de déterminants génétiques de la résistance par des approches de génomique des populations et d'associations génotype / phénotype fait l'objet du troisième chapitre.

Enfin, la discussion finale résumera les résultats obtenus, étudiera leurs conséquences pour l'évolution des populations de rats et pour le maintien de la peste sur les hauts plateaux de Madagascar et détaillera les perspectives ouvertes par ce travail.

Les résultats de cette thèse sont basés sur des captures de rongeurs et des expériences sur les animaux ramenés en captivité, réalisées à l'IPM lors de trois missions de un à deux mois chacune, et sur des travaux de biologie moléculaire, accomplis au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP).

Chapitre 1 :

Histoire de la colonisation de Madagascar par le rat noir

Article I

Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar.

C. Tollenaere, C. Brouat, J.-M. Duplantier, L. Rahalison, S. Rahelinirina, M. Pascal, H.

Leirs, H. Moné, G. Mouahid, J.-F. Cosson.

Sous presse dans *Journal of Biogeography*.

I- Introduction

Le rat noir est une espèce originaire d'Inde introduite partout dans le monde (Musser & Carleton, 2005 ; Fig. 8). En tant qu'espèce commensale, l'histoire de la dispersion de *Rattus rattus* à travers le monde est fortement liée à celle des migrations humaines (voir Introduction V-1).

A Madagascar, les premières installations humaines, probablement indonésiennes, auraient eu lieu il y a 2300 ans environ (Burney *et al.*, 2004). D'autres vagues de peuplements ont conduit à la population malgache actuelle, résultat d'un mélange entre des ancêtres Africains et Indonésiens (Hurles *et al.*, 2005). Il y a mille ans environ, d'importantes populations humaines sont attestées le long des côtes malgaches (Wright & Rakotoarisoa, 2003 ; Burney *et al.*, 2004) : au niveau de la côte nord-est à partir du IX^{ème} siècle et sur la côte nord-ouest (grand port commerçant de Mahilaka) et la côte sud-est à partir du XII^{ème} siècle (Wright & Rakotoarisoa, 2003 ; voir Fig. 16). A cette époque (à partir du VIII^{ème} siècle), le sud-ouest de l'Océan Indien est parcouru par de grands courants migratoires et commerciaux (Liszkowski, 2000) : les commerçants arabes transitent alors entre la péninsule Arabique, l'Afrique de l'Est, les Comores et Madagascar (Allibert, 1988). D'autre part, les hauts plateaux centraux de l'île de Madagascar auraient été colonisés par l'homme plus tardivement que les zones côtières, probablement il y a quelques siècles seulement (Wright & Rakotoarisoa, 2003).

Quelques études ont déjà été réalisées sur des micromammifères commensaux introduits à Madagascar. Chez la musaraigne *Suncus murinus*, des données historiques et morphologiques suggèrent de multiples colonisations à partir des bateaux des marchands arabes, via l'Afrique de l'Est (Hutterer & Tranier, 1990). La souris domestique (*Mus musculus*) malgache est proche génétiquement des souris du Yémen (Duplantier *et al.*, 2002). Ces deux espèces seraient donc probablement arrivées à Madagascar entre les VIII^{ème} et XII^{ème} siècles, période où le commerce entre la Péninsule Arabique et Madagascar était très important (Duplantier *et al.*, 2002). Concernant le rat noir, les plus anciens indices archéologiques de sa présence datent du XI-XIV^{ème} siècle dans un site du nord-ouest de Madagascar (Rakotozafy, 1996 ; Radimilahy, 1997). Une étude caryologique et allozymique a montré que seul *R. rattus*, et non son espèce sœur *R. tanezumi* (voir Introduction V-1), est présent à Madagascar (Duplantier *et al.*, 2003). Une première étude sur les séquences nucléotidiques des rats noirs malgaches a été réalisée par Hingston *et al.* (2005), avec des conclusions partielles car seules des populations du sud de Madagascar ont été échantillonnées et les données génétiques extérieures à Madagascar étaient extrêmement réduites.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'histoire de la colonisation de Madagascar par le rat noir, de façon à mieux connaître l'histoire de l'espèce réservoir de la peste dans ce pays. L'hypothèse est que *R. rattus* soit arrivé de l'Inde en passant par la Péninsule Arabique (Duplantier & Duchemin, 2003b), comme les autres espèces de petits mammifères introduites sur l'île (souris, musaraigne). On s'attend (1) à une arrivée de *R. rattus*, au plus tôt en même temps que les premières installations humaines, c'est-à-dire il y a 2000 ans, mais plus

probablement à l'époque des implantations importantes et du commerce arabe, c'est-à-dire il y a 800-1000 ans (Duplantier *et al.*, 2003 ; Duplantier & Duchemin, 2003b) et (2) à une colonisation d'abord restreinte aux zones côtières puis s'étendant plus tardivement aux hauts plateaux centraux. On cherchera des indicateurs d'une colonisation de Madagascar par une introduction unique, ou bien au travers de multiples introductions. On s'intéressera également à l'histoire de la colonisation des îles voisines de Madagascar, notamment les Comores, (îles de Grande Comore et de Mayotte) et la Réunion, qui peuvent partager la même histoire que Madagascar, ou au contraire avoir été colonisées par le rat noir de façon indépendante.

Dans le but de mieux comprendre l'histoire de la colonisation de Madagascar et des îles voisines par *R. rattus*, nous avons d'abord utilisé un marqueur génétique mitochondrial et considéré un échantillonnage à deux échelles : échelle de l'ouest de l'Océan Indien, prenant en compte les zones d'origine potentielles des populations malgaches (Inde, Péninsule Arabique ; voir II-1) et échelle de Madagascar (pour laquelle nous avons inclus les données préalablement publiées par Hingston *et al.*, 2005 ; voir III-1). Ces analyses font l'objet de l'article I. Les conclusions de cette étude sont cependant à nuancer du fait de l'utilisation d'un marqueur mitochondrial seulement, car l'histoire des populations inférée à partir de données de génétique cytoplasmique peut parfois se révéler différente de celle décrite à partir du génome nucléaire (voir par exemple Bensch *et al.*, 2006 ; Britton-Davidian *et al.*, 2007). En effet, l'histoire évolutive d'un seul gène peut ne pas refléter l'histoire des populations (Nichols, 2001). En particulier, le génome mitochondrial, hérité maternellement, ne reflète que l'histoire de la lignée maternelle et est soumis à une dérive forte (en conséquence d'une taille efficace réduite, Ballard & Whitlock, 2004) et à de l'introgression (Chan & Levin, 2005). Il est de plus possible que la sélection naturelle agisse sur le génome mitochondrial car il contient des gènes importants fonctionnellement et n'est pas affecté par la recombinaison (Dowling *et al.*, 2008). Nous présentons donc une première comparaison des données issues de l'ADN mitochondrial avec des résultats obtenus récemment (données en cours d'analyse) en collaboration avec C. Brouat, A. Loiseau et J.-M. Duplantier pour de multiples loci nucléaires (microsatellites) à l'échelle de Madagascar et des îles voisines (voir II-2), ainsi qu'au sein de Madagascar (voir III-2).

II- Etude des relations entre Madagascar et les régions voisines ou historiquement importantes

1. Données mitochondriales dans l'ouest de l'Océan Indien

- Méthodes

Des tissus de rats noirs échantillonnés dans différents pays de l'ouest de l'Océan Indien (Inde, Péninsule Arabique et Afrique de l'Est, Fig. 11) ont été obtenus grâce à des collaborations. A Madagascar, de nombreuses populations de rat noir ont été échantillonnées lors de l'affectation de J.-M. Duplantier dans ce pays entre 1996 et 2000 et cet échantillonnage a été complété entre 2006 et 2009, en partie à l'occasion de ma thèse. Toutes les localités échantillonnées par l'équipe sont présentées dans la Fig. 12. Pour l'étude à l'échelle de l'Océan Indien, nous avons choisi 14 rats issus de différentes localités malgaches. L'échantillonnage concerne finalement onze îles ou pays dans l'Ouest de l'Océan Indien, avec de 2 à 14 individus par pays (71 individus au total, Fig. 11). Quelques individus venant du Sénégal (N = 2) et de Guadeloupe (N = 3) ont aussi été séquencés. Les séquences disponibles dans la base de donnée génétique Genbank, issues de rats de différents continents, ont été comparées à celles de notre jeu de données.

Figure 11 Carte indiquant les pays d'origine des échantillons analysés pour les séquences mitochondriales à l'échelle de l'ouest de l'Océan Indien.

Pour chaque pays, le nombre d'individus de rat noir séquencés est indiqué entre parenthèses.

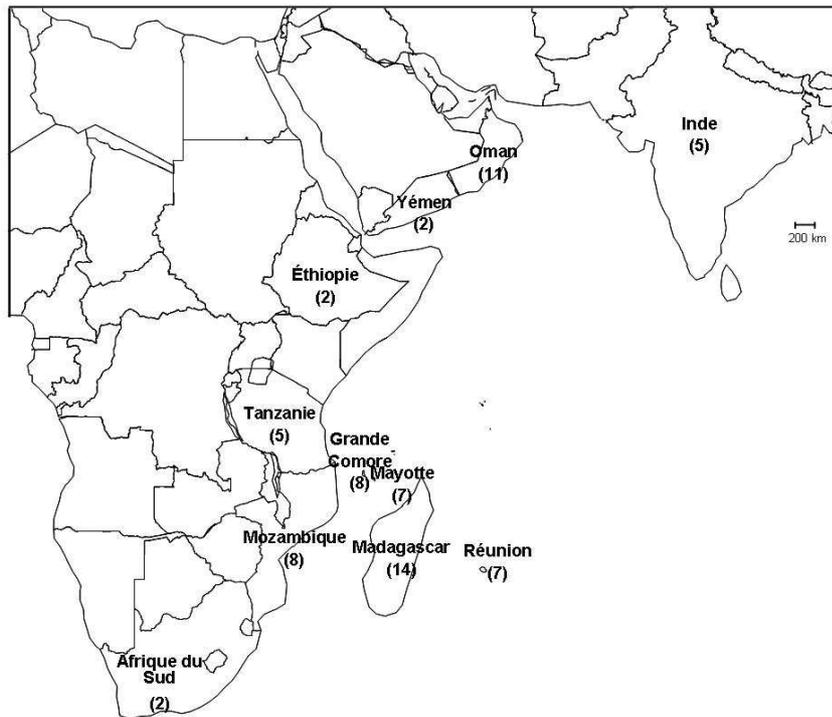
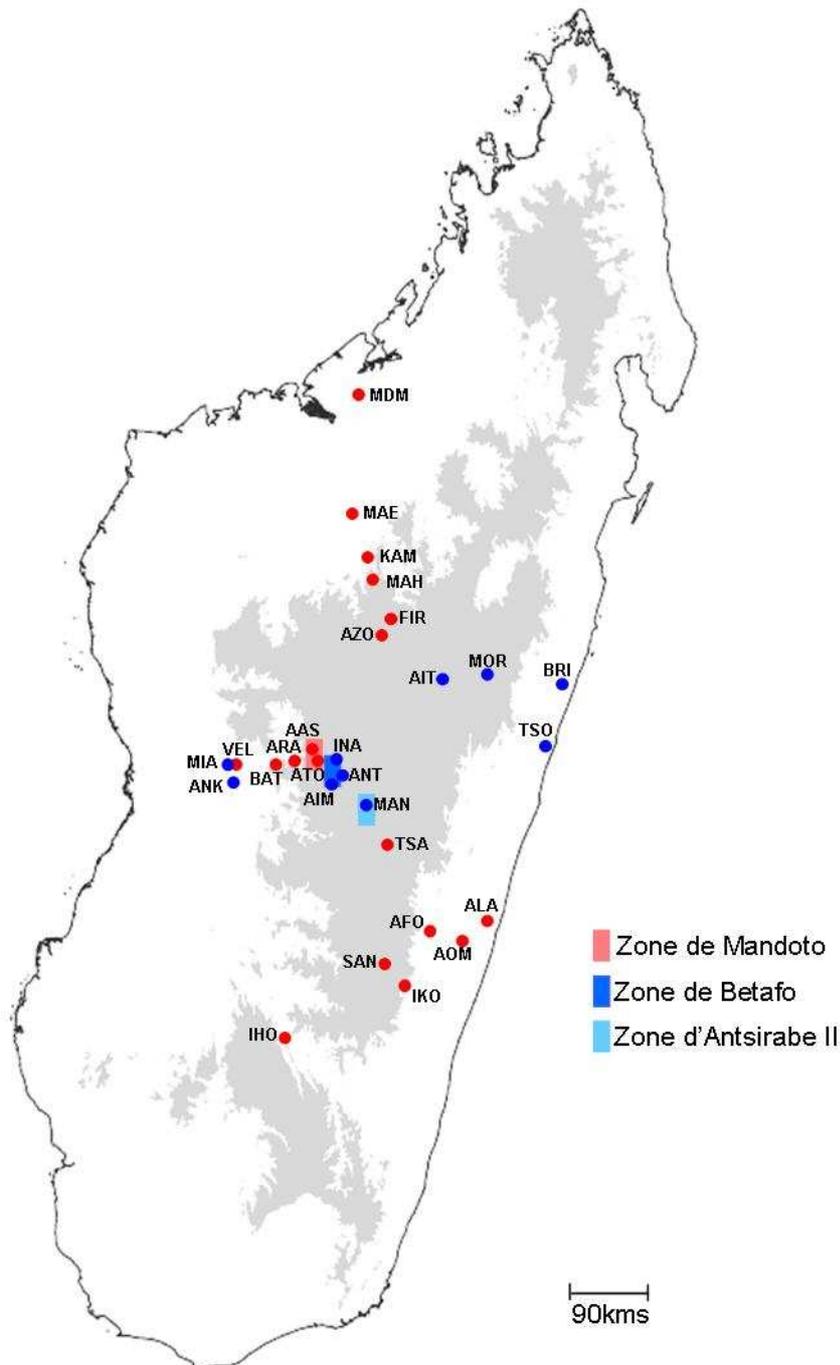


Figure 12 Localisation de l'ensemble de l'échantillonnage de micromammifères réalisé à Madagascar par l'équipe de recherche.

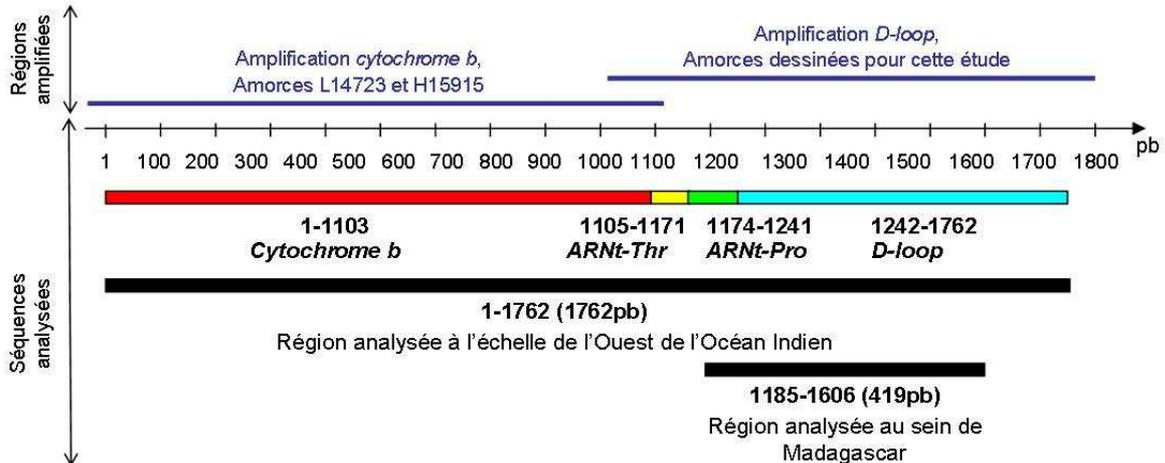
Les villages échantillonnés entre 1996 et 2000 sont représentés par des points rouges et ceux échantillonnés entre 2006 et 2009 sont en bleu. Les rectangles indiquent des régions où plusieurs villages (5-7) ont été échantillonnés de façon à réaliser des études à l'échelle locale.

La zone grisée correspond à la zone des hauts plateaux centraux, où l'altitude est supérieure à 800m et où la peste existe à l'état endémique.



Une séquence mitochondriale de 1762 paires de bases (pb) regroupant le cytochrome b, deux ARN de transfert et une partie de la D-loop (Fig. 13) a été séquencée pour les 76 individus analysés.

Figure 13 Représentation schématique de la région d'ADN mitochondrial étudiée.



- Résultats

L'arbre phylogénétique des haplotypes de *R. rattus* obtenus est présenté dans la Fig. 14. Les haplotypes des rats d'Inde apparaissent dans différents groupes de l'arbre, de même que ceux d'Oman et d'Afrique de l'Est. Ce résultat est en accord avec l'attendu d'une forte diversité dans les zones d'origine (Inde) et dans les régions les plus anciennement colonisées (Péninsule Arabique, Afrique de l'Est).

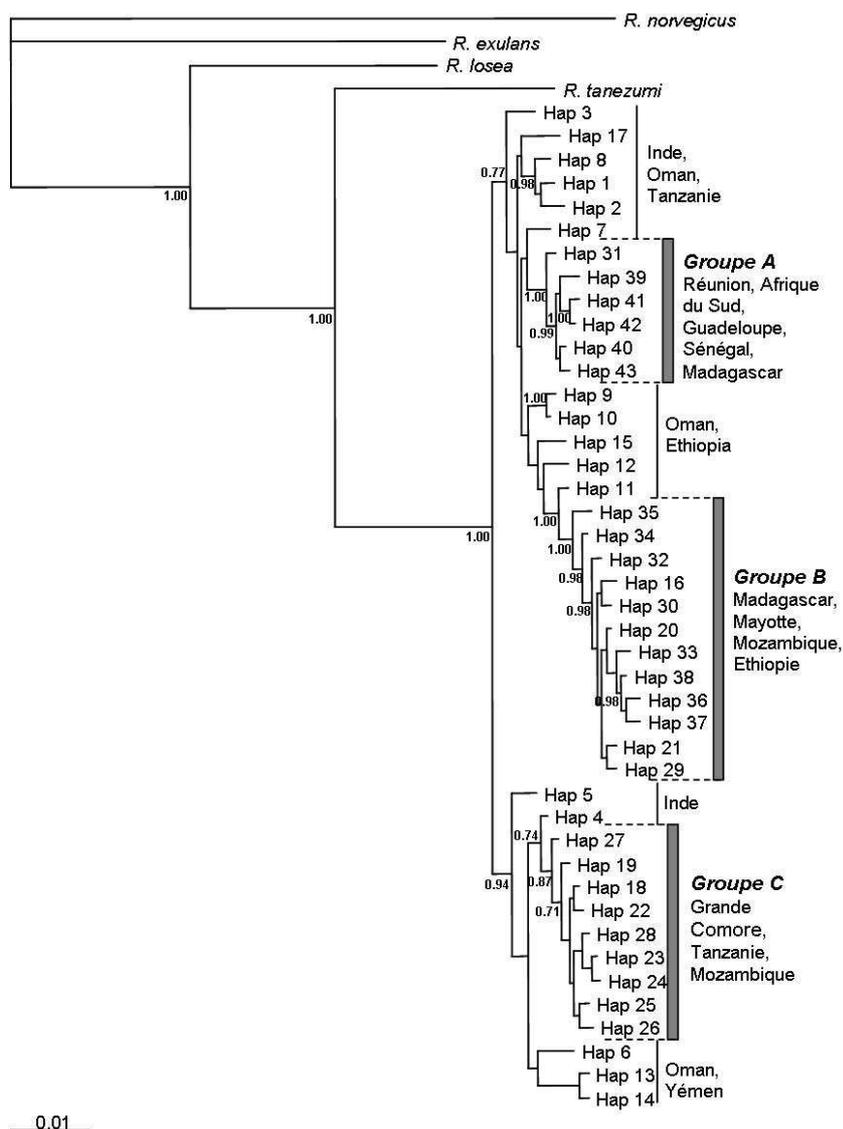
Trois groupes bien soutenus se distinguent. Le groupe **A** comprend les haplotypes des individus de la Réunion (Hap 39, aucun polymorphisme parmi 7 individus issus de 3 sites), d'Afrique du Sud, du Sénégal et de Guadeloupe. Un individu de Madagascar (nommé DM1021, issu de la population MDM au nord-Ouest de l'île, Fig. 12) fait partie de ce groupe. Les séquences partielles trouvées sur Genbank, concernant des rats de Nouvelle-Zélande, d'îles de l'Europe et du Pacifique et de New York, sont toutes identiques ou similaires à l'haplotype trouvé en Afrique du Sud. Ainsi, toutes les séquences venant de rats échantillonnés hors de la zone de l'Océan Indien sont proches des rats de la Réunion et de l'Afrique du Sud. Le rat noir est supposé être arrivé à l'île de la Réunion en 1680 et en Afrique du Sud au cours du siècle dernier. On peut donc supposer que ce groupe d'haplotypes (rats des îles européennes, îles du Pacifique, Sénégal, Guadeloupe et New York) correspond à une lignée de rats ayant colonisé une grande partie du monde très récemment (au cours des trois ou quatre siècles derniers), probablement à partir de bateaux européens.

Le groupe **B** contient tous les autres individus de Madagascar, tous les individus de Mayotte et une partie de ceux du Mozambique et d'Ethiopie. Les haplotypes issus de Madagascar (sauf un situé dans le groupe **A**, voir III-1) forment donc un groupe monophylétique, ce qui indiquerait une colonisation à partir d'une unique introduction sur

l'île. Ce groupe forme un groupe bien soutenu avec un haplotype d'Oman (Hap11, Fig. 14), et compte tenu des données historiques (voir I), il est probable que la population de Madagascar dérive de rats noirs d'Oman. L'île de Mayotte présente des haplotypes (Hap 20, 29 et 30) inclus dans un groupe d'haplotypes de Madagascar (Hap 20 et 32-38) et dont certains haplotypes de Madagascar sont ancestraux (Hap 34-35, Fig. 14), indiquant (1) soit que la population de Mayotte résulte d'une fraction de la population de rats noirs malgaches (2) soit que le génome mitochondrial des rats noirs de Mayotte a subi une introgression par des migrants venus de Madagascar.

Figure 14 Phylogénie des haplotypes de *Rattus rattus*, échantillonnées dans différentes îles et pays de l'ouest de l'Océan Indien (ainsi qu'au Sénégal et en Guadeloupe).

L'arbre est raciné par trois espèces proches dont les échantillons viennent d'Asie du Sud-Est (Pagès *et al.*, en révision). Il a été obtenu grâce à une analyse bayésienne partitionnée (les probabilités postérieures sont indiquées pour chaque nœud), à partir d'une séquence mitochondriale de 1624pb (*cyt b* + *D-loop* ; les ARNt n'ont pas été inclus dans l'analyse car ils ne présentaient pas de variabilité).



Enfin, le groupe **C** contient tous les haplotypes trouvés à Grande Comore, ainsi que des haplotypes trouvés au Mozambique et en Tanzanie. Grande Comore présente donc une composition génétique très différente de celle de Madagascar et de son île voisine, Mayotte.

Les groupes **B** et **C** présentent des haplotypes trouvés en Afrique de l'Est (Mozambique, Tanzanie, Ethiopie, Fig. 14). Ces derniers peuvent s'interpréter comme le résultat de migrations postérieures à la colonisation des îles (Madagascar pour le groupe **B** et Grande Comore pour le **C**), de ces îles vers le continent africain. Cette interprétation semble cependant surprenante et mériterait des investigations complémentaires en Afrique de l'Est.

Le logiciel IM (Isolation with Migration) a été utilisé pour simuler la divergence entre les populations Oman / Madagascar d'une part, et Oman / Grande Comore d'autre part. Dans les deux cas, les résultats favorisent un modèle dans lequel une petite fraction de la population d'Oman a fondé les populations de chacune des deux îles, et qui ne fait pas intervenir de migration récurrente, donc un scénario d'introduction unique. Les temps de divergence entre les groupes de gènes sont similaires pour les deux îles : 10 215 ans BP [4 012-25 252] pour Oman / Madagascar et 9 238 ans BP [2 630-60 752] pour Oman / Grande Comore⁶. La colonisation des deux îles pourrait donc avoir été simultanée, bien que les haplotypes de chacune des îles appartiennent à des groupes différents de l'arbre phylogénétique (Fig. 14). On peut imaginer par exemple une colonisation des deux îles à partir d'une même zone de forte diversité (probablement une ville portuaire d'Oman) et que l'effet de fondation conduise à la rétention d'une faible diversité, de composition différente, dans chacune des îles.

Deux arguments suggèrent donc une colonisation de Madagascar à partir d'Oman : l'arbre des haplotypes indiquant une proximité entre un haplotype d'Oman et le groupe malgache et les résultats de IM simulant une divergence entre les populations d'Oman et de Madagascar.

2. Données nucléaires populationnelles pour Madagascar et trois îles voisines

- Méthodes

Une étude de génétique des populations est en cours de réalisation sur 21 populations de Madagascar (N =414) et une population de chacune des îles suivantes : Grande Comore, Mayotte et Réunion (N = 22 dans chacune des populations). Les marqueurs génétiques utilisés sont des microsatellites : sept marqueurs issus de *R. norvegicus* (voir aussi Gilabert *et al.*, 2007) et dix marqueurs récemment développés sur *R. rattus* (Loiseau *et al.*, 2008).

⁶ Ces temps de divergence importants reflètent la durée écoulée depuis la divergence des groupes génétiques, et non celle depuis la colonisation des îles, qui peut être plus tardive. Ils sont de plus probablement surestimés car calculés en utilisant un taux de mutation dérivant d'une comparaison interspécifique et non intraspécifique (Ho & Larson, 2006).

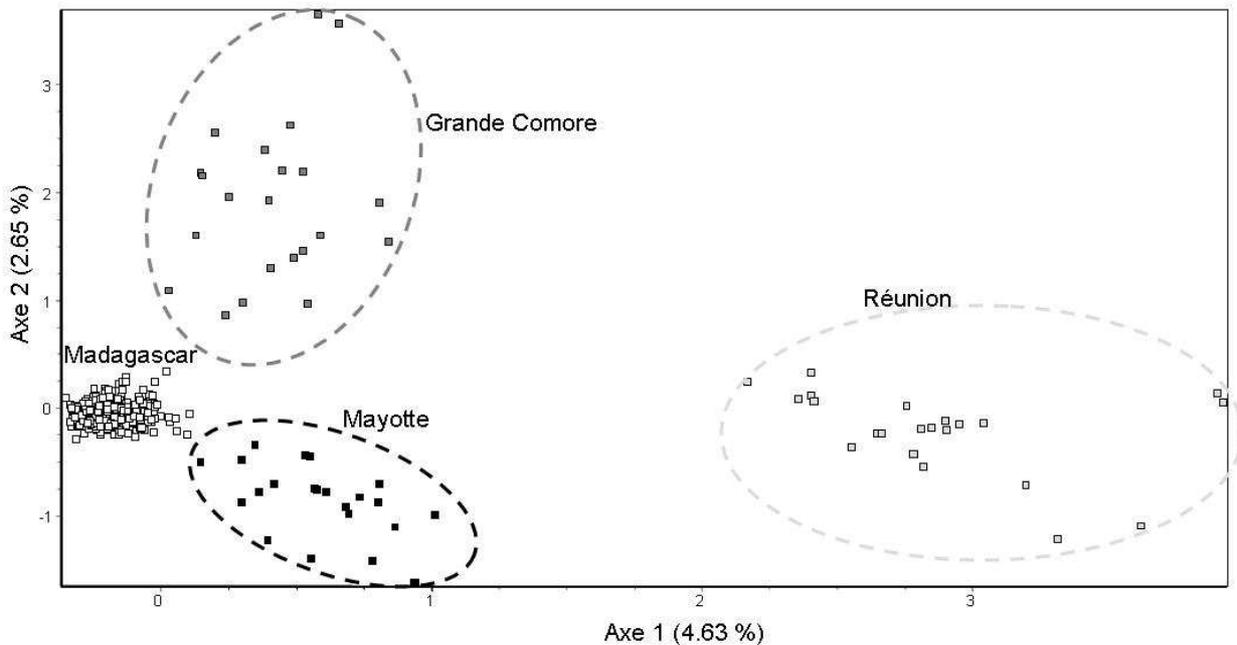
- Résultats

Des analyses multivariées (Analyse Factorielle des Correspondances, AFC) indiquent que chacune des quatre îles forme un groupe génétique distinct (Fig. 15). La différenciation génétique (F_{ST}) entre populations des différentes îles est de 19.9 % entre Réunion et Grande Comore, 24.0 % entre Réunion et Mayotte et 15.8 % entre Grande Comore et Mayotte. La différenciation entre Madagascar et les autres îles est en moyenne de 11.7 % avec Grande Comore, 16.1 % avec Mayotte et 24.2 % avec Réunion. La population de la Réunion présente donc le groupe génétique le plus distinct tandis que Madagascar et Grande Comore sont un peu plus proches l'une de l'autre que des autres îles.

La population de la Réunion présente la plus faible diversité génétique (hétérozygotie attendue, $H_E = 0.63$), tandis que la population de Grande Comore est la plus diversifiée ($H_E = 0.80$, alors que Mayotte : $H_E = 0.73$) par rapport aux populations de Madagascar qui présentent des diversités génétiques comprises entre 0.68 et 0.75. Des études réalisées sur *R. rattus* en Guadeloupe suggèrent des diversités génétiques moyennes d'environ 0.55-0.60 (Abdelkrim *et al.*, 2005 ; Prugnolle *et al.*, 2005a) et donc plutôt comparables à celle observée à La Réunion.

Figure 15 Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) réalisées sur les données de microsatellites pour quatre îles de l'ouest de l'Océan Indien.

Les individus de Madagascar sont en blanc, Grande Comore en gris foncé, Mayotte en noir et Réunion en gris clair. Seuls les deux premiers axes de l'AFC sont représentés.



3. Discussion des relations entre les *R. rattus* de Madagascar et ceux des zones voisines ou historiquement importantes

Les données nucléaires et mitochondriales sont globalement concordantes. Toutes deux indiquent que les rats noirs de Madagascar forment un groupe homogène, distinct des rats trouvés sur les îles voisines. Un seul individu (codé DM1021) avait été trouvé comme extérieur à ce groupe au niveau de son génome mitochondrial, mais il ne se distingue pas du groupe malgache sur les données nucléaires. Ainsi, cet individu serait le descendant d'un migrant, suffisamment lointain pour qu'il n'en ait gardé que le génome mitochondrial, tandis que les événements de reproduction avec recombinaison auraient conduit à la perte de ses allèles nucléaires.

Au niveau de l'Océan Indien, les données nucléaires sont partielles car elles ne concernent que trois îles voisines de Madagascar : Grande Comore, Mayotte et Réunion. Les données mitochondriales rattachaient les haplotypes trouvés à Mayotte à ceux de Madagascar, suggérant une colonisation de Mayotte par des rats malgaches, tandis que les haplotypes mitochondriaux rencontrés à Grande Comore étaient très différents de ceux de Madagascar. Les données nucléaires indiquent au contraire une différenciation génétique plus faible entre Madagascar et Grande Comore que entre Madagascar et Mayotte. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour étudier les différents scénarios envisagés pouvant expliquer ces patrons.

Les données mitochondriales suggèrent une diversité génétique à Madagascar (un groupe génétique homogène) réduite par rapport à l'Inde (haplotypes appartenant à différentes parties de l'arbre, Fig. 14). Les données nucléaires ne comprennent pas de population d'Inde, empêchant de comparer les diversités entre aire native et aire d'introduction. Cependant, la diversité génétique observée à Madagascar est plus forte que celle de la Réunion ou de Guadeloupe, mais moins forte que celle de Grande Comore qui est pourtant aussi une population introduite et est une plus petite île.

III- Etude au sein de l'île de Madagascar

1. Variabilité génétique mitochondriale à Madagascar

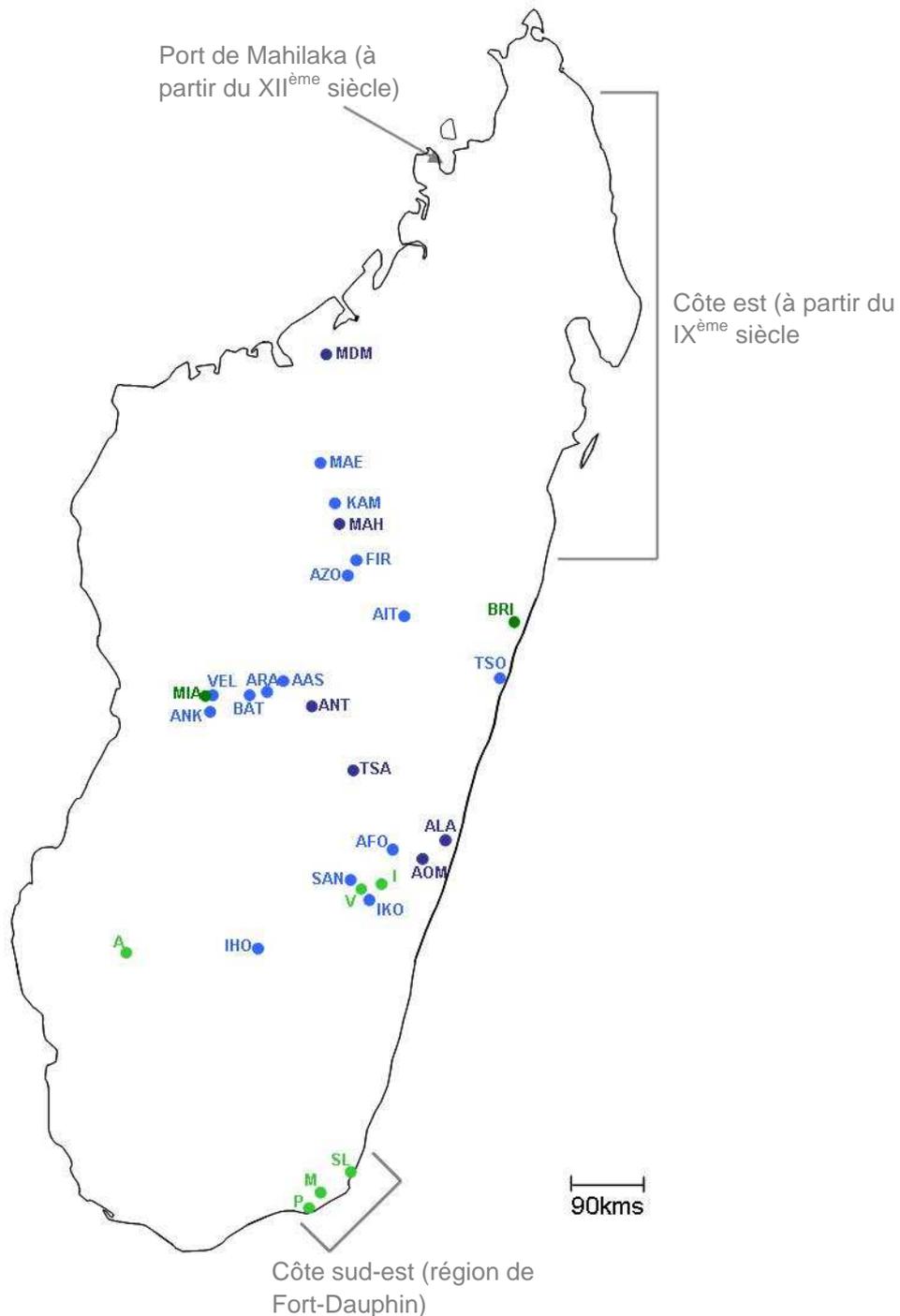
- Méthodes

Parmi les localités disponibles à Madagascar (Fig. 12), nous avons choisi pour cette étude huit populations du nord et du centre de l'île, de façon à compléter l'analyse de six populations du sud de Madagascar réalisée par Hingston *et al.* (2005) (que nous avons incorporé à notre jeu de données grâce aux séquences disponibles sur Genbank). La carte des localités utilisées pour les analyses phylogéographiques est présentée dans la Fig. 16. Chaque population est constituée de 8 à 25 individus, résultant en un jeu de données de 190 individus.

Figure 16 Echantillonnage à l'échelle de Madagascar utilisé pour l'étude de l'histoire de la colonisation par le rat noir.

Les populations étudiées sont représentées par des points avec une couleur indiquant le type d'analyse. Les populations en vert (vert clair pour les populations analysées par Hingston *et al.*, 2005, et vert foncé pour celles analysées dans cette étude, mais non génotypées pour les marqueurs microsatellites) et en bleu foncé (populations analysées dans les deux études: séquence mitochondriale et marqueurs microsatellites) ont été analysées pour la séquence de D-loop (419pb) tandis que les populations en bleu clair n'ont été analysées que pour les marqueurs microsatellites.

Les régions présentant des restes archéologiques anciens et donc probablement ayant été peuplées tôt dans l'histoire de l'homme à Madagascar (Wright & Rakotoarisoa, 2003) sont représentées en gris.



Les analyses ont été réalisées sur une partie de la D-loop (419pb, Fig. 13), de façon à pouvoir inclure les résultats de Hingston *et al.* (2005) dans notre jeu de données, et du fait de l'absence de variabilité du cytochrome b au sein de Madagascar.

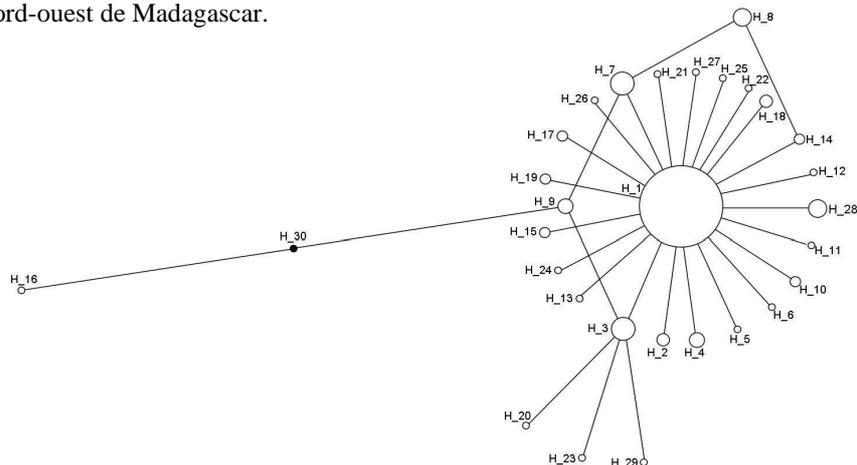
- Résultats :

Au sein de Madagascar, 29 haplotypes ont été identifiés pour la séquence de 419pb de D-loop (Fig. 13). Le réseau liant ces haplotypes montre que tous les échantillons sauf un (sur 190 analysés au total, individu DM1021, Fig. 17) forment un groupe monophylétique. Ce résultat est donc en accord avec l'hypothèse d'un événement de colonisation unique de Madagascar par le rat noir. L'arrivée de nouveaux migrants est possible comme le montre le génotype de l'individu DM1021 mais très rare (99.5 % des rats échantillonnés), probablement à cause de la compétition entre un nouvel arrivant et les populations installées.

Le réseau des haplotypes présente une topologie en étoile (Fig. 17), caractéristique des populations en expansion. Un signal d'expansion démographique existe sur l'ensemble de l'île, mais aussi dans six populations sur les 14 analysées (voir article I). Dans ces populations, l'expansion démographique a été estimée (grâce à des analyses de Mismatch Distribution) comme datant de 1000 à 4000 ans (mais ces dates sont probablement surestimées à cause d'une sous-estimation du taux de mutation, voir II-1). Les populations de la côte est présentent des dates d'expansion plus anciennes que celles des hauts plateaux centraux ou de la région ouest. De plus, les diversités génétiques sont plus fortes dans les populations de la côte est que dans celles de hauts plateaux (sauf pour la population ANT qui présente une composition en haplotype singulière, et qui présente une forte diversité alors qu'elle est la plus éloignée de la mer, Fig. 16). Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse d'une colonisation de Madagascar par le rat noir à partir de la côte est et s'étendant ensuite sur les hauts plateaux centraux.

Figure 17 Réseau d'haplotypes mitochondriaux obtenu pour les 190 individus de Madagascar (en blanc) et un individu d'Oman (H_30, en noir).

Cette analyse a été réalisée sur les 419pb, correspondant à une partie de la D-loop (Fig. 13). Les relations supposées entre haplotypes sont indiquées et la taille des disques est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype en question. L'haplotype H_16 a été obtenu pour l'individu DM1021 originaire de la population MDM dans le nord-ouest de Madagascar.



2. Structure génétique des populations malgaches par des données nucléaires

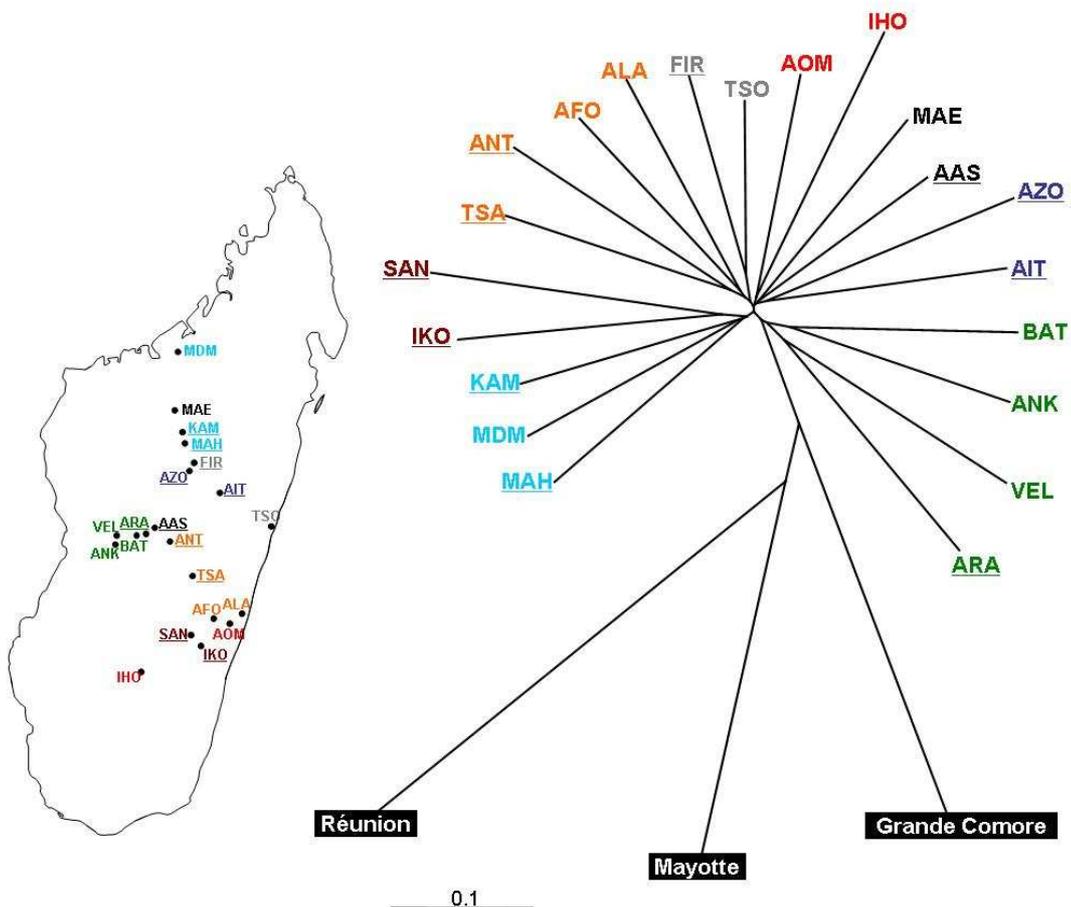
Le jeu de données de Madagascar seulement (excluant les îles voisines) comprend 21 populations (Fig. 16) avec 12 à 33 individus par population.

Au sein de Madagascar, les populations sont globalement peu structurées, avec un arbre des populations permettant d'identifier quelques groupes de populations proches (à l'ouest ou au sud-est notamment) mais pas systématiquement (Fig. 18). Les hauts plateaux ne forment pas un groupe génétique distinct de celui de la zone de basse altitude (AMOVA, facteur zone non significatif $p = 0.083$; voir aussi Fig. 18).

Les valeurs de différenciation génétique (F_{ST}) sont comprises entre 1.3 et 10.2 % (moyenne : 5.6 %). La différenciation maximale est obtenue entre les populations IHO (population la plus au sud de l'échantillonnage) et AIT (situé légèrement au nord du centre du pays). On observe pas des différenciations plus fortes entre les deux zones (peste et sans peste) que au sein de la zone de peste (données non montrées).

Figure 18 Arbre des populations de *Rattus rattus* de Madagascar réalisé à partir des données de marqueurs microsatellites.

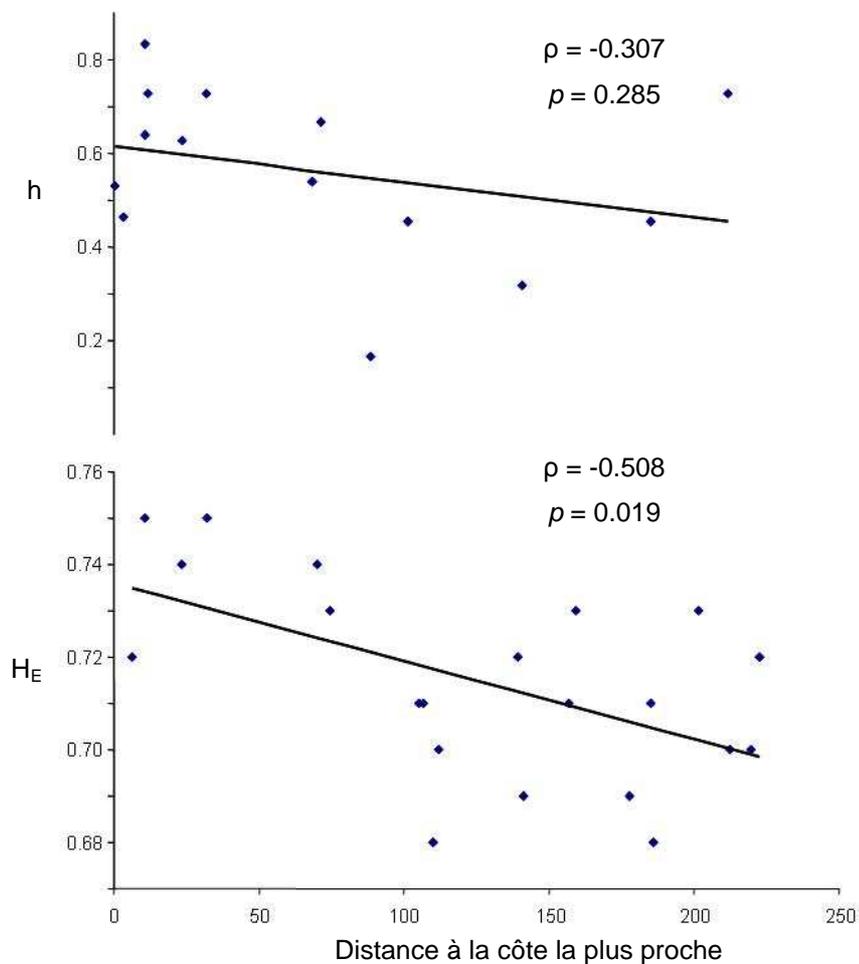
Les distances entre populations sont estimées par la méthode de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) et l'arbre est reconstruit par la méthode de Neighbor-Joining. Les populations des hauts plateaux centraux sont soulignées.



Il existe une tendance des populations de Madagascar échantillonnées en basse altitude à être plus diversifiées que celles des hauts plateaux centraux, mais la différence n'est pas significative (test de Mann-Whitney, $p = 0.55$). En revanche, il existe une relation négative significative entre la diversité génétique et la distance à la mer : les populations les plus diversifiées sont celles situées le plus proche de la côte (Fig. 19). Notamment, les plus fortes diversités génétiques se trouvent dans les populations de la côte est (AOM et ALA, $H_E = 0.75$ et AFO, $H_E = 0.74$) et une population de la côte nord-ouest (MDM, $H_E = 0.74$).

Figure 19 Relation entre la diversité génétique et la distance à la mer dans les populations de *Rattus rattus* de Madagascar.

La diversité génétique est estimée par la diversité haplotypique pour le jeu de données mitochondrial (h , en haut) et de l'hétérozygotie attendue pour le jeu de données de marqueurs microsatellites (H_E , en bas). Le coefficient de corrélation de Spearman est indiqué, ainsi que la probabilité associée au test.



3. Discussion : structure génétique et histoire des populations malgaches

Les populations malgaches sont globalement peu structurées avec une absence de structuration entre hauts plateaux centraux (zone de peste) et zones de basse altitude (zone sans peste), ce qui avait déjà été révélé sur un jeu de données plus réduit (Gilabert, 2005).

La diversité génétique des populations décroît avec la distance à la mer. Ces relations sont observées pour les données nucléaires et les mêmes tendances sont observées sur les données mitochondriales. La relation entre la diversité génétique et la distance à la mer peut être liée à l'histoire des populations avec une colonisation des zones côtières plus anciennes que celle des hauts plateaux centraux (comme c'est le cas chez l'homme, Wright & Rakotoarisoa, 2003). Elle pourrait aussi être le résultat de migrations récurrentes conduisant à une augmentation de la diversité dans les zones côtières. Les données mitochondriales suggèrent cependant une migration récurrente très limitée.

Enfin, il est possible que la démographie des populations soit différente avec des tailles efficaces de populations plus grandes dans les zones de basse altitude que sur les hauts plateaux centraux. Les données de captures indiquent au contraire des taux de captures de *R. rattus* plus forts sur les hauts plateaux que dans les zones côtières (obs. pers.), mais cela peut être dû à un biais de capture car les milieux (et donc la disponibilité en nourriture) sont très différents entre les deux zones. D'autre part, une hypothèse de réduction de la diversité sur les hauts plateaux, en conséquence des goulots d'étranglement répétés suite aux épidémies de peste (mis en évidence chez les chiens de prairies aux Etats-Unis, Trudeau *et al.*, 2004) avait été suggérée pour les rats noirs malgaches (Gilabert, 2005). Cependant, la différence de diversité entre zone de basse altitude et hauts plateaux n'est pas significative et il semble que la tendance observée soit plutôt la conséquence de la forte diversité observée dans les régions côtières (Fig. 19).

Les patrons géographiques observés sur la diversité génétique (surtout pour les données nucléaires) et les dates d'expansions démographiques (estimées à partir des données mitochondriales) suggèrent la côte est comme région colonisée en premier, tandis que la colonisation des hauts plateaux aurait été plus tardive.

IV- Conclusions et perspectives

Les données actuelles ne nous permettent pas d'exclure une colonisation unique de Madagascar par le rat noir à partir de la région d'Oman. Comme l'homme, *R. rattus* se serait ainsi d'abord installé sur les côtes de l'île de Madagascar il y a 1000-2000 ans, pour coloniser les hauts plateaux centraux plus tard, il y a probablement quelques siècles seulement. Les îles voisines de Madagascar (les Comores et la Réunion) présentent des compositions génétiques différentes de celle de Madagascar, traduisant une histoire beaucoup plus récente pour la Réunion, alors que les histoires de Grande Comore et de Mayotte pourraient être liées ou simultanées avec celle de Madagascar.

Dans l'état actuel des choses, les résultats majeurs obtenus grâce aux séquences mitochondriales sont confirmés par les données de marqueurs nucléaires, même si quelques aspects diffèrent entre les deux études (au niveau des relations entre Madagascar et les îles voisines notamment). Malgré les problèmes théoriques liés à l'utilisation d'un marqueur mitochondrial en phylogéographie (Ballard & Whitlock, 2004), la concordance de résultats nucléaires et mitochondriaux a déjà été montrée pour d'autres jeux de données (voir par exemple Koskinen *et al.*, 2002b). Ces résultats confirment que les séquences mitochondriales sont un bon marqueur pour retracer les routes d'introduction des rongeurs commensaux, comme ça a été fait pour la souris en Europe (Gunduz *et al.*, 2001) ou le rat du Pacifique en Océanie (Matisoo-Smith & Robins, 2009 ; Encadré 7). En effet, cette approche présente l'avantage de pouvoir être utilisée même avec un petit nombre d'individus par population. Cependant, grâce au développement de nouvelles méthodes d'analyse statistique, les données issues de multiples marqueurs nucléaires offrent des possibilités prometteuses pour inférer l'histoire récente des populations, notamment en testant statistiquement la validité de scénarios alternatifs.

Les perspectives incluent l'utilisation de ce type de méthodes sur le jeu de données de microsatellites. Ainsi, après une évaluation plus élaborée de la structure génétique des populations (par exemple en utilisant le logiciel Structure, Pritchard *et al.*, 2000), des analyses ABC (Approximate Bayesian Computation, Cornuet *et al.*, 2008) permettront de tester différents scénarios : notamment l'introduction unique du rat noir à Madagascar contre des introductions multiples, ou encore différentes hypothèses concernant les relations entre les îles voisines et Madagascar (par exemple la possibilité d'une colonisation de l'île de Mayotte par des migrants venus de Madagascar).

D'autre part, l'échantillonnage en populations (pour les marqueurs microsatellites) pourra être élargi à différents niveaux. Des collaborations sont en cours pour obtenir des échantillons issus du nord, du sud et de l'ouest de Madagascar. De plus, des populations supplémentaires sur les îles voisines de Madagascar seraient intéressantes car chacune des îles voisines de Madagascar n'a été étudiée pour les données nucléaires qu'au travers d'une seule population (c'est le cas aussi en mitochondrial pour Grande Comore). Enfin, inclure des populations de la zone d'origine du rat noir, l'Inde, dans le jeu de données pourrait être très informatif. L'attendu d'une diminution de la diversité génétique entre zone d'origine et zone d'introduction (voir Dlugosch & Parker, 2008 ; Puillandre *et al.*, 2008) semble en effet être observé sur les données mitochondriales, mais des échantillons d'Inde manquent pour réaliser cette comparaison sur les microsatellites.

Enfin, des tissus venant de différents continents (notamment les Amériques, l'Afrique du Nord et de l'Ouest et l'Europe) pourraient être intégrés aux analyses des séquences mitochondriales. Cela permettrait de confirmer ou pas les résultats pressentis d'une colonisation récente par des *R. rattus* du Groupe A à l'échelle mondiale (Fig. 14), en suivant les voies empruntées par les bateaux européens.

Chapitre 2 :

Approche expérimentale de la résistance à la peste chez le rat noir

Article II

Susceptibility to *Yersinia pestis* experimental infection in wild *Rattus rattus*, reservoir of plague in Madagascar

C.Tollenaere, L. Rahalison, M. Ranjalahy, J.-M. Duplantier S. Rahelinirina, S. Telfer,
C. Brouat

Soumis à *Ecohealth*

I- Introduction

Les travaux de Rahalison *et al.* (2003) ont montré qu'une population de rats noirs des hauts plateaux centraux de Madagascar est beaucoup plus résistante à une infection expérimentale par *Yersinia pestis* qu'une population de basse altitude (Fig. 21). Cette différence de résistance existe à la fois sur les rats capturés sur le terrain et sur les rats nés en captivité (descendants de rats sauvages, Rahalison *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent la sélection d'une résistance chez *Rattus rattus*, sous la pression exercée par la maladie depuis son arrivée à Madagascar en 1898 (Encadré 8). Ils soulèvent aussi de nombreuses questions, abordant trois aspects :

(a) Généralité du patron observé et conséquences épidémiologiques. Cette différence de résistance peut-elle être généralisée à l'ensemble de la zone de peste et de la zone sans peste à Madagascar ? Quels facteurs individuels (par exemple le sexe), populationnels (comme les caractéristiques de l'habitat) ou temporels (comme la saison) influencent le niveau de résistance des rats de la zone de peste ? Quelle est la cinétique de la maladie chez les rats sensibles ? On peut aussi se demander si les rats résistants sont capables de transmettre la bactérie. En effet, la littérature mentionne parfois cette possibilité (par exemple Park *et al.*, 2007), même s'il semble clair que les rats résistants ne deviennent pas septicémique car ce stade entraîne inévitablement la mort, et donc que la résistance à la peste est plutôt une résistance au sens strict et non une tolérance (Encadré 2). Les réponses à ces questions permettraient de mieux comprendre l'écologie de la transmission. Par exemple, une plus forte sensibilité des rats des maisons que des rats de l'extérieur aura des conséquences importantes pour le risque de transmission à l'homme. De même, la durée de la maladie chez les rats sensibles est importante pour déterminer la fenêtre de transmission de la bactérie aux puces.

(b) Variables immunitaires et résistance. Le niveau d'anticorps produit est-il associé au niveau de résistance ? Quelle est la cinétique de la production des anticorps chez les rats sensibles et résistants ? Cette partie pourrait apporter des informations sur les mécanismes immunitaires impliqués dans la différence de résistance entre les deux zones, notamment savoir si la réponse humorale est corrélée au niveau de résistance à la peste.

(c) Hérédité de la résistance. Comment la résistance se transmet-elle dans la descendance ? Suit-elle un déterminisme mendélien ? La compréhension de l'hérédité de la résistance serait une information fondamentale pour appréhender la question du déterminisme génétique de la résistance (voir chapitre 3). De plus, l'architecture génétique d'un trait influence sa réponse à la sélection et finalement son évolution (Hansen, 2006). Le déterminisme génétique de la résistance doit donc être pris en compte pour étudier l'évolution de la résistance à la peste chez le rat noir.

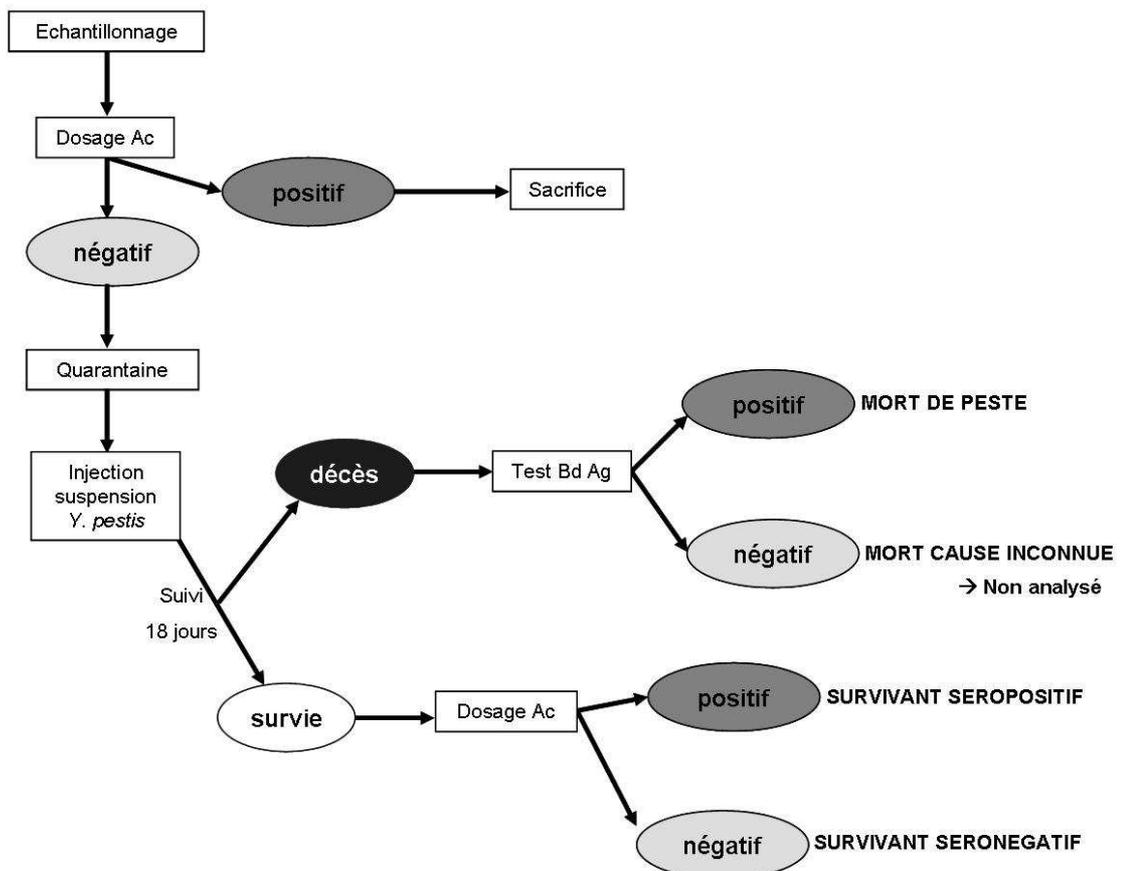
Pour aborder les questions (a) et (b), nous avons entrepris des infections expérimentales (décrites dans le II) et pour les questions (c), nous avons mis en place des croisements en captivité (relatés dans le III). Les résultats présentés dans les parties II-2 et II-3 font l'objet de l'article II.

II- Infections expérimentales

1. Méthodes utilisées pour l'échantillonnage et les infections expérimentales

Le protocole mis en place pour les infections expérimentales est schématisé dans la Fig. 20. Des captures de micromammifères ont été réalisées dans cinq zones : trois zones de basse altitude et deux zones des hauts plateaux centraux (Fig. 21). Les animaux capturés ont été épicés, les puces comptées et prélevées de manière à être identifiées à l'IPM. On a gardé les rats noirs en captivité tandis que les souris et musaraignes capturées ont été sacrifiées par élongation et disséquées. Pour chaque animal capturé, une goutte de sang a été déposée sur un sérobuvard de façon à réaliser un dosage en anticorps anti-F1 (Dromigny, 1997 ; Rasoamanana *et al.*, 1997 ; Encadré 12). Ces anticorps protègent contre la peste, chez les souris de laboratoire (Andrews *et al.*, 1996 ; Li & Yang, 2008) et chez les *R. rattus* de Madagascar (L. Rahalison, com. pers.). On fait l'hypothèse que les rats séronégatifs en anticorps anti-F1 n'ont jamais été en contact avec *Y. pestis* et ce sont eux qui pourront être inoculés après une dizaine de jours de quarantaine.

Figure 20 Représentation schématique du protocole utilisé pour les infections expérimentales. Dosage Ac: dosage ELISA en anticorps anti-F1; Test Bd Ag: test bandelette rapide de détection de l'antigène F1.

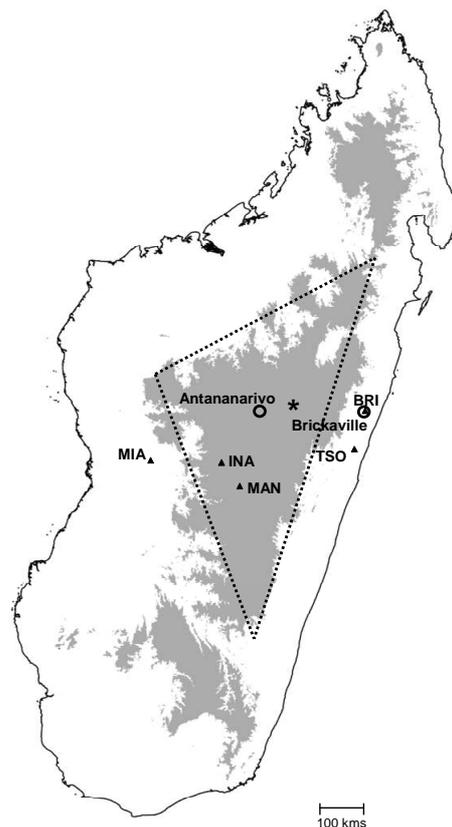


Toutes les infections expérimentales ont été réalisées à partir d'une souche nommée 23:07S. Celle-ci a été isolée en 2007 à partir d'un prélèvement de bubon sur un malade, enrichi par inoculation à une souris (décédée deux jours plus tard). Le patient se trouvait à Ambatomena (Manjakandriana, Fig. 21) et présentait un bubon de la taille d'un citron ; un décès dû à la peste avait récemment eu lieu dans le même village.

Les bactéries ont été mises en culture pendant deux jours à 26°C dans du bouillon BHI (Encadré 13). La concentration de la suspension obtenue a été estimée grâce à un spectrophotomètre. Des dilutions ont ensuite été réalisées pour obtenir la concentration désirée qui varie en fonction de l'expérience considérée (dose injectée différente dans chacune des expériences). Des dilutions de la suspension ont aussi été étalées sur boîte CIN (Encadré 13) de façon à estimer la concentration plus précisément, par comptage des colonies (en cfu, *colony forming units*, un cfu correspond à une bactérie).

L'inoculation de *Y. pestis* se fait par injection sous-cutanée au niveau de la cuisse de 100µL de suspension bactérienne. Les rats sont ensuite contrôlés deux fois par jour pendant 18 jours. Les rats décédés sont disséqués et un broyat de leur rate est soumise à un test rapide de détection des antigènes F1 (Chanteau *et al.*, 2003 ; Encadré 12), de façon à vérifier que la peste est bien l'origine de leur décès. Au bout de 18 jours après inoculation, une goutte de sang des rats survivants est déposée sur un sérobuvarde de façon à effectuer un dosage en anticorps anti-F1 (Encadré 12).

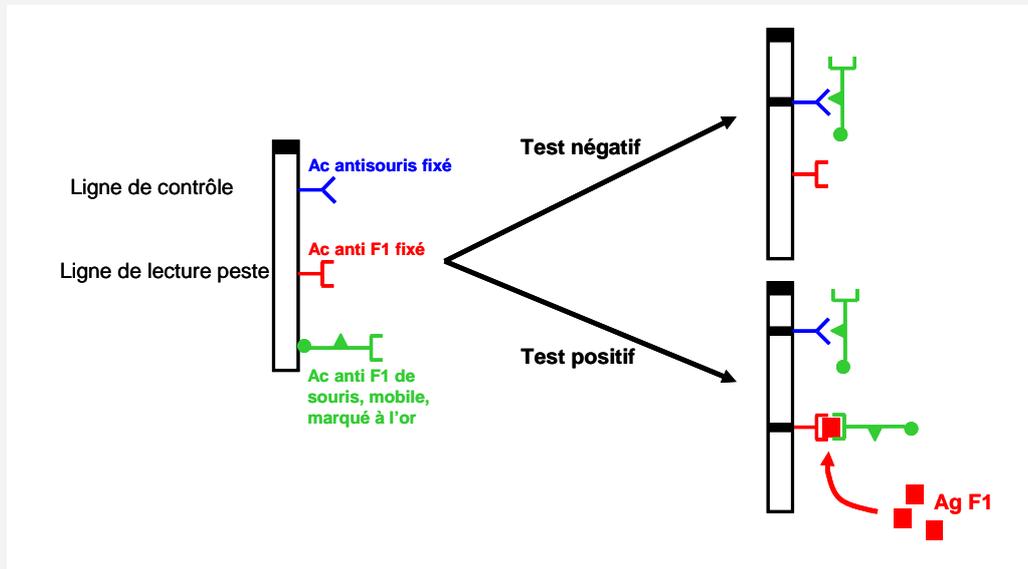
Figure 21 Localisation géographique des localités échantillonnées pour les infections expérimentales (triangles noirs), des localités précédemment étudiées par Rahalison *et al.* (2003) (ronds vides) et du village d'origine de la souche de *Y. pestis* utilisée (23:07S) (étoile).



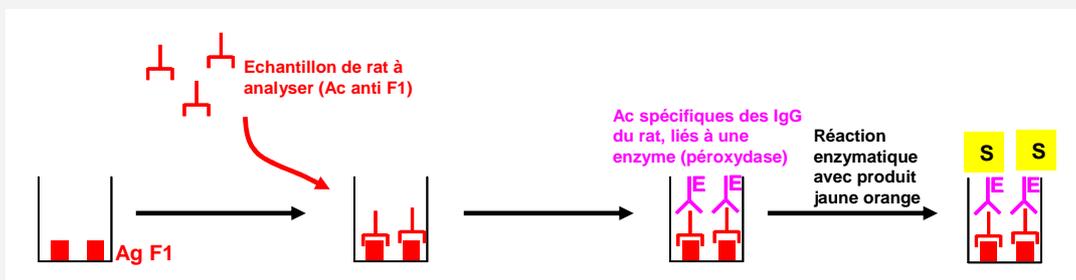
Encadré 12 Illustration schématique du principe des tests immunologiques utilisés.

Ces méthodes sont basées sur la détection de l'antigène F1 et des anticorps anti-F1. F1 est une protéine spécifique de *Y. pestis*. Elle compose sa capsule bactérienne et est libérée en quantités importantes dans les organes de l'hôte. Ac = anticorps. Ag = antigène.

(a) Test bandelette antigène F1 (Chanteau *et al.*, 2003)



(b) Dosage en anticorps (IgG) anti-F1 par ELISA (Dromigny, 1997 ; Rasoamanana *et al.*, 1997)



D'après Chanteau (2006)

Encadré 13 Milieux utilisés pour la culture de *Y. pestis* dans le cadre des infections expérimentales

Boite CIN (Cefsulodine, Irgasan, Novobiocine): milieu gélosé contenant trois antibiotiques permettant l'isolement sélectif et la numération de *Y. pestis*. Celle-ci est observée sous forme de colonies fines à noyau rouge, mates et à bordure irrégulière.



Bouillon BHI (Brain Heart Infusion): milieu réalisé à partir de cerveau de veau et cœur de bœuf. C'est un milieu très riche utilisé pour le repiquage des micro-organismes exigeants tels que *Y. pestis*. Il ne peut être utilisée que sur des cultures pures.

D'après Chanteau (2006)

2. Effet de la zone d'origine sur la sensibilité à la peste

Le taux de mortalité après infection expérimentale par la peste a été étudié (1) dans trois expériences pour les rats noirs issus des zones sans peste (basse altitude) et (2) dans quatre expériences pour les rats issus du foyer de peste (hauts plateaux centraux). Les populations de rats issues des deux zones diffèrent significativement dans leur sensibilité lors de l'injection de *Y. pestis* : les rats issus des hauts plateaux centraux sont beaucoup plus résistants que les rats issus de la zone de basse altitude (Fig. 22, effet origine des rats $p = 0.014$, voir aussi l'article II).

Comme chez de nombreuses espèces (Dennis *et al.*, 1999), le développement de la maladie est généralement très rapide chez les rats noirs malgaches (rats des hauts plateaux infectés à forte dose et rats de basse altitude) : les rats qui décèdent le font en général entre le deuxième et quatrième jour avec 90 % des décès avant le septième jour (Fig. 23). Cependant, la mort est plus tardive pour les rats des hauts plateaux infectés à faible dose avec la majorité des décès entre le troisième et septième jour et des mortalités dues à la peste survenant jusqu'à 17 jours post-inoculation (Fig. 23).

Figure 22 Courbe dose-réponse suite à l'injection d'une souche de peste virulente comparée entre populations de la zone de peste et de la zone sans peste.

Les populations de la zone de peste sont représentées par des triangles tandis que celles de la zone sans peste par des carrés. Les points indiquent les pourcentages de mortalité avec leur intervalle de confiance binomial. Les droites de régression sont représentées.

Pour les rats de la zone de peste, les deux points marqués A correspondent à des expériences d'infections réalisées sur des rats échantillonnés entre les mois de septembre et janvier, tandis que les points marqués B ont été obtenus à partir de rats échantillonnés au mois de mai.

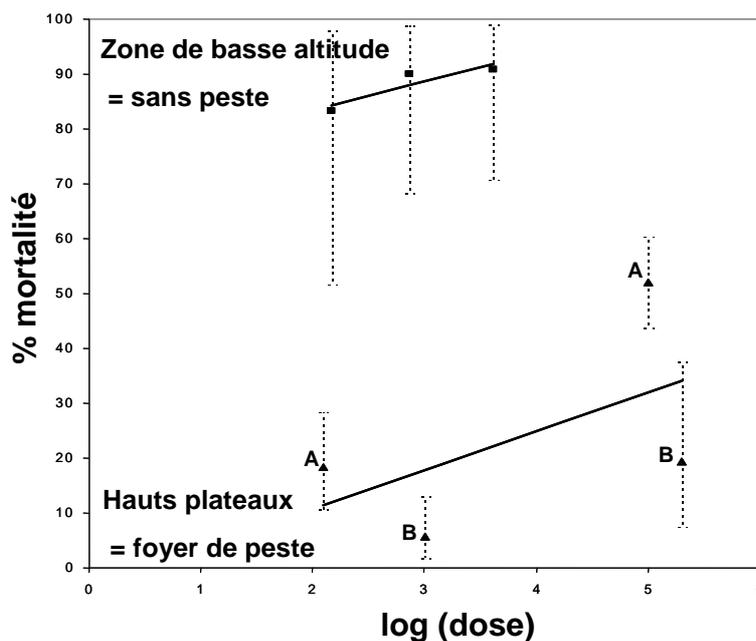
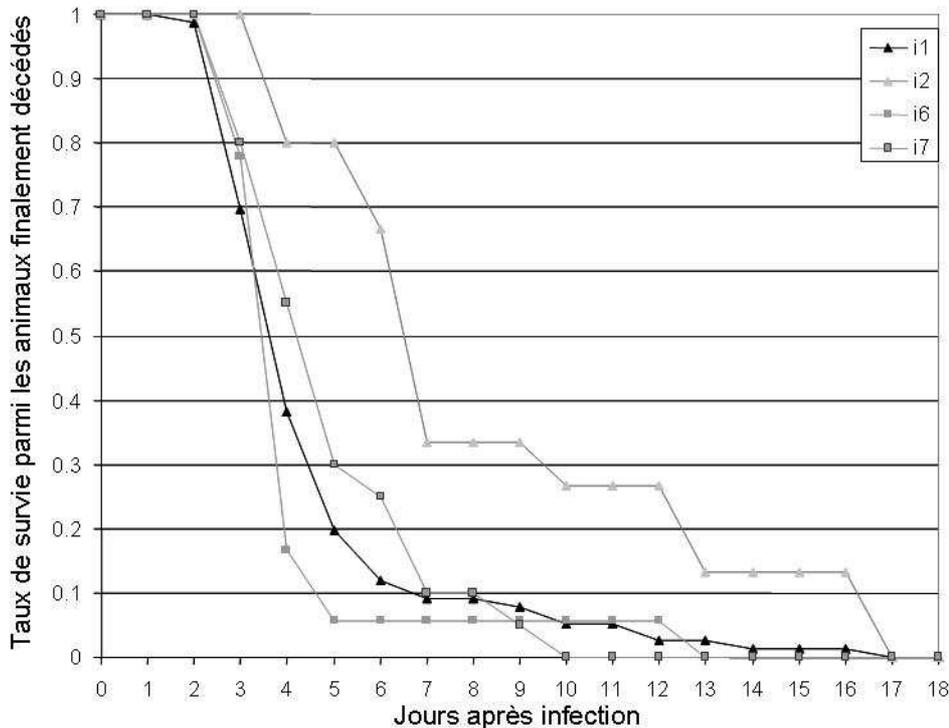


Figure 23 Cinétique de mortalité des rats noirs malgaches après une infection expérimentale par *Yersinia pestis*.

Seules les expériences incluant au moins 14 rats décédés sont représentées. La courbe en noir (indiquée i1) correspond à une expérience d'infection à forte dose (10^5 cfu) tandis que les autres (en gris) sont des infections à dose inférieure à 5000 cfu. Les courbes notées i1 et i2 ont été obtenues à partir d'infections des rats des hauts plateaux tandis que les courbes i6 et i7 correspondent à des rats issus de basse altitude.



3. Variabilité de la sensibilité au sein de la zone de peste

- Variabilité individuelle

De façon générale, on s'attend à des variations de la résistance aux maladies selon le sexe et l'âge des animaux. En effet, les mâles sont souvent plus sensibles que les femelles, ce qui est attribué à un investissement immunitaire différentiel des deux sexes en conséquence d'intérêts évolutifs différents⁷ (Klein, 2000 ; Rolff, 2002 ; Zuk & Stoehr, 2002). L'âge des animaux peut aussi avoir un effet sur la résistance aux maladies, premièrement via l'effet négatif de l'âge sur le système immunitaire (sénescence immunitaire, Doums *et al.*, 2002 ; DeVeale *et al.*, 2004). Inversement, si la résistance est due à une exposition préalable, l'âge augmentera la probabilité d'avoir déjà été en contact avec le pathogène.

Dans le cas de la peste, le niveau individuel de résistance est connu pour être affecté par le sexe et par l'âge des animaux (Twigg, 1978 ; Gage & Kosoy, 2005 ; voir Introduction IV-6). Chez l'homme, l'incidence de la peste est souvent variable selon le sexe mais le sexe le plus

⁷ Le principe de Bateman propose que les femelles investissent dans la longévité, tandis que les mâles investissent dans le succès reproducteur (Bateman, 1948). La sélection en faveur d'une résistance aux pathogènes serait donc plus forte pour les femelles que pour les mâles.

touché n'est pas toujours le même dans les différents foyers (les hommes sont les plus touchés à Madagascar, Migliani *et al.*, 2006 ; tandis que ce sont les femmes en Tanzanie, Davis *et al.*, 2006). Des différences comportementales sont classiquement invoquées pour expliquer cela, bien que ces différences ne soient pas toujours très nettes (par exemple à Mahajanga, Boisier *et al.*, 2002). Chez le rat malgache, la séroprévalence pour la peste peut différer selon le sexe avec une séroprévalence plus forte chez les mâles (Rahelinirina, 2009 ; mais Dromigny, 1997 n'a pas mis en évidence d'effet du sexe). De plus, il semble que la séroprévalence augmente avec l'âge des animaux (Dromigny, 1997), ce qui peut s'interpréter comme la conséquence d'une durée d'exposition plus grande, ou par une résistance plus importante des individus âgés.

D'autre part, différentes observations indiquent que la résistance à la peste pourrait varier selon l'habitat des rats à Madagascar : intérieur des maisons, haies de sisal ou bas-fonds (voir Fig. 9). En effet, les rats noirs changent peu d'habitat (Rahelinirina, 2009) et ils ne portent pas les mêmes puces selon leur habitat : *Xenopsylla cheopis* est la puce principale dans les maisons, tandis que *Synopsyllus fonquerniei* est majoritaire à l'extérieur (Brygoo, 1966). Les niveaux de séroprévalence des rongeurs (reflet de la circulation de la bactérie dans un site) peuvent de plus varier fortement en fonction de l'habitat au sein d'une localité, avec les rats des milieux de l'extérieur présentant des séroprévalences plus fortes que ceux des maisons (Dromigny, 1997 ; Rahelinirina, 2009).

Dans notre étude, nous pouvons estimer la classe d'âge des animaux à partir de leur masse (quatre classes d'âge définies chez le rat noir de Madagascar, Rahelinirina, 2009) et nous avons étudié l'effet des facteurs sexe, classe d'âge et habitat sur l'issue de l'inoculation expérimentale (survie ou décès) chez les rats issus des hauts plateaux centraux. Seul le sexe a une influence dans une des quatre expériences réalisées ($p = 0.035$), avec les mâles légèrement plus résistants que les femelles (57.6 % des mâles vs 40 % des femelles survivent). Cette observation (opposée au principe de Bateman présenté ci-dessus) n'est pas vérifiée dans les autres expériences. Mais cela peut être dû à un manque de puissance, sachant que les nombres de décès sont faibles. L'âge et l'habitat ne se révèlent jamais significatifs pour expliquer la résistance à la peste. L'absence d'effet de l'âge sur la résistance suggère que c'est probablement la durée d'exposition à la peste qui détermine la variabilité du niveau de séroprévalence en fonction de l'âge chez le rat.

- Variabilité temporelle

Au niveau populationnel, on peut remarquer une hétérogénéité du niveau de résistance entre les quatre expériences d'infections réalisées sur des rats venant de la zone de peste (Fig. 22). Une explication possible est un effet de la saison sur la résistance à la peste puisque les deux expériences d'infections expérimentales qui ont donné de forts niveaux de résistance ont été réalisées sur des rats échantillonnés au mois de mai, tandis qu'une résistance plus faible a été obtenue pour des rats échantillonnés à l'automne.

En effet, de nombreuses maladies infectieuses montrent une dynamique saisonnière (Altizer *et al.*, 2006 ; Duffy *et al.*, 2009). Une variabilité temporelle de la réponse immunitaire face à la peste a de plus déjà été observée chez les grandes gerbilles du Kazakhstan (Park *et al.*, 2007). Dans le cas de la peste à Madagascar, la maladie circule principalement entre Octobre et Mars, ce qui se traduit par des cas humains (Migliani *et al.*, 2006) et un taux de séropositifs chez *R. rattus* plus fort (Rahelinirina, 2009). Cette saisonnalité est liée à l'abondance relative des hôtes et des vecteurs au début de la saison de peste: les rats étant en nombre réduit tandis que les puces sont à leur maximum (Duplantier & Duchemin, 2003a). Une potentielle épidémie survenant pendant la saison de peste agirait comme pression de sélection, conduisant à une augmentation du niveau de résistance pendant cette période. La reproduction (principalement de Mars à Juin en extérieur, Duplantier & Rakotondravony, 1999 ; Rahelinirina, 2009) conduirait ensuite à une diminution de ce niveau de résistance si les descendants de rats résistants ne sont pas tous résistants (voir III-2). Une explication alternative des variations saisonnières de résistance serait une variation de l'immunocompétence générale due aux cycles photopériodiques avec une immunité affaiblie pendant l'hiver malgache (Dowell, 2001). Cependant, l'existence de ces variations saisonnières du niveau de résistance à la peste des rats noirs malgaches reste à confirmer. Celle-ci n'avait auparavant pas été détectée chez des rats noirs d'Antananarivo, avec une dose létale pour la moitié des individus similaire à quatre périodes de l'année (mois de mars, juin, juillet et novembre, Brygoo & Rajenison, 1972).

4. Production d'anticorps en réponse à l'infection

La majorité des rats issus des hauts plateaux centraux ayant survécu à l'infection expérimentale présente des anticorps anti-F1. Cependant ce taux varie selon la dose injectée, avec 63-76 % des rats pour une infection à faible dose (125-1000 cfu) contre 94-100 % à forte dose (10^5 - 2.10^5 cfu).

D'autre part, lors d'une expérience d'infection expérimentale (non présentée jusqu'à présent) impliquant trois lots de rats, nous avons eu la surprise de constater un taux de mortalité extrêmement faible : par exemple, 6.7 % de mortalité sur des rats de basse altitude injectés à une dose de 500 cfu alors que l'attendu au vu des expériences précédentes était d'environ 90 %. L'hypothèse la plus probable est une perte de virulence de la souche de peste. En effet, le génome de *Y. pestis* est connu pour être instable et les fréquentes recombinaisons génétiques peuvent conduire à une perte de virulence (Buchrieser *et al.*, 1999 ; Parkhill *et al.*, 2001). Ici, l'utilisation d'une souche cultivée à partir d'une colonie (sur boîte CIN, Encadré 12) peut avoir conduit au tirage aléatoire d'une bactérie mutante ayant perdu sa virulence. Le vaccin EV utilisé à Madagascar avait ainsi été obtenu par culture de bactéries provenant d'un malade, donc d'une souche virulente (Chanteau, 2006).

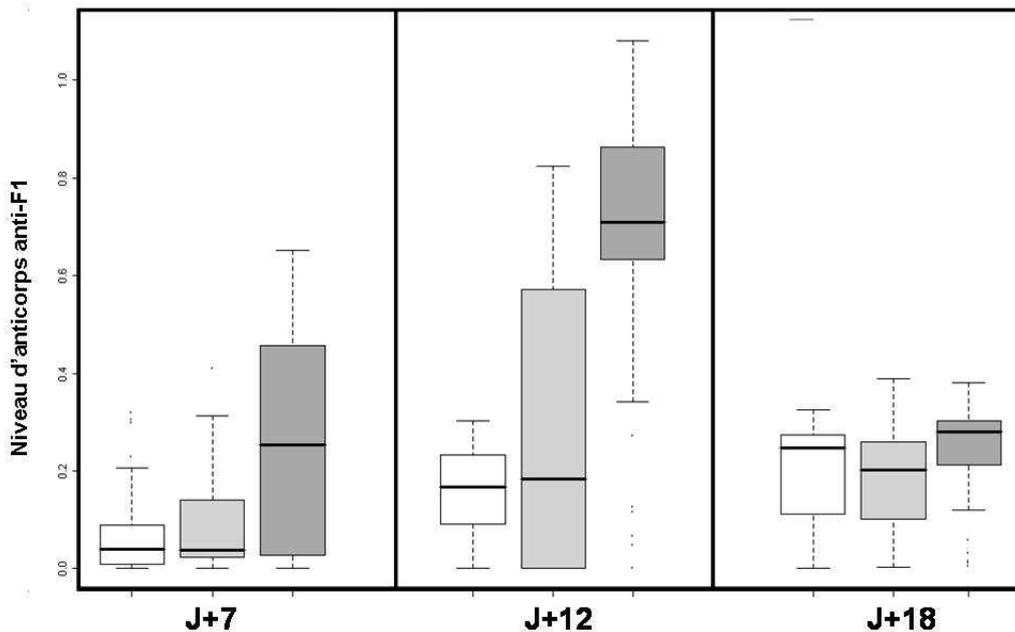
Ces expériences ont été mises à profit pour étudier la cinétique de la production d'anticorps dans les jours qui suivent l'infection, ce qui est rarement étudié chez des rats issus de populations naturelles. Chez *Mastomys natalensis*, Shepherd *et al.* (1986a) ont montré que les

anticorps (IgG anti-F1) apparaissent 6 jours après une inoculation de *Y. pestis* virulente chez les individus survivants. Mais l'avantage d'utiliser ici une souche avirulente est la possibilité de comparer les réponses d'animaux sensibles (qui seraient morts si on avait utilisé une souche virulente) et résistants⁸. Des échantillons de sérum ont été prélevés après 3 ou 4 jours (une partie des individus seulement), puis pour tous les animaux à 7, 12 et 18 jours après l'inoculation.

Seuls trois rats sur 62 se sont révélés séropositifs après trois jours, les anticorps apparaissant en général après sept jours (pour 42-68% des rats séropositifs à J+7). Les résultats obtenus sont représentés dans la Fig. 24. L'effet de la dose injectée a été étudié chez les rats de la zone de peste (les rats de basse altitude n'ayant été infecté qu'à faible dose) et le taux d'anticorps produit dépend de la dose (MANOVA avec mesures répétées, $p = 0.0001$). L'effet de l'origine des rats a été étudié pour une dose injectée faible et les rats des deux zones ne diffèrent pas significativement dans leur taux d'anticorps produits ($p = 0.18$) mais l'interaction origine*temps est significative ($p = 0.01$), révélant une cinétique de la réponse immunitaire différente (réponse en moyenne plus forte chez les rats de la zone de peste à J+12 seulement).

Figure 24 Distribution du niveau d'anticorps anti-F1 chez *Rattus rattus* dans les jours suivant l'infection par une souche de *Yersinia pestis* non virulente (après 7, 12 et 18 jours) dans trois expériences.

Le niveau d'anticorps est représenté pour chaque groupe par une boîte à moustaches classique: trait épais indique la médiane, la boîte contient 50 % des observations et les moustaches contiennent les valeurs non extrêmes (représentées, elles, par des points). Les distributions correspondent: en blanc, à des rats issus de la zone sans peste, inoculés à dose faible (500cfu) ; en gris clair, à des rats de la zone de peste, inoculés à dose faible (500cfu) et en gris foncé, à des rats de la zone de peste, inoculés à dose forte (10^5 cfu).



⁸ Résistance et sensibilité sont ici considérées au niveau populationnel : les rats issus des hauts plateaux sont globalement considérés comme résistants, tandis que ceux issus de basse altitude sont considérés sensibles.

5. Suivi des bactéries dans la phase précoce de la pathologie

Le devenir des bactéries chez les rats résistants n'a jamais été réellement étudié. Pourtant, cette question est très importante puisqu'elle détermine le rôle que ces rats peuvent ou non jouer dans la transmission de la peste. Bien que la littérature soit parfois ambiguë à ce sujet (par exemple Park *et al.*, 2007), il semble pourtant clair que les rats résistants ne peuvent atteindre la bactériémie nécessaire à la transmission de *Y. pestis* à la puce (au moins 10^6 cfu/mL, Lorange *et al.*, 2005), car un rongeur présentant de tels taux de bactéries dans le sang meurt dans les deux jours (Sebbane *et al.*, 2005 ; Eisen & Gage, 2009). Cependant, des bactéries peuvent exister en plus faible quantité et dans certains organes chez les rats résistants. Des bactéries ont ainsi été trouvées dans la moelle osseuse de rats noirs malgaches ayant survécu à une infection expérimentale après sept semaines (L. Rahalison, données non publiées). Thomas *et al.* (1988) a observé le développement de bubons contenant *Y. pestis* jusqu'à 30 jours après infection chez des souris (*Onychomys leucogaster*) ayant survécu à l'infection. De plus, la possibilité pour des hôtes de conserver la bactérie dans certains organes et de devenir septicémique tardivement lors d'un stress par exemple (infection chronique) est fréquemment évoquée dans la littérature (Lindner *et al.*, 2007 ; Wimsatt & Biggins, 2009).

Nous avons réalisé une expérience préliminaire pour étudier le taux de bactéries dans le sang et la rate d'animaux infectés, aux troisième et quatrième jours après infection. Dix-huit rats issus d'une population des hauts plateaux (INA, Fig. 20) ont été inoculés à forte dose ($2 \cdot 10^5$ cfu). La moitié a été sacrifiée après trois jours et l'autre moitié après quatre jours. Une autre expérience sans sacrifice a été menée en parallèle dans laquelle environ 20% des individus sont décédés. On s'attendait donc, si on n'avait pas sacrifié les rats, au décès de 20% des 18 rats, c'est à dire 3 à 4 rats, et à la survie des autres (14-15 rats). L'hypothèse est que les rats qui seraient décédés présentent une quantité de bactéries importante dans la rate et dans le sang, tandis que ceux qui auraient survécu présentent pas ou peu de bactéries dans la rate, et pas de bactérie dans le sang (dans le cas d'une résistance au sens strict et non d'une tolérance). Les antigènes F1 ont été recherchés dans la rate par test bandelette (Encadré 12) et des cultures de bactéries ont été réalisées sur boîte CIN (Encadré 13) à partir de broyat de rate et de sang prélevé dans le coeur. La masse de la rate des animaux a été estimée car cet organe est très important dans la défense contre les pathogènes, en conséquence de sa fonction de prolifération des lymphocytes (John, 1994). On s'attend à un grossissement de la rate proportionnel à l'infection bactérienne (Grasman, 2002 ; voir par exemple de Bellocq *et al.*, 2007 ; Cowan *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. La culture à partir d'une goutte de sang ne s'est révélée positive pour *Y. pestis* que pour un seul rat (rat n°10, sacrifié à J+4) sur 18. Ce rat présentait aussi de grandes quantités de bactéries dans la rate. Deux autres rats (sacrifiés à J+4) présentaient aussi des bactéries dans la rate. Le test bandelette a révélé la présence d'antigènes F1 dans la rate de nombreux rats (15 sur 18, en conséquence d'une sensibilité plus grande de ce test que de la bactériologie, Tableau 1).

Chapitre 2

On n'observe pas de relation claire entre la masse de la rate (rapportée à la masse de l'animal) et le niveau de l'infection. Le seul rat trouvé en septicémie a un rapport masse de la rate sur masse du corps important (rat n°10 : 10.86), mais ce n'est pas le maximum observé (rat n°7 : 15.93). Cependant, le protocole présente le problème de ne pas comparer la masse de la rate avant et après infection pour chaque individu, mais seulement entre différents individus infectés, en faisant l'hypothèse simplificatrice que tous les rats ont le même rapport entre masse de la rate et masse du corps avant infection. Des expériences antérieures indiquent que la résistance à la peste chez les rats de Madagascar ne semble pas affectée par la splénectomie préalable des animaux (Brygoo & Rajenison, 1972). Malgré la colonisation précoce de la rate par *Y. pestis* (seulement 36 heures après infection chez *R. norvegicus*, Sebbane *et al.*, 2005), cette étude suggère une influence faible de la rate sur le niveau de résistance à la peste. Nos résultats, bien que soumis à caution, iraient aussi dans ce sens.

De façon générale, les résultats obtenus ne sont pas facilement interprétables car on n'a pas observé l'attendu de 3-4 rats différents des autres. Il semble en tous cas que peu de rats (un sur 18 ici) soient trouvés en phase septicémique 3 à 4 jours après infection.

Tableau 1 Résultats de l'expérience préliminaire de suivi du niveau de bactéries dans le sang et la rate, trois et quatre jours après l'infection expérimentale.

Pour la sérologie, la valeur de la densité optique (DO, Encadré 12) est indiquée, ainsi que le résultat du test (P : positif et N : négatif). Le résultat du test rapide de détection de l'antigène F1 (Encadré 12), réalisé sur la rate des animaux sacrifiés est indiqué (0 : négatif, + : faiblement positif et 3+ : fortement positif).

Rat n°	sexe	masse (m)	date sacrifice	masse rate (m _R)	m _R /m	Sérologie		bactériologie		Test Bd
						DO	résultat	sang	rate	AG rate
1	M	138	J + 3	0,77	5,46	0,032	N	0	6	+
2	M	96	J + 3	0,3	3,16	0,008	N	0	0	0
3	M	112	J + 3	0,42	3,56	0,003	N	0	0	0
4	M	87	J + 3	0,84	8,57	0,005	N	0	1	0
5	M	90	J + 3	0,49	5,05	0,013	N	0	0	+
6	F	152	J + 3	0,77	4,97	0,000	N	0	7	+
7	F	82	J + 3	1,37	15,93	0,000	N	0	0	+
8	F	120	J + 3	0,93	7,62	0,000	N	0	0	+
9	F	125	J + 3	1,55	11,31	0,000	N	0	0	+
10	M	150	J + 4	1,52	10,86	0,013	N	+++	+++	3+
11	M	171	J + 4	0,95	5,56	0,018	N	0	0	+
12	M	85	J + 4	0,36	3,96	0,048	N	0	81	+
13	M	110	J + 4	0,34	2,76	0,018	N	0	0	+
14	M	74	J + 4	0,29	3,58	0,024	N	0	0	+
15	F	109	J + 4	0,27	2,45	0,000	N	0	0	+
16	F	129	J + 4	0,77	5,42	0,000	N	0	0	+
17	F	146	J + 4	NA	NA	0,006	N	0	0	+
18	F	74	J + 4	0,53	6,71	0,064	P	0	0	+

6. Conclusions et perspectives

En plus de nous fournir des animaux de phénotype connu nécessaires pour les analyses génétiques (dans le chapitre 3), réaliser des infections expérimentales a permis d'apporter quelques réponses aux questions (voir I) soulevées par les travaux de Rahalison *et al.* (2003). La différence de sensibilité entre populations de la zone de peste et zone sans peste est confirmée. Cette observation a été étendue à des localités supplémentaires, notamment à la zone de basse altitude située du côté ouest des hauts plateaux (localité MIA), dont l'histoire et l'écologie diffèrent de la région de la côte est préalablement étudiée (Encadré 11). L'habitat et l'âge ne semblent pas avoir une influence importante sur la résistance à la peste. Le sexe pourrait jouer un rôle, avec une tendance des mâles à être plus résistants. La maladie se développe rapidement chez le rat noir, comme chez l'homme (Perry & Fetherston, 1997) ou le rat de laboratoire *R. norvegicus* (Sebbane *et al.*, 2005). Cette vitesse dépend cependant de la dose de bactéries injectées. La réponse humorale en anticorps anti-F1 n'est pas différente entre populations de la zone de peste et de la zone sans peste, bien que sa cinétique semble légèrement différente.

Pour l'ensemble de ces études, nous avons utilisé des rats directement issus de populations naturelles, et non nés en captivité. L'avantage est qu'il est possible de transposer les taux de mortalité suite à l'infection expérimentale aux taux de rats effectivement décédés de peste dans la nature, et donc ce type d'expérience est plus intéressant pour étudier les conséquences épidémiologiques de la résistance.

Cependant, l'exposition préalable des rats à la peste peut affecter leur niveau de résistance. Nous avons considéré les rats se révélant séronégatifs en anticorps anti-F1 comme n'ayant jamais été en contact avec *Y. pestis* (Fig. 19). Utiliser une seule mesure de taux d'anticorps pour vérifier la naïveté des individus face à la peste peut pourtant sembler peu précautionneux : sachant que les rats des hauts plateaux sont soumis à une circulation importante de la maladie, il est possible qu'un taux plus important que celui indiqué par le nombre de rats séropositifs ait été en contact avec la bactérie. Ce contact pourrait dater de quelques mois et la quantité d'anticorps anti-F1 pourrait alors avoir diminué (la disparition des anticorps apparue suite à une infection expérimentale a en général lieu après 5 à 12 mois, V.M. Andrianaivoarimanana, com. pers.); mais les rats pourraient cependant garder une résistance accrue à l'infection, par exemple en conséquence d'une immunité cellulaire mémoire (V.M. Andrianaivoarimanana, com. pers.). Mais ce cas est probablement rare dans la nature car la durée de vie des rats est courte (moins d'un an en général, J.-M. Duplantier, com. pers.). D'autre part, la proportion de rats séronégatifs après infection, bien que petite pour une dose forte injectée (0-6 %), peut monter jusqu'à 37 % lors d'une infection par dose faible. Une vérification plus rigoureuse de la naïveté des rats face à la peste pourrait inclure une autre mesure de l'immunité humorale (par exemple un dosage en anticorps anti-LcrV, comme dans Li *et al.*, 2008) ou encore l'évaluation de l'immunité cellulaire mémoire (par exemple un test de prolifération des cellules mononuclées du sang périphériques lors de la stimulation par

l'antigène F1, voir Andrianaivoarimanana, 2007). En outre, bien que l'antigène F1 augmente la virulence des souches de *Y. pestis* (Du *et al.*, 2002 ; Sebbane *et al.*, 2009), il n'est pas indispensable pour l'infection (Drozdov *et al.*, 1995 ; Sebbane *et al.*, 2009). Des souches virulentes ne présentant pas d'antigène F1 ont en outre déjà été isolées (par exemple Winter *et al.*, 1960), mais cela reste très rare (de l'ordre de 1% des souches, Anisimov *et al.*, 2004) et n'a jamais été mis en évidence à Madagascar. C'est pourquoi le diagnostic de peste reste aujourd'hui en grande partie basé sur la détection de l'antigène F1 (test de diagnostic rapide par bandelette notamment, Encadré 12). La seule façon de s'affranchir à coup sûr du problème de la naïveté face à la peste des rats inoculés serait finalement de travailler avec des rats nés en captivité (voir par exemple Thomas *et al.*, 1988), ce qui n'est pas toujours évident (voir III les problèmes de reproduction des rats en animalerie).

Les résultats obtenus semblent cependant indiquer une importance limitée de l'histoire individuelle des rats (possible exposition préalable) pour expliquer l'issue de l'infection expérimentale, puisqu'on n'a pas observé d'effet de l'âge (approximé par la masse de l'animal) sur la résistance à la peste. Cette observation est en accord avec l'obtention d'un même niveau de résistance (DL₅₀ similaire) chez les rats nés en captivité que chez les parents sauvages (Rahalison *et al.*, 2003). Ainsi, il est possible que le fait de considérer les rats séronégatifs en anticorps anti-F1 comme naïfs face à la peste ne soit pas une si mauvaise approximation.

La dose de bactéries injectées lors d'une piqûre de puce semble être très variable (Lorange *et al.*, 2005 ; Encadré 6) et le nombre de puces trouvé sur un même rat peut lui aussi varier fortement (2.6 ± 5.09 puces par rat et jusqu'à 70 puces trouvées sur un rat, parmi 1477 rats noirs piégés dans la province d'Antananarivo en 2006). Il semble donc impossible de prévoir la dose de *Y. pestis* généralement reçue par les rats dans la nature. Or cette dose influence fortement sur la sensibilité et sur la réponse (ici, en anticorps mais probablement de façon générale) des rats face à la peste. D'autre part, dans nos expériences, les doses estimées à posteriori (comptage après culture) se sont parfois révélées bien différentes de celles choisies au départ (estimées grâce au spectrophotomètre), sans que nous ne puissions l'expliquer et le protocole pourra être amélioré en estimant de façon plus rigoureuse les doses injectées.

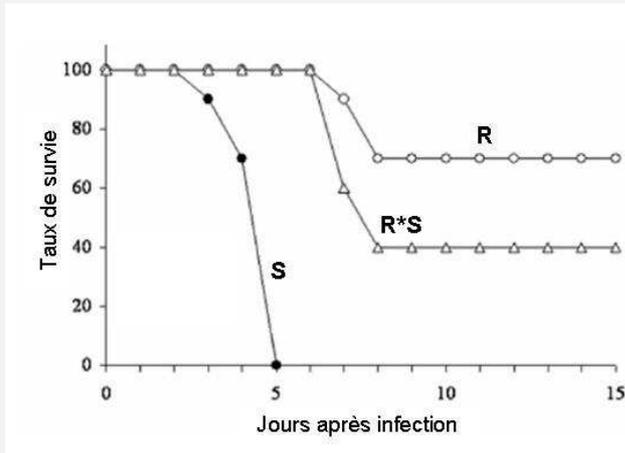
De façon générale, les protocoles expérimentaux devront donc être améliorés pour les expériences futures. Celles-ci pourront permettre de répondre à des questions non résolues, voire non abordées pendant ma thèse. Notamment, un suivi rigoureux du taux de bactéries dans la rate ou dans le sang des animaux infectés (comme dans Sebbane *et al.*, 2005 et Turner *et al.*, 2008, Encadré 14) ou encore un suivi du taux d'antigènes F1 (qui dépend de la sévérité de la maladie chez l'homme, Chanteau *et al.*, 1998a) pourraient être très intéressants pour étudier le rôle des rats résistants dans la transmission de la maladie, ou encore pour estimer la variabilité spatiotemporelle de la résistance à la peste au sein de la zone de peste.

Une étude comparée des mécanismes immunitaires face à la peste entre rats des hauts plateaux et rats de basse altitude pourrait aussi être envisagée. Par exemple, Arntzen *et al.* (1991) ont mis en évidence une prolifération différentielle des mononucléaires de la rate chez deux espèces de *Mastomys* différant dans leur sensibilité à la peste en Afrique du Sud.

Identifier les mécanismes physiologiques de défense contre *Y. pestis* distinguant les populations de *R. rattus* des deux zones pourra permettre de comprendre l'évolution de la réponse immunitaire, ainsi que d'affiner la définition de gènes candidats pour l'étude du déterminisme de la résistance (voir chapitre 3).

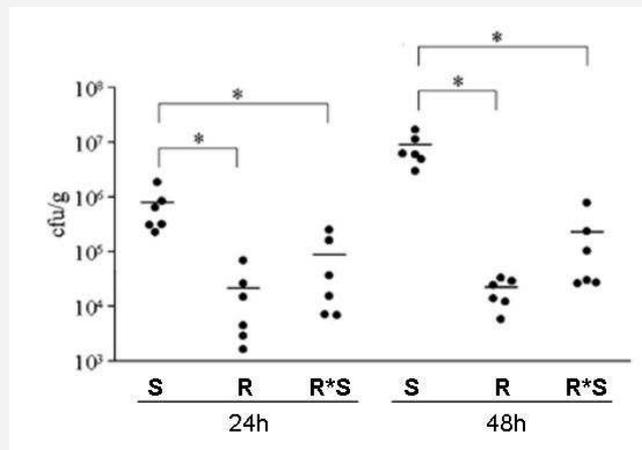
Encadré 14 Résultats de Turner *et al.* (2008): comparaison de deux lignées de souris différant dans leur résistance à la peste (souche atténuée de *Yersinia pestis*) et étude du déterminisme génétique de cette résistance.

(a) Cinétique du taux de survie après injection de 13 000 cfu



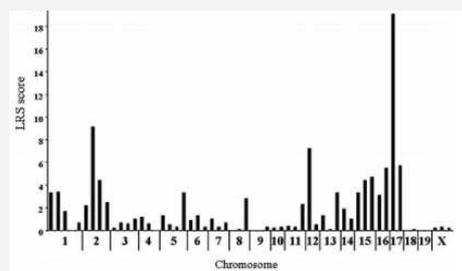
Les lignées de souris consanguines C57BL/6 (notée S) et BALB/cJ (notée R) diffèrent dans leur résistance à la peste. Leurs descendants F1 (notés R*S) présentent un phénotype intermédiaire.

(b) Quantification des bactéries dans la rate après injection de 2000 cfu



La différence de résistance/sensibilité des deux lignées se traduit par une différence de nombre de bactéries retrouvées dans la rate après infection. Le même résultat est trouvé dans le foie.

(c) Effet des différents chromosomes sur la résistance à la peste



L'analyse de 58 microsatellites chez 95 souris F2 révèle qu'un locus majeur pour la résistance se trouve sur le chromosome 17. Des analyses plus précises révèlent qu'il se trouve dans la région du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité).

III- Croisements

1. Objectifs et méthodologie générale

Dans le but de mieux comprendre le déterminisme génétique de la résistance à la peste chez le rat noir, des croisements ont été entrepris. En effet, réaliser des croisements en captivité et suivre la répartition d'un caractère phénotypique dans la descendance peut permettre de répondre à différentes questions telles que :

(1) la dominance d'un caractère : le caractère étudié est-il dominant, récessif ou encore co-dominant ?

(2) le nombre de gènes gouvernant le caractère étudié : les résultats sont-ils en accord ou non avec l'hypothèse d'un déterminisme monogénique du caractère ?

(3) la composition génétique d'une population : est-elle homogène sur le plan génétique ou présente-elle du polymorphisme ? En effet, l'observation d'une hétérogénéité phénotypique (mort ou survie) des rats des hauts plateaux n'implique pas forcément un polymorphisme génétique. On peut déterminer s'il existe un polymorphisme en sélectionnant la descendance de rats résistants : on s'attend à une augmentation de la résistance dans le cas d'un polymorphisme, tandis que la résistance restera constante dans le cas d'une population génétiquement homogène.

Les croisements sont donc très informatifs et semblent dans notre cas possibles car des reproductions de rat noir en captivité ont déjà été réalisées à l'IPM. Ils peuvent permettre de plus d'élaborer des lignées de rats dont le phénotype est connu. La connaissance du phénotype des rats des lignées à priori, et non à posteriori, est un avantage pour de nombreuses expériences (comme celle décrite II-5). De plus, ces lignées pourront être consanguines, ce qui permet de limiter la variabilité génétique (rats homozygotes) et par conséquent la variabilité phénotypique intra-lignée.

La mise au point du protocole de croisements est ici compliquée par le fait que l'on étudie le caractère complexe 'résistance à la peste'. Deux problèmes se posent alors:

1. La définition même du caractère

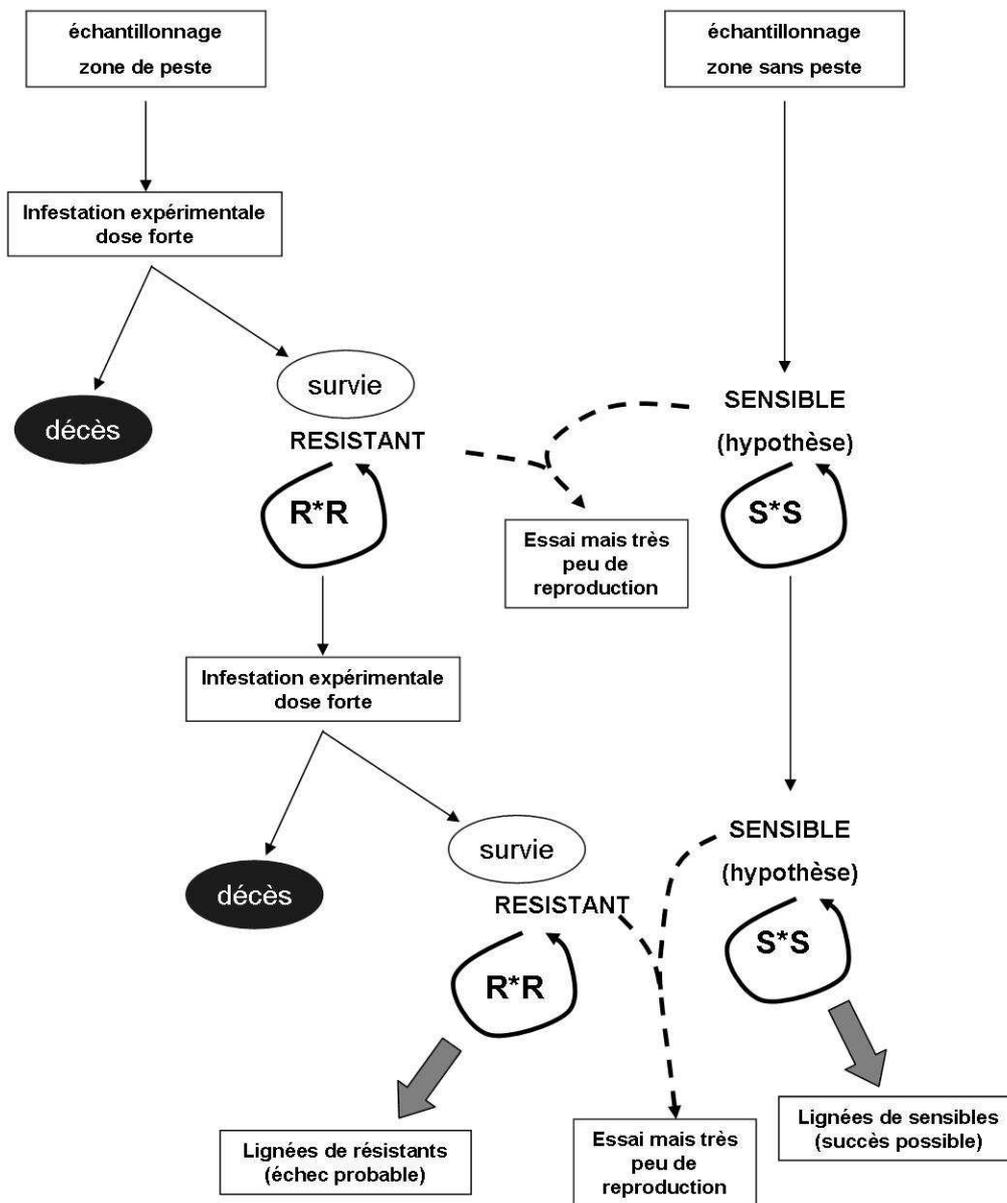
Qu'appelle-t-on un individu résistant ? On peut aborder la question en terme de vivant ou décédé à la suite d'une infection expérimentale. Mais alors, la question de la dose appliquée lors de l'infection expérimentale se pose. En effet, on peut être résistant à une dose et non à une dose supérieure. On a choisi pour cette partie, comme pour le chapitre 3, d'appliquer deux doses seuils définies à partir des résultats préalables de Rahalison *et al.* (2003) : (1) une dose faible (environ 100cfu), qui correspond à la dose tuant tous les rats de basse altitude (DL₁₀₀) : les individus qui décèdent suite à l'infection par une dose de 100cfu de *Y. pestis* sont considérés comme sensibles à la peste et (2) une dose forte (environ 10⁵ cfu), qui correspond environ à la dose tuant la moitié des rats du foyer de peste (DL₅₀): les individus qui survivent

à la suite de l'infection par une dose de 10^5 cfu de *Y. pestis* sont considérés comme résistants à la peste.

2. La survie des individus après définition de leur caractère

Si l'individu décède après une infection expérimentale à faible dose, son caractère 'sensible' sera connu mais il ne pourra être remis en couple pour continuer le suivi du caractère dans la descendance. On a donc choisi de travailler avec des individus a priori sensibles, c'est-à-dire des individus issus des populations de la zone de basse altitude, qui sont globalement sensibles (voir résultats I-2). Ces rats ont été infectés après reproduction de façon à vérifier leur sensibilité à posteriori.

Figure 25 Schéma du déroulement des croisements réalisés au cours de la thèse.



2. Expériences réalisées et résultats obtenus

Le déroulement des expériences réalisées est schématisé dans la Fig. 25.

En Février-Mars 2007, des rats ont été échantillonnés dans deux localités des hauts plateaux centraux (zone de peste, INA et MAN) et dans deux localités de basse altitude (zone sans peste, BRI et MIA, Fig. 21). Ces rats ont été ramenés en captivité à l'IPM. Les rats issus des hauts plateaux centraux ont été infectés par une dose forte de *Y. pestis* (infection décrite dans la partie II-2). Les individus ayant survécu à cette infection et donc caractérisés comme résistants ont été mis en couples, ainsi que des individus issus des zones de basse altitude considérés comme sensibles. Les couples ont été formés en mettant dans une cage un individu mâle et deux individus femelles. Au total, 80 couples ont été formés dont 17 entre des individus de basse altitude, 8 entre des individus des hauts plateaux centraux et 55 couples 'mixtes' faisant intervenir des rats issus des deux zones.

Sept mois plus tard (Octobre 2007), seulement 13 portées (dont 10 viables) au total avaient été obtenues. Le nombre de portées par couple est donc faible (0.023 portées/couple/mois). Les couples comportant deux rats issus de la même zone (0.046 portées/couple/mois) se reproduisent mieux que les couples dont les deux rats venaient de zones différentes (0.013 portées/couple/mois) (différence significative² : $p = 0.034$). Les couples ont alors été modifiés pour ne former que des couples d'origine identique lors de la première génération (Fig. 25). Des individus issus des hauts plateaux ont été croisés avec des individus de basse altitude lors de la deuxième génération. En effet, on s'attend à une reproduction améliorée entre descendants de première génération car (i) ces individus sont nés en captivité et (ii) ils sont nés de parents s'étant reproduits en captivité.

Quatre mois plus tard (Janvier 2008), la reproduction avait augmenté avec 0.100 portées/couple/mois. Cependant, on a alors mis en évidence un effet du nombre de femelles par couple. Les cages contenant une seule femelle avec un mâle donnaient plus de portées (0.205 portées/couple/mois) que les cages contenant deux femelles et un mâle (0.073 portées/couple/mois) (⁹ $p = 0.010$). Il semble donc que l'absence d'une femelle surnuméraire augmente au moins deux fois la reproduction, compensant la diminution du nombre de couples car les mâles sont limitants (conséquence d'un plus grand nombre de femelles que de mâles capturés). Les couples ont donc été modifiés de façon à n'avoir qu'une seule femelle par mâle.

⁹ Différences testées grâce à des modèles linéaires généralisés, réalisés sur le nombre de portées obtenues pour chaque couple (variable suivant une loi de Poisson) avec une variable explicative binaire: (1) rats de même zone ou de deux zones différentes ou (2) femelle seule dans sa cage ou deux femelles par cage.

Chapitre 2

En Juin 2008, la deuxième génération a été mise en place.

Premièrement, les parents venant de la zone de basse altitude ont été infectés expérimentalement de façon à vérifier l'hypothèse qu'ils sont sensibles à la peste. 20 rats sur 22 inoculés sont décédés (90.9 %, voir II-2), ce qui confirme donc la sensibilité de la population parentale. Cependant, la dose effectivement injectée (voir II-6 pour une discussion sur la différence entre dose prévue et dose réelle) était de 4000cfu, ce qui n'est pas si faible (100 cfu attendu). De plus, les deux rats survivants étaient des rats s'étant bien reproduits. La vérification de la sensibilité des parents n'est donc pas vraiment un succès mais aucune expérience complémentaire n'a pu être réalisée à posteriori.

D'autre part, les descendants issus des croisements de deux parents résistants ont été infectés à forte dose. Toutes familles confondues, on a inoculé 47 rats (issus de huit familles différentes) et 51.1% sont décédés après inoculation. Pour les familles présentant au moins sept individus (trois familles), on trouve entre 46.2 et 57.1% de décès au sein des familles (Tableau 2).

Tableau 2 Résultats de l'infection des descendants F1 de rats des hauts plateaux ayant survécu à une infection expérimentale à la peste (et donc classés comme 'résistants').

N° famille	Nb rats total	Nb rats décédés	pourcentage mortalité
1	3	1	33.3
2	4	0	0.0
3	4	4	100.0
4	4	2	50.0
5	5	2	40.0
6	7	4	57.1
7	7	4	57.1
8	13	6	46.2
TOTAL	47	24	51.1

Les rats survivants, ainsi que les descendants de sensibles, ont alors été remis en couple. Au total 28 couples ont été formés (voir détails dans le Tableau 3). La priorité a été mise sur les couples avec un résistant et un sensible, de façon à obtenir des F1. Pour les couples de résistants d'une part et de sensibles d'autre part, des frères et sœurs (si possible non issus de la même portée, pour augmenter les chances de succès dans la reproduction) ont été croisés de façon à commencer l'élaboration de lignées consanguines.

Tableau 3 Croisements des rats descendants des rats capturés sur le terrain (mise en place juin 2008 / bilan en janvier 2009).

Nombre de couples, nombre de portées obtenues (total, c'est à dire viables ou non), nombre de portées par couple et par mois et objectifs de chaque type de croisement.

Type de croisement	Nombre de couples Nombre de portées (Nb de portées/couple/mois)		Objectifs du type de croisement	
	Consanguins	Non consanguins	Consanguins	Non consanguins
R * R	3 0 (0.000)	3 0 (0.000)	- Obtenir des lignées de rats résistants	
			- Déterminer si le taux de résistants augmente au cours des générations lors de la sélection de rats résistants ou pas → Existe-il du polymorphisme dans la population ?	
R * S	--	11 3 (0.039)	/	- Déterminer le taux de résistants chez les F1 → la résistance est-elle dominante ? le résultat est-il en accord avec un déterminisme monogénique ?
S * S	18 11 (0.092)	3 2 (0.071)	- Obtenir des lignées de rats sensibles	

En janvier 2009, contrairement à l'attendu, la reproduction ne s'était pas améliorée : on avait obtenu 0.060 portées/couple/mois. Compte tenu du nombre de couples, peu de portées ont été obtenues (16 portées au total dont 12 viables). En particulier, aucune portée n'a été obtenue pour les croisements R*R après 7 mois (mais on n'avait que 6 couples) et seulement trois portées pour les croisements R*S (0.039 portées/couple/mois). Seuls les descendants de S*S consanguines (11 portées obtenues au total, 0.092 portées/couple/mois) ont pu être remis en couple pour former des couples de deuxième génération et espérer obtenir des descendants de troisième génération.

La mortalité a été relativement importante entre Juin 2008 et Janvier 2009. On observe une tendance (test exact de Fisher, $p = 0.058$) des rats résistants (26.1% des rats décédés) à mourir plus que les rats sensibles (7.5% de rats décédés).

Au moment de la rédaction de la thèse en octobre 2009, nous n'avons toujours pas obtenu de descendants de troisième génération.

3. Conclusion, problèmes rencontrés et perspectives

Les croisements réalisés nous ont permis d'obtenir des résultats pour la composition des descendants de résistants (R*R) de première génération (F1), qui serait d'environ 50% de rats résistants. Ce résultat n'est pas en accord avec les prédictions dans le cas d'un seul gène et d'une bonne discrimination des résistants par infection à la dose de bactéries choisie (quelle que soit la dominance, on s'attend dans ce cas à 75-100 % de rats résistants). Le même pourcentage de résistants que celui obtenu pour la population native a donc été obtenu après sélection des résistants. La proportion de résistants n'aurait donc pas augmenté en réponse à une sélection artificielle pour la résistance à la peste, ce qui pourrait s'expliquer par une homogénéité de la population, avec un (des) allèle(s) de résistance fixé(s) sur les hauts plateaux centraux. Dans ce cas, le fait qu'une partie seulement des rats survive à une dose forte résulterait seulement de facteurs non génétiques (voir chapitre 3 pour une discussion des conséquences pour la détection de marqueurs génétiques liés à la peste). Cependant, cela n'est pour le moment qu'une hypothèse, qui mériterait des observations sur plusieurs générations pour être vérifiée. L'étude d'un caractère quantitatif potentiellement lié à la résistance (comme le taux de bactéries dans la rate après infection, Encadré 14) apporterait un argument favorisant ou non l'idée d'une variabilité individuelle au sein des populations de la zone de peste.

Les croisements expérimentaux réalisés ne permettent pas d'apporter autant de réponses qu'attendu, ce qui peut s'expliquer en partie par la faible intensité de la reproduction. Celle-ci pourrait être due aux conditions générales de l'élevage. La faiblesse de la reproduction dans les couples de rats résistants pourrait aussi être la conséquence du protocole expérimental qui nécessite de croiser des rats après leur avoir fait subir une infection expérimentale à la peste. Non seulement cela diminue grandement le nombre d'animaux disponible pour la reproduction, mais en plus, les rats survivants sont potentiellement affectés dans leur état général, ce qui pourrait nuire à leur capacité de reproduction. En effet, nos résultats suggèrent une différence de mortalité entre rats infectés ou non, ce qui est en accord avec un effet de la peste sur la survie chez des rongeurs résistants (comme chez la grande gerbille au Kazakhstan, Begon *et al.*, 2006). La peste pourrait ainsi affecter la valeur sélective, non seulement des rongeurs sensibles (mort dans les jours qui suivent l'infection), mais aussi des résistants (effet inconnu augmentant la mortalité dans les mois post-infection), ce qui aurait des conséquences épidémiologiques fortes.

Plus généralement, avec le recul on peut se demander si la définition du caractère 'résistance' ne peut pas être améliorée. L'idéal serait de travailler avec un caractère quantitatif, comme le temps de survie après infection ou bien la densité en bactéries dans un organe cible (Lengeling *et al.*, 2001). Ce type de caractère serait plus informatif qu'un caractère binaire survie/mort et moins dépendant de la définition arbitraire de la dose de bactéries injectées. Le temps de survie après infection a par exemple été utilisé par Sebastiani *et al.* (1998) pour étudier la résistance à *Salmonella typhimurium* chez la souris.

Alternativement, l'estimation du taux de bactéries après infection pourrait être une méthode intéressante pour les infections expérimentales (chapitre 2 II-6, Encadré 14) et dans le cas des croisements (voir par exemple Turner *et al.*, 2008, Encadré 14). Par rapport à la date de survie, ce caractère présente de plus un avantage au niveau éthique puisque les animaux sont sacrifiés à une date donnée plutôt que de laisser la maladie se développer jusqu'à la mort de l'animal.

Par la suite, les rats issus des croisements de rats de basse altitude pourront être utilisés, pour obtenir des lignées de rats sensibles. En revanche, les rats issus de croisements de rats résistants sont en nombre très limité. L'ensemble des expériences réalisées pour la partie 'croisements' aura finalement apporté des informations sur la méthodologie à utiliser dans le futur, plus que des résultats à proprement parler.

IV- Conclusion

Au cours de cette thèse, l'approche expérimentale a donné des résultats intéressants, notamment pour caractériser la résistance (Article II). Cependant, elle aura été décevante pour d'autres aspects, notamment dans l'étude de l'hérédité de la résistance par des croisements. Malgré les difficultés rencontrées, l'approche expérimentale devra être encouragée par la suite. En effet, celle-ci pourrait apporter des connaissances précieuses concernant les mécanismes de défense du rat noir face à *Y. pestis* et les différences immunitaires entre rats issus de la zone de peste et ceux de la zone sans peste. Ces études devront être standardisées par l'utilisation de rats nés en captivité, voire dans l'idéal de lignées consanguines.

En outre, l'approche expérimentale pourrait aussi permettre des investigations en immunologie écologique (Sadd & Schmid-Hempel, 2009 ; Schulenburg *et al.*, 2009). Par exemple, on pourrait étudier le coût de la résistance à la peste qui est probable puisque, dans le cas de ressources limitées, des compromis évolutifs entre différentes fonctions sont nécessaires (Lochmiller & Deerenberg, 2000 ; Rigby *et al.*, 2002). Ces derniers peuvent opposer l'immunité et la reproduction ; voir par exemple la relation négative entre fécondité et résistance à une bactérie chez des drosophiles (McKean *et al.*, 2008). Des compromis peuvent aussi avoir lieu entre différentes voies immunitaires, avec une résistance à un pathogène associée à une sensibilité accrue à un (des) autre(s) ; voir par exemple l'antagonisme entre la tuberculose bovine et les helminthes gastro-intestinaux chez le buffle d'Afrique (Jolles *et al.*, 2008).

Chapitre 3 :

Détection de marqueurs génétiques associés à la résistance à la peste chez *Rattus rattus*

Article III

CCR5 polymorphism and plague resistance in natural populations of the black rat in Madagascar

C.Tollenaere, L. Rahalison, M. Ranjalahy, S. Rahelinirina, J.-M. Duplantier, C. Brouat
Infection, Genetics and Evolution. (2008) 8: 891-897.

Article IV

AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection

C. Tollenaere, J.-M. Duplantier, L. Rahalison, M. Ranjalahy, C. Brouat
Soumis à *Molecular Ecology*

I- Introduction

L'étude du déterminisme génétique de traits adaptatifs peut être réalisée sans à priori à l'échelle du génome, ou bien par une étude gène candidat sur un gène choisi sur la base des connaissances préalables (voir Introduction II-3). Dans le cas de la résistance des hôtes aux pathogènes, ces connaissances préalables peuvent être des données génétiques acquises chez une autre espèce, ou encore des informations sur les mécanismes immunologiques développés contre le pathogène.

Concernant la résistance à la peste, la seule étude de génétique quantitative réalisée a récemment mis en évidence une région génomique importante située dans le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) sur des lignées de souris (Turner *et al.*, 2008, voir Encadré 14).

Jusqu'à présent, la réponse de l'hôte mammalien à *Y. pestis* a été relativement peu étudiée (Turner *et al.*, 2008, voir Introduction IV-4). Des études immunologiques ont cependant montré l'effet du TNF- α (Tumor necrosis factor, codé par le gène *Tnf*) et de l'IFN- γ (Interféron, codé par le gène *Ifng*) sur la survie de souris de laboratoire suite à une infection expérimentale de peste : l'injection de ces cytokines pro-inflammatoires confère une protection (Nakajima & Brubaker, 1993), tandis que leur neutralisation augmente la sensibilité (Parent *et al.*, 2006) face à la peste.

Le gène *Tlr-4* (Toll-like receptor 4) est impliqué dans la réponse immunitaire innée précoce contre les bactéries gram négatives : il code un récepteur reconnaissant le lipopolysaccharide (LPS) qui compose leur membrane externe (Poltorak *et al.*, 1998 ; Hoshino *et al.*, 1999). De son côté, *Y. pestis* présente un LPS particulier (Rebeil *et al.*, 2004), qui n'est pas reconnu par les TLR-4 (Montminy *et al.*, 2006).

Enfin, bien que la délétion du gène *Ccr5*, codant un récepteur de chémokines, n'ait pas été associée à une différence de sensibilité à la peste chez les souris (Elvin *et al.*, 2004 ; Mecsas *et al.*, 2004 ; Styer *et al.*, 2007), elle semble affecter certains mécanismes immunitaires de la réponse face à *Y. pestis* : la phagocytose par les macrophages (Elvin *et al.*, 2004) et le niveau de chémokines circulant (Styer *et al.*, 2007) sont plus élevés chez les souris déficientes pour ce gène.

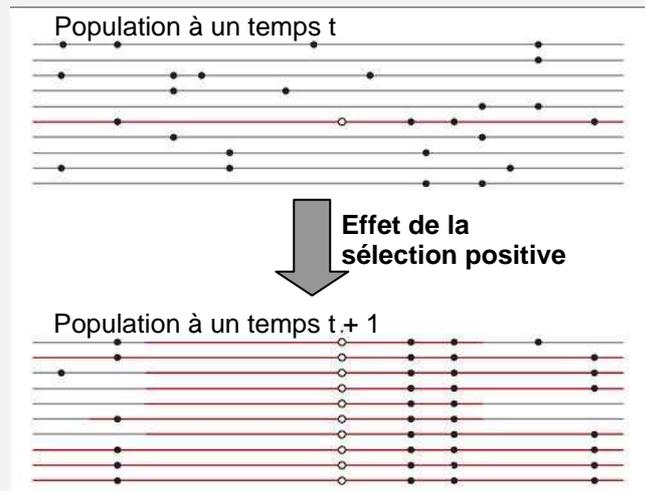
Sur la base des données de la littérature, différents gènes candidats peuvent donc être définis concernant la résistance à la peste : le complexe multigénique CMH, les gènes *Tnf* et *Ifng*, le gène *Tlr-4* ou encore le gène *Ccr5*. En particulier, le gène *Ccr5* a donné des résultats préliminaires intéressants, et a donc été étudié (voir II, dont une partie des résultats fait l'objet de l'article III). Cependant, les mécanismes immunologiques restant relativement mal connus, et n'ayant jamais été comparés entre *Rattus rattus* sensibles et résistants dans les populations naturelles de Madagascar, une approche à l'échelle génomique, sans à priori sur les gènes impliqués, semblait aussi pertinente (voir III, dont une partie des résultats fait l'objet de l'article IV). Contrairement à l'approche gène candidat, où ce sont généralement les substitutions fonctionnelles qui sont recherchées, l'approche génomique vise à détecter des

marqueurs génétiques liés physiquement à des loci sous sélection et subissant de la sélection indirecte (ou auto-stop génétique, Encadré 15). Enfin une approche intermédiaire entre gène candidat et génomique a été envisagée avec l'étude d'un complexe génique candidat, le CMH, en utilisant des marqueurs génétiques liés (voir VI).

Encadré 15 Représentation schématique de l'effet de la sélection sur les régions génomiques adjacentes (auto-stop génétique)

Le site fonctionnel sous sélection positive est représenté en blanc, tandis que les marqueurs liés physiquement sont en noir. Ces derniers subiront une sélection indirecte en conséquence de leur liaison physique à un site sous sélection.

Chaque trait représente la portion de chromosome d'un individu avec celui qui porte la mutation avantageuse coloré en rouge.



Issu de Storz (2005)

Que ce soit dans le cas d'une approche gène candidat ou bien à l'échelle génomique, deux méthodes complémentaires sont envisageables et ont été utilisées au cours de cette thèse :

1) la comparaison d'individus caractérisés phénotypiquement, dans ce cas pour leur résistance à la peste. Des animaux infestés expérimentalement (voir chapitre 2) ont été utilisés et des associations entre l'issue de l'infection expérimentale (survie ou décès) et le génotype ont été recherchées (voir Introduction II-3). L'issue de l'infection expérimentale dépendant de la dose de bactéries injectées (voir chapitre 2 II-2), nous avons choisi, comme dans les expériences de croisements (voir chapitre 2 III-1), de considérer comme résistants les rats survivants à une dose de bactéries d'au moins 10^5 cfu tandis que les rats décédés à une dose inférieure ou égale à 100cfu sont considérés comme sensibles.

Il est cependant important de remarquer que cette approche n'est valable que s'il existe un polymorphisme génétique pour la résistance à la peste au sein des hauts plateaux de Madagascar. En effet, on n'observera pas d'association génotype / phénotype pour un locus déterminant la résistance si la résistance à la peste est fixée génétiquement, comme suggéré par certains résultats de croisements expérimentaux (voir chapitre 2 III-3). Cela mérite cependant des expériences complémentaires pour être confirmé et nous ferons dans cette partie l'hypothèse de l'existence d'un polymorphisme génétique pour la résistance à la peste dans les populations des hauts plateaux centraux de Madagascar.

2) la comparaison de populations connues pour avoir des phénotypes globalement différents, ici au niveau de leur résistance à la peste. En effet, les populations de la zone de peste diffèrent phénotypiquement des populations de la zone sans peste, avec une résistance plus forte en zone de peste (voir chapitre 2 II-2). On s'attend donc à des fréquences alléliques différentes entre zone de peste et zone sans peste pour les gènes impliqués dans la résistance. De plus, la pression de sélection par la peste est différente dans les deux zones et il est donc envisageable de détecter des loci affectés par une sélection s'exerçant seulement dans le foyer de peste, en comparant les différenciations génétiques entre des populations des deux zones (Beaumont, 2005 ; voir Fig. 2 pour les attendus). Pour cela, la distribution des mesures de différenciations génétiques observées est confrontée à un attendu neutre, qui peut être obtenu, théoriquement, empiriquement, ou encore par des simulations (Beaumont, 2005, Encadré 16). Dans notre cas, c'est l'approche par simulations qui a été utilisée (Encadré 16).

Encadré 16 Différentes méthodes d'obtention de la distribution des différenciations génétiques (F_{ST}) sous l'hypothèse de neutralité:

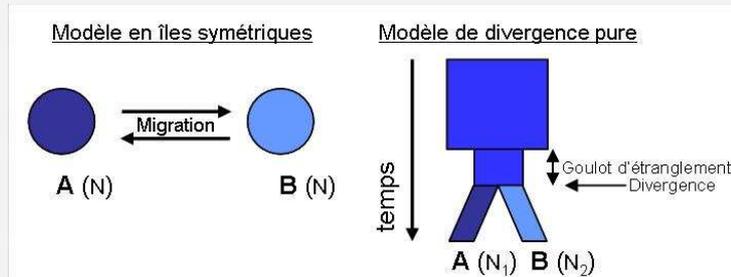
1) à partir d'un modèle:

- distribution théorique

Lewontin & Krakauer (1973) ont proposé l'utilisation d'un test de χ^2 pour tester l'écart de la distribution des F_{ST} à l'hypothèse de neutralité, mais ce test a par la suite été vivement critiqué (voir par exemple Nei & Maruyama, 1975, ou Robertson, 1975).

- distribution simulée

Les simulations utilisent comme modèles démographiques: le modèle en îles symétriques dans la méthode de Beaumont & Nichols (1996) (implémentée dans le logiciel Fdist) ou un modèle de divergence pure dans la méthode de Vitalis *et al.* (2001) (correspondant au logiciel DetSel).



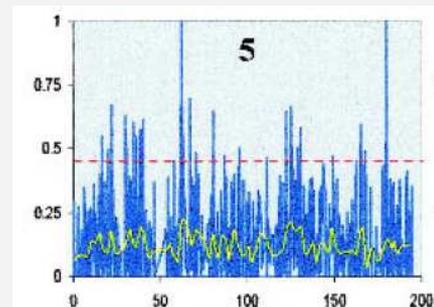
2) à partir des données:

- distribution empirique

Akey *et al.* (2002) ont analysé un jeu de données comprenant 26530 SNP dans le génome humain, ce qui leur permet d'estimer une distribution empirique des F_{ST} .

Ici, exemple du chromosome 5 (en bleu, F_{ST} pour chaque locus ; en jaune: F_{ST} moyen sur 1 Mb; en rouge seuil du F_{ST} pour 2.5 % des loci).

Cette approche nécessite un très grand nombre de marqueurs génétiques.



II- Etude du gène candidat Ccr5

1. Introduction

Le gène Ccr5 code un récepteur de chémokines, une famille de protéines impliquées principalement dans le recrutement et l'activation des leucocytes au niveau du site de l'inflammation (Rollins, 1997 ; Yoshie *et al.*, 2001). En particulier, le récepteur CCR5 est impliqué dans la réponse Th1 (immunité cellulaire) et la migration des macrophages (Mackay, 2001 ; Mantovani *et al.*, 2004).

Chez l'homme, un allèle mutant du gène Ccr5 (délétion conduisant à une absence de récepteur¹⁰) est associé à une protection contre le SIDA (Dean *et al.*, 1996 ; Samson *et al.*, 1996), en conséquence de l'utilisation de ce récepteur par le VIH pour pénétrer dans les lymphocytes T (Dragic *et al.*, 1996). L'interprétation de la distribution de cet allèle, présent en relativement forte fréquence dans les populations humaines européennes (environ 10 %) mais absent en Afrique et en Asie (Libert *et al.*, 1998 ; Stephens *et al.*, 1998) est controversée. Une sélection exercée dans le passé par des pathogènes comme la peste (Stephens *et al.*, 1998 ; Duncan *et al.*, 2005) ou la variole (Galvani & Slatkin, 2003) a été invoquée (Libert *et al.*, 1998 ; Novembre *et al.*, 2005). D'autres envisagent au contraire que le patron observé soit le résultat d'une évolution neutre (Sabeti *et al.*, 2005 ; Hedrick & Verrelli, 2006).

Contrairement au virus du SIDA, *Y. pestis* ne se fixe pas au récepteur CCR5 pour entrer dans les cellules. Cependant, le récepteur CCR5 intervient dans les phénomènes précoces de réaction face aux pathogènes (voir ci-dessus), probablement importants dans la réaction des hôtes face à la peste car le développement de la maladie est très rapide (en général, voir Introduction IV-4 et chez *R. rattus*, Fig. 23). Une modification du fonctionnement des chémokines, et par conséquent du recrutement des leucocytes au niveau du site d'inflammation, pourrait influencer le niveau de résistance/sensibilité à l'infection par *Y. pestis*. De plus, des différences immunitaires lors d'une infection par la peste ont été obtenus entre souris normales et souris déficientes pour le gène Ccr5 (Elvin *et al.*, 2004 ; Styer *et al.*, 2007, voir I).

2. Mise en évidence d'un polymorphisme protéique

Des amorces définies à partir du génome de *Rattus norvegicus* ont été utilisées pour séquencer une partie du gène Ccr5 (827pb représentant 75 % de la séquence codante, et incluant la délétion connue chez l'homme, voir §1) chez 14 *R. rattus* venant de différentes localités à Madagascar. Une seule substitution (A/G) a été mise en évidence (deux allèles nommés A et G, numéros Genbank FJ573194- FJ573195). Celle-ci est non synonyme (arginine / histidine) et se trouve dans la seconde boucle extracellulaire de la protéine

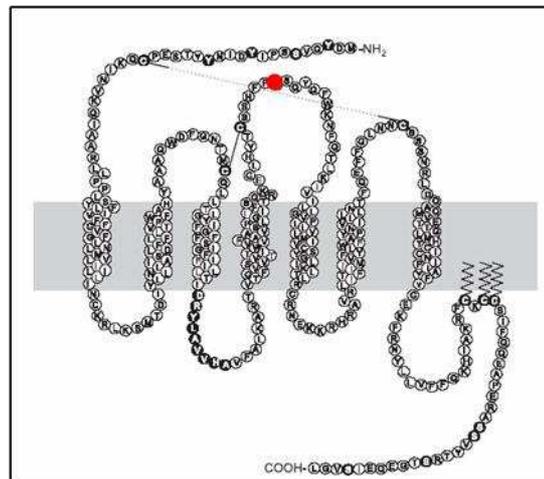
¹⁰ La délétion de 32pb est à l'origine d'un décalage du cadre de lecture. La protéine synthétisée est tronquée et donc non fonctionnelle. Elle n'est pas incluse dans la membrane plasmique comme le récepteur CCR5 fonctionnel.

(Opperman, 2004 ; Fig. 26), une région fonctionnellement importante puisqu'elle correspond à la zone de fixation des chémokines et confère au récepteur sa spécificité de ligand (Wu *et al.*, 1997 ; Dragic *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 2000). Le changement d'un seul acide aminé peut sembler modeste pour la fonction de la protéine. Pourtant, quelques exemples montrent que cela peut suffire à des modifications phénotypiques importantes : par exemple la couleur du pelage gouvernée par le gène Mc1r (Hoekstra *et al.*, 2006), ou la résistance à certains pathogènes influencée par le gène Nramp1 (Malo *et al.*, 1994) chez la souris. Cette substitution correspond à un site variable, par exemple entre l'homme, la souris et le rat (Carmo *et al.*, 2006). Chez *R. norvegicus*, on remarque que les souches Sprague Dawley (numéro Genbank U77350) et Wistar (Y12009) présentent un nucléotide A tandis que la souche Brown Norway (NM05960) a un G. Or cette dernière est plus résistante à la peste que les deux autres (Sebbane *et al.*, 2005).

Nous avons donc testé de nombreux individus de rat noir pour cette substitution par PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, permettant une discrimination codominante des deux allèles A et G, voir Annexe A2 pour la méthode).

Figure 26 Localisation de la substitution étudiée chez *Rattus rattus* à partir de la structure du récepteur *CCR5* chez l'homme (structure de la protéine issue de Opperman, 2004).

La substitution d'acide aminé, représentée en rouge, se situe dans la deuxième boucle extracellulaire de la protéine. La membrane plasmique de la cellule est représentée en gris, avec la région extracellulaire en haut et la partie intracellulaire en bas.



3. Comparaison d'individus de phénotype résistant ou sensible

Des rats noirs ayant subi une infection expérimentale ont été utilisés de façon à réaliser une étude d'association entre le phénotype (survie ou décès après infection expérimentale) et le génotype (présence ou absence de l'allèle G ; les homozygotes GG sont en effet trop rares pour être distingués des hétérozygotes AG). Trois jeux de données ont été utilisés. Le premier (E1) concerne des animaux issus d'expériences passées réalisées par l'IPM pour déterminer la DL_{50} (dose létale pour la moitié des individus) dans différentes populations. Il permet donc de comparer des rats considérés comme résistants (ayant survécu à une dose supérieure ou égale à 10^5 cfu) et des rats sensibles (décédés à une dose inférieure ou égale à 100 cfu) issus d'un ensemble de 6 populations des hauts plateaux (4-10 rats par population). Le second (E2) concerne des rats issus de villages proches de la localité INA (voir Fig. 12) infestés à une dose forte (10^5 cfu) et compare les rats résistants aux autres (décédés à 10^5 cfu). Enfin, le troisième (E3) est composé de rats issus de la même zone que ceux considérés pour E2 mais infestés à dose faible (100 cfu) et compare les rats sensibles aux autres (ayant survécu à 100 cfu). Ces deux derniers jeux de données correspondent à une partie de ceux analysés pour caractériser la résistance phénotypique (chapitre 2 II-2).

Au sein de E1, l'allèle G est plus présent chez les rats résistants (59.1 %) que chez les rats sensibles (22.2%) (test exact de Fisher, $p = 0.027$). La même tendance est observée pour E2 (44.4% chez les résistants contre 23.1% chez les autres) mais la différence n'est pas significative ($p = 0.148$). Enfin, dans E3, l'allèle G est présent avec la même fréquence chez les rats sensibles (20%) que chez les autres.

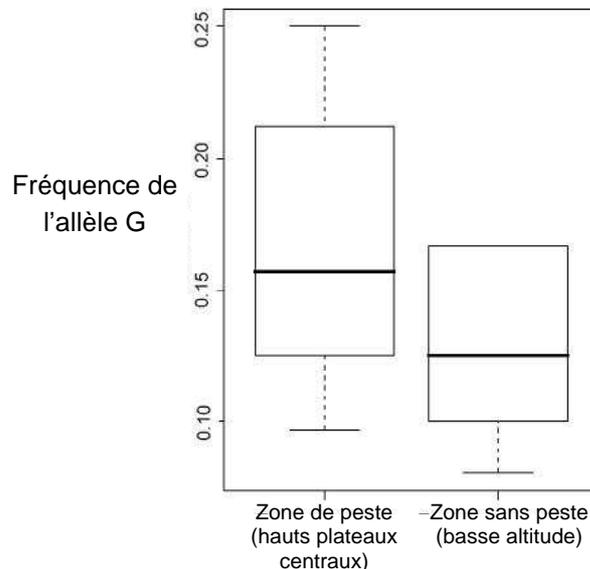
Le fait de n'obtenir une différence significative que pour E1 est probablement dû à la meilleure discrimination du phénotype dans ce jeu de données que dans les deux autres, puisque les rats ayant un phénotype non défini (survie à dose faible ou décès à dose forte) ont été exclus du jeu de données. Alternativement, cela peut être un biais dû au mélange de rats venant de différentes populations. En effet, ce jeu de données comprend différentes populations avec un nombre de résistants et de sensibles variables selon les populations et on peut ainsi imaginer une différence entre résistants et sensibles résultant en réalité des différences de fréquences alléliques entre populations. Cependant, les fréquences alléliques n'ayant pas été étudiées dans toutes les populations incluses dans ce jeu de données, nous ne pouvons pas étudier plus en détail cette dernière hypothèse.

Les résultats des relations entre génotype et phénotype indiqueraient donc une association de l'allèle G avec la résistance à la peste. Nous remarquons que les observations réalisées sur les souches de rat de laboratoire (*R. norvegicus*, voir II-2) vont dans le même sens.

4. Comparaison des populations de la zone de peste et zone sans peste

Si l'allèle G est associé à la résistance à la peste, on s'attend à des fréquences de l'allèle G plus forte dans la zone de peste (populations soumises à la pression de sélection exercée par la peste) que dans la zone sans peste (populations sensibles). Douze populations¹¹ dont six dans la zone de peste et six dans la zone sans peste (une trentaine d'individus par population) ont été analysées pour le gène *Ccr5*. Les fréquences alléliques ne diffèrent pas significativement entre zone de peste et zone sans peste (test de Mann-Whitney, $p = 0.164$), mais une tendance pour une plus forte fréquence de l'allèle G en zone de peste est observée (Fig. 27).

Figure 27 Comparaison des fréquences alléliques observées pour le gène *Ccr5* entre six populations de rats noirs de la zone de peste et six populations de la zone sans peste.



Cette analyse révèle que les fréquences alléliques au sein de la zone de peste sont très variables. C'est le cas même à petite échelle : la fréquence de l'allèle G varie de 9 à 21 % dans deux populations distantes de seulement 20 kms environ (ANT et AIM, Fig. 12). Des phénomènes locaux pourraient donc gouverner l'évolution du gène *Ccr5* et obscurcir les relations entre la fréquence de l'allèle G et la résistance à la peste à l'échelle de Madagascar. Ceci nous a conduit à étudier ce gène à une échelle régionale, au sein du foyer de peste.

¹¹ Dans ce cas, une population est définie comme un site de piégeage à l'échelle du village : on ne distingue pas le milieu d'échantillonnage (maisons ou extérieur, voir Fig. 10) car la structure génétique (étudiée sur des marqueurs microsatellites) est faible voire absente à cette échelle spatiale (Gilabert *et al.*, 2007).

5. Structure génétique à petite échelle au sein du foyer de peste

Cette étude a fait l'objet d'une partie du stage de master 1 de Sandrine Kako-Ouraga entre janvier et juin 2008.

Si les épidémies de peste ont une influence sur la fréquence de l'allèle G, on s'attend à une relation entre les fréquences alléliques du gène Ccr5 et des indicateurs de la circulation de la peste (supposés refléter l'intensité de la sélection) : l'historique de la peste humaine ou la séroprévalence murine. De plus, on s'attend à une structuration différente entre le gène Ccr5, dont l'allèle G serait sélectionné lors des épidémies de peste, et des marqueurs neutres. En particulier, comme les séroprévalences (Dromigny, 1997 ; Rahelinirina, 2009) ainsi que les espèces de puces (Brygoo, 1966) varient selon le milieu considéré (maison, haies de sisal ou bas-fond, voir Fig. 10 et chapitre 2 II-3), on s'attend à des niveaux de circulation de la peste différents, qui pourraient se traduire par variations des fréquences alléliques entre les différents milieux.

Pour tester ces prédictions, une étude à l'échelle locale¹² a été réalisée dans la région de Betafo, au sein de la zone de peste (Fig. 12).

Les résultats obtenus confirment la variabilité de la fréquence de l'allèle G à petite échelle (Fig. 28).

- Structuration des populations :

L'effet milieu n'est pas significatif sur la présence/absence de l'allèle G ($\chi^2 = 4.7$; $p = 0.09$), de même que l'interaction milieu*village ($\chi^2 = 5.81$; $p = 0.81$). En revanche, il existe un effet village ($\chi^2 = 18.53$; $p = 0.010$).

L'isolement par la distance n'est pas significatif (test de Mantel, $p = 0.68$) alors qu'une structuration par la distance a été mise en évidence sur des marqueurs neutres (microsatellites, $p < 0.0001$ pente = 0.006, Rahelinirina, 2009). Cette absence de structuration par la distance sur le gène Ccr5 contrairement à ce qui est observé sur les marqueurs neutres pourrait être une évidence de sélection balancée. Cependant, ce résultat peut aussi être la conséquence d'un manque de puissance liée à l'utilisation d'un seul locus. En effet, l'isolement par la distance sur chacun des loci microsatellites pris isolément n'est pas significatif non plus.

- Relation avec des indicateurs de circulation de la peste :

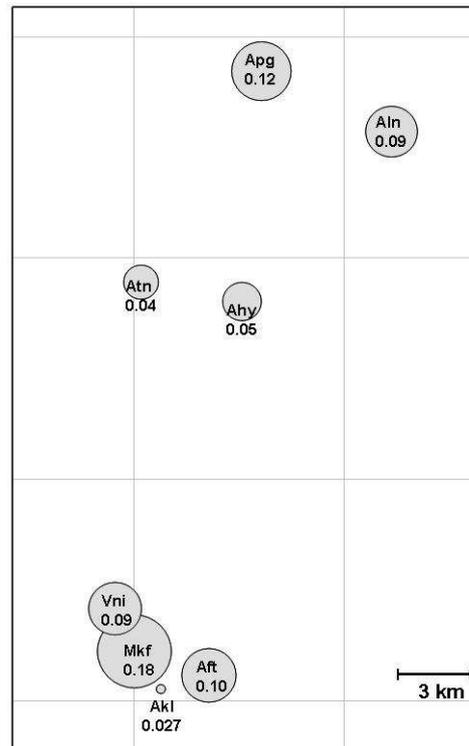
Contrairement à l'attendu, la fréquence de l'allèle G dans le village n'ayant pas recensé de cas humain dans les cinq dernières années n'est pas plus faible que dans les autres (Fig. 28). Cependant, l'analyse d'un seul village sans cas humain rend cette observation peu concluante. De plus, la déclaration des cas humains pouvant être sous-estimée, et la peste pouvant circuler chez les rongeurs sans transmission à l'homme, ceux-ci ne sont pas de très bons indicateurs de la présence de la peste dans les populations de rats noirs.

¹² A l'échelle de Betafo, les analyses de structuration génétique (isolement par la distance) ont été réalisées en distinguant les échantillonnages (ou 'populations') effectués dans les maisons, les haies de sisal et les bas-fonds (19 'populations'); tandis que les analyses de relation entre fréquence allélique et indicateurs de peste ont été réalisées en considérant un village (tout milieu confondu) comme une population (8 'populations'), de façon à augmenter le nombre d'individu par observation.

Il n'y a pas de relation entre la fréquence allélique et la séroprévalence murine (Spearman, $S = 101$, $p = 0.63$). La séroprévalence murine est un indicateur de la proportion de rats ayant eu la peste dans les mois passés (les anticorps persisteraient entre 5 et 12 mois, V. Andrianaivoarimanana, com. pers.) et ne peut donc renseigner que sur la sélection exercée très récemment (un an maximum). Il est possible que la fréquence de l'allèle sous sélection concerné résulte de l'intégration de la sélection sur une plus longue période et ne dépende que marginalement de la sélection de l'année.

Figure 28 Distribution géographique des fréquences alléliques obtenues pour le gène *Ccr5* dans les villages étudiés à une échelle locale au sein de la zone de peste (région de Betafo).

Pour chaque village ($20 < N < 59$), la taille du disque est proportionnelle à la fréquence de l'allèle G observée (de 0.03 à 0.18).
Le village Ambatondrafito (Aft) est le seul à ne pas avoir recensé de cas humains durant les cinq dernières années.



6. Conclusion

La mise en évidence d'une substitution potentiellement fonctionnelle et les premiers résultats de l'étude d'association (jeu de données E1) s'étant révélés prometteurs, le gène *Ccr5* a été étudié au niveau individuel lors de plusieurs expériences d'infections (E2 et E3), et au niveau populationnel à deux échelles géographiques et avec deux types d'analyses différentes (entre zone de peste et zone sans peste et au sein du foyer de peste). Les résultats sont finalement ambigus. La substitution mise en évidence dans le gène *Ccr5* pourrait avoir un rôle mineur dans le déterminisme de la résistance à la peste dans les populations de rats noirs malgaches, mais les arguments en faveur de cette hypothèse sont contrebalancés par l'absence de signaux similaires au niveau des fréquences alléliques dans les populations.

A l'exclusion de celles portant sur les primates porteurs de SIV, notre étude fait partie des rares recherches sur le gène *Ccr5* en populations naturelles (mais voir Carmo *et al.*, 2006). Celles-ci pourraient cependant se développer du fait de l'implication du récepteur CCR5 dans la défense contre le virus de West Nile (Lim *et al.*, 2006).

III- Détection de marqueurs génomiques sous sélection par la peste

1. Approche envisagée, méthodologie

Nous avons utilisé l'approche de génomique des populations (Black *et al.*, 2001 ; Luikart *et al.*, 2003) qui consiste en la détection d'empreintes de sélection en comparant les différenciations génétiques sur de nombreux marqueurs génétiques, tels que les AFLP par exemple, à l'attendu sous l'hypothèse de neutralité (attendu obtenu par simulations, Encadré 16). Cette approche a déjà été appliquée à différentes problématiques, depuis l'étude réalisée par Wilding *et al.* en 2001 (voir Tableau 4 et une revue dans Nosil *et al.*, 2009). Elle repose sur le fait qu'une différenciation génétique plus importante que pour le reste du génome est attendue, non seulement au niveau des loci sous sélection, mais aussi sur les marqueurs liés physiquement à ces loci (Encadré 15). La taille de la région génomique présentant une différenciation génétique forte (ou île génomique de divergence) dépend de l'intensité de la sélection et du niveau de recombinaison (Charlesworth *et al.*, 1997 ; Andolfatto, 2001). Les études empiriques, bien que rares jusqu'à présent, indiqueraient une forte variabilité dans la taille de cette île génomique de divergence (voir Encadré 17).

L'approche de génomique des populations a été validée par la co-localisation des loci détectés comme potentiellement sous sélection avec des QTL identifiés (Rogers & Bernatchez, 2005 ; Via & West, 2008) ou par des études d'associations génotype/phénotype au niveau individuel (Gagnaire *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous avons détecté des loci présentant une différenciation génétique plus forte que l'attendu (voir §3) puis avons testé les associations entre ces loci et l'issue d'infections expérimentales par la peste (voir §4). L'identification ultérieure des marqueurs AFLP anonymes, difficile dans le cas d'une espèce présentant peu de données génomiques (Bensch *et al.*, 2002 ; Wood *et al.*, 2008) est facilitée dans notre cas puisque le génome d'une espèce proche de *R. rattus*, *R. norvegicus*, est connu (Gibbs *et al.*, 2004). *Rattus norvegicus* aurait divergé de *R. rattus* il y a moins de trois millions d'années (Robins *et al.*, 2008). Ces deux espèces présentent ainsi seulement 9.62 % de sites variables pour le génome mitochondrial par exemple (comparaison entre génomes mitochondriaux complets de *R. rattus*, numéro Genbank EU273707 et *R. norvegicus*, NC_001665.2). Une synténie¹³ est de plus observée entre les deux espèces pour 16 chromosomes sur 18 (Cavagna *et al.*, 2002). Nous avons donc choisi une méthode de détection des loci candidats à la sélection peu restrictive permettant d'identifier un nombre conséquent de loci (voir §3), identifiables par la suite par comparaison avec le génome de *R. norvegicus* (voir §6).

¹³ Conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces.

Chapitre 3

Tableau 4 Quelques études visant à mettre en évidence des marqueurs génétiques sous sélection à partir de jeux de données de marqueurs AFLP par une approche de génomique des populations.

Espèce (Référence)	Conditions environnementales (Nb de populations échantillonnées)	Trait phénotypique	Nb total de marqueurs (Nb de combinaisons d'amorces)	Nombre de marqueurs sous sélection
<i>Littorina saxatilis</i> Littorine des rochers (Wilding <i>et al.</i> , 2001)	Localisation sur l'estran : en haut sur les falaises et les gros rochers (3) ou en bas dans les graviers (5)	Deux morphotypes	306 (5)	15 loci détectés par comparaison des écotypes dans 3 localités
<i>Coregonus clupeaformis</i> Grand corégone (Campbell & Bernatchez, 2004)	Habitat limnique (4) ou benthique (4)	Deux morphotypes	440 (7)	en moyenne 14 loci détectés par comparaison ; 6 loci détectés dans les 4 paires
<i>Rana temporaria</i> Grenouille rousse (Bonin <i>et al.</i> , 2006)	Gradient d'altitude: faible (2), moyenne (2) ou haute altitude (2)	inconnu	392 (10)	8 loci détectés dans au moins 2 paires de populations indépendantes ou dans une analyse globale
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> Chrysomèle des racines du maïs (Miller <i>et al.</i> , 2007b)	Alternance des cultures de maïs et soja (3) ou culture de maïs uniquement (3)	Résistance à l'alternance des cultures	353 (9)	1 seul locus détecté entre populations divergentes et pas entre populations de même type
<i>Viola cazorlensis</i> Violette de Carzola (Herrera & Bazaga, 2008)	Non caractérisées (14) (Populations fragmentées avec potentielle variation de pollinisateur)	Morphologie florale	369 (8)	9 loci détectés par les 2 logiciels utilisés lors d'une analyse globale
<i>Fundulus heteroclitus</i> Choquemort (Williams & Oleksiak, 2008)	Sites littoraux pollués (3) ou sites de référence (6)	Résistance aux hydrocarbures aromatiques	450 (5)	24 loci détectées dans 1 population polluée par rapport à ses deux sites de référence (4 communs à 2 sites pollués sur 3)
<i>Neochlamisus bebbianae</i> (Egan <i>et al.</i> , 2008)	Feuilles d'érable (3) ou de saule (3)	Divergence comportementale	447 (8)	23 loci détectés dans au moins deux paires de populations d'habitats différents, mais pas entre même habitats
<i>Arabidopsis halleri</i> Arabette de Haller (Meyer <i>et al.</i> , 2009)	Pollution par métaux lourds (2) ou pas (2)	Tolérance au zinc	820 (27)	13 loci sont détectés par les 2 logiciels utilisés, dont 4 communs aux 2 populations polluées

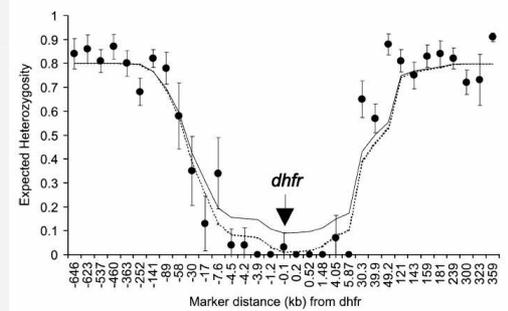
Encadré 17 Exemples d'études permettant d'estimer la taille de la région chromosomique subissant l'auto-stop génétique (île génomique de divergence)

- Le parasite responsable du paludisme (*Plasmodium falciparum*) présente une résistance aux antipaludéens en Asie du sud-est.

La résistance est due au gène *dhfr* et la diversité génétique a été étudiée pour des microsatellites proches du gène *dhfr*.

Chaque point correspond au résultat obtenu pour un locus microsatellite. Les courbes représentent les résultats de modèles d'auto-stop génétique.

Un signal de balayage sélectif (réduction de la diversité) est donc observé pour une région génomique d'environ **100 kb** (ou 6cM).



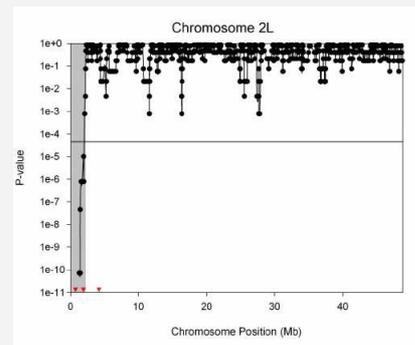
Issu de Nair et al. (2003)

- Le moustique africain *Anopheles gambiae*, vecteur du paludisme, présente deux formes M et S sympatriques partiellement isolées

La différenciation entre les deux morphes est testée et trois régions génomiques, dont la zone télomérique du bras gauche du chromosome 2 représentée ici. Pour cette région, la partie à forte différenciation (en gris) s'étend sur environ **2000 kb**.

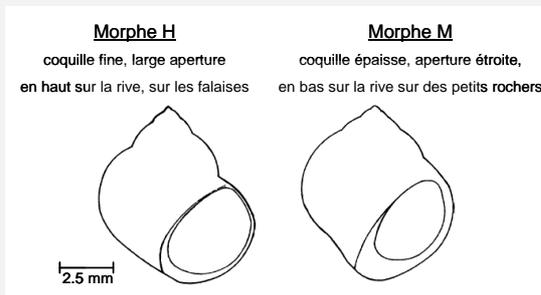
En revanche, pour les deux autres régions chromosomiques, la zone différenciée fait seulement quelques dizaines à centaines de kb.

Cependant, ces valeurs sont probablement sous-estimées.



Issu de Turner et al. (2005)

- Les littorines (*Littorina saxatilis*) de la côte nord-est de l'Angleterre présentent deux écotypes avec une barrière reproductive probablement partielle



Des marqueurs AFLP ont été utilisés pour détecter des loci singuliers, présentant une différenciation génétique entre les deux morphes plus forte que l'attendu neutre (voir Tableau 4).

Ces marqueurs ont ensuite été séquencés. Deux loci singuliers sur dix sont caractérisés par l'insertion d'éléments transposables.

On retrouve une différenciation génétique forte entre les deux morphes au niveau des séquences. La comparaison des séquences avec une bibliothèque BAC (Bacterial Artificial Chromosome) de séquences de 100-150kb suggère que les différents marqueurs singuliers se trouvent dans des régions indépendantes. De plus, la différenciation est fortement localisée, avec **moins de quelques kb** différenciés, suggérant des îles génomiques de divergence très réduites.

D'après Wilding et al. (2001) et Wood et al. (2008)

2. Marqueurs anonymes utilisés

Les marqueurs AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphism*), dont le principe est détaillé dans l'annexe **A3**, ont été utilisés (Vos *et al.*, 1995 ; Blears *et al.*, 1998). Ces marqueurs génétiques sont des marqueurs anonymes, à priori distribués aléatoirement dans le génome, dominants et bialléliques (Bonin *et al.*, 2007). Des essais préliminaires ont montré que l'obtention de marqueurs AFLP est plus satisfaisante (pics plus lisibles, répétabilité des lectures) avec des échantillons récents et nous avons donc choisi d'étudier des populations échantillonnées après 2006 (Tableau **5** et Fig. **12**).

Dix combinaisons d'amorces ont été utilisées. Les loci étudiés ont été choisis sur des critères de polymorphisme et de lisibilité (voir annexe **A4**). Finalement, 249 marqueurs ont été analysés. C'est un nombre de marqueurs modéré pour une approche de génomique des populations bien que nous ayons utilisé un nombre conséquent de combinaisons d'amorces (Tableau **4**). Ceci s'explique par le fait que les profils sont fortement similaires entre individus (seulement 35 % des pics clairs étaient polymorphes), traduisant le faible polymorphisme des populations de *R. rattus* à Madagascar, déjà été mis en évidence sur les séquences mitochondriales, probablement en conséquence d'un goulot d'étranglement lors de la colonisation de l'île par le rat noir (voir chapitre 1). Le génome de *R. norvegicus* étant constitué de 2.75 Gb (Gibbs *et al.*, 2004), notre étude comporte environ un marqueur tous les 11 Mb, en supposant que les marqueurs AFLP sont distribués uniformément dans le génome.

3. Identification des marqueurs sous sélection en populations naturelles

Nous avons utilisé deux méthodes pour distinguer les loci potentiellement sous sélection des loci neutres : celle implémentée dans *DFdist* (Beaumont & Nichols, 1996) et celle dans *DetSelD* (Vitalis *et al.*, 2001 ; 2003). Ces deux logiciels utilisent des modèles différents (modèle en îles pour *DFdist* et modèle de divergence pour *DetSelD* voir Encadré **16**) pour inférer la distribution des F_{ST} sous l'hypothèse de neutralité (à partir d'un F_{ST} global pour *DFdist* et de paramètres de nuisance renseignés par l'utilisateur dans *DetSelD*).

Ces méthodes ont été appliquées à quatre paires de populations, comprenant chaque fois une population de la zone de peste et une population de la zone sans peste : deux paires situées dans l'est de l'île et deux dans l'ouest (Tableau **5**). Étudier à la fois des paires de populations de l'est et de l'ouest de Madagascar peut permettre de séparer les effets corrélés de la présence/absence de la peste et de certaines autres pressions de sélection potentielles, puisque les zones de basse altitude à l'est et à l'ouest sont caractérisées par des conditions environnementales drastiquement différentes (Jury 2003, voir Encadré **11**).

Les différenciations génétiques entre les deux populations d'une même paire sont faibles ($F_{ST} < 3\%$), sauf pour la paire comportant la population ANK (Tableau **5**).

Tableau 5 Quatre paires de populations de *Rattus rattus* à Madagascar analysées avec des marqueurs AFLP.

Chaque paire est composée d'une population de la zone de peste et d'une population de la zone sans peste.

Nom	Population de la zone de peste	Population de la zone sans peste	Localisation dans le pays	F _{ST} moyen (249 loci)
E1	AIT	TSO	est	0.0281***
W1	ANT	ANK	ouest	0.0664***
E2	MOR	BRI	est	0.0147 ^{NS}
W2	INA	MIA	ouest	0.0238**

*** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; ^{NS} $p > 0.05$.

Nous avons considéré comme candidats à la sélection spécifique de la zone : (1) les marqueurs détectés dans au moins deux paires de populations (au seuil de 0.95, voir aussi Bonin *et al.*, 2006), et (2) ceux dont la p -value combinée sur les quatre paires de populations (par la méthode de Fisher, 1948) est inférieure à 0.01 (voir aussi Meyer *et al.*, 2009), et cela pour chacun des deux logiciels utilisés. Nous avons ainsi mis en évidence 22 loci candidats (voir Tableau 6).

L'association des loci avec des variables environnementales est vue comme un moyen de confirmer la ou les conditions étudiées comme possible pression de sélection (Bonin *et al.*, 2007 ; Holderegger *et al.*, 2008). Nous avons testé l'association entre la présence/absence du pic AFLP et la zone d'origine (peste ou sans peste) parmi les 22 loci candidats : 14 sont associés au facteur zone (test exact de Fisher ; Tableau 6). Cependant, un marqueur AFLP lié à un locus sous sélection par la peste peut ne pas être associé au facteur zone, par exemple si plusieurs allèles de résistance au gène fonctionnel existent (convergence au niveau du même locus) et varient suivant les populations.

La structure génétique obtenue sur les populations étudiées pour les marqueurs neutres (227 loci) est influencée par la géographie (avec un gradient est-ouest, Fig. 29). Au contraire, la structure génétique pour les marqueurs sous sélection (22 loci) distingue les populations de la zone de peste des populations de la zone sans peste (Fig. 29).

Les marqueurs détectés par ces méthodes sont candidats à une sélection différentielle entre zone de peste et zone sans peste. Mais la peste n'est pas la seule pression de sélection potentielle qui peut différencier ces deux zones, qui se définissent aussi en terme d'altitude (la zone de peste correspond à la zone d'altitude supérieure à 800 m).

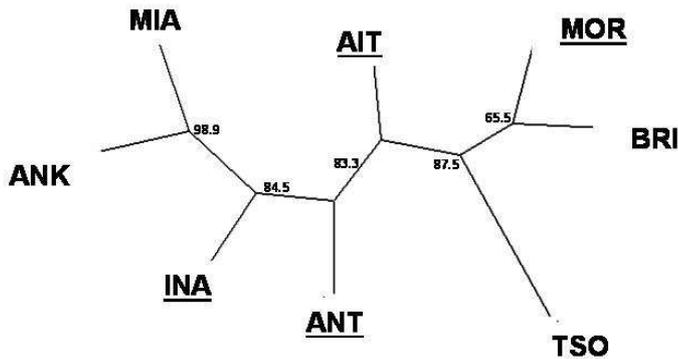
Figure 29 Structure génétique comparée des loci neutres et des loci candidats à la sélection.

A gauche, arbres en Neighbour-joining (les populations soulignées sont celles de la zone de peste) ; à droite, résultat de l'AMOVA en groupant les populations par zone (zone de peste ou zone sans peste) ou par la longitude (populations de l'est ou de l'ouest).

Facteur zone / facteur longitude

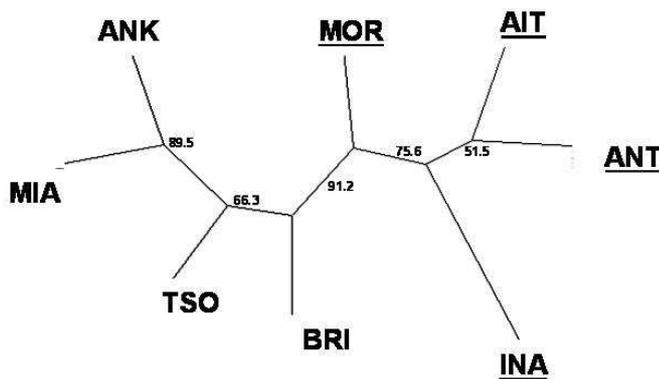
(a) 227 loci neutres

$p = 0.194 / p = 0.000$



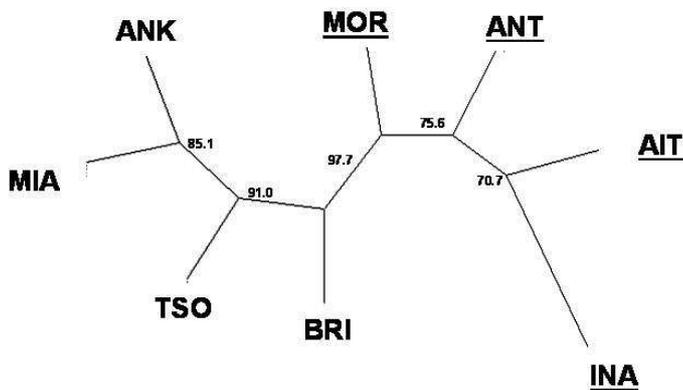
(b) 22 loci candidats à une sélection zone spécifique

$p = 0.000 / p = 0.541$



(c) 14 loci candidats à une zone spécifique et associés au facteur zone

$p = 0.000 / p = 0.624$



Différents facteurs écologiques peuvent aussi être des pressions de sélection potentielles, mais certains diffèrent entre populations de l'est et populations de l'ouest (notamment la pluviométrie, avec la région de l'est beaucoup plus humide que l'ouest, Encadré 11). Les loci détectés dans des paires de populations des deux 'côtés' de l'île de Madagascar (10 loci sur les 22, Tableau 6) sont donc de meilleurs candidats à une sélection par la peste car le nombre de facteurs écologiques confondants est plus faible que si l'on considère un seul 'côté'. Cependant, l'altitude, et par conséquent la température, sont confondus avec la présence / absence de la peste. Les marqueurs identifiés peuvent donc être considérés comme probablement soumis à une forme de sélection spécifique de la zone. Seule l'expérimentation peut alors permettre de dissocier les facteurs confondants.

4. Associations avec le résultat des inoculations expérimentales

Les associations entre la présence / absence du pic et l'issue d'infections expérimentales (test exact de Fisher) ont été recherchées pour tous les loci et dans deux jeux de données préalablement utilisés dans l'étude du gène *Ccr5* (voir II). Pour le jeu de données 'dose forte' (appelé E2 dans II), trois loci ont des p -valeurs inférieures à 0.05, dont deux détectés comme candidat à la sélection dans l'approche de génomique des populations (voir §3) : B408 ($p = 0.010$) et D466 ($p = 0.013$) ; et un locus non détecté comme singulier : B167 ($p = 0.002$). Pour le jeu de données 'dose faible' (appelé E3 dans II), c'est le cas de six loci dont aucun n'a été détecté comme singulier en génomique des populations : J220 ($p = 0.019$), U434 ($p = 0.021$), W162 ($p = 0.025$), Y163 ($p = 0.042$), U305 ($p = 0.044$) et N221 ($p = 0.048$). Deux loci présentent une p -valeur combinée sur les deux jeux de données (méthode de Fisher, 1948) significative : B167 ($p = 0.007$) et B172 ($p = 0.045$). Aucun de ces loci ne reste significatif après correction pour les tests multiples par la méthode séquentielle de Bonferroni.

Deux marqueurs, B408 et D466, sont identifiés comme candidats à la sélection par la peste en utilisant deux méthodes indépendantes (génomique des populations et étude des associations phénotypiques) et sont donc des candidats particulièrement intéressants pour la résistance à la peste. Cependant, les vingt marqueurs détectés comme singuliers par la génomique des populations, mais non associés au résultat de l'infection expérimentale, peuvent aussi être soumis à une pression de sélection exercée par la peste. Dans ce cas, l'absence d'association avec l'issue de l'infection expérimentale pourrait être due : (1) à un trop faible nombre d'individus testés expérimentalement pour détecter une influence modeste d'un locus, (2) au choix des doses de bactéries utilisées lors des infections expérimentales, potentiellement peu discriminantes, (3) à l'absence de polymorphisme génétique pour la résistance à la peste au sein des populations des hauts plateaux centraux (dans ce cas, le résultat de l'infection expérimentale ne serait dû qu'à des facteurs non génétiques, voir I), et enfin (4) à une différence dans le déterminisme génétique de la résistance entre les deux zones et au sein de la zone de peste¹⁴.

¹⁴ Prenons par exemple, le cas très simple d'un gène présentant des allèles A et B dans la zone de peste et l'allèle C fixé dans la zone sans peste, A étant associé à une résistance accrue, B à une résistance moyenne et C à une sensibilité. Un mécanisme similaire mais faisant intervenir plusieurs loci peut aussi être imaginé.

Tableau 6 Résultats obtenus pour les 22 marqueurs détectés comme sous sélection par l'approche de génomique des populations au niveau des tests de détection de sélection, de l'association avec la zone, ainsi qu'avec le phénotype déterminé par les infections expérimentales.

R : sélection détectée dans au moins deux paires de populations (répétition) ; **C** : *p*-value combinée sur les quatre paires de populations inférieures à 0.01.

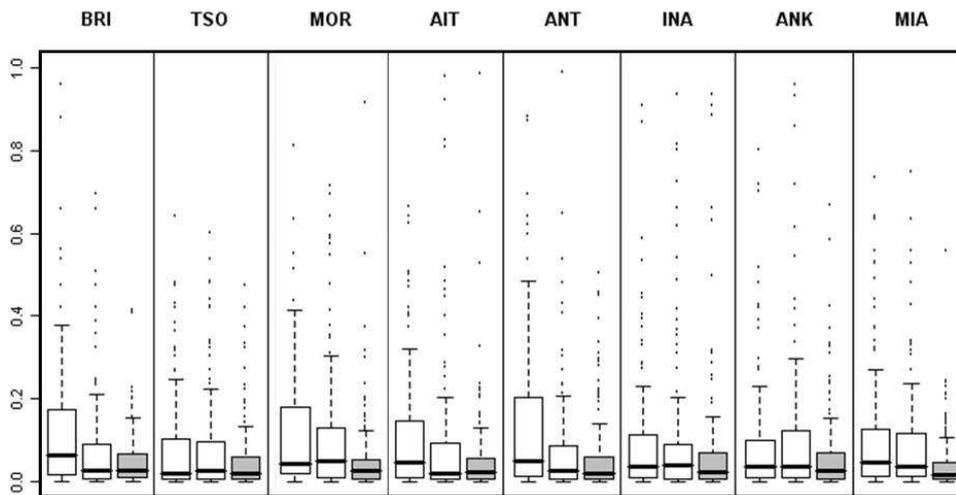
Locus	<i>DetSelD</i>	<i>DFdist</i>	Détection de sélection dans une paire de l'est et une paire de l'ouest	Association avec le facteur 'zone'	Association avec l'issue des infections expérimentales
A121	R ; C	R ; C		x	
A284	R ; C	C	x		
A449	R ; C			x	
B161		R ; C	x	x	
B163	C	C		x	
B388	C				
B408		C		x	x
C411	R ; C		x	x	
C483	R ; C	C	x		
D077	R		x	x	
D180	C	C		x	
D450	C			x	
D455		R			
D466	R ; C	R ; C	x		x
J275	R ; C		x	x	
J393	R ; C		x	x	
Q199	R ; C	C			
U296		R		x	
U387	C				
U493		R		x	
W099	R		x		
Y222	R ; C	R ; C	x	x	

5. Distribution dans le génome des loci candidats à la sélection

Dans le cas d'un regroupement génomique des loci candidats à la sélection, on s'attendrait à un déséquilibre de liaison plus fort entre les 22 loci singuliers que entre 22 loci choisis aléatoirement parmi les neutres (voir par exemple Nosil *et al.*, 2008). On observe au contraire un déséquilibre de liaison plus fort entre les loci neutres que entre les loci candidats à la sélection (tests *t* appariés sur les huit populations : $p < 0.0001$; Fig. 30), ce qui semble difficilement interprétable. Il semble au moins clair qu'un regroupement des loci sous sélection semble peu probable à la vue du résultat de cette analyse.

Figure 30 Comparaison des déséquilibres de liaison entre loci candidats à la sélection (en gris, 22 loci) et loci neutres (en blanc, deux jeux de données de 22 loci choisis aléatoirement parmi les 227 loci neutres)

Dans chaque population, la distribution des coefficients de corrélation au carré pour chaque paire de loci (R^2 , calculé à partir de Hill, 1974, selon Dasmahapatra *et al.*, 2002) est représentée.



6. Séquençage et caractérisation des marqueurs anonymes potentiellement intéressants

Seize des 22 marqueurs AFLP candidats à la sélection ont été isolés par migration des fragments sur gel d'acrylamide, excision puis séquençage du fragment d'intérêt. Le protocole est détaillé dans l'annexe A5. On considère la séquence validée si des séquences similaires ont été obtenues chez au moins deux individus, ce qui est à ce jour le cas pour dix loci (Tableau 7). L'objectif à terme est d'isoler et de séquencer les 22 marqueurs candidats (travail en cours de réalisation).

Parmi les marqueurs séquencés, deux loci (B161 et B163) présentent des séquences homologues à 98.8%. Ce sont deux allèles d'un même locus, différant par une insertion de deux paires de bases. Ce résultat est en accord avec les analyses de déséquilibre de liaison, qui ont montré une liaison forte entre ces deux loci ($0.5 < R^2 < 0.98$ dans les quatre populations de la zone de peste ; non calculé dans la zone sans peste car la présence de B161 est fixée).

Neuf séquences ont donc été comparées au génome de *R. norvegicus* (base de données génomique Ensembl : <http://www.ensembl.org/index.html>) : trois ont une localisation multiple tandis que six sont localisés sans ambiguïté (Tableau 7 et Fig. 31).

Les séquences obtenues ont été analysées grâce au serveur RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>), permettant d'identifier des motifs répétés correspondant à des éléments transposables. Les trois loci ayant une localisation multiple se révèlent être des rétrotransposons de la famille LINE1 (Tableau 7). Deux loci ayant une localisation unique présentent aussi des motifs répétés (famille LINE2 ou MIRs), mais pour moins de la moitié de leur séquence seulement (Tableau 7). Des études similaires de séquençage de loci AFLP potentiellement sous sélection ont aussi mis en évidence des éléments transposables : par exemple, sur des littorines (Wood *et al.*, 2008, Encadré 17), des pyrales (R. Streiff, com. pers.) ou des moustiques (M. Paris, com. pers.). Les éléments transposables constituent une part importante des génomes : en particulier, 40 % du génome de *R. norvegicus* (22 % sont des éléments transposables de type LINE-1, Gibbs *et al.*, 2004).

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'importance des éléments transposables parmi les loci candidats à la sélection : (1) l'activité de rétrotransposons actifs présentant des différenciations génétiques fortes, et donc identifiés comme des loci 'singuliers', à cause de leur mode d'évolution particulier et non en conséquence d'un effet de la sélection. En effet, les méthodes appliquées (logiciels *DFdist* et *DetSel*) permettent de mettre en évidence les loci qui diffèrent du reste du génome, ce qui peut être la conséquence de l'effet de la sélection ou bien de modalités ou de taux de mutation particuliers. (2) la sélection agissant sur des éléments transposables en conséquence de leur importance fonctionnelle dans le génome. Les éléments transposables jouent en effet un rôle fondamental dans la régulation de l'expression génétique (par exemple Faulkner *et al.*, 2009) et peuvent avoir un rôle adaptatif (par exemple une insertion de transposon confère une résistance aux insecticides chez *Drosophila*, Aminetzach *et al.*, 2005). Les rétrotransposons de la famille de LINE-1, en particulier, influencent la régulation de l'expression génétique chez les mammifères (Han *et al.*, 2008).

La localisation des loci séquencés dans le génome de *R. norvegicus* est représentée sur la Fig. 31. Il semble prématuré pour l'instant de suggérer une localisation des loci candidats à la sélection plutôt agrégée, ou dispersée dans le génome. On remarque cependant que deux paires de loci se trouvent sur le même chromosome, une des paires concernant deux loci (C411 et C483) distants seulement de 600kb¹⁵. Ces deux loci sont de plus sur le même

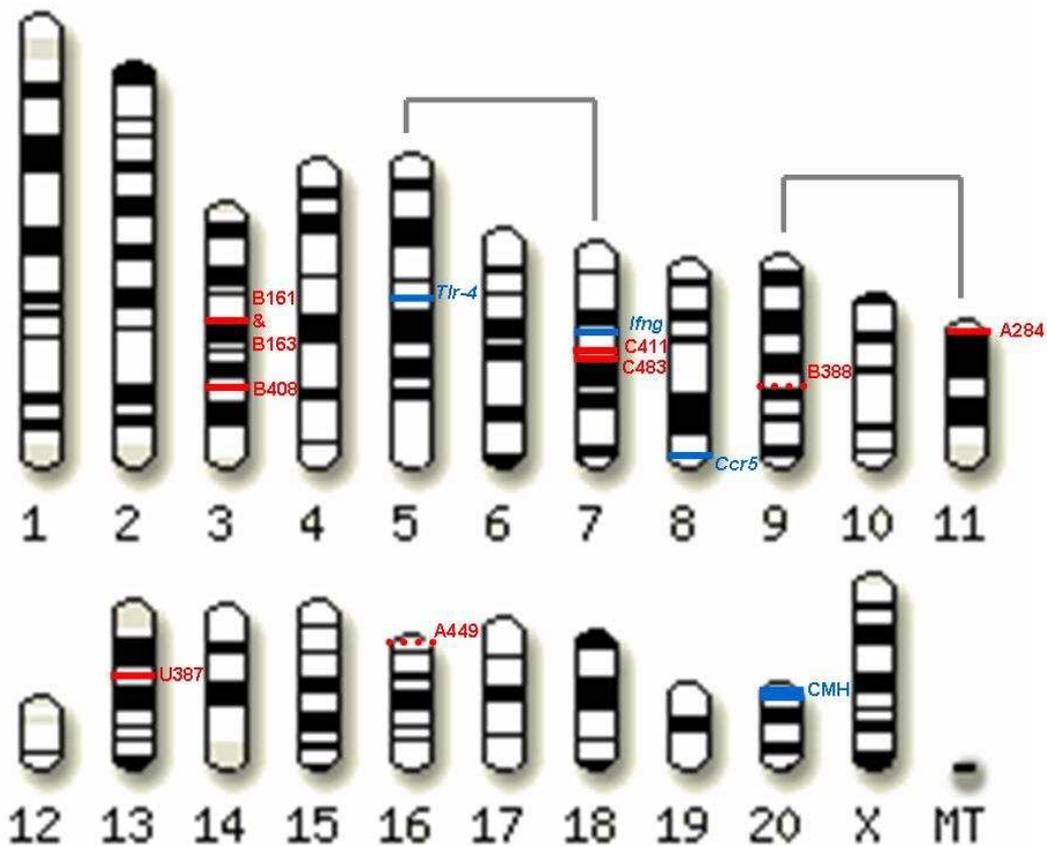
¹⁵ Pourtant, ces deux loci présentent un déséquilibre de liaison (R^2) modéré : la moyenne sur les huit populations est de 0.082, mais il est supérieur à 0.2 dans deux populations (voir Fig. 30 pour l'ordre de grandeur des R^2).

chromosome que le gène candidat *Ifng* (voir Introduction), mais à une distance relativement importante (14-15Mb). Ainsi, bien qu'un regroupement physique de tous les loci supposés sous sélection semble exclu (voir Fig. 31 et §5), certains loci peuvent être proches dans le génome et ainsi appartenir à la même région génomique potentiellement sous sélection.

Nous avons considéré comme gènes voisins des loci candidats à la sélection ceux se trouvant à moins de 300kb du locus AFLP (Tableau 7). Cet intervalle peut être plus large que celui affecté par la sélection indirecte (voir Encadré 17), mais a été choisi pour ces observations préliminaires pour limiter le risque de ne pas détecter des gènes importants. Parmi ces gènes voisins, le gène *Il17rd*, codant un récepteur de l'interleukine 17, est proche (133 kb) du locus A449 et le gène *Chst1*, impliqué dans la réaction inflammatoire, est relativement proche (261 kb) des loci B161 et B163.

Figure 31 Carte génétique indiquant la position des loci candidats à la sélection identifiés par l'approche génomique (en rouge), et des principaux gènes candidats (en bleu).

Les loci localisés sans ambiguïté sont représentés en trait plein, tandis que les loci à localisation multiple, mais avec une localisation plus probable, sont en pointillés. La carte des chromosomes est celle de *R. norvegicus* (2n=42). Le génome de *R. rattus* (2n=38) diffère par la fusion de deux chromosomes indiquées en gris (Cavagna *et al.*, 2002).



Chapitre 3

Tableau 7 Résultats obtenus pour les dix marqueurs AFLP candidats à la sélection séquencés pour au moins deux individus : analyse des séquences répétées et localisation dans le génome complet de *Rattus norvegicus*.

Le nombre de paires de bases similaires et le pourcentage d'identité sont indiqués pour chaque comparaison.

Locus	Séquences répétées	Localisation (<i>R. norvegicus</i>)	Gènes connus à une distance inférieure à 300kb: Nombre de gènes à fonction inconnue Liste des gènes à fonction connue
A284	Non	Chr11; 8.6 Mb (196 pb, 98 %)	2 -
A449	LINE1 (409 pb, 98%)	Localisation multiple mais meilleur alignement : Chr16 ; 2.1Mb (417 pb, 98 %)	2 Asb14 (ankyrin repeat and SOCS box containing protein 14) Pde12 (2',5'-phosphodiesterase 12, fonction antivirale et antitumorale induite par les interférons) Arf4 (ADP-ribosylation factor 4, trafic des protéines et catalyse de la toxine du choléra) NP_001102576 (HESX homeobox 1, régulation du développement) Il17rd (interleukin 17 receptor D)
B161	Non	Chr3; 77.3 Mb (130 pb, 96 %)	2 Syt13 (synaptotagmine, transport vésicules vers la membrane plasmique)
B163		(133 pb, 94 %)	Chst1 (Carbohydate sulfotransferase 1, impliqué dans la réaction inflammatoire)
B388	LINE1 (344 pb, 97%)	Localisation multiple mais meilleur alignement : Chr9 ; 67.1Mb (300 pb, 95 %)	- ErbB4 (receptor tyrosine-protein kinase erbB-4, protéine exprimée dans le système nerveux en développement)
B408	Non	Chr3; 116.7 Mb (374 pb, 98 %)	4 Ttl (enzyme de tyrosination de la tubuline) Rpa2 (ou Plor1b ou Ppo1-2, une sous-unité de l'ARN polymérase) Slc20a1 (symport sodium-phosphate) Ckap2l (protéine associée au cytosquelette) Il1a (interleukin 1 α) Il1b (interleukin 1 β) Tmem87b (Transmembrane protein 87B precursor) Fbln7 (fubuline, fixation d'ions calcium)
C411	MIRs (53 pb, 14 %)	Chr7; 71.8 Mb (381 pb, 98 %)	4 Ankrd46 (ankyrin repeat small protein) Spag1 (sperm-associated antigen 1) Fbxo43 (endogenous meiotic inhibitor 2) Pabpc1 (polyA binding protein 1, impliqué dans la stabilité des ARNm)
C483	Non	Chr7; 72.4 Mb (448 pb, 96 %)	- Ywhaz (ou Msfs1, protein kinase C inhibitor protein 1, protéine régulatrice très exprimée dans le cerveau)
D180	LINE1 (116 pb, 81 %)	Localisation multiple, pas de meilleur alignement	
U387	LINE2 (143 pb, 40.4 %)	Chr13; 49.9 Mb (353 pb, 96 %)	- Nr5a2 (nuclear receptor subfamily 5 group A member 2, protéine régulatrice présente dans le foie et le pancréas) NP_001012030.1 (zinc finger protein 281)

Dans l'état actuel des recherches, les gènes candidats identifiés les plus intéressants sont les gènes en tandem de l'interleukine 1 (IL-1 α et IL-1 β), qui sont relativement proches (environ 190 kb) du locus B408 (Tableau 7), un marqueur identifié dans les deux approches de génomique des populations et d'association génotype / phénotype (Tableau 6). Ces gènes codent deux cytokines qui se fixent à deux récepteurs (IL-1RI et IL-1RII), sont sécrétées par les macrophages et les cellules épithéliales, et interviennent dans la réponse inflammatoire (Janeway *et al.*, 2003). Ces cytokines présentent une homologie structurale avec l'antigène F1 de *Y. pestis* (Zavjalov *et al.*, 1995). Cet antigène est capable de se fixer sur les récepteurs des IL-1 (Abramov *et al.*, 2001 ; Abramov *et al.*, 2002). Il a un rôle important dans la transmission de la bactérie au rongeur par la puce et dans l'inhibition de la phagocytose (Du *et al.*, 2002 ; Sebbane *et al.*, 2009) et on pourrait ainsi imaginer qu'une interleukine mutante modifie l'interaction entre la protéine F1 et les récepteurs des IL-1, ce qui empêcherait F1 de jouer son rôle et augmenterait la résistance de l'hôte. Mais cela ne reste à ce stade qu'une hypothèse.

7. Discussion des résultats et perspectives

Cette partie a conduit à la mise en évidence de loci candidats à la sélection, dont certains sont identifiés par deux approches complémentaires, la génomique des populations et une étude d'association génotype / phénotype (Vasemagi & Primmer, 2005 ; Stinchcombe & Hoekstra, 2008). Le fait que notre modèle biologique soit soumis à une pression de sélection forte est probablement une des raisons pouvant expliquer la mise en évidence de loci intéressants, malgré la faible couverture génomique de cette étude (un marqueur polymorphe tous les 11 Mb), conséquence de la diversité génétique limitée de l'espèce étudiée.

A l'issue des analyses AFLP, les marqueurs identifiés sont des candidats à la sélection exercée par la peste. Cette pression de sélection doit être confirmée par l'analyse de polymorphismes fonctionnels. Dans ce but, les marqueurs AFLP peuvent être localisées grâce à la proximité phylogénétique d'une espèce modèle, *R. norvegicus*. Les gènes se trouvant proches des loci singuliers et connus pour être impliqués dans la défense des hôtes contre les pathogènes deviendront des gènes candidats très pertinents. Ce travail est en cours de réalisation. Les gènes ciblés pourront dans un deuxième temps être séquencés et leurs séquences seront soumises à des tests de sélection (voir Introduction II-3), ainsi qu'à des études d'associations génotype / phénotype (comme réalisées pour le gène Ccr5 et pour les marqueurs AFLP). Enfin, la même approche pourra être envisagée sur 22 loci choisis aléatoirement parmi les loci neutres de façon à comparer les patrons observés sur les loci singuliers avec une 'référence' observée sur les loci neutres : au niveau du regroupement génomique des loci, et éventuellement au niveau de la proximité de ces loci avec des gènes impliqués dans les défenses immunitaires.

IV- Détection de sélection sur un complexe multigénique candidat

Cette partie a fait l'objet du stage de master 1 de Svilena Ivanova entre janvier et juin 2009.

1. Contexte, objectifs et justification

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) contient des gènes de classe 1 (codant des récepteurs membranaires présents chez toutes les cellules capables de reconnaître les antigènes des pathogènes intracellulaires), des gènes de classe 2 (codant des récepteurs membranaires des cellules présentatrices d'antigène qui exposent les peptides des pathogènes extracellulaires après phagocytose) et des gènes de classe 3 (contenant notamment des gènes codant des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire et des protéines du complément) (Janeway *et al.*, 2003). Le CMH présente un polymorphisme exceptionnel (Hughes & Yeager, 1998), c'est pourquoi il est très étudié en écologie et en évolution depuis une vingtaine d'années (Bernatchez & Landry, 2003 ; Sommer, 2005). Cette diversité génétique élevée des gènes du CMH peut s'expliquer par une sélection naturelle de type balancée, c'est-à-dire qui favorise la diversité génétique (voir Introduction II-1), exercée par les pathogènes (Prugnolle *et al.*, 2005b ; Piertney & Oliver, 2006). Les mécanismes sous-jacents à la sélection balancée invoqués pour le CMH sont la superdominance (ou avantage des hétérozygotes, Doherty & Zingernagel, 1975), la sélection fréquence dépendance (ou avantage du rare, Takahata & Nei, 1990) ou encore des variations spatio-temporelles des pressions de sélection (Hedrick, 2002). Cependant, il n'est pas exclu qu'une sélection directionnelle (fixation d'allèles avantageux, voir Introduction II-1) s'exerce sur certains gènes du CMH, au moins dans certaines conditions spatio-temporelles. La sélection naturelle s'exerçant sur le CMH a été mise en évidence par la détection d'associations entre contenu génétique pour certains de ses gènes et charge parasitaire, ou d'une structure génétique différente de celle des marqueurs neutres (revue dans Garrigan & Hedrick, 2003 et Piertney & Oliver, 2006).

La peste est une pression de sélection possible sur le CMH des rongeurs sauvages. En effet, des études de laboratoire ont montré le rôle de certains gènes du CMH dans la réponse immunitaire (Nakajima & Brubaker, 1993 ; Parent *et al.*, 2006 pour le gène Tnf) ou dans la résistance à la peste (Turner *et al.*, 2008, voir Encadré 14). Le Tnf est un gène du CMH de classe 3 codant une cytokine impliquée dans le déclenchement de la réaction inflammatoire (Janeway *et al.*, 2003). Certains de ses allèles ont été associés à des variations de sensibilité à plusieurs maladies infectieuses humaines (Hill, 1996). D'autre part, en tant que pathogène extracellulaire ou endocyté par les macrophages, les antigènes de *Y. pestis* sont reconnus par le CMH de classe 2 (voir par exemple Musson *et al.*, 2006). Enfin, Starnbach & Bevan (1994) ont montré que le CMH de classe 1 est aussi capable de reconnaître des antigènes de *Yersinia*. Ainsi, des gènes de chaque classe du CMH contiennent potentiellement des gènes candidats intéressants pour étudier la sélection exercée par la peste sur les populations d'hôtes, comme le rat noir de Madagascar.

Les gènes du CMH peuvent être étudiés directement par clonage et séquençage (voir par exemple Bryja *et al.*, 2006), ou bien indirectement en s'intéressant à des marqueurs microsatellites voisins des gènes et dont le polymorphisme est plus facile à étudier (voir par exemple Charbonnel & Pemberton, 2005). Envisager la première approche demande de cibler un ou deux gènes à étudier parmi les multiples gènes que contient le CMH (environ 220 gènes chez *R. norvegicus* par exemple, Hurt *et al.*, 2004). Les connaissances actuelles sur les mécanismes immunitaires en réponse à la peste apportent peu d'arguments permettant de cibler un ou quelques gènes candidats en particulier. De plus, bien que le CMH présente un taux de recombinaison réduit (Stenzel *et al.*, 2004), il correspond à presque 4Mb chez *R. norvegicus* (Hurt *et al.*, 2004). Les résultats obtenus pour un ou deux loci ne peuvent donc pas être extrapolés pour en déduire l'évolution de l'ensemble du complexe. Nous avons donc choisi la seconde approche qui permet l'étude simultanée de plusieurs loci, facilement et à moindre coût. Elle présente en outre l'avantage de permettre la comparaison de marqueurs neutres (hors CMH) et potentiellement sous sélection (dans le CMH) de même nature et ayant un modèle de mutation similaire. Cette approche a été validée par la corrélation observée entre les allèles pour les microsatellites liés et les allèles des gènes voisins (Doxiadis *et al.*, 2007). Elle a de plus permis de détecter des indices de sélection, sur des gènes du CMH (Charbonnel & Pemberton, 2005 ; Hansen *et al.*, 2007 ; Santucci *et al.*, 2007 ; De Groot *et al.*, 2008 ; mais voir Boyce *et al.*, 1997 ; Worley *et al.*, 2006) ou bien sur d'autres gènes d'intérêt (Kohn *et al.*, 2003 ; Oetjen & Reusch, 2007 ; Jensen *et al.*, 2008). Des associations entre génétique et charge parasitaire ont aussi été rapportées pour des microsatellites liés à certains gènes candidats (Luikart *et al.*, 2008).

La structure génétique au niveau de marqueurs microsatellites liés au CMH a donc été étudiée dans des populations de rat noir malgache, et comparée avec celle de marqueurs microsatellites neutres. L'objectif est de détecter la sélection naturelle potentiellement exercée sur ces gènes immunitaires et d'évaluer si les épizooties de peste peuvent être invoquées comme une pression de sélection sur le CMH. Nous n'avons pas étudié les associations entre génotype et phénotype pour ces marqueurs car, les marqueurs microsatellites présentant généralement un grand nombre d'allèles et nos jeux de données comportant un nombre modéré d'individus de phénotype connu, on s'attend à un manque de puissance d'un tel test (ce qui n'était pas le cas des marqueurs bialléliques des deux parties précédentes).

2. Méthodologie

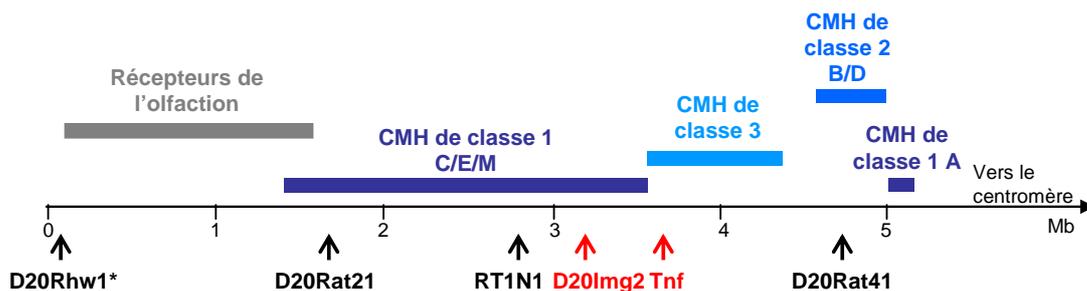
- Mise au point des marqueurs microsatellites liés au CMH

Neuf marqueurs initialement développés chez *R. norvegicus* (Rat Genome Database, <http://ratmap.gen.gu.se/>) ont été testés mais seuls six ont été correctement amplifiés. Ces six marqueurs microsatellites obtenus sont localisés dans différentes zones du CMH (Fig. 32). Ils ont été génotypés pour l'ensemble du jeu de données. Cependant, trois d'entre eux se sont révélés dupliqués au moins une fois (Fig. 32), ce qui est peu surprenant sachant que la présence de gènes dupliqués en tandem est une caractéristique du CMH (Hurt *et al.*, 2004). Les profils de ces loci étaient rendus difficiles à lire par le grand nombre d'allèles. De plus,

comme il n'a pas été possible d'attribuer les différents allèles à chacune des copies des locus, ces marqueurs ne peuvent pas être analysés par les méthodes classiques de génétique des populations, faites pour les loci diploïdes. D'autre part, un locus (D20Rhw1) s'est finalement révélé situé hors de la zone du CMH (Fig. 32) et n'a donc pas été analysé. Les analyses réalisées pour le moment n'ont donc pris en compte que deux loci liés au CMH.

Figure 32 Caractéristiques et localisation des microsatellites liés au CMH étudiés.

(a) Localisation des loci sur le bras court du chromosome 20 chez *Rattus norvegicus*



Les marqueurs indiqués en rouge ont été analysés tandis que ceux en noir ont été génotypés mais n'ont pas été analysés pour le moment.

(b) Caractéristiques des loci considérés

Marqueur	Gène voisin	Type de gène	Source	Nombre de copies
D20Rat21	RT1-M6	CMH de classe 1	Amorces dessinées sur le génome de <i>R. norvegicus</i>	Au moins 2
RT1N1	RT1-N1	CMH de classe 1	Amorces dessinées à partir de séquences de <i>R. rattus</i> **	Au moins 2
D20Img2	Ddr1	non CMH, situé dans la région du CMH de classe 1	Ioannidu <i>et al.</i> , 2001	Une seule
TNF	Tnf	CMH de classe 3	Amorces dessinées à partir de séquences de <i>R. rattus</i> **	Une seule
D20Rhw1*	Clic2	Non CMH situé hors du CMH	Rat Genome Database (http://rgd.mcg.edu/)	Une seule
D20Rat41	RT1-Bb	CMH de classe 2	Amorces dessinées à partir de séquences de <i>R. rattus</i> **	Au moins 3

* Le marqueur Rhw1 a été choisi car il était indiqué dans Gunther & Walter (2001) et sur le site Rat Genome Database (RGD) comme associé à un gène du CMH de classe 2 (RT1-B). Cependant, la recherche des amorces dans le génome de *R. norvegicus* a révélé que ce marqueur est en fait localisé à l'extérieur du CMH, près du gène Clic2. Nous avons donc informé les gestionnaires du site RGD de cette contradiction et la localisation de ce marqueur a été actualisée.

** A partir du génome de *R. norvegicus*, des amorces permettant d'amplifier une région d'environ 1000pb contenant le microsatellite choisi ont été dessinées. Elles ont été utilisées sur quelques *R. rattus* et les fragments obtenus ont été séquencés. Nous avons alors dessiné de nouvelles amorces sur les séquences obtenues, permettant d'amplifier une région plus petite et qui ont été utilisées pour le génotypage. Finalement, les résultats obtenus avec ces amorces ne sont pas vraiment meilleurs que ceux obtenus avec les amorces de *R. norvegicus*.

- Stratégie d'échantillonnage et attendus

Une approche à deux échelles spatiales a été envisagée. A l'échelle de Madagascar, nous avons choisi quatre paires de populations, éloignées géographiquement les unes des autres et donc représentant des contextes écologiques bien différents¹⁶ (Fig. 33). Chaque paire comprend une population du foyer de peste et une de la zone sans peste, distantes de 100-140 kms environ et présentant des valeurs de différenciation génétique (F_{ST}) pour les marqueurs neutres comprises entre 3.5 et 5.9 %. Ainsi, nous comparons des populations soumises à des pressions de sélection différentes (épidémies de peste ou pas), et l'attendu est que les marqueurs sous sélection aient une différenciation génétique entre les deux zones plus forte que les marqueurs supposés neutres (voir Fig. 2 les attendus pour des milieux écologiquement différents).

A l'échelle locale, nous avons considéré un échantillonnage au sein du foyer de peste des hauts plateaux centraux (déjà considéré dans l'étude du gène *Ccr5*). Cet échantillonnage, réalisé dans la région de Betafo, comprend 12 populations réparties sur une surface d'environ 150 km² (Fig. 33). Ces douze populations correspondent à sept villages avec pour certains villages une distinction entre la population des rats piégés dans les maisons et celle des rats de l'extérieur (Fig. 33). Dans cette zone, la peste circule activement ce qui se traduit par des cas humains, des séroprévalences murines d'environ 10% et des puces porteuses de *Y. pestis* (Rahelinirina, 2009). La pression de sélection exercée par la peste sur les populations de rats est donc probablement forte. Pour simplifier, on suppose qu'elle est homogène sur l'ensemble de la zone de Betafo et on s'attend donc à une différenciation génétique plus faible pour des marqueurs sous sélection que pour des marqueurs neutres (voir Fig. 2 les attendus pour les milieux écologiquement similaires).

Enfin, au niveau intra-populationnel, la sélection affectant la diversité génétique, on s'attend à une diversité des marqueurs sous sélection différente de celle des marqueurs neutres en zone de peste mais pas en zone sans peste (voir Fig. 2). Ainsi, dans le cas d'une sélection directionnelle (resp. balancée), une diversité génétique plus faible (resp. plus forte) que celles aux marqueurs neutres est attendue pour un marqueur sous sélection dans toutes les populations de la zone de peste (échelle locale et populations des hauts plateaux considérée à l'échelle de Madagascar), tandis qu'un niveau de diversité similaire à celui des neutres est attendu dans la zone sans peste.

Le protocole utilisé pour le génotypage des six loci est détaillé dans l'annexe A6. Le jeu de données obtenu pour les deux marqueurs liés au CMH non dupliqués est comparé avec celui disponible pour 13 loci microsatellites supposés neutres (voir chapitre 1, quatre loci ont été retirés du jeu de données car ils présentaient des allèles nuls¹⁷).

¹⁶ Ces quatre populations ne sont pas les mêmes que celles choisies pour les analyses par des marqueurs AFLP. En effet, les marqueurs AFLP nécessitent de l'ADN de très bonne qualité (voir III-2), restreignant les possibilités de choix des populations à étudier (voir Fig. 12). Pour les microsatellites au contraire, ces échantillons ont pu être analysés, nous permettant de choisir des paires de populations plus éloignées géographiquement.

¹⁷ Les allèles nuls entraînent une surestimation des valeurs de différenciation génétique (Chapuis & Estoup, 2007) et une sous estimation de la diversité génétique (Chapuis, 2006). Des marqueurs présentant un grand des allèles nuls ne sont donc pas appropriés pour des analyses de comparaison de ces paramètres entre loci.

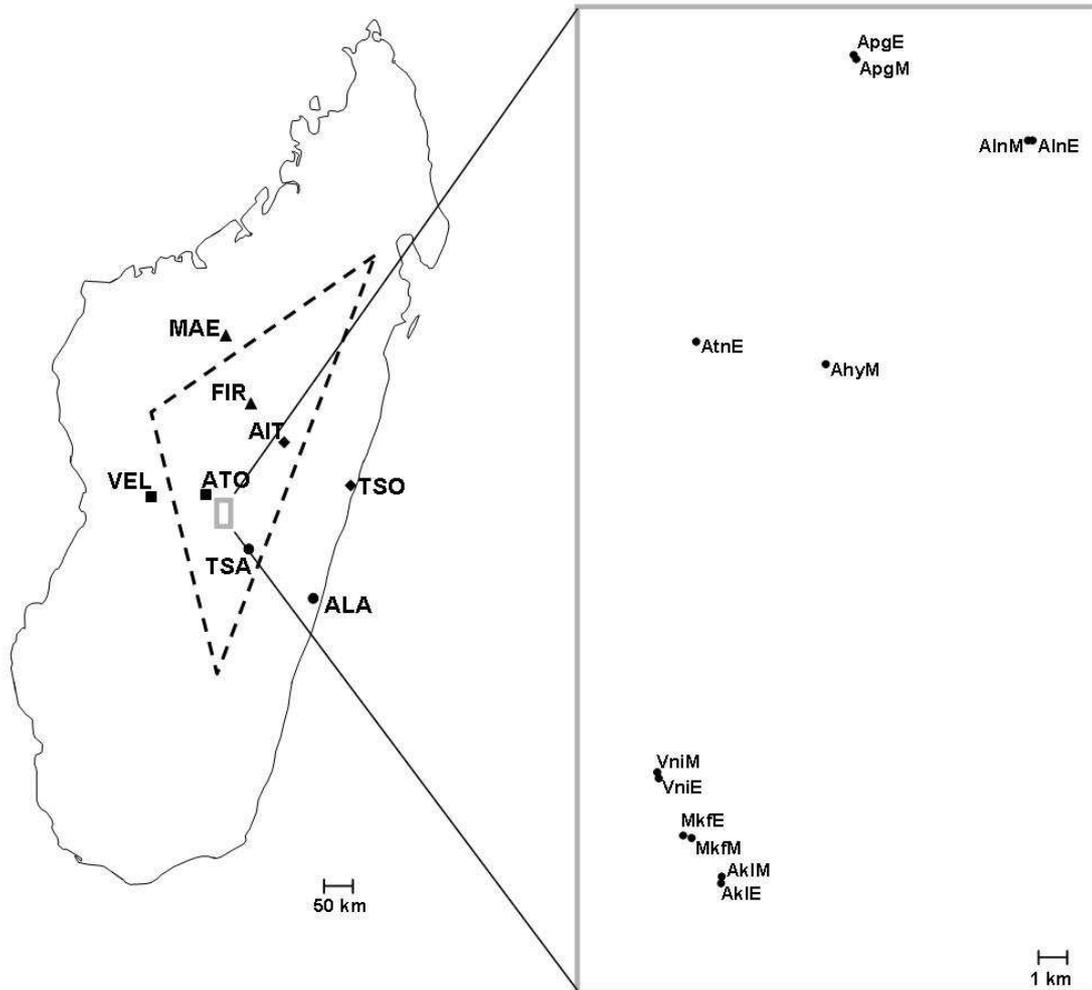
Figure 33 Localisation des populations étudiées avec les microsattellites liés au CMH.

(a) Huit populations (quatre paires) échantillonnées à l'échelle de l'île de Madagascar.

Chaque paire de populations a un symbole différent. Le foyer de peste principal est entouré en pointillé. La zone de Betafo est encadrée en gris.

(b) Douze populations échantillonnées à une échelle locale, près de Betafo, au sein du foyer de peste.

Les populations sont nommées suivant le village (trois premières lettres) et le milieu échantillonné (dernière lettre: M = maisons, E = bas fonds).



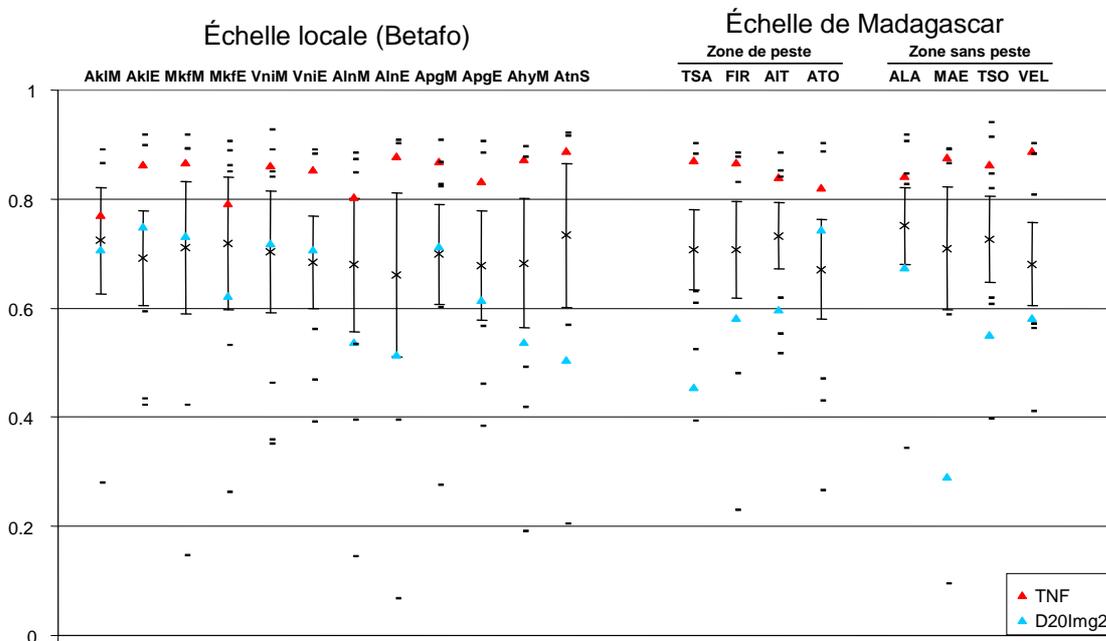
3. Analyses réalisées et résultats obtenus

La diversité génétique intra-populationnelle (mesurée par l'hétérozygotie attendue, H_E) varie selon les loci, qu'ils soient neutre ou dans le CMH : à l'échelle de Madagascar (ANOVA, $F_{1,15} = 19.39$, $p < 0.0001$) et à l'échelle de Betafo (Kruskal-Wallis $\chi^2_{(15)} = 38.65$, $p = 0.0001$). Le locus Tnf est parmi les marqueurs les plus diversifiés tandis que le locus D20Img2 est parmi les marqueurs les moins diversifiés (Fig. 34). Cependant, des marqueurs neutres entrent aussi dans ces catégories et aucun des deux loci liés au CMH ne se distingue vraiment des marqueurs neutres en terme de diversité intrapopulationnelle.

Les diversités génétiques entre la zone de peste et la zone sans peste ont été comparées grâce au calcul du ratio des diversités géniques ($\ln RH = \ln \left[\frac{1/(1-H_{Epop1}) - 1}{1/(1-H_{Epop2}) - 1} \right]$), dont la distribution sur les loci neutres suit une loi normale dans chaque paire de population (Schlotterer, 2002 ; Kauer *et al.*, 2003). Ce test a été appliqué aux quatre paires de populations à Madagascar, mais aucun des loci liés au CMH étudiés ne se distingue de la distribution attendue pour les loci neutres.

Figure 34 Diversité génétique (mesurée par l'hétérozygotie attendue H_E) dans chacune des populations étudiées.

Pour chaque population sont indiquées: la moyenne sur tous les loci neutres (croix noires) avec son intervalle de confiance à 99%, les valeurs extrêmes (qui sortent de l'intervalle de confiance) des loci neutres (tirets noirs) et les valeurs des loci liés au CMH (en couleur, voir légende).



Dans le cas d'une pression de sélection hétérogène, on s'attend à une différenciation génétique plus forte pour les marqueurs sous sélection que pour des marqueurs neutres, tandis que l'inverse est attendu dans le cas d'une pression de sélection homogène. Aucun marqueur lié au CMH ne présente de différenciation génétique anormalement forte ou faible au sein de la zone de peste (Fig. 35).

En revanche, dans les comparaisons entre zone de peste et zone sans peste, le locus D20Img2 présente un signal de sélection entre les populations AIT et TSO selon le logiciel *Fdist2* et dans toutes les paires de populations selon le logiciel *DetSel* (Fig. 36). Plusieurs études (par exemple, Oetjen & Reusch, 2007) ont aussi rapporté un nombre de loci singuliers plus importants avec le logiciel *DetSel* que *Fdist2*. Le locus *Tnf* n'est jamais détecté quelle que soit l'approche utilisée (Fig. 36).

Figure 35 Détection de sélection à l'échelle de Betafo en utilisant le logiciel *Fdist2* : comparaison de la différenciation génétique pour chaque locus à l'attendu neutre simulé.

La différenciation génétique (F_{ST}) est représentée en fonction de l'hétérozygotie attendue (H_E). Des simulations ont permis d'obtenir les valeurs médianes ainsi que l'enveloppe contenant 95 % des valeurs simulées. Les valeurs obtenues pour chaque locus sont représentées par des cercles: noirs pour les marqueurs neutres et gris pour les marqueurs liés au CMH.

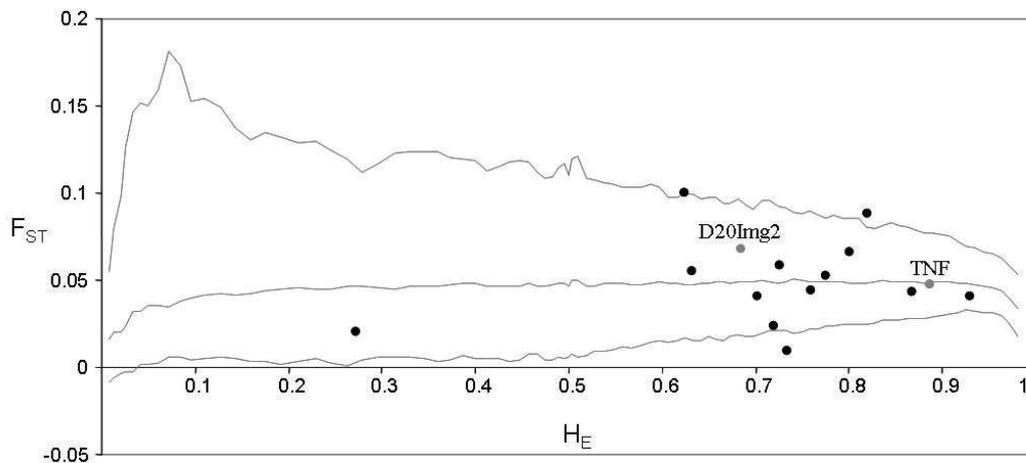


Figure 36 Détection de sélection sur les microsatellites dans les quatre paires de populations comportant chacune une population du foyer de peste et une de la zone sans peste.

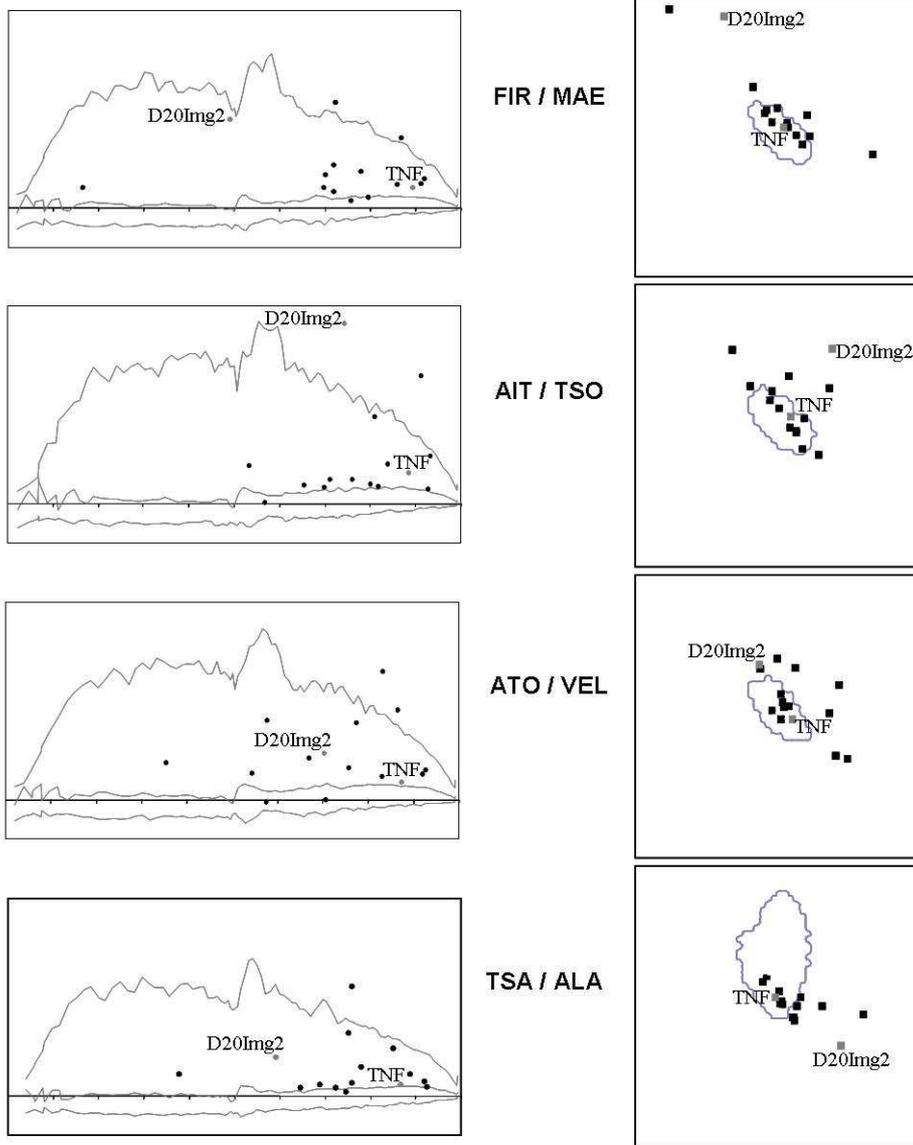
Dans les deux cas, les valeurs obtenues pour les marqueurs supposés neutres sont indiquées en noir tandis que celles des microsatellites liés au CMH sont en gris. Les courbes contiennent 95 % des simulations réalisées sous l'hypothèse de neutralité.

(a) Résultats obtenus avec le logiciel *Fdist2*.

Voir la Fig. 35 pour les légendes. L'axe du F_{ST} est compris entre -0.1 et 0.4 et l'axe du H_E entre 0 et 1.

(b) Résultats obtenus avec le logiciel *DetSel*.

Chaque axe (F_1, F_2) correspond à la différenciation d'une population par rapport à l'autre, entre -0.5 et +0.5 pour chaque paire de populations.



4. Discussion

Cette étude a révélé des signaux de sélection sur l'un des deux marqueurs microsatellites candidats analysés : le locus D20Img2, situé dans la zone du CMH de classe 1, présente une différenciation génétique entre zone de peste et zone sans peste plus forte que l'attendu sous l'hypothèse de neutralité. Une sélection spécifique de la zone (foyer de peste ou zone sans peste) semble donc s'exercer sur un gène proche de ce locus. Les analyses réalisées sur la diversité génétique ne montrent cependant pas d'évidence de sélection (bien que ces analyses n'aient pas été montrées comme moins sensibles que celles sur la différenciation à notre connaissance). La sélection s'exerçant sur ce locus devra être confirmée par l'étude des séquences des gènes voisins, de façon à identifier le polymorphisme fonctionnel correspondant. Le gène le plus proche du marqueur (environ 50kb) est *Ddr1*, mais ce gène n'a pas été identifié comme intervenant dans la défense face aux pathogènes. Au contraire, le gène *Ier3*, impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules T, est à 70-75kb et plusieurs gènes du CMH de classe 1 impliqués dans la résistance aux pathogènes (*RT1-T24-1* et *RT1-CE7*) sont distants d'au moins 250kb du marqueur D20Img2, une distance à laquelle il semble que l'autostop génétique puisse intervenir (Encadré 17, Turner *et al.*, 2005). En revanche, le marqueur lié au gène *Tnf* ne se distingue des marqueurs neutres pour aucune analyse réalisée. Ainsi, bien qu'à priori un bon candidat (d'après les études immunologiques, voir §1) et la proximité entre le gène *Tnf* et le marqueur microsatellites étudié (quelques centaines de nucléotides seulement), nos résultats n'indiquent pas d'évidence de sélection exercée par la peste sur ce gène dans les populations de rat noir.

La mise en évidence de sélection sur un locus montre que l'approche consistant à utiliser des marqueurs liés aux gènes (approche indirecte), plutôt que de travailler directement sur les séquences des gènes candidats, peut donner des résultats intéressants (voir aussi par exemple Hansen *et al.*, 2007 ; Santucci *et al.*, 2007). Cependant, l'intérêt principal de cette approche est la possibilité d'étudier un grand nombre de marqueurs. Ainsi l'objectif était d'analyser six loci situés dans différentes régions du CMH. Nous n'avons finalement pu analyser que deux loci. Le nombre de régions du CMH étudiées est donc restreint et il n'est pas exclu que certaines régions du CMH importantes pour la résistance à la peste chez le rat noir, et donc sous sélection dans les populations malgaches, existent mais n'aient pas été analysées ici. La cause principale de cet échec à obtenir un grand nombre de marqueurs est la duplication de certains loci. Les perspectives incluent ainsi (1) l'étude des trois loci dupliqués non analysés, qui pourra être réalisée, non pas par les méthodes de génétique des populations classiques, mais plutôt par exemple en comparant des indices de diversité (voir par exemple Blais *et al.*, 2007) et (2) la mise au point de nouveaux marqueurs.

V- Conclusion

La génétique de la résistance à la peste a été étudiée au cours de cette thèse par deux approches complémentaires. Tout d'abord, l'approche gène candidat a montré que le gène

Ccr5 pourrait être un gène mineur impliqué dans la résistance à la peste et qu'une région du CMH de classe 1 (celle dans laquelle se trouve le marqueur D20Img2) est potentiellement sous sélection divergente entre zone de peste et zone sans peste. Plus de gènes candidats auraient pu être étudiés pour augmenter nos chances de trouver des gènes importants dans la résistance. En effet, lorsque les connaissances sur le phénotype sont relativement limitées et qu'aucun gène particulier ne se distingue comme le meilleur candidat (comme dans notre modèle), il semble que l'approche gène candidat nécessite d'être relativement exhaustive, c'est à dire de s'intéresser à de nombreux gènes pour espérer identifier des loci intéressants.

Dans de tels cas, l'approche génomique semble aussi intéressante et elle a aussi été conduite au cours de cette thèse. Nous avons ainsi mis en évidence des marqueurs génétiques anonymes potentiellement sous sélection divergente entre les zones et associés au phénotype déterminé par les infections expérimentales. Ces marqueurs sont en cours d'identification et les perspectives à court terme incluent la localisation de tous ces marqueurs et le séquençage des gènes voisins connus pour être impliqués dans la défense des hôtes face aux pathogènes. Ces gènes sont en effet de très bons candidats pour influencer la résistance à la peste dans les populations naturelles du rat noir à Madagascar.

Les résultats obtenus n'indiquent pas d'effet très fort sur la résistance (pas de locus diagnostic par exemple). Cela peut impliquer, soit que la résistance est polygénique, avec de nombreux gènes mineurs, soit que des gènes majeurs existent, mais ils seraient alors situés relativement loin des loci étudiés, la distance entre le gène sous sélection et le locus étudié conduisant à une diminution du signal de sélection.

Nos résultats pourraient aussi suggérer l'existence d'une pression de sélection non homogène au sein du foyer de peste. Une telle hétérogénéité spatiale de la sélection exercée par la peste peut être qualitative, si plusieurs souches de *Y. pestis* circulent sur les hauts plateaux malgaches, ce qui n'est pas exclu (voir Introduction V-2 et Encadré 8) et dans ce cas, on peut s'attendre à l'existence de différents allèles / gènes de résistance entre localités. Il existe de plus probablement une hétérogénéité quantitative de la sélection au niveau local, en terme d'intensité de la circulation de la maladie et de temps écoulé depuis la dernière épidémie de peste et dans ce cas, on peut s'attendre à des fréquences d'allèles de résistance variables selon les localités au sein du foyer de peste.

Enfin, la puissance des tests réalisés sur les résultats des associations génotype / phénotype peut avoir été limitée par le nombre d'individus considéré, et une définition du phénotype potentiellement peu discriminante (voir Chapitre 2 III-3). Ces deux aspects sont liés car plus le phénotype est discriminant, plus l'effort expérimental doit être important pour obtenir le même nombre d'individus de phénotype connu¹⁸.

¹⁸ On peut, par exemple, réaliser une infection expérimentale par deux doses de *Y. pestis*, chacune pour une partie des individus, et ne prendre en compte seulement les individus morts à dose faible et ceux survivant à dose forte.

Discussion générale et perspectives

I- Histoire de l'évolution de la résistance à la peste chez une espèce introduite, le rat noir

La structure génétique neutre du rat noir à Madagascar et dans l'ouest de l'Océan Indien est cohérente avec l'hypothèse d'une introduction unique de *R. rattus* à Madagascar, probablement il y a 1000 à 2000 ans à partir de populations d'Oman. La colonisation aurait commencé par les régions côtières de l'île, et se serait étendue plus tard aux hauts plateaux centraux (voir chapitre 1). La peste est arrivée à Madagascar bien après l'arrivée du rat : les premiers cas ont été recensés en 1898 pendant la troisième pandémie et la région des hauts plateaux est une zone d'endémisme (cas humains de peste déclarés chaque année) depuis les années 1930.

Les résultats des infections expérimentales (chapitre 2 II) ont confirmé ceux de Rahalison *et al.* (2003) indiquant une résistance à la peste du rat noir sur les hauts plateaux de Madagascar. Cette résistance est transmise à la descendance en captivité et a donc probablement une base génétique (Rahalison *et al.*, 2003). Se posent alors les questions de l'apparition et de la propagation de cet (ces) allèle(s) de résistance par rapport à l'histoire du rat et de la peste à Madagascar évoquée ci-dessus.

Quels patrons géographiques de sélection / contre-sélection ?

Les populations situées dans la zone de peste (hauts plateaux centraux) sont beaucoup plus résistantes à la peste que les populations de la zone sans peste (zone de basse altitude) (Rahalison *et al.*, 2003 et chapitre 2 II-2). L'existence de ce patron géographique avant l'arrivée de la peste est improbable¹⁹. Il est donc le résultat de la sélection naturelle exercée par les épidémies de peste là où elles existent, c'est-à-dire dans la zone des hauts plateaux centraux, et conduisant à une augmentation de la proportion de résistants. La sensibilité des rats dans les zones de basse altitude peut être la conséquence soit d'une contre-sélection dans la zone sans peste (coût de la résistance), soit d'une dispersion limitée par rapport à la durée de la sélection: les allèles de résistance présents dans la zone de peste seraient absents ou en faible fréquence dans la zone sans peste car la dispersion entre les deux zones n'aurait pas eu le temps d'homogénéiser les fréquences alléliques entre zones de basse altitude et hauts plateaux centraux. La structure génétique neutre, indiquant que la dispersion n'est pas plus faible entre les deux zones qu'au sein de la zone de peste, rend moins probable cette seconde hypothèse.

Un argument en faveur d'un coût de la résistance serait la mise en évidence d'un polymorphisme pour la résistance au sein des populations des hauts plateaux. A l'inverse,

¹⁹ On pourrait imaginer l'hypothèse qu'un goulot d'étranglement ayant eu lieu lors de la colonisation des hauts plateaux (plusieurs siècles avant l'arrivée de la peste sur Madagascar) ait conduit par hasard à la rétention d'allèles de résistance à partir d'une population globalement sensible mais présentant du polymorphisme, mais cette hypothèse semble extrêmement peu probable d'après la structure génétique neutre actuelle (voir Chapitre 1).

l'absence de polymorphisme suggérerait l'absence de contre-sélection des allèles de résistance entre deux épizooties locales (probablement quelques années en général). Bien que les mesures expérimentales de résistance montrent une hétérogénéité phénotypique dans la réponse des rats face à la peste, celle-ci ne se traduit pas forcément par du polymorphisme génétique pour la résistance. L'observation du même taux de mortalité dans la descendance de rats sélectionnés pour avoir résisté à une infection expérimentale que dans les populations dont sont issues leurs parents (c'est-à-dire une absence de réponse à la sélection, chapitre 2 III-3), suggérerait ainsi une absence de polymorphisme génétique au sein des hauts plateaux. Ces résultats sont cependant préliminaires et nécessitent des expériences complémentaires.

Bien qu'un coût soit souvent supposé comme associé à la résistance des hôtes aux pathogènes (voir Introduction I-2), les connaissances actuelles ne présentent pas d'évidence en faveur de ce coût dans le cas de la résistance à la peste des populations de rats noirs. Des études expérimentales pourraient permettre d'apporter des arguments en faveur ou à l'encontre de cet éventuel coût de la résistance dans notre modèle (voir chapitre 2 IV).

Quels scénarios pour l'apparition de la résistance ?

Trois hypothèses sont envisageables concernant l'apparition de ce(s) allèle(s) de résistance: (1) une (des) nouvelle(s) mutation(s), (2) de la variation génétique déjà présente dans les populations introduites ou (3) l'arrivée de ce(s) allèle(s) par migration postérieure à l'introduction.

L'hypothèse de variation génétique déjà présente (2) est souvent invoquée pour expliquer les adaptations rapides (Prentis *et al.*, 2008 ; Olivieri, 2009). L'observation d'une diversité génétique neutre modérée dans les populations de rats noirs à Madagascar, en conséquence d'un goulot d'étranglement lors de l'invasion (voir résultats du chapitre 1), semble s'opposer à cette hypothèse. Cependant, les possibilités d'adaptation ne dépendent pas de la diversité génétique neutre, mais de la variabilité génétique ayant des conséquences phénotypiques (Lee, 2002). Il est ainsi plus pertinent de se demander si les populations introduites à Madagascar présentaient de la variabilité pour la résistance à la peste plutôt que de la diversité génétique neutre. La peste est avérée en Irak entre 599-775 et il semble que l'Arabie ait été particulièrement touchée par la peste justinienne (Zietz & Dunkelberg, 2004). Il est donc probable que la peste ait atteint la zone d'origine des rats malgaches à cette période. L'évolution d'une résistance aurait pu alors se faire à Oman²⁰, dans un contexte de forte diversité génétique de *R. rattus*, et les allèles auraient ensuite été dispersés vers Madagascar. Cependant, le goulot d'étranglement subi lors de l'introduction à Madagascar conduisant à une diminution de la diversité, on s'attend à une perte aléatoire des allèles rares par dérive.

²⁰ La sélection pour la résistance aurait aussi pu se faire avant l'introduction à Oman, dans la zone d'origine du rat noir, c'est-à-dire l'Inde. Cependant, l'introduction à Oman date probablement de quelques millénaires avant JC (Pascal *et al.*, 2006) et il n'existe pas de données fiables concernant de possibles épidémies de peste en Inde avant cette période. Les lieux et dates de cette possible sélection passée ont de toutes façons peu d'influence sur le raisonnement.

Ainsi, les allèles de résistance n'auraient pu arriver à Madagascar que s'ils étaient en fréquences non négligeables dans les populations introduites.

La sensibilité des rats issus de la zone sans peste (qui est de plus la zone colonisée en premier) suggère pourtant une faible fréquence actuelle du (des) allèle(s) de résistance dans les populations de basse altitude. Il semble donc dans ce cas nécessaire d'invoquer un coût à la résistance pour expliquer la sensibilité des rats de basse altitude. Cependant, un coût trop élevé ne permettrait pas d'expliquer le maintien du polymorphisme de résistance en l'absence de la peste depuis l'arrivée du rat à Madagascar il y a 1000 à 2000 ans. Des conditions restreintes semblent donc nécessaires pour privilégier l'hypothèse un polymorphisme pour la résistance préexistant à l'arrivée de la peste dans les populations de rat noir malgache.

L'hypothèse de la migration (3) semble à première vue en désaccord avec les résultats de structure génétique neutre indiquant une colonisation unique de Madagascar par le rat noir. Cependant, il n'est pas exclu que de nouveaux allèles puissent arriver à Madagascar, comme l'illustre le cas d'un individu avec un génome mitochondrial différent (chapitre 1 II-1). De plus, l'observation d'un plus grand nombre d'allèles microsatellites privés dans les populations situées près de la côte (chapitre 1 III-2) pourrait être la conséquence de la migration récurrente entre l'extérieur de Madagascar et les zones côtières. Ces hypothèses pourront bénéficier de nouveaux résultats concernant la structuration neutre des populations de *R. rattus* à Madagascar en confrontant différents scénarios d'introduction à Madagascar (voir chapitre 1 IV). Même si les flux de gènes récurrents sont très faibles au niveau des loci neutres, l'avantage adaptatif conféré par un allèle de résistance à un potentiel migrant conduira à une forte sélection en sa faveur, notamment si celui-ci arrive dans un port durant la troisième pandémie (on peut alors même imaginer l'arrivée des allèles de résistance en même temps que la peste, par exemple des navires indiens transportant des rats résistants et des puces infectées). Cependant, on s'attend à ce que si la résistance est arrivée à Madagascar par migration, elle ait pu atteindre d'autres régions du monde. Le fait que la résistance de *R. rattus* à la peste semble restreinte à Madagascar s'oppose donc à cette hypothèse et favorise au contraire le scénario d'une résistance résultat de nouvelle(s) mutation(s) (hypothèse 1).

L'hypothèse de la mutation est en général favorisée dans le cas où la variabilité génétique est réduite et qu'il n'y a pas de migration récurrente (voir par exemple Koskinen *et al.*, 2002a ; Huey, 2005 ; Dlugosch & Parker, 2008). Un tel mécanisme semble intuitivement plus long, puisque la probabilité qu'une mutation avantageuse soit apparue augmente avec le temps. Mais il n'est pas exclu.

L'état actuel des connaissances ne permet donc pas de conclure en faveur d'un des scénarios pour expliquer l'apparition de la résistance à la peste chez le rat noir malgache. L'étude expérimentale d'éventuels coût à la résistance à la peste, ainsi que l'avancée des recherches en cours sur la structure génétique neutre du rat noir à Madagascar, pourront apporter des arguments en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses proposées.

Vers un modèle pour l'évolution de la résistance ?

Les modalités d'évolution de la résistance dépendent de différentes caractéristiques du modèle biologique étudié : le type de résistance (évitement, tolérance ou résistance au sens strict, voir Encadré 1), les coûts associés à cette résistance, l'existence ou non d'une immunité acquise, la longévité de l'hôte (voir les modèles théoriques suivants : Boots & Bowers, 1999 ; Boots & Haraguchi, 1999 ; Roy & Kirchner, 2000 ; Miller *et al.*, 2007a). Des données expérimentales sur le rat noir à Madagascar sont donc nécessaires, dont certaines ont été apportées au cours de cette thèse (résultats du chapitre 2 II). Des informations sur les bases génétiques de la résistance (nombre de gènes impliqués, épistasie, dominance) sont aussi nécessaires pour comprendre l'évolution de la résistance. En effet, une résistance à hérédité dominante augmenterait en fréquence plus rapidement que si ce trait est récessif. Des contraintes génétiques peuvent de plus parfois expliquer des patrons d'évolution inattendus (par exemple un déséquilibre de liaison entre loci gouvernant deux traits soumis des pressions de sélection opposées, Gratten *et al.*, 2008). Etablir des modèles d'évolution de la résistance à la peste reste ainsi une perspective à plus long terme puisque cela nécessite des connaissances approfondies sur le modèle biologique.

II- Bases génétiques de la résistance à la peste chez *Rattus rattus*

L'importance des bases génétiques de la résistance pour comprendre son évolution nous a conduit à étudier la génétique de la résistance à la peste chez le rat noir malgache au cours de cette thèse (chapitre 3). Ce modèle biologique semble pertinent pour l'étude de l'adaptation. En effet, la pression de sélection (les épidémies de peste) est forte et bien identifiée. Il est cependant possible que celle-ci ne soit pas homogène ni dans le temps ni dans l'espace à l'échelle de la zone de peste. De plus, le phénotype adaptatif (la résistance à la peste) est caractérisé et chaque individu peut être étudié individuellement par des infections expérimentales. Enfin, le rat noir est proche de l'espèce modèle *R. norvegicus* (divergence de moins de 3 Myr, Robins *et al.*, 2008) et le génome de *R. rattus* a été caractérisé cytologiquement (Cavagna *et al.*, 2002). Ainsi, bien que n'étant pas une espèce modèle, les données génétiques disponibles chez *R. rattus* sont conséquentes. Le rat noir de Madagascar présente donc deux caractéristiques le rendant à priori un bon modèle pour l'étude de l'adaptation : (1) il se place dans un contexte évolutif intéressant, et dont l'étude est réalisable et (2) c'est une espèce intermédiaire dans un continuum entre espèces de laboratoire et espèces sauvages (Storz & Hoekstra, 2007 ; Ellegren & Sheldon, 2008).

Déterminer des gènes / marqueurs génétique de résistance ?

Des approches gène candidat et génomique nous ont permis de mettre en évidence des marqueurs génétiques potentiellement associés à la résistance à la peste (résultats du chapitre 3). Les gènes situés à proximité de ces marqueurs, et connus pour être impliqués dans la défense des hôtes contre les pathogènes sont donc de très bons candidats pour la suite des investigations.

Cependant, à l'issue de cette thèse, on reste loin de l'idée initiale, peut-être utopique, d'obtenir une cartographie des niveaux de résistance dans les populations de *R. rattus* grâce aux outils de la génétique. En effet, cela nécessite au moins deux conditions : l'existence de gènes majeurs et l'homogénéité des relations génotype/phénotype dans l'ensemble de la zone de peste. Ces deux hypothèses ne sont pas invalidées, mais pas non plus vérifiées à l'issue de cette thèse. Cela souligne ainsi les difficultés, même dans un cas relativement favorable, à déterminer les bases génétiques de la résistance aux pathogènes. Il semble que ce type d'approche ne doive être envisagée que dans les cas où le phénotype et la pression de sélection sont bien définis, et qu'elle nécessite de mettre en œuvre des moyens très importants en biologie moléculaire. Le développement actuel de nouvelles méthodes de séquençage rendra bientôt disponibles de telles données génétiques pour de nombreuses espèces, même non modèles.

D'autres approches envisageables ?

La génétique de la résistance aurait aussi pu être étudiée par d'autres approches. Notamment les deux approches proposées ci-dessous sont envisageables, mais à plus long terme car elles nécessitent de bonnes conditions de reproduction en captivité (ce qui n'est pas le cas actuellement, voir chapitre 2 III-3). Tout d'abord, des lignées de rats résistants et de rats sensibles pourraient être comparées en ce qui concerne : (1) la cinétique de l'infection (suivis temporels de la bactérie dans les phases précoces) (2) l'expression génétique suite à l'infection (Oleksiak *et al.*, 2002 ; Bryant *et al.*, 2004) et (3) la cinétique de la réponse immunitaire (suivi de protéines telles que les cytokines pro-inflammatoires ou les cellules immunitaires), lors d'une infection expérimentale par la peste. De telles études pourraient permettre de définir des gènes candidats sur la base de données plus pertinentes que celles issues de la littérature, car obtenues chez le rat noir malgache et non chez d'autres espèces (*Mus musculus* ou *Rattus norvegicus*).

D'autre part, une approche QTL (*Quantitative Trait Loci*) pourrait être envisagée. Celle-ci nécessite la détermination d'un caractère quantitatif approprié. De façon générale, l'étude expérimentale de la résistance à la peste bénéficierait d'ailleurs grandement de protocoles expérimentaux étudiant un caractère quantitatif (par exemple le taux de bactéries dans le sang à un temps donné) plutôt que le caractère binaire survie / mort (voir chapitre 2 II-6 et III-3). L'approche QTL ne nécessite pas forcément des lignées pures (Erickson *et al.*, 2004). Cependant, la nécessité d'environ 300 individus F2 (mais voir Albertson *et al.*, 2003, 173 individus) et de nombreux marqueurs génétiques (par exemple, 137 dans Albertson *et al.*, 2003), si possible codominants (Erickson *et al.*, 2004), rend cette méthode difficile dans l'état actuel des choses. Pourtant, cette approche est intéressante dans le cadre de l'étude de la résistance aux pathogènes, comme l'illustre l'étude la résistance à *Salmonella typhimurium* chez des lignées de souris qui a mis en évidence l'importance de trois régions génomiques (Sebastiani *et al.*, 1998) dont une comprend le gène *Nramp1*, déjà connu pour affecter la résistance à cette bactérie (Skamene *et al.*, 1982).

III- Conséquences épidémiologiques de la résistance à la peste du rat noir

Le rat noir est la seule espèce susceptible de jouer de rôle de réservoir de la peste dans les villages des hauts plateaux malgaches, alors qu'il n'est pas connu comme réservoir dans les autres foyers du monde (voir Introduction IV-5). Il semble donc important d'étudier cette espèce de façon à mieux comprendre son rôle dans la transmission et le maintien de la peste à Madagascar. Des infections expérimentales ont pour cela été réalisées, révélant un niveau de résistance des populations de rat noir des hauts plateaux compris entre 50 et 95 %. Ces observations sont cohérentes avec la vision actuelle d'un réservoir de peste constitué d'une population de rongeurs présentant une réponse à l'infection hétérogène (Gage & Kosoy, 2005) (hétérogénéité de la résistance au niveau phénotypique, pas forcément au niveau génétique). En effet, une population homogène sensible serait éradiquée par la peste tandis qu'une population homogène résistante conduirait à la disparition de la peste car elle ne serait pas transmise (voir Introduction IV-6).

Des modèles d'épidémiologie de la peste récemment développés (Keeling & Gilligan, 2000a; 2000b) formalisent ce raisonnement et suggèrent que la peste peut se maintenir à l'état endémique durant plusieurs années si la population de rongeurs présente initialement un niveau de résistance de l'ordre de 50 à 75 %. De plus, des niveaux de résistance relativement similaires (40-80 %) ont été observés chez les rongeurs réservoirs de peste en Asie (Biggins & Kosoy, 2001 ; Gage & Kosoy, 2005). Chez les *R. rattus* de Madagascar, le niveau de résistance phénotypique serait donc proche de ceux connus, théoriquement et empiriquement, comme nécessaires pour permettre la persistance de la maladie.

Modéliser le rôle de la résistance dans le maintien de la peste à Madagascar ?

Appliquer des approches théoriques aux particularités du foyer de peste de Madagascar pourrait permettre de mieux comprendre l'importance de la résistance dans la transmission de la maladie et son maintien à long terme. En effet, les modèles existants et les estimations de leurs paramètres (Keeling & Gilligan, 2000a ; 2000b) sont parfois très approximatifs et ne s'appliquent pas forcément au contexte malgache. Ces modèles ainsi que leurs paramètres pourraient être mis au point grâce aux données acquises sur le foyer de peste de Madagascar. Les données importantes de piégeage de rongeurs obtenues par l'équipe permettent d'avoir une bonne estimation de la distribution du nombre de puces par rat, de la densité des rats et de leur taux de reproduction. Des données sur la dispersion des rats à l'échelle locale ont de plus été acquises récemment (Rahelinirina, 2009). Les infections expérimentales réalisées au cours de cette thèse permettent d'améliorer les connaissances sur la pathologie de la peste chez *R. rattus* (probabilité de guérison, cinétique de l'infection) ; les données manquantes pourront être issues des travaux réalisés sur *R. norvegicus* (Sebbane *et al.*, 2005). La littérature nous apporte des informations sur les modalités de la transmission de la peste chez *Xenopsylla cheopis* (voir Introduction IV-4). Pour le moment, on pourrait ne pas s'intéresser aux caractéristiques de *Synopsyllus fonquerniei* et considérer les deux espèces de puces comme

similaires, bien que des travaux ultérieurs puissent aussi se focaliser sur les rôles respectifs des deux espèces dans la transmission de la peste. Les résultats des modèles réalisés pourront être confrontés aux données de séroprévalences murines et de cas humains à Madagascar.

IV- Conclusion

Cette thèse a permis des avancées dans l'étude du réservoir de la peste à Madagascar : une description de la structuration génétique de ses populations, permettant des inférences sur leur histoire, une meilleure caractérisation de la résistance à la peste et la mise en évidence de gènes potentiellement impliqués dans cette résistance. Elle ouvre des perspectives de recherche prometteuses dans ces domaines.

Les données obtenues concernant la résistance à la peste apportent une contribution à la compréhension du rôle du rat noir dans la circulation de la peste à Madagascar. A plus long terme, des données géographiques concernant le niveau de résistance des populations de rat noir à Madagascar pourraient permettre d'identifier les zones où le risque de transmission à l'homme est le plus fort, dans le but de mieux gérer les campagnes de sensibilisation au niveau des acteurs de santé publique ou encore le contrôle des populations de rongeurs.

Références citées

- Abdelkrim J., Pascal M. & Samadi S. (2005). Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Molecular Ecology* **14**: 2923-2931.
- Abel L., Demenais F., Prata A., Souza A.E. & Dessein A. (1991). Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Human Genetics* **48**: 959-970.
- Abramov V.M., Vasiliev A.M., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Kosarev I.V., Khlebnikov V.S., Ishchenko A.T., MacIntyre S., Gillespie J.R., Khurana R., Korpela T., Fink A.L. & Uversky V.N. (2001). Structural and functional similarity between *Yersinia pestis* capsular protein CafI and human interleukin-1 beta. *Biochemistry* **40**: 6076-6084.
- Abramov Y.M., Vasiliev A.M., Khlebnikov V.A., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Kosarev I.V., Ishchenko A.T., Gillespie J.R., Millett I.S., Fink A.L. & Uversky V.N. (2002). Structural and functional properties of *Yersinia pestis* CafI capsular antigen and their possible role in fulminant development of primary pneumonic plague. *Journal of Proteome Research* **1**: 307-315.
- Acevedo-Whitehouse K. & Cunningham A.A. (2006). Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 433-438.
- Achtman M. (2004) Age, descent, and genetic diversity within *Yersinia pestis*. In: *Yersinia: molecular and cellular biology*, (Carniel E. & Hinnebusch B.J., eds.). Horizon Bioscience, Wymondham.
- Achtman M. (2008). Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* **62**: 53-70.
- Achtman M., Morelli G., Zhu P.X., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francois V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E. & Keim P. (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17837-17842.
- Achtman M., Zurth K., Morelli C., Torrea G., Guiyoule A. & Carniel E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14043-14048.
- Adamo S.A. (1999). Evidence for adaptive changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour* **57**: 117-124.
- Agnese D.M., Calvano J.E., Hahn S.J., Coyle S.M., Corbett S.A., Calvano S.E. & Lowry S.F. (2002). Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *Journal of Infectious Diseases* **186**: 1522-1525.
- Akey J.M., Zhang G., Zhang K., Jin L. & Shriver M.D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research* **12**: 1805-1814.
- Albertson R.C., Streelman J.T. & Kocher T.D. (2003). Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5252-5257.
- Allibert C. (1988). Les contacts entre l'Arabie, le Golfe persique, l'Afrique Orientale et Madagascar. Confrontation des documents écrits, des traditions orales et des données archéologiques récentes. *Travaux de la Maison de l'Orient*: 110-126.
- Altizer S., Dobson A., Hosseini P., Hudson P., Pascual M. & Rohani P. (2006). Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* **9**: 467-484.
- Altizer S., Harvell D. & Friedle E. (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 589-596.
- Aminetzach Y.T., Macpherson J.M. & Petrov D.A. (2005). Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. *Science* **309**: 764-767.
- Anderson R. & May R. (1991). *Infectious diseases in humans*. Oxford University Press, Oxford.
- Andolfatto P. (2001). Adaptive hitchhiking effects on genome variability. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**: 635-641.

Références

- Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Welkos S.L. & Friedlander A.M. (1996). Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infection and Immunity* **64**: 2180-2187.
- Andrianavoarimanana V.M. (2007) Réponse immunitaire lors d'une infection à *Yersinia pestis* chez l'homme. Master 2. Université de Versailles - St Quentin en Yvelines. pp. 41.
- Anisimov A.P., Lindler L.E. & Pier G.B. (2004). Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clinical Microbiology Reviews* **17**: 434-+.
- Antonovics J., Abbate J.L., Baker C.H., Daley D., Hood M.E., Jenkins C.E., Johnson L.J., Murray J.J., Panjeti V., Rudolf V.H.W., Sloan D. & Vondrasek J. (2007). Evolution by any other name: Antibiotic resistance and avoidance of the E-word. *Plos Biology* **5**: 137-140.
- Archie E.A., Luikart G. & Ezenwa V.O. (2009). Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 21-30.
- Arntzen L., Wade A.A. & Isaacson M. (1991). Immune-Responses of two *Mastomys* Sibling Species to *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity* **59**: 1966-1971.
- Audouin-Rouzeau F. (2003). *Les chemins de la peste: le rat, la puce et l'homme*. Presses Universitaires de rennes.
- Audouin-Rouzeau F. & Vigne J.-D. (1994). La colonisation de l'Europe par le rat noir (*Rattus rattus*). *Revue de Paléobiologie* **13**: 125-145.
- Avise J.C. (2000). *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.
- Ayyadurai S., Houhamdi L., Lepidi H., Nappez C., Raoult D. & Drancourt M. (2008). Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil. *Microbiology SGM* **154**: 2865-2871.
- Bacot A.W. & Martin C.J. (1914). Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *Journal of Hygiene* **13**: 423-439.
- Ballard J.W.O. & Whitlock M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**: 729-744.
- Baltazard M. (1960). Déclin et destin d'une maladie infectieuse: la peste. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* **23**: 247-262.
- Bateman A.J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**: 349-368.
- Baverstock P.R., Adams M., Maxson L.R. & Yosida T.H. (1983). Genetic differentiation among karyotypic forms of the black rat, *Rattus rattus*. *Genetics* **105**: 969-983.
- Beaumont M.A. (2005). Adaptation and speciation : what Fst can tell us ? *Trends in Ecology and Evolution* **20**: 435-440.
- Beaumont M.A. & Nichols R.A. (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London B* **263**: 1619-1626.
- Begon M., Klassovskiy N., Ageyev V., Suleimenov B., Atshabar B. & Bennett M. (2006). Epizootiologic parameters for plague in Kazakhstan. *Emerging Infectious Diseases* **12**: 268-273.
- Bensch S., Akesson S. & Irwin D.E. (2002). The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Molecular Ecology* **11**: 2359-2366.
- Bensch S., Irwin D.E., Irwin J.H., Kvist L. & Akesson S. (2006). Conflicting patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in *Phylloscopus* warblers. *Molecular Ecology* **15**: 161-171.
- Beraldi D., McRae A.F., Gratten J., Slate J., Visscher P.M. & Pemberton J.M. (2006). Development of a linkage map and mapping of phenotypic polymorphisms in a free-living population of Soay sheep (*Ovis aries*). *Genetics* **173**: 1521-1537.
- Bergstrom C.T. & Feldgarden M. (2008) The ecology and evolution of antibiotic-resistant bacteria. In: *Evolution in health and disease. 2nd edition*, (Stearns S.C. & Koella J.C., eds.) pp. 125-138. Oxford University Press, New York.
- Bernatchez L. & Landry C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates : what have we learned about natural selection in 15 years? . *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 363-377.
- Bertherat E., Bekhoucha S., Chougrani S., Razik F., Duchemin J.B., Houti L., Deharib L., Fayolle C., Makrerougrass B., Dali-Yahia R., Bellal R., Belhabri L., Chaieb A., Tikhomirov E. & Carniel E.

Références

- (2007). Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 1459-1462.
- Bertorelle G., Bruford M.W., Hauffe H.C., Rizzoli A. & Vernesi C. (2009). *Population genetics for animal conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beutler B., Jiang Z.F., Georgel P., Crozat K., Croker B., Rutschmann S., Du X. & Hoebe K. (2006). Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annual Review of Immunology* **24**: 353-389.
- Biggins D.E. & Kosoy M.Y. (2001). Influences of introduced plague on North American mammals: Implications from ecology of plague in Asia. *Journal of Mammalogy* **82**: 906-916.
- Bizanov G. & Dobrokhotova N.D. (2007). Experimental infection of ground squirrels (*Citellus pygmaeus* Pallas) with *Yersinia pestis* during hibernation. *Journal of Infection* **54**: 198-203.
- Black W.C., Baer C.F., Antolin M.F. & DuTeau N.M. (2001). Population genomics: Genome-wide sampling of insect populations. *Annual Review of Entomology* **46**: 441-469.
- Blais J., Rico C., van Oosterhout C., Cable J., Turner G.F. & Bernatchez L. (2007). MHC adaptive divergence between closely related and sympatric African Cichlids. *PloS One* **8**: e734.
- Blears M.J., De Grandis S.A., Lee H. & Trevors J.T. (1998). Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **21**: 99-114.
- Boisier P., Rahalison L., Rasolomaharo M., Ratsitorahina M., Mahafaly M., Razafimahefa M., Duplantier J.M., Ratsifasoamanana L. & Chanteau S. (2002). Epidemiologic features of four successive annual outbreaks of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 311-316.
- Bonin A., Ehrich D. & Manel S. (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* **16**: 3737-3758.
- Bonin A., Taberlet P., Miaud C. & Pompanon F. (2006). Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution* **23**: 773-783.
- Bonneaud C., Mazuc J., Gonzalez G., Haussy C., Chastel O., Faivre B. & Sorci G. (2003). Assessing the cost of mounting an immune response. *American Naturalist* **161**: 367-379.
- Boots M. (2008). Fight or learn to live with the consequences? *Trends in Ecology & Evolution* **23**: 248-250.
- Boots M. & Bowers R.G. (1999). Three mechanisms of host resistance to microparasites - avoidance, recovery and tolerance - show different evolutionary dynamics. *Journal of Theoretical Biology* **201**: 13-23.
- Boots M. & Bowers R.G. (2004). The evolution of resistance through costly acquired immunity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 715-723.
- Boots M. & Haraguchi Y. (1999). The evolution of costly resistance in host-parasite systems. *American Naturalist* **153**: 359-370.
- Boulinier T., Sorci G., Monnat J.Y. & Danchin E. (1997). Parent-offspring regression suggests heritable susceptibility to ectoparasites in a natural population of kittiwake *Rissa tridactyla*. *Journal of Evolutionary Biology* **10**: 77-85.
- Boyce W.M., Hedrick P.W., MuggliCockett N.E., Kalinowski S., Penedo M.C.T. & Ramey R.R. (1997). Genetic variation of major histocompatibility complex and microsatellite loci: A comparison in bighorn sheep. *Genetics* **145**: 421-433.
- Brinkhof M.W.G., Heeb P., Kolliker M. & Richner H. (1999). Immunocompetence of nestling great tits in relation to rearing environment and parentage. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 2315-2322.
- Britton-Davidian J., Catalan J., Lopez J., Ganem G., Nunes A.C., Ramalhinho M.G., Auffray J.C., Searle J.B. & Mathias M.L. (2007). Patterns of genic diversity and structure in a species undergoing rapid chromosomal radiation: an allozyme analysis of house mice from the Madeira archipelago. *Heredity* **99**: 432-442.

Références

- Bryant P.A., Venter D., Robins-Browne R. & Curtis N. (2004). Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infectious Diseases* **4**: 100-111.
- Brygoo E.R. (1966). Epidémiologie de la peste à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* **35**: 9-147.
- Brygoo E.R. (1967). Démonstration expérimentale du rôle de vecteur de *Synopsyllus fonquerniei*. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* **35**: 309-311.
- Brygoo E.R. & Dodin A. (1967). Transmission expérimentale de la peste par *Synopsyllus fonquerniei* de Madagascar. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **264**: 681-682.
- Brygoo E.R. & Rajenison S. (1972). Sensibilité du *Rattus rattus* de Tananarive à l'inoculation expérimentale de *Yersinia pestis*. Influence de la splénectomie. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* **41**: 17-27.
- Bryja J., Charbonnel N., Berthier K., Galan M. & Cosson J.F. (2007). Density-related changes in selection pattern for major histocompatibility complex genes in fluctuating populations of voles. *Molecular Ecology* **16**: 5084-5097.
- Buchrieser C., Rusniok C., Frangeul L., Couve E., Billault A., Kunst F., Carniel E. & Glaser P. (1999). The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: Sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infection and Immunity* **67**: 4851-4861.
- Burney D.A., Burney L.P., Godfrey L.R., Jungers W.L., Goodman S.M., Wright H.T. & Jull A.J.T. (2004). A chronology for late prehistoric Madagascar. *Journal of Human Evolution* **47**: 25-63.
- Burroughs A.L. (1947). Sylvatic plague studies: the vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. *Journal of Hygiene* **43**: 371-396.
- Campbell D. & Bernatchez L. (2004). Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 945-956.
- Carmo C.R., Esteves P.J., Ferrand N. & van der Loo W. (2006). Genetic variation at chemokine receptor CCR5 in leporids: alteration at the 2nd extracellular domain by gene conversion with CCR2 in *Oryctolagus*, but not *Sylvilagus* and *Lepus* species. *Immunogenetics* **58**: 494-501.
- Carniel E. (2002). The plague. *Comptes Rendus Biologies* **325**: 851-853.
- Carrington M., Nelson G.W., Martin M.P., Kissner T., Vlahov D., Goedert J.J., Kaslow R., Buchbinder S., Hoots K. & O'Brien S.J. (1999). HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* **283**: 1748-1752.
- Casanova J.L. & Abel L. (2007). Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *Embo Journal* **26**: 915-922.
- Cavagna P., Stone G. & Stanyon R. (2002). Black rat (*Rattus rattus*) genomic variability characterized by chromosome painting. *Mammalian Genome* **13**: 157-163.
- Cavalli-Sforza L.L. (1966). Population structure and human evolution. *Proceedings of The Royal Society of London B* **164**: 362-379.
- Cavalli-Sforza L.L. & Edwards W.F. (1967). Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**: 233-257.
- Chan K.M.A. & Levin S.A. (2005). Leaky prezygotic isolation and porous genomes: Rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution* **59**: 720-729.
- Chanteau S. (2006). *Atlas de la peste à Madagascar*. IRD éditions, Paris.
- Chanteau S., Rabarijaona L., O'Brien T., Rahalison L., Hager J., Boisier P., Burans J. & Rasolomaharo M. (1998a). F1 antigenaemia in bubonic plague patients, a marker of gravity and efficacy of therapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **92**: 572-573.
- Chanteau S., Ratsifasoamanana L., Rasoamanana B., Rahalison L., Randriambeloso J., Roux J. & Rabeson D. (1998b). Plague as a reemerging disease in Madagascar. *Emerging Infectious Diseases* **4**: 101-104.
- Chanteau S., Ratsitorahina M., Rahalison L., Rasoamanana B., Chan F., Boisier P., Rabeson D. & Roux J. (2000). Current epidemiology of human plague in Madagascar. *Microbes and Infection* **2**: 25-31.

Références

- Chanteau S., Rahalison L., Ralafiarisoa L., Foulon J., Ratsitorahina M., Ratsifasoamanana L., Carniel E. & Nato A. (2003). Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* **361**: 211-216.
- Chapuis M.P. (2006) Génétique des populations d'un insecte pullulant, le criquet migrateur, *Locusta migratoria*. Thèse. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. Pp 72.
- Chapuis M.P. & Estoup A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 621-631.
- Charbonnel N. & Pemberton J. (2005). A long-term genetic survey of an ungulate population reveals balancing selection acting on MHC through spatial and temporal fluctuations in selection. *Heredity* **95**: 377-388.
- Charlesworth B., Nordborg M. & Charlesworth D. (1997). The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genetical Research* **70**: 155-174.
- Chen T.H. & Meyer K.F. (1974). Susceptibility and antibody response of *Rattus* species to experimental plague. *The Journal of Infectious Diseases* **129**: S62.
- Ciesielski C., Marianos D., Ou C.Y., Dumbaugh R., Witte J., Berkelman R., Gooch B., Myers G., Luo C.C., Schochetman G., Howell J., Lasch A., Bell K., Economou N., Scott B., Furman L., Curran J. & Jaffe H. (1992). Transmission of Human Immunodeficiency Virus in a dental practice. *Annals of Internal Medicine* **116**: 798-805.
- Collinge S.K., Johnson W.C., Ray C., Matchett R., Grensten J., Cully J.F., Gage K.L., Kosoy M.Y., Loye J.E. & Martin A.P. (2005). Landscape structure and plague occurrence in black-tailed prairie dogs on grasslands of the western USA. *Landscape Ecology* **20**: 941-955.
- Collinge S.K., Ray C. & Cully J.F. (2008) Effects of disease on keystone species, dominant species and their communities. In: *Infectious disease ecology: the effects of ecosystems on disease and of disease on ecosystems*, (Ostfeld R.S., Keesing F. & Eviner V.T., eds.). pp. 129-144. Princeton University Press, Princeton and Oxford.
- Coltman D.W., Wilson K., Pilkington J.G., Stear M.J. & Pemberton J.M. (2001). A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology* **122**: 571-582.
- Cordell H.J. (2002). Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Human Molecular Genetics* **11**: 2463-2468.
- Cornelius C., Quenee L., Anderson D. & Schneewind O. (2007) Protective immunity against plague. In: *The genus Yersinia: from genomics to function*, (Perry R.D. & Fetherston J.D., eds.). pp. Springer, New York.
- Cornuet J.M., Santos F., Beaumont M.A., Robert C.P., Marin J.M., Balding D.J., Guillemaud T. & Estoup A. (2008). Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* **24**: 2713-2719.
- Cotter S.C. & Wilson K. (2002). Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity* **88**: 229-234.
- Cowan K.M., Shutler D., Herman T.B. & Stewart D.T. (2009). Splenic mass of masked shrews, *Sorex cinereus*, in relation to body mass, sex, age, day of the year, and Bladder Nematode, *Liniscus* (= *Capillaria*) *maseri*, infection. *Journal of Parasitology* **95**: 228-230.
- Crow J.F. (2002). Perspective: Here's to Fisher, additive genetic variance, and the fundamental theorem of natural selection. *Evolution* **56**: 1313-1316.
- Cruz A. & Wiley J.W. (1989). The decline of an adaptation in the absence of a presumed selection pressure. *Evolution* **43**: 55-62.
- Dasmahapatra K.K., Blum M.J., Aiello A., Hackwell S., Davies N., Bermingham E.P. & Mallett T. (2002). Inferences from a rapidly moving hybrid zone. *Evolution* **56**: 741-753.
- Daszak P., Cunningham A.A. & Hyatt A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* **287**: 443-449.
- Davis S., Makundi R.H., Machang'u R.S. & Leirs H. (2006). Demographic and spatio-temporal variation in human plague at a persistent focus in Tanzania. *Acta Tropica* **100**: 133-141.

Références

- de Bellocq J.G., Ribas A., Casanova J.C. & Morand S. (2007). Immunocompetence and helminth community of the white-toothed shrew, *Crocidura russula* from the Montseny Natural Park, Spain. *European Journal of Wildlife Research* **53**: 315-320.
- De Graaf G. (1981) *Rattus rattus*. In: *The rodents of Southern Africa*, (De Graaf G., ed.). pp. 219-225. Butterworth, Durban.
- De Groot N.G., Heijmans C.M.C., De Groot N., Otting N., De Vos-Rouweler A.J.M., Remarque E.J., Bonhomme M., Doxiadis G.G.M., Crouau-Roy B. & Bontrop R.E. (2008). Pinpointing a selective sweep to the chimpanzee MHC class I region by comparative genomics. *Molecular Ecology* **17**: 2074-2088.
- de Meeus T., McCoy K.D., Prugnolle F., Chevillon C., Durand P., Hurtrez-Bousses S. & Renaud F. (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to "debusquer la bete". *Infection Genetics and Evolution* **7**: 308-332.
- de Roode J.C., Culleton R., Cheesman S.J., Carter R. & Read A.F. (2004). Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 1073-1080.
- Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., Goedert J.J., Buchbinder S.P., Vittinghoff E., Gomperts E., Donfield S., Vlahov D., Kaslow R., Saah A., Rinaldo C., Detels R. & O'Brien S.J. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* **273**: 1856-1862.
- Deng W., Burland V., Plunkett G., Boutin A., Mayhew G.F., Liss P., Perna N.T., Rose D.J., Mau B., Zhou S.G., Schwartz D.C., Fetherston J.D., Lindler L.E., Brubaker R.R., Plano G.V., Straley S.C., McDonough K.A., Nilles M.L., Matson J.S., Blattner F.R. & Perry R.D. (2002). Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *Journal of Bacteriology* **184**: 4601-4611.
- Dennis D.T., Gage K.L., Gratz N., Poland J. & Tikhomirov E. (1999). *Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control*. Geneva.
- DeVeale B., Brummel T. & Seroude L. (2004). Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell* **3**: 195-208.
- Devignat R. (1951). Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis* : nouvelle hypothèse. *Bulletin World Health Organization* **4**: 242-263.
- Dlugosch K.M. & Parker I.M. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**: 431-449.
- Dobson A., Cattadori I., Holt R.D., Ostfeld R.S., Keesing F., Krichbaum K., Rohr J.R., Perkins S.E. & Hudson P.J. (2006). Sacred cows and sympathetic squirrels: The importance of biological diversity to human health. *Plos Medicine* **3**: 714-718.
- Doherty C. & Zingernagel R.M. (1975). Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 complex. *Nature* **256**: 50-52.
- Doums C., Moret Y., Benelli E. & Schmid-Hempel P. (2002). Senescence of immune defence in *Bombus* workers. *Ecological Entomology* **27**: 138-144.
- Dowell S.F. (2001). Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* **7**: 369-374.
- Dowling D.K., Friberg U. & Lindell J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution* **23**: 546-554.
- Doxiadis G.G.M., de Groot N., Claas F.H.J., Doxiadis I.I.N., van Rood J.J. & Bontrop R.E. (2007). A highly divergent microsatellite facilitating fast and accurate DRB haplotyping in humans and rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 8907-8912.
- Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y.X., Nagashima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P. & Paxton W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4(+) cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**: 667-673.
- Dragic T., Trkola A., Lin S.W., Nagashima K.A., Kajumo F., Zhao L., Olson W.C., Wu L.J., Mackay C.R., Allaway G.P., Sakmar T.P., Moore J.P. & Maddon P.J. (1998). Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of Virology* **72**: 279-285.

Références

- Drancourt M., Houhamdi L. & Raoult D. (2006). *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *Lancet Infectious Diseases* **6**: 234-241.
- Dromigny J.-A. (1997) Contribution à la connaissance du cycle épidémiologique de la peste à Madagascar: étude sérologique des rats et des musaraignes. DEA. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, pp. 52.
- Drozdov I.G., Anisimov A.P., Samoiloa S.V., Yezhov I.N., Yereimin S.A., Karlyshev A.V., Krasilnikova V.M. & Kravchenko V.I. (1995). Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis. *Journal of Medical Microbiology* **42**: 264-268.
- Du Y.D., Rosqvist R. & Forsberg A. (2002). Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infection and Immunity* **70**: 1453-1460.
- Duchemin J.B. (2003) Biogéographie des puces de Madagascar. Thèse Université Paris XII -Val de Marne.. pp. 254.
- Duchemin J.B., Duplantier J.M., Goodman S.M., Ratovonjato J., Rahalison L. & Chanteau S. (2007) La peste à Madagascar: faune endémique et foyers sylvatiques. In: *Peste: entre épidémies et sociétés*, (Signoli M., Chev   D., Adalian P., Bo  tsch G. & Dutour O., eds.). Firenze University Press, Firenze.
- Duchemin J.B., Ratovonjato J. & Duplantier J.M. (2003) Siphonaptera, Fleas, *Parasy Gasy*. In: *The natural history of Madagascar*, (Goodman S.M. & Benstead J.P., eds.). pp. 687-692. University of Chicago Press, Chicago.
- Duffy M.A., Hall S.R., Caceres C.E. & Ives A.R. (2009). Rapid evolution, seasonality, and the termination of parasite epidemics. *Ecology* **90**: 1441-1448.
- Duffy M.A. & Sivars-Becker L. (2007). Rapid evolution and ecological host-parasite dynamics. *Ecology Letters* **10**: 44-53.
- Duncan S.R., Scott S. & Duncan C.J. (2005). Reappraisal of the historical selective pressures for the CCR5-Delta 32 mutation. *Journal of Medical Genetics* **42**: 205-208.
- Duplantier J.-M., Catalan J., Orth A., Grolleau B. & Britton-Davidian J. (2003). Systematics of the black rat in Madagascar: consequences for the transmission and distribution of plague. *Biological Journal of the Linnean Society* **78**: 335-341.
- Duplantier J.-M., Duchemin J.-B., Chanteau S. & Carniel E. (2005). From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary Research* **36**: 437-453.
- Duplantier J.-M., Orth A., Catalan J. & Bonhomme F. (2002). Evidence for a mitochondrial lineage originating from the Arabian peninsula in the Madagascar house mouse (*Mus musculus*). *Heredity* **89**: 154-158.
- Duplantier J.M. & Duchemin J.B. (2003a) Human diseases and introduced small mammals. In: *The natural history of Madagascar*, (Goodman S.M. & Benstead J.P., eds.). pp. 158-161. University of Chicago Press, Chicago.
- Duplantier J.M. & Duchemin J.B. (2003b) Introduced small mammals and their ectoparasites: a description of their colonization and its consequences. In: *The natural history of Madagascar*, (Goodman S.M. & Benstead J.P., eds.). pp. 1159-1186. University of Chicago Press, Chicago.
- Duplantier J.M., Duchemin J.B., Ratsitorahina M., Rahalison L. & Chanteau S. (2001). Emergence of plague in the Ikongo district of Madagascar, 1998. 2. Reservoir and fleas involved. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique* **94**: 119-122.
- Duplantier J.M. & Rakotondravony D. (1999) The rodent problem in Madagascar: agricultural pest and threat to human health. In: *Ecologically-based rodent management*, (Singleton G., Linds L., Leirs H. & Zhang Z., eds.). pp. 441-459. ACIA, Canberra.
- Dwyer G., Elkinton J.S. & Buonaccorsi J.P. (1997). Host heterogeneity in susceptibility and disease dynamics : tests of a mathematical model. *American Naturalist* **150**: 685-707.
- Egan S.P., Nasil P. & Funk D.J. (2008). Selection and genomic differentiation during ecological speciation: Isolating the contributions of host association via a comparative genome scan of *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution* **62**: 1162-1181.
- Eisen R.J., Bearden S.W., Wilder A.P., Monteneri J.A., Antolin M.F. & Gage K.L. (2006). Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly

Références

- spreading plague epizootics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15380-15385.
- Eisen R.J. & Gage K.L. (2009). Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods. *Veterinary Research* **40**.
- Eisen R.J., Petersen J.M., Higgins C.L., Wong D., Levy C.E., Mead P.S., Schriefer M.E., Griffith K.S., Gage K.L. & Ben Beard C. (2008). Persistence of *Yersinia pestis* in soil under natural conditions. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 941-943.
- Eisen R.J., Wilder A.P., Bearden S.W., Monteneri J.A. & Gage K.L. (2007). Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera : Pulicidae) is as efficient as transmission by blocked fleas. *Journal of Medical Entomology* **44**: 678-682.
- Ellegren H. & Sheldon B.C. (2008). Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature* **452**: 169-175.
- Elvin S.J., Williamson E.D., Scott J.C., Smith J.N., de Lema G.P., Chilla S., Clapham P., Pfeffer K., Schlondorff D. & Luckow B. (2004). Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection. *Nature* **430**: 6998.
- Engelthaler D.M., Hinnebusch J., Rittner C.M. & Gage K.L. (2000). Quantitative competitive PCR as a technique for exploring flea-*Yersinia pestis* dynamics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **62**: 552-560.
- Erickson D.L., Fenster C.B., Stenoien H.K. & Price D. (2004). Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Molecular Ecology* **13**: 2505-2522.
- Ewald P.W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **14**: 465-485.
- Facon B., Pointier J.P., Jarne P., Sarda V. & David P. (2008). High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Current Biology* **18**: 363-367.
- Faulkner G.J., Kimura Y., Daub C.O., Wani S., Plessy C., Irvine K.M., Schroder K., Cloonan N., Steptoe A.L., Lassmann T., Waki K., Hornig N., Arakawa T., Takahashi H., Kawai J., Forrest A.R.R., Suzuki H., Hayashizaki Y., Hume D.A., Orlando V., Grimmond S.M. & Carninci P. (2009). The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature Genetics* **41**: 563-571.
- Fenner F. & Fantini B. (1999). Biological control of vertebrate pests: the history of myxomatosis - an experiment in evolution. CAB International publishing, New York.
- Ferwerda B., McCall M.B.B., Alonso S., Mouktaroudi M., Giamarellos-Bourboulis E.J., Izagirre N., Syafruddin D., Kibiki G., Cristea T., Hijmans A., Hamann L., Israel S., Eighazali G., Troye-Blomberg M., Kumpf O., Maiga B., Dolo A., Doumbo O., Hermsen C.C., Stalenhoef A.F.H., van Crevel R., Brunner H.G., Oh D.Y., Schumann R.R., de la Rua C., Sauerwein R., Kullberg B.J., van der Ven A., van der Meer J.W.M. & Netea M.G. (2007). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 16645-16650.
- Fisher R.A. (1930). The genetical theory of natural selection. Clarendon, Oxford.
- Fisher R.A. (1948). Combining independent tests of significance. *American Statistician* **2**: 30.
- Frank S.A. (2002). *Immunology and evolution of infectious disease*. Princeton University Press, Princeton and Oxford.
- Frankham R. (2005). Invasion biology - Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* **94**: 385-385.
- Frodham A.J. & Hill A.V.S. (2004). Genetic of infectious diseases. *Human Molecular Genetics* **13**: R187-R194.
- Froeschke G. & Sommer S. (2005). MHC class II DRB variability and parasite load in the striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the southern Kalahari. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1254-1259.
- Gage K.L. & Kosoy M.Y. (2005). Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annual Review of Entomology* **50**: 505-528.

Références

- Gagnaire P.A., Albert V., Jonsson B. & Bernatchez L. (2009). Natural selection influences AFLP intraspecific genetic variability and introgression patterns in Atlantic eels. *Molecular Ecology* **18**: 1678-1691.
- Galimand M., Carniel E. & Courvalin P. (2006). Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 3233-3236.
- Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rasoamanana B., Chanteau S., Carniel E. & Courvalin P. (1997). Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *New England Journal of Medicine* **337**: 677-680.
- Galvani A.P. (2003). Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 132-139.
- Galvani A.P. & Slatkin M. (2003). Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5-Delta 32 HIV-resistance allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15276-15279.
- Gandon S., Mackinnon M.J., Nee S. & Read A.F. (2001). Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* **414**: 751-756.
- Ganzhorn J.U. (2003). Effects of introduced *Rattus rattus* on endemic small mammals in dry deciduous forest fragments of western Madagascar. *Animal Conservation* **6**: 147-157.
- Ganzhorn J.U., Goodman S.M. & Dehgan A. (2003) Effects of forest fragmentation on small mammals and lemurs. In: *The natural history of Madagascar*, (Goodman S.M. & Benstead J.P., eds.) pp. 1228-1234. University of Chicago Press, Chicago.
- Garrigan D. & Hedrick P.W. (2003). Perspective: detecting adaptative molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution* **57**: 1707-1722.
- Gasparini J., McCoy K.D., Haussy C., Tveraa T. & Boulinier T. (2001). Induced maternal response to the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**: 647-650.
- Gibbs R.A., et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**: 493-521.
- Gilabert A. (2005). Génétique des populations des rats noirs (*Rattus rattus*) de Madagascar en relation avec la peste. *Mémoire de Master 2*: Université Paris XI.
- Gilabert A., Loiseau A., Duplantier J.M., Rahelinirina S., Rahalison L., Chanteau S. & Brouat C. (2007). Genetic structure of black rat populations in a rural plague focus in Madagascar. *Canadian Journal of Zoology* **85**: 965-972.
- Girard G. (1942). Le comportement de la puce *Synopsyllus fonquerniei* et son rôle dans la transmission de la peste. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique* **35**: 177-181.
- Girard G. & Robic J. (1934). Vaccination contre la peste au moyen d'une souche de bacilles de Yersin vivants, de virulence atténuée. *Bulletin de l'Académie de Médecine* **111**: 939-945.
- Girard J.M., Wagner D.M., Vogler A.J., Keys C., Allender C.J., Drickamer L.C. & Keim P. (2004). Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8408-8413.
- Goldstein D.B. & Schlotterer C. (1999). *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford University Press, New York.
- Goodman S.M. (1995). *Rattus* on Madagascar and the dilemma of protecting the endemic rodent fauna. *Conservation Biology* **9**: 450-453.
- Goodman S.M. & Benstead J.P. (2003). *The natural history of Madagascar*. Chicago and London.
- Grant B.S. (2004). Allelic melanism in American and British peppered moths. *Journal of Heredity* **95**: 97-102.
- Grasman K.A. (2002). Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integrative and Comparative Biology* **42**: 34-42.
- Gratten J., Beraldi D., Lowder B.V., McRae A.F., Visscher P.M., Pemberton J.M. & Slate J. (2007). Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-

Références

- colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**: 619-626.
- Gratten J., Wilson A.J., McRae A.F., Beraldi D., Visscher P.M., Pemberton J.M. & Slate J. (2008). A localized negative genetic correlation constrains microevolution of coat color in wild sheep. *Science* **319**: 318-320.
- Gratz N.G. (1997). The burden of rodent-borne diseases in Africa South of the Sahara. *Belg. J. Zool.* **127**: 71-84.
- Guiyoule A., Rasoamanana B., Buchrieser C., Michel P., Chanteau S. & Carniel E. (1997). Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2826-2833.
- Gunduz I., Auffray J.C., Britton-Davidian J., Catalan J., Ganem G., Ramalhinho M.G., Mathias M.L. & Searle J.B. (2001). Molecular studies on the colonization of the Madeiran archipelago by house mice. *Molecular Ecology* **10**: 2023-2029.
- Gunther E. & Walter L. (2001). The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics* **53**: 520-542.
- Hamblin M.T., Thompson E.E. & Di Rienzo A. (2002). Complex signatures of natural selection at the Duffy blood group locus. *American Journal of Human Genetics* **70**: 369-383.
- Han K.D., Lee J.N., Meyer T.J., Remedios P., Goodwin L. & Batzer M.A. (2008). L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 19366-19371.
- Hansen M.M., Skaala O., Jensen L.F., Bekkevold D. & Mensberg K.L.D. (2007). Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Molecular Ecology* **16**: 1413-1425.
- Hansen T.F. (2006). The evolution of genetic architecture. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **37**: 123-157.
- Hanson D.A., Britten H.B., Restani M. & Washburn L.R. (2007). High prevalence of *Yersinia pestis* in black-tailed prairie dog colonies during an apparent enzootic phase of sylvatic plague. *Conservation Genetics* **8**: 789-795.
- Hasu T., Benesh D.P. & Valtonen E.T. (2009). Differences in parasite susceptibility and costs of resistance between naturally exposed and unexposed host populations. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 699-707.
- Hedrick P.W. (2002). Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* **56**: 1902-1908.
- Hedrick P.W. & Verrelli B.C. (2006). 'Ground truth' for selection on CCR5-Delta 32. *Trends in Genetics* **22**: 293-296.
- Heeney J.L., Dalglish A.G. & Weiss R.A. (2006). Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* **313**: 462-466.
- Herrera C.M. & Bazaga P. (2008). Population-genomic approach reveals adaptive floral divergence in discrete populations of a hawk moth-pollinated violet. *Molecular Ecology* **17**: 5378-5390.
- Hill A.V.S. (1996). Genetics of infectious disease resistance. *Current Opinion in Genetics and Development* **6**: 348-353.
- Hill A.V.S. (2001). The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2**: 373-400.
- Hill W.G. (1974). Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* **33**: 229-239.
- Hingston M., Goodman S.M., Ganzhorn J.U. & Sommer S. (2005). Reconstruction of the colonization of southern Madagascar by introduced *Rattus rattus*. *Journal of Biogeography* **32**: 1549-1559.
- Hinnebusch B.J. (2005). The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. *Current Issues in Molecular Biology* **7**: 197-212.
- Hinnebusch B.J., Fischer E.R. & Schwan T.G. (1998). Evaluation of the role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *Journal of Infectious Diseases* **178**: 1406-1415.

Références

- Hinnebusch B.J., Rosso M.L., Schwan T.G. & Carniel E. (2002). High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. *Molecular Microbiology* **46**: 349-354.
- Hirschhorn J.N. & Daly M.J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* **6**: 95-108.
- Ho S.Y.W. & Larson G. (2006). Molecular clocks: when times are a-changin'. *Trends in Genetics* **22**: 79-83.
- Hoekstra H.E., Hirschmann R.J., Bunday R.A., Insel P.A. & Crossland J.P. (2006). A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science* **313**: 101-104.
- Holderegger R., Herrmann D., Poncet B., Gugerli F., Thuiller W., Taberlet P., Gielly F., Rioux D., Brodbeck S., Aubert S. & Manel S. (2008). Land ahead: using genome scans to identify molecular markers of adaptive relevance. *Plant Ecology and Diversity* **1**: 273-283.
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K. & Akira S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology* **162**: 3749-3752.
- Hu P., Elliott J., McCreedy P., Skowronski E., Garnes J., Kobayashi A., Brubaker R.R. & Garcia E. (1998). Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology* **180**: 5192-5202.
- Hubbert W.T. & Goldenberg M.I. (1970). Natural resistance to plague : genetic basis in the vole (*Microtus californicus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **19**: 1015-1019.
- Huey R.B. (2005) Using invasive species to study evolution: case studies with *Drosophila* and salmon. In: *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*, (Sax D.F., Stachowicz J.J. & Gaines S.D., eds.) pp. 139-164. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hughes A.L. & Yeager M. (1998). Natural selection at Major Histocompatibility Complex loci of Vertebrates. *Annual Review of Genetics* **32**: 415-435.
- Hurles M.E., Sykes B.C., Jobling M.A. & Forster P. (2005). The dual origin of the Malagasy in island Southeast Asia and East Africa: Evidence from maternal and paternal lineages. *American Journal of Human Genetics* **76**: 894-901.
- Hurst L.D. (2009). Genetics and the understanding of selection. *Nature Reviews Genetics* **10**: 83-93.
- Hurt P., Walter L., Sudbrak R., Klages S., Muller I., Shiina T., Inoko H., Lehrach H., Gunther E., Reinhardt R. & Himmelbauer H. (2004). The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Research* **14**: 631-639.
- Hutterer R. & Tranier M. (1990) The immigration of the Asian house shrew (*Suncus murinus*) into Africa and Madagascar. In: *Vertebrates in the tropics*, (Peters G. & Hutterer R., eds.) pp. 309-319. Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Inglesby T.V., Dennis D.T., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Friedlander A.M., Hauer J., Koerner J.F., Layton M., McDade J., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Schoch-Spana M. & Tonat K. (2000). Plague as a biological weapon - Medical and public health management. *Jama-Journal of the American Medical Association* **283**: 2281-2290.
- Ioannidu S., Walter L., Dressel R. & Gunther E. (2001). Physical map and expression profile of genes of the telomeric class I gene region of the rat MHC. *Journal of Immunology* **166**: 3957-3965.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M. & Shlomchik M.J. (2003). *Immunobiologie: le système immunitaire fondamentale et pathologique. 2nde édition*. De Boeck, Paris et Bruxelles.
- Jansa S.A., Goodman S.M. & Tucker P.K. (1999). Molecular phylogeny and biogeography of the native rodents of Madagascar (Muridae : Nesomyinae): A test of the single-origin hypothesis. *Cladistics* **15**: 253-270.
- Jarrett C.O., Deak E., Isherwood K.E., Oyston P.C., Fischer E.R., Whitney A.R., Kobayashi S.D., DeLeo F.R. & Hinnebusch B.J. (2004). Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *Journal of Infectious Diseases* **190**: 783-792.

Références

- Jensen L.F., Hansen M.M., Mensberg K.L. & Loeschcke V. (2008). Spatially and temporally fluctuating selection at non-MHC immune genes: evidence from TAP polymorphism in populations of brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Heredity* **100**: 79-91.
- Jepson A., Banya W., SisayJoof F., HassanKing M., Nunes C., Bennett S. & Whittle H. (1997). Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes to human immune responses to foreign antigens. *Infection and Immunity* **65**: 872-876.
- John J.L. (1994). The avian spleen - a neglected organ. *Quarterly Review of Biology* **69**: 327-351.
- Jolles A.E., Ezenwa V.O., Etienne R.S., Turner W.C. & Olf H. (2008). Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* **89**: 2239-2250.
- Jones H.P., Tershy B.R., Zavaleta E.S., Croll D.A., Keitt B.S., Finkelstein M.E. & Howald G.R. (2008). Severity of the effects of invasive rats on seabirds: A global review. *Conservation Biology* **22**: 16-26.
- Kalbe M. & Kurtz J. (2006). Local differences in immunocompetence reflect resistance of sticklebacks against the eye fluke *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasitology* **132**: 105-116.
- Kauer M.O., Dieringer D. & Schlotterer C. (2003). A microsatellite variability screen for positive selection associated with the "Out of Africa" habitat expansion of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **165**: 1137-1148.
- Keeling M.J. & Gilligan C.A. (2000a). Bubonic plague : a metapopulation model of a zoonosis. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 2219-2230.
- Keeling M.J. & Gilligan C.A. (2000b). Metapopulation dynamics of bubonic plague. *Nature* **407**: 903-906.
- Kiesecker J.M., Skelly D.K., Beard K.H. & Preisser E. (1999). Behavioral reduction of infection risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9165-9168.
- Klein S.L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **24**: 627-638.
- Koechlin J., Guillaumet J.L. & Morat P. (Eds.) (1974) *Flore et végétation de Madagascar*, Vaduz, J. Cramer verlag.
- Kohn M.H., Pelz H.J. & Wayne R.K. (2003). Locus-specific genetic differentiation at Rw among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations. *Genetics* **164**: 1055-1070.
- Kohn M.H. & Pelz J.H. (1999). Genomic assignment of the warfarin resistance locus, Rw, in the rat. *Mammalian Genome* **10**: 696-698.
- Koskinen M.T., Haugen T.O. & Primmer C.R. (2002a). Contemporary fisherian life-history evolution in small salmonid populations. *Nature* **419**: 826-830.
- Koskinen M.T., Knizhin I., Primmer C.R., Schlotterer C. & Weiss S. (2002b). Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Thymallus* spp. (grayling) provides evidence of ice-age mediated environmental perturbations in the world's oldest body of fresh water, Lake Baikal. *Molecular Ecology* **11**: 2599-2611.
- Laakkonen J., Goodman S.M., Duchemin J.-B. & Duplantier J.M. (2003). Trypomastigotes and potential flea vectors of the endemic rodents and the introduced *Rattus rattus* in the rainforests of Madagascar. *Biodiversity and Conservation* **12**: 1775-1783.
- Lafferty K.D. & Gerber L.R. (2002). Good medicine for conservation biology: The intersection of epidemiology and conservation theory. *Conservation Biology* **16**: 593-604.
- Laine A.L. (2004). Resistance variation within and among host populations in a plant-pathogen metapopulation: implications for regional pathogen dynamics. *Journal of Ecology* **92**: 990-1000.
- Landry C. & Bernatchez L. (2001). Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology* **10**: 2525-2539.
- Laudisoit A., Leirs H., Makundi R.H., Van Dongen S., Davis S., Neerinckx S., Deckers J. & Libois R. (2007). Plague and the human flea, Tanzania. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 687-693.

Références

- Lebarbenchon C., Poulin R. & Thomas F. (2007) Parasitisme, biodiversité et biologie de la conservation. In: *Ecologie et évolution des systèmes parasités*, (Thomas F., Guégan J.F. & Renaud F., eds.) pp. De Boeck, Bruxelles.
- Lee C.E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 386-391.
- Lengeling A., Pfeffer K. & Balling R. (2001). The battle of two genomes: genetics of bacterial host/pathogen interactions in mice. *Mammalian Genome* **12**: 261-271.
- Levin B.R., Lipsitch M. & Bonhoeffer S. (1999). Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* **283**: 806-809.
- Lewontin R.C. & Krakauer J. (1973). Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* **74**: 175-195.
- Li B., Guo Y., Guo Z.B., Liang Y., Zhu Z.W., Zhou Q., Yan Y.F., Song Z.Z. & Yang R.F. (2008). Serologic survey of the sentinel animals for plague surveillance and screening for complementary diagnostic markers to F1 antigen by protein microarray. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **79**: 799-802.
- Li B. & Yang R.F. (2008). Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system. *Infection and Immunity* **76**: 1804-1811.
- Libert F., Cochaux P., Beckman G., Samson M., Aksenova M., Cao A., Czeizel A., Claustres M., de la Rua C., Ferrari M., Ferrec C., Glover G., Grinde B., Guran S., Kucinskis V., Lavinha J., Mercier B., Ogur G., Peltonen L., Rosatelli C., Schwartz M., Spitsyn V., Timar L., Beckman L., Parmentier M. & Vassart G. (1998). The Delta ccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics* **7**: 399-406.
- Lilley B., Lammie P., Dickerson J. & Eberhard M. (1997). An increase in hookworm infection temporally associated with ecologic change. *Emerging Infectious Diseases* **3**: 391-393.
- Lim J.K., Glass W.G., McDermott D.H. & Murphy P.M. (2006). CCR5: no longer a 'good for nothing' gene - chemokine control of West Nile virus infection. *Trends in Immunology* **27**: 308-312.
- Lindler L.E., Plano G.V., Burland V., Mayhew G.F. & Blattner F.R. (1998). Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen. *Infection and Immunity* **66**: 5731-5742.
- Lindner I., Torrvellas-Garcia J., Kolonias D., Carlson L.M., Tolba K.A., Plano G.V. & Lee K.P. (2007). Modulation of dendritic cell differentiation and function by YopJ of *Yersinia pestis*. *European Journal of Immunology* **37**: 2450-2462.
- Liszkowski H.D. (2000). Mayotte et les Comores: escale sur la route des Indes aux XVe et XVIIIe siècles. Collection Mémoires.
- Little T.J. & Ebert D. (1999). Associations between parasitism and host genotype in natural populations of *Daphnia* (Crustacea : Cladocera). *Journal of Animal Ecology* **68**: 134-149.
- Lloyd-Smith J.O., Schreiber S.J., Kopp P.E. & Getz W.M. (2005). Superspreading and the effect of individual variation on disease emergence. *Nature* **438**: 355-359.
- Lochmiller R.L. & Deerenberg C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87-98.
- Lockwood J.L., Cassey P. & Blackburn T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 223-228.
- Logiudice K., Duerr S.T.K., Newhouse M.J., Schmidt K.A., Killilea M.E. & Ostfeld R.S. (2008). Impact of host community composition on Lyme disease risk. *Ecology* **89**: 2841-2849.
- LoGiudice K., Ostfeld R.S., Schmidt K.A. & Keesing F. (2003). The ecology of infectious disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 567-571.
- Loiseau A., Rahelinirina S., Rahalison L., Konecny A., Duplantier J.M. & Brouat C. (2008). Isolation and characterization of microsatellites in *Rattus rattus*. *Molecular Ecology Resources* **8**: 916-918.

Références

- Lorange E.A., Race B.L., Sebbane F. & Hinnebusch J. (2005). Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis*. *The Journal of Infectious Diseases* **191**: 1907-12.
- Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S. & Taberlet P. (2003). The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* **4**: 981-994.
- Luikart G., Pilgrim K., Vistry J., Ezenwa V.O. & Schwartz M.K. (2008). Candidate gene microsatellite variation is associated with parasitism in wild bighorn sheep. *Biology Letters* **4**: 228-231.
- Lukaszewski R.A., Kenny D.J., Taylor R., Rees D.G.C., Hartley M.G. & Oyston P.C.F. (2005). Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: Effects on host macrophages and neutrophils. *Infection and Immunity* **73**: 7142-7150.
- Mackay C.R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature Immunology* **2**: 95-101.
- Malo D., Vogan K., Vidal S., Hu J.X., Cellier M., Schurr E., Fuks A., Bumstead N., Morgan K. & Gros P. (1994). Haplotype mapping and sequence-analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**: 51-61.
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. & Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* **25**: 677-686.
- Margolis E. & Levin B.R. (2007) The evolution of bacteria-host interactions: virulence and the immune over-response. In: *Introduction to the evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*, (Baquero J.F.M., Nombela A.C., Cassel G.H. & Gutierrez J.A., eds.). pp. 3-12. ASM Press.
- Marquet S., Abel L., Hillaire D., Dessein H., Kalil J., Feingold J., Weissenbach J. & Dessein A.J. (1996). Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nature Genetics* **14**: 181-184.
- Matisoo-Smith E. & Robins J.H. (2004). Origins and dispersals of Pacific peoples: Evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9167-9172.
- Matisoo-Smith E. & Robins J.H. (2009). Mitochondrial DNA evidence for the spread of Pacific rats through Oceania. *Biological Invasions*: doi 10.1007/s10530-008-9404-1.
- May R.M. & Anderson R.M. (1983). Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **219**: 281-313.
- McCoy K.D., Chapuis E., Tirard C., Bouludier T., Michalakis Y., Le Bohec C., Le Maho Y. & Gauthier-Clerc M. (2005). Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**: 2389-2395.
- McDonald J.H. & Kreitman M. (1991). Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature* **351**: 652-654.
- McKean K.A., Yourth C.P., Lazzaro B.P. & Clark A.G. (2008). The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Mecas J., Franklin G., Kuziel W.A., Brubaker R.R., Falkow S. & Mosier D.E. (2004). CCR5 mutation and plague protection. *Nature* **427**: 606.
- Medel R. (2000). Assessment of parasite-mediated selection in a host-parasite system in plants. *Ecology* **81**: 1554-1564.
- Meerburg B.G., Singleton G. & Kijlstra A. (2009a). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology*: 1-50.
- Meerburg B.G., Singleton G.R. & Leirs H. (2009b). The Year of the Rat ends - time to fight hunger! *Pest Management Science* **65**: 351-352.
- Meyer-Lucht Y. & Sommer S. (2005). MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Molecular Ecology* **14**: 2233-2243.
- Meyer C.L., Vitalis R., Saumitou-Laprade P. & Castric V. (2009). Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Molecular Ecology* **18**: 2050-2062.
- Migliani R., Chanteau S., Rahalison L., Ratsitorahina M., Boutin J.P., Ratsifasoamanana L. & Roux J. (2006). Epidemiological trends for human plague in Madagascar during the second half of the

Références

- 20th century: a survey of 20 900 notified cases. *Tropical Medicine and International Health* **11**: 1228-1237.
- Miller L.H., Mason S.J., Clyde D.F. & McGinniss M.H. (1976). Resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks - Duffy-blood-group genotype, Fy_{fy}. *New England Journal of Medicine* **295**: 302-304.
- Miller M.P. & Vincent E.R. (2008). Rapid natural selection for resistance to an introduced parasite of rainbow trout. *Evolutionary Applications* **1**: 336-341.
- Miller M.R., White A. & Boots M. (2007a). Host life span and the evolution of resistance characteristics. *Evolution* **61**: 2-14.
- Miller N.J., Ciosi M., Sappington T.W., Ratcliffe S.T., Spencer J.L. & Guillemaud T. (2007b). Genome scan of *Diabrotica virgifera virgifera* for genetic variation associated with crop rotation tolerance. *Journal of Applied Entomology* **131**: 378-385.
- Mills J.N. & Childs J.E. (1998). Ecologic studies of rodent reservoirs: Their relevance for human health. *Emerging Infectious Diseases* **4**: 529-537.
- Moller A.P. (1990). Effects of a Hematophagous Mite on the Barn Swallow (*Hirundo rustica*) - a Test of the Hamilton and Zuk Hypothesis. *Evolution* **44**: 771-784.
- Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D. & Lien E. (2006). Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nature Immunology* **7**: 1066-1073.
- Moret Y. & Schmid-Hempel P. (2000). Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**: 1166-1168.
- Musser G.M. & Carleton M.D. (2005) Family Muridae. In: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, (Wilson D.E. & Reeder D.M., eds.). pp. 894-1531. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Musson J.A., Morton M., Walker N., Harper H.M., McNeill H.V., Williamson E.D. & Robinson J.H. (2006). Sequential proteolytic processing of the capsular Caf1 antigen of *Yersinia pestis* for major histocompatibility complex class II-restricted presentation to T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 26129-26135.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B. & Kent J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- Nachman M.W., Hoekstra H.E. & D'Agostino S.L. (2003). The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5268-5273.
- Nair S., Williams J.T., Brockman A., Paiphun L., Mayxay M., Newton P.N., Guthmann J.P., Smithuis F.M., Hien T.T., White N.J., Nosten F. & Anderson T.J.C. (2003). A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in southeast Asian malaria parasites. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 1526-1536.
- Nakajima R. & Brubaker R.R. (1993). Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor. *Infection and Immunity* **61**: 23-31.
- Nei M. & Maruyama T. (1975). Lewontin-Krakauer test for neutral genes - Comment. *Genetics* **80**: 395-395.
- Nei M., Maruyama T. & Chakraborty R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**: 1-10.
- Nesse R.M. & Stearns S.C. (2008). The great opportunity: Evolutionary applications to medicine and public health. *Evolutionary Applications* **1**: 28-48.
- Nichols R.A. (2001). Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 358-364.
- Normark B.H. & Normark S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252**: 91-106.
- Nosil P., Egan S.P. & Funk D.J. (2008). Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: "Isolation by adaptation" and multiple roles for divergent selection. *Evolution* **62**: 316-336.

Références

- Nosil P., Funk D.J. & Ortiz-Barrientos D. (2009). Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**: 375-402.
- Novembre J., Galvani A.P. & Slatkin M. (2005). The geographic spread of the CCR5 Delta 32 HIV-resistance allele. *Plos Biology* **3**: 1954-1962.
- Oetjen K. & Reusch T.B.H. (2007). Genome scans detect consistent divergent selection among subtidal vs. intertidal populations of the marine angiosperm *Zostera marina*. *Molecular Ecology* **16**: 5156-5167.
- Okado K., Shinzawa N., Aonuma H., Nelson B., Fukumoto S., Fujisaki K., Kawazu S. & Kanuka H. (2009). Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **379**: 6-10.
- Oleksiak M.F., Churchill G.A. & Crawford D.L. (2002). Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature Genetics* **32**: 261-266.
- Oliver M.K., Telfer S. & Piertney S.B. (2009). Major histocompatibility complex (MHC) heterozygote superiority to natural multi-parasite infections in the water vole (*Arvicola terrestris*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**: 1119-1128.
- Olivieri I. (2009). Alternative mechanisms of range expansion are associated with different changes of evolutionary potential. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 289-292.
- Opperman M. (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function and regulation. *Cellular signalling* **16**: 1201-1210.
- Orengo D.J. & Aguade M. (2004). Detecting the footprint of positive selection in a European population of *Drosophila melanogaster*: Multilocus pattern of variation and distance to coding regions. *Genetics* **167**: 1759-1766.
- Ostfeld R.S. & Keesing F. (2000). Biodiversity and disease risk: The case of lyme disease. *Conservation Biology* **14**: 722-728.
- Pagès M., Chaval Y., Herbreteau V., Waengsothorn S., Cosson J.F., Hugot J.-P., Morand S. & Michaux J. (en révision). Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *Bmc Evolutionary Biology*.
- Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K. & Smiley S.T. (2006). Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infection and Immunity* **74**: 3381-3386.
- Park S.H., Chan K.-S., Viljugrein H., Nekrassova L., Suleimenov B., Ageyev V.S., Klassovskiy N.L., Pole S.B. & Stenseth N.C. (2007). Statistical analysis of the dynamics of antibody loss to a disease-causing agent: plague in natural populations of great gerbils as an example. *Journal of the Royal Society Interface* **4**: 57-64.
- Parker I.M. & Gilbert G.S. (2004). The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **35**: 675-700.
- Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T.G., Prentice M.B., Sebahia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdano-Tarraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C.F., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S. & Barrell B.G. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**: 523-527.
- Pascal M., Lorvelec O. & Vigne J.-D. (2006). Invasions biologiques et extinctions: 11 000 ans d'histoire des Vertébrés en France. Coédition Belin - Quae, Paris.
- Paterson S., Wilson K. & Pemberton J.M. (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3714-3719.
- Pelz H.J., Rost S., Hunerberg M., Fregin A., Heiberg A.C., Baert K., MacNicoll A.D., Prescott C.V., Walker A.S., Oldenburg J. & Muller C.R. (2005). The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* **170**: 1839-1847.

Références

- Perry R.D. & Fetherston J.D. (1997). *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 35-66.
- Persson J. & Vance R.E. (2007). Genetics-squared: combining host and pathogen genetics in the analysis of innate immunity and bacterial virulence. *Immunogenetics* **59**: 761-778.
- Piertney S.B. & Oliver M.K. (2006). The evolutionary ecology of the Major Histocompatibility Complex. *Heredity* **96**: 7-21.
- Poltorak A., He X.L., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B. & Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-2088.
- Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramisse F. & Vergnaud G. (2004). Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *Bmc Microbiology* **4**.
- Prentice M.B. & Rahalison L. (2007). Plague. *Lancet* **369**: 1196-1207.
- Prentis P.J., Wilson J.R.U., Dormontt E.E., Richardson D.M. & Lowe A.J. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science* **13**: 288-294.
- Prince F.M., Kartman L. & Pratt H.D. (1965). *Plague*. San Francisco.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Prugnolle F., Theron A., Pointier J.P., Jabbour-Zahab R., Jarne P., Durand P. & De Meeus T. (2005a). Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: Consequence for local adaptation. *Evolution* **59**: 296-303.
- Prugnolle F., Manica A., Charpentier M., Guégan J.F., Guernier V. & Balloux F. (2005b). Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology* **15**: 1022-1027.
- Puillandre N., Dupas S., Dangles O., Zeddani J.L., Capdevielle-Dulac C., Barbin K., Torres-Leguizamon M. & Silvain J.F. (2008). Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions* **10**: 319-333.
- Pujol C. & Bliska J.B. (2005). Turning *Yersinia* pathogenesis outside in : subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clinical Immunology* **114**: 216-226.
- Quan S.F. & Kartman L. (1962). Ecological studies of wild rodent plague in the San Francisco Bay area of California. VIII. Susceptibility of wild rodents to experimental plague infection. *Zoonoses Research* **1**: 121-144.
- Quan S.F., Wheeler C.M., Goldenberg M.I. & Kartman L. (1965). The susceptibility of *Rattus* species from two areas of Hawaï to infection with *Pasteurella pestis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **14**: 638-642.
- Quintana-Murci L., Alcais A., Abel L. & Casanova J.L. (2007). Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nature Immunology* **8**: 1165-1171.
- Radimilahy C. (1997) Mahilaka, an eleventh- to fourteenth-century Islamic port: the first impact of urbanism on Madagascar. In: *Natural change and human impact in Madagascar*, (Goodman S.M. & Patterson B.D., eds.). pp. 342-363. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Rahalison L., Ranjalaly M., Duplantier J.-M., Duchemin J.-B., Ravelosaona J., Ratsifasoamanana L. & Chanteau S. (2003) Susceptibility to plague of the rodents in Antananarivo, Madagascar. In: *The genus Yersinia*. pp. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Rahelinirina S. (2009) Le risque pesteux dans les foyers ruraux du Moyen-Ouest malgache: déplacements et structuration des populations de rats noirs de l'échelle de l'habitat à celle du paysage. Thèse de l'Université d'Antananarivo.
- Rahelinirina S. & Duplantier J.M. (1997) Suivi mensuel de la dynamique des populations de rats noirs (*Rattus rattus*) dans les foyers de peste de la région de Mandoto. In: *Rongeurs et lutte Antimurine à Madagascar*. Recueil des exposés lors du Symposium tenu à Antananarivo du 1er au 5 décembre 1997.
- Rakotozafy L.M.A. (1996) Etude de la constitution du régime alimentaire des habitants du site de Mahilaka du XIe au XIVe siècle à partir des produits de fouilles archéologiques. Vol. PhD thesis. pp. University of Antananarivo, Antananarivo.

Références

- Ramanamanjato J.B. & Ganzhorn J.U. (2001). Effects of forest fragmentation, introduced *Rattus rattus* and the role of exotic tree plantations and secondary vegetation for the conservation of an endemic rodent and a small lemur in littoral forests of southeastern Madagascar. *Animal Conservation* **4**: 175-183.
- Rasoamanana B., Leroy F., Boisier P., Rasolomaharo M., Buchy P., Carniel E. & Chanteau S. (1997). Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **4**: 587-591.
- Ratsitorahina M., Chanteau S., Rahalison L., Ratsifasoamanana L. & Boisier P. (2000). Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar. *Lancet* **355**: 111-113.
- Rebeil R., Ernst R.K., Gowen B.B., Miller S.I. & Hinnebusch B.J. (2004). Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. *Molecular Microbiology* **52**: 1363-1373.
- Regoes R.R., Nowak M.A. & Bonhoeffer S. (2000). Evolution of virulence in a heterogeneous host population. *Evolution* **54**: 64-71.
- Rigby M.C., Hechinger R.F. & Stevens L. (2002). Why should parasite resistance be costly? *Trends in Parasitology* **18**: 116-120.
- Robertson A. (1975). Lewontin-Krakauer test for neutral genes - Comment. *Genetics* **80**: 396-396.
- Robins J.H., McLenachan P.A., Phillips M.J., Craig L., Ross H.A. & Matisoo-Smith E. (2008). Dating of divergences within the *Rattus* genus phylogeny using whole mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 460-466.
- Rogers S.M. & Bernatchez L. (2005). Integrating QTL mapping and genome scans towards the characterization of candidate loci under parallel selection in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Molecular Ecology* **14**: 351-361.
- Rolff J. (2002). Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**: 867-872.
- Rollins B.J. (1997). Chemokines. *Blood* **90**: 909-928.
- Rollins L.A., Woolnough A.P. & Sherwin W.B. (2006). Population genetic tools for pest management: a review. *Wildlife Research* **33**: 251-261.
- Roy B.A. & Kirchner J.W. (2000). Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution* **54**: 51-63.
- Sabeti P.C., Walsh E., Schaffner S.F., Vavilys P., Fry B., Hutcheson H.B., Cullen M., Mikkelsen T.S., Roy J., Patterson N., Cooper R., Reich D., Altshuler D., O'Brien S. & Lander E.S. (2005). The case for selection at CCR5-Delta 32. *Plos Biology* **3**: 1963-1969.
- Sadd B.M. & Schmid-Hempel P. (2009). Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications* **2**: 113-121.
- Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyltermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y.J., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G. & Parmentier M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**: 722-725.
- Santucci F., Ibrahim K.M., Bruzzone A. & Hewit G.M. (2007). Selection on MHC-linked microsatellite loci in sheep populations. *Heredity* **99**: 340-348.
- Sax D.F., Stachowicz J.J. & Gaines S.D. (2005). *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*. Inc. publisher, Sunderland, Massachusetts.
- Schlotterer C. (2002). A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps. *Genetics* **160**: 753-763.
- Schlotterer C. (2003). Hitchhiking mapping - functional genomics from the population genetics perspective. *Trends in Genetics* **19**: 32-38.
- Schmid-Hempel P. (2003). Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**: 357-366.
- Schrag S.J. & Wiener P. (1995). Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution ? *Trends in Ecology & Evolution* **10**: 319-324.

Références

- Schroder N.W. & Schumann R.R. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infectious Diseases* **5**: 156-164.
- Schulenburg H., Kurtz J., Moret Y. & Siva-Jothy M.T. (2009). Introduction. Ecological immunology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **364**: 3-14.
- Searle J.B. (2008). The genetics of mammalian invasion: a review. *Wildlife Research* **35**: 185-192.
- Sebastiani G., Olien L., Gauthier S., Skamene E., Morgan K., Gros P. & Malo D. (1998). Mapping of genetic modulators of natural resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in wild-derived mice. *Genomics* **47**: 180-186.
- Sebbane F., Gardner D., Long D., Gowen B.B. & Hinnebusch J. (2005). Kinetics of disease progression and host response in a rat model of bubonic plague. *American Journal of Pathology* **166**: 1427-1439.
- Sebbane F., Jarrett C., Gardner D., Long D. & Hinnebusch B.J. (2009). The *Yersinia pestis* caf1M1A1 fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. *Infection and Immunity* **77**: 1222-1229.
- Sezgin E., Duvernell D.D., Matzkin L.M., Duan Y.H., Zhu C.T., Verrelli B.C. & Eanes W.F. (2004). Single-locus latitudinal clines and their relationship to temperate adaptation in metabolic genes and derived alleles in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **168**: 923-931.
- Sheldon B.C. & Verhulst S. (1996). Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 317-321.
- Shepherd A.J., Hummitzsch D.E., Leman P.A., Swanepoel R. & Searle L.A. (1986a). Comparative tests for detection of plague antigen and antibody in experimentally infected wild rodents. *Journal of Clinical Microbiology* **24**: 1075-1078.
- Shepherd A.J., Leman P.A. & Hummitzsch D.E. (1986b). Experimental plague infection in South-African wild rodents. *Journal of Hygiene* **96**: 171-183.
- Skamene E., Gros P., Forget A., Kongshavn P.A.L., Scharles C. & Taylor B.A. (1982). Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**: 506-509.
- Smith J.A., Wilson K., Pilkington J.G. & Pemberton J.M. (1999). Heritable variation in resistance to gastro-intestinal nematodes in an unmanaged mammal population. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 1283-1290.
- Snowden F.M. (2008). Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. *Immunological Reviews* **225**: 9-26.
- Sommer S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and evolution. *Frontiers in Zoology* **2**: 16.
- Sorci G., Moller A.P. & Boulinier T. (1997). Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **12**: 196-200.
- Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., Scheld W.M., Bartlett J.G. & Edwards J. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 155-164.
- Springer Y.P. (2007). Clinal resistance structure and pathogen local adaptation in a serpentine flax-flax rust interaction. *Evolution* **61**: 1812-1822.
- Stapp P., Salkeld D.J., Eisen R.J., Pappert R., Young J., Carter L.G., Gage K.L., Tripp D.W. & Antolin M.F. (2008). Exposure of small rodents to plague during epizootics in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Diseases* **44**: 724-730.
- Starnbach M.N. & Bevan M.J. (1994). Cells infected with *Yersinia* present an epitope to class I MHC-restricted CTL. *The Journal of Immunology* **153**: 1603-1612.
- Stearns S.C. & Koella J.C. (2008). *Evolution in health and disease. 2nd edition*. Oxford University Press, New York.
- Stenseth N.C., Atshabar B.B., Begon M., Belmain S.R., Bertherat E., Carniel E., Gage K.L., Leirs H. & Rahalison L. (2008). Plague: Past, present, and future. *Plos Medicine* **5**: 9-13.
- Stenseth N.C., Leirs H., Skonhofs A., Davis S.A., Pech R.P., Andreassen H.P., Singleton G.R., Lima M., Machangu R.M., Makundi R.H., Zhang Z., Brown P.B., Shi D. & Wan X. (2003). Mice and

Références

- rats: the dynamics and bio-economics of agricultural rodents pests. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**.
- Stenzel A., Lu T., Koch W.A., Hampe J., Guenther S.M., De La Vega F.M., Krawczak M. & Schreiber S. (2004). Patterns of linkage disequilibrium in the MHC region on human chromosome 6p. *Human Genetics* **114**: 377-385.
- Stephens J.C., Reich D.E., Goldstein D.B., Shin H.D., Smith M.W., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Allikmets R., Schriml L., Gerrard B., Malasky M., Ramos M.D., Morlot S., Tzetis M., Oddoux C., di Giovine F.S., Nasioulas G., Chandler D., Aseev M., Hanson M., Kalaydjieva L., Glavac D., Gasparini P., Kanavakis E., Claustres M., Kambouris M., Ostrer H., Duff G., Baranov V., Sibul H., Metspalu A., Goldman D., Martin N., Duffy D., Schmidtke J., Estivill X., O'Brien S.J. & Dean M. (1998). Dating the origin of the CCR5-Delta 32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics* **62**: 1507-1515.
- Stinchcombe J.R. & Hoekstra H.E. (2008). Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**: 158-170.
- Storz J.F. (2005). Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* **14**: 671-688.
- Storz J.F. & Hoekstra H.E. (2007). The study of adaptation and speciation in the genomic era. *Journal of Mammalogy* **88**: 1-4.
- Styer K.L., Click E.M., Hopkins G.W., Frothingham R. & Aballay A. (2007). Study of the role of CCR5 in a mouse model of intranasal challenge with *Yersinia pestis*. *Microbes and Infection* **9**: 1135-1138.
- Tabor H.K., Risch N.J. & Myers R.M. (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* **3**: 1-7.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- Takahata N. & Nei M. (1990). Allelic genealogy under overdominant and frequency dependent selection and polymorphism of Major Histocompatibility Complex loci. *Genetics* **124**: 967-978.
- Thomas M.A. & Klaper R. (2004). Genomics for the ecological toolbox. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 439-445.
- Thomas R.E., Barnes A.M., Quan T.J., Beard M.L., Carter L.G. & Hopia C.E. (1988). Susceptibility to *Yersinia pestis* in the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *Journal of Wildlife Diseases* **24**: 327-333.
- Thompson J.N. (1998). Rapid evolution as an ecological process. *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 329-332.
- Thursz M.R., Kwiatkowski D., Allsopp C.E.M., Greenwood B.M., Thomas H.C. & Hill A.V.S. (1995). Association between an Mhc Class-II Allele and Clearance of Hepatitis-B Virus in the Gambia. *New England Journal of Medicine* **332**: 1065-1069.
- Titball R.W. & Leary S.E.C. (1998). Plague. *British Medical Bulletin* **54**: 625-633.
- Titball R.W. & Williamson E.D. (2001). Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine* **19**: 4175-4184.
- Tompkins D.M., White A.R. & Boots M. (2003). Ecological replacement of native red squirrels by invasive greys driven by disease. *Ecology Letters* **6**: 189-196.
- Tournamille C., Colin Y., Cartron J.P. & Levankim C. (1995). Disruption of a gata motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene-expression in Duffy negative individuals. *Nature Genetics* **10**: 224-228.
- Towns D.R., Atkinson I.A.E. & Daugherty C.H. (2006). Have the harmful effects of introduced rats on islands been exaggerated? *Biological Invasions* **8**: 863-891.
- Trowsdale J. & Parham P. (2004). Defense strategies and immunity-related genes. *European Journal of Immunology* **34**: 7-17.
- Trudeau K.M., Britten H.B. & Restani M. (2004). Sylvatic plague reduces genetic variability in black-tailed prairie dogs. *Journal of Wildlife Diseases* **40**: 205-211.
- Tung J., Primus A., Bouley A.J., Severson T.F., Alberts S.C. & Wray G.A. (2009). Evolution of a malaria resistance gene in wild primates. *Nature* **460**: 388-U103.

Références

- Turner J.K., McAllister M.M., Xu J.L. & Tapping R.I. (2008). The resistance of BALB/cJ mice to *Yersinia pestis* maps to the Major Histocompatibility Complex of chromosome 17. *Infection and Immunity* **76**: 4092-4099.
- Turner T.L., Hahn M.W. & Nuzhdin S.V. (2005). Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *Plos Biology* **3**: 1572-1578.
- Twigg G.I. (1978). The role of rodents in plague dissemination: a worldwide review. *Mammal Review* **8**: 77-110.
- Vallender E.J. & Lahn B.T. (2004). Positive selection on the human genome. *Human Molecular Genetics* **13**: R245-R254.
- Van Riper C., Van Riper S.G. & Hansen W.R. (2002). Epizootiology and effect of avian pox on Hawaiian forest birds. *Auk* **119**: 929-942.
- Vasemagi A. & Primmer C.R. (2005). Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Molecular Ecology* **14**: 3623-3642.
- Via S. & West J. (2008). The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. *Molecular Ecology* **17**: 4334-4345.
- Vitalis R., Dawson K. & Boursot P. (2001). Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics* **158**: 1811-1823.
- Vitalis R., Dawson K., Boursot P. & Belkhir K. (2003). DetSel 1.0: A computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity* **94**: 429-431.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Wakelin D., Farias S.E. & Bradley J.E. (2002). Variation and immunity to intestinal worms. *Parasitology* **125**: S39-S50.
- Wares J.P., Hughes A.R. & Grosberg R.K. (2005) Mechanisms that drive evolutionary change: Insights from species introductions and invasions. In: *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*, (Sax D.F., Stachowicz J.J. & Gaines S.D., eds.). pp. 229-257. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Webb C.T., Brooks C.P., Gage K.L. & Antolin M.F. (2007). Classical flea-borne transmission does not drive plague epizootics in prairie dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 6236-6241.
- Webster J.P. & Woolhouse M.E.J. (1998). Selection and strain specificity of compatibility between snail intermediate hosts and their parasitic schistosomes. *Evolution* **52**: 1627-1634.
- Webster J.P. & Woolhouse M.E.J. (1999). Cost of resistance: relationship between reduced fertility and increased resistance in a snail-schistosome host-parasite system. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 391-396.
- Wegner K.M., Berenos C. & Schmid-Hempel P. (2008). Nonadditive genetic components in resistance of the red flour beetle *Tribolium castaneum* against parasite infection. *Evolution* **62**: 2381-2392.
- Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F., White D.G., Rosso M.-L., Rasko D.A., Mammel M.K., Eppinger M., Rosovitz M.J., Wagner D.M., Rahalison L., LeClerc J.E., Hinshaw J.M., Lindler L.E., Cebula T.A., Carniel E. & Ravel J. (2007). Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE* **2**: e309.
- Wilding C.S., Butlin R.K. & Grahame J. (2001). Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 611-619.
- Wilfert L. & Schmid-Hempel P. (2008). The genetic architecture of susceptibility to parasites. *Bmc Evolutionary Biology* **8**: 187.
- Williams L.M. & Oleksiak M.F. (2008). Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. *Bmc Evolutionary Biology* **8**: 282.

Références

- Williamson E.D., Flick-Smith H.C., LeButt C., Rowland C.A., Jones S.M., Waters E.L., Gwyther R.J., Miller J., Packer P.J. & Irving M. (2005). Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. *Infection and Immunity* **73**: 3598-3608.
- Wimsatt J. & Biggins D.E. (2009). A review of plague persistence with special emphasis on fleas. *Journal of Vector Borne Diseases* **46**: 85-99.
- Winter C.C., Cherry W.B. & Moody M.D. (1960). An unusual strain of *Pasteurella pestis* isolated from a fatal human case of plague. *Bulletin World Health Organization* **23**: 408-409.
- Wood H.M., Grahame J.W., Humphray S., Rogers J. & Butlin R.K. (2008). Sequence differentiation in regions identified by a genome scan for local adaptation. *Molecular Ecology* **17**: 3123-3135.
- Woolhouse M.E.J. (2002). Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends in Microbiology* **10**: S3-S7.
- Woolhouse M.E.J., Dye C., Etard J.F., Smith T., Charlwood J.D., Garnett G.P., Hagan P., Hii J.L.K., Ndhlovu P.D., Quinnell R.J., Watts C.H., Chandiwana S.K. & Anderson R.M. (1997). Heterogeneities in the transmission of infectious agents: Implications for the design of control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 338-342.
- Woolhouse M.E.J. & Gowtage-Sequeria S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 1842-1847.
- World Health Organisation (2003). Human plague in 2000-2001. *Weekly Epidemiological Record* **78**: 130-135.
- World Health Organisation (2004) Annex Table 2: deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002. Dans *The World Health Report 2004, Changing history*. World Health organisation, Geneva, Switzerland.
- Worley K., Carey J., Veitch A. & Coltman D.W. (2006). Detecting the signature of selection on immune genes in highly structured populations of wild sheep (*Ovis dalli*). *Molecular Ecology* **15**: 623-637.
- Wright H.T. & Rakotoarisoa J.A. (2003) The rise of Malagasy societies: new developments in the archaeology of Madagascar. Dans *The natural history of Madagascar*, (Goodman S.M. & Benstead J.P., eds.). pp. 112-119. University of Chicago Press, Chicago.
- Wu L.J., LaRosa G., Kassam N., Gordon C.J., Heath H., Ruffing N., Chen H., Humblis J., Samson M., Parmentier M., Moore J.P. & Mackay C.R. (1997). Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: Multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *Journal of Experimental Medicine* **186**: 1373-1381.
- Ye Y.X.H., Chenoweth S.F. & McGraw E.A. (2009). Effective but costly, evolved mechanisms of defense against a virulent opportunistic pathogen in *Drosophila melanogaster*. *Plos Pathogens* **5**: e1000385.
- Yoshie O., Imai T. & Nomiya H. (2001) Chemokines in immunity. *Advances in Immunology* **78**: 57-110.
- Zavyalov V., Denesyuk A., Zavyalova G. & Korpela T. (1995). Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis*. *Immunology Letters* **45**: 19-22.
- Zbinden M., Haag C.R. & Ebert D. (2008). Experimental evolution of field populations of *Daphnia magna* in response to parasite treatment. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1068-1078.
- Zhou D.S. & Yang R.F. (2009). Molecular darwinian evolution of virulence in *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity* **77**: 2242-2250.
- Zhou N.M., Luo Z.W., Hall J.W., Luo J.S., Han X.B. & Huang Z.W. (2000). Molecular modeling and site-directed mutagenesis of CCR5 reveal residues critical for chemokine binding and signal transduction. *European Journal of Immunology* **30**: 164-173.
- Zietz B.P. & Dunkelberg H. (2004). The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **207**: 165-178.
- Zuk M. & Stoehr A.M. (2002). Immune defense and host life history. *American Naturalist* **160**: S9-S22.

ANNEXES

Annexe A1 Liste des micromammifères présents à Madagascar

D'après Goodman S.M. & Benstead J.P. (2003).

Les espèces indiquées par un astérisque sont des espèces introduites.

Rodentia

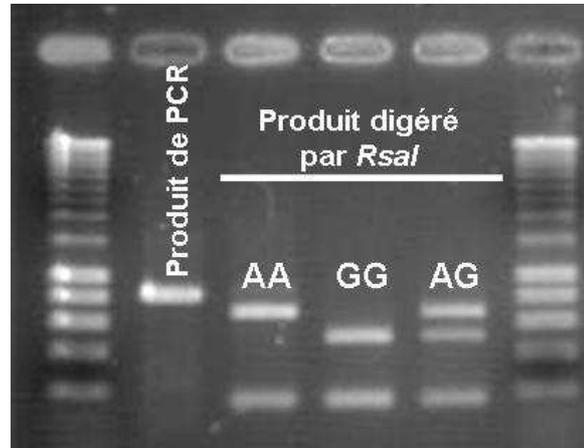
Muridae	Murinae	<i>Mus musculus</i> *
		<i>Rattus rattus</i> *
		<i>Rattus norvegicus</i> *
	Nesomyinae	<i>Brachytarsomys albicauda</i>
		<i>Brachytarsomys villosa</i>
		<i>Brachytarsomys betsileoensis</i>
		<i>Brachytarsomys ramirohitra</i>
		<i>Eliurus ellemani</i>
		<i>Eliurus grandidieri</i>
		<i>Eliurus majori</i>
		<i>Eliurus minor</i>
		<i>Eliurus myoxinus</i>
		<i>Eliurus penicillatus</i>
		<i>Eliurus petteri</i>
		<i>Eliurus tanala</i>
		<i>Eliurus webbi</i>
		<i>Gymnuromys roberti</i>
		<i>Hypogeomys antimena</i>
		<i>Macrotarsomys bastardi</i>
		<i>Macrotarsomys ingens</i>
		<i>Monticolomys koopmani</i>
		<i>Nesomys audeberti</i>
		<i>Nesomys lambertoni</i>
		<i>Nesomys rufus</i>
		<i>Voalavo gymnocaudus</i>

Liopotyphla

Tenrecidae	Geogalinae	<i>Geogale aurita</i>
	Oryzorictinae	<i>Limnogale mergulus</i>
		<i>Microgale brevicaudata</i>
		<i>Microgale cowani</i>
		<i>Microgale dobsoni</i>
		<i>Microgale drouhardi</i>
		<i>Microgale dryas</i>
		<i>Microgale fotsifotsy</i>
		<i>Microgale gracilis</i>
		<i>Microgale gymnorhyncha</i>
		<i>Microgale longicaudata</i>
		<i>Microgale monticola</i>
		<i>Microgale nasoloi</i>
		<i>Microgale parvula</i>
		<i>Microgale principula</i>
		<i>Microgale pusilla</i>
		<i>Microgale soricoides</i>
		<i>Microgale taiva</i>
		<i>Microgale talazaci</i>
	<i>Microgale thomasi</i>	
	<i>Oryzorictes hova</i>	
	<i>Oryzorictes tetradactylus</i>	
	Tenrecinae	<i>Echinops telfairi</i>
		<i>Hemicentetes semispinosus</i>
		<i>Hemicentetes nigriceps</i>
<i>Setifer setosus</i>		
<i>Tenrec ecaudatus</i>		
Soricidae	Crocidurinae	<i>Suncus madagascariensis</i>
		<i>Suncus murinus</i> *

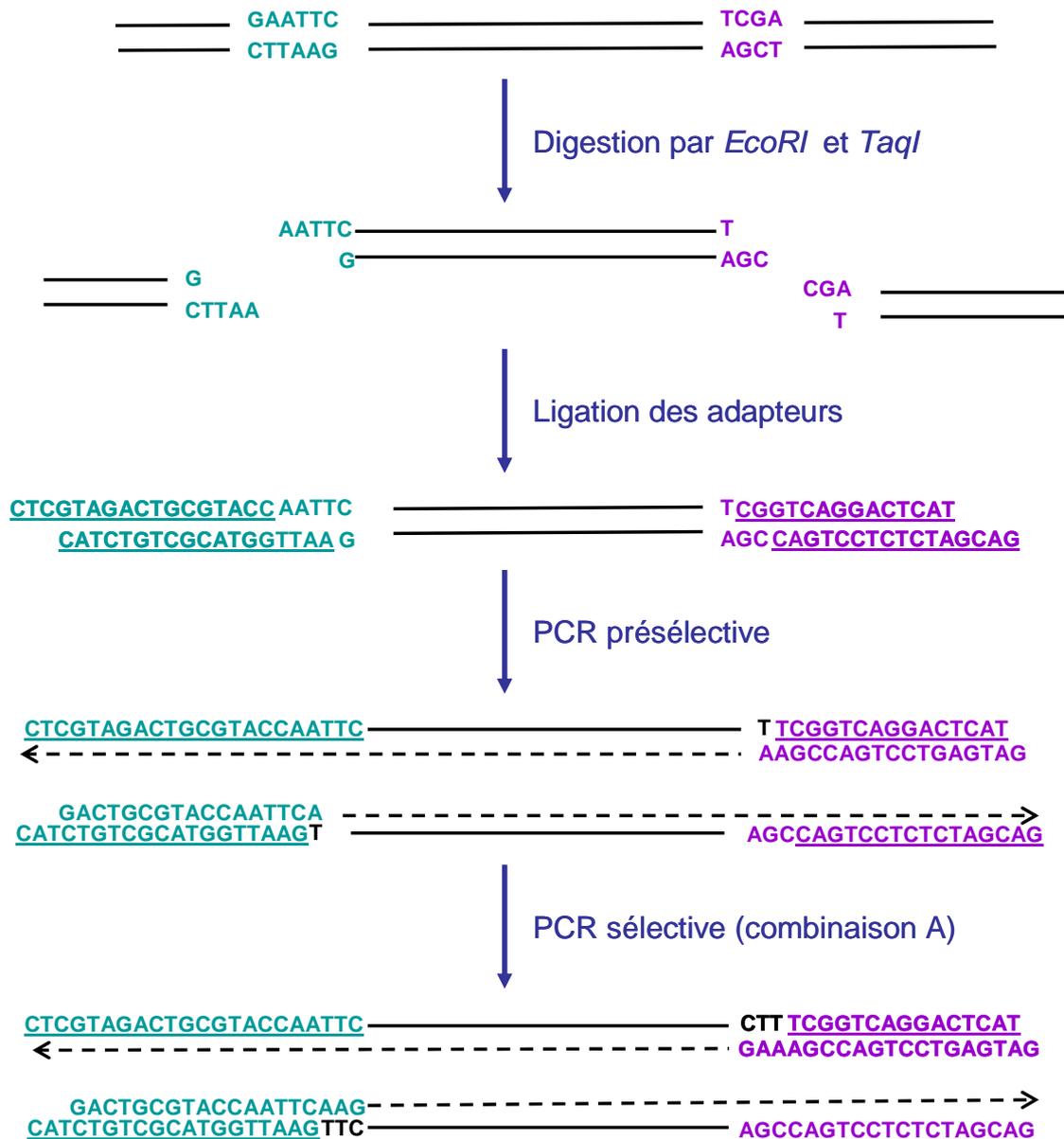
Annexe A2 Méthode de génotypage utilisée pour distinguer les deux allèles du gène *Ccr5*.

Ce gel d'agarose présente le produit de PCR du gène *Ccr5*, ainsi que le résultat de la digestion par *RsaI*, une enzyme de restriction spécifique de la substitution (l'allèle A présente un seul site de restriction et donc deux fragments ; tandis que l'allèle G en présente deux, et donc trois fragments, dont deux sont confondus sur le gel). Le résultat de la restriction est représenté pour trois individus présentant des génotypes différents.



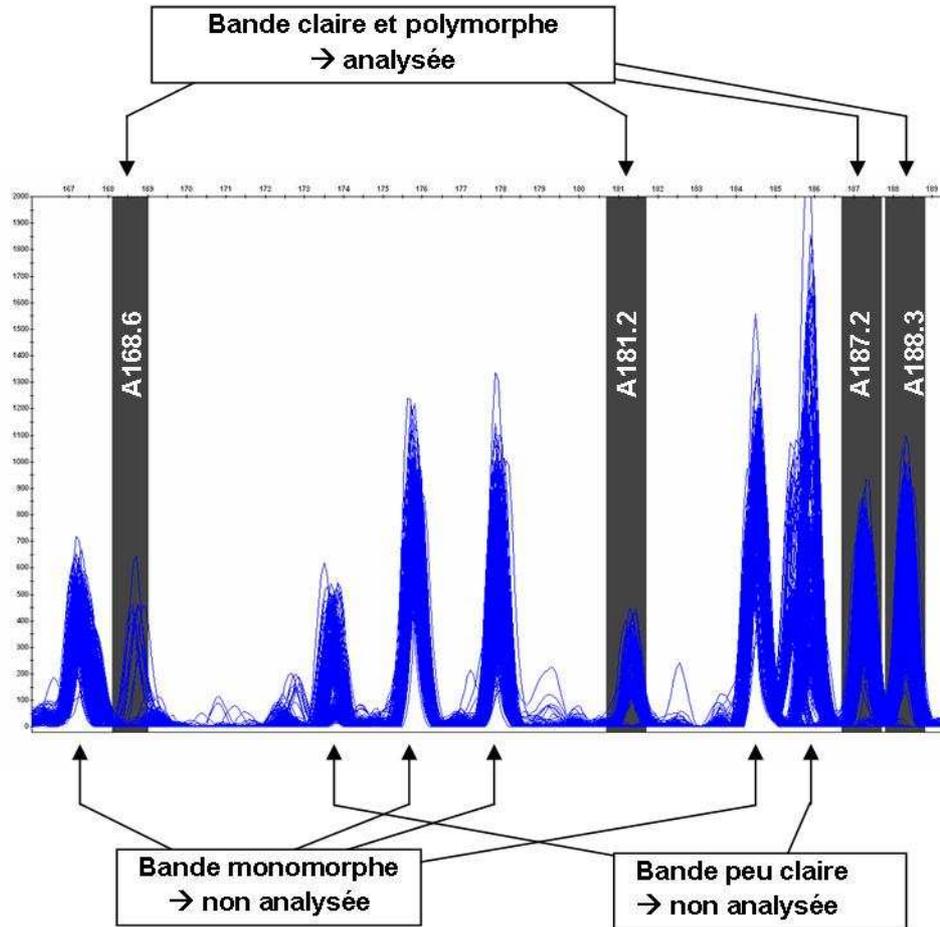
Annexe A3 Principe du protocole utilisé pour l'obtention des marqueurs AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Cette méthode permet d'obtenir des marqueurs anonymes (position inconnue dans le génome) et dominants (présence / absence du fragment). Un seul couple d'enzymes (*EcoRI* et *TaqI*) a été utilisé dans notre cas mais 10 combinaisons d'amorces sélectives (ici, la combinaison A), dont chacune permet d'obtenir un jeu de marqueurs génétiques différents.



Annexe A4 Illustration de la méthode de choix des marqueurs AFLP lors de la lecture.

La figure présente le résultat de la superposition des électrophorogrammes pour l'ensemble des individus analysés et pour la combinaison d'amorces A. Quatre marqueurs ont ici été choisis car les profils étaient clairs et polymorphes.



Annexe A5 Protocole d'isolation et de séquençage des marqueurs AFLP

Amplification et précipitation

Des individus sont été sélectionnés en fonction de leur clarté de leur profil AFLP à proximité du locus considéré. La PCR sélective pour la combinaison d'amorces correspondante est réalisée six fois. Les six produits de PCR de chaque individu sont mélangés. On ajoute 8 μ L d'acétate de sodium à 1.5M et 200 μ L d'isopropanol froid. Après centrifugation (15 minutes à 12 000 tours/minute), le surnageant est vidé. On ajoute ensuite 400 μ L d'éthanol à 70° froid et centrifuge la solution obtenue (15 minutes à 12 000 tours/minute). Le surnageant est vidé et séché. Les produits sont finalement repris dans 13.5 μ L d'eau.

Migration sur gel d'acrylamide

3 μ L des produits de PCR précipités sont déposés sur un gel à 6% d'acrylamide-urée. La durée de la migration est ajustée en fonction de la taille du fragment étudié. Les bandes sont visualisées grâce au fluorochrome des amorces E-AXX sur un laser FMBIO II Multi-View (Hitachi). La bande repérée est excisée sur le gel à l'aide d'un scalpel.

Ré-amplification et séquençage

Le produit excisé est dilué 1/50^{ème}. Une PCR est ensuite réalisée avec 5 μ L de produit dilué, 2.5 μ L de tampon, 1.5 μ L de dNTP, 0.8 μ L de chaque amorce (E-AAG et T-AGA), 0.2 μ L de Taq Qiagen et 13.3 μ L d'eau. Après une dénaturation de 15minutes à 95°C, 38 cycles comprenant 15 secondes de dénaturation à 94°C, 15secondes d'hybridation à 56°C et 30 secondes d'élongation à 72°C sont réalisés suivis d'une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Ces produits de PCR sont purifiés par ExoSap puis séquencés.

Annexe A6 Protocole de génotypage des microsatellites liés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Les amorces utilisées pour l'amplification des six loci liés au CMH sont les suivantes :

locus		amorces
TNF	TNF-RR_F	5'-ACATAGGCATGGTGTCTCTG-3'
	TNF-RR_R	5'-CAGGATTCTGTGGCAATCTG-3'
RT1N1	RT1N1-RR_F	5'-TCTCGTGAATAGGCAGA-3'
	RT1N1-RR_R	5'-TGGCTGCCTAGAACTCACT-3'
D20Rat41	D20Rat41-RR_FA	5'-AGTYCTTTCTGGYCTCCAT -3'
	D20Rat41-RR_RA	5'- TGGGACGATGTGTCATATCC -3'
D20Rat21	D20Rat21_F2	5'-CTGTGCTATGGCAGGAGATT-3'
	D20Rat21_R2	5'-GCCATCTTCAGCACTACAGG-3'
D20Img2	D20Img2_F	5'-CTGAGCTCCCTAGGACCTACAT-3'
	D20Img2_R	5'-TCTCTTGTGTCAGGCTAATTAC-3'
D20Rhw1	D20Rhw1_F	5'- AAGTGGCAGGTCTCATTCTCA -3'
	D20Rhw1_R	5'- GAAAAGACAACCATTACCAAATCA- 3'

Deux PCR sont nécessaires pour amplifier correctement les six loci : l'une (PCR1) avec les loci TNF et RT1N1 et l'autre (PCR2) avec D20Rat41, D20Rat21, D20Img2 et D20Rhw1. Chacune de ces PCR est réalisée dans un volume final de 10µL contenant : 0.2µL de chaque amorce, 5µL de Premix multiplex (Qiagen) et enfin 2µL d'ADN pour la PCR1 et 1µL d'ADN pour la PCR2. Le même programme est utilisé pour les deux PCR. Il comprend une étape de dénaturation initiale de 15min à 95°C, suivie de 35 cycles de dénaturation (30s à 94°C), hybridation (1min30 à 60°C) et élongation (1 min à 72°C) et enfin une extension finale de 30 min à 60°C.

Les produits des deux PCR sont dilués et mélangés en ajoutant 40µL d'eau à 10µL de produit de PCR1 dilué 1/10^{ème} et 20µL de PCR2 dilué 1/10^{ème}. Ensuite, 2µL de cette solution sont mélangés avec 18µL de formamide et 0.1µL de marqueur de taille ILS600 (Promega). Les fragments sont dénaturés par chauffage 5 minutes à 95°C. La migration des fragments est réalisée sur un séquenceur ABI Prism 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) et la lecture des génotypes en utilisant le logiciel GeneMapper (Applied Biosystems).

ARTICLES

Article I

Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar

C. Tollenaere, C. Brouat, J.-M. Duplantier, L. Rahalison, S. Rahelinirina, M. Pascal, H. Moné, G. Mouahid, H. Leirs and J.-F. Cosson

Sous presse dans *Journal of Biogeography*



Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar

Charlotte Tollenaere^{1*}, Carine Brouat¹, Jean-Marc Duplantier¹, Lila Rahalison², Soanandrasana Rahelinirina², Michel Pascal³, Hélène Mon e⁴, Gabriel Mouahid⁴, Herwig Leirs⁵ and Jean-François Cosson¹

¹IRD, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/ Montpellier SupAgro), Campus International de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France, ²Institut Pasteur de Madagascar (IPM), Unité Peste, BP1274, Ambatofotsikely, 101 Antananarivo, Madagascar, ³INRA, UMR ESE, Campus de Beaulieu, Bât. 16, 35 000 Rennes, ⁴UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD Biologie et écologie Tropicale et M diterran enne, Université de Perpignan, Via Domitia, 52, Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France, ⁵Departement of Biology, Universiteit Antwerpen, Groenenborgerlaan 171, B-2020 Antwerpen, Belgium

ABSTRACT

Aim To describe the phylogeographic patterns of the black rat, *Rattus rattus*, from islands in the western Indian Ocean where the species has been introduced (Madagascar and the neighbouring islands of Réunion, Mayotte and Grande Comore), in comparison with the postulated source area (India).

Location Western Indian Ocean: India, Arabian Peninsula, East Africa and the islands of Madagascar, Réunion, Grande Comore and Mayotte.

Methods Mitochondrial DNA (cytochrome *b*, tRNA and D-loop, 1762 bp) was sequenced for 71 individuals from 11 countries in the western Indian Ocean. A partial D-loop (419 bp) was also sequenced for eight populations from Madagascar (97 individuals), which were analysed in addition to six previously published populations from southern Madagascar.

Results Haplotypes from India and the Arabian Peninsula occupied a basal position in the phylogenetic tree, whereas those from islands were distributed in different monophyletic clusters: Madagascar grouped with Mayotte, while Réunion and Grand Comore were present in two other separate groups. The only exception was one individual from Madagascar (out of 190) carrying a haplotype that clustered with those from Réunion and South Africa. ‘Isolation with migration’ simulations favoured a model with no recurrent migration between Oman and Madagascar. Mismatch distribution analyses dated the expansion of Malagasy populations on a time-scale compatible with human colonization history. Higher haplotype diversity and older expansion times were found on the east coast of Madagascar compared with the central highlands.

Main conclusions Phylogeographic patterns supported the hypothesis of human-mediated colonization of *R. rattus* from source populations in either the native area (India) or anciently colonized regions (the Arabian Peninsula) to islands of the western Indian Ocean. Despite their proximity, each island has a distinct colonization history. Independent colonization events may have occurred simultaneously in Madagascar and Grande Comore, whereas Mayotte would have been colonized from Madagascar. Réunion was colonized independently, presumably from Europe. Malagasy populations may have originated from a single successful colonization event, followed by rapid expansion, first in coastal zones and then in the central highlands. The congruence of the observed phylogeographic pattern with human colonization events and pathways supports the potential relevance of the black rat in tracing human history.

Keywords

Commensal rodent, invasive species, island colonization, Madagascar, mitochondrial DNA, phylogeography, *Rattus rattus*.

*Correspondence: C. Tollenaere, CBGP – Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34 988 Montferrier/Lez, France. E-mail: tollenaere@supagro.inra.fr

INTRODUCTION

Commensal small mammals, such as rats and mice, generally expand their distributions in association with humans, especially in the case of islands. For this reason, studying their colonization patterns can provide insight into human expansion history, as shown by the genetic analysis of *Rattus exulans* in Southeast Asia and the Pacific islands (reviewed in Matisoo-Smith & Robins, 2009) or of the house mouse in Europe (Gunduz *et al.*, 2001; Britton-Davidian *et al.*, 2007; Searle *et al.*, 2008). Colonization pathways, areas of origin and/or the time frame of introduction events can be inferred from genetic studies of invasive species through phylogeographic methods (Avise, 2000). New genetic methodologies applied to rats and mice can thus add to the archaeological toolbox and provide historical insights into human migrations (Searle, 2008).

Madagascar was probably first settled by Indonesian people and the Malagasy human population results from an admixture of African and Indonesian ancestors (Hurles *et al.*, 2005). Various pieces of evidence date the earliest human presence in Madagascar to about 2300 yr BP (Burney *et al.*, 2004), possibly in the south-west portion of the island; however, this early human occupation was probably sparse. Subsequent waves of immigration resulted in large human populations throughout the island about 1000 years ago (10th century AD; Burney *et al.*, 2004), with the establishment of settlements along several parts of the Malagasy coast (Wright & Rakotoarisoa, 2003). At that time, the entire Indian Ocean was a vast trading network, connecting societies between China and the Mediterranean. Arab traders (mainly from Oman) travelled from the Arabian Peninsula along the African coast towards the Comoros islands and Madagascar (Allibert, 1988; Liszkowski, 2000). This relatively well-known human history provides an opportunity to validate the approach of studying the colonization patterns of commensal small mammals as a proxy for human history.

In Madagascar, four commensal small mammals were introduced and now largely dominate small mammal communities in rural and urban regions (Goodman *et al.*, 2003): the black (*Rattus rattus*) and Norway (*Rattus norvegicus*) rats, the house mouse (*Mus musculus*) and the house shrew (*Suncus murinus*). A few studies have investigated the history of commensal small mammal colonization of Madagascar. Hutterer & Tranier (1990) suggested that the house shrew was carried by Arab traders from India to East Africa and Madagascar, and Duplantier *et al.* (2002) showed that house mice from Madagascar were genetically close to populations found in Yemen. In the Malagasy central highlands, the black rat (*R. rattus*) represents more than 95% of rodent captures in fields and inside houses (Duplantier & Rakotondravy, 1999). This species has overrun Madagascar (Goodman, 1995) and occurs in practically all habitats (Duplantier & Duchemin, 2003). The black rat thus appears to be a particularly relevant species for studying historical colonization processes in Madagascar.

Moreover, as in other parts of the world, especially islands (Townsend *et al.*, 2006; Harris, 2009), the black rat is strongly implicated in ecosystem damage (Lever, 1994; Jones *et al.*, 2008) and serious agricultural and health problems (Gratz, 1997) in Madagascar (Duplantier & Rakotondravy, 1999). Several studies (Goodman, 1995; Ganzhorn *et al.*, 2003; but see Ramanamanjato & Ganzhorn, 2001; Ganzhorn, 2003) suggest an important impact of the black rat on Malagasy endemic rodents and small lemurs. It is the main reservoir of plague (Brygoo, 1966; Duplantier *et al.*, 2005), a disease which in Madagascar accounted for 41% of the world's reported cases in 2000–01 (World Health Organization, 2003). Improving genetic knowledge of this pest species may thus also have conservation and health implications. However, and despite its world-wide distribution, *R. rattus* invasions have been infrequently studied using genetic methods (but see Abdelkrim *et al.*, 2005; Hingston *et al.*, 2005).

The genus *Rattus* originated in Southeast Asia and the black rat, *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758), is native to the Indian Peninsula and has since been introduced world-wide (Musser & Carleton, 2005). *Rattus rattus* appears to have many close relatives (Aplin *et al.*, 1996; Musser & Carleton, 2005). It can be distinguished from its sister species *Rattus tanezumii* (Temminck, 1844), restricted to the south and east of Asia, by cytological studies (*R. rattus*: $2n = 38$ whereas *R. tanezumii* $2n = 42$; Baverstock *et al.*, 1983). An earlier investigation of the karyotype of Malagasy rats identified only the $2n = 38$ form (Duplantier *et al.*, 2003). Hingston *et al.* (2005) provided the first genetic investigation of the colonization of Madagascar by *R. rattus*. Their results were consistent with an Indian origin of southern Malagasy populations, but the absence of samples from East Africa, the Arabian Peninsula and northern Madagascar prevented them from confirming this hypothesis.

The specific objectives of this study are to describe the phylogeographic patterns of the black rat in the western Indian Ocean using mitochondrial sequence data. We predicted that the migration patterns would match what has been proposed for the house mouse and the house shrew (see above): colonization of East Africa and of the islands of the Indian Ocean (Madagascar, Mayotte and Grande Comore) from India through the Arabian Peninsula (Fig. 1). Thus, we expected India (source populations) and, to a lesser extent, the Arabian Peninsula (an old settlement) to present basal and diverse haplotypes, while recently (the past few thousand years) introduced populations (on islands and, to a lesser extent, in East Africa) would be genetically less diverse. In particular, we addressed the issue of the origin and timing of the arrival of *R. rattus* in Madagascar. To this end, we extended the sampling of Hingston *et al.* (2005) in southern Madagascar by adding new populations in the central and northern parts of the island, as well as samples from neighbouring countries and islands. Colonization of the central highlands of Madagascar was expected to be more recent than that of the coastal areas, as human settlement is thought to have first occurred on the coasts and subsequently in the highlands (Wright & Rakotoarisoa, 2003).

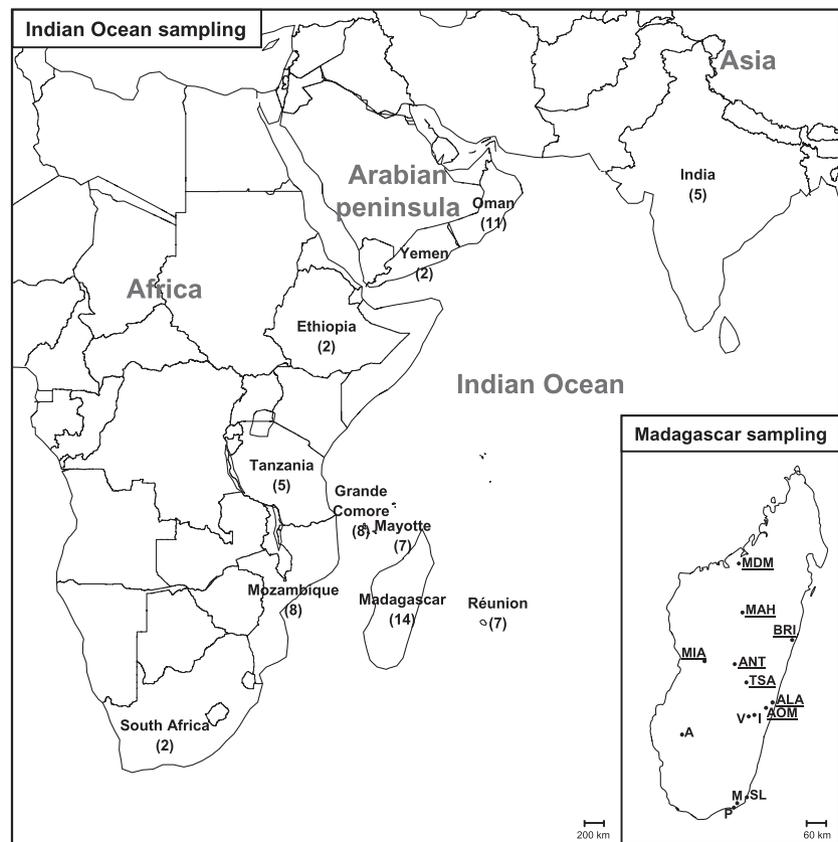


Figure 1 Map showing the countries and islands of the western Indian Ocean relevant to this study. Sample sizes of *Rattus rattus* analysed for the Indian Ocean scale and the mitochondrial DNA sequence (1762 bp) are indicated in brackets. For Madagascar (see inset), the localities of all populations sampled (D-loop sequence, 419 bp) are shown, including those studied by Hingston *et al.* (2005) (A, Anavelona; I, Ioranjatsy; M, Mandena; P, Petricky; SL, Ste Luce; V, Vinantelo) and those sampled in this study (underlined: ALA, Ambalatenona; ANT, Antahobe; AOM, Ambohimiariana; BRI, Brickaville; MAH, Mahatsinjo; MDM, Madiomangana; MIA, Miandrivazo; TSA, Tsarasambo).

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Black rat samples were organized into two datasets in order to investigate colonization patterns at two geographic scales: Madagascar and the Indian Ocean. In Madagascar, 97 black rats were collected by live trapping in various localities (12–13 rats per locality) that were widely distributed across the island (Fig. 1). Data from Hingston *et al.* (2005) comprising 93 other individuals from six populations from the south of Madagascar were included in some of our analyses (190 individuals total) (Fig. 1). Samples from outside of Madagascar (2–11 individuals from each country or island) were collected through different collaborations (Fig. 1). They were added to 14 individuals of the 97 sampled in Madagascar to constitute the Indian Ocean scale dataset (71 individuals).

Laboratory procedures

DNA was isolated from ethanol-preserved tissues (ear or tail) using the DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions; 100 μ L of buffer was used for the final elution.

For the 71 individuals of the Indian Ocean analyses, complete cytochrome *b* (*cyt b*) was amplified using primers L14723 (5'-ACC AAT GAC ATG AAA AAT CAT CGT T-3') and H15915 (5'-TCT CCA TTT CTG GTT TAC AAG AC-3').

Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a 25 μ L total volume containing: 2 μ L of extracted DNA, 1 μ M of each primer, 100 μ M of deoxyribonucleotides (dNTPs), and 0.1 U of *Taq* polymerase in the appropriate 1 \times Buffer (Qiagen). Samples were subjected to an initial denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 92 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 58 $^{\circ}$ C for 45 s, and extension at 72 $^{\circ}$ C for 1 min, with a final extension phase at 72 $^{\circ}$ C for 10 min.

For all individuals used in this study, 758 bp of the 3'-adjoining region of the *cyt b* comprising two tRNA (tRNA-Thr and tRNA-Pro) and a partial D-loop region were amplified. This sequence contained the 419-bp sequence analysed by Hingston *et al.* (2005). The forward primer (5'-GGC CAA CTA GCA TCC ATC AG-3'), located 92 bp before the end of the *cyt b* gene was designed from a Malagasy *R. rattus* *cyt b* sequence. The reverse primer (5'-GAC GGC TAT GTT GAG GAA GG-3') was designed from a GenBank *R. norvegicus* mitochondrial sequence (accession number AB211039). This region was amplified using the same PCR conditions as for the *cyt b*.

The PCR were purified using ExoSAP® Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Sequencing was performed by Genoscreen (Lille, France) or Macrogen (Seoul, Korea).

Sequence alignment

Sequences were aligned using the multiple alignment algorithm implemented in CLUSTALW and further checked by eye.

At the Indian Ocean scale, both amplified loci were combined, resulting in a mitochondrial (mtDNA) sequence 1762 bp long, with 1103 bp corresponding to the *cyt b*, 138 bp to the tRNAs and 521 bp to the D-loop. At the Madagascar scale, the same 419-bp D-loop region (D-loop) as in Hingston *et al.* (2005) was analysed.

As outgroups, we used a sequence of *R. norvegicus* from GenBank (accession number X14848) and sequences from *R. tanezumi*, *Rattus losea* and *R. exulans* from Thailand (M. Pagès *et al.*, INRA-CBGP, France, submitted).

We compared our mtDNA haplotypes (1762 bp) with previously published sequences: (1) homologous sequences of the whole mitochondrial sequence (16,305 bp, GenBank accession number EU273707) of one *R. rattus* from New Zealand (Robins *et al.*, 2008); (2) homologous sequences (1762 bp GenBank FJ897498–FJ897501) from three black rats sampled in Guadeloupe and two in Senegal; (3) 713 bp of the *cyt b* sequences and 550 bp of the D-loop sequences from five *R. rattus* samples from the islands of Oceania (New Zealand, Society, Samoa, Papua New Guinea) (GenBank EF186354–EF186360 and EF186469–EF186375) published by Robins *et al.* (2007); and (4) the 419-bp D-loop haplotype (GenBank DQ009794) named HaMI (Hingston *et al.*, 2005) found in samples originating from France (Lavezzi Islands and Ouessant Island), Great Britain (Lundy Island) and French Polynesia (Raïatéa and Tahiti). Hingston *et al.* (2005) noted that the HaMI haplotype has within it a 288-bp region identical to one sequence (GenBank U13754) from New York (Usdin *et al.*, 1995).

Indian Ocean scale analyses

All the analyses were performed on the mtDNA dataset (1762 bp). We estimated nucleotide diversity (π , Nei, 1987) and its standard deviation (Tajima, 1993) for each of three partitions using the DNASP 4.0 program (Rozas *et al.*, 2003). No polymorphism was found within *R. rattus* samples in the tRNAs. Partitioned analyses (Bayesian phylogenetic reconstruction) were thus performed on the *cyt b* and the D-loop only (1624 bp) whereas global analyses [network construction and 'isolation with migration' (IM) simulations] were carried out on the 1762-bp mtDNA dataset. We performed Bayesian analyses to estimate phylogenetic relationships between haplotypes. First, we used MRAIC version 1.4.3 (Nylander, 2004) to determine the most suitable model of DNA substitution among 24 possible models. To this end we applied the corrected Akaike information criterion to each of the two partitions (*cyt b* and D-loop). The selected models of DNA evolution were the GTR model (Rodriguez *et al.*, 1990) with a proportion of invariant sites for the *cyt b*, and the HKY model (Hasegawa *et al.*, 1985) with a gamma distribution for the D-loop. The D-loop region alignment contained 13 gaps (among which six were polymorphic within *R. rattus* samples), and we added this information to our dataset by coding gaps as binary data, as recommended by the MRBAYES manual. MRBAYES version 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) was then run

partitioning the dataset into three: *cyt b*, D-loop and gaps. For the *cyt b* and the D-loop, we applied the models selected by MRAIC. Each partition had its own set of parameters and we allowed partitions to evolve under different rates. We computed 10 million iterations (generations), four chains, and a burn-in of one million (10%) generated trees.

A haplotypes network (an appropriate method for intra-specific data; Posada & Crandall, 2001) was constructed using the median-joining method available in the NETWORK version 4.1.1.2 software (<http://www.fluxus-engineering.com/>, Bandelt *et al.*, 1999).

An IM program (Hey & Nielsen, 2004) was used to infer divergence time and migration rates between population pairs. Because *R. rattus* from Madagascar and Grande Comore are thought to originate from Oman (see above), we performed these analyses between Madagascar and Oman and between Grande Comore and Oman. We introduced the splitting parameter (s ; Hey, 2005), which is the proportion of the ancestral population that contributed to Madagascar's or Grande Comore's population, respectively. The inheritance scalar was set to 0.25, and the model of evolution was set to HKY, as recommended for mitochondrial DNA (IM manual). To assess convergence, we checked effective sample sizes throughout the run and compared results between three independent runs. The burn-in period was set to 100,000 iterations. The first run of the IM program used parameter values recommended by Hey & Nielsen (2004) for priors of upper bounds of divergence time (t), migration rates (m_1 and m_2), and population sizes (θ_a , θ_1 and θ_2) parameters. In the final runs of divergence between Oman and Madagascar, priors were set to 6 for t , 2 for m , 300 for θ_a and 1000 for θ_1 and θ_2 . For the divergence between Oman and Grande Comore, they were the same except for t , the upper bound of which was set to 12. Because development to sexual maturity takes about 4 months and reproduction stops (outdoors) or decreases (in houses) during the winter (J.-M. Duplantier, unpublished observations), the generation time of the black rat was estimated at 6 months. The mutation rate (μ_1) was inferred from the genetic distance (ML-dist: maximum-likelihood distance estimated considering the HKY model using PAUP* software; Swofford, 2000) between *R. rattus* and *R. tanezumi*, assuming a divergence time (T) of 450,000 years (Robins *et al.*, 2008) and using the formula $\mu_1 = (\text{ML-dist} \times \text{sequence length})/2T$. This mutation rate was used to convert IM parameters into demographic estimates following Hey & Nielsen (2004). The effective size of the founder population of each island population (n_F) was then estimated from the effective size of the ancestral population (N_a) and the splitting parameter using the formula $n_F = (1 - s)N_a$ (Hey, 2005).

Madagascar-scale analyses

For Madagascar-scale analyses, we aligned our dataset with six populations from the south of the island that were published by Hingston *et al.* (2005). Analyses were thus performed on the 419-bp D-loop sequence (corresponding to the region used

in Hingston *et al.*, 2005). A network was computed for these Malagasy D-loop haplotypes (using the same method as for the Indian Ocean scale analyses).

Haplotype (h) and nucleotide (π) diversities (Nei, 1987) and their standard deviations (Tajima, 1993) were estimated for each population using the DNASP 4.0 program (Rozas *et al.*, 2003). We tested the hypothesis that *R. rattus* diversity was higher in the coastal areas than in the highlands by computing correlations (Spearman's rank) between haplotype diversity and minimum distance to the sea (calculated as the straight line distance to the coast line using Spatial Analyst in ARCMAP 8.2, <http://www.esri.com/>).

Demographic analyses were performed using DNASP to test for recent (on an evolutionary time-scale) expansion in each population and in the complete Malagasy dataset. F_S (Fu, 1997) and R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) statistics were estimated. For populations having experienced a recent demographic change (at least one of these two tests were significant), we performed pairwise mismatch distribution analysis (Rogers & Harpending, 1992) to estimate the 'growth-decline' model parameter Tau (mode of the curve, Rogers & Harpending, 1992). This parameter allows the estimation

of the expansion time using the formula: T (in years) = $(Tau \times \text{generation time} \times 1,000,000) / (2\mu_2 \times \text{sequence length})$. The generation time of black rats was estimated to be 6 months (see above). The parameter μ_2 is the mutation rate per million years and was inferred from the genetic distance (uncorrected p estimated using PAUP* software) between *R. rattus* and *R. tanezumi*.

RESULTS

Indian Ocean scale analyses

Overall, 74 variable sites were found in the *R. rattus* samples (71 individuals, Table 1), resulting in a total of 40 mtDNA haplotypes within the 1762-bp sequence (GenBank accession numbers GQ891569–GQ891608). Haplotype composition for each country is reported in Table 1 (see details of individuals analysed in Appendix S1 in Supporting Information). Nucleotide diversities were 0.0056 ± 0.003 for the *cyt b* (40 variable sites), and 0.0098 ± 0.0006 for the D-loop (34 variable sites).

Samples from outside the Indian Ocean were all similar to the mtDNA haplotype Hap 40 we found in South Africa. The

Table 1 Geographic location, *Rattus rattus* sample size and haplotypes found for each locality considered. Further details (individual data and corresponding GenBank accession numbers) are provided in Appendix S1.

Country or island	Site	<i>N</i>	Haplotypes
India	Attur	1	Hap 5
	Avallanchi	1	Hap 4
	Mudumalai	3	Hap 1, Hap 2, Hap 3
Oman	Arazat	3	Hap 6
	Sahanout	4	Hap 9, Hap 10, Hap 11, Hap 12
	Tibraq	4	Hap 7, Hap 8
Yemen		2	Hap 13, Hap 14
Ethiopia		2	Hap 15, Hap 16
Tanzania	Lushoto	3	Hap 17, Hap 18, Hap 19
	Morogoro	2	Hap 17
Mozambique	Maputo	2	Hap 18, Hap 22
	Tete	3	Hap 18, Hap 20
	Zambezi	3	Hap 18, Hap 20, Hap 21
Grande Comore	Moroni	8	Hap 18, Hap 23, Hap 24, Hap 25, Hap 26, Hap 27, Hap 28
Mayotte	Site 1	4	Hap 20
	Site 2	2	Hap 29, Hap 30
	Site 3	1	Hap 20
Madagascar*	Ambalatenona (ALA)	3	Hap 20 (H1), Hap 34 (H1), Hap 35 (H17)
	Ambohimariana (AOM)	3	Hap 36 (H23), Hap 37 (H9), Hap 38 (H3)
	Brickaville (BRI)	2	Hap 32 (H14), Hap 33 (H3)
	Madiomangana (MDM)	4	Hap 20 (H1), Hap 31 (H16)
	Miandrivazo (MIA)	2	Hap 20 (H1)
Réunion	Site 1	3	Hap 39
	Site 2	3	Hap 39
	Site 3	1	Hap 39
South Africa	Cape Town	2	Hap 40
Total		71	

N, sample size for *R. rattus* individuals analysed for the mtDNA sequence (1762 bp).

*For Malagasy haplotypes, correspondence between haplotypes for the mtDNA sequence (1762 bp, named Hap *X*) and those for the D-loop sequence only (419 bp, named HX) are mentioned.

haplotype found in New Zealand (1762 bp) was identical to Hap 40. Within the four mtDNA haplotypes observed in Guadeloupe and Senegal (1762 bp), one was identical to Hap 40 and the others differed only by one or two substitutions (0.06–0.11% difference). Among the five *R. rattus* from the islands of Oceania (Robins *et al.*, 2007); 682 bp of the *cyt b* were identical to Hap 40, while only three positions differed out of 585 bp of the D-loop (0.51% divergence). The HaMI haplotype (Hingston *et al.*, 2005) was identical (D-loop, 419 bp) to Hap 40.

The phylogenetic tree in Fig. 2 estimates the coalescence for the 40 mtDNA haplotypes, rooted by *R. tanezumi*, *R. losea*, *R. exulans* and *R. norvegicus*. Haplotypes from India (Hap 1–5) and Oman (Hap 6–12) were all found in basal positions and in different branches of the tree. Mayotte and Madagascar shared their most common haplotype (Hap 20, Table 1). Haplotypes found in these two islands were all (except for Hap 31 from Madagascar) in a monophyletic group [Group B, posterior probability (PP) = 1.00], which also contained some individuals from Mozambique and Ethiopia. The haplotype closest to this group (Hap 11, PP = 1.00) was found in Oman. The only Malagasy haplotype found outside of Group B, Hap 31, originated from the locality Madiomangana (MDM,

north-west Madagascar, Fig. 1). It clustered in a monophyletic group (Group A, PP = 1.00), which also contained haplotypes from South Africa and from Réunion (where all seven individuals shared the same haplotype, Table 1). All the haplotypes found in Grande Comore were in one group (Group C; PP = 0.63) together with some haplotypes from Mozambique and Tanzania. The comparison of the phylogenetic tree (Fig. 2) with the haplotype network (Fig. 3) revealed that both representations were quite similar, and the three groups identified in the phylogenetic tree were also found within the network. Groups B and C formed star-like topologies, which are characteristic of recent (on an evolutionary time-scale) demographic expansion events.

Simulations under the IM model were computed using all individuals available for mtDNA sequences, except for the Malagasy individual carrying Hap 31. Removal of this individual was justified by the fact that this divergent haplotype represents 7.1% of the Malagasy sample (1/14 individuals), and as such may highly influence results although it is only one out of 190 in the total sample (0.5%, see below). We obtained reliable estimations for parameters of divergence time (t), splitting (s), migration rates (m_1 and m_2) and ancestral population size (θ_a). In contrast, posterior probabil-

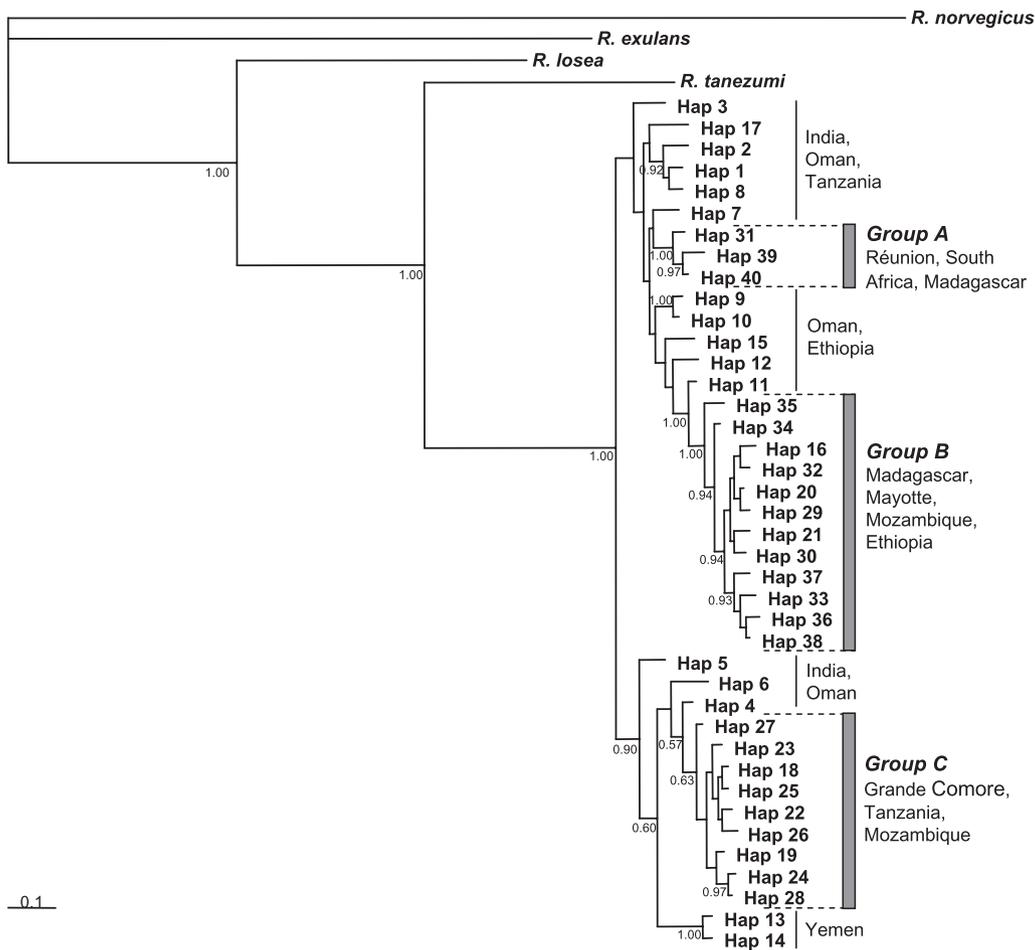
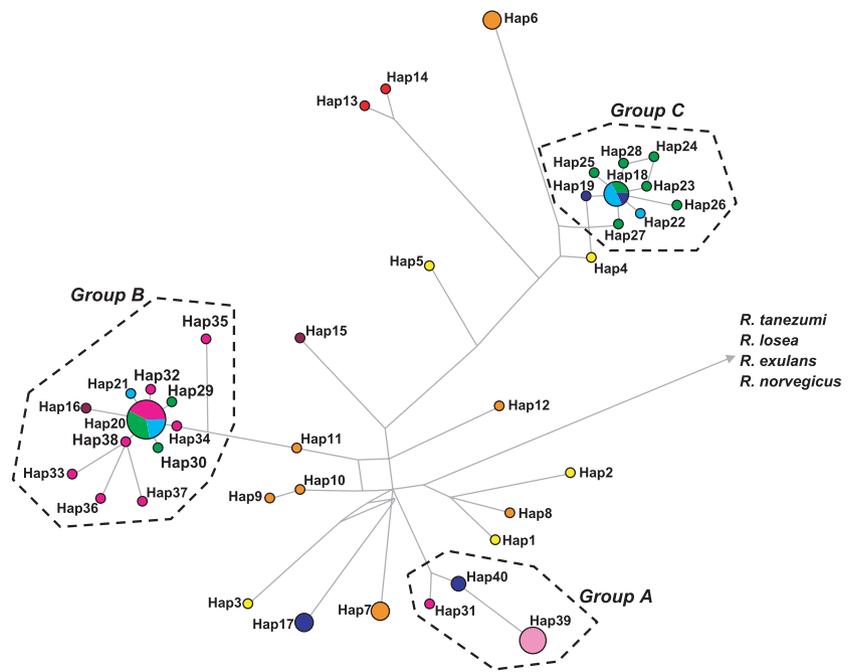


Figure 2 Bayesian tree of the 40 *Rattus rattus* mitochondrial DNA haplotypes and four closely related species: *Rattus tanezumi*, *Rattus losea*, *Rattus exulans* and *Rattus norvegicus*. Posterior probabilities are shown when higher than 0.5.

Figure 3 Median-joining network of the 40 *Rattus rattus* mitochondrial DNA haplotypes (1762-bp sequence) found in the western Indian Ocean (and four closely related species). Node sizes are proportional to haplotype frequencies. Groups mentioned in the text are circled and named as in Fig. 2. Each country is symbolized by a different colour: India, yellow; Oman, orange; Yemen, red; Ethiopia, brown; Tanzania, blue; Mozambique, bright blue; Grande Comore, dark green; Mayotte, light green; Madagascar, pink; Réunion, light pink; South Africa, dark blue.



ity distribution never gave clear results for actual population sizes θ_1 and θ_2 . The divergence time parameter was estimated to be 0.91 (95% confidence interval: 0.36–2.25) for Madagascar and 0.82 (0.23–5.41) for Grande Comore (Fig. 4a). Both migration parameters had peaks at the lower limit of resolution: the migration parameter from Oman to Madagascar or Grande Comore was estimated at 0.007 (0.001–1.309) and 0.001 (0.001–1.101), respectively (Fig. 4b). The splitting parameter (s) was estimated at 0.9985 (0.9505–0.9995) for Madagascar and 0.9995 (0.8775–0.9995) for Grande Comore. The ancestral population size parameters (θ_a) were estimated at 46.05 (19.65–102.45) for Madagascar and 33.45 (0.75–87.15) for Grande Comore. To convert parameter estimates into time-scale units, we used a mutation rate (μ_1) of 8.9×10^{-5} mutation events/locus/year (calculated from the ML distance between *R. rattus* and *R. tanezumi* of 0.0455). The estimated time of divergence of Oman with Madagascar and Grande Comore was 10,215 yr BP (4012–25,252) and 9238 yr BP (2630–60,752), respectively. Estimations of the splitting parameter (s) and of the ancestral population size (N_a) resulted in an effective number of founders (n_F) of about 388 for Madagascar and 94 for Grande Comore (as it results from a product of estimators, the 95% confidence interval of n_F was not worked out but would certainly be very large).

Madagascar-scale analyses

Within the 419-bp D-loop region analysed for the 190 Malagasy *R. rattus* (including those of Hingston *et al.*, 2005), 26 polymorphic sites were found (6.2%), corresponding to 27 mutations (no indels were found). A total of 29 D-loop haplotypes were identified, including 13 previously described by Hingston *et al.* (2005) (GenBank accession numbers DQ009781–DQ009793 and GQ891553–GQ891568). The D-

loop haplotype network (Fig. 5) revealed a star-like topology as observed for the mtDNA analysis (Fig. 3). D-loop haplotype frequencies found in each population are reported in Fig. 6. The same main haplotype (H1, corresponding to Hap 20 in the mtDNA dataset) was found in each population except for one located in the highlands (Antahobe, ANT), where H28 was the main D-loop haplotype. The haplotype and nucleotide diversity indices are indicated for each population in Table 2. Higher haplotype diversity was found in Ambalatenona (ALA), where high nucleotide diversity was also found. However, the highest nucleotide diversity was found in Madiomiangana (MDM), because of a very distinct D-loop haplotype (H16, see Fig. 5, corresponding to Hap 31, see Fig. 3). The correlation between haplotype diversity and distance to the coast was non-significant (Spearman's rank, $S = 594.7$, $P = 0.285$), probably due to the population Antahobe (ANT) which is the most distant from the sea (about 212 km) and presents high haplotype diversity (Table 2). However, a tendency for the expected pattern (higher diversity near the sea, $\rho = -0.307$) was observed.

Six populations experienced a population demographic change (Table 2): two from the east coast (AOM and BRI), two from the west coast (A and MIA) and two from the central highlands (MAH and TSA). The uncorrected genetic distance between *R. rattus* and *R. tanezumi* was 0.68, resulting in a mutation rate (μ_2) of $15.1\% \text{ Myr}^{-1}$. Time since expansion was estimated using this mutation rate for all populations having experienced a demographic change (Table 2). Expansion times were the largest for populations on the east coast (populations AOM and BRI), followed by the west coast (populations A and MIA) and finally the central highlands (populations MAH and TSA). The pool of all Malagasy individuals also revealed significant patterns of recent population growth, estimated at about 3000 yr BP (Table 2).

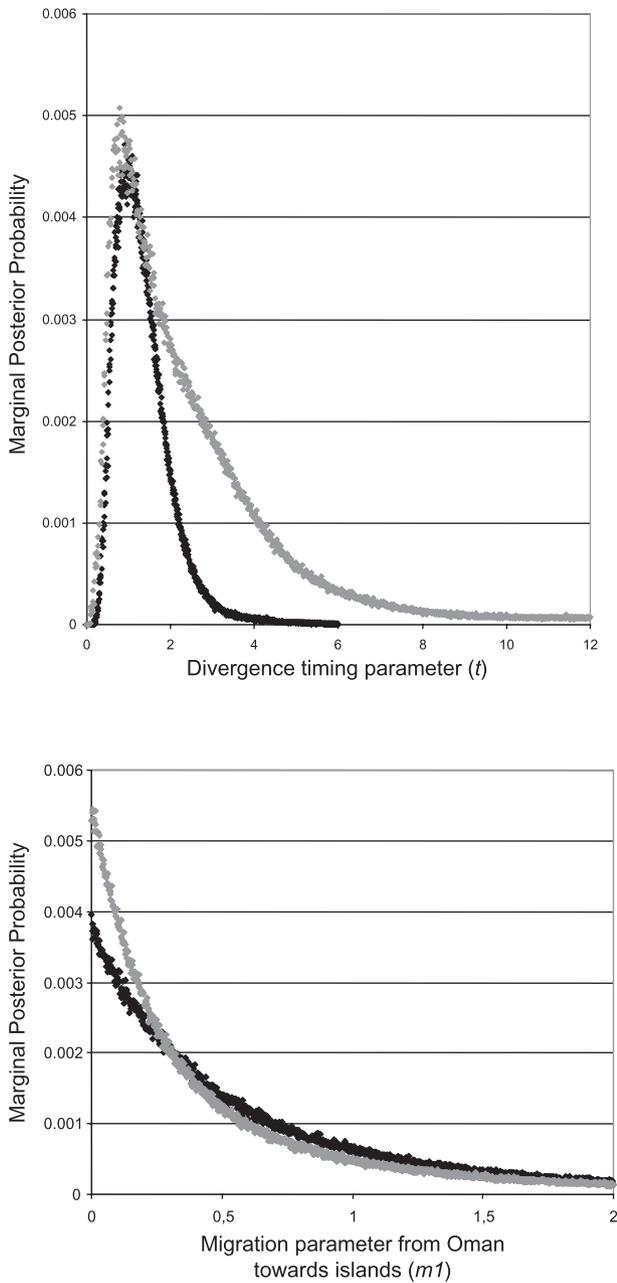


Figure 4 Results of simulations under the 'Isolation with migration' (IM) model for *Rattus rattus* population divergence between Oman and Madagascar (in black) and between Oman and Grande Comore (in grey): marginal posterior probability distribution for the time since divergence parameter (t , a) and the recurrent migration towards islands parameter (m_1 , b). For IM simulations, the dataset included 11 individuals from Oman, 13 from Madagascar and 8 for Grande Comore.

DISCUSSION

Colonization routes in the Indian Ocean

The colonization history of the black rat, *R. rattus*, towards western Europe and Africa is hypothesized to be strongly connected to human migration and trade routes. This species

was first found in North Africa (Egypt, Libya) in 2000 BC (de Graaf, 1981; Pascal *et al.*, 2006). In East Africa, no fossils or archaeological remains have been found, preventing any dating of the arrival of *R. rattus*. However, it may have been present since the beginning of the Christian era, as commercial links between the Arabian Peninsula, the Middle East and the East African coast were already important during this period (Hutterer & Tranier, 1990). In accordance with this relatively recent history, our results indicate little geographic structure, with shared haplotypes occurring across large geographic areas (for example, Hap 20 was found in Mozambique, Mayotte and Madagascar) and many countries (India, Oman, Tanzania and Mozambique) containing very distant haplotypes. Haplotypes from India were always found in basal positions, as expected for the native area of the species. Haplotypes from Oman were also found in basal positions of the phylogenetic tree and were not grouped in the network. Each of three sampled localities in Oman presents a different haplotype composition. The high genetic diversity found in the Oman *R. rattus* populations could originate from a relatively old introduction (compared to the other localities) with a high number of founders or through multiple colonization events.

Samples found in GenBank, originating from European Islands, Pacific Islands, Senegal, Guadeloupe and New York, are all identical or similar to the mtDNA haplotype found in our South African samples. Although this result requires confirmation with world-wide sampling and longer sequences, it suggests that rats bearing this haplotype were recently (about a few centuries ago) disseminated around the world, probably from western European populations. *Rattus rattus* arrived into southern Europe by the second to fourth centuries BC but would have remained confined to main commercial roads until a period of rapid urban growth; consequently, the rat population expanded around the 11th to 13th centuries AD (Audouin-Rouzeau & Vigne, 1994; Pascal *et al.*, 2006). However, north-western Mediterranean islands such as Lavezzi were probably colonized at an early stage of European colonization, probably by a few centuries BC (Ruffino *et al.*, 2009). Guadeloupe is thought to have been colonized by *R. rattus* during the 17th century AD (Abdelkrim *et al.*, 2005) and Senegal between the 17th and 19th centuries (Konecny, 2009). Pacific islands (including New Zealand) were probably colonized by the black rat during European exploration from the 16th to 18th centuries AD (Atkinson, 1985). Indeed, rats are reported to have heavily infested the ships of Cook's expeditions in AD 1785 (de Graaf, 1981). Finally, *R. rattus* is thought to have been introduced in South Africa only within the last 100 years and spread along with European settlements (de Graaf, 1981).

Colonization of some western Indian Ocean small islands

Despite their geographic proximity, each Indian Ocean island has a distinct *R. rattus* genetic composition, probably revealing different colonization histories.

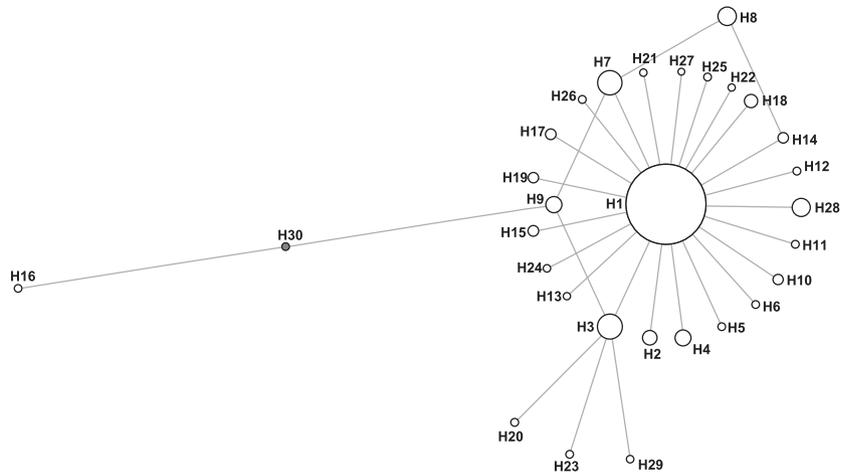


Figure 5 Median-joining network of Malagasy *Rattus rattus* D-loop haplotypes (419-bp region, 29 haplotypes H1–29) and one Oman individual (H30, in grey). Circle sizes represent haplotype frequency in the whole dataset (190 individuals from Madagascar).

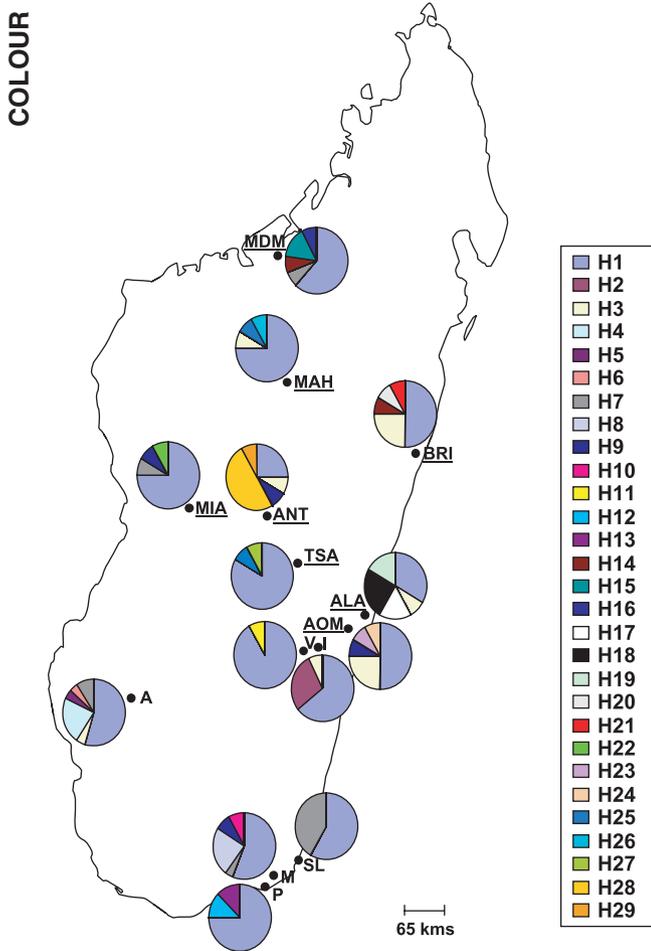


Figure 6 Location and D-loop haplotype composition (419-bp sequence) of each population of *Rattus rattus* from Madagascar. Population codes are the same as in Fig. 1. Underlined populations are those sampled in this study, whereas others were studied by Hingston *et al.* (2005).

In Grande Comore, the mtDNA haplotypes all belonged to a well-supported group, which also contained sequences from East Africa (Mozambique and Tanzania). This group was closely related to Indian and Arabian (Oman and Yemen)

sequences but was very distinct from Malagasy sequences. Therefore, independent colonization events may have occurred in Madagascar and Grande Comore. However, simulations under IM estimated a similar divergence time with Oman for both islands. Colonization events may have thus been simultaneous, but the genetic composition of the founder population in Grande Comore would have been highly different from that of Madagascar. However, our sampling in Grande Comore only covered the town and the vicinity of the Moroni harbour, and different haplotypes may be present in other parts of the archipelago.

Mayotte's mtDNA haplotypes were very similar to those of Madagascar, and they shared their most common haplotype (Hap 20), which may be indicative of a two-step colonization pattern. Mayotte was first colonized by East Africans and Arabians, but important migrations from Madagascar occurred later on. In this way, the Malagasy black rat could have been the first to settle in Mayotte, or, alternatively, it could have driven out earlier occupants.

Only one mtDNA haplotype was found in Réunion Island, although three distant (20–60 km apart) localities, widely distributed over the island, were sampled. This haplotype was similar to the one found in South Africa and to those reported in the literature from various continents (Europe, America, West Africa and Oceania). This result is in agreement with a colonization of Réunion independently of that of Madagascar, Mayotte and Grande Comore, presumably directly from Europe. The settlement of Europeans and the colonization by the black rat is thought to date from AD 1680 in Réunion Island (Moutou, 1983; Atkinson, 1985).

Insights into the colonization of Madagascar

Rattus rattus sampled from Madagascar formed a monophyletic group (except for one individual, see below). This observation favours the hypothesis of a single colonization of Madagascar, followed by *in situ* diversification (which is plausible considering the timing and the high mutation rate of the D-loop region). The haplotype most closely related to the Malagasy haplotype group (Hap 11) was found in Oman,

Table 2 Genetic diversities and results of population expansion tests for each population of *Rattus rattus* in Madagascar and the whole Malagasy dataset.

Population (distance to the sea, km)	<i>N</i>	<i>h</i> ± SD	π ± SD	<i>F_S</i>	<i>R₂</i>	<i>Tau</i> (time, yr BP)
Anavelona (A) (71.4)	22	0.67 ± 0.09	0.0020 ± 0.0020	-2.75*	0.087	0.814 (3217)
Ioranjatsy (I) (68.6)	14	0.54 ± 0.11	0.0014 ± 0.0001	-1.12	0.169	
Vinantelo (V) (88.7)	12	0.17 ± 0.13	0.0004 ± 0.0010	-0.48	0.276	
Ste Luce (SL) (0.3)	12	0.53 ± 0.08	0.0013 ± 0.0010	0.72	0.265	
Mandena (M) (10.7)	25	0.64 ± 0.08	0.0029 ± 0.0020	-0.29	0.146	
Petricky (P) (3.6)	8	0.46 ± 0.20	0.0012 ± 0.0010	-1.00	0.216	
<u>Ambalatenona (ALA)</u> (10.6)	12	0.83 ± 0.07	0.0028 ± 0.0005	-1.48	0.144	
<u>Antahobe (ANT)</u> (211.6)	12	0.73 ± 0.11	0.0031 ± 0.0007	-1.27	0.151	
<u>Ambohimiariana (AOM)</u> (31.9)	12	0.73 ± 0.11	0.0025 ± 0.0006	-1.82*	0.127*	1.030 (4070)
<u>Brickaville (BRI)</u> (11.6)	12	0.73 ± 0.11	0.0024 ± 0.0006	-1.94*	0.124*	0.985 (3892)
<u>Mahatsinjo (MAH)</u> (185.2)	12	0.46 ± 0.17	0.0012 ± 0.0005	-2.12**	0.144*	0.500 (1976)
<u>Miandrivazo (MIA)</u> (101.3)	12	0.46 ± 0.17	0.0015 ± 0.0007	-1.59*	0.134*	0.636 (2513)
<u>Madiomiangana (MDM)</u> (23.5)	13	0.63 ± 0.14	0.0036 ± 0.0017	-0.78	0.171	
<u>Tsarasambo (TSA)</u> (140.9)	12	0.32 ± 0.16	0.0008 ± 0.0004	-1.32*	0.186*	0.333 (1316)
All Madagascar	190	0.63 ± 0.04	0.0023 ± 0.0002	-35.95***	0.019*	0.787 (3110)

Haplotype (*h*) and nucleotide (π) diversities and their standard deviations (SD). Results for *F_S*- and *R₂*-tests. In populations having gone through a recent expansion (at least one of these tests was significant), mismatch distribution analysis was performed, and time since population expansion was estimated from *Tau*, using a mutation rate estimated at 15.1% Myr⁻¹ from the *Rattus rattus*/*Rattus tanezumi* divergence. All these analyses were performed on the 419-bp D-loop region. Underlined populations are those sampled in this study, while others were published by Hingston *et al.* (2005).

P* < 0.05; *P* < 0.01; ****P* < 0.001.

suggesting that the Arabian Peninsula may be the origin of the black rat colonization of Madagascar, as was argued for the house mouse (Duplantier *et al.*, 2002). Simulations under the IM model (divergence between the populations of Oman and Madagascar) favour the model without recurrent migration and estimate the number of founders on Madagascar (and Grande Comore) as a few hundred. Our results thus agree with one main colonization event in Madagascar, that is to say the arrival of *R. rattus* in a few boats coming from approximately the same region of Oman at the same time. These founder rats would thus present low genetic diversity and subsequent drift would have led to the retention of only the major haplotype.

Finally, it is worth noting the only exception to this general trend, i.e. one individual (carrying Hap 31) out of the 190 (0.5%) analysed, belonged to another group, which included the haplotypes from South Africa, Réunion and probably many other localities outside the western Indian Ocean. This individual was found in the Madiomiangana (MDM) population, a site located along a large river, about 25 km from the large harbour of Majunga. This variant haplotype is probably the result of a post-colonization immigration event. The successful integration of such migrants is thus still possible in Madagascar, but is expected to be extremely rare owing to the advantage of resident rats over migrants during competitive interactions (Granjon & Cheylan, 1989; Russell & Clout, 2004).

IM simulations estimated the split of the ancestral populations of Oman and Madagascar at about 10,000 years ago. However, this does not mean that the Malagasy population was established at that time, but that the gene pools had started to diverge (Nichols, 2001). The Malagasy black rat populations have experienced recent population expansion, and population

growth was estimated to have occurred about 3000 yr BP. As expected, this value is more recent than the estimated divergence time and is compatible with the date of human arrival in Madagascar, about 2300 yr BP (Burney *et al.*, 2004). Moreover, the substitution rate inferred from the inter-specific genetic distance may underestimate the intra-specific mutation rate (Ho & Larson, 2006); in this case, our population expansion would have occurred more recently than 3000 years ago.

One population located on the east coast (Ambohimiariana, AOM) presents the highest haplotype diversity (and nucleotide diversity if we remove the MDM population, for which the high nucleotide diversity is due to a single individual), the haplotype most closely related to that of Oman and the oldest expansion time. Other east coast populations also have high haplotype diversities (ALA and BRI) and old expansion times (BRI). These data suggest that the first arrival of *R. rattus* occurred on the east coast of Madagascar, rather than in the Tolagnaro region (south) as argued by Hingston *et al.* (2005). The oldest Malagasy black rat fossils were found in Mahilaka (north-west of the island), an Islamic port dating back to the 11th to 14th centuries AD (Rakotozafy, 1996; Radimilahy, 1997). However, the arrival of the rat probably pre-dates this period because human settlements were present very early in the east coast (about the 9th century AD; Wright & Rakotoarisoa, 2003).

Population growth dating suggests that the central highlands (at least for the two populations TSA and MAH; no signal of population expansion was found for ANT) were colonized later than the coasts. This is in accordance with historical data that describe the first human colonization to be restricted to the coastal zones, with later settlement of the central highlands by the 12th to 13th centuries AD (Wright & Rakotoarisoa, 2003).

In the central highlands, two populations (TSA and MAH) out of three also have low haplotype and nucleotide diversities, which supports the hypothesis of a more recent colonization. However, higher diversity was found in one population in the centre of the highlands (ANT), which also had a non-typical haplotype composition (the most common haplotype is H28 instead of H1). This high diversity could result from a bottleneck (a rare haplotype being retained by chance), followed by immigration (recovery of genetic diversity by the addition of new haplotypes). Such demographic crashes may be common in rat populations in the central highlands due to the occurrence of plague (Brygoo, 1966; Duplantier *et al.*, 2005).

CONCLUSION

Due to their high mutation rate, mitochondrial sequences are useful for inferring species history, especially as regards the colonization patterns of introduced commensal rodents (Gunduz *et al.*, 2001; Searle *et al.*, 2008). In addition, the phylogeographic histories of rats and mice can be valuable for tracing human history, as for example the use of *R. exulans* as a proxy for the movement of prehistoric people in the Pacific (Matisoo-Smith & Robins, 2009). We show here that mitochondrial sequences provide useful information for inferring the history of *R. rattus* and tracking human movement in the Indian Ocean, even for recent evolutionary time-scales. Nevertheless, our results require confirmation because they rely only on mitochondrial DNA, the use of which for phylogeography is under debate (Ballard & Whitlock, 2004; Zink & Barrowclough, 2008). Future research should also include nuclear markers such as microsatellites, which are currently being developed for *R. rattus* (Loiseau *et al.*, 2008).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to people who provided us with samples: François Catzeflis and Annie Orth (India), Pavel Munclinger and Josef Bryja (Yemen), Paolo Colangelo and Laurent Granjon (Ethiopia), Hermann Thomas, Damien Fouillot, Jean-Pierre Quéré and Bernard Devaux (Réunion), Terry Robinson and Gauthier Dobigny (South Africa) and Gwenaél Vourc'h, Amélie Desvars, Thomas Duval and Clément Punelle (Réunion and Mayotte). We thank Yannick Chaval, Marie Pagès and Vincent Herbreteau for the sequences of other *Rattus* used as outgroups. We are grateful to the plague laboratory of the 'Institut Pasteur de Madagascar' for assistance during sampling in Madagascar. We thank Caroline Tatard and Anne Loiseau for their help with molecular biology and Sylvain Piry, Fabien Condamine, Michael Fontaine and Emmanuelle Jousset for their help concerning data analyses. The final version of the manuscript was significantly improved by Janice Britton-Davidian, James Russell and one anonymous referee. Funding for sampling in Madagascar and molecular biology was provided by the IRD (Institut de Recherche pour le Développement), the IPM (Institut Pasteur de Madagascar) and the ANR-SEST (Agence Nationale pour la Recherche, Santé-Environnement et Santé-

Travail) programme on plague diffusion. Sampling in Mayotte and Réunion was funded by the INRA (Institut National de Recherche Agronomique) and by the ChikAni program of ANR-SEST, and sampling in Oman by the French Ministry of Foreign Affairs (French Embassy in Oman).

REFERENCES

- Abdelkrim, J., Pascal, M. & Samadi, S. (2005) Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Molecular Ecology*, **14**, 2923–2931.
- Allibert, C. (1988) Les contacts entre l'Arabie, le Golfe Persique, l'Afrique Orientale et Madagascar. Confrontation des documents écrits, des traditions orales et des données archéologiques récentes. *Travaux de la Maison de l'Orient*, **16**, 110–126.
- Aplin, K.P., Chesser, T. & ten Have, J. (1996) Evolutionary biology of the genus *Rattus*: profile of an archetypal rodent pest. *Rats, mice and people: rodent biology and management*. ACIAR, Canberra.
- Atkinson, A.E. (1985) The spread of commensal species of *Rattus* to oceanic islands and their effects on island avifaunas. *ICBP Technical Publication*, **3**, 35–81.
- Audouin-Rouzeau, F. & Vigne, J.-D. (1994) La colonisation de l'Europe par le Rat Noir (*Rattus rattus*). *Revue de Paléobiologie*, **13**, 125–145.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**, 729–744.
- Bandelt, H.-J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Baverstock, P.R., Adams, M., Maxson, L.R. & Yosida, T.H. (1983) Genetic differentiation among karyotypic forms of the black rat, *Rattus rattus*. *Genetics*, **105**, 969–983.
- Britton-Davidian, J., Catalan, J., Lopez, J., Ganem, G., Nunes, A.C., Ramalinho, M.G., Auffray, J.C., Searle, J.B. & Mathias, M.L. (2007) Patterns of genetic diversity and structure in a species undergoing rapid chromosomal radiation: an allozyme analysis of house mice from the Madeira archipelago. *Heredity*, **99**, 432–442.
- Brygoo, E.R. (1966) Epidémiologie de la peste à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, **35**, 9–147.
- Burney, D.A., Burney, L.P., Godfrey, L.R., Jungers, W.L., Goodman, S.M., Wright, H.T. & Jull, A.J.T. (2004) A chronology for late prehistoric Madagascar. *Journal of Human Evolution*, **47**, 25–63.
- Duplantier, J.-M. & Duchemin, J.B. (2003) Introduced small mammals and their ectoparasites: a description of their colonization and its consequences. *The natural history of Madagascar* (ed. by S.M. Goodman and J.P. Benstead), pp. 1159–1186. University of Chicago Press, Chicago.
- Duplantier, J.-M. & Rakotondravony, D. (1999) The rodent problem in Madagascar: agricultural pest and threat to

- human health. *Ecologically-based rodent management* (ed. by G. Singleton, L. Linds, H. Leirs and Z. Zhang), pp. 441–459. ACIA, Canberra.
- Duplantier, J.-M., Orth, A., Catalan, J. & Bonhomme, F. (2002) Evidence for a mitochondrial lineage originating from the Arabian peninsula in the Madagascar house mouse (*Mus musculus*). *Heredity*, **89**, 154–158.
- Duplantier, J.-M., Catalan, J., Orth, A., Grolleau, B. & Britton-Davidian, J. (2003) Systematics of the black rat in Madagascar: consequences for the transmission and distribution of plague. *Biological Journal of the Linnean Society*, **78**, 335–341.
- Duplantier, J.-M., Duchemin, J.-B., Chanteau, S. & Carniel, E. (2005) From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary Research*, **36**, 437–453.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Ganzhorn, J.U. (2003) Effects of introduced *Rattus rattus* on endemic small mammals in dry deciduous forest fragments of western Madagascar. *Animal Conservation*, **6**, 147–157.
- Ganzhorn, J.U., Goodman, S.M. & Dehgan, A. (2003) Effects of forest fragmentation on small mammals and lemurs. *The natural history of Madagascar* (ed. by S.M. Goodman and J.P. Benstead), pp. 1228–1234. University of Chicago Press, Chicago.
- Goodman, S.M. (1995) *Rattus* on Madagascar and the dilemma of protecting the endemic rodent fauna. *Conservation Biology*, **9**, 450–453.
- Goodman, S.M., Ganzhorn, J.U. & Rakotondravony, D. (2003) Introduction to the mammals. *The natural history of Madagascar* (ed. by S.M. Goodman and J.P. Benstead), pp. 1159–1186. University of Chicago Press, Chicago.
- de Graaf, G. (ed.) (1981) *Rattus rattus*. *The rodents of Southern Africa*, pp. 219–225. Butterworth, Durban.
- Granjon, L. & Cheylan, G. (1989) Le sort de rats noirs (*Rattus rattus*) introduits sur une île, révélé par radio-tracking. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, **309**, 571–575.
- Gratz, N.G. (1997) The burden of rodent-borne diseases in Africa South of the Sahara. *Belgian Journal of Zoology*, **127**, 71–84.
- Gunduz, I., Auffray, J.C., Britton-Davidian, J., Catalan, J., Ganem, G., Ramalhinho, M.G., Mathias, M.L. & Searle, J.B. (2001) Molecular studies on the colonization of the Madeiran archipelago by house mice. *Molecular Ecology*, **10**, 2023–2029.
- Harris, D.B. (2009) Review of negative effects of introduced rodents on small mammals on islands. *Biological Invasions*, **11**, 1611–1630.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **21**, 160–174.
- Hey, J. (2005) On the number of New World founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. *PLoS Biology*, **3**, e193.
- Hey, J. & Nielsen, R. (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, **167**, 747–760.
- Hingston, M., Goodman, S.M., Ganzhorn, J.U. & Sommer, S. (2005) Reconstruction of the colonization of southern Madagascar by introduced *Rattus rattus*. *Journal of Biogeography*, **32**, 1549–1559.
- Ho, S.Y.W. & Larson, G. (2006) Molecular clocks: when times are a-changin'. *Trends in Genetics*, **22**, 79–83.
- Hurles, M.E., Sykes, B.C., Jobling, M.A. & Forster, P. (2005) The dual origin of the Malagasy in Island Southeast Asia and East Africa: evidence from maternal and paternal lineages. *American Journal of Human Genetics*, **76**, 894–901.
- Hutterer, R. & Tranier, M. (1990) The immigration of the Asian house shrew (*Suncus murinus*) into Africa and Madagascar. *Vertebrates in the tropics* (ed. by G. Peters and R. Hutterer), pp. 309–319. Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Jones, H.P., Tershy, B.R., Zavaleta, E.S., Croll, D.A., Keitt, B.S., Finkelstein, M.E. & Howald, G.R. (2008) Severity of the effects of invasive rats on seabirds: a global review. *Conservation Biology*, **22**, 16–26.
- Konecny, A. (2009) *Consequences of anthropogenic changes on rodent communities and populations: study cases on native and introduced species in Eastern Senegal*. PhD Thesis, Université Montpellier 2 and Masaryk University, Brno.
- Lever, C. (1994) *Naturalized animals: the ecology of successfully introduced species*. Poyser Natural History, London.
- Liszkowski, H.D. (2000) *Mayotte et les Comores: escale sur la route des Indes aux XVe et XVIIIe siècles*. Collection Mémoires, Editions du Baobab, Mayotte.
- Loiseau, A., Rahelinirina, S., Rahalison, L., Konecny, A., Duplantier, J.-M. & Brouat, C. (2008) Isolation and characterization of microsatellites in *Rattus rattus*. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 916–918.
- Matisoo-Smith, E. & Robins, J.H. (2009) Mitochondrial DNA evidence for the spread of Pacific rats through Oceania. *Biological Invasions*, **11**, 1521–1527.
- Moutou, F. (1983) Introduction dans les îles, l'exemple de l'île de la Réunion. *Compte-Rendu de la Société de Biogéographie*, **59**, 201–211.
- Musser, D.E. & Carleton, M.D. (2005) Superfamily Muroidea. *Mammal species of the world*, Vol. 2 (ed. by D.E. Wilson and D.M. Reeder), pp. 894–1531. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nichols, R.A. (2001) Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 358–364.
- Nylander, J.A.A. (2004) *MrAIC.pl*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.
- Pascal, M., Lorvelec, O. & Vigne, J.-D. (2006) *Invasions biologiques et extinctions: 11 000 ans d'histoire des vertébrés en France*. Coédition Belin–Quae, Paris.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 37–45.

- Radimilahy, C. (1997) Mahilaka, an eleventh- to fourteenth-century Islamic port: the first impact of urbanism on Madagascar. *Natural change and human impact in Madagascar* (ed. by S.M. Goodman and B.D. Patterson), pp. 342–363. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Rakotozafy, L.M.A. (1996) *Etude de la constitution du régime alimentaire des habitants du site de Mahilaka du XIe au XIVe siècle à partir des produits de fouilles archéologiques*. PhD Thesis, University of Antananarivo, Antananarivo.
- Ramanamanjato, J.B. & Ganzhorn, J.U. (2001) Effects of forest fragmentation, introduced *Rattus rattus* and the role of exotic tree plantations and secondary vegetation for the conservation of an endemic rodent and a small lemur in littoral forests of southeastern Madagascar. *Animal Conservation*, **4**, 175–183.
- Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. (2002) Statistical properties of neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092–2100.
- Robins, J.H., Hingston, M., Matisoo-Smith, E. & Ross, H.A. (2007) Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 717–729.
- Robins, J.H., McLenachan, P.A., Phillips, M.J., Craig, L., Ross, H.A. & Matisoo-Smith, E. (2008) Dating of divergences within the *Rattus* genus phylogeny using whole mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 460–466.
- Rodriguez, F.-J., Oliver, J.-L., Marin, A. & Medina, J.-R. (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, **142**, 485–501.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic difference. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552–569.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496–2497.
- Ruffino, L., Bourgeois, K., Vidal, E., Duhem, C., Paracuellos, M., Escribano, F., Sposimo, P., Baccetti, N., Pascal, M. & Oro, D. (2009) Invasive rats and seabirds after 2,000 years of an unwanted coexistence on Mediterranean islands. *Biological Invasions*, **11**, 1631–1651.
- Russell, J.C. & Clout, M.N. (2004) Modelling the distribution and interaction of introduced rodents on New Zealand offshore islands. *Global Ecology and Biogeography*, **13**, 497–507.
- Searle, J.B. (2008) The genetics of mammalian invasion: a review. *Wildlife Research*, **35**, 185–192.
- Searle, J.B., Jones, C.S., Gündüz, I., Scascitelli, M., Jones, E.P., Herman, J.S., Rambau, R.V., Noble, L.R., Berry, R.J., Giménez, M.D. & Johannesdottir, F. (2008) Of mice and (Viking?) men: phylogeography of British and Irish house mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 201–207.
- Swofford, D.L. (2000) *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tajima, F. (1993) Measurement of DNA polymorphism. *Mechanisms of molecular evolution* (ed. by N. Takahata and A.G. Clark), pp. 37–59. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Towns, D.R., Atkinson, I.A.E. & Daugherty, C.H. (2006) Have the harmful effects of introduced rats on islands been exaggerated? *Biological Invasions*, **8**, 863–891.
- Usdin, K., Chevret, P., Catzeflis, F.M., Verona, R. & Furano, A.V. (1995) L1 (LINE-1) retrotransposable elements provide a ‘fossil’ record of the phylogenetic history of murid rodents. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 73–82.
- World Health Organization (2003) Human plague in 2000–2001. *Weekly Epidemiological Record*, **78**, 130–135.
- Wright, H.T. & Rakotoarisoa, J.A. (2003) The rise of Malagasy societies: new developments in the archaeology of Madagascar. *The natural history of Madagascar* (ed. by S.M. Goodman and J.P. Benstead), pp. 112–119. University of Chicago Press, Chicago.
- Zink, R.M. & Barrowclough, G.F. (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, **17**, 2107–2121.

SUPPORTING INFORMATION

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

Appendix S1 Detailed sampling at the Indian Ocean scale.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be reorganized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

BIOSKETCHES

Charlotte Tollenaere is a PhD student at the Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP) in Montpellier. She is interested in the genetics of *Rattus rattus* in relation to its role as plague reservoir in Madagascar and works in collaboration with the team of **Lila Rahalison** (Institut Pasteur de Madagascar). **Carine Brouat**, **Jean-Marc Duplantier** and **Jean-François Cosson** belong to the CBGP research group working on rodents. This team focuses on population genetics, ecology, and evolution of host/parasite interactions of various rodent species. **Soanandrasana Rahelinirina** (Madagascar), **Michel Pascal** (Réunion and Mayotte), **Hélène Moné** and **Gabriel Mouahid** (Oman) and **Herwig Leirs** (Tanzania and Mozambique) contributed to sample collection.

Editor: Brett Riddle

SUPPORTING INFORMATION

Appendix S1 Detailed data for Indian Ocean scale analyses.

For each *Rattus rattus* individual considered, the geographic location, collectors, haplotypes found (for the *mt* sequence, 1762 bp) and GenBank accession number are indicated. For Malagasy haplotypes, correspondence between haplotypes for the *mt* sequence (1762 bp named HapX) and those for the D-loop only (419 bp, named HX) are mentioned.

Individual code	Provenance	Haplotype	Genbank accession number	Collectors	
T875	India (Attur)	Hap 5	GQ891573	François Catzeflis, Annie Orth <i>et al.</i> UMR ISEM, Montpellier, France	
T826	India (Avallanchi)	Hap 4	GQ891572		
T813	India (Mudumalai)	Hap 1	GQ891569		
T819	India (Mudumalai)	Hap 2	GQ891570		
T820	India (Mudumalai)	Hap 3	GQ891571		
R8	Oman (Arazat)	Hap 6	GQ891574	Hélène Moné, Gabriel Mouahid <i>et al.</i> UMR5244, Perpignan, France	
R10	Oman (Arazat)	Hap 6	GQ891574		
R11	Oman (Arazat)	Hap 6	GQ891574		
R'1	Oman (Sahanout)	Hap 9	GQ891577		
R'2	Oman (Sahanout)	Hap 10	GQ891578		
R'3	Oman (Sahanout)	Hap 11	GQ891579		
R15	Oman (Sahanout)	Hap 12	GQ891580		
R3	Oman (Tibraq)	Hap 7	GQ891575		
R12	Oman (Tibraq)	Hap 7	GQ891575		
GD	Oman (Tibraq)	Hap 7	GQ891575		
R1	Oman (Tibraq)	Hap 8	GQ891576		
PB3655	Yemen	Hap 13	GQ891581		Pavel Munclinger <i>et al.</i> University of Prague, Czech Republic
PB3658	Yemen	Hap 14	GQ891582		
ET35	Ethiopia	Hap 15	GQ891583	Paolo Colangelo <i>et al.</i> University of Roma, Italy	
ET124	Ethiopia	Hap 16	GQ891584		
TE4059	Tanzania (Lushoto)	Hap 17	GQ891585	Herwig Leirs <i>et al.</i> University of Antwerpen, Belgium	
TE4264	Tanzania (Lushoto)	Hap 18	GQ891586		
TE4060	Tanzania (Lushoto)	Hap 19	GQ891587		
TE2944	Tanzania (Morogoro)	Hap 17	GQ891585		
TE0970	Tanzania (Morogoro)	Hap 17	GQ891585		
MO232	Mozambique (Maputo)	Hap 18	GQ891586		
MO257	Mozambique (Maputo)	Hap 22	GQ891590		
MO113	Mozambique (Tete)	Hap 18	GQ891586		
MO110	Mozambique (Tete)	Hap 20	GQ891588		
MO134	Mozambique (Tete)	Hap 20	GQ891588		
MO146	Mozambique (Zambezi)	Hap 18	GQ891586		
MO147	Mozambique (Zambezi)	Hap 20	GQ891588		
MO148	Mozambique (Zambezi)	Hap 21	GQ891589		

CO13	Grande Comore (Moroni)	Hap 18	GQ891586	Jean-Marc Duplantier <i>et al.</i> UMR CBGP, Montferrier sur Lez, France	
CO111	Grande Comore (Moroni)	Hap 18	GQ891586		
CO40	Grande Comore (Moroni)	Hap 23	GQ891591		
CO50	Grande Comore (Moroni)	Hap 24	GQ891592		
CO87	Grande Comore (Moroni)	Hap 25	GQ891593		
CO98	Grande Comore (Moroni)	Hap 26	GQ891594		
CO102	Grande Comore (Moroni)	Hap 27	GQ891595		
CO117	Grande Comore (Moroni)	Hap 28	GQ891596		
13IN020407RR1	Mayotte (Site 1)	Hap 20	GQ891588		Gwenaël Vourc'h <i>et al.</i> INRA Clermont-Ferrand - Theix, France
13IN040407RR5	Mayotte (Site 1)	Hap 20	GQ891588		
13IN020407RR9	Mayotte (Site 1)	Hap 20	GQ891588		
13IN020407RR14	Mayotte (Site 1)	Hap 20	GQ891588		
13IN040407RR15	Mayotte (Site 2)	Hap 29	GQ891597		
13IN040407RR10	Mayotte (Site 2)	Hap 30	GQ891598		
12IN030407RR1	Mayotte (Site 3)	Hap 20	GQ891588		
DF631	Madagascar (ALA)	Hap 20 (H1)	GQ891588	Jean-Marc Duplantier <i>et al.</i> UMR CBGP, Montferrier sur Lez, France	
DF658	Madagascar (ALA)	Hap 34 (H1)	GQ891602		
DF665	Madagascar (ALA)	Hap 35 (H17)	GQ891603		
DF489	Madagascar (AOM)	Hap 36 (H23)	GQ891604		
DF508	Madagascar (AOM)	Hap 37 (H9)	GQ891605		
DF549	Madagascar (AOM)	Hap 38 (H3)	GQ891606		
CT04	Madagascar (BRI)	Hap 32 (H14)	GQ891600		
CT32	Madagascar (BRI)	Hap 33 (H3)	GQ891601		
DM1002	Madagascar (MDM)	Hap 20 (H1)	GQ891588		
DM0995	Madagascar (MDM)	Hap 20 (H1)	GQ891588		
DM1023	Madagascar (MDM)	Hap 20 (H1)	GQ891588		
DM1021	Madagascar (MDM)	Hap 31 (H16)	GQ891599		
MDZ01	Madagascar (MIA)	Hap 20 (H1)	GQ891588		
MDZ10	Madagascar (MIA)	Hap 20 (H1)	GQ891588		
Reu1	Réunion (Site 1)	Hap 39	GQ891607		Bernard Devaux <i>et al.</i> ONF, France
Reu2	Réunion (Site 1)	Hap 39	GQ891607		
Reu4	Réunion (Site 1)	Hap 39	GQ891607		
3IN170207RR4	Réunion (Site 2)	Hap 39	GQ891607	Gwenaël Vourc'h <i>et al.</i> INRA Clermont-Ferrand - Theix, France	
3IN190207RR1	Réunion (Site 2)	Hap 39	GQ891607		
3IN180207RR14	Réunion (Site 2)	Hap 39	GQ891607		
1IN230107RR1	Réunion (Site 3)	Hap 39	GQ891607		
CAP1	South Africa (Cape Town)	Hap 40	GQ891608	Terry Robinson <i>et al.</i> University of Stellenbosch, South Africa	
SA02	South Africa (Cape Town)	Hap 40	GQ891608		

Article II

Susceptibility to *Yersinia pestis* experimental infection in wild *Rattus rattus*, reservoir of plague in Madagascar

C. Tollenaere, L. Rahalison, M. Ranjalahy, J.-M. Duplantier, S. Rahelinirina, S. Telfer, C. Brouat

Soumis à EcoHealth

Susceptibility to *Yersinia pestis* experimental infection in wild *Rattus rattus*, reservoir of plague in Madagascar

C. TOLLENAERE¹, L. RAHALISON², M. RANJALAHY², J.-M. DUPLANTIER¹, S. RAHELINIRINA², S. TELFER³, C. BROUAT¹

¹ IRD, UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France.

² Institut Pasteur de Madagascar (IPM), Unité Peste, BP1274, 101 Antananarivo, Madagascar.

³ Institute of Environmental and Biological Sciences, University of Aberdeen, AB24 2TZ, United Kingdom.

Abstract (182 words)

In Madagascar, the black rat, *Rattus rattus*, is the main reservoir of plague (*Yersinia pestis* infection), a disease still responsible for hundreds of cases each year in this country. This study used experimental plague challenge on wild-caught rats to describe susceptibility in populations of *R. rattus*, in order to better understand how this species can act as a plague reservoir. An important difference in plague resistance between rat populations from the plague focus (central highlands) and those from the plague-free zone (low altitude area) was confirmed to be a widespread phenomenon. Within the plague focus, we evidenced an effect of the sex of rats on plague susceptibility, with males slightly more resistant than females. Other individual factors investigated (weight and habitat of sampling) did not affect plague resistance. When infected at high bacterial dose, rats from the plague focus died mainly within 3-5 days and produced specific antibodies; whereas following low dose infection, delayed mortality was observed and surviving seronegative rats were not uncommon. These results concerning Malagasy *R. rattus* response to experimental plague infection are discussed along with their epidemiological consequences.

Keywords

Experimental challenge; Infectious disease resistance; Madagascar; Rodent-borne disease; *Yersinia pestis*.

Context

Rodent-borne diseases inflict a heavy toll on human health (Gratz 1997; Heyman et al. 2002; Mills 2005). To increase our understanding of rodent reservoir dynamics, and consequently of disease risks, we need to consider evolutionary changes of the hosts in response to their pathogens (Woolhouse et al. 2002; Altizer et al. 2003). Plague is a rodent-borne disease caused by the bacteria *Yersinia pestis* and transmitted by fleas (Prentice and Rahalison 2007). In Madagascar, plague arrived in 1898 during the third pandemic, and has persisted in the central highlands, at altitudes above 800 meters since the 1930s' (Brygoo 1966; Duplantier et al. 2005). This large region constitutes one of the main plague foci in the world (41 % of the world's reported cases in 2000-2001, WHO 2003). The black rat, *Rattus rattus*, is by far the most abundant small mammal in villages of the central highlands and is the most probable plague reservoir (Brygoo 1966; Duplantier and Duchemin 2003). However, this species is classically considered to be plague susceptible (Dennis et al. 1999), resulting in the paradox of attributing the role of reservoir to a highly susceptible host.

Preliminary experimental infections (Rahalison et al. 2003) showed that rats from one locality within the Malagasy plague focus were more resistant to plague infection than rats from one plague-free locality (Antananarivo, LD₅₀ of approximately 10⁵ bacteria, compared with Brickaville, LD₅₀ lower than 100, Fig. 1). Within the plague focus, rats from different habitats carry different flea species (*Xenopsylla cheopis* is found inside houses and *Synopsyllus fonquerniei* outdoor, Brygoo 1966) and exhibit contrasting levels of plague seroprevalence (with rats caught outdoor more seropositive than inside houses, Dromigny 1997; Rahelinirina 2009), so they may differ in their susceptibility to plague. Moreover, plague resistance heterogeneity within species could be modulated by individual factors such as sex or age of animals (Twigg 1978; Gage & Kosoy 2005).

In this study, we aimed to further increase knowledge about plague resistance in natural populations of *R. rattus* in Madagascar, using experimental plague challenges. The main goals were (1) to determine whether the difference in plague resistance between the plague focus and the plague-free zone was observed in other localities, and (2) to examine whether resistance to plague was associated with individual (sex or weight) or ecological (habitat) factors.

Rat sampling

Wild-trapped rats were used in preference to laboratory-born animals to ensure that host factors would match closely those found in their natural environment (see also Isaacson et al. 1983). Sampling was conducted between November 2006 and May 2008 in five zones: two central highland zones, where human plague cases are reported each year, and three plague-free zones (Fig. 1). Rats were live-trapped within houses, in sisal hedges, and around irrigated rice fields (as described in Gilabert et al. 2007). For each sampled rat, a blood sample was collected to perform an anti-F1 (*Y. pestis* specific) antibodies ELISA assay (Dromigny 1997; Rasoamanana et al. 1997). Only seronegative rats (supposed plague naïve) were plague challenged, at least ten days after trapping. Seropositive rats were killed by elongation as recommended by Mills et al. (1995).

Plague challenge and follow-up of animals

For all inoculation experiments, we used the same *Y. pestis* strain, which was isolated from a Malagasy patient during a routine diagnostic test (Institut Pasteur de Madagascar). The patient was severely affected and one fatal case occurred in the same village.

As the bacterial dose injected during a flea bite can be highly variable (from zero to more than 4000 bacteria, Lorange et al. 2005) and variable numbers of fleas can feed on a single rat (up to 70 fleas on a single rat, J.M.

Duplantier, unpublished observation), we conducted several experiments (Table 1) with various bacterial doses (estimated by depositing different dilutions on selective agar plates). Animals were weighed and 100 μ L of bacterial solution was injected subcutaneously in the thigh. We then followed animals during 18 days, as preliminary experiments showed that subsequent mortality was not attributable to plague (*L. Rahalison*, unpublished observation). All rats were examined twice a day. An antigen F1 rapid diagnostic test (RDT, Chanteau et al. 2003) was used on the spleen of dead rats to confirm that the death was caused by plague. Dead rats with negative RDT were rare (mean 2 % of inoculated rats) and removed from the analyses. At the end of the experiment (18th day), blood was sampled for an ELISA assay (as described above), to estimate the proportion of surviving rats presenting anti-F1 antibodies.

Comparison of plague susceptibility between plague focus and plague-free zone

The mortality rate depended on the origin of the rats (covariance analyses with the bacterial dose injected included as a covariate, $F_1 = 26.4$, $p = 0.014$), with rats from the plague focus being much more plague resistant than rats from the low-altitude zone (Table 1, Fig. 2). The difference in plague susceptibility between plague focus and plague-free zone populations, previously described by *Rahalison et al.* (2003), is here confirmed and demonstrated in other localities. As this pattern was also observed in laboratory-born animals (*Rahalison et al.*, 2003), it suggests an evolution of plague resistance restricted to central highland populations where plague has been endemic for 90 years. Plague resistance in these *R. rattus* populations would therefore be an example of rapid evolution (*Carroll et al.* 2007) under the strong selection pressure of a pathogen (*Altizer et al.* 2003). The speed of this evolution could be due to the high virulence of plague bacteria (*Stenseth et al.* 2008) and to the short generation time of the black rat (about 0.5 years; *J.-M. Duplantier*, unpublished data). Evolution of plague resistance may not be restricted to this system, as variability in resistance related to plague occurrence has also been described in other recent plague foci: *Onychomys leucogaster* (*Thomas et al.* 1988) and *Microtus californicus* (*Quan and Kartman* 1962) in North America; *Mastomys natalensis* in South Africa (*Shepherd et al.* 1986). Unlike these native species, the black rat was only introduced to Madagascar by humans a few thousands years ago, and consequently displays relatively low levels of neutral genetic variability, especially in the central highlands (*Tollenaere et al.* in press). However, neutral genetic variation is not necessarily representative of variation relevant for selection, and here moderate level of neutral diversity does not appear to have prevented rapid evolution (see also *Koskinen et al.* 2002 or *Dlugosch and Parker* 2008).

Kinetics of infection

The timing of death (Fig. 3) was examined for experiments resulting in at least 15 dead individuals (i1, i2, i6, i7). For experiments involving rats from the plague-free zone (i6 and i7) and for high-dose infections of rats from the plague focus (i1), most plague death occurred between the third and the fifth day after inoculation (more than 90 % before the seventh day). These results confirmed the rapidity of plague disease in *R. rattus*, as is also the case in other hosts, including humans (*Perry and Fetherston* 1997) and laboratory rats (*Sebbane et al.* 2005). However, for the low

dose experiment involving rats from the plague focus, rats died from the fourth to the 17th day. The prolonged lifespan of plague infected rats within plague foci could have a significant influence on flea infection rates and, therefore, plague transmission, but information on bacteraemia levels in the blood through the course of infection would be necessary to evaluate this hypothesis.

Antibody production in surviving animals

Most rats surviving to 18 days produced antibodies. However, the proportion differed according to the dose injected (Table 1), with 24-37% of rats surviving a low dose infection (i2, i3) testing seronegative, compared with only 0-6 % at high dose (i1, i4). Individuals resistant to infection with no antibody production were thus rare at high dose but fairly common in low dose infections. As the natural dose injected by fleas may be highly variable (*Lorange et al.* 2005), this result indicates that seroprevalence levels could underestimate plague circulation in rodent populations.

Individual factors affecting susceptibility within the plague focus

Generalized linear models (GLM) with a binomial error distribution and a logit link function were used to test the effect of sex, weight (at inoculation time), habitat (houses, sisal fences and rice fields) and their interactions on plague survival. Only experiment i1 was considered due to insufficient number of dead rats in other experiments. Sex was the only variable included in the final model with males were more resistant than females (z value = -2.104, $df = 1$, $p = 0.035$). More experiments are needed to confirm this finding. In humans, plague incidence often differs between males and females, although the direction of the sex-bias differs between foci (for example *Migliani et al.* 2006 and *Davis et al.* 2006). However, this pattern is classically attributed to variation in risk due to differential behaviour, rather than differences in susceptibility, although differential behaviour are not identified in all cases (for example *Boisier et al.* 2002).

Animal weight and habitat did not influence susceptibility. Other individual level factors such as physiological or immune status, along with genetic load (for example in *Microtus californicus*, *Hubbert and Goldenberg* 1970), may also influence resistance levels (*Gage & Kosoy* 2005) and should be investigated in Malagasy *R. rattus*.

Conclusion: epidemiological consequences of resistance level within the plague focus

The proportion of plague resistant or susceptible individuals in a population characterizes the role of that population in transmission and maintenance of plague (*Biggins and Kosoy* 2001). Indeed, highly resistant individuals allow the maintenance of rat populations during outbreaks, whereas highly susceptible rats allow plague transmission (*Eisen and Gage* 2009), as fleas can only be infected on animals with terminal septicaemia (*Lorange et al.* 2005). Resistance levels found in *Rattus rattus* populations from the Malagasy plague focus (50-94 %) were close to those found in classical enzootic hosts in Asia (40-80 %, *Biggins and Kosoy* 2001). Moreover, epidemiological models show that an introduction of bubonic plague can lead to highly persistent enzootic focus when the initial level of resistance in rodent population is of 50-75 % (*Keeling and Gilligan* 2000). Developing epidemiological models specific to this particular plague focus would allow a more detailed investigation of the role

of *R. rattus* resistance for plague persistence in Madagascar. The results of this study provide crucial insight for developing such models.

Acknowledgements

We are grateful to the all staff of the Plague laboratory of the Institut Pasteur de Madagascar for assistance during the fieldwork, experimentation and serological analysis. We thank Florent Sebbane for helpful comments on earlier versions of the manuscript, as well as Nathalie Charbonnel for constructive discussions. Funding was provided by the IRD (Institut de Recherche pour le Développement), the IPM (Institut Pasteur de Madagascar) and an ANR-SEST (Agence Nationale pour la Recherche, Santé - Environnement et Santé - Travail) program on plague diffusion.

References

- Altizer S, Harvell D, and Friedle E (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 18:589-596.
- Biggins DE, and Kosoy MY (2001). Influences of introduced plague on North American mammals: Implications from ecology of plague in Asia. *Journal of Mammalogy* 82:906-916.
- Boisier P, Rahalison L, Rasolomaharo M, Ratsitorahina M, Mahafaly M, Razafimahefa M, et al. (2002). Epidemiologic features of four successive annual outbreaks of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar. *Emerging Infectious Diseases* 8:311-316.
- Brygoo ER (1966). Epidémiologie de la peste à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 35:9-147.
- Carroll SP, Hendry AP, Reznick DN, and Fox CW (2007). Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology* 21:387-393.
- Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, et al. (2003). Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* 361:211-216.
- Clopper CJ, and Pearson ES (1934). The use of confidence or fiducial limits illustrated by the case of binomial *Biometrika* 26:404-413.
- Davis S, Makundi RH, Machang'u RS, and Leirs H (2006). Demographic and spatio-temporal variation in human plague at a persistent focus in Tanzania. *Acta Tropica* 100:133-141.
- Dennis DT, Gage KL, Gratz N, Poland J, and Tikhomirov E (1999). *Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control*, WHO, Geneva. 171p.
- Dromigny J-A (1997). Contribution à la connaissance du cycle épidémiologique de la peste à Madagascar: étude sérologique des rats et des musaraignes. Unpublished Master Report. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Paris.
- Dlugosch KM, and Parker IM (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17:431-449.
- Duplantier J-M, Duchemin J-B, Chanteau S, and Carniel E (2005). From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary Research* 36:437-453.
- Duplantier JM, and Duchemin JB (2003). Human diseases and introduced small mammals. Pages 158-161 in S. M. Goodman and J. P. Benstead, editors. *The natural history of Madagascar*. University of Chicago Press, Chicago.
- Eisen RJ, and Gage KL (2009). Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods. *Veterinary Research* 40.
- Gage KL, and Kosoy MY (2005). Natural History of plague: perspectives from more than a century of research. *Annual Review of Entomology* 50:505-528.
- Gilabert A, Loiseau A, Duplantier JM, Rahelinirina S, Rahalison L, Chanteau S, et al. (2007). Genetic structure of black rat populations in a rural plague focus in Madagascar. *Canadian Journal of Zoology* 85:965-972.
- Gratz NG (1997). The burden of rodent-borne diseases in Africa South of the Sahara. *Belg. J. Zool.* 127:71-84.
- Haldane JBS (1956). The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Annals of Human Genetics* 20:309-311.
- Heyman P, Vandenvelde C, and Zizi M (2002). The assessment of human health risks from rodent-borne diseases by means of ecological studies of rodent reservoirs. *Military Medicine* 167:70-73.
- Hubbert WT, and Goldenberg MI (1970). Natural resistance to plague: genetic basis in the vole (*Microtus californicus*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19:1015-1019.
- Isaacson M, Taylor P, and Arntzen L (1983). Ecology of plague in Africa: response of indigenous wild rodents to experimental plague infection. *Bulletin of the World Health Organization* 61:339-344.
- Keeling MJ, and Gilligan CA (2000). Metapopulation dynamics of bubonic plague. *Nature* 407:903-906.
- Koskinen MT, Haugen TO, and Primmer CR (2002). Contemporary fisherian life-history evolution in small salmonid populations. *Nature* 419:826-830.
- Lorange EA, Race BL, Sebbane F, and Hinnebusch J (2005). Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis*. *The Journal of Infectious Diseases* 191:1907-1912.
- Migliani R, Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, Boutin JP, Ratsifasoamanana L, et al. (2006). Epidemiological trends for human plague in Madagascar during the second half of the 20th century: a survey of 20 900 notified cases. *Tropical Medicine and International Health* 11:1228-1237.
- Mills JN (2005). Regulation of Rodent-Borne viruses in the natural host: implications for human disease. *Archives of Virology*:45-57.
- Mills JN, Yates TL, Childs JE, Parmenter RR, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. (1995). Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus *Journal of Mammalogy* 76:716-722.
- Perry RD, and Fetherston JD (1997). *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* 10:35-66.
- Prentice MB, and Rahalison L (2007). Plague. *Lancet* 369:1196-1207.
- Quan SF, and Kartman L (1962). Ecological studies of wild rodent plague in the San Francisco Bay area of California. VIII. Susceptibility of wild rodents to experimental plague infection. *Zoonoses Research* 1:121-144.
- Quan SF, Wheeler CM, Goldenberg MI, and Kartman L (1965). The susceptibility of *Rattus* species from two areas of Hawaii to infection with *Pasteurella pestis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 14:638-642.

Rahalison L, Ranjalaly M, Duplantier J-M, Duchemin J-B, Ravelosaona J, Ratsifasoamanana L, et al. (2003). Susceptibility to plague of the rodents in Antananarivo, Madagascar. in *The genus Yersinia*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Rahelinirina S (2009). Le risque pesteux dans les foyers ruraux du Moyen-Ouest malgache: déplacements et structuration des populations de rats noirs de l'échelle de l'habitat à celle du paysage. Thesis. Antananarivo, Antananarivo.

Rasoamanana B, Leroy F, Boisier P, Rasolomaharo M, Buchy P, Carniel E, et al. (1997). Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4:587-591.

Sebbane F, Gardner D, Long D, Gowen BB, and Hinnebusch J (2005). Kinetics of disease progression and host response in a rat model of bubonic plague. *American Journal of Pathology* 166:1427-1439.

Shepherd AJ, Leman PA, and Hummitzsch DE (1986). Experimental plague infection in South African wild rodents. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 96:171-183.

Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, et al. (2008). Plague: Past, present, and future. *Plos Medicine* 5:9-13.

Thomas RE, Barnes AM, Quan TJ, Beard ML, Carter LG, and Hopia CE (1988). Susceptibility to *Yersinia pestis* in the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *Journal of Wildlife Diseases* 24:327-333.

Tollenaere C, Brouat C, Duplantier JM, Rahalison L, Rahelinirina S, Pascal M, et al. (in press). Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *Journal of Biogeography*.

Twigg GI (1978). The role of rodents in plague dissemination: a worldwide review. *Mammal Review* 8:77-110.

Woolhouse MEJ, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, and Levin BR (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* 32:569-577.

World Health Organization (2003). Human plague in 2000-2001. *Weekly Epidemiological Record* 78:130-135.

Table 1: Plague challenge experiments conducted

Experiment		i1	i2	i3	i4	i5	i6	i7
Date		15/02/07	27/09/07	26/05/08	26/05/08	04/06/07	16/10/07	23/05/08
Origin* (locality)		C. H. (INA + MAN)	C. H. (INA)	C. H. (INA)	C. H. (INA)	L. A. (BRI + MIA)	L. A. (TSO + MIA)	L. A. (BRI + MIA + TSO)
Bacterial dose		10 ⁵	125	1000	2.10 ⁵	150	750	4150
Number of rats %	Infested	146	82	86	31	12	20	22
	Dead	76 52.1 %	15 18.3 %	5 5.8 %	6 19.4 %	10 83.3%	18 90 %	20 90.9 %
	Surviving seronegative	4 5.7 %	16 23.9 %	30 37.0 %	0 0 %	N.A.	N.A.	N.A.

* C.H. = Central Highlands, L.A.= Low altitude (for precise location, see Fig. 1).

N.A.= not analyzed.

Percentages are calculated par rapport to the total number of analysed rats, except for surviving seronegative where it is a percentage of the survivors.

Figures

Figure 1: Location of study sites and plague focus in Madagascar.

Dotted line: limits of the main plague focus. Grey area: zone where altitude is higher than 800 meters. Triangles: sampling sites [Brickville (BRI), Inanantonana (INA), Mangarano (MAN), Miandrivazo (MIA) and Tsarasambo (TSO)]. Open circles: localities considered by Rahalison et al. (2003).

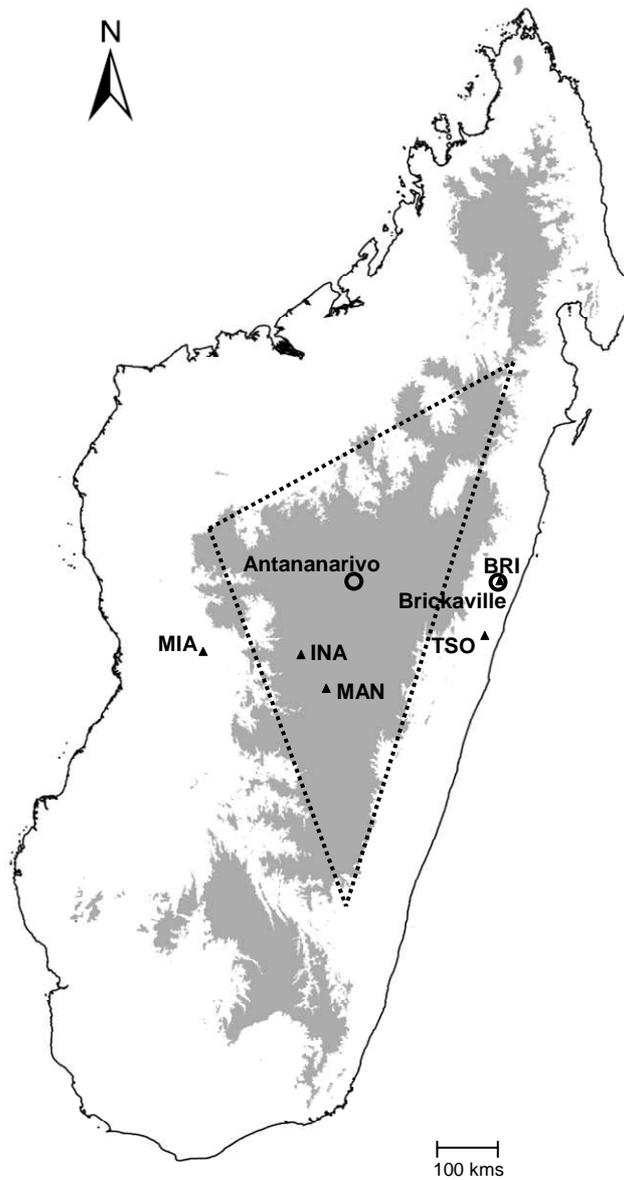


Figure 2: Dose-response curves in term of mortality rate for the rats originating from the plague focus (central highlands, triangles) and rats originating from the plague-free zone (low altitude zone, squares). Mortality rates are indicated for each infection experiment, along with their binomial confidence interval (Clopper and Pearson 1934).

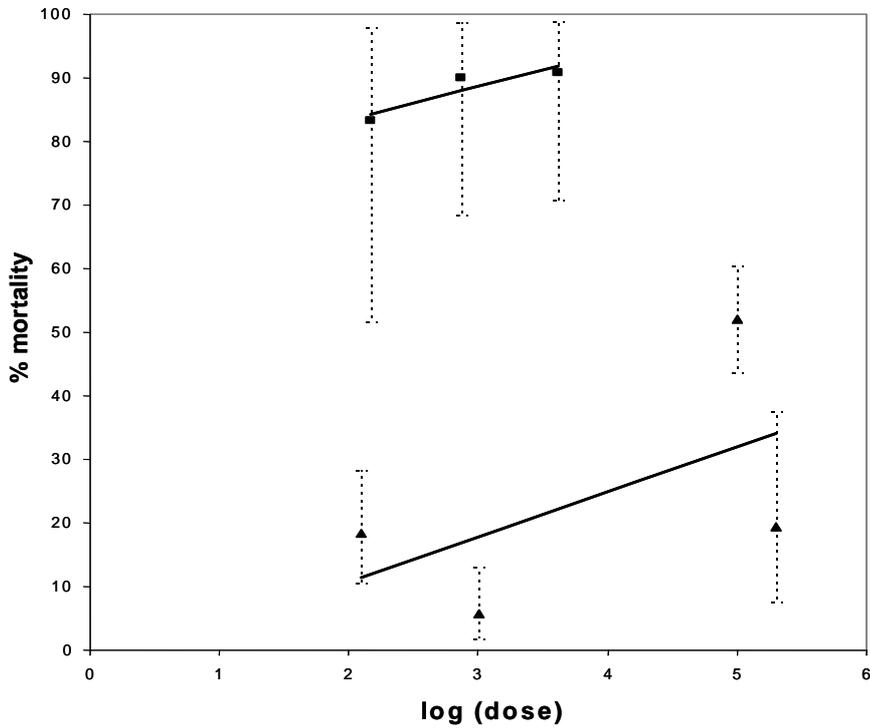
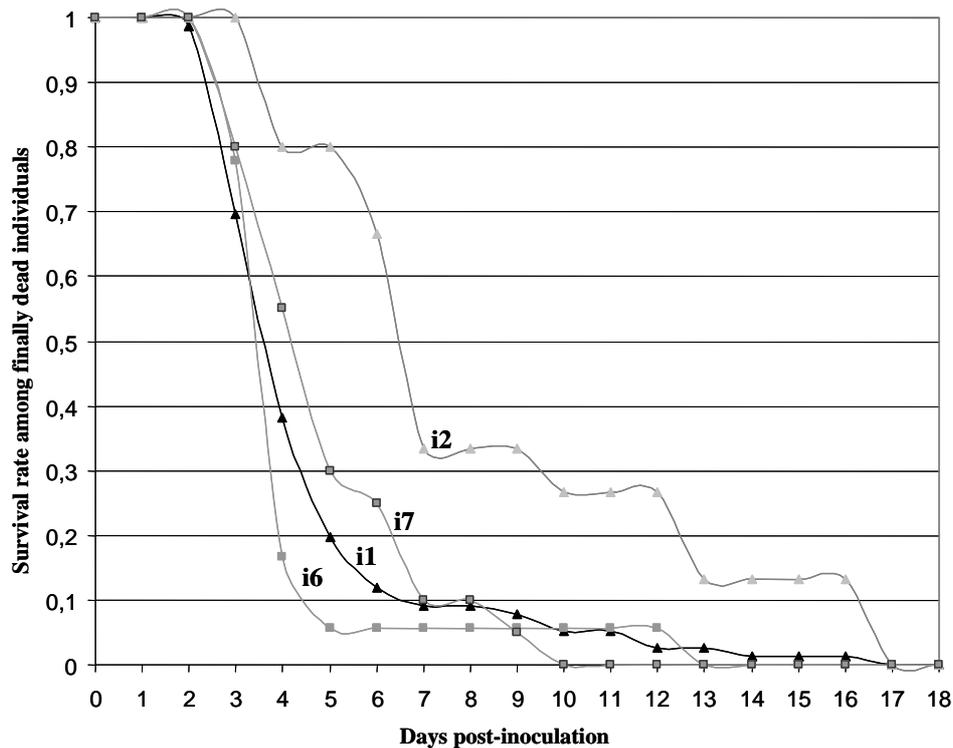


Figure 3: Kinetics of mortality for experiments resulting with more than 14 dead individuals. For each day after plague challenge, the proportion of surviving individuals among finally (after 18 days) dead individuals was calculated.

i1 (black) was a high dose infection whereas i2, i6 and i7 (grey) were low or moderate dose infections. i1 and i2 were infections rats from the plague focus whereas i6 and i7 used rats from the plague-free zone.



Article III

CCR5 polymorphism and plague resistance in natural populations of the black rat in Madagascar

C. Tollenaere, L. Rahalison, M. Ranjalahy, S. Rahelinirina, J.-M. Duplantier, C. Brouat

Infection, Genetics and Evolution 2008 **8**: 891-897.



Short communication

CCR5 polymorphism and plague resistance in natural populations of the black rat in Madagascar

C. Tollenaere^{a,*}, L. Rahalison^b, M. Ranjalahy^b, S. Rahelinirina^b, J.-M. Duplantier^a, C. Brouat^a^aIRD UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), Campus International Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier sur Lez Cedex, France^bInstitut Pasteur de Madagascar (IPM), Unité Peste, BP1274, Ambatofotsikely, 101 Antananarivo, Madagascar

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2008

Received in revised form 11 July 2008

Accepted 12 July 2008

Available online 25 July 2008

Keywords:

Infectious disease resistance

Yersinia pestis

Chemokine receptor

Candidate gene

Immunogenetics

ABSTRACT

Madagascar remains one of the world's largest plague foci. The black rat, *Rattus rattus*, is the main reservoir of plague in rural areas. This species is highly susceptible to plague in plague-free areas (low-altitude regions), whereas rats from the plague focus areas (central highlands) have evolved a disease-resistance polymorphism. We used the candidate gene CCR5 to investigate the genetic basis of plague resistance in *R. rattus*. We found a unique non-synonymous substitution (H184R) in a functionally important region of the gene. We then compared (i) CCR5 genotypes of dying and surviving plague-challenged rats and (ii) CCR5 allelic frequencies in plague focus and plague-free populations. Our results suggested a higher prevalence of the substitution in resistant animals compared to susceptible individuals, and a tendency for higher frequencies in plague focus areas compared to plague-free areas. Therefore, the CCR5 polymorphism may be involved in Malagasy black rat plague resistance. CCR5 and other undetermined plague resistance markers may provide useful biological information about host evolution and disease dynamics.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Evolutionary biology is increasingly concerned with the study of infectious diseases (Levin et al., 1999; Quintana-Murci et al., 2007; Nesse and Stearns, 2008), for example host heterogeneity in disease susceptibility, which is thought to play a major role in disease persistence (Anderson and May, 1991; Dwyer et al., 1997; Woolhouse et al., 1997). Molecular advances make possible the study of the genetic basis of host resistance (Cooke and Hill, 2001). Immunogenetics has mainly focused on MHC (Major Histocompatibility Complex) genes, but many other genes influence host-parasite interactions and can result in differences in the resistance/susceptibility of hosts to parasites (Acevedo-Whitehouse and Cunningham, 2006). Evolutionary studies are of particular interest in the context of emerging or re-emerging diseases (Woolhouse, 2002) that represent a substantial global threat to human health, such as plague (*Yersinia pestis* infection, Daszak et al., 2000; Prentice and Rahalison, 2007; Stenseth et al., 2008).

Plague arrived in Madagascar during the last pandemic (Tamatave harbour, 1898), and has been endemic in the central highlands since the 1920s (Brygoo, 1966). Since its worldwide re-

emergence in the 1980–1990s (Chanteau et al., 1998; Migliani et al., 2006), Madagascar has been one of the world's main foci, accounting for 41% of the world's reported cases in 2000–2001 (1619 suspected cases, WHO, 2003). The main reservoir of plague in Malagasy central highlands is the black rat, *Rattus rattus* (Brygoo, 1966; Duplantier et al., 2003). *Rattus* species are known to exhibit variability in plague susceptibility (Chen and Meyer, 1974). In Madagascar, experimental infestations and breeding strongly suggest the evolution of a genetically based plague resistance in rat populations inside plague focus: *R. rattus* of the plague-free regions (low altitude zone, <800 m) are very susceptible, whereas the rats from plague focus (central highland zone, >800 m) present resistance (Rahalison et al., 2003).

Plague was proposed as the possible past selective pressure acting on the human CCR5 (chemokine receptor 5) gene (Stephens et al., 1998). A mutant allele of the CCR5 gene, CCR5-Δ32 (32-base pair deletion resulting in a null allele), confers resistance to HIV infection (Samson et al., 1996) and delays the onset of AIDS (Dean et al., 1996). The question of the evolution of allelic frequencies at the CCR5 human locus is still intensively debated, with some arguing that the pattern of variation is consistent with neutral evolution (Sabeti et al., 2005), whereas others have invoked ancestral selection by other pathogens (Novembre et al., 2005). Although plague has been suggested as this past disease (Stephens et al., 1998, but see Cohn and Weaver, 2006; Hedrick and Verrelli,

* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 62 33 31; fax: +33 4 99 62 33 45.
E-mail address: tollena@supagro.inra.fr (C. Tollenaere).

2006), more recently, the hypothesis of smallpox as past selective pressure on human CCR5 gene has been favoured (Galvani and Slatkin, 2003).

However, a role for CCR5 in plague resistance in rodents cannot be ruled out, as different studies provided contrasting results. Comparing plague-challenged CCR5-deficient mice and control mice, Elvin et al., 2004; Mecsas et al. (2004) and Styer et al. (2007) revealed no difference in survival rates. However, plague response is thought to be very different between mice and rats (Pollitzer, 1954, cited in Sebbane et al., 2005). On the other hand, some important immunological processes differed between CCR5-deficient mice and control mice: macrophage uptake intensity was higher in wild type (Elvin et al., 2004) and circulating chemoattractant levels were higher in CCR5-deficient mice (Styer et al., 2007).

Indeed, chemokine receptor genes such as CCR5 are likely to contribute to immunity against plague. Chemokines (chemoattractant cytokines) play a key role in inflammation regulation by attracting leucocytes to the site of inflammation (Rollins, 1997; Baggiolini, 1998). In particular, the CCR5 receptor is mainly involved in *Th1* immune responses and macrophage migration (Mackay, 2001). Plague is characterized by the rapidity of its symptoms (e.g., death within three–four days in laboratory rats, Sebbane et al., 2005), which suggests that the innate immune defences of most hosts are not effective against this pathogen. Indeed, *Y. pestis* virulence factors (Type III secretion system) are thought to paralyze the phagocytic machinery of innate immune cells and delay inflammatory cell recruitment to the site of infection (Cornelis, 2000; Bubeck et al., 2007; Navarro et al., 2005). This delayed inflammatory response may contribute to *Y. pestis* invasion success (Bubeck et al., 2007). Moreover, treatment of mice with proinflammatory cytokines (TNF- α and IFN- γ) enhances survival upon plague inoculation (Nakajima and Brubaker, 1993). Thus, host resistance could be due to quicker inflammatory cell recruitment. Unfortunately, immunological studies have focused on susceptible laboratory animals, and there is a lack of comparative data from resistant and susceptible rodents to clarify differences in immunological processes, notably chemokine levels. However, through its involvement in macrophage migration and possible consequences for inflammation speed and intensity, CCR5 could be a candidate gene for differences in plague susceptibility.

Despite these laboratory studies and intensive research in humans (review in de Silva and Stumpf, 2004), the CCR5 polymorphism has been poorly studied in natural populations (but see Zhang et al., 2003 for primates) and there have been no studies concerning wild rodents exposed to plague infections. We thus decided to investigate CCR5 as a candidate gene for plague resistance in natural populations of black rats in Madagascar. Two complementary approaches were carried out. First, we first used animals experimentally challenged with *Y. pestis*, and we compared the CCR5 genotypes of susceptible (die following exposure to low dose) and resistant (survive following exposure to high dose) rats. Second, we compared CCR5 allelic frequencies in black rat populations from plague-free and plague focus areas.

2. Materials and methods

2.1. Rat sampling

Between 1999 and 2007, rats were live-caught using wire-meshed and Sherman traps in houses and outdoors in 15 localities in Madagascar (Fig. 1), following the protocol described in Gilabert et al. (2007). At least 25 rats were trapped at each study site. Some animals caught in the plague focus (from seven localities, Fig. 1) were brought alive to the laboratory for experimental challenge (at

least ten days of quarantine after trapping). Others (from six localities in low-altitude areas, and two localities in the plague focus, Fig. 1) were euthanized after capture by cervical dislocation and autopsied. For each individual, a piece of ear, or tail, was kept in 95 °C ethanol for genetic analyses.

2.2. Experimental plague challenge

In order to contrast plague-susceptible and plague-resistant individuals, rats from the plague focus area were experimentally infected with virulent *Y. pestis*. First, the plague serology status of each animal was established using a specific antibody assay (ELISA IgG anti-F1) (Rasoamanana et al., 1997; Dromigny, 1997), and only seronegative (supposed plague naïve) individuals were included in these experiments. Plague inoculations were performed by subcutaneous injection of 100 μ L of *Y. pestis* suspension into the left thigh. The same *Y. pestis* strain, originating from a Malagasy patient and highly virulent in inoculated mice, was used throughout. Inoculated rats were monitored for three weeks.

At the individual level, the outcome of plague challenge is strongly related to the injected *Y. pestis* dose. The infectious dose that kills an individual rat is likely to show a continuous distribution within a population. However, clearly the critical dose for an individual cannot be measured and thresholds must be used to discriminate between relatively susceptible and relatively resistant phenotypes. We therefore conducted analyses on three data sets using the results of previous experiments (Rahalison et al., 2003) to determine experimental doses and define thresholds.

The first data set (E1) was obtained from previous experimental infections made on batches of rats from different populations and infected with increasing doses of *Y. pestis*. The dose that kills 100% of the rats from plague-free areas (100 cfu) was used as a threshold to define susceptible individuals, while the dose known to kill 50% of rats from the plague focus (10^5 cfu) was used as a threshold to define relatively plague-resistant individuals. The same preliminary studies have shown that, as defined by these thresholds, both susceptible and resistant rats occur inside the plague focus. The natural plague dose received by rats is thought to be highly variable. According to Lorange et al. (2005), most blocked fleas would inject less than 100 cfu (45% did not transmit any bacteria), but some would transmit as many as 4000 *Y. pestis*. Moreover, the dose injected into a rat during a plague outbreak may increase with the number of fleas it carries (as many as 50 fleas were found on a single rat, J.M. Duplantier, personal communication.). In this first data set, only rats killed at doses lower than 100 cfu (susceptible individuals) and rats surviving at doses higher than 10^5 cfu (resistant individuals) were included in the analyses. The data set included 40 rats from six highland populations (Fig. 1): ATO (three resistant (r)/one susceptible (s)), AIM (2 r/2 s), AIT (4 r/6 s), ANT (1 r/4 s), MAN (7 r/3 s) and MOR (5 r/2 s).

The second data set (E2, $N = 53$) concerned individuals from one locality of the highlands (Inanantonana, INA, Fig. 1) challenged with 10^5 cfu. This allowed us to compare 10^5 cfu-resistant individuals (those that have survived) against the others. Based on the preliminary experiments, this would allow a comparison between the bottom 50% and the top 50% of animals in terms of resistance. The third data set (E3, $N = 60$) also involved rats from Inanantonana, but sampled six months later and challenged with 100 cfu. This allowed a comparison of 100 cfu-susceptible individuals against the others. As expected from previous experiments, in the second data set, approximately 50% (70/146) of animals survived a challenge of 10^5 cfu, and in the third data set about 80% (67/82) of animals survived a challenge of 100 cfu (C. Tollenaere, personal communication.). Thus, within the plague focus, approxi-

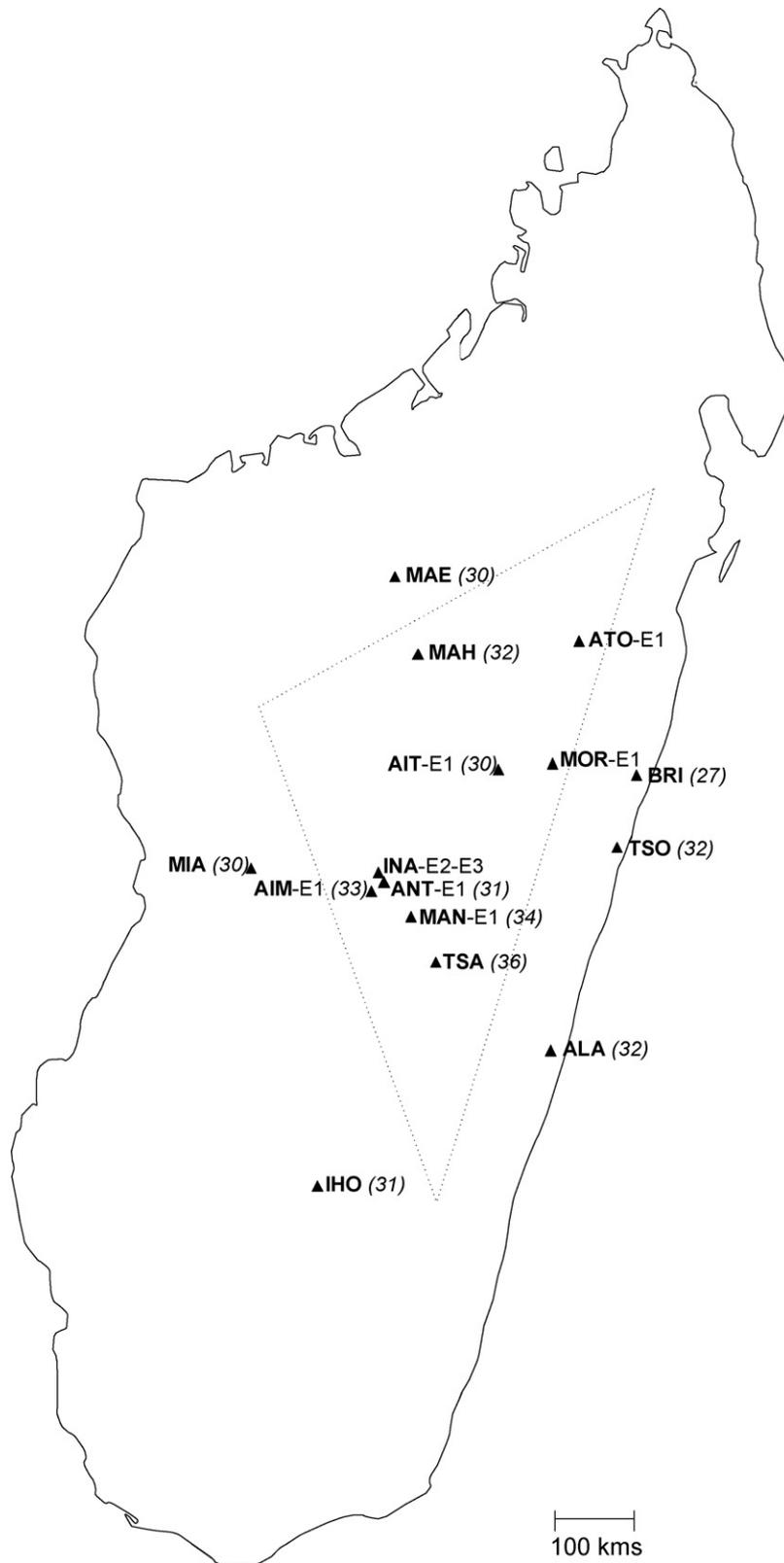


Fig. 1. Localization of sampling sites in Madagascar. Each site is located by a black triangle: Ambalatenona (ALA), Ambatosoratra (ATO), Ambohimambola (AIM), Ambohitseheno (AIT), Antahobe (ANT), Brickaville (BRI), Ihosy (IHO), Inanantonana (INA), Maevatanana (MAE), Mahatsinjo (MAH), Mangarano (MAN), Miandrivazo (MIA), Morarano Gara (MOR), Tsarasambo (TSO), Tsarasaotra (TSA). Locations used for individual plague challenges are indicated with E1, E2 and E3 (first, second and third data set respectively). Locations used for allelic frequency comparisons have their respective sample sizes indicated in brackets. The plague focus area is surrounded with a dashed line.

mately 20% of animals are susceptible to 100 cfu, compared to nearly all animals from plague-free areas (C. Tollenaere, personal communication.).

2.3. Populations used for comparing allelic frequencies

In order to compare the CCR5 allele frequencies in plague focus and plague-free areas, twelve populations were considered. Six populations were from the low altitude region: Ambalatenona (ALA), Brickaville (BRI), Iho (IHO), Maevatanana (MAE), Mian-drivazo (MIA), Tsarasambo (TSO); and six populations were from the central highlands: Ambohimambola (AIM), Ambohitseho (AIT), Antahobe (ANT), Mahatsinjo (MAH), Mangarano (MAN), Tsarasaotra (TSA), Fig. 1. Five of these populations were sampled in 1999–2000 (ALA, MAE, IHO, TSA, MAH) and seven were sampled in 2006–2007 (AIM, AIT, ANT, BRI, MAN, MIA, TSO).

2.4. DNA extraction and amplification of the CCR5 gene

Genomic DNA was extracted from rat tissue using DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions, with two final elutions of 50 μ L.

Primers were designed from a *Rattus norvegicus* sequence from GenBank (NM_053960). The forward-primer sequence is 5'-CCATCTGACCTGCTCTTC-3', and the reverse-primer sequence is 5'-AACTTCTGTCTCTCTGTGG-3'. The resulting Polymerase Chain Reaction (PCR) product is 827 bp of the total gene, of about 2500 bp (75% of 1056 bp coding region). The amplified sequence contained the region of the human deletion present in the CCR5- Δ 32 allele. PCR was conducted with a total volume of 20 μ L containing 0.4 μ M of each primer, 100 μ M dNTP, 0.1 U *Taq* polymerase (Qiagen) in appropriate 1 \times PCR buffer, and 2 μ L DNA 1/10 diluted. The PCR program began with initial denaturation (3 min, 94 $^{\circ}$ C), followed by 35 cycles of: denaturation (30 s, 92 $^{\circ}$ C), hybridization (45 s, 58 $^{\circ}$ C) and elongation (1 min, 72 $^{\circ}$ C), and ended by a final extension (10 min, 72 $^{\circ}$ C).

2.5. Polymorphism characterization

Fourteen PCR products (three from AIM locality, two from BRI, MAN and MOR and one from ALA, ATO, IHO, MAE and MIA, Fig. 1) were sent for sequencing to Genoscreen (Lille, France). Sequencing results revealed a unique substitution (A–G) at 630 bp (GenBank sequence NM_053960); hereafter, the polymorphism will be referred to as the A allele or the G allele. This substitution was then characterized in all individuals by the restriction enzyme, *Rsa*I, which specifically cuts the fragment containing the G allele. Digestions were conducted at 37 $^{\circ}$ C for four hours with a 10 μ L volume, containing 5 μ L PCR product, 1 μ g BSA, and 5 U *Rsa*I enzyme (Promega) in appropriate 1 \times buffer C (Promega). Digestion products were resolved in a 1.5% agarose gel. Homozygous individuals for the A allele presented two bands: 600 and 150 bp; homozygous individuals for the G allele presented three bands at 400, 170 and 150 bp (the last two appearing as a doublet); and heterozygote individuals presented five bands, three of which could be detected.

2.6. Data analysis

The association between phenotype and genotype in the plague infection experiments was investigated independently for each experiment using 2 \times 2 contingency tables. G allele was found at low frequency and therefore G homozygotes were very few. Thus, a recessive effect of the G allele could not be investigated because of low statistical power and we tested for a dominant effect of G allele

on plague susceptibility. The first factor is the phenotype (resistant or susceptible), as revealed by plague challenges, and the second is the presence/absence of the G allele. Relative risks (RR) were estimated as described by Haldane (1956). Two-tailed Fisher exact tests were performed for each experiment. We finally combined the results of the three different experiments using Fisher's method (Fisher, 1948).

Allelic frequencies at the CCR5 gene were estimated within populations using GENETIX software (Belkhir et al., 1996–2004). Inbreeding coefficients (F_{IS}) were also estimated and an exact test of Hardy–Weinberg equilibrium was performed in each population using the Markov chain methods implemented in GENEPOP 3.3 (Raymond and Rousset, 1995). We then performed analysis of molecular variance (AMOVA) using ARLEQUIN version 3.0 software (Excoffier et al., 2005). This analysis was conducted at three hierarchical levels of population's subdivision: among plague focus defined groups (populations inside/outside the plague focus), among populations within groups, and within populations. The significance of these parameters was estimated by 10,000 permutations. As the G allele frequency may vary substantially over the sampling period, we made sure that our results were not an artefact of sampling date by performing AMOVA separately for each of the sampling sessions (1999–2000 and 2006–2007).

3. Results and discussion

3.1. The CCR5 polymorphism in *Malagasy black rat*

The only polymorphic site identified in the 827 bp sequence of the CCR5 gene was non-synonymous. It resulted in an Arginine (R)–Histidine (H) substitution at position 184 in the protein (H184R). This is not surprising considering that most mutations described in the human CCR5 gene are also non-synonymous (13 of 16), a pattern which was attributed to past selection (Carrington et al., 1997). This substitution is located at a variable position (Carmo et al., 2006), differing between humans (NM000579), *Mus musculus* (AF022990) and *R. norvegicus* (NM05360).

Comparison with the human protein (Opperman, 2004) revealed that this substitution affects an amino acid located in the second extracellular loop, which seems to be the unique domain involved in chemokine binding (Wu et al., 1997; Zhou et al., 2000). Moreover, site-directed mutagenesis in humans revealed that position 184 influences RANTES fixation (Dragic et al., 1998). Although both amino acids R and H belong to the same functional family of dibasic amino acids, various studies showed that this change could have high functional significance (e.g., in severe insulin resistance: Nakashima et al., 1995, or language disorder: Lai et al., 2001). Although proving the functional significance of this substitution would require physiological or biochemical studies in this model, the literature shows that functional significance of the substitution H184R is likely.

3.2. The CCR5 polymorphism between resistant/susceptible rats

Results of plague challenges are reported in Table 1. In the first data set (E1), the relatively resistant category of individuals (top 50% of animals, in terms of resistance) presented the G allele significantly more often than susceptible individuals (bottom 20% of animals in terms of resistance; RR = 4.839, p = 0.027). In the second data set (E2), the same tendency towards an excess of the G allele in relatively resistant animals (top 50%) compared to more susceptible animals (bottom 50%) was observed, although the difference was not significant (RR = 2.617, p = 0.148). In the third data set (E3), the comparison was between the most susceptible 20% and the remaining 80% of animals. Here we found no difference between

Table 1
Individual comparisons of CCR5 genotypes for plague-challenged animals

		CCR5 genotype				RR	p
		AA	AG	GG	RR		
E1, N = 40	Resistant	9 (40.9%)	13 (59.1%)	0 (0%)	4.839	0.027	
	Susceptible	14 (77.8%)	3 (16.7%)	1 (5.6%)			
E2, N = 53	Resistant	15 (55.6%)	10 (37.0%)	2 (7.4%)	2.617	0.148	
	Others	20 (76.9%)	6 (23.1%)	0 (0%)			
E3, N = 60	Others	36 (80.0%)	7 (15.6%)	2 (4.4%)	1	1	
	Susceptible	12 (80.0%)	2 (13.3%)	1 (6.7%)			

We considered animals that survived at doses higher than 10^5 cfu to be resistant and animals that died at doses lower than 100 cfu to be susceptible. In the first experiment (E1), we used these two thresholds, whereas in the second (E2) and the third (E3) we only used one threshold (10^5 cfu for E2 and 100 cfu for E3). *N* is the number of rats screened in each experiment. The number in each cell indicates sample size, and frequencies are in brackets.

As only six individuals had a GG genotype, a recessive effect of G allele on plague susceptibility could not be investigated, and we tested for an effect from G allele presence/absence on the plague phenotype. RR: relative risk associated with the presence (genotype AG and GG)/absence (genotype AA) of G allele, estimated as described by Haldane (1956); *p*: *p*-values associated with Fisher exact test two-tailed for the presence/absence of G allele.

the two groups (RR = 1). The Fisher's method was used to combine the probabilities of the three experiments and revealed only marginal significance ($\chi^2 = 11.045$, $p = 0.087$). The fact that significant results were only found in the first experiment (E1) could be due to the use of two thresholds, whereas the two other experiments compared only one category (resistant in E2 and susceptible in E3) against a heterogeneous pool of other individuals. Although further confirmation is needed, our results suggest a possible association between the presence/absence of G allele with individual plague resistance, with a dominant effect of G allele to A allele.

Studies on the impact of the CCR5 genotype on susceptibility to plague have already given ambiguous results in laboratory mice (Elvin et al., 2004; Styer et al., 2007). This study is, to our knowledge, the first to investigate the association between CCR5 variability and plague resistance in wild rodents. Most of the variability related to exposure was removed by challenging animals instead of comparing wild infected and healthy rats (i.e., common garden experiment, Little, 2002), as is often done in disease studies of both human (Cooke and Hill, 2001) and animal populations (e.g., Meyer-Lucht and Sommer, 2005). However, although rats were housed in controlled conditions, as rats came from natural populations and were not inbred, individual differences could also be due to other genetic and non-genetic factors such as immune and physiological status (Gage and Kosoy, 2005). Studying the CCR5 polymorphism in rat lineages differing in plague susceptibility would eliminate this individual history and would help confirm the possible involvement of CCR5 in plague resistance.

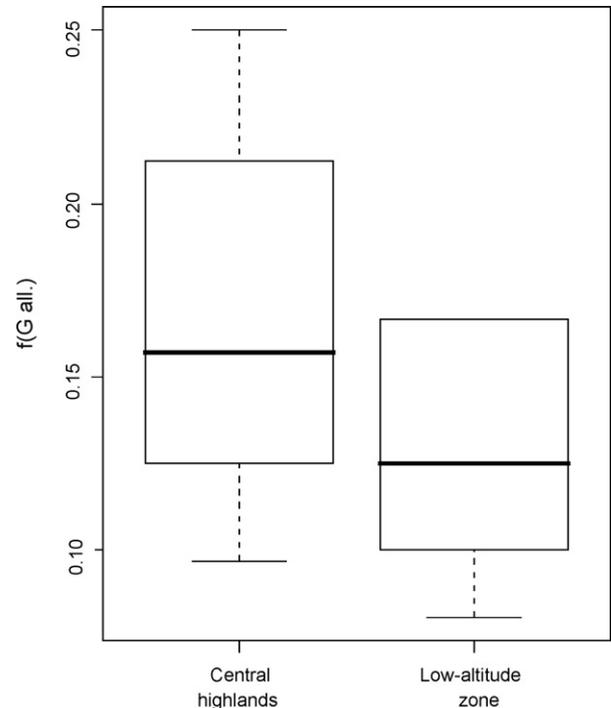
3.3. The CCR5 polymorphism between plague focus/plague-free areas

Twelve populations (378 individuals, see Fig. 1 for population size) were genotyped for the CCR5 substitution. All populations

Table 2
Analyses of molecular variance (AMOVA) in black rat populations

	df	Variance component	Percentage of variation	<i>p</i> -Value	Statistics
Among groups	1	0.0004	0.33	0.164	$\varphi_{CT} = 0.0033$
Among populations within groups	10	0.0002	0.12	0.186	$\Phi_{SC} = 0.0013$
Within populations	744	0.1251	99.54	0.231	$\Phi_{ST} = 0.0046$

The two groups consisted of populations from the central highlands area (plague focus) and those from low altitude zone (plague-free).

**Fig. 2.** Boxplot representation of G allele frequencies split according to area: plague focus (central highlands) and plague-free zone (low-altitude zone). Medians are plotted for each zone. Boxes contain 75% of observations and error bars contain the more extreme values.

exhibited Hardy-Weinberg equilibrium at this gene ($-0.186 < F_{IS} < 0.216$, $p > 0.05$).

Analysis of molecular variance revealed no significant differentiation between the two groups, plague focus and plague-free populations ($p = 0.164$, Table 2). However, the proportion of variance due to differences among groups was higher than the one among populations within groups (Table 2). Moreover, as expected from resistant/susceptible individual comparisons, the mean value for G allele frequencies was higher in the central highlands (0.166 ± 0.057) compared to the low altitude region (0.127 ± 0.035 ; Fig. 2). This result, although insignificant, showed a tendency for a higher G allele frequency in the plague focus area compared to the plague-free area, and was also found after analysing each sampling session independently. Although weakly supported, these results are concordant with the CCR5 polymorphism influencing plague resistance.

G allele frequencies were quite low in each population (between 9.7 and 21.2%). Considering that this allele may be associated with a beneficial effect of plague resistance, this low frequency could result from the evolutionary cost of this allele. In accordance with this hypothesis, spatial variability of G allele frequencies was important, particularly in the central highlands and even at a local scale (ANT, 9.7% G allele, and AIM, 21.2%, were only separated by about 20 km). This could be the result of variability in population history of exposure to plague. Indeed,

rodent plague epidemics may be very local, as seroprevalence levels show high variability at a local scale (from 0 to 50% seroprevalence in villages separated by up to 12 km, Dromigny, 1997). Neutral evolutionary forces (migration and drift) may also be important in driving CCR5 variation patterns. Analyses of neutral markers (microsatellites) showed that Malagasy black rat populations could be genetically differentiated on a relatively small spatial scale (Gilbert et al., 2007). In this way, studying CCR5 allelic frequencies in *R. rattus* populations on a smaller scale, with regard to plague circulation indicators (such as seroprevalence), could be useful to further investigate the impact of CCR5 polymorphism on plague resistance.

4. Conclusion

Since plague is widespread in rodent reservoirs, it cannot be eradicated and therefore, understanding the dynamics of these wildlife reservoirs is critical (Stenseth et al., 2008). Although other pathogens (especially smallpox) now seem more likely than plague to be responsible for historical selection pressures on human CCR5- Δ 32 (Cohn and Weaver, 2006), the CCR5 gene could play a role in plague immunity, especially in animal reservoirs. Indeed, Elvin et al. (2004) showed that macrophage uptake of mice is affected by the CCR5 mutation. In our study, one allele, which affects the CCR5 amino acid sequence, seems to be more prevalent in resistant than in susceptible individuals. We therefore expected higher frequencies of this allele in plague focus than in plague-free areas. This tendency was found, although results were statistically insignificant. Consequently, although remaining to be confirmed, a role for this CCR5 polymorphism in plague resistance of natural populations of *R. rattus* in Madagascar cannot be ruled out. However, CCR5 would probably be a minor gene contributing to a polygenic determined resistance, the more frequent genetic basis for susceptibility to infectious diseases (Woolhouse et al., 2002). Determining the other plague resistance genetic determinants in Malagasy black rats is now essential to provide a better understanding of plague repartition, dynamics and evolution.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the Plague laboratory of the Institut Pasteur de Madagascar for assistance during the fieldwork and serological analysis. The manuscript benefited from the helpful comments of Nathalie Charbonnel, Florent Sebbane and Sandra Telfer. We thank Christian Demeure for his commentary on immunological processes and Anne Loiseau for her advice on molecular biology. Funding was provided by the IRD (Institut de Recherche pour le Développement), the IPM (Institut Pasteur de Madagascar) and an ANR-SEST (Agence Nationale pour la Recherche, Santé-Environnement et Santé-Travail) program on plague diffusion.

References

Acevedo-Whitehouse, K., Cunningham, A.A., 2006. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends in Ecology and Evolution* 21, 433–438.

Anderson, R., May, R., 1991. *Infectious Diseases in Humans*. Oxford University Press, Oxford.

Baggiolini, M., 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565–568.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour le génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université Montpellier II, Montpellier (France).

Brygoo, E.R., 1966. Épidémiologie de la peste à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 35, 9–147.

Bubeck, S.S., Cantwell, A.M., Dube, P.H., 2007. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infection and Immunity* 75, 697–705.

Carmo, C.R., Esteves, P.J., Ferrand, N., van der Loo, W., 2006. Genetic variation at chemokine receptor CCR5 in leporids: alteration at the 2nd extracellular domain by gene conversion with CCR2 in *Oryctolagus*, but not *Sylvilagus* and *Lepus* species. *Immunogenetics* 58, 494–501.

Carrington, M., Kissner, T., Gerrard, B., Ivanov, S., O'Brien, S.J., Dean, M., 1997. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *American Journal of Human Genetics* 61, 1261–1267.

Chanteau, S., Ratsifasoamanana, L., Rasoamanana, B., Rahalison, L., Randriambeloso, J., Roux, J., Rabeson, D., 1998. Plague as a re-emerging disease in Madagascar. *Emerging Infectious Diseases* 4, 101–104.

Chen, T.H., Meyer, K.F., 1974. Susceptibility and antibody response of *Rattus* species to experimental plague. *The Journal of Infectious Diseases* 129, S62.

Cohn, S.K., Weaver, L.T., 2006. The Black Death and AIDS: CCR5-Delta 32 in genetics and history. *Quarterly Journal of Medicine* 99, 497–503.

Cornelis, G.R., 2000. Molecular and cellular biology aspects of plague. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8778–8783.

Cooke, G.S., Hill, A.V.S., 2001. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nature Reviews Genetics* 2, 967–977.

Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443–449.

de Silva, E., Stumpf, M.P.H., 2004. HIV and the CCR5-Delta 32 resistance allele. *FEMS Microbiology Letters* 241, 1–12.

Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., O'Brien, S.J., 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 273, 1856–1862.

Dragic, T., Trkola, A., Lin, S.W., Nagashima, K.A., Kajumo, F., Zhao, L., Olson, W.C., Wu, L.J., Mackay, C.R., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Moore, J.P., Maddon, P.J., 1998. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of Virology* 72, 279–285.

Dromigny, J.-A., 1997. Contribution à la connaissance du cycle épidémiologique de la peste à Madagascar: étude sérologique des rats et des musaraignes. DEA Paris VI 52.

Duplantier, J.-M., Catalan, J., Orth, A., Grolleau, B., Britton-Davidian, J., 2003. Systematics of the black rat in Madagascar: consequences for the transmission and distribution of plague. *Biological Journal of the Linnean Society* 78, 335–341.

Dwyer, G., Elkinton, J.S., Buonaccorsi, J.P., 1997. Host heterogeneity in susceptibility and disease dynamics: tests of a mathematical model. *American Naturalist* 150, 685–707.

Elvin, S.J., Williamson, E.D., Scott, J.C., Smith, J.N., de Lema, G.P., Chilla, S., Clapham, P., Pfeffer, K., Schlondorff, D., Luckow, B., 2004. Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection. *Nature* 430, 417.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–50.

Fisher, R.A., 1948. Combining independent tests of significance. *American Statistician* 2, 30.

Gage, K.L., Kosoy, M.Y., 2005. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annual Review of Entomology* 50, 505–528.

Galvani, A.P., Slatkin, M., 2003. Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5-Delta 32 HIV-resistance allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15276–15279.

Gilbert, A., Loiseau, A., Duplantier, J.M., Rahelinirina, S., Rahalison, L., Chanteau, S., Brouat, C., 2007. Genetic structure of black rat populations in a rural plague focus in Madagascar. *Canadian Journal of Zoology* 85, 965–972.

Haldane, J.B.S., 1956. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Annals of Human Genetics* 20, 309–311.

Hedrick, P.W., Verrelli, B.C., 2006. 'Ground truth' for selection on CCR5-Delta 32. *Trends in Genetics* 22, 293–296.

Lai, C.S.L., Fisher, S.E., Hurst, J.A., Vargha-Khadem, F., Monaco, A.P., 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413, 519–523.

Levin, B.R., Lipsitch, M., Bonhoeffer, S., 1999. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283, 806–809.

Little, T.J., 2002. The evolutionary significance of parasitism: do parasite-driven genetic dynamics occur *ex silico*? *Journal of Evolutionary Biology* 15, 1–9.

Lorange, E.A., Race, B.L., Sebbane, F., Hinnebusch, J., 2005. Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis*. *The Journal of Infectious Diseases* 191, 1907–1912.

Mackay, C.R., 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature Immunology* 2, 95–101.

Mecas, J., Franklin, G., Kuziel, W.A., Brubaker, R.R., Falkow, S., Mosier, D.E., 2004. CCR5 mutation and plague protection. *Nature* 427, 606.

Meyer-Lucht, Y., Sommer, S., 2005. MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Molecular Ecology* 14, 2233–2243.

Migliani, R., Chanteau, S., Rahalison, L., Ratsitorahina, M., Boutin, J.P., Ratsifasoamanana, L., Roux, J., 2006. Epidemiological trends for human plague in Madagascar during the second half of the 20th century: a survey of 20 900 notified cases. *Tropical Medicine and International Health* 11, 1228–1237.

- Nakajima, R., Brubaker, R.R., 1993. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor. *Infection and Immunity* 61, 23–31.
- Nakashima, N., Umeda, F., Yanase, T., Nawata, H., 1995. Insulin-resistance associated with substitution of histidine for arginine-252 in the alpha-subunit of the human insulin-receptor-trial of insulin-like growth-factor-1 injection therapy to enhance insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80, 3662–3667.
- Navarro, L., Alto, N.M., Dixon, J.E., 2005. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Current Opinion in Microbiology* 8, 21–27.
- Nesse, R.M., Stearns, S.C., 2008. The great opportunity: evolutionary applications to medicine and public health. *Evolutionary Applications* 1, 28–48.
- Novembre, J., Galvani, A.P., Slatkin, M., 2005. The geographic spread of the CCR5 Delta 32 HIV-resistance allele. *PLoS Biology* 3, 1954–1962.
- Opperman, M., 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function and regulation. *Cellular Signalling* 16, 1201–1210.
- Prentice, M.B., Rahalison, L., 2007. Plague. *Lancet* 369, 1196–1207.
- Pollitzer, R., 1954. Plague. World Health Organization, Geneva.
- Quintana-Murci, L., Alcais, A., Abel, L., Casanova, J.L., 2007. Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nature Immunology* 8, 1165–1171.
- Rahalison, L., Ranjalahy, M., Duplantier, J.-M., Duchemin, J.-B., Ravelosoaona, J., Ratsifasoamanana, L., Chanteau, S., 2003. Susceptibility to plague of the rodents in Antananarivo Madagascar. In: *The Genus Yersinia*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Rasoamanana, B., Leroy, F., Boisier, P., Rasolomaharo, M., Buchy, P., Carniel, E., Chanteau, S., 1997. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4, 587–591.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop version 3: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Rollins, B.J., 1997. Chemokines. *Blood* 90, 909–928.
- Sabeti, P.C., Walsh, E., Schaffner, S.F., Varilly, P., Fry, B., Hutcheson, H.B., Cullen, M., Mikkelsen, T.S., Roy, J., Patterson, N., Cooper, R., Reich, D., Altshuler, D., O'Brien, S., Lander, E.S., 2005. The case for selection at CCR5-Delta 32. *PLoS Biology* 3, 1963–1969.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cogniaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y.J., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G., Parmentier, M., 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722–725.
- Sebbane, F., Gardner, D., Long, D., Gowen, B.B., Hinnebusch, J., 2005. Kinetics of disease progression and host response in a rat model of bubonic plague. *American Journal of Pathology* 166, 1427–1439.
- Stenseth, N.C., Atshabar, B.B., Begon, M., Belmain, S.R., Bertherat, E., Carniel, E., Gage, K.L., Leirs, H., Rahalison, L., 2008. Plague: past, present and future. *PLoS Medicine* 5, 9–13.
- Stephens, J.C., Reich, D.E., Goldstein, D.B., Shin, H.D., Smith, M.W., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Allikmets, R., Schriml, L., Gerrard, B., Malasky, M., Ramos, M.D., Morlot, S., Tzetzis, M., Oddoux, C., di Giovine, F.S., Nasioulas, G., Chandler, D., Aseev, M., Hanson, M., Kalaydjieva, L., Glavac, D., Gasparini, P., Kanavakis, E., Claustres, M., Kambouris, M., Ostrer, H., Duff, G., Baranov, V., Sibul, H., Metspalu, A., Goldman, D., Martin, N., Duffy, D., Schmidtke, J., Estivill, X., O'Brien, S.J., Dean, M., 1998. Dating the origin of the CCR5-Delta 32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics* 62, 1507–1515.
- Styer, K.L., Click, E.M., Hopkins, G.W., Frothingham, R., Aballay, A., 2007. Study of the role of CCR5 in a mouse model of intranasal challenge with *Yersinia pestis*. *Microbes and Infection* 9, 1135–1138.
- Woolhouse, M.E.J., Dye, C., Etard, J.-F., Smith, T., Charlwood, J.D., Garnett, G.P., Hagan, P., Hii, J.L.K., Ndhlovu, P.D., Quinell, R.J., Watts, C.H., Chandiwana, S.K., Anderson, R., 1997. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 338–342.
- Woolhouse, M.E.J., 2002. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends in Microbiology* 10, S3–S7.
- Woolhouse, M.E.J., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* 32, 569–577.
- World Health Organisation, 2003. Human plague in 2000–2001. *Weekly Epidemiological Record* 78, 130–135.
- Wu, L.J., LaRosa, G., Kassam, N., Gordon, C.J., Heath, H., Ruffing, N., Chen, H., Humblias, J., Samson, M., Parmentier, M., Moore, J.P., Mackay, C.R., 1997. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *Journal of Experimental Medicine* 186, 1373–1381.
- Zhang, Y.W., Ryder, O.A., Zhang, Y.P., 2003. Intra- and interspecific variation of the CCR5 gene in higher primates. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1722–1729.
- Zhou, N.M., Luo, Z.W., Hall, J.W., Luo, J.S., Han, X.B., Huang, Z.W., 2000. Molecular modeling and site-directed mutagenesis of CCR5 reveal residues critical for chemokine binding and signal transduction. *European Journal of Immunology* 30, 164–173.

Article IV

AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection

C. Tollenaere, J.-M. Duplantier, L. Rahalison, M. Ranjalahy, C. Brouat

Soumis à *Molecular Ecology*

AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection.

C. TOLLENAERE*, J.-M. DUPLANTIER*, L. RAHALISON†, M. RANJALAHY†, C. BROUAT*

* IRD UMR CBGP (INRA / IRD / Cirad / Montpellier SupAgro), Campus International Baillarguet, CS 30016, 34988 Montpellier sur Lez cedex, France.

† Institut Pasteur de Madagascar (IPM), Unité Peste, BP1274, Ambatofotsikely, 101 Antananarivo, Madagascar.

ABSTRACT

The black rat (*Rattus rattus*) is the main reservoir of plague (*Yersinia pestis* infection) in Madagascar's rural zones. This species is highly resistant to plague within the plague focus (central highland) whereas it is susceptible where the disease is absent (low altitude zone). We aimed at determining genetic markers associated with plague resistance in this species, in order to better understand plague wildlife circulation and host evolution in response to a highly virulent pathogen.

To this purpose, we used 249 AFLP markers and combined population genomics and association study in Malagasy *R. rattus*. First, simulated distributions of genetic differentiation were compared to observed data in four pairs of one population from plague focus and one from plague-free zone. We found 22 loci with higher differentiation in at least two independent population pairs, or with significant combined p-values over the four pairs. Among the 22 outlier loci, 14 presented significant association with the zone (plague focus vs plague-free zone). Population genetic structure inferred from outlier loci differed from the one from neutral loci. Second, phenotype association study revealed that two of the 22 loci were involved in differentiation between dying and surviving rats following experimental plague challenge.

The outlier loci identified in this study are candidate for undergoing plague selective pressure. Further investigation would involve localization of the AFLP marker in the genome and investigation of neighbouring candidate immune genes, which would both be facilitated by the phylogenetic proximity of the model species *R. norvegicus*.

Keyword: Adaptation genetics; Association study; Disease resistance; Pathogen-mediated selection; Population genomics; *Yersinia pestis*.

INTRODUCTION

Understanding the genetic basis of adaptation has always been a key question of evolutionary biology (Ellegren & Sheldon 2008; Orr 2005). Population genomics (Black *et al.* 2001; Luikart *et al.* 2003) now offers opportunity to address this issue by separating locus-specific effects from genome-wide demographic effects (Cavalli-Sforza 1966). Loci under natural selection are expected to present higher genetic differentiation than neutral loci between populations suffering different selective environments (Beaumont 2005). Population genome scans were thus recently performed in various wild species (see Nosil *et al.* 2009 for a review) in order to detect genetic markers associated with selective pressure such as altitude (Bonin *et al.* 2006) or pollution (Williams & Oleksiak 2008), with phenotypic differences (Herrera & Bazaga 2008), or with both adaptive phenotypic change and selective pressure: see for example ecomorphs of *Littorina* associated with microhabitats (Wilding *et al.* 2001), ecotypes of *Coregonus* varying in depth habitat (Campbell & Bernatchez 2004) or oviposition behaviour association with resistance to crop rotation in *Diabrotica* (Miller *et al.* 2007). In some cases, the validity of population genomics approach was confirmed by the collocation of identified loci with quantitative trait loci (QTL) (Campbell & Bernatchez 2004, Via & West, 2008), or by individual-based phenotype association studies (Storz 2005, see for example Gagnaire *et al.*, 2009). AFLP markers (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Bleas *et al.* 1998; Vos *et al.* 1995) are generally used for such genomic studies of non-model species because of the possibility they offer to develop an unlimited number of loci without any knowledge of the species genome and with a limited cost (Meudt & Clarke 2007).

To our knowledge, AFLP genome scans have never been applied to detect genetic markers associated with pathogen resistance in host populations. However, parasites can act as strong selective pressure on their hosts, resulting in strikingly rapid evolutionary changes (Altizer *et al.* 2003; see for example Miller & Vincent 2008). Consequently, genes involved in immune defence revealed to be strongly affected by natural selection (see for example Nielsen *et al.* 2005; Lazzaro 2008; Piertney & Oliver 2006). Investigating the genetic basis of host resistance / susceptibility has scientific interest for our understanding of the parasite's role in host evolution, and important health applications in the context of emerging and re-emerging diseases. Host resistance to infectious diseases is usually considered as a highly polygenic trait (Hill 2001; Sorci *et al.* 1997). However, QTL studies in animals usually identified a few major loci (Wilfert & Schmid-Hempel 2008). Although main studies dealing with host-pathogen interaction genetics in natural populations focused on the Major histocompatibility complex (MHC), it is now believed that MHC is not enough to understand wildlife immunogenetics (Acevedo-Whitehouse & Cunningham 2006). In the context of pathogen resistance, AFLP genome scan thus seems a relevant approach to identify candidate genes, at the genome scale and with no need of a priori knowledge about host defence mechanisms.

Plague (*Yersinia pestis* infection) is among the most virulent known pathogen for humans and susceptible rodents (Stenseth *et al.* 2008) and its epidemics may consequently act as very strong selective pressure on its hosts (for example Hanson *et al.* 2007; Thomas *et al.* 1988). The black rat (*Rattus rattus*) is the main reservoir of the disease in Madagascar (Brygoo 1966; Duplantier *et al.*

2003), where hundreds of human cases are still reported each year (WHO 2003). This species is usually considered to be highly susceptible to plague (Dennis *et al.* 1999; e.g. in Hawaiï, Quan *et al.* 1965). However, Rahalison *et al.* (2003) and Tollenaere *et al.* (pers. obs.) showed that *R. rattus* populations from Malagasy plague focus (central highlands of the country, above 800 meters) are much more resistant than black rat populations from plague-free zone (difference 1000 fold in the lethal dose for 50% individuals). This resistance is transmitted to laboratory-borne descendants (Rahalison *et al.* 2003). Plague resistance variability in *R. rattus* populations could have high impact on plague wildlife circulation as the proportion of susceptible / resistant individuals to plague in a population characterizes the role this population can play in transmission / maintenance of plague (Biggins & Kosoy 2001; Gage & Kosoy 2005). Besides its theoretical interest of how parasites shape genetic variation of their host, determining genetic markers associated with plague resistance would thus also be a step towards a better understanding of plague circulation in Malagasy focus.

Although a plague resistance locus was identified within the MHC region in mice strains (Turner *et al.* 2008), nothing ensure that the same locus would be implicated in different species (Wilfert & Schmid-Hempel 2008). Moreover, detailed mechanisms of host resistance remain poorly understood (Turner *et al.* 2008) and have never been studied in Malagasy *R. rattus*, making hazardous the definition of candidate genes (but see Tollenaere *et al.* 2008, on CCR5 candidate gene). On the other hand, this context appears highly relevant for a population genomics approach as (1) the selective pressure (plague disease) is identified and strong (2) adaptive phenotypic change (plague resistance) is characterized (3) the studied species diverged recently from the model species *R. norvegicus* (about 2.9 Myr, Robins *et al.* 2008) so that genomic resources would allow relatively easy identification of AFLP markers (Storz & Hoekstra 2007; Ellegren & Sheldon 2008).

The goal of this study is thus to identify markers potentially associated with plague resistance in Malagasy *R. rattus* populations using an AFLP genome scan. To this purpose, we sampled independent natural populations that inhabit environments with contrasting or similar selective pressures (see also Williams & Oleksiak 2008): four pairs of one population located in the plague focus (central highlands of Madagascar) and one population located in the plague-free zone (low altitude zone of the island) were analysed. We also investigated associations between AFLP markers and phenotypic variation inside the plague focus: two dataset of experimentally plague challenged individuals comparing rats that died to surviving individuals were analysed.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Black rats were sampled between April 2006 and January 2009 in eight sites of Madagascar (Fig. 1): four in the central highlands (plague focus, Ambohitsheno, AIT, 1415m, Antahobe, ANT, 1200m, Inanantonana, INA, 1268m and Morarano-Gare, MOR, 906m) and four in the low altitude zone (plague-free zone, Ankotrofotsy, ANK, 85m, Brickaville, BRI, 12m, Miandrivazo, MIA, 72m, and Tsarasambo, TSO, 15m). It resulted in four pairs of one population from plague focus and one population from plague-free zone distant (Fig. 1): two pairs in the East of the island: E1 (AIT-TSO, distant from 138.1kms) and E2 (BRI-

MOR, 85.0 kms), and two pairs in the West: W1 (ANK-ANT, 122.8kms) and W2 (INA-MIA, 123.6kms). The geographic distribution of population pairs across East and West sides of Madagascar was chosen to disentangle the correlated effects of plague presence/absence and other potential selective factors (see details in the discussion), as low altitude East and West Malagasy zones present different environmental conditions (Jury 2003).

At least 25 rats were trapped in each site using wire-meshed and Sherman traps set in houses and outdoor. Caught animals were euthanized by cervical dislocation or bred for other experiments. Tissues (ear, tail or finger) were kept in 95° ethanol for genetic analyses.

Laboratory procedures

Total DNA was extracted using the DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions adapted to rodent tails and animal tissues. DNA was finally eluted in 100µL of elution buffer. DNA concentration was estimated by a fluorimetric quantification of dsDNA using the Picogreen Kit (Molecular Probes, Invitrogen, UK).

Restriction enzymes *EcoRI* and *TaqI* were used following the protocol described in Ajmone-Marsan *et al.* (1997). Briefly, 350ng of DNA was first incubated with 5 units *TaqI* (Promega, Madison, USA) 2h at 65°C. Then the product was incubated with 5 units *EcoRI* (Promega) 1h at 37°C. Last, the solution was incubated 3h at 37°C with 1 unit DNA ligase (Promega) and *TaqI* (50pmol) and *EcoRI* (5pmol) adapters. All the reactions are performed in each enzyme buffer and with bovine serum albumine (BSA) according to the manufacturer's instructions. DNA was diluted 1:10 in water after digestions and ligation. Pre-selective PCR was then performed using primers E-A (5' – GACTGCGTACCAATTCA– 3') and T-A (5' – GATGAGTCTGACCGAA– 3'). Last, amplified DNA was diluted 1: 20 before performing selective PCR, using ten different primer pairs (Table 1). Amplified fragments were detected using automated Prism 3130XL sequencer (Applied Biosystems).

AFLP scoring

Electrophoresis reading was performed using GeneMapper 3.7 software (Applied Biosystems). The choice and scoring of markers is a critical point of the AFLP procedure (Bonin *et al.* 2005). As genotyping errors are more frequent for small fragments (Meyer *et al.* 2009), peaks were scored between 60 and 520pb. We then chose loci using two criteria: polymorphism (band presence or band absence in at least two individuals) and clarity of reading (clear threshold between presence / absence and no peak superposition). To ensure quality of the data (Bonin *et al.* 2004; Pompanon *et al.* 2005), 16 individuals (6.7 % of total individuals) were genotyped twice since the extraction step. The error rate was estimated to 0.63 % (25 errors out of 3984 comparisons).

Outlier detection simulations

For each pair of population analysed, we estimated genetic differentiation (F_{ST}) using AFLP-surv 1.0 software (Vekemans, 2002). Significance of F_{ST} was assessed using TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses) v. 1.3 software (Mark Miller 1997, available at <http://www.marksgeneticsoftware.net/>).

We used two programs allowing the detection of highly differentiated loci compared to the whole dataset (Beaumont 2005). Each approach was applied to the four

independent comparisons of “plague-focus” and “plague-free” population: E1 (AIT / TSO), W1 (ANK / ANT), E2 (BRI / MOR) and W2 (INA / MIA). This sampling design, comparing independent population pairs, was originally recommended by Tsakas & Krimbas (1976) (see also Vitalis *et al.* 2001).

First, we used the program *DetSelD* (available at <http://www.ecoanthropologie.cnrs.fr/spip.php?article359>), a new version of the *DetSel* software (Vitalis *et al.* 2001; Vitalis *et al.* 2003) dealing with dominant markers such as AFLP (Midamegbe *et al.* submitted). *DetSelD* performs coalescent simulations using a pure divergence model where an ancestral population suffers a bottleneck and then split into two isolated populations. The null distribution was obtained using 20 combinations of nuisance parameters values: we allowed variations in the ancestral population size ($N_e = 10^3, 10^4, 10^5$ and 10^6 individuals) and divergence time ($t = 50, 100, 500, 1000$ and 5000 generations), whereas the bottleneck duration was set to one generation and the population size after bottleneck was 1/10 of the ancestral population size. For each pairwise comparison and each nuisance parameter set, 100 000 simulations were performed.

Second, we used *DFdist* program (available at <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~mab/stuff/>), an extension for dominant markers of the original *Fdist* program (Beaumont & Nichols 1996). *DFdist* first estimates genetic differentiation (F_{ST}) for each locus using Zhivotovsky (1999)’s Bayesian method to estimate allelic frequencies. This empirical distribution allows the estimation of the global estimation of “neutral” population differentiation as the trimmed (30% highest and lowest F_{ST} values removed) mean F_{ST} (recommended by Beaumont & Balding 2004). This global F_{ST} is then used to perform 50 000 simulations following an island model (2 demes).

For both programs, we used a threshold of 5%, recommended in the case of (1) dominant markers which are less informative than codominant ones and (2) a species closely related to a model species because the difficulty in identifying outliers could be lower (Foll & Gaggiotti 2008).

Classification and analyses of outliers

P values obtained for the four independent comparisons were combined following Fisher’s method (Fisher 1948). [Some *DFdist* p-values were equal to zero and we conservatively changed them to 0.0001 so that they do not influence Fisher’s p-values more than they could]. We considered as outlier loci those that, for at least one detection program (*DFdist* or *DetSelD* approach), (1) were detected as outlier in at least two independent comparisons at the threshold 5%, i.e. “repeated outliers” or (2) had Fisher’s combined p-values lower than 1%, i.e. “combined outliers”. Indeed, (1) the repetition of outlier detection in various comparison is widely used (Storz 2005; see for example Bonin *et al.* 2006), as replicated divergence across population pairs is unlikely to arise via nonselective factors such as type I error, genetic drift, or mutation rate variation (Nosil *et al.* 2009). Whereas various studies considered outliers repeated in non-independent comparisons (for example Nosil *et al.* 2008), we only considered repetition in independent comparison. Moreover (2) combining p-values is another way recently used (Meyer *et al.* 2009; Midamegbe *et al.* submitted) as it could detect some loci presenting p-values closed to the threshold in various comparison which appear good candidates but wouldn’t be detected by the other method.

For each outlier locus, we tested for association between the presence / absence of the peak and plague zone: plague focus or plague-free zone. To this purpose, we performed Fisher’s exact tests using R software (Ihaka & Gentleman 1996). This method is favoured because it allows to test independence between two binary variables in the case of low sample size, which may occur here for loci with extreme peak frequency. Sequential Bonferroni procedure (Rice 1989) was used to correct for multiple testing.

Proportion of outlier loci in each primer pair combination were tested for homogeneity using χ^2 test as various studies reported non-random repartition of outlier loci among primer combinations (Campbell & Bernatchez 2004; Herrera & Bazaga 2008).

Genetic structure compared between neutral and outlier dataset

Genetic structures were compared between the neutral dataset, the outlier dataset and a subset of the outlier dataset comprising only the outlier loci with significant association with the zone (plague focus vs plague-free zone).

For each set of markers, analyses of Molecular Variance (AMOVA) were conducted using Arlequin v.3.01 (Excoffier *et al.* 2005) on populations grouped into the two zones (plague focus vs plague-free zone), or alternatively grouped into the longitude location (East vs West, Fig. 1).

We also generated 1000 bootstrapped Nei’s distances using AFLP-surv software. Neighbor-joining trees were constructed with Neighbor and Consense programs within the package Phylip v.3.2. (Felsenstein 2004, available on <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>).

Genotyping and analysis of plague challenged individuals

Two dataset consisting of plague-challenged individuals were also analysed for AFLP markers using the same genotyping protocol. Plague challenge protocol is detailed in Tollenaere *et al.* (2008). Briefly, the same strain of *Yersinia pestis* was injected subcutaneously to wild-caught animals (from villages close to INA locality, Fig. 1) which did not present plague-specific antibodies (supposed plague naïve). The dose of bacteria injected was 100 cfu (colony forming units) which kills all animals from low-altitude zone, or 10^5 cfu, which is the LD_{50} (Lethal Dose for 50% of individuals) of rats from plague focus (Rahalison *et al.* 2003). Animals were followed 18 days post-inoculation. Dead animals were tested for plague specific antigens to assess that plague was the cause of death and surviving animals were tested for plague antibodies to verify the inoculation success.

The ‘high dose’ dataset consisted in 54 animals inoculated with 10^5 cfu of *Yersinia pestis* among which 27 rats survived and 27 rats died from plague. The ‘low dose’ dataset considered 49 animals inoculated with 100 cfu of *Yersinia pestis* among which 35 rats survived and 14 died. Among the 249 AFLP markers, 226 were polymorphic within the ‘high dose’ dataset and 223 for the ‘low dose’ experiment. For each dataset and for each AFLP marker, Fisher’s exact tests were performed to test for association between the binary variable “plague challenge issue” (dying or surviving) and the presence/absence of the band, using the R software (Ihaka & Gentleman 1996). Sequential Bonferroni procedure (Rice 1989) was used to correct for multiple testing. Relative risks (RR) were calculated following Haldane (1956). Fisher’s method (Fisher 1948) was used to combine p-values over the two experiments.

RESULTS

A total of 239 individuals (29.9 ± 2.4 individuals by population, see details in Fig. 1) were genotyped for 249 polymorphic loci (24.9 ± 9.1 loci by primer pair, see details in Table 1). All individuals exhibited unique AFLP profiles. AFLP loci are named by the primer pair code (see Table 1) and the fragment length.

Outlier detection

Global F_{ST} used for *DFdist* simulations in each population pair are reported in the Table 2. For E2 comparison, the trimmed mean F_{ST} estimated from data was slightly negative ($F_{ST} = -0.00033$). As F_{ST} cannot be zero in *DFdist* program, we used 0.005 as conservative global F_{ST} (see also Miller *et al.* 2007). For each comparison of plague-focus vs plague-free population, at the 5% level, we detected 14.8 ± 2.6 (resp. 3.8 ± 1.3 at the 1% level) loci using *DetSelD* and 15.3 ± 5.3 (resp. 5.3 ± 2.1 at the 1% level) using *DFdist* (Fig. 2).

Results of zone-specific outlier detection are reported in Table 3. Twelve loci were detected in at least two independent comparison using *DetSelD* whereas there was seven using *DFdist* (three loci common to both programs). 15 loci had significant p-values (<0.01) combining *DetSelD* p-values whereas they were ten combining *DFdist* p-values (eight loci common to both programs). Finally, when pooling the different detection method, we obtained a set of 22 outlier loci (Table 3). Three of those 22 loci were detected in the four method used (each program and “repeated” or “combining” method): A121, D466 and Y222. Ten of the 22 loci were detected both in one population pair from the eastern populations (E1 or E2) and one pair from the western populations (W1 or W2), for at least one software (Table 3).

Outlier’s analysis

Association with the variable “zone” (plague focus or plague free zone) was found (p-value <0.05) for 14 loci out of 22 after Bonferroni correction (Table 3). Among the three loci detected as outlier using the four detection methods, two had significant association with the zone (A121 and Y222, Table 3).

Proportion of outlier loci in the ten primer combinations varied between 0 (combination N) and 18.5 % (combination D) (mean: $9.2 \pm 6.0\%$). No significant difference in the proportion of outlier loci was found between the ten combinations ($\chi^2 = 9.11$, $p = 0.43$).

Compared genetic structure between neutral and outlier datasets

We compared genetic structure for the neutral dataset (227 loci), for the outlier dataset (22 loci) and for the outlier subdataset with association with the “zone” significant after Bonferroni correction (14 loci).

AMOVAs (Table 4) revealed that the majority of genetic variance could be attributed to within population variability whatever the dataset considered. The distinction between zones (plague focus vs plague-free zone) was significant for outlier datasets only. The proportion of genetic variance attributed to the zone was 5.4% in the dataset of 22 outlier loci and of 9.2% in the subdataset of 14 outlier loci. On the other hand, the distinction between longitude locations (East vs West) was significant for neutral loci only (explaining 1.45% of variation).

Neighbor-joining tree for neutral dataset (227 loci) grouped populations according to geography (Fig. 3a). It differed from the population tree obtained with outlier loci

(22 loci) and the subset of outlier loci (14 loci), in which populations clustered together according to their location inside or outside the plague focus (Fig. 3b and 3c).

Analysis of plague challenged individuals

Two outlier AFLP markers revealed significant (at $p < 0.05$, but not after correction for multiple testing) for the ‘high dose’ dataset: B408 ($p = 0.010$) and D466 ($p = 0.013$) (Table 5). No outlier locus revealed significant for the ‘low dose’ dataset. However, for both marker the difference observed for the first dataset had the same tendency in the second (peak presence associated with death for B408 whereas the opposite was found for D466) and Fisher’s combined p-values were lower than 0.05 (Table 5).

One non-outlier locus was associated ($p < 0.05$) with the issue of plague challenge in the ‘high dose’ dataset (B167, $p = 0.002$) and six in the ‘low dose’ (J220, $p = 0.019$; U434, $p = 0.021$; W162, $p = 0.025$; Y163, $p = 0.042$; U305, $p = 0.044$; N221, $p = 0.048$). Two markers had significant combined p-values: B167 ($p = 0.007$) and B172 ($p = 0.045$). We noticed that, through the population genomics approach, no evidence of selection was evidenced on the locus B167, whereas the locus B172 was outlier in the population pair E1 when using *DetSelD* program (and combined p-value over the four pairs using *DetSelD* was 0.055).

DISCUSSION

Zoonotic diseases such as plague could never be eradicated though vaccination measures, and consequently, understanding evolutionary ecology of such wildlife disease appears decisive (Daszak *et al.* 2000; Stenseth *et al.* 2008). In this study, we investigated plague resistance genetics in Malagasy natural populations of its reservoir, *Rattus rattus*, using a population genomics approach combined to a phenotype association study.

The genetic markers considered are 249 AFLP loci. The number of markers analysed in this study was quite low compared to other AFLP genome scans of non-model organisms [between 254 (Jump *et al.* 2006) to 820 loci (Meyer *et al.* 2009)]. If randomly distributed in the genome, our markers would be distant from about 12 Mb. However, the molecular biology effort was sensible as we screened ten primer combinations when many previous studies analysed fewer (see for example, five primer pairs used by Wilding *et al.* 2001 or by Williams & Oleksiak 2008). Relatively few loci per primer pair were considered because we only chose high quality markers (clear presence/absence of the peak) and because AFLP profiles were very similar between *R. rattus* individuals: only about 35 % of the observed bands were polymorphic. This low level of polymorphism of Malagasy *R. rattus* populations was already noticed on mitochondrial sequences (no polymorphism within the *cytochrome b*, Tollenaere *et al.* in press) and certainly results from the introduction of the black rat in Madagascar, following human migration a few thousands years ago.

As working on anonymous AFLP markers, probably located in non-coding DNA, we did not expect to found loci under direct natural selection but loci undergoing hitchhiking selection (Schlotterer 2003). Hitchhiking can extend a considerable distance from the selected locus (Charlesworth *et al.* 1997; Via & West 2008). Its intensity depends of the ratio of the strength of selection and the recombination rate (Andolfatto, 2001). In our case, it could be strong, as we expect a recent and strong selective sweep consequently to the high fatality rate of plague in naive

rodent populations. Alternatively, high F_{ST} values can result from other mechanisms such as hitchhiking in structured populations (Faure *et al.* 2008) or founder effect (Excoffier & Ray 2008).

Sampling design involved four independent pairs of populations experiencing different selective pressure. Neutral genetic differentiation between population pairs was low, especially in the population pair E2, so that the possibility to detect positively selected loci (higher F_{ST}) is maximized (Beaumont 2005). On the other hand, demographic histories of Malagasy *R. rattus* populations may not conform to demographic models used for simulations. *DetSelD* uses a pure divergence model but migration may connect sampled populations. *DFdist* includes migration by simulating a symmetrical island model, but dissimilar population size and asymmetric migration rate may occur as the two zones differ in their catching rates (J.M. Duplantier unpublished observation) and genetic diversities (on mitochondrial sequences: Tollenare *et al.* in press, and microsatellites: C. Brouat unpublished data). Nevertheless, the statistical methods used were shown to be relatively robust to departures from demographic assumptions (Beaumont & Nichols 1996; Vitalis *et al.* 2001). Moreover, the design used comparing population pairs partly avoids problems associated with heterogeneous demographic parameters (Tsakas & Krimbas 1976; Vitalis *et al.* 2001).

We chose to consider as outlier loci those detected in at least two population pairs, or which had significant combined p-values for the four pairs for at least one simulation program (*DFdist* or *DetSelD*). This exhaustive way to detect outlier was favoured because further location of AFLP markers should be relatively easy due to the phylogenetic proximity of the fully sequenced species *R. norvegicus* (Gibbs *et al.* 2004). Indeed, they diverged about 2.9 Myr ago (Robins *et al.* 2008), the proportion of variable sites between their mitochondrial genomes is 9.62 % (estimated between of *R. rattus*, Genbank Accession number: EU273707, and *R. norvegicus* Wistar strain, Genbank Accession number: NC_001665.2) and chromosome painting revealed complete homology and synteny between *R. rattus* and *R. norvegicus* in 16 chromosomes out of 18 (Cavagna *et al.* 2002).

Using the detection method mentioned above, we found 22 loci candidate for zone-specific natural selection (out of 249 total, 8.8 %). Fourteen of these loci had significant association with plague zone. Both datasets of outliers loci (22 or 14 loci) showed significant differentiation between plague-free zone and plague focus, but the subset of 14 loci better explained genetic variance (9.5 % attributed to zone) than the 22 outlier loci (5.4 %). On the other hand, the significant East-West geographical differentiation of neutral loci reflected higher gene flow levels among geographically closed localities. However, and although association with ecological factor was proposed as highly relevant for AFLP studies (Bonin *et al.* 2007; Holderegger *et al.* 2008), outliers loci which are not significantly associated with plague zone remain candidate for undergoing plague selection (see below).

Under the hypothesis of a homogeneous selective pressure among the whole plague focus, we expected selected markers to be detected in all of the population pairs investigated, but not any locus fulfil such requirements. We chose the criteria of repetition of detection in at least two pairs and identified two loci (A284 and C411) highly differentiated in even three population pairs out of four using *DetSelD*. Various hypotheses may result in evidence

of selection only in some of the population pair investigated and in outliers loci not significantly associated with plague zone. First, we cannot rule out the possibility of convergent evolution towards plague resistance in various populations of the Malagasy plague focus, potentially involving different genetic basis resulting in the same resistance phenotype. For example, adaptive melanism is controlled by different genes in two American populations of the rock pocket mice (Hoekstra & Nachman 2003) and various epistatic networks mediate susceptibility to infection by a trypanosome in *Bombus terrestris* in Switzerland (Wilfert *et al.* 2007). Second, adaptation through standing variation would lead to patterns of polymorphisms different from the standard models of adaptation through new mutation and to the association of functional polymorphisms with different alleles at closely linked loci (Teshima *et al.*, 2006; Barrett & Schluter 2008). Third, if variability in *Yersinia pestis* exists in Madagascar, coevolution may lead to variable resistance genetics in the host according to the locally present plague bacterium strain. *Yersinia pestis* strains from Madagascar all grouped in the cluster spread during the third pandemic but some variability was described within the country (Achtman *et al.* 2004; Guiyoule *et al.* 1997). However, detailed analysis of *Y. pestis* genetic structure in Malagasy plague focus is lacking to investigate such hypothesis. Finally, plague-linked selective pressures may vary across space and time within the plague focus. A putative evolutionary cost of plague resistance may imply dramatical differences in the prevalence of resistance alleles in local populations, regarding the age and strength of the last epizootic event.

The outlier loci identified can be considered as zone-specific outliers. However, selective pressure cannot firmly be associated with plague as other ecological factors differ between the two zones. Indeed, altitude and, as a consequence, mean temperature are confounded with plague occurrence (Jury 2003). On the other hand, annual precipitation (Jury 2003), vegetation (Lowry II *et al.* 1997) and human culture (Battistini & Verin 1972; for example the type of houses which may affect commensal rodent such as the black rat) differ between central highlands, the eastern part of low-altitude zone, and the western part of low-altitude zone. The ten outlier loci found in pairs of both eastern and western comparison are thus good candidates for plague specific selection because they are potentially affected by fewer confounding factors.

We combined population genomics with a phenotype association study (Stinchcombe & Hoekstra 2008; Storz 2005) in order to discriminate between different possible selective pressures differing between central highlands and low-altitude zone. Experimentally plague inoculated animals were typed for AFLP loci, to test whether plague challenge issue was correlated with outlier loci. Two outlier loci (B408 and D466) revealed significant association with plague inoculation issue for one plague challenge experiment. The tendency remained the same in the second experiment, but the difference was not significant, maybe due to a lack of power consequent to the low sample size (14 dying individuals) of this second dataset. These two loci were thus detected in two completely independent approaches, being particularly relevant candidates for plague resistance markers.

The 20 outlier loci that were not associated with survival / death following plague challenge could however be related to plague resistance for various reasons. First, sample size of plague challenge datasets (about 50 individuals) may be too low to detect modest genetic

differences (Hirschhorn & Daly 2005). Second, the two doses of bacteria used could discern only poorly genetically differentiated groups. Third, resistance genotype could be fixed in central highlands (absence of genetically isolated groups). The fact that some animals died after experimental challenge would in this case be related only to non-genetic factors, such as immune and physiological status (as we used wild and not inbred animals). Fourth, genetic differences associated with plague resistance/susceptibility may be different between plague focus and plague-free zone (outlier loci) and within plague focus (loci potentially detected through experimentally infected animals from plague focus).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

This study identified 22 loci candidate for zone-specific selection and thus potentially involved in plague resistance phenotype of *R. rattus* central highlands populations. Two of these loci were also associated with plague challenge issue in a dataset of experimentally injected individuals. The 22 loci are currently being sequenced and blasted on *R. norvegicus* genome so that they could be mapped. Finding genes involved in the immune response in the neighbouring of the sequenced fragment could be an argument favouring plague as the zone-specific selective pressure. Such genes would then be sequenced so that selection patterns on DNA sequences could be investigated and functional polymorphism identified. This study and further identification of detected loci are thus a step towards the understanding of genetic basis of disease resistance and pathogen mediated selection in natural population of reservoirs.

REFERENCES CITED

- Acevedo-Whitehouse K, Cunningham AA (2006) Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics ? *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 433-438.
- Achtman M, Morelli G, Zhu PX, *et al.* (2004) Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17837-17842.
- Ajmone-Marsan P, Valentini A, Cassandro M, *et al.* (1997) AFLP (TM) markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* **28**, 418-426.
- Altizer S, Harvell D, Friedle E (2003) Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 589-596.
- Andolfatto P (2001) Adaptive hitchhiking effects on genome variability. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**, 635-641.
- Barrett RDH, Schluter D (2008) Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 38-44.
- Beaumont MA (2005) Adaptation and speciation : what F_{ST} can tell us ? *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 435-440.
- Beaumont MA, Balding DJ (2004) Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* **13**, 969-980.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London B* **263**, 1619-1626.
- Biggins DE, Kosoy MY (2001) Influences of introduced plague on North American mammals: Implications from ecology of plague in Asia. *Journal of Mammalogy* **82**, 906-916.
- Black WC, Baer CF, Antolin MF, DuTeau NM (2001) Population genomics: Genome-wide sampling of insect populations. *Annual Review of Entomology* **46**, 441-469.
- Blears MJ, De Grandis SA, Lee H, Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **21**, 99-114.
- Battistini R, Verin P (1972) Man and the Environment in Madagascar: Past problems and problems of today. In: *Biogeography and ecology in Madagascar* (eds. Battistini R, Richard-Vindard G), pp. 311-337, Junk, the Hague.
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**, 3261-3273.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* **16**, 3737-3758.
- Bonin A, Pompanon F, Taberlet P (2005) Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity. In: *Molecular evolution: producing the biochemical data, Part B Methods in Enzymology* (eds. Zimmer EA, Roalson E), pp. 145-161. Academic Press, New York.
- Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F (2006) Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution* **23**, 773-783.
- Brygoo ER (1966) Epidémiologie de la peste à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* **35**, 9-147.
- Campbell D, Bernatchez L (2004) Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 945-956.
- Cavagna P, Stone G, Stanyon R (2002) Black rat (*Rattus rattus*) genomic variability characterized by chromosome painting. *Mammalian Genome* **13**, 157-163.
- Cavalli-Sforza LL (1966) Population structure and human evolution. *Proceedings of The Royal Society of London B* **164**, 362-379.
- Charlesworth B, Nordborg M, Charlesworth D (1997) The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genetical Research* **70**, 155-174.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* **287**, 443-449.
- Dennis DT, Gage KL, Gratz N, Poland J, Tikhomirov E (1999) *Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control*, World Health Organisation, Geneva.
- Duplantier J-M, Catalan J, Orth A, Grolleau B, Britton-Davidian J (2003) Systematics of the black rat in Madagascar: consequences for the transmission and distribution of plague. *Biological Journal of the Linnean Society* **78**, 335-341.
- Ellegren H, Sheldon BC (2008) Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature* **452**, 169-175.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0 : An integrated software package for population genetics

- data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Excoffier L, Ray N (2008) Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 347-351.
- Faure MF, David P, Bonhomme F, Bierne N (2008) Genetic hitchhiking in a subdivided population of *Mytilus edulis*. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Fisher RA (1948) Combining independent tests of significance. *American Statistician* **2**, 30.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics* **180**, 977-993.
- Gage KL, Kosoy MY (2005) Natural History of plague: perspectives from more than a century of research. *Annual Review of Entomology* **50**, 505-528.
- Gagnaire PA, Albert V, Jonsson B, Bernatchez L (2009) Natural selection influences AFLP intraspecific genetic variability and introgression patterns in Atlantic eels. *Molecular Ecology* **18**, 1678-1691.
- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, *et al.* (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**, 493-521.
- Guiyoule A, Rasoamanana B, Buchrieser C, *et al.* (1997) Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2826-2833.
- Haldane JBS (1956) The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Annals of Human Genetics* **20**, 309-311.
- Hanson DA, Britten HB, Restani M, Washburn LR (2007) High prevalence of *Yersinia pestis* in black-tailed prairie dog colonies during an apparent enzootic phase of sylvatic plague. *Conservation Genetics* **8**, 789-795.
- Herrera CM, Bazaga P (2008) Population-genomic approach reveals adaptive floral divergence in discrete populations of a hawk moth-pollinated violet. *Molecular Ecology* **17**, 5378-5390.
- Hill AVS (2001) The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2**, 373-400.
- Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* **6**, 95-108.
- Hoekstra HE, Nachman MW (2003) Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. *Molecular Ecology* **12**, 1185-1194.
- Holderegger R, Herrmann D, Poncet B, *et al.* (2008) Land ahead: using genome scans to identify molecular markers of adaptive relevance. *Plant Ecology and Diversity* **1**, 273-283.
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299-314.
- Jump AS, Hunt JM, Martinez-Izquierdo JA, Penuelas J (2006) Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology* **15**, 3469-3480.
- Jury MR (2003) The climate of Madagascar. In: *The natural history of Madagascar* (eds. Goodman SM, Benstead JP), pp. 75-87. University of Chicago Press, Chicago.
- Lazzaro BP (2008) Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 284-289.
- Lowry II PP, Schatz GE, Phillipson PB (1997) The classification of natural and anthropogenic vegetation in Madagascar. In: *Natural change and human impact in Madagascar* (eds. Goodman SM, Patterson BD), pp. 93-123. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* **4**, 981-994.
- Meudt HM, Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* **12**, 106-117.
- Meyer CL, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V (2003) Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Molecular Ecology* **18**, 2050-2062.
- Midamegbe A, Vitalis R, Malausa T, Streiff R (submitted) Adaptation and genome. I. Exploring divergent selection between two *Ostrinia* species.
- Miller NJ, Ciosi M, Sappington TW, *et al.* (2007) Genome scan of *Diabrotica virgifera virgifera* for genetic variation associated with crop rotation tolerance. *Journal of Applied Entomology* **131**, 378-385.
- Miller MP, Vincent ER (2008) Rapid natural selection for resistance to an introduced parasite of rainbow trout. *Evolutionary Applications* **1**, 336-341.
- Nielsen R, Bustamante C, Clark AG, *et al.* (2005) A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. *Plos Biology* **3**, 976-985.
- Nosil P, Egan SP, Funk DJ (2008) Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: "Isolation by adaptation" and multiple roles for divergent selection. *Evolution* **62**, 316-336.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**, 375-402.
- Orr HA (2005) The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics* **6**, 119-127.
- Piertney SB, Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the Major Histocompatibility Complex. *Heredity* **96**, 7-21.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Quan SF, Wheeler CM, Goldenberg MI, Kartman L (1965) The susceptibility of *Rattus* species from two areas of Hawaiï to infection with *Pasteurella pestis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **14**, 638-642.
- Rahalison L, Ranjalaly M, Duplantier J-M, *et al.* (2003) Susceptibility to plague of the rodents in Antananarivo, Madagascar. In: *The genus Yersinia*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Rice WR (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Robins JH, McLenachan PA, Phillips MJ, *et al.* (2008) Dating of divergences within the *Rattus* genus phylogeny using whole mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 460-466.
- Schlotterer C (2003) Hitchhiking mapping - functional genomics from the population genetics perspective. *Trends in Genetics* **19**, 32-38.

- Sorci G, Moller AP, Boulinier T (1997) Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **12**, 196-200.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, *et al.* (2008) Plague: Past, present, and future. *Plos Medicine* **5**, 9-13.
- Stinchcombe JR, Hoekstra HE (2008) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**, 158-170.
- Storz JF (2005) Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* **14**, 671-688.
- Storz JF, Hoekstra HE (2007) The study of adaptation and speciation in the genomic era. *Journal of Mammalogy* **88**, 1-4.
- Teshima KM, Coop G, Przeworski M (2006) How reliable are empirical genomic scans for selective sweeps? *Genome Research* **16**, 702-712.
- Thomas RE, Barnes AM, Quan TJ, *et al.* (1988) Susceptibility to *Yersinia pestis* in the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *Journal of Wildlife Diseases* **24**, 327-333.
- Tollenaere C, Brouat C, Duplantier JM, *et al.* (in press) Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *Journal of Biogeography*.
- Tollenaere C, Rahalison L, Ranjalahy M, *et al.* (2008) CCR5 polymorphism and plague resistance in natural populations of the black rat in Madagascar. *Infection Genetics and Evolution* **8**, 891-897.
- Tsakas S, Krimbas CB (1976) Testing the heterogeneity of F values: a suggestion and a correction. *Genetics* **84**, 399-401.
- Turner JK, McAllister MM, Xu JL, Tapping RI (2008) The resistance of BALB/c mice to *Yersinia pestis* maps to the Major Histocompatibility Complex of chromosome 17. *Infection and Immunity* **76**, 4092-4099.
- Vekemans X (2002) AFLP-surf version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Via S, West J (2008) The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. *Molecular Ecology* **17**, 4334-4345.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P (2001) Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics* **158**, 1811-1823.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P, Belkhir K (2003) DetSel 1.0: A computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity* **94**, 429-431.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 611-619.
- Wilfert L, Gadau J, Baer B, Schmid-Hempel P (2007) Natural variation in the genetic architecture of a host-parasite interaction in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Molecular Ecology* **16**, 1327-1339.
- Wilfert L, Schmid-Hempel P (2008) The genetic architecture of susceptibility to parasites. *Bmc Evolutionary Biology* **8**, 187.
- Williams LM, Oleksiak MF (2008) Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. *Bmc Evolutionary Biology* **8**, 282.
- World Health Organisation (2003) Human plague in 2000-2001. *Weekly Epidemiological Record* **78**, 130-135.
- Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 907-913.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the staff of the Plague laboratory of the Institut Pasteur de Madagascar for great assistance during the fieldwork, and to Rejane Streiff for helpful advises in molecular biology, data analyses and comments on the manuscript. We thank Anne Loiseau and Caroline Tatard for advices on molecular biology. Data used in this work were produced through molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 « Montpellier Environnement Biodiversité ». Funding was provided by the IRD (Institut de Recherche pour le Développement), the IPM (Institut Pasteur de Madagascar) and an ANR-SEST (Agence Nationale pour la Recherche, Santé-Environnement et Santé-Travail) program on plague diffusion.

Table 1: Combinations of primers used for selective amplification in the AFLP procedure. Each primer *EcoRI* (resp. *TaqI*) begins by 5' –GACTGCGTACCAATTC– 3' (resp. 5' –GATGAGTCCTGACCGA– 3') followed by the three selective base indicated in this table.

Combination		Primer <i>EcoRI</i>	Primer <i>TaqI</i>	Number of markers
1	A	E - AAG	T - AAG	43
2	B	E - AAG	T - AGA	23
3	C	E - AAG	T - ATC	21
4	D	E - AAG	T - ATG	27
5	J	E - ACT	T - AAG	35
6	N	E - ACT	T - AGT	26
7	Q	E - ATA	T - AAG	21
8	U	E - ATA	T - ATG	22
9	W	E - AAG	T - AGT	22
10	Y	E - ATA	T - AGT	9

Table 2: Genetic differentiation found in the four population pairs considered in this study.

The genetic differentiation (F_{ST}) from the whole dataset (249 markers) is indicated. Significance of F_{ST} is shown: ^{NS} non significant, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$. The trimmed F_{ST} (after removal of the 30% of extreme F_{ST} loci) estimated by *DFdist* is indicated, except for the population pair E2 for which *DFdist* estimated a slightly negative F_{ST} and the value 0.005 was arbitrarily chosen for simulations.

Population pair name	Plague focus population	Plague-free zone population	Location	F_{ST}	Trimmed F_{ST} used for <i>DFdist</i>
E1	AIT	TSO	East	0.0281***	0.008
W1	ANT	ANK	West	0.0664***	0.048
E2	MOR	BRI	East	0.0147 ^{NS}	0.005
W2	INA	MIA	West	0.0238**	0.005

Table 3: Results of selection detection for the 22 zone-specific outlier loci detected.

For each outlier locus, crosses indicate when the method used identified this locus. For repetition analyses, we indicated significant population pair. Population pairs are in bold when the locus revealed outlier at the 1% threshold. Combined p-values (Fisher's method) over the four independent comparisons are mentioned. P-values for the Fisher's exact test of association between the factor "zone" (plague focus or plague-free zone) and the presence / absence of the AFLP peak are indicated. * indicates when the statistic remained significant after Bonferroni correction.

Outlier locus	<i>DetSelD</i> repetition	<i>DFdist</i> repetition	<i>DetSelD</i> Combined p-value	<i>DFdist</i> Combined p-value	Zone association p-value
A121	x E1 & E2	x E1 & E2	x (0.000)	x (0.000)	(0.00000*)
A284	x E1 & W1 & W2	W1	x (0.001)	x (0.006)	(0.02796)
A449	x W1 & W2		x (0.008)	(0.211)	(0.00036*)
B161		x E1 & W2	(0.142)	x (0.003)	(0.00000*)
B163	E1	E1	x (0.002)	x (0.009)	(0.00117*)
B388	E2		x (0.007)	(0.132)	(0.89720)
B408	E1	E1	(0.011)	x (0.002)	(0.00021*)
C411	x E1 & W1 & W2	W2	x (0.002)	(0.046)	(0.00000*)
C483	x E1 & W2	E1	x (0.001)	x (0.000)	(0.55750)
D077	x E1 & W2		(0.024)	(0.108)	(0.00161*)
D180	W2	W2	x (0.009)	x (0.001)	(0.00001*)
D450	E1	E1	x (0.005)	(0.105)	(0.00002*)
D455	E2	x E1 & E2	(0.048)	(0.036)	(0.04201)
D466	x E2 & W2	x E2 & W2	x (0.002)	x (0.004)	(0.06474)
J275	x E1 & W2	E1	x (0.007)	(0.056)	(0.00295*)
J393	x W1 & E2		x (0.007)	(0.183)	(0.00291*)
Q199	x E1 & E2	E1	x (0.009)	x (0.003)	(0.51560)
U296		x W1 & W2	(0.170)	(0.021)	(0.00043*)
U387	W2	W2	x (0.009)	(0.034)	(0.60200)
U493	W1	x W1 & W2	(0.018)	(0.012)	(0.00037*)
W099	x E1 & W2	W2	(0.017)	(0.098)	(0.00769)
Y222	x E1 & W2	x W1 & W2	x (0.008)	x (0.005)	(0.00013*)

Table 4: Analysis of molecular variance (AMOVA) grouping by zone (plague focus vs plague-free zone) and by longitude location (East vs West).

Analyses were performed with (a) the 227 neutral loci (b) the 22 zone-specific outliers (c) the 14 zone-specific outliers with significant association with the zone.

	'Plague focus' vs 'Plague-free zone'				'East' vs 'West'			
	df	Percentage of variation	p-value	statistics	df	Percentage of variation	p-value	statistics
a) Neutral dataset (227 loci)								
Among groups	1	0.27	0.19446	$\phi_{CT}=0.003$	1	1.45	0.00000	$\phi_{CT}=0.0145$
Among populations within groups	6	4.68	0.00000	$\phi_{SC}=0.0469$	6	3.98	0.00000	$\phi_{SC}=0.0404$
Within populations	231	95.05	0.00000	$\phi_{ST}=0.0495$	231	94.57	0.00000	$\phi_{ST}=0.0543$
b) Outlier dataset (22 loci)								
Among groups	1	5.43	0.00000	$\phi_{CT}=0.0543$	1	-1	0.54149	$\phi_{CT}=-0.0100$
Among populations within groups	6	8.54	0.00000	$\phi_{SC}=0.0903$	6	13.38	0.00000	$\phi_{SC}=0.1325$
Within populations	231	86.04	0.00000	$\phi_{ST}=0.1396$	231	87.62	0.00000	$\phi_{ST}=0.1238$
c) Outlier sub-dataset (14 loci)								
Among groups	1	9.21	0.00000	$\phi_{CT}=0.0921$	1	-1.27	0.62376	$\phi_{CT}=-0.0127$
Among populations within groups	6	6.53	0.00000	$\phi_{SC}=0.0719$	6	13.07	0.00000	$\phi_{SC}=0.1291$
Within populations	231	84.26	0.00000	$\phi_{ST}=0.1574$	231	88.20	0.00000	$\phi_{ST}=0.1180$

Table 5: Association between presence / absence of the peak corresponding to two AFLP markers (B408 and D466) and experimental plague challenge issue (survival or death following inoculation).

The first dataset corresponds to a high-dose plague challenge where 54 rats were injected with a suspension of 10^5 bacteria. The second dataset results from a low dose challenge with 49 animals injected 100 *Yersinia pestis*. For each locus and each experiment, relative risks (RR) were calculated following Haldane and significance (p) was assessed by Fisher's exact test. We obtained combined p-values using Fisher method on the two p-values of each experiment.

	B408 peak				D466 peak				
	absence	presence	RR	p	absence	presence	RR	p	
high dose	12	15	6.177	0.014	17	10	0.068	0.005	
	(44.4 %)	(55.6 %)			(63.0 %)	(37.0 %)			
low dose	3	24	3.066	0.294	26	9	0.792	1	
	(11.1 %)	(88.9 %)			(96.3 %)	(3.7 %)			
Combined p-values	12	23			26	9			
	(34.3 %)	(65.7 %)			(74.3 %)	(25.7 %)			
Combined p-values	2	12			11	3			
	(14.3 %)	(85.7 %)			(78.6 %)	(21.4 %)			
		$p = 0.026$				$p = 0.032$			

FIGURES

Figure 1: Sampling map situating the eight *R. rattus* populations analysed.

Populations from the same pair are indicated with the same symbol: black circle (E1), black triangle (E2), white circle (W1) and white triangle (W2). The sample size is shown in brackets for each population.

The central highlands, where altitude is higher than 800 meters, is coloured in grey. This zone corresponds to the plague focus (Brygoo 1966; Duplantier *et al.* 2005).

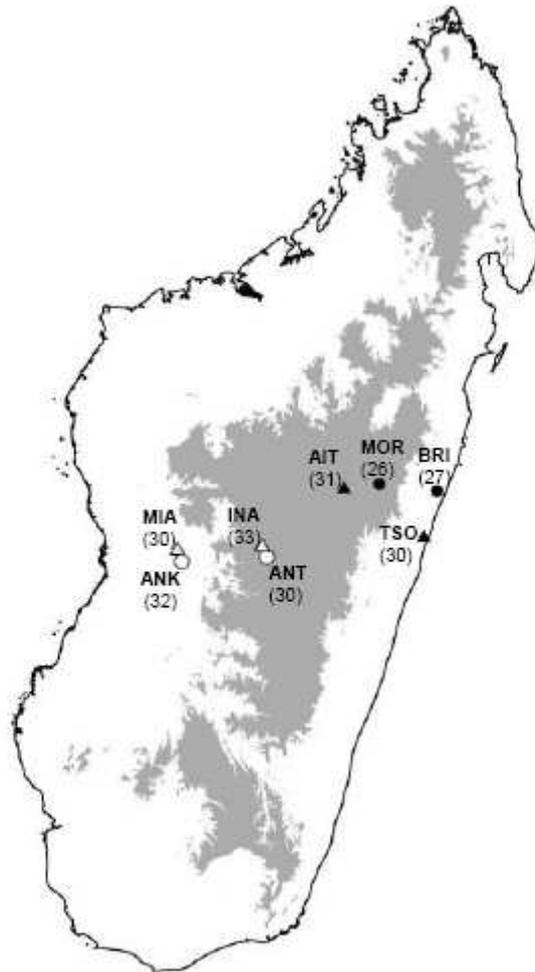


Figure 2: Results of outlier detection using *DetSelD* program (on the left) and *DFdist* program (on the right) for the four independent comparisons of one low altitude (plague-free zone) and one high altitude (plague focus) *R. rattus* populations.

For each comparison and both programs, each point corresponds to one locus. Loci with higher differentiation are plotted with grey points whereas neutral loci are plotted with black point.

For *DetSelD*, F_1 and F_2 , which are estimates of the differentiation between each population to the ancestral population, are plotted. The envelope represents the 95% of simulations. For *DFdist*, the genetic differentiation (F_{ST}) is plotted against expected heterozygosity (H_E). Mean F_{ST} and the envelope containing 95% of simulations are indicated.

