HAL
open science

Rôles relatifs des facteurs démographiques, sociaux et sélectifs sur la sélection de partenaires reproducteurs chez le gorille des plaines de l'ouest

Alice Baudouin

To cite this version:

Alice Baudouin. Rôles relatifs des facteurs démographiques, sociaux et sélectifs sur la sélection de partenaires reproducteurs chez le gorille des plaines de l'ouest. Biologie animale. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B057 . tel-01831825

HAL Id: tel-01831825

https://theses.hal.science/tel-01831825v1

Submitted on 6 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2017

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale EGAAL

présentée par

Alice Baudouin

Préparée à l'unité de recherche 6553 ECOBIO
Ecosystèmes, Biodiversité, Evolution
UFR Sciences et Vie de l'Environnement

Rôles relatifs des facteurs démographiques, sociaux et sélectifs sur la sélection de partenaires reproducteurs chez le gorille des plaines de l'ouest

Thèse soutenue à Paimpont
Le 21 Décembre 2017

devant le jury composé de :

Aurélie COHAS
Maitre de conférences, Université Claude Bernard Lyon 1, UMR CNRS 5558 LBBE
Rapporteure

Bernard THIERRY
Directeur de recherche, CNRS IPHC
Rapporteur

Shelly MASI
Maitre de conférences, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7206, Paris
Examinatrice

Joan VAN BAAREN
Professeur, Université Rennes 1, UMR CNRS 6553 ECOBIO
Présidente du jury

Nelly MENARD
Directrice de recherche, CNRS UMR 6553 ECOBIO
Directrice de thèse

Pascaline LE GOUAR
Maitre de conférences, Université Rennes 1, UMR CNRS 6553 ECOBIO
Co-directrice de thèse

A mes grands-pères, car on dit que c'est grâce à eux si je suis ici

Remerciements

Je remercie très sincèrement l'équipe de choc des primates paimpontais. Nelly, je sais que j'ai été source de beaucoup de stress pendant ces trois années, et j'en suis (encore une fois) désolée. J'ai rarement été dans les timings, et souvent manqué de rigueur, mais j'ai beaucoup appris grâce à toi. Pascaline, ce fut un plaisir de progresser à tes cotés. J'espère que mes inattentions ne t'auront pas trop désespérées, et que je ne serais que la première d'une longue série de thésarde. Vous avez toujours fait passer ma thèse en premier parmi vos nombreux autres projets, et j'en suis très reconnaissante. Votre patience infinie, et votre compréhension ont été de vrais atouts pour la réussite de ma thèse. Enfin, Dominique, tu n'es peut-être pas encadrant sur le papier, mais tu en as assuré le rôle. La formation que tu m'as donnée a même impressionné les américains, c'est pour dire ! Tu t'es beaucoup impliqué dans cette thèse, et bon nombre de résultats ne seraient pas disponibles sans ton acharnement malgré les aléas de la génétique. Ta bonne humeur quotidienne a illuminé les couloirs de la station durant ces trois ans.

Now, let's travel to Salt Lake City. A big thanks you to you, Leslie. You welcomed me into your lab, and shared with me your knowledge. I really enjoyed the time spent working together, and l hope we will pursue it. Jesse, a massive thanks you for letting me stay at your place. It's a kind gesture to invite a foreign unknown girl, and you made me experienced « American TV show's life ». Nicole, I'd like to thank you for being available at any time, and making my life easier at the lab.

Je tiens à remercier également les membres des mes comités de thèse, Elise Huchard, Sabrina Krief, Eric Petit et Marie Trabalon, pour leurs remarques et commentaires instructifs. Je remercie aussi les membres de mon jury, Aurélie Cohas, Shelly Masi, Bernard Thierry et Joan Van Baaren pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je souhaite maintenant remercier mes parents, qui m'ont laissé suivre le projet de devenir « zoologue » établi en 4ème. Vous avez tout fait pour que je puisse poursuivre mes études, qu'importe où cela m'emmènerait. Et pourtant, je sais que vous ne comprenez pas toujours ce que je fais. Mais vous avez été d'un soutien indéfectible, et votre fierté me pousse à toujours faire de mon mieux. Et enfin, petite sœur, merci pour le transfert d'énergie depuis ton canapé ces dernières semaines. J'espère que tu liras ce travail et que tu continueras à te la raconter avec ta sœur « docteur ». J'ai prévu une carrière de scientifique pour la petite Ambre aussi, je vais veiller au grain.

Financements

Grâce à mon affiliation à l'équipe PAYSCALIM de l'Unité Mixte de Recherche 6553 – ECOBIO, l'Université Rennes 1 et le CNRS ont participé au financement de cette thèse.

Le co-encadrement de Leslie Knapp, professeure à l'Université et responsable du département d'anthropologie de l'Utah (Etats-Unis), m'a permis de bénéficier de financements de University of Salt Lake City.

Les observations sur le terrain ont été financées par les programmes ECOsystèmes FORestiers (Ministères de l'Ecologie et du Développement Durable) et Espèces-Phares (DG Environnement, Union Européenne), ainsi que par l'ANR IdiPop.

Mon financement personnel a été assuré par une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Ma participation au congrès international de conservation de la biodiversité a été financée par l'ANR Idipop. Mon séjour de deux mois à l'Université de Salt Lake City en 2015 a été soutenu par une bourse de mobilité sortante de Rennes Métropole, celui de 2016 par l'ANR IdiPop.

Sommaire

Introduction générale 1
I La socialité 1
a) Evolution de la socialité 1
b) Diversité des systèmes sociaux 2
c) Dispersion et socialité 4
II Choix de partenaire 5
a) La sélection sexuelle 5
b) Influence de la qualité des partenaires sur le choix de partenaire 7
c) Facteurs sociaux 11
d) Choix pour des caractéristiques génotypiques cryptiques : le cas des gènes du complexe d'histocompatibilité majeur 12
III Perturbation démographique 17
a) Définitions 17
b) Perturbation et socialité 18
IV Présentation de l'étude 19
a) Contexte 19
b) Objectifs 20
Chapitre 1 : Méthodologie générale 23
I Modèle d'étude, le gorille des plaines de l'ouest 23
a) Taxonomie 23
b) Répartition géographique et effectifs actuels 23
c) Habitat et régime alimentaire des gorilles des plaines de l'ouest 25
d) Organisation sociale 26
II Sites d'études 28
a) Le Parc National d'Odzala-Kokoua (PNOK) 28
b) La saline de Lokoué 30
c) La saline de Romani 30
Chapitre 2 33
Résumé du chapitre 2 34
Influence of individual, mate and unit-dependent factors on social dispersal of adult females in western lowland gorillas 37
Abstract 39
II Materials and Methods 45
a) Study sites and populations 45
b) Dispersal status of adult females 47
c) Analyses of dispersal patterns 47

III Results 50
a) Gorilla units and dispersal status of adult females 50
b) Factors influencing female emigration 52
c) Factors influencing the immigration of adult females 57
d) Transfer characteristics 60
IV Discussion 62
a) Factors related to female characteristics 62
b) Silverback-related factors 64
c) Factors related to unit characteristics 66
d) Conclusion & Perspectives 67
Supplementary material 68
Table S1 Periods of observation and presence of gorillas on the Lokoué and Romani clearings during each period of the study 68
Table S2 Sample data across sites and years 69
Yaws-like skin disease lesions in wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla)* in the Republic of Congo. 71
Table S3 Proportions (±standard errors) of individuals weakly and severely diseased by yaws-like infection in the two populations 73
References 75
Chapitre 3 82
Résumé du chapitre 3 83
Chapitre 3 : Changes in social dispersal of adult females in western lowland gorillas after a demographic crash 86
I Introduction 87
II Materiel and Methods 90
a) Study site and population 90
b) Dispersal status of adult females 91
c) Analyses of emigration pattern 91
d) Analyses of immigration pattern 92
III Results 93
a) Gorilla units 93
b) Factors influencing female emigration 95
c) Factors influencing female immigration 98
d) Transfers within Lokoué population and dispersal between Lokoué and surrounding populations 101
IV Discussion 101
Supplementary material 105
Table S1 Periods of observation and presence of gorillas on the Lokoué clearings during each period of the study 105

References 106
Chapitre 4 110
Résumé du chapitre 111
Chapitre 4: Studying MHC class II variability from non-invasive genetic monitoring in a wild great ape. 113
I Introduction 114
II Materials and methods 116
a) Non invasive genetic monitoring and sampling scheme 116
b) Primer definition and amplification of MHC loci short and long products 116
c) NGS library construction 118
d) Data analysis 118
III RESULTS 121
a) Validation of new primer 121
b) NGS analysis 123
IV DISCUSSION 128
Supplementary material 130
Table S1 Fusion primers 130
References 133
Chapitre 5 136
Chapitre 5 : Analyse de la diversité du Complexe Majeur d'Histocompatibilité à l'échelle populationnelle en utilisant un suivi de génétique non invasive: développement d'une méthode d'haplotypage par marqueur microsatellite lié. 137
I Introduction 137
II Matériel et Méthodes 140
a) Schéma d'échantillonnage 140
b) Analyses 142
III Résultats 142
IV DISCUSSION 147
Matériel supplémentaire 151
Références 152
Chapitre 6 155
Chapitre 6 : Etudes préliminaires 156
I Etude du choix de partenaire chez le magot 156
a) Objectifs 156
b) Méthode 158
c) Résultats 160

d) Discussion et perspectives 164
II Etude du CMH par l'utilisation d'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant .. 166
a) Objectifs 166
b) Méthodes et premiers résultats 167
c) Discussion et perspectives 174
Références bibliographiques 176
Discussion Générale et Perspectives 178
I Choix de partenaires sociaux/sexuels chez les femelles de gorille de plaine de l'ouest 178
II Influence d'une perturbation environnementale majeure sur le choix des femelles 179
III L'étude du CMH chez le gorille des plaines de l'ouest 181
IV Utilisation d'échantillon ADN non-invasif 183
IV Faire le lien entre les observations directes et les prélèvements génétiques 184
V Existence d'un choix du mâle 184
Références 186

Liste des figures

Introduction

Figure 1 Mécanisme du choix de partenaire et de la sélection sexuelle d'après Widemo and Sæther (1999). 7

Figure 2 Structure des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité. 13

Figure 3 Structure de la classe II du CMH sur le chromosome 6 avec un focus sur la région DR son l'exon 2. 14

Chapitre 1

Figure 1 Répartition des quatre sous-espèces de gorille 25

Figure 2 Organisation sociale et dispersion des femelles chez le gorille des plaines de l'ouest 28

Figure 3 Localisations du Parc National d'Odzala-Kokoua avec les emplacements des clairières de Lokoué et Romani et de la réserve de Lossi dont les populations ont fait l'objet de cette étude 29

Figure 4 Photos des salines de Lokoué, en haut, et de Romani, en bas 30

Chapitre 2

Figure 1 Relationships between breeding unit age and the adult-to-immature ratio in a) Lokoué and b) Romani, and number of adult females in breeding units in c) Lokoué and d) Romani 52

Figure 2 Marginal effects of presence of unweaned infant on the probability of emigration by adult females in both populations (a), effect of unit size in both populations (b), of the proportion of severely diseased individuals in Romani (c), and of the age of breeding units in Lokoué (d) 57

Figure 3 Manly's selection indices testing the preferences of immigrating females for the type of social unit (a), its age (b), for the proportion of individuals in the unit suffering from skin disease (c) and for the unit size (d). CI: confidence interval 95% 61

Figure S1 Various cases of yaws-like skin lesions in our western lowland gorilla populations…….74

Chapitre 3

Figure 1 Marginal effect of the study periods on the emigration probability of adult females 96

Figure 2 Marginal effect of unit size on emigration probability of adult females for a) before Ebola period, b) short term after Ebola and c) long term after Ebola..... 97

Figure 3 Manly selectivity index for unit type (a), unit age (b) and proportion of severely diseased individuals within the unit (c) 99

Chapitre 4

Figure 1 Phylogenetic tree of published gorilla DRB exon 2 sequences cut at the length of the short fragment….....123

Figure 2 Phylogenetic tree of gorilla DRB exon 2 including the new sequences from this study….126

Chapitre 5

Figure 1 Exemple d'électrophorégrammes présentant les allèles du microsatellite D6S2878 chez cinq sujets humains, d'après Doxiadis et al. (2009). 139

Figure 2 Electrophoregramme du D6S2878 observé chez le gorille avec le logiciel Genemapper, les pics retenus sont noircis. 143

Figure 3 Pedigree de deux familles issues de la population de Lossi. 145

Chapitre 6

Figure 1 Exemple du génotype d'un individu magot possédant 6 allèles 162

Figure 2 Fréquence des allèles trouvés pour le marqueur lié au CMH au sein des groupes focaux 162

Figure 3 Attribution d'un allèle à chaque bande ce qui permet d'établir un génotype à chaque individu sans séquencer chaque bande. 167

Figure 4 Image d'un gel d'électrophorèse par gradient dénaturant. 168

Figure 5 Pedigrees des familles d'Ares et Apollo. 170

Liste des tableaux

Chapitre 1

Table 1 Caractéristiques des classes d'âge chez le gorille des plaines de l'ouest d'après Breuer (2009) ……..……32

Chapitre 2

Table 1 Explanatory variables tested according to the direction of dispersal by adult females: female emigrating from vs. staying in their breeding group, and units into which females immigrated vs. all other non-chosen units …….….50

Table 2 Best general linear mixed models (ΔAICc<2) estimating the effects of emigrating females, silverbacks and breeding units as factors of the probability of female emigration in the Lokoué and Romani populations. ……...55

Table 3 Best general linear mixed models (ΔAICc<2) estimating effects of immigrating females, silverbacks and units as factors of the probability for female immigration into the Lokoué and Romani populations.……..….59

Table S1 Periods of observation and presence of gorillas on the Lokoué and Romani clearings during each period of the study …….……68

Table S2 Sample data across sites and years …….69

Table S3 Proportions (±standard errors) of individuals weakly and severely diseased by yaws-like infection in the two populations …….73

Chapitre 3

Table 1 Number of the different unit types during the three studied periods……....93

Table 2 Available silverback males within Lokoué population depending on the period, and the history of their status. ……..94

Table 3 Best general linear mixed models (ΔAICc<2) estimating the effects of periods and breeding units as factors of the probability of female emigration in the Lokoué population. ……...95

Table 4 The number of immigrant females and, in parenthesis, the numbers of availabilities of the different categories in the three periods……..……98

Table S1 Periods of observation and presence of gorillas on the Lokoué clearings during each period of the study.....105

Chapitre 4

Table 1 Origin of samples used for NGS analysis. 117

Table 2 Gorilla MHC class II alleles identified in the present study and the population where they were found.....124

Table S1 Fusion primers 130

Chapitre 5

Tableau 1 Analyse de la diversité du D6S2878 selon la sous population considérée.....145

Tableau 2 Association des génotypes identifiés pour le marqueur D6S2878 et des groupes de liaison du des *DRB* du CMH porté par les individus. 146

Tableau S1 Présentation des individus utilisés pour le génotypage du D6S2878 ayant également été séquencés par NGS pour la région du CMH-*DRB*. 151

Chapitre 6

Tableau 1 Description des échantillons disponibles, des mères connues, des mères potentielles et des pères potentiels pour chaque enfant dans chaque groupe.....159

Tableau 2 Valeurs des paramètres génétiques pour les marqueurs neutres.....161

Tableau 3 Liens de parentés identifiés par reconstruction (** : relations significatives et prises en compte pour la suite des analyses.....163

Tableau 4 Dyades significativement apparentées selon le coefficient R de Queller & Goodnight...163

Tableau 5 Triades de parents-enfants retenues et nombre d'allèles partagés entre les parents.....164

Tableau 6 Résultats des identifications d'allèles après séquençage des bandes issues des EGGD. 171

Tableau 7 Concordance entre le nombre d'allèles identifiés selon la méthode utilisée pour les sept individus qui ont été analysés par EGGD, génotypage du microsatellite lié et NGS.....172

Tableau 8 Concordance entre les allèles identifiés selon la méthode du EGGD et la méthode du NGS pour les sept individus qui ont été analysés des deux façons..... 173

Introduction générale

Introduction générale

I La socialité

a) Evolution de la socialité

La socialité se définit comme la vie en groupes sociaux au sein desquels les individus développent des interactions de coopération plus ou moins importantes. Les individus d'une même espèce se rassemblent lorsque les bénéfices en terme de valeur adaptative individuelle supplantent les inconvénients de la vie en groupe (Alexander 1974; Krause and Ruxton 2002). Le développement de la coopération entre les individus augmente les bénéfices individuels et permet l'évolution de la socialité. La socialité est donc supposée avoir des conséquences sur la valeur adaptative des individus (Silk 2007). Les bénéfices perçus par un individu, grâce aux interactions sociales à court terme, entraineraient une différence de valeur adaptative à long terme (Grafen 1991). Par exemple, si la vie en groupe permet une réduction du temps passé à la surveillance de danger, l'individu peut alors passer plus de temps à se nourrir, ce qui lui assurera une meilleure valeur adaptative. Les bénéfices différentiels qui résultent des variations des paramètres de la vie en groupe seront plus facilement mis en évidence au niveau intra-spécifique, en mettant par exemple en relation les variations de taille et/ou de composition de groupe et des relations interindividuelles avec les variations de valeurs adaptatives des individus dans ces groupes (Silk 2007).

Les bénéfices de la vie en groupe diffèrent selon les espèces considérées. Par exemple les espèces d'herbivores profiteront de la vie en groupe grâce au gain de vigilance ou à la défense du groupe face au prédateurs (Lehtonen and Jaatinen 2016) alors que les espèces de prédateurs profiteront de la vie en groupe grâce à la coopération pour la chasse (Bullinger et al. 2011; MacNulty et al. 2014). Il existe des inconvénients à la vie en groupe qui sont l'augmentation de la compétition pour les ressources et l'augmentation de la transmission de maladies et pathogènes (Alexander 1974; Nunn et al. 2015). Ces inconvénients peuvent différer selon l'espèce. Par exemple, la diffusion des parasites peut varier selon le type d'organisation sociale, le degré de promiscuité des individus, l'intensité des contacts sociaux et les structures d'accouplements (Altizer et al. 2003).

Il existe trois types de conditions favorisant la vie en groupe : 1) une diminution de la susceptibilité à la prédation soit par défense active ou effet de dilution 2) une facilitation de la

recherche de nourriture, par la chasse en groupe, ou une plus grande capacité d'exploration du territoire 3) une répartition hétérogène de certaines ressources comme les sites de nuit ou de reproduction incitant au rassemblement des individus autour de ces lieux favorables (Alexander 1974). Quand la vie en groupe est favorisée, la taille et la composition du groupe social auront des conséquences sur la morphologie et les comportements des individus, allant de l'importance du dimorphisme sexuel (Pérez-Barbería et al. 2002) en passant par la taille relative du cerveau (hypothèse du cerveau social ; Dunbar 2009) et la prévalence de l'infanticide (Silk 2007). Il existe une corrélation forte entre la polygynie et le degré de dimorphisme sexuel. L'apparition de la polygynie aurait conduit les mâles à augmenter leur taille corporelle (principalement) pour mieux défendre leurs femelles (Harvey et al. 1978; Plavcan 2001).

b) Diversité des systèmes sociaux

L'agrégation en groupe de composition variable avec le temps est souvent observée au sein du règne animal, mais il existe des espèces qui forment des groupes relativement stables avec des membres permanents (Kutsukake 2008). Les relations sociales entretenues par deux individus d'un même groupe dépendent de leurs interactions sociales, mais également des interactions que chacun a avec les autres membres du groupe. Ainsi, chacun « garde en mémoire » les liens qu'il a établi avec les membres de son groupe (Kutsukake 2008).

La diversité des systèmes sociaux existants peut être décrite en partie en utilisant la diversité des régimes d'appariement. Cependant, il faut distinguer entre organisation sociale, structure sociale et systèmes d'appariements qui sont différentes composantes des systèmes sociaux (Kappeler and van Schaik 2002). En effet, l'organisation sociale recouvre la manière dont les individus s'associent les uns aux autres pour former des unités sociales reproductrices, le nombre moyen de partenaires, la durée des associations entre reproducteurs ainsi que le partage des soins parentaux. Les systèmes d'appariements impliquent une composante génétique en plus de la composante sociale. La structure sociale fait référence aux relations sociales entre membres de groupes ou au sein d'une population (Kappeler and van Schaik 2002). L'évolution vers la vie en groupe chez les mammifères est probablement basée sur la répartition spatiale des femelles, qui se regroupent en fonction des contraintes écologiques (Kappeler 2013). Les mâles se répartissent ensuite selon la distribution spatiale des femelles réceptives.

Le système d'appariement de type monogamie, c'est-à-dire la reproduction avec un unique partenaire, ce pour les deux sexes, au cours d'une saison de reproduction, aurait évolué à partir d'ancêtres solitaires avec des mâles vagabonds parcourant le territoire de plusieurs femelles solitaires (Lukas and Clutton-Brock 2013). Une faible densité de ressources alimentaires de haute qualité et l'intolérance entre femelles favorisent leur vie solitaire et rend difficile la défense de plusieurs femelles reproductrices par les mâles (Lukas and Clutton-Brock 2013). Cette hypothèse de la monogamie comme première forme de vie en groupe est questionnée chez les primates pour lesquels la monogamie aurait évolué à partir d'ancêtres vivant en groupes multi-mâles multi-femelles instables (Shultz et al. 2011). Il est toutefois important de faire la distinction entre la monogamie sociale, qui décrit une proximité sociale et spatiale importante entre deux individus de sexes opposés, et la monogamie génétique qui décrit un accouplement exclusif et est considérée comme rare chez les mammifères (Reichard and Boesch 2003).

Le second système d'appariement que l'on peut décrire est la polygynie, un mâle se reproduit avec plusieurs femelles. Lorsque l'aide du mâle dans la survie des descendants n'est pas indispensable, et que les femelles vivent en groupes sociaux, un ou plusieurs mâles peuvent protéger un certain nombre de femelles reproductrices et les empêcher de se reproduire avec d'autres mâles extérieurs au groupe. C'est le cas pour le lion d'Afrique (*Panthera leo*), lorsque les mâles atteignent l'âge de quatre ans, ils tentent de prendre le contrôle d'un groupe de femelles, généralement apparentées, en affrontant le mâle dominant (Bertram 1975; Packer et al. 1988). Si les groupes de femelles sont petits, un seul mâle suffira tandis que l'on verra l'augmentation d'unités multi-mâles avec l'augmentation du nombre de femelles reproductrices. La coalition entre plusieurs mâles apparentés au sein des groupes de lions permet une meilleure protection contre les attaques de congénères. La polygynie sera d'autant plus présente que les femelles seront sur des territoires défendables ou resteront en groupes sociaux stables.

Lorsqu'une femelle se reproduit avec plusieurs mâles, mais eux ne se reproduisent qu'avec une seule femelle, on parle de polyandrie. Ce système reproducteur est peu répandu mais se retrouve chez les mammifères sous la forme de coopération (Dixson 2015). En effet chez le tamarin (*Saguinus sp.*) et l'ouistiti (*Callithrix sp.*), la naissance de jumeaux est fréquente. La femelle recherche les soins parentaux et la protection des ressources de deux mâles pour assurer une meilleure survie à ses descendants. Cependant, le degré de polyandrie de ces espèces reste à préciser. Le dernier type

d'appariement est la polygynandrie, ou promiscuité sexuelle. Au cours d'une saison de reproduction, les mâles et les femelles ont chacun plusieurs partenaires reproducteurs. Cependant, chez les primates, on parle de « pseudo-promiscuité » puisque des facteurs tels que le rang social ou l'âge restent impliqués dans les possibilités de reproduction (Dixson 2015).

c) Dispersion et socialité

Greenwood (1980) a montré que la dispersion biaisée pour les mâles et la philopatrie des femelles est commune chez les mammifères, ce qui l'a amené à supposer un lien entre le régime d'appariement et la dispersion. La défense des femelles dans les systèmes polygynes serait un déterminant de la dispersion des mâles. Cependant la défense des femelles n'est pas la seule pression évolutive : l'évitement de la consanguinité, la sélection de parentèle, la compétition pour les ressources ou le partenaire sont également déterminant pour l'évolution des modalités de dispersion chez les espèces sociales (Lawson Handley and Perrin 2007). C'est pourquoi chez les espèces polygynes une variété de modalités de dispersion peut être observée : la dispersion des mâles uniquement (ex : les macaques, Pusey and Packer 1987), des femelles uniquement (ex : beaucoup de carnivores nocturnes ; Sandell 1989) ou des deux sexes (ex : la plupart des équidés, les colobes olives, et les trois espèces africaines de grands singes, (Wrangham 1980; Pusey 1987; Korstjens and Schippers 2003). Chez les espèces sociales, la dispersion détermine la structure et l'organisation sociale des populations (Kappeler & van Schaik 2002). Chez les espèces dont l'unité de reproduction est structurée en harem (un mâle reproducteur pour plusieurs femelles), les deux sexes doivent disperser de leur unité sociale de naissance pour éviter la consanguinité pour les femelles et pour accéder à la reproduction pour les mâles (Clutton-Brock & Lukas, 2012). La décision de disperser est alors conditionnée principalement par l'âge. Les risques pris lors de la dispersion (risque de sur-mortalité, stress d'un nouvel environnement social) doivent être balancé par les bénéfices acquis en termes de reproduction. C'est également la balance entre les coûts à rester dans une unité sociale (compétition locale, (Perrin and Mazalov 2000) et les bénéfices à disperser vers une nouvelle unité (accès à un meilleur reproducteur, (Höner et al. 2007) qui règle la dispersion secondaire des individus. L'attraction vers un partenaire sexuel est donc un facteur déterminant de la dispersion (Lawson Handley and Perrin 2007). Les modalités de cette attraction structurent ainsi la dynamique sociale des populations.

II Choix de partenaire

a) La sélection sexuelle

Les variations du système de reproduction induisent une différence de l'intensité de la sélection sexuelle, qui se retrouve dans une variation de l'importance du dimorphisme sexuel et de soins parentaux (Alexander 1974; Jones and Ratterman 2009). Par exemple, au sein des mammifères, les espèces polygames sont plus dimorphiques que les espèces monogames. Les espèces polygynes avec des tailles de groupe plus grandes sont aussi plus dimorphiques (Alexander 1974). Darwin (1872) suggère que le dimorphisme sexuel a évolué sous l'influence de la sélection sexuelle qui dépend du succès reproducteur de certains individus par rapport à d'autres du même sexe. Les femelles montrent ainsi une préférence vers des mâles qui leur permettront d'obtenir des bénéfices allant vers une meilleure valeur adaptative pour elles-mêmes ou leurs descendants (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). La fréquence et l'intensité des traits dimorphiques sont souvent plus exagérés chez les mâles que chez les femelles. Néanmoins, les femelles peuvent également montrer des traits dimorphiques particuliers dans des contextes, similaires à ceux des mâles, de compétition pour l'accès aux partenaires sexuels. Ces traits peuvent être comportementaux et/ou morphologiques (Clutton-Brock et al. 2006; Clutton-Brock 2007; Rosvall 2011).

Darwin (1872) a été le premier à décrire les deux voies pré-copulatoires selon lesquelles se fait la sélection sexuelle. La première est la compétition intra-sexuelle, et la deuxième résulte d'une préférence d'accouplement d'un des sexes pour des ornements chez le sexe opposé. La définition de ces deux voies est essentiellement celle encore utilisée aujourd'hui (Jones and Ratterman 2009). Le rôle des ornements dans la sélection sexuelle a le plus souvent été étudié chez les mâles. Cependant, il existe aussi des ornements chez les femelles (Clutton-Brock 2007), par exemple la couleur du plumage chez certaines espèces d'oiseaux, qui seraient des signaux fiables de leur résistance aux parasites, donc de leur valeur adaptative (Amundsen 2000). Chez les femelles primates, la relation entre ornements (couleur faciale ou forme du gonflement de la peau sexuelle par exemple) n'est pas clairement établie (Setchell et al. 2006, 2015).

Les préférences d'accouplements sont définies comme un ensemble de propriétés sensorielles et comportementales qui influencent la propension d'un individu à se reproduire avec un certain phénotype (Heisler et al. 1987). La sélection sexuelle est alors le patron de reproduction issu

de ces préférences. Les préférences peuvent être séparées en deux éléments, « *mating function* » qui définit l'ordre dans lequel un individu va classer ses partenaires potentiels, et « *choosiness* » qui définit l'effort et l'énergie qu'un individu est prêt à investir pour accéder à un partenaire (Jennions and Petrie 1997; Dechaume-Moncharmont et al. 2016). La sélection sexuelle peut être couteuse pour le sexe qui est choisi car être sélectif implique une consommation de temps et d'énergie. Ainsi, trois explications principales sont proposées pour le maintien de cette stratégie au cours de l'évolution. Si on considère la sélection opérée par les femelles par exemple, une première hypothèse est que les préférences des femelles entrainent un bénéfice direct de leur survie ou de leur reproduction. Les coûts engendrés par la recherche du meilleur partenaire sont contrebalancés par les bénéfices de se reproduire avec un meilleur mâle. Cela sera développé dans le paragraphe IIb. La deuxième hypothèse voudrait que la sélection soit maintenue grâce à un bénéfice génétique pour la valeur adaptative des descendants. Enfin, la dernière hypothèse suppose l'existence d'un effet pleiotropique avec un, ou plusieurs, gènes impliqués dans des caractères (couleur, forme, taille) qui favorisent une meilleur performance lors de la recherche de nourriture ou de l'évitement des prédateurs (Jennions and Petrie 1997).

Il existe plusieurs types d'éléments qui permettent aux femelles d'exercer une sélection de partenaires reproducteurs. Le premier, le plus fréquemment étudié, concerne les traits héritables que sont les caractères sexuels secondaires. Chez le gorille des plaine de l'ouest par exemple, certains traits du dimorphisme sexuel (longueur du corps, taille du cimié, musculature) sont corrélés au succès reproducteur des mâles et à la survie des descendants (Breuer et al. 2012). Le deuxième élément à prendre en considération est l'environnement dans lequel évoluent les individus. Ensuite, pour des espèces sociales, l'environnement social des reproducteurs aura aussi une importance sur le choix de partenaire. Et enfin, certaines caractéristiques génétiques n'étant pas exprimées par un caractère sexuel secondaire peuvent aussi influencer le choix de partenaire reproducteur. Plusieurs études ont montré que les femelles utilisaient de multiples indices pour le choix de leur partenaire (Kodric-Brown 1993; Choudhury and Black 1994; Borgia 1995; voir une revue dans Jennions and Petrie 1997). Elles peuvent hiérarchiser les informations, ou les étudier toutes en même temps en leur donnant un poids différent. Enfin, il ne faut pas oublier que dans certain cas les femelles ne peuvent pas exercer de choix de partenaire. En effet, dans des populations à faible effectif, le nombre de partenaires disponibles peut être réduit et la femelle aura un choix très restreint. Dans les populations

génétiquement isolées, l'absence de variation génétique peut également masquer l'existence d'une préférence pour l'espèce lorsque les traits phénotypiques potentiellement sélectionnés par les femelles ont une base génétique dont la variabilité a été réduite.

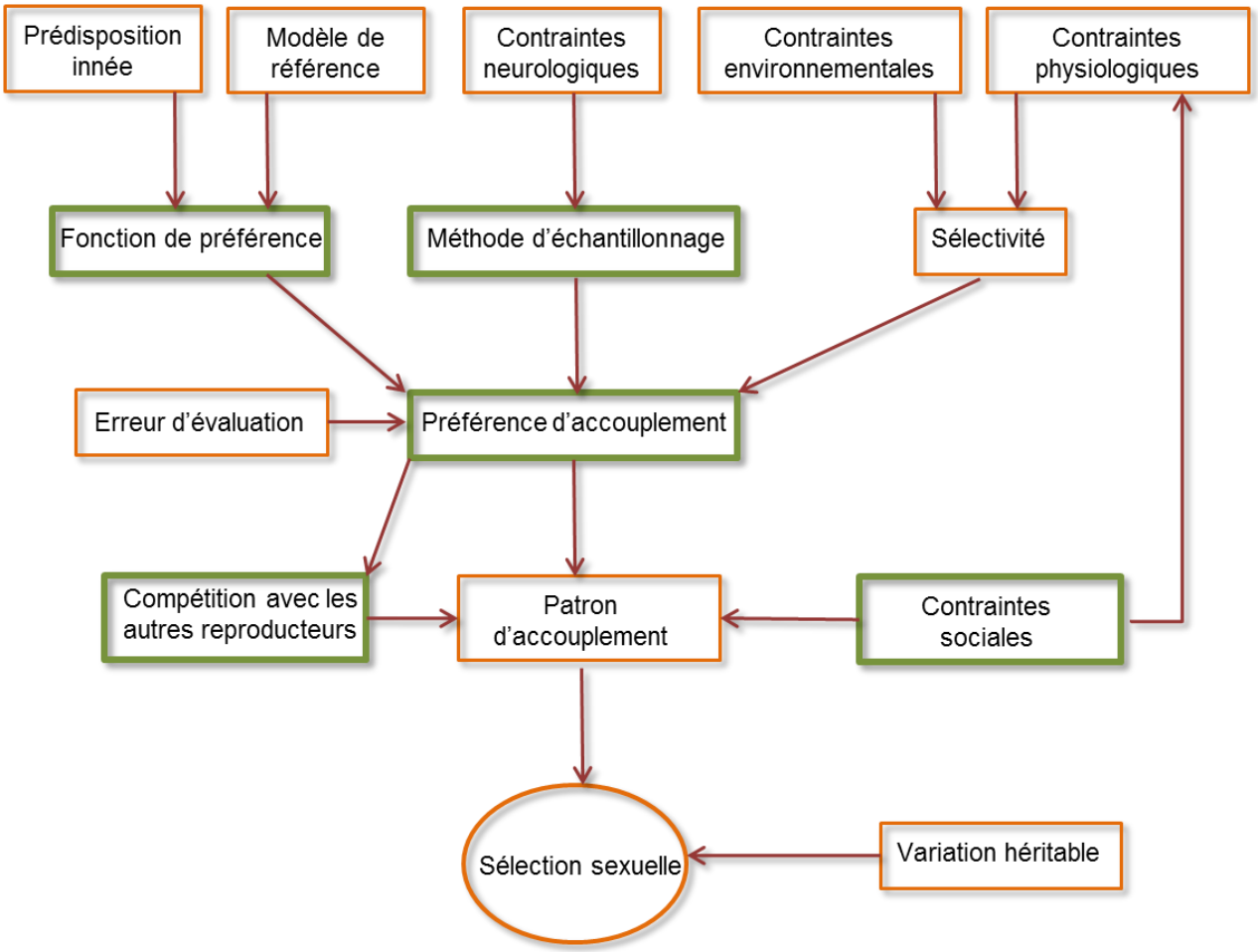


Figure 1 Mécanisme du choix de partenaire et de la sélection sexuelle d'après Widemo and Sæther (1999). Les boites vertes indiquent les thèmes qui seront abordés au cours de cette thèse.

b) Influence de la qualité des partenaires sur le choix de partenaire

Qualité du partenaire et caractères sexuels secondaires

Darwin a défini les caractères sexuels secondaires comme des traits exagérés impliqués dans la compétition intra-sexuelle pour l'accès à la reproduction, n'apportant pas, ou peu, de bénéfices de survie. Par contre, de nombreuses études corrélationnelles ou expérimentales ont confirmé que les individus, notamment les mâles, montrant une ornementation exagérée ou un trait particulier avaient un meilleur succès reproducteur (Jennions and Petrie 1997). Ces caractères sexuels secondaires, parfois plus ou moins handicapants, peuvent être des signaux honnêtes de la qualité des mâles,

reproductrice ou de protection contre les prédateurs ou les attaques par des congénères (Vanpé et al. 2010). Deux mécanismes principaux peuvent expliquer que les mâles qui les portent puissent être sélectionnés par les femelles. Le premier a été décrit par (Fisher 1915, 1930) ; il s'agit d'un processus d'emballement. Si un ornement apporte un léger avantage de survie aux mâles, les femelles les choisissant produiront des descendants mâles avec un avantage de survie. Ainsi, cet ornement se rependra par la meilleure survie des porteurs mais également par le choix, hérité de la mère, des femelles vers ces individus (Fisher 1915, 1930; Lande 1981; Jones and Ratterman 2009). Ce mécanisme ne faisant que s'amplifier avec les générations les phénotypes présentant cet ornement resteront sélectionnés même si son exagération a des conséquences négatives sur la survie du mâle (Jones and Ratterman 2009). Tant que les bénéfices, en termes de succès reproducteur, issus de la préférence des femelles dépassent les coûts sur la viabilité des mâles, cet emballement continue. Le second mécanisme est le principe du handicap et la recherche de « bons gènes » (Smith 1991; Andersson 1994; Mead and Arnold 2004). Il repose sur l'idée que les ornements sont des indicateurs de bonne santé et de vigueur, autrement dit, des signaux honnêtes de la qualité du mâle. Les ornements étant handicapants, les individus les produisant ne peuvent être que de très bonne qualité. Lorsque le caractère sexuel secondaire et la préférence des femelles sont héritables, la femelle qui se reproduit avec un mâle de meilleure qualité va produire des descendants qui bénéficieront des bons gènes du père en terme de survie et des bons gènes de la mère en terme de choix de partenaire résultant en une meilleur valeur adaptative (Bertram et al. 2016). Le problème de cette hypothèse est que la sélection directionnelle vers un caractère exagéré va réduire le bénéfice indirect qui lui est associé ainsi que sa variabilité génétique. Cependant, si ces traits sont associés à une résistance à des pathogènes ou parasites, la dynamique de coévolution maintiendra une variation génétique et le lien entre le caractère sexuel et la résistance aux maladies (Hamilton and Zuk 1982). Ainsi, l'hypothèse de l'emballement fisherien attribue des avantages de survie directement à l'ornementation, tandis que l'hypothèse du handicap octroie un rôle d'indicateur aux ornements.

Les deux mécanismes explicités ci-dessus se basent sur l'existence de bénéfices indirects. Ceux-ci occultent les bénéfices que peut obtenir directement une femelle en choisissant son partenaire reproducteur comme l'apport de cadeaux nuptiaux ou l'acquisition d'un meilleur territoire (Andersson 1994).

Les caractères sexuels secondaires ont principalement été étudiés chez les mâles mais les femelles peuvent également en développer (Clutton-Brock 2009). En effet, la compétition pour l'accès aux ressources nourricières, protectives ou reproductives est aussi présente entre femelles. La compétition entre femelles est courante chez les espèces dont la mère tire des bénéfices de ses accouplements avec différents partenaires au sein d'un même cycle reproductif (Clutton-Brock et al. 2006; Clutton-Brock 2009). L'existence d'une préférence des mâles envers les femelles selon leurs caractéristiques morphologiques favorise également l'apparition de caractères sexuels secondaires chez ces dernières.

Chez les espèces sociales, la mise en place de système de hiérarchie va intervenir dans les préférences d'appariement. Au sein des mammifères, les femelles montrent une préférence pour des mâles dominants qui apportent alors des bénéfices directs comme un meilleur territoire ou une meilleure protection, mais également des bénéfices indirects, les traits affectant la dominance étant parfois héritables (Clutton-Brock and McAuliffe 2009).

Les caractères sexuels secondaires sont le plus souvent associés à un signalement de « bons gènes ». Une hypothèse alternative suggère que l'ornementation soit liée à un degré d'hétérozygotie comme observé chez plusieurs oiseaux et mammifères. Ainsi l'hypothèse des « gènes complémentaires » suppose que les préférences se font sur la base du taux d'hétérozygotie ou de la recherche d'un partenaire dissimilaire génétiquement (Bertram et al. 2016). Lorsqu'ils sont hétérozygotes, les mâles peuvent montrer une meilleure fitness et les femelles chercheront alors un mâle avec un génotype différent du leur afin d'améliorer la fitness de leurs descendants (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). Cette préférence sera dépendante du génotype de la femelle, et la « *mating function* » sera donc différente pour chacune, permettant un maintien de la variabilité génétique de la population malgré une forte préférence de partenaire (Bertram et al. 2016)

Les femelles étant à la recherche d'un mâle leur assurant une bonne descendance, ses capacités de résistance à des pathogènes seront importantes. Les odeurs peuvent retranscrire l'état de santé des mâles, et chez plusieurs espèces de rongeurs, il a été montré que les femelles vont utiliser ces indices olfactifs pour détecter les individus infectés afin d'optimiser la santé de leur descendants (Clutton-Brock and McAuliffe 2009).

Choix de partenaire et qualité de protecteur contre la prédation et les congénères

Les femelles sont capables de détecter les qualités du mâle de plusieurs façons. Elles peuvent utiliser des indices visuels, comme la taille des individus qui peut parfois être garante d'une meilleure défense, mais également des indices olfactifs et vocaux. Chez les rongeurs, les femelles vont utiliser la taille des glandes odorantes, la fréquence de marquage odorant ainsi que la structure chimique de l'odeur pour déterminer le statut hiérarchique des mâles et orienter leur choix de partenaire reproducteur (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). Quant au cerf élaphe (*Cervus elaphus*) (McComb 1991), ou au microcèbe mignon (*Microcebus murinus*) (Craul et al. 2004) les femelles montrent une préférence pour des fréquences d'appels vocaux plus élevés. La fréquence étant corrélée au statut de dominance chez le microcèbe, ou chez le cerf élaphe au succès reproducteur du mâle.

Le risque de prédation est un facteur important intervenant dans la sélectivité des femelles. Les études théoriques prédisent une diminution de l'effort alloué à la recherche d'un partenaire lors d'une augmentation du risque de prédation (Jennions and Petrie 1997). En effet, dans une population avec une densité variable de partenaires reproducteurs, être sélectif implique de plus grandes distances et être soumis à un risque plus grand de rentrer en contact avec un prédateur (Crowley et al. 1991). La pression de prédation constitue un indice directement disponible à l'observation des femelles. Chez les oiseaux, les femelles qui choisiront des mâles plus vigilants, leur permettant de réduire leur propre vigilance, et donc un meilleur partage des soins parentaux et donc une meilleure efficacité sur les autres tâches (Dahlgren 1990; Portugal and Guillemain 2011). La protection par le mâle est également importante pour lutter contre les nombreux autres courtisans. Chez les éléphants de mer (*Mirounga angustirostris*) les femelles peuvent subir de sévères blessures, de la part des mâles périphériques courtisans, lors de leur retour à la mer à la fin de la période de lactation. Cependant, en quittant leur mâle reproducteur, elles sont la cible des nombreux mâles en périphérie du harem. En s'accouplant avec un mâle suffisamment imposant, par rapport aux autres mâles qui les harcèlent lors de leur trajet vers la mer, elles s'assurent une protection et réduisent la probabilité de blessures (Mesnick and Boeuf 1991). Chez les ongulés qui forment des troupeaux instables, les femelles rejoignent les mâles offrant la meilleure protection (Clutton-Brock and McAuliffe 2009).

Le territoire occupé et défendu par un mâle peut également permettre à la femelle de choisir son partenaire. La recherche de ressources peut prévaloir sur le choix d'un phénotype particulier (Jennions and Petrie 1997).

L'environnement peut avoir un effet sur la détection et la discrimination des signaux, comme par exemple la luminosité sur la détection des couleurs. Aussi, dans des conditions environnementales différentes, les sons, par exemple, peuvent se diffuser différemment, et les femelles baseront ainsi leur choix sur le signal le plus perceptible (Real 1994). Les partenaires peuvent être « distraits » par la présence d'un prédateur ou de mauvaises conditions environnementales modifiant leur « *mating function* » (Jennions and Petrie 1997). La femelle n'arrive plus évaluer ses partenaires et modifie ainsi son choix.

c) Facteurs sociaux

L'environnement social peut exercer une influence directe ou indirecte sur la sélection sexuelle (Galef and White 2000). L'influence directe de l'environnement social est souvent définie comme « mate-choice copying». La femelle va exprimer un choix de partenaire en copiant celui effectué par les autres femelles du groupe (Jennions and Petrie 1997; Clutton-Brock and McAuliffe 2009). Cela peut permettre de réduire le coût de l'évaluation des partenaires sexuels et d'obtenir plus rapidement des informations « qualitatives » sur les partenaires potentiels. Cependant, il est parfois difficile de différencier une réelle imitation de choix, d'un regroupement autour d'un même mâle pour sa protection contre la prédation et le harcèlement par d'autres mâles (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). Les femelles peuvent ainsi se rassembler autour d'un mâle indépendamment d'une décision de choix de partenaire reproducteur (Clutton-Brock and McComb 1993).

Les interactions entre mâles sont un facteur évident impliqué dans le choix de partenaire par les femelles (Jennions and Petrie 1997). Les plus jeunes mâles sont souvent moins forts et ont tendance à perdre la compétition pour l'accès aux femelles (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). Les mâles plus matures contrôlent souvent un plus grand territoire attirant ainsi plus de femelles. La distance entre les partenaires potentiels aura aussi son importance. Par exemple, une hypothèse expliquant l'apparition de leks pour la reproduction serait la facilité d'accès à plusieurs mâles pour les femelles (Jennions and Petrie 1997). Cependant, la reproduction sur les leks est couteuse pour les mâles, suite à une augmentation des combats intra-sexuel et à la faible disponibilité en ressources alimentaires sur les territoires de petites tailles défendus sur les leks (Clutton-Brock et al. 1993). Le rassemblement des mâles sur les leks leur permettrait une meilleure défense contre les prédateurs (vigilance et effet de dilution), l'attraction d'un nombre démesuré de femelles et la rétention des femelles réceptives. On a ainsi pu observer un choix de partenaire basé sur des critères différents

entre des femelles sur des leks ou en dehors de leks. Plusieurs hypothèses pour cela sont la réduction du cout lié à la recherche de partenaire sur les leks, autorisant les femelles à être plus sélectives face au grand nombre de mâles disponibles. Aussi, sur les leks, la proximité entre femelles peut favoriser la stratégie d'imitation du choix des autres femelles, influençant les critères de choix (Gibson and Höglund 1992).

La compétition entre femelles est moins étudiée mais semble tout aussi importante pour le choix de partenaire. Une femelle peut monopoliser un mâle préféré ou augmenter le nombre de copulations pour limiter l'accès aux autres femelles (Jennions and Petrie 1997). Le choix de certaines femelles sera alors limité par les relations antagonistes avec les autres femelles et leur dominance (Moller 1992).

La sex-ratio opérationnelle (SRO) définit la proportion de mâles et femelles effectivement disponibles pour la reproduction (Emlen & Oring, 1977). L'existence d'un biais vers plus de femelles que de mâles augmentent la compétition intra-sexuelle entre femelles (Clutton-Brock 2009). La SRO pouvant changer au cours de la période de reproduction, s'ensuivra une modification des pressions de compétition intra-sexe entre les sexes. La disponibilité en mâles et femelles peut, par exemple, être influencée par les différences inter-sexuelles de traits d'histoires de vie. Si l'un des deux sexes montre une mortalité plus importante, il deviendra le sexe rare ce qui modifiera la sélectivité du second.

La reproduction entre apparentés a pour conséquence de réduire la fitness des descendants (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). Les femelles ont mis en place plusieurs stratégies qui permettent d'éviter de se reproduire avec des apparentés. La dispersion, le retardement de la maturité sexuelle ou l'accouplement avec des immigrants sont des stratégies mise en place, en partie, pour l'évitement de consanguinité (Pusey 1987).

d) Choix pour des caractéristiques génotypiques cryptiques : le cas des gènes du complexe d'histocompatibilité majeur

Diversité du CMH

Les traits génétiques peuvent également apporter des bénéfices directs et indirects sur la fitness. Les individus avec un plus fort taux d'hétérozygotie montrent un meilleur succès reproducteur ainsi qu'une meilleure capacité immunitaire et résistance aux pathogènes (Chapman et al. 2009). Chez le mésite monias (*Monias benschi*) et la mésange bleue (C*yanistes caeruleus*), les femelles hétérozygotes ont montré des plus grandes tailles de ponte, quant aux mâles plus hétérozygotes ils ont de meilleurs territoires et nourrissent plus fréquemment leurs jeunes (Seddon et al. 2004; García-Navas et al. 2009). Le niveau d'hétérozygotie d'un individu peut être étudié sur le génome total, mais est fréquemment limité à des locus spécifiques (Kempenaers 2007). Dans cet objectif, les gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ont attiré beaucoup d'attention car ils jouent un rôle central dans le système immunitaire, mais aussi parce que c'est une des régions les plus polymorphes du génome des vertébrés (Kamiya et al. 2014). Les gènes de classe I et II du CMH codent pour des peptides de reconnaissance des molécules étrangères aux cellules T (Fig 2). Les classes I présentent les peptides pathogènes d'origines intracellulaires (viraux), et les classe II les peptides pathogènes d'origine extracellulaires (bactériens) (Kamiya et al. 2014). Parmi les gènes de classe II, les locus DR codent pour les chaines α (DRA gène monomorphique invariant) et β (DRB codant pour le peptide de reconnaissance). La duplication des gènes DRB est un mode d'évolution de ce complexe de gènes (Yeager and Hughes 1999). Le nombre de locus du CMH et l'étendue de son polymorphisme varie au niveau inter- et intra- spécifique (Yeager and Hughes 1999).

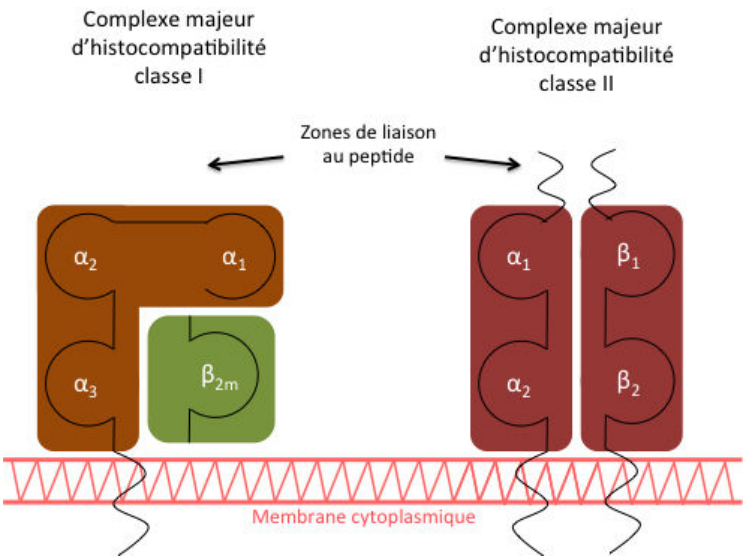


Figure 2 Structure des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité.

L'évolution et le maintien d'un tel polymorphisme est due à plusieurs forces évolutives. La première pression de sélection agissant sur le CMH est celle exercée par les pathogènes. Il s'agit d'une sélection balancée issue de la coévolution entre hôte et pathogène (Bernatchez and Landry 2003). La première hypothèse expliquant ce mécanisme de maintien du polymorphisme par pression de sélection des pathogène indique que les hétérozygotes auraient un plus large spectre de détection des pathogènes et donc un avantage évolutif. La seconde hypothèse propose que l'antigénicité (reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte) parasitaire soit sélectionnée pour exploiter les défauts de la réponse immunitaire en se basant sur le CMH du génotype le plus commun chez l'hôte (Bernatchez and Landry 2003). Ce processus favorise alors l'apparition et le maintien de gènes rares, et donc le polymorphisme. Une force évolutive plus rarement évoquée dans le maintien de la diversité du CMH est l'avortement sélectif (Potts and Wakeland 1990). Chez l'homme, on a observé que des couples subissant des fausses couches récurrentes partagent plus d'allèles CMH que des couples contrôles. La dernière force évolutive agissant sur le polymorphisme du CMH est la sélection sexuelle. Deux explications principales sont le plus souvent citées (Penn 2002). La première serait liée à l'évitement de consanguinité. Le CMH étant très polymorphe, la probabilité de partager des allèles augmente avec l'apparentement. La reproduction entre apparentés étant le plus souvent évitée, l'appariement entre deux individus différents aide à maintenir le polymorphisme (Potts and Wakeland 1990). La deuxième explication du maintien du polymorphisme du CMH au travers de la sélection sexuelle implique un choix de partenaire reproducteur.

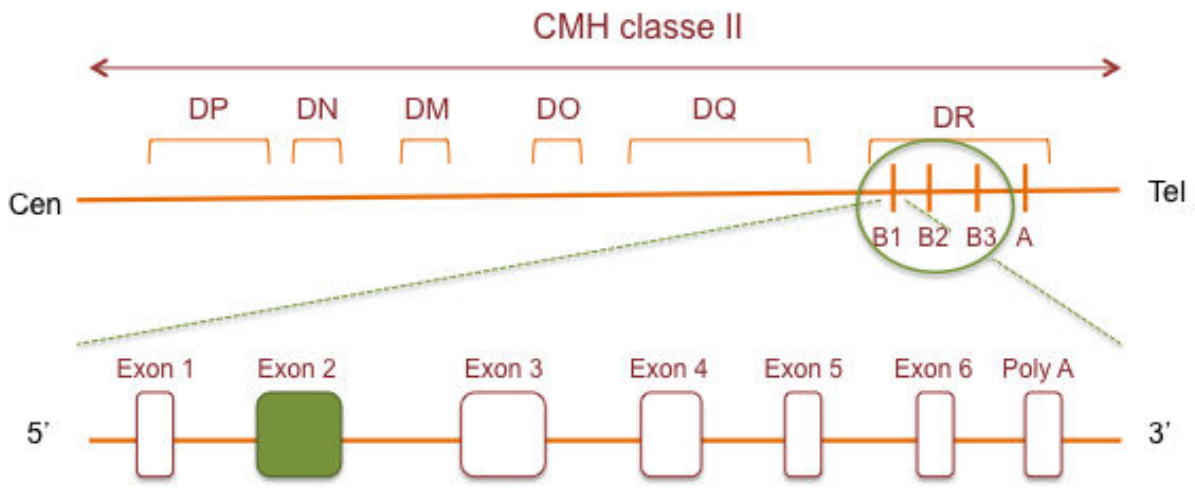


Figure 3 Structure de la classe II du CMH sur le chromosome 6 avec un focus sur la région DR son l'exon 2.

CMH et choix du partenaire

Le CMH est un bon candidat dans l'étude du choix de partenaire car c'est une région avec un fort taux de polymorphisme qui donne une base de variabilité suffisante pour une différenciation des individus sur la base de leur génotype (Jordan and Bruford 1998). Aussi, discriminer les potentiels partenaires reproducteurs sur la base du CMH permettrait de choisir le « bon » génotype qui améliorerait la survie des descendants en augmentant sa résistance aux pathogènes et parasites (Kamiya et al. 2014). L'étude du lien entre choix de partenaire et variabilité du CMH a commencé avec des souris en conditions contrôlées, ce qui a permis de montrer l'existence d'un tel choix de partenaire sur la base du génotype du CMH (Yamazaki et al., 1976). L'orientation de ce choix est encore débattue. Cette observation a ensuite été confirmée en utilisant des lignées de populations sauvages en milieu semi-naturel (Potts et al., 1991). Aujourd'hui encore, les connaissances de cette région sont principalement acquises sur des organismes modèles ou chez l'humain (Kamiya et al. 2014). Le choix du partenaire conditionné par la variabilité du CMH permettrait aussi d'éviter la reproduction entre apparentés (Brown and Eklund 1994).

Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer un lien entre choix de partenaire et variabilité du CMH : 1) la recherche d'un allèle particulier, 2) la recherche du plus grand nombre d'allèles (avantage de l'hétérozygote), 3) la recherche d'un génotype compatible (similaire ou dissimilaire) (Huchard and Pechouskova 2014; Kamiya et al. 2014). La première hypothèse repose sur la recherche d'un phénotype de résistance (lié à un allèle particulier) conférant un avantage sélectif dans un environnement donné, il s'agit donc d'un choix condition-dépendant. L'avantage possible de l'hétérozygote résiderait dans sa meilleure santé engendrant un choix de ces individus comme partenaire sexuel ainsi que dans l'augmentation de la probabilité de retrouver un allèle rare chez les individus hétérozygotes. Le choix pour un partenaire dissimilaire permet d'augmenter la diversité du CMH chez les descendants et d'améliorer leur probabilité de survie face à un plus grand spectre de pathogènes, mais une trop grande diversité risque d'augmenter le risque de maladies auto-immunes (Huchard and Pechouskova 2014).

Chez l'humain et les primates non-humains, une méta-analyse a permis de montrer une préférence pour des partenaires hétérozygotes, et donc un MHC très diversifié (Winternitz et al. 2017). Plus particulièrement, chez les primates non-humains, c'est la recherche d'un partenaire dissimilaire qui semble primer (Winternitz et al. 2017). Le CMH ne serait pas utilisé de manière isolée pour

effectuer un choix de partenaire, la direction du choix basé sur le CMH serait influencée par l'environnement, la structure sociale ou le système d'appariement (Jordan and Bruford 1998; Huchard and Pechouskova 2014). Par exemple, la recherche d'un partenaire dissimilaire pourrait être favorisée dans des populations avec un fort taux de consanguinité, tandis que sous une forte pression de pathogènes c'est un allèle particulier qui sera recherché.

Mécanismes de signalement lié au CMH

L'influence du CMH sur le choix de partenaire ne peut se faire que s'il existe des mécanismes de signalement et perception du génotype. La mise en évidence d'une signature odorante a été possible chez plusieurs espèces de rongeurs ainsi que chez le mandrill (*Mandrillus sphinx*) (Huchard and Pechouskova 2014). La sélection pour un génotype CMH particulier peut également se faire de manière post-copulatoire (Ziegler et al. 2005). En effet, lors de la remontée des spermatozoïdes dans l'utérus, la femelle peut avoir des sécrétions visant à favoriser certains génotypes CMH, alors lisibles sur les membranes des spermatozoïdes. Le génotype exprimé par le CMH pourrait également être sélectif durant la période post-fécondation et conduire à des interruptions de grossesse. Ce processus de sélection post-copulatoire est souvent supposé lorsque la fertilité d'un couple est réduite comparativement à un couple possédant des caractéristiques CMH différentes. Par exemple, le partage d'un allèle du CMH de classe I chez des couples de macaques à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) a impliqué une mortalité fœtale plus importante que lorsque ces mêmes individus se reproduisent avec des partenaires ne partageant pas cet allèle (Knapp et al. 1996). Cependant, chez le macaque rhésus, la sélection pour un partenaire plus hétérozygote ne semble pas se faire par des voix post-copulatoires (Sterck et al. 2017). Cette étude émet tout de même l'hypothèse d'une incompatibilité entre certains haplotypes maternels et fœtaux.

Défis méthodologiques

Bien que le CMH semble être un candidat important pour les travaux sur le choix de partenaire, son étude pose plusieurs difficultés techniques (Babik 2010). Premièrement, son important polymorphisme empêche l'utilisation des méthodes utilisées traditionnellement pour le séquençage, comme l'utilisation d'amorces de PCR spécifiques. Pour cela, il faudrait avoir connaissance de la variabilité existante dans cette région, pour chaque espèce, mais cela n'est le cas que pour les organismes modèles tel que la souris, le macaque rhésus ou l'humain (Huchard and Pechouskova

2014). Pour résoudre ce problème, la plupart des études se concentrent sur une portion réduite du CMH, mais la création d'amorces permettant de récupérer toute la variabilité allélique reste un travail long, couteux et laborieux. La seconde difficulté technique est la présence de pseudogènes dans la région d'intérêt (Babik 2010). La détection de telles séquences est indispensable à l'étude fonctionnelle du CMH. Cependant, il est nécessaire d'avoir des échantillons sanguins ce qui n'est pas toujours possible pour des études en milieux naturels (Huchard and Pechouskova 2014). La dernière difficulté technique provient de la fréquente duplication des locus CMH, avec une variabilité inter spécifique mais également intra spécifique. Ainsi, pour un même individu on peut obtenir plus de deux allèles associés à un même gène. Cette spécificité rend l'utilisation du séquençage de Sanger traditionnel impossible, à moins d'utiliser des amorces spécifiques pour chaque locus.

La variabilité adaptative des modalités de choix de partenaire a été démontrée dans des cas de variations environnementales ou sociales (Lynch et al. 2005; Heuschele et al. 2009). En effet, l'expression des traits sexuels secondaires, entre autre, peut être dépendant des conditions environnementales (Qvarnström 2001). Les bénéfices associés à la sélection de partenaire seront également condition-dépendantes, conditionnant la valeur adaptative et la génétique des populations. L'impact des fluctuations démographiques sur le choix de partenaire a rarement été étudié et leurs conséquences peuvent devenir cruciales dans le cas de petites populations menacées

III Perturbation démographique

a) Définitions

Une perturbation est un événement discret dans le temps qui va changer la structure de l'écosystème, des communautés ou populations, ainsi que la disponibilité en ressources (Meurant 2012). L'impact d'une perturbation va dépendre du degré de dépendance de l'espèce à son habitat, de son intensité et de son échelle spatiale et temporelle (Kavanagh and Stanton 2005; Sinclair and Byrom 2006; Dumbrell et al. 2008). Une perturbation va agir à tous les niveaux hiérarchiques, de l'individu jusqu'au paysage. Suite à une perturbation, il est possible d'observer une modification de traits morphologiques et comportementaux avec des conséquences possibles au niveau génétique (Pickett et al. 1989; Steinfartz et al. 2007; Smith et al. 2008). Il existe une grande variété de perturbation, elles peuvent être abiotiques comme une sécheresse, une inondation ou un incendie, mais également biotiques comme une infection ou l'introduction d'une espèce invasive, et les

perturbations peuvent également être liées à l'homme comme la déforestation, la chasse ou la pollution (Meurant 2012). Une perturbation peut impacter également tous les individus d'une population, c'est le cas par exemple pour une sécheresse ou la fragmentation de l'habitat, ou elle peut provoquer la perte d'un type d'individus bien ciblé comme c'est le cas pour la chasse et le braconnage. Certaines perturbations peuvent entrainer la perte d'un grand nombre d'individus sur une faible durée, on parle alors de « die-off » (Ameca y Juárez et al. 2012). Lorsque la perte est supérieure à 90% des individus d'une population, on parle d'évènement de mortalité de masse (Fey et al. 2015). Ce type d'évènement provoque un goulot d'étranglement démographique avec une modification de la dynamique et de la structuration génétique de la population. Le déclin global d'une population suite à un EMM est le plus souvent causé par une maladie (26.3%) ; pour exemple on peut citer les Chytridiomycoses et Ranavirus chez les amphibiens (Daszak et al. 1999; Green et al. 2002), divers agents infectieux chez les lions de mer californiens (*Zalophus californianus ;* Acevedo-Whitehouse et al. 2003), le syndrome du nez blanc chez les chauves-souris (Blehert et al. 2009), les tumeurs faciales chez le diable de Tasmanie (Lachish et al. 2011) ou le virus Ebola chez les gorilles (Bermejo 2004). Les perturbations liées au climat comme un incendie catastrophique (*Loxodonta africana* ; Woolley et al. 2008), une tempête particulièrement violente (*Equus caballus*; Scorolli et al. 2006) sont principalement associés à des espèces terrestre et représentent 24.7% des EEM. Les EMM sont aussi fréquemment lié à l'Homme (19.3%) ou à des biotoxicité (15.6%) comme l'intoxication aux algues bleues-vertes pour les chauves-souris (Pybus and Hobson 1986) ou la mortalité des moutons associée à une cyanobactérie (Negri et al. 1995).

b) Perturbation et socialité

La structure sociale d'une population va avoir un rôle important dans la propagation d'une maladie épidémique (Ameca y Juárez et al. 2012) puis sur la réponse que la population adoptera face à une perturbation. Le regroupement en groupes sociaux de grande taille peut faciliter. Ainsi, lors d'une épidémie à virus Ebola tuant 90% de la population, les gorilles de plaines de l'ouest (*Gorilla gorilla gorillaII)* ont montré une modification de la structure de la population restante (Genton et al. 2015) avec une augmentation du nombre de mâles immatures devenant solitaires et une disparition plus importante des groupes reproducteurs. Cette modification de la structure sociale suite à une perturbation a été retrouvée chez le macaque à longue queue (*Macaca fascisularis*) pour lesquelles la structure matrilinéaire de la population a été modifiée suite à la disparition d'un grand nombre de

femelles adultes (Brotcorne et al. 2015). Aussi, parmi les survivants, il y a eu une augmentation de la tension sociale suite à une réduction du temps consacré aux activités affiliatives. Une perturbation peut induire une réponse collective afin de mieux survivre. Chez plusieurs espèces d'ongulés africains, la chasse et la poursuite par des hommes peut conduire à la formation de groupes plus grands afin d'augmenter la capacité de vigilance (Averbeck et al. 2012). A l'inverse, la dégradation des ressources ou le pastoralisme, favorisent la formation de groupes de plus petite taille.

Une perturbation va avoir un impact immédiat sur les populations affectées, par la perte d'un grand nombre d'individus, mais également sur le long terme, avec des survivants qui doivent réagir face à la disparition de leurs partenaires sociaux, et dont le comportement et les interactions sociales sont limitées par les autres survivants disponible. En effet, les individus vivant au sein d'un même groupe social sont impliqués dans des interactions sociales de diverses natures : neutres, coopération, agression. Les survivants d'une perturbation voient alors la disparition d'une partie des individus avec lesquels ils ont l'habitude d'interagir. Chez l'éléphant, les individus plus âgés servent de modèles aux individus plus jeunes (Shannon et al. 2013). Sans interactions avec des plus âgés, suite à leur disparition, l'apprentissage des jeunes est incomplet et ne leur permet pas toujours de savoir répondre de manière adéquate dans le cas de menaces, par un autre individu par exemple. Plus généralement, c'est leur capacité de prise de décision qui est modifiée sur le long terme (Shannon et al. 2013).

IV Présentation de l'étude

a) Contexte

Le choix de partenaire est une thématique largement étudiée en écologie comportementale (Jennions and Petrie 1997; Galef and White 2000; Candolin 2003; Clutton-Brock and McAuliffe 2009; Jones and Ratterman 2009). Cependant, le travail sur des espèces non modèles, longévives et en milieu naturel complique l'étude des processus de sélection. Chez le gorille de plaine de l'ouest, les femelles sont regroupées en harem autour d'un unique mâle reproducteur (Taylor and Goldsmith 2002). L'accès à la reproduction est alors conditionné par une dispersion des deux sexes, une fois la maturité sexuelle atteinte. Chez une espèce menacée comme le gorille de plaine de l'ouest, l'étude de la reproduction est un élément important de sa conservation. Mieux comprendre le fonctionnement des populations permet de mieux appréhender les menaces qui peuvent peser sur leur survie. Une

première partie de cette thèse s'est intéressée à la dispersion secondaire des femelles adultes, qui trouve son origine dans la recherche d'un meilleur partenaire reproducteur. Observer les comportements de dispersion permet d'avoir des indices sur la sélection d'un partenaire reproducteur par les femelles ainsi que sur les critères de choix utilisés. Dans un deuxième temps, c'est l'importance du complexe majeur d'histocompatibilité dans le choix de partenaire chez cette espèce qui est étudié. Bien que l'influence du CMH dans les stratégies d'appariement ne soit plus à démontrer (Jordan and Bruford 1998), cela n'a jamais été étudié chez le gorille. Les populations de gorille étudiées ayant subies des épidémies à virus Ebola, cela ajoute un contexte de perturbation environnementale à notre étude, avec une forte mortalité des individus vivant en groupe sociaux. La sélection de partenaire dans une population perturbée est rarement étudiée car il est rare d'avoir accès à des données récupérées avec la même méthodologie avant et après la perturbation.

b) Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer, dans un premier temps, s'il existait une stratégie de sélection de partenaire reproducteur chez les femelles de gorilles de plaines. Si un tel choix existe, la probabilité qu'il soit multifactoriel est forte. Ainsi, nous souhaitions voir l'importance relative des différents types d'indices comportementaux, démographiques ou génétiques, pouvant influencer le choix de partenaire reproducteur. Connaître les règles d'appariement des individus au sein d'une population permet de mieux comprendre sa dynamique et d'établir de meilleures prescriptions pour sa conservation. L'une des populations observées a subi une épidémie à virus Ebola, provoquant un effondrement démographique et une modification de la structure de la population à court terme. Un second volet de ce travail a pour objectif de réussir à étudier l'existence d'une relation entre le choix de partenaire et le complexe majeur d'histocompatibilité. Cette question souvent étudiée l'est encore peu fréquemment chez un organisme non modèle, en milieu naturel. Cela nécessitait la mise en place de nouvelles méthodes d'étude du CMH au niveau populationnel, en utilisant des fèces, et donc de l'ADN non invasif détérioré et délicat. L'objectif était alors de réussir à passer d'une étude au niveau individuel, à une étude au niveau populationnel, avec des contraintes budgétaires et temporelle, afin d'étudier l'importance de ce complexe dans le choix de partenaire chez le gorille. Un autre objectif de ce travail de thèse était alors d'établir si, suite à une perturbation provoquant une mortalité de masse, il était possible d'observer une modification des stratégies d'appariement. Pour ce faire nous nous sommes intéressés aux modifications des patrons de

dispersion et des appariements génétiques après l'épidémie pour commencer à comprendre les réponses adaptatives de cette espèce face à une perturbation.

L'impact de l'Homme sur son environnement est grandissant, augmentant le nombre de perturbations imposées aux écosystèmes (Shannon et al. 2013). S'intéresser à l'impact des perturbations sur les processus structurant les populations permet d'envisager des plans de conservation de manière éclairées. La conservation de la biodiversité étant un objectif majeur de notre temps, tant pour des motifs économiques tels que le tourisme ou les services écosystémiques, que pour des motifs éthiques et patrimoniaux.

c) Organisation du manuscrit

Ce manuscrit de thèse est composé de six chapitres. Le premier chapitre donne des informations sur la méthodologie commune à tous les chapitres. Le chapitre 2 est un article actuellement soumis. Les chapitres 3, 4 et 5 ont été rédigés pour une future soumission. Le chapitre 6 présente des travaux préliminaires réalisés au cours de la thèse, insuffisamment développés pour donner lieu à une publication mais ouvrant de nouvelles voies pour le sujet traité ici. Chaque chapitre est composé d'une introduction, méthodologie, discussion, numérotation des tables et figures. Les références associées à l'introduction, au chapitre 1 et à la discussion sont rassemblées en fin de manuscrit.

Chapitre 1

Chapitre 1 : Méthodologie générale

I Modèle d'étude, le gorille des plaines de l'ouest

a) Taxonomie

Le premier spécimen de gorille a été décrit en 1847 par Savage et Wyman, sur la base d'individus observés au Gabon, et attribué au genre *Troglodytes* avec les chimpanzés. C'est en 1852 qu'il est classé par St Hilaire dans un genre à part, le genre *Gorilla*. Par la suite, le fort dimorphisme sexuel chez ce genre, ainsi que le polymorphisme des mâles adultes, a conduit à une augmentation du nombre d'espèces décrites. Au début du 20ème siècle, trois espèces encore d'actualité étaient décrites. Il s'agit du gorille de montagne *Gorilla beringei beringei* (Matschie 1903), du gorille de la Cross River *Gorilla diehli* (Matschie 1904), et du gorille de l'Est *Gorilla beringei graueri* (Matschie 1914). La classification actuelle du genre *Gorilla* a été établie en 2001 (Groves) avec les apports des études morphologiques et génétiques (Ruvolo et al. 1994; Garner and Ryder 1996; Stumpf et al. 1998). L'histoire de la taxonomie du gorille a été décrite par Groves (2002). Actuellement, les gorilles sont répartis en deux espèces et quatre sous-espèces. La première espèce regroupe les gorilles de l'Ouest *Gorilla gorilla* avec les gorilles de plaine de l'Ouest (*G. g. gorilla*) et les gorilles de la Cross River (*G. g. diehli*). La deuxième espèce est celle des gorilles de l'Est *Gorilla beringei* avec les gorilles de plaine de l'Est ou gorilles de Grauer (*G. b. graueri*) et les gorilles de montagne (*G. b. beringei*).

b) Répartition géographique et effectifs actuels

Les quatre sous-espèces de gorille sont classées en danger critique d'extinction par la liste rouge de l'IUCN (IUCN 2016a, b). Il ne reste plus que deux populations de gorilles de montagne à la frontière entre la république démocratique du Congo (RDC), l'Uganda et le Rwanda. Séparées de 25km mais sans échange d'individus possible, l'effectif est estimé à moins de 5000 individus restants (Fig 1; Gray et al. 2013; Roy et al. 2014). Cependant, c'est la seule espèce de grands singes dont les populations semblent en croissance (Gray et al. 2013). Quant au gorille de Grauer, c'est une espèce endémique d'une forêt à l'est de la RDC (Fig 1). Une campagne de comptage entre 2010 et 2015 a estimé à 3800 individus restant dans cette population désormais extrêmement fragmentée (Plumptre et al. 2015). Concernant les gorilles de l'ouest, ils sont présents en Angola, au Cameron, en

République du centre Afrique, en Guinée Equatoriale, au Gabon, au Nigeria, en RDC et République du Congo (Fig 1). Les deux sous-espèces sont séparées par la rivière Sanaga (Anthony et al. 2007; Fünfstück et al. 2014; Fünfstück and Vigilant 2015). Une surveillance accrue entre 1990 et 2005 a permis d'établir à 250-300 individus la sous espèce Cross river (Bergl 2006). Cette sous-espèce a été repérée dans 11 localités, avec des reproductions inter-localités récentes impliquant des échanges d'individus (Bergl and Vigilant 2007), mais les couloirs permettant la communication entre les populations ne semblent plus exister aujourd'hui, ajoutant une menace à la survie de cette sous-espèce (Imong et al. 2014). Les populations de gorilles de plaines de l'ouest sont présentes dans de nombreuses aires protégées et environ 22% des populations s'y trouvent. Ceci a permis de maintenir un total de 150000-200000 individus au milieu des années 2000 (Williamson et al. 2013; Sop et al. 2015). Cependant, avec un déclin de 18.75% entre 2005 et 2013 leur population actuelle est estimée à quelques centaines de milliers d'individus.

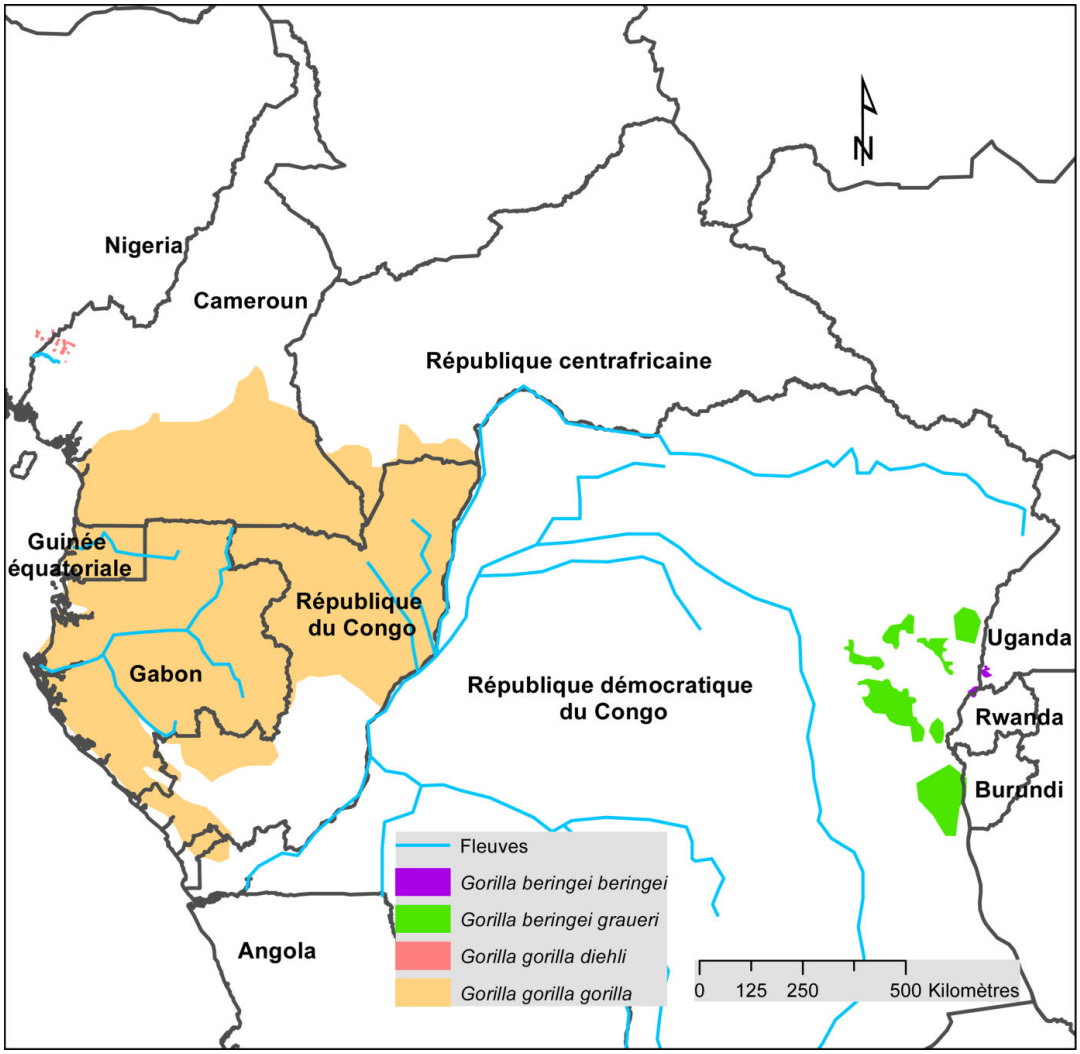


Figure 1 Répartition des quatre sous-espèces de gorille

c) Habitat et régime alimentaire des gorilles des plaines de l'ouest

Les gorilles sont sélectifs dans leur alimentation, malgré leur taille et leur capacité à digérer des aliments de faible qualité nutritive (Strait 1997). Ils vont principalement consommer les parties des plantes les moins fibreuses, avec le plus de protéines mais également le plus de sucre et le moins de tanin (Rogers et al. 1990; Remis et al. 2001; Rogers et al. 2004). Ce sont des folivores avec un fort taux de frugivorie saisonnière. Leur régime alimentaire évolue en fonction de la disponibilité en fruits au cours de l'année (Remis 1997). Leur régime alimentaire est composé de plus de 200 aliments, dont 129 espèces de plantes différentes incluant 89 fruits (Williamson et al. 1990; Remis et al. 2001). Lorsque les fruits se raréfient, la consommation de feuilles ou d'écorces sera plus importante (Tutin and Fernandez 1993; Remis et al. 2001). Parmi les espèces de gorilles, les gorilles des plaines de l'Ouest sont ceux qui consomment le plus de fruits, même en dehors des périodes de fructification (Rogers et al. 1990; Popovich et al. 1997; Rogers et al. 2004). La modification de leur régime alimentaire au cours des saisons induit également une modification de leur temps d'activité, avec une

augmentation des distances parcourues durant la saison de fructification (Masi et al. 2009). Cependant, cette modification d'activité ne semble pas être due à une variation de l'énergie disponible grâce à l'ingestion de fruits, car la consommation de feuilles leur apporte tout autant d'énergie malgré leur taille corporelle importante (Masi et al. 2015). Cette préférence pour les fruits peut être expliquée par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, les fruits sont présents à des périodes où la qualité des jeunes feuilles est moindre. Les fruits pourraient être préférés pour des raisons « gustatives » avec un attrait pour le sucre. La digestion plus facile des fruits par rapport aux feuilles permettrait de réduire le temps passé à la recherche de nourriture et d'augmenter le temps disponible pour les interactions sociales, ou la recherche de nutriments plus difficiles à trouver. La frugivorie prononcée chez le gorille de l'Ouest apporte une plus grande variété dans son alimentation et donc une amélioration générale de sa santé. Enfin, diversifier le régime alimentaire permet une plus grande faculté de résilience face à une perturbation (Masi et al. 2015).

En raison de leur régime alimentaire, les gorilles de plaines de l'Ouest sont principalement forestiers avec une plus forte densité en forêts secondaires (var 7.3-10.9 individus/km², Carroll 1988; Tutin and Fernandez 1993). En forêts primaires, la densité en individus est en moyenne plus faible (var. 0,86–1,6 ind./km² Fay et al. 1989; Bermejo 1995). Cependant, les plantes et fruits qui constituent leur régime alimentaire de base en forêt sont pauvres en minéraux (Remis et al. 2001; Magliocca and Gautier-Hion 2002). Certaines forêts de leur aire de distribution, localisées par exemple au Gabon, ou en république du Congo, incluent des clairières hydromorphes recouvertes d'une strate herbacée où les gorilles apprécient consommer les plantes aquatiques (Magliocca and Gautier-Hion 2002). Une étude sur les plantes consommées dans ces zones particulières a permis de mettre en évidence que seules quatre des 45 plantes présentes sont mangées par les gorilles, celles-ci ayant la particularité de présenter une forte concentration en minéraux. La recherche de minéraux, indispensables à leur régime alimentaire, semble être un attrait important des clairières naturelles pour de nombreuses espèces animales, dont le gorille (Magliocca and Gautier-Hion 2002; Metsio Sienne et al. 2014).

d) Organisation sociale

Les populations de gorilles sont composées de trois types d'unités sociales (Fig 2). Les groupes reproducteurs (GR) sont composés d'un seul mâle adulte reproducteur, le « dos argenté ». Chez les gorilles des plaines de l'Ouest, contrairement au gorille des montagnes, aucun groupe reproducteur multimâle n'a été observé. Le mâle reproducteur est entouré de femelles adultes ainsi

que de leurs descendants immatures. Le dos argenté est le père supposé de tous les jeunes du groupe reproducteur. Les groupes non-reproducteurs (GNR) sont constitués quasi-exclusivement de mâles immatures, avec la présence possible d'un dos argenté et parfois des femelles immatures. Les individus solitaires (S) sont principalement des dos argentés, des dos noirs (mâles adolescents) et exceptionnellement des femelles (Magliocca et al. 1999; Gatti et al. 2004). Environ 42% des mâles adultes sont solitaires (Gatti et al. 2004). Les groupes sont généralement composés d'environ dix individus (Parnell 2002; Yamagiwa et al. 2003), mais des groupes de plus de 20 individus ont également été observés (Magliocca et al. 1999; Bermejo 2004).

Arrivé à maturité sexuelle (8 ans pour les femelles, 14 ans pour les mâles, Breuer et al. 2009), les deux sexes doivent disperser de leur groupe natal afin de trouver un partenaire sexuel. Les femelles peuvent rejoindre un GR déjà existant, ou alors un dos argenté solitaire afin de former un nouveau GR. Les mâles doivent quant à eux acquérir une ou plusieurs femelles adultes en dehors de leur groupe natal (Parnell 2002; Stokes et al. 2003; Yamagiwa et al. 2003; Gatti 2005; Caillaud et al. 2008). Chez les gorilles des plaines de l'Ouest, la prise de contrôle d'un GR par un autre dos argenté n'a pas été observée (Yamagiwa et al. 2003; Robbins et al. 2004). Les mâles adultes forment leur premier groupe reproducteur vers 18 ans (Breuer et al. 2009), et la durée de tenure peut aller jusqu'à 12 ans (5.9 ans en moyenne, N = 24; Breuer et al. 2010). Chez les femelles, il n'est pas rare d'observer une dispersion secondaire, c'est-à-dire un changement de GR. La gestation dure entre 250-270 jours, avec un seul petit par gestation. Les gorillons sont sevrés au bout de 3 à 4 ans (Breuer et al. 2009). L'allaitement induit une interruption de la disponibilité reproductive des femelles (Stewart 1988).

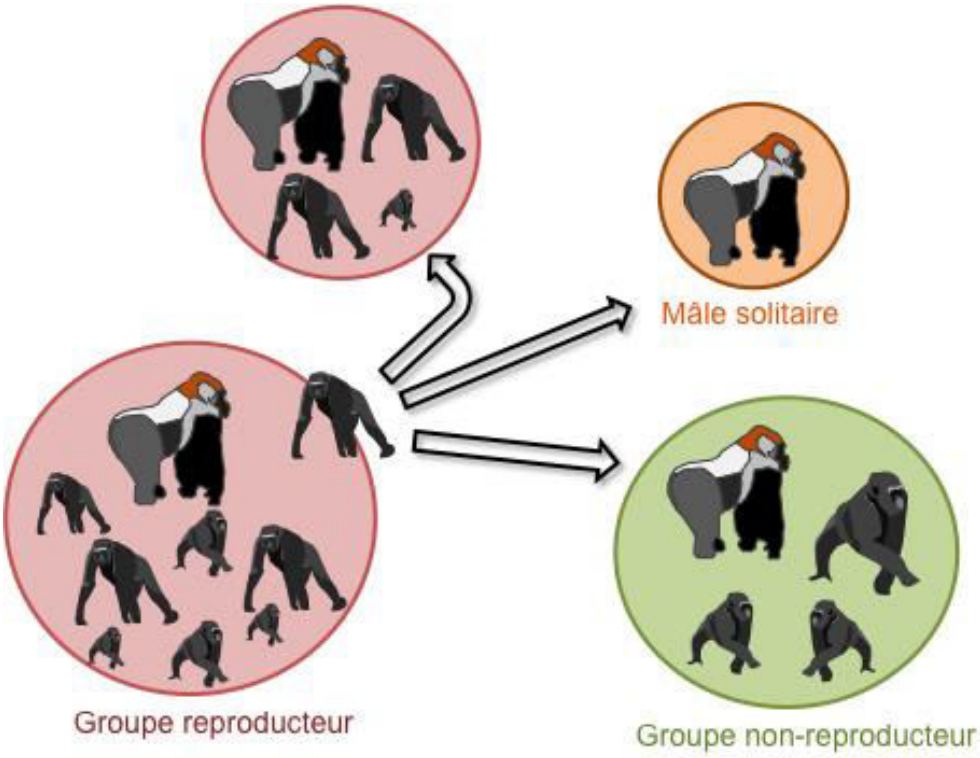


Figure 2 Organisation sociale et dispersion des femelles chez le gorille des plaines de l'ouest

Les individus adultes d'un même groupe montrent des interactions sociales inter-sexuelles plus fortes qu'intra-sexuelles (Stokes 2004). Entre femelles, il ne semble pas exister de relations de dominance ou de coopération. L'infanticide par les mâles adultes chez cette espèce est rare (Robbins and Robbins 2015).

II Sites d'études

a) Le Parc National d'Odzala-Kokoua (PNOK)

Le Parc National d'Odzala-Kokoua est un des plus anciens d'Afrique puisque créé en 1935 par le gouvernement d'Afrique Equatoriale Française. Depuis 1992, il est géré par le programme ECOFAC (conservation et utilisation rationnelle des ECOsystemes Forestiers d'Afrique Centrale) sous la tutelle de l'Union Européenne et du Ministère Congolais de l'Economie Forestières, à partir de 2011 la gestion est confiée à African Parks Networks. Le prolongement jusqu'à la rivière Kokoua en 2001 a porté sa superficie à 13 200 km² (Fig 2) et en fait la plus grande aire protégée du Congo (Aveling and Froment 2001).

Dans cette région, le climat est de type équatorial avec deux saisons de pluies, forte en Octobre, et plus faible de Mars à Mai, et également deux saisons sèches, de juin à août et de décembre à Février. Le PNOK étant situé au niveau d'une transition climatique entre un régime austral net et un régime boréal, les précipitations sont sujettes à des variations locales.

Le PNOK est constitué d'une mosaïque d'habitats forestiers et de savanes qui n'ont pas subi de modifications anthropiques. De nombreuses clairières hydromorphes font également partie de la mosaïque d'habitats du parc (Vanleeuwe et al. 1998). Les termes de « bais » ou « saline » sont indifféremment utilisés pour désigner les clairières dont le sol est supposé plus riche en sel que celui des forets environnantes. Ceci en fait une zone riche en biodiversité avec 114 espèces de mammifères dont 16 primates, 442 espèces d'oiseaux et 1 150 espèces végétales (Maisels 1996).

Figure 3 Localisations du Parc National d'Odzala-Kokoua avec les emplacements des clairières de Lokoué et Romani et de la réserve de Lossi dont les populations ont fait l'objet de cette étude.

C'est au sein du PNOK que l'on retrouve les deux sites d'intérêt de notre étude, les salines de Lokoué et Romani (Fig 3). Ces salines hébergent deux populations distinctes de gorilles de plaines de l'Ouest, une population étant définie ici comme l'ensemble des individus fréquentant la même clairière au cours d'une période donnée. Aucun échange d'individus entre les deux populations d'études n'a été observé jusqu'à présent car séparées de 20km et par la rivière Mambili.

b) La saline de Lokoué

La saline a une surface de 4ha, et les gorilles sont au maximum à 200 mètres au moment de l'observation (Fig 4). Elle fait partie d'un complexe de 12 salines dans un rayon de 4km.

En plus des gorilles, la saline de Lokoué est régulièrement visitée par des buffles de forêt (*Syncerus caffer nanus*,) des hylochères (*Hylochoerus meinertzhageni*), des éléphants de forêt (*Loxodonta cyclotis*), plus rarement des bongos (*Tragelaphus eurycer*us), des sitatungas (*Tragelaphus spekii*) et des colobes guéréza (*Colobus guereza*). La population de gorilles de Lokoué est étudiée depuis 2001, suite à la forte fréquentation observée par Ménard and Querouil (2000). Cette population a souffert en 2003-2004 d'une épidémie à virus Ebola provoquant la mort de 95% des individus identifiés alors (Caillaud et al. 2006; Devos et al. 2008).

c) La saline de Romani

Cette saline a une surface de 2,4ha, mais sa forme fait que les gorilles peuvent être éloignés de 300 mètres lors des observations (Fig 4).

La population de gorille fréquentant cette saline est suivie depuis 2005, et ne semble pas avoir été touchée par le virus ebola (Genton et al. 2015).

Figure 4 Photos des salines de Lokoué, en haut, et de Romani, en bas.

III Méthode d'observation

Les observations directes ont été faites depuis des miradors situés à environ 5m du sol. La présence d'observateurs ne semble pas avoir perturbé les gorilles, avec une distance d'observation variant de 5 à 200m. Les observations ont été possibles grâce à une longue-vue KOWA TSN2 (x20 à x60), une caméra Sony Handycam Digital 8 DCR-TRV 620E ou un appareil photo réflex Canon EOS 40D avec un téléobjectif Canon Lens (600mm ; f/4L) et un doubleur de focale Canon Extender (x2). Ainsi, en plus des commentaires écrits des observateurs, nous disposons désormais d'une base de données photographique permettant un rétrocontrôle de l'identification des groupes et individus.

A chaque visite d'un gorille, les observateurs déterminaient son identité en se basant sur une combinaison de caractéristiques physiques telles que la morphologie générale, la présence de cicatrices ou de handicap, la couleur du pelage, mais également la forme de la tête, des narines ou de l'arcade sourcilière, la présence et la taille de la crête sagittale, la présence de fossettes ou de plis de peau sous les yeux. Lorsque cela était possible, les observateurs estimaient le sexe et l'âge des individus, ainsi que leur appartenance à un groupe social. Le sexage des individus jeunes est délicat car les caractères sexuels secondaires ne sont pas encore présents et les parties génitales discrètes. L'âge des individus a été déterminé en suivant la classification de Breuer (2009 ; Tab 1) qui a été établie sur la base de caractéristiques physiques et comportementales.

Plusieurs observateurs se sont succédés au cours des périodes d'études, mais un observateur plus expérimenté valide les informations récoltées grâce aux nombreuses photographies faites lors d'une observation. La connaissance de l'histoire de vie des groupes sur le long terme permet également des ajustements quant à l'identification des individus et unités.

Tableau 2 Caractéristiques des classes d'âge chez le gorille des plaines de l'ouest d'après Breuer (2009)

Classe	Age (années)	Caractéristiques
Enfant	≤ 4	Allaité et porté en permanence ventralement pendant les premiers mois puis dorsalement lors des déplacements
Juvénile	4 < X ≤ 7,5	Sevré ; petite taille et traits arrondis ; plus indépendant qu'au stade enfant mais peut être porté lors de situations stressantes
Sub-adulte femelle	7,5 < X ≤ 10	Corps allongé et membres fins ; développement des tétons chez la femelle
Sub-adulte mâle	7,5 < X ≤ 11	Développement de la musculature des épaules et du cou chez le mâle
Femelle adulte	≤ 10	Présence d'une poitrine développée ; présence ou non d'un enfant
Mâle à dos noir	11 < X ≤ 14	Taille similaire ou supérieure à une femelle adulte ; musculature développée ; le dos peut prendre une coloration rousse
Mâle adulte ou mâle à dos argenté	≥ 14	Les poils du dos sont gris et cette coloration peut s'étendre sur les épaules et sur les cuisses ; la crête sagittale est développée

Chapitre 2

Résumé du chapitre 2

La dispersion sociale, soit le mouvement entre deux unités sociales différentes, est un élément important de la valeur adaptative d'un individu. Chez les mammifères sociaux dont les unités sociales reproductrices sont composées d'un seul mâle reproducteur avec plusieurs femelles, les descendants des deux sexes doivent changer d'unité sociale afin d'accéder à la reproduction. La dispersion sociale des femelles comprend la décision de quitter son unité sociale actuelle et le choix de l'unité à laquelle s'intégrer. Ceci implique une évaluation du rapport cout-bénéfice du processus de migration qui va intégrer plusieurs éléments comme par exemple l'âge, l'expérience ou les conditions physiques et physiologique mais également des caractéristiques des unités quittées et rejointes telles que leur taille, la sex-ratio ou la présence d'immatures. Des éléments liés à la qualité des mâles reproducteurs sont également importants dans la prise de décision, comme sa capacité de protection, son âge ou sa santé.

Cette étude vise à déterminer les facteurs influençant les décisions d'émigration et d'immigration des femelles adultes chez le gorille des plaines de l'ouest (*Gorilla gorilla gorilla*).

Pour répondre à notre objectif nous disposons d'observations permettant de reconnaitre individuellement chaque gorille de deux populations visitant deux clairières salifères distinctes incluses dans la forêt tropicale au sein du parc national d'Odzala-Kokoua en République du Congo. La population de Lokoué a été suivie sur 15 ans mais a subi un effondrement démographique du à une épidémie à virus Ebola. L'étude présentée ici se concentre sur la période non perturbée, donc avant cet effondrement. La population de Romani a été suivie sur 10 ans et aucun des indices d'une perturbation démographique majeure n'a été détecté pendant cette période. Lors des observations, les individus sont assignés à un sexe et une classe d'âge et à une unité sociale. Grâce aux nombreuses photographies et descriptions des caractéristiques physiques, chaque individu est identifié et la composition précise de l'unité est établie. Il existe trois types d'unités : les individus solitaires (mâles adultes à « dos argentés » et mâles adolescents « à dos noir » le plus souvent), les unités reproductrices (groupes reproducteurs) et les unités non reproductrices composées majoritairement de mâles immatures. Compte tenu des patrons de formation et de changements temporels des groupes reproducteurs, il est possible de leur attribuer un âge : groupe reproducteur naissant, enfant, juvénile, mature, sénescent. Un groupe naissant, récemment formé, comprend un

mâle à dos argenté avec une ou deux femelles sans descendance tandis qu'en fin de maturation, un groupe sénescent comprend des descendants immatures de tous âges et les femelles commencent à quitter le groupe. En fin de tenure de groupe, le mâle reprend une vie solitaire. Grâce au suivi à long terme, pour chaque année d'observation, les femelles se voient attribuer le statut de résidente, émigrante ou immigrante.

Nous faisons les hypothèses suivantes

(1) Les caractéristiques de la femelle migrante auront une influence sur ses décisions avec une différence entre a) femelles nullipares et multipares, b) femelles avec ou sans enfant non sevré, c) femelles affectées par une maladie de peau contagieuse, en fonction des différents stades symptomatiques.

(2) Les caractéristiques des mâles reproducteurs auront un impact sur les décisions de migration des femelles telles que a) les femelles quitteront plus probablement un mâle atteint par une maladie de peau, b) les femelles rechercheront des groupes reproducteurs avec un nombre plus élevé de femelles adultes et d'immatures, comme un indicateur de la valeur reproductive et protectrice du mâle, c) les femelles quitteront plutôt les groupes reproducteurs sénescents menés par des mâles âgés et moins protecteurs.

(3) Les caractéristiques des unités sociales impacteront les décisions de migrations faites par les femelles telles que a) les femelles éviteront les groupes reproducteurs avec un trop grand nombre de femelles adultes, pour réduire la pression de compétition, b) les femelles éviteront les unités avec une trop grande proportion d'individus atteint par une maladie de peau contagieuse.

L'utilisation de modèles linéaires mixtes généralisés a permis l'intégration de nombreux facteurs, liés à la femelle migrante, au mâle reproducteur ou à l'unité sociale. Les modèles liés à l'émigration sont femelle-centrés (les femelles ont un statut soit de résidentes soit d'émigrantes), tandis que les modèles concernant l'immigration sont groupe-centrés. Une procédure de sélection de modèles multi-étapes a été suivie. Le choix de l'unité d'immigration a aussi été testé en utilisant un indice de Manly mesurant l'utilisation effective des ressources en fonction des disponibilités.

Nos résultats ont mis en évidence la pluralité factorielle de la prise de décision de la dispersion sociale chez les femelles adultes de gorilles des plaines de l'ouest.

(1) Toutes les caractéristiques propres à la femelle migrante ne sont pas impliquées dans le processus de décision ; a) la parité des femelles n'intervient pas dans le choix d'émigration ou d'immigration, b) le degré de gravité de la maladie de peau ne réduit pas ses probabilités d'émigrer, c) mais la présence d'un enfant non sevré inhibe les possibilités de dispersion des femelles.

(2) Certaines caractéristiques des mâles reproducteurs ont une influence sur les probabilités d'émigrer et d'immigrer des femmes ; a) les femelles préfèrent rejoindre un groupe reproducteur déjà formé qu'un individu solitaire, b) le statut infectieux du mâle n'intervient pas dans le choix des femelles, c) au sein des groupes reproducteurs, la présence de femelles adultes n'est pas utilisé comme indicateur de la qualité du mâle par les autres femelles migrantes, d) les femelles quittent les groupes reproducteurs sénescents pour rejoindre des groupes naissants ou enfants.

(3) Les caractéristiques des unités sociales sont importantes dans le choix des femelles ; a) les femelles quittent les groupes qui ont une trop forte proportion d'individus infectés par la maladie de peau et évitent de rejoindre de tels groupes, b) les groupes comprenant environ 10-15 ont une probabilité d'émigration plus forte et sont évités par les immigrantes.

Les femelles adultes de gorilles de plaine de l'ouest intègrent une multitude d'indices pour leurs décisions de migration sociale. Malgré des variations inter-populationnelles, cette étude souligne l'importance de l'environnement social pour le processus de dispersion.

Influence of individual, mate and unit-dependent factors on social dispersal of adult females in western lowland gorillas

Revised manuscript submitted to Behavioral Ecology and Sociobiology

Alice Baudouin[1], Sylvain Gatti[1], Florence Levréro[2], Céline Genton[1], Romane Cristescu[3], Vincent Billy[4], Peggy Motsch [4], Pascaline Le Gouar[1], Nelly Ménard[1]

[1] UMR 6553, ECOBIO: Ecosystems, Biodiversity, Evolution, CNRS/University of Rennes 1, Biological Station of Paimpont, Paimpont, France,

[2] Université de Saint-Etienne/Lyon, Equipe de Neuro-Ethologie Sensorielle, Neuro-PSI, CNRS UMR 9197, Saint-Etienne, France,

[3] GeneCology, Faculty of Science, Health, Education and Engineering, University of the Sunshine Coast, Sippy Downs, QLD, Australia,

[4] Odzala_Kokoua National Park, African Parks Networks, Mbomo, Republic of Congo

Corresponding author: Alice Baudouin, UMR 6553, ECOBIO: Ecosystems, Biodiversity, Evolution, CNRS/University of Rennes 1, Biological Station of Paimpont, Paimpont, France, Tel.: 33(2)99618170, alice.baudouin@univ-rennes1.fr

Acknowledgments

We are very grateful to the three anonymous reviewers for their constructive comments. We thank the team of the ECOFAC program (EU): C. Aveling, B. Djoni-Djimbi, P. Ngouembe, J-M. Froment, P. Marshall, P. Montuir, P. Mortier, P. Rickmounie, T. Smith, J. de Winter, and of African Parks Networks: D. Zeller, L. Lamprecht, E. Mararv, G. Le Flohic for logistical assistance and permission to work in Odzala-Kokoua National Park. We are grateful to J-B. Lepale, S. Yaba Ngouma, D-J Ndebo, A. Lavandier, M. Douadi, D. Caillaud, C. Devos, M. Dewas, L. Bouquier, S. Navel, Q. Gautier, G. Le Flohic, D.-M. Paquet, P. Besnard, M. Boros for their assistance with data collection on site. This is a scientific production of UMR CNRS 6553, Caren-OSUR, University of Rennes1, funded by the ECOsystèmes FORestiers program (http://www.gip-ecofor. org/; Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, France), the Espèces-Phares program (DG Environnement, UE), and the

French agency for research via the ANR-11-JVS7-015 IDi-Pop project. We thank Albin Fertil and Annie Buchwalter for editing English language.

Abstract

Social dispersal is an important feature of species dynamics. When females are structured in polygynous group, their dispersal patterns condition the reproductive success of populations. Dispersal decisions are highly conditioned by mate choice strategies and social environment. We investigated the influence of female-, male- and unit-related factors on emigration and immigration probabilities of female western lowland gorillas. We used long-term monitoring data from two populations of *Gorilla gorilla gorilla* within the same forest area in the Republic of Congo. Females with unweaned offspring did not disperse, probably to avoid infanticide risk. Dispersers left older units to join younger ones led by younger fully mature silverbacks with a probable better reproductive value. According to emigration probabilities, we detected a breeding unit size around 10-15 individuals that seemed unfavorable for females to benefit from males' protective and reproductive abilities whereas smaller and larger units were preferred. Surprisingly, outer signs of skin disease infection of the female or of her potential sexual partner did not influence her decision to leave or join a group. However, the presence of an infectious disease in females' social environment seemed to influence their dispersal pattern. The emigration rate was higher in social units with a higher proportion of severely diseased individuals, and females from units with more than half of diseased individuals showed avoidance patterns. We emphasize the importance of studying both emigration and immigration phases, as well as all types of cues that females can rely on for their dispersal decision process.

Significant statement

Females' decision to disperse in polygynous social species can be an important component of the reproductive success of social units. In gorillas, adult females disperse to join either an existing breeding group or a solitary silverback to form a new breeding group. We found that females' decision to emigrate and immigrate was influenced by their reproductive status, silverback quality, and social unit-related factors. Females with an unweaned infant avoided emigrating because of infanticide risk. Females preferred younger breeding groups to senescent ones led by old silverbacks of possibly lesser reproductive and protective value. In addition, the optimal size of breeding groups appeared to be 10-15 individuals.

Finally, females were more prone to emigrate when a high proportion of individuals of their group suffered from skin disease infection. Therefore females' decision to disperse results from a combination of multiple pieces of information.

I Introduction

In social species, social dispersal is defined as a movement from one social unit to another, involving a change of social and sexual partners (Isbell and Van Vuren 1996; Clutton-Brock and Lukas 2012). Social dispersal, similarly to locational dispersal, plays a major role in individual fitness as well as in the genetics and dynamics of the overall population (Greenwood 1980; Clobert et al. 2001; Bowler and Benton 2005; Brom et al. 2016) . In social mammal species, male-biased dispersal is the most common pattern (Greenwood 1980) and most of female dispersal occurs through matrilineal group fission (Lefebvre et al. 2003; Clutton-Brock and Lukas 2012). In some species where social units are composed of several breeding females defended by one male, however, both males and females leave their native unit to join another social unit (e.g. most social equids, several tropical bats, several primate species such as some *ateles* and *colobus* species, and gorillas (Clutton-Brock and Lukas 2012). In these species, cooperative interactions between adult females are rare, and female secondary dispersal is common (Sterck et al. 1997; Lukas and Clutton-Brock 2011) Four major proximal forces are suggested to drive female social dispersal: inbreeding avoidance, reduction of predation risk, reduction of feeding competition, and choice of a higher-quality male (reproductive and survival benefits and active protection against infanticide (Sterck et al. 2005).

Female social dispersal, when voluntary, encompasses both a decision to emigrate from the current social unit and a decision to immigrate into a new unit, chosen among neighboring groups (Sterck et al. 2005). Emigrating involves a cost-benefit analysis of whether to leave a unit or remain in it (Isbell and VanVuren 1996; Debeffe et al. 2015). Choosing a target unit into which to immigrate requires gathering information on neighboring social units during interactions and selecting one most likely to improve individual fitness. Emigration and immigration decisions are critical because they determine both future survival and reproductive success. Therefore, analyzing the individual, social and environmental factors that influence both emigration and immigration decisions is crucial to understand population dynamics and genetics.

Multiple individual characteristics may influence female dispersal decisions, such as age, personality, past experience, physiological or body condition, and reproductive status. Individuals in a good condition tend to be more prone to disperse since they are better equipped to bear dispersal

costs (Dufty and Belthoff 2001). For instance, the dispersal probability of roe deer (*Capreolus capreolus*) increases with their body mass (Debeffe et al. 2012). Pregnancy, lactation or the presence of an unweaned dependent offspring can reduce the likelihood of female dispersal (Sicotte 2000; Sterck et al. 2005; Sicotte et al. 2017). Consequently, nulliparous adolescent or young adult females may have more time and more opportunities to disperse than parous older females and can do secondary transfers before their first conception (mountain gorillas, Robbins et al. 2009a); horses, Linklater and Cameron 2009).

Among the social factors that influence social dispersal, social unit size is often investigated. Large units provide better protection against predation, but can also induce higher competition and in turn promote dispersal (Clutton-Brock and Lukas 2012). In some species with one dominant male per unit, social dispersal of females increases with group size (*Equus ferus caballus*, Marjamaeki et al. 2013) and females transfer to smaller groups (*Gorilla beringei beringei,* Watts 1990)*; G. gorilla gorilla,* Stokes et al. 2003); *Colobus vellerosus,* Teichroeb et al. 2009). However, evidence of the ensuing advantages of decreased competition, through increased reproductive success for example, is still lacking (Stokes et al. 2003). In some folivorous species, females live in small groups despite a low feeding competition in large groups. This “folivore paradox” has been explained by social factors limiting group sizes, such as an increase take-over risk of large groups, potentially accompanied by infanticide (Steenbeek and van Schaik 2001). A second “folivore paradox” has been invoked when scramble competition is low in large groups and females stay in small groups despite a greater risk of infanticide (as in mountain gorillas). This second paradox could be resolved by considering the limited opportunities for females to join large multimale groups when lactating or pregnant, or other factors such as the phylogenetic inertia in favor of small one-male groups (Robbins et al. 2009b). Unit composition can be a more decisive factor than unit size. For example, mantled howler females (*Alouatta palliata*) preferentially emigrate into units with fewer females regardless of unit size, limiting the risk of take over and infanticide (Clarke and Glander 2010). Female colobus left groups being invaded by multiple males more often than units taken over by single males, which could result from prolonged stress levels of females and/or indicates a lower competitive quality of males in the first case than in the second case (Sicotte et al. 2017).

In species with long tenure of groups by one dominant male, a natural ageing cycle of the social units has been described (Thomas langur, Sterck et al. 2005); Western lowland gorillas, Parnell

2002). Different ages of social units could be used by females as a proxy of male's age, therefore of its protective and reproductive quality. For example, in Thomas langur (*Presbytis thomasi*) females prefer units with fewer immatures that could be a proxy of an early tenure phase by a young adult male that provides better protection against infanticide and predation, thereby increases chances of offspring survival (Sterck et al. 2005). By contrast, in Western lowland gorillas, the silverback (*i.e.* the dominant male) in nascent units (one male and only few adult females) is considered generally younger and less experienced and protective but has a high reproductive value, whereas the silverbacks in mature or senescent units are experienced due to their long tenure and are more protective, but they have lower breeding success (Stokes et al. 2003). If the silverback dies, females with an infant tend to immigrate into senescent units with a post-breeding silverback that can offer better protection against infanticide (Stokes et al. 2003).

Increased disease and pathogen transmission is one of the major risks of group living (Alexander 1974). The influence of such increased risk on population dynamics and the consequences of dispersal on disease spread for social species have been demonstrated (Altizer et al. 2003; de Castro and Bolker 2005; Nunn et al. 2008; McCallum et al. 2009; Kappeler et al. 2015), but the role of diseases in emigration and immigration decisions has been neglected (Debeffe et al. 2014). Avoidance of disease and parasite transmission is rarely cited as a potential hypothesis for social dispersal (Brown and Brown 1992; Boulinier et al. 2001). Yet, disease can affect body condition, breeding success and sometimes survival of individuals, and could influence their decision to disperse in several ways. First, the condition of a diseased individual may be too poor for it to bear dispersal costs (Dufty and Belthoff 2001). For example, the dispersal propensity of roe deer decreases with increasing endoparasite abundance, infected individuals being too weak to disperse (Debeffe et al. 2014). Secondly, individuals may prefer healthy mates that ensure benefits in terms of infection avoidance, better care of offspring or better resistance to disease (Tybur and Gangestad 2011). Finally, dispersing individuals may avoid disease transmission if a high contagion risk exists in their unit, possibly using, in theory, information on diseased conspecific to select the unit into which to immigrate, in particular when signs of disease are visible such as skin disease.

This study aims to determine which factors influence the decision of western lowland gorilla adult females to emigrate from and immigrate into any given unit. This polygynous species is structured in one-male units led by a dominant silverback male and composed of several non-related adult females and their offspring. Approximately 42% of silverbacks are solitary or live in non-breeding units (Gatti et al. 2004). A silverback forms his first breeding unit when he is around 18 years old (Breuer et al. 2009), and his reproductive and protective abilities are believed to decline at the end of his tenure that may last up to 12 years (5.9 years on average, N = 24; (Breuer et al. 2010). According to this tenure duration, females have to disperse from their natal unit to avoid mating with their father (Clutton-Brock 1989). They subsequently commonly experience several secondary dispersal events (Stokes et al. 2003). We focused our analyses on these secondary dispersals, excluding cases of natal dispersal.

We hypothesized secondary emigration to be driven by multiple factors related to the female itself, and the characteristics of the current and prospective silverbacks and social unit. We made several hypotheses: 1) in relation to the female's characteristics (Table 1), we postulated that a) multiparous and nulliparous females would differ in their decision to emigrate due to different previous experiences (having already reproduced or not), b) females with an unweaned dependent infant would avoid emigration to limit infanticide risk (Sterck 1997; Harcourt and Greenberg 2001; Stokes et al. 2003), and c) females being affected by disease might be unable to emigrate because of their poorer physical condition or their immigration attempts may be resisted by females in the group of destination (Watts 1991; Monard et al. 1996; Linklater and Cameron 2009; Teichroeb et al. 2009); 2) in relation to the silverback's condition (Table 1), we hypothesized that a) females would be more prone to leave a unit with a low-quality silverback in terms of health, reproductive and protective values: a) we supposed that females would be more prone to leave severely diseased silverbacks, b) females would choose, as a proxy of a silverback's reproductive success and ability to protect them from predators, breeding units with a high number of females and a high proportion of females with an infant, and c) in the case of voluntary secondary emigration (*i.e.* not induced by the death of the leading silverback) females would leave senescent units led by older and less protective silverbacks. Finally, 3) in relation to the unit's features (Table 1), we hypothesized that a) females would leave large units or units with numerous females to avoid feeding or social competition (*i.e.* for mating access or for proximity to their protector(Watts 1994) , whereas they would leave small units to limit predation risk, which should lead

to an optimal unit size with reduced emigration, b) females would leave breeding units with a high proportion of diseased individuals to limiting the risk of being contaminated.

After leaving their unit, adult females join another breeding unit or a solitary male to form a new breeding unit. Owing to the particular spatial organization of the studied populations where numerous units visit the same clearing, all units have overlapping home range with each other; therefore they likely have opportunity to meet each other. We then considered all units as available for female choice. We investigated the extent to which the female's choice of target units is influenced by the characteristics of a sexual partner (*i.e.* the silverback) and those of a social environment (*i.e.* other members of target units). We hypothesized that females would prefer high-quality silverbacks, in terms of good health, a high breeding potential (leading a nascent unit), and a high protective value (having a high proportion of females with an infant in his unit). In case of prevalence of the hypothesis of competition avoidance for food or access to male, we expected that immigrations in large units or numerous females should be limited due to the resistance of resident females toward immigrants (Watts 1991). Disease risk avoidance was expected to lead immigrating females to prefer units with a low proportion of diseased individuals.

This study emphasizes the importance of studying both emigration and immigration phases using multifactorial design, including disease information, in social species.

II Materials and Methods

a) Study sites and populations

We collected demographic data from two gorilla populations visiting different salt clearings [Lokoué, (00°54’23’’N, 15°10’33’’E) and Romani (00°41'28"N; 14°53'31"E)] in the Odzala-Kokoua National Park (Republic of Congo). These clearings are 20 km apart and separated by the wide Mambili River. We observed gorillas from platforms located at the edge of the clearings, using a Kowa spotting scope (20x60), and either a video camera (Sony Handycam Digital 8 DCR-TRV 620E) or a camera (Canon EOS 40D digital camera equipped with a 600 mm lens and a Teleplus 2X converter). We monitored the Lokoué population for 15 years (2001 – 2015). This population underwent a demographic crash suspected to have been caused by an Ebola outbreak in 2004 (Caillaud et al.

2006), therefore we only analyzed pre-epidemic data (2001-2003, see details in Table S1). We focused on stable populations, not on the impact of a large demographic decline on dispersal patterns (see details in Table S1). We monitored the Romani population for 10 years (2005-2015 with two interruptions between June 2006-May 2008 and May 2010-December 2012, see Table S1) and did not detect any demographic indicators of an Ebola outbreak (Genton et al. 2015; Genton et al. 2017). Recording data blind was not possible because our study involved focal animals in the field.

Each gorilla was identified based on a combination of body features: physical handicaps, hair color pattern, general body shape, scars, wounds, face shape, "noseprints" (Fossey 1983). Photos and films were archived and were used to compare gorilla identification between different visiting periods (Table S1). The sex and age-class of each individual were determined according to physical characteristics and behavior (Gatti et al. 2004; Breuer et al. 2009) as follows: infants (≤ 4 years old, unweaned, still suckling and carried by the mother), juveniles (4 to 7.5 years old), subadults (7.5 to 10 years old for females, 7.5 to 11 years old for males), blackbacks (11- to 14-year-old males), adult females (≥ 10 years old) and silverbacks (≥ 14-year-old males). Sexing immature individuals (infants, juveniles and subadults) is difficult due to their inconspicuous genitals and low sexual dimorphism; however, sexing was occasionally possible when they bent down to lick the soil. We differentiated nulliparous females, which have never been observed with an infant and have non-elongated nipples and undeveloped breasts, from parous females, which have elongated nipples (Breuer et al. 2009).

Western lowland gorillas can present skin lesions, such as yaws, a disease caused by a treponematosis described in human (Mitjà et al. 2013) and non-human primates (Levréro et al. 2007). This disease spreads through direct contact between individuals, and lesions can be easily detected. The consequences of yaws can be debilitating, the worst stage leading to deformities and severe handicaps (Levréro et al. 2007; Mitjà et al. 2013). We were able to define a skin disease intensity for each observed individual (0: no clinical sign; 1: weak intensity, *i.e.* visible signs of skin disease but healed; 2: severely diseased, see details in Supplementary material S3).

Gorilla social units were categorized as breeding units (including adults of both sexes), non-breeding units (without any adult female and typically composed of immature individuals), and solitary males (Gatti et al. 2004; Levréro et al. 2006). In this study, we considered only the solitary silverbacks, excluding the solitary blackbacks from analyses because we assume that they were not target of

immigrant females. We recorded the size and composition of each social unit visiting the clearings. According to Parnell (2002), we categorized breeding unit ages as “nascent” (one silverback + one or more adult females without an offspring), “infant” (one silverback + adult females with infants), “juvenile” (one silverback + several adult females and offspring up to juveniles), “mature” (one silverback + adult females and offspring up to subadults), “senescent” (one silverback, adult females and several cohorts of offspring from infants to blackbacks). Differences in the adult-to-immature ratio and in the number of adult females between the breeding unit age categories were tested using a Kruskall-Wallis test.

b) Dispersal status of adult females

At each observation of a social unit we recorded changes, if any, in the composition in adult females. We then categorized each adult female according to her dispersal status in a given year as follows: i) resident female: an adult female that has belonged to the same breeding unit so far; ii) emigrating female: an adult female that has left her breeding unit; iii) immigrating female: a new adult female in a unit. “Secondary emigrations” were defined as females (parous or nulliparous) leaving a group they previously immigrated or reproduced into. Emigrations of nulliparous females that have been observed as infant or immature in the group they left were considered as natal emigrations and excluded from analyses. We used the term “transfer event” when we knew both the original and target units of the dispersing female. Females not observed again after emigrating were considered as having emigrated out of the population or into an unknown unit. We could not differentiate them from those who died, but none of them showed evidence of a bad health condition. Females not known within the population before they immigrated were considered to have immigrated from a neighboring population.

c) Analyses of dispersal patterns

We investigated the factors that influenced the dispersal status of adult females. We examined whether mothers with an unweaned offspring dispersed or not. We analyzed the factors that influenced emigration and immigration patterns by building two datasets that differed by the kind of response variable and the associated explanatory variables. In the emigration case, we aimed to understand which factors best explained that a female emigrated from or stayed within her breeding

unit. Therefore, the response variable was female-related (*i.e.* each female was considered either an emigrant or a resident per year, with a binomial distribution that accounts for differences in the total number of adult females within the unit) and was examined for each female each year (further named "female-year" observation). The explanatory variables were the characteristics of the adult females and the characteristics of their breeding units (Table 1). Adult females' characteristics included their parity (nulliparous *vs.* parous), skin disease intensity. Their breeding unit characteristics included unit size (total number of individuals in the unit), squared unit size (to take into account a possible quadratic effect, the number of adult females, the infants-over-adult-females ratio, the breeding unit category (nascent to senescent), the overall proportion of individuals displaying skin disease, the proportion of individuals at each stage of skin disease (1 and 2), and silverbacks' skin disease status (as defined for females above). In the immigration case, we investigated which characteristics of the gorilla units (*i.e.* the explanatory variables, Table 1) best explained that a female immigrated into a target unit in comparison with all neighboring units. Therefore, the response variable was gorilla unit–related and was examined every year for each available gorilla unit (further named "unit-year" observation, binomial distribution on whether the unit was chosen by an immigrating female that year or not). Unit characteristics included unit category (related to the mating status of silverbacks, either leading a breeding unit or unmated in non-breeding unit or solitary, see Table 1), unit size, squared unit size, the number of adult females, the squared number of females, the infants-over-adult-females ratio, the breeding unit category (nascent to senescent), the overall proportion of individuals displaying skin disease in each gorilla unit, the proportion of individuals at each stage of skin disease (1 and 2), and the skin disease status of all silverbacks available in the population.

We used a generalized linear mixed model *(GLMM*, binomial family, *glmer* function, lme4 R-package, Bates et al. 2014) to analyze each of our two datasets. We applied a multistep approach for validation. In a first step we used automated model selection (Burnham and Anderson 2003) on the *GLMM* with all explanatory variables (*dredge* function, MUMin R-package, Barton 2009). To avoid pseudoreplication effects, breeding unit identity and year were considered as random effects in emigration analyses, whereas year was considered as a random effect in immigration analysis. In a second step we examined the multicollinearity between explanatory variables using the Variance Inflation Factors (VIFs) for the saturated model (Fox and Monette 1992). We excluded all models that included explanatory variables with VIF > 10 (Kennedy 2003) which allow to consider only model with

non-correlated explanatory variables. Among the remaining models, those with a ΔAICc < 2 from the best model were considered equally plausible for explaining variations in the emigration status of females and in the characteristics of the target units of immigrants. In a third step, we used type III ANOVA (car R package, Fox 2002) to test whether explanatory variables were significant, and model averaging to estimate their relative importance (model.avg function, MUMin R package). In emigration analyses, we tested the influence of female, silverback and group-related factors for each population. In immigration analyses, we first tested the influence of the unit types in which silverbacks lived (breeding unit, non-breeding unit, solitary male) and their status in terms of skin disease. Then we tested the influence of the other characteristics of the breeding units. Then in order to test if significant selected effects differed between populations in emigration and immigration analyses, we analyzed both populations together considering interactions of selected variables with population. Significant threshold was corrected for multiple testing.

Additionally, we tested the choice of unit made by immigrating females using a Manly standardized selection ratio (*widesIII* function, adehabitatHS R package (Manly et al. 2012) which computes the probability that an individual will use a particular resource, taking into account all the different available resources. Manly's indices were calculated pooling data from the two populations. Indices higher than 1 indicated preferences whereas indices lower than 1 indicated avoidance. We tested the significance of the observed distribution under a null hypothesis of a random choice using the log-likelihood statistic (Manly et al. 2012) for each of the following factors: social unit category, breeding unit age, unit size (4 categories: 2 to 5 individuals, 6 to 9 individuals, 10 to 13 individuals, 14 to 18 individuals), number of adult females in gorilla units (5 categories: 1 or 2 adult females, 3-4, 5-6, 7-8, >=9), proportion of severely diseased individuals in units (3 categories: 0%, 1-50%, > 50%), and intensity of skin disease on silverbacks.

Finally, the differences in the characteristics of the two units involved in female transfers were tested with Wilcoxon paired and chi-squared tests.

All analyses were performed using R 3.3.2 (R Development Core Team 2008), and graphics of marginal GLMM effects with SjPlot package (Lüdecke and Schwemmer 2017).

Table 1 Explanatory variables tested according to the direction of dispersal by adult females: female emigrating from vs. staying in their breeding group, and units into which females immigrated vs. all other non-chosen units

Explanatory variables	Emigrating	Immigrating
Female characteristics	Female parity	
	Presence of an unweaned infant	
	Intensity of skin disease	
Characteristics of silverbacks		Mating status (leading a breeding group or unmated)
	Status of skin disease of the unit's silverback	Status of skin disease of all silverbacks available in the population
	Age of breeding unit	Age of breeding unit
	Infants/females ratio	Infants/females ratio
	Number of adult females[1]	Number of adult females
		Squared number of adult females
Gorilla unit characteristics	Unit size	Unit size
	Squared unit size	Squared unit size
	Overall proportion of individuals suffering from skin disease	Overall proportion of individuals suffering from skin disease
	Proportion of individuals diseased at each stage of skin disease	Proportion of individuals diseased at each stage of skin disease

[1]: this variable was included in the binomial distribution

III Results

a) Gorilla units and dispersal status of adult females

Throughout the whole study period, the Lokoué and Romani populations were composed of 42 and 13 different identified breeding units, five and three non-breeding units, and 24 and 22 solitary silverbacks, respectively. A total of 64 and 31 different silverbacks, either solitary or unit leaders, were respectively identified at Lokoué and Romani (see details in supplementary material. Table S2). These numbers varied depending on the year due to the formation or the disbanding of breeding units, and also silverbacks becoming solitary (see supplementary material, Table S3). Breeding units at Lokoué and at Romani included 8.4 (3-20) and 9.4 (2-18) individuals on average, and 4.7 (1-11) and 4.6 (1-9) adult females, respectively. The immatures-over-adults ratio differed according to breeding unit age

(Kruskall-Wallis, $H_{Lokoué}$ = 230.4, df = 30, $P < 0.0001$, H_{Romani} = 179.63, df = 25, $P < 0.0001$), and the number of adult females (Kruskall-Wallis, $H_{Lokoué}$ = 94.535, df = 4, $P < 0.0001$, H_{Romani} = 69.86, df = 4, $P < 0.0001$, Fig. 1).

Totals of 156 and 56 different adult females were identified at Lokoué and Romani, respectively. Among them, 25 and 19 females emigrated from their breeding unit, while 131 and 37 females were permanent resident since their first observation in their breeding group at Lokoué and Romani, respectively. We observed 26 and 42 female immigration events, respectively. We recorded 19 transfer events concerning 17 females.

Over the whole study periods, an average 16% (SE = 0.007, N = 43-58) and 22.5% (SE = 0.91, N = 14-21) of the population showed signs of skin disease at Lokoué and Romani, respectively, while 8.4% (SE = 2.64 , N = 20-29) and 11.4% (SE = 1.25, N = 5-13) were severely diseased (stage 2, see details in supplementary material S3).

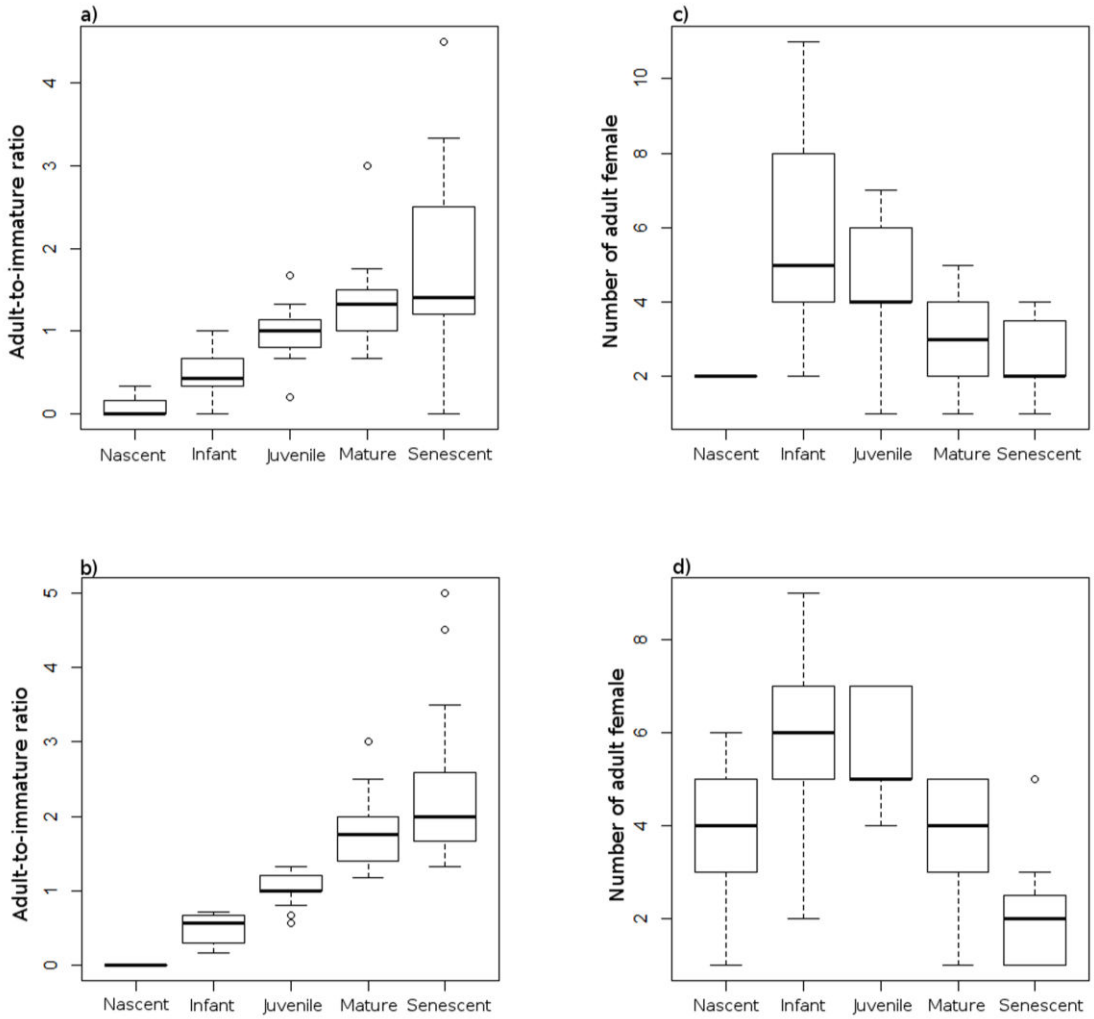


Fig. 1 Relationships between breeding unit age and the adult-to-immature ratio in a) Lokoué and b) Romani, and number of adult females in breeding units in c) Lokoué and d) Romani

b) Factors influencing female emigration

We recorded 322 female-year observations at Lokoué and 194 at Romani. 47 observations involved nulliparous females at Lokoué and 32 at Romani. Resident females made up 297 and 175 female-years, respectively. In 58.3% (Lokoué, N=297) and 62.9% (Romani, N=175) of cases the resident female was accompanied by an unweaned infant. In the two populations, 75% (N=44) of the emigrating females had a weaned infant the year they emigrated or had lost it at least three months before emigrating (N=3). In the remaining 12 cases, females had an unweaned infant on their last visit at the clearing before emigrating but whether that infant died before its mother left her unit or emigrated with her is unknown. In one case only, a female was seen emigrating with her infant. Both were observed together for two months. Subsequently, the mother was observed in a new breeding unit but her infant had disappeared.

We excluded the subset models of the complete GLMM that contained several statuses of skin diseases because of large collinearity between them (VIFs >10). Among the remaining models, four and two models best explained variations in emigration status among females (ΔAICc < 2) at Lokoué and Romani, respectively (Table 2). They included breeding unit size, squared breeding unit size, the proportion of severely diseased individuals within the breeding unit, the presence of unweaned infant, and the proportion of females with an infant (Table 2) for both populations, additionally breeding unit age and overall proportion of diseased individuals in Lokoué (Table 2). None of the models including the skin disease status of the emigrating female or of the silverback, the parity, or the proportion of individuals weakly suffering from skin disease in the unit were selected whichever the site.

Among the selected factors, in both populations the proportion of females with an infant in the breeding unit appeared to have no significant effect (type II ANOVA, P > 0.05). By contrast, in both populations, the presence of an unweaned infant was an important factor (Table 2). The probability of emigration when females have an unweaned infant was significantly lower (Fig. 2a). The size and squared size of the unit were also important and significant factors for both populations (Table 2). The probability of emigration peaked when units were around 10 individuals (Fig. 2b). Then, at Romani, the presence of skin disease was an important and significant factor (Table 2). Females emigrated significantly more from units with a high proportion of individuals severely suffering from skin diseases (Fig. 2c). At Lokoué, unit age was an important and significant factor (Table 2). Females emigrated significantly less from infant units than from other unit categories (Fig. 2d).

When both populations were considered together, the model included the effects of interactions of population with the quadratic effect of group size, the unit age, the presence of unweaned infant and the proportion of individuals severely suffering from skin diseases. Selection of models led to retain all simple effects and only the interaction between age of unit and population that was significant (W = 12.1; df = 4; P = 0.016). Emigration probability was higher in infant group in Romani than in Lokoué (5 events on 169 female-year in Lokoué, 8 events on 43 female-year in Romani, pairwise proportion posthoc test, p<0.001). This difference appeared to be due to one group classified as an infant group for which 5 out of its 7 adult females emigrated in one year. When we

discarded this group from analysis the interaction effect was not significant (W = 8.7; df = 4; P = 0.067) whereas the other effects remained significant.

Table 2 Best general linear mixed models (ΔAICc<2) estimating the effects of emigrating females, silverbacks and breeding units as factors of the probability of female emigration in the Lokoué and Romani populations. Estimates of each effect are presented with slope values for continuous variables and a + sign for discrete variables. Stars indicate significant values with ANOVA error type II

	Parity[1]	Presence of unweaned infant	Female skin disease[2]	Silverback skin disease[3]	Unit age[4]	Unit size	Squared unit size	Infants/ Females[5]	Weakly diseased individuals[6]	Severely diseased individuals[6]	Total diseased[7]	df[8]	AICc	Δ AICc	Weight[9]
Lokoué															
VIF[10]	2.9	1	1.1/1.7	2.2/4	4.21 to 7.9	2.7	2.8	1.9	21.9	71.3	97.8				
		+*			**+***	**-0.19***	**-0.05***			2.09		11	143.81	0.00	0.06
		+*			**+***	**-0.20***	**-0.05***					10	144.00	0.18	0.05
		+*			**+***	**-0.19***	**-0.05***				0.92	11	145.40	1.59	0.03
		+*			**+***	**-0.22***	**-0.05***	0.49				11	145.76	1.95	0.02
Relative importance	0	1	0	0	1	1	1	0.14	0	0.36	0.16				
Romani															
VIF[10]	1.7	1	1.8/2.2	4.2/6.9	1.4-3	6.4	9.8	2.9	1384	5280	8134				
		+*				-0.40	**-0.09***			**3.64***		7	89.78	0.00	0.02
		+*				-0.41	-0.07	1.27		**3.74***		8	90.30	0.50	0.01
	0	1	0	0	0	1	1	0.44	0	1	0				

[1]: Parity: nulliparous *vs.* parous;

[2]: Three intensity levels of skin disease on emigrating females: not diseased. weakly diseased. severely diseased

[3]: Three intensity levels of skin disease on the leader silverback: not diseased. weakly diseased. severely diseased

[4]: Age of breeding units: nascent. infant. juvenile. mature. senescent

[5]: Proportion of females with an infant

[6]: Proportion of weakly or severely diseased individuals in initial breeding units

[7]: Proportion of all diseased individuals in breeding units

[8]: Degree of freedom

[9]: Weight of the model calculated on all possible models

[10]: for categorical variable the number of VIF computed is the number of categories -1

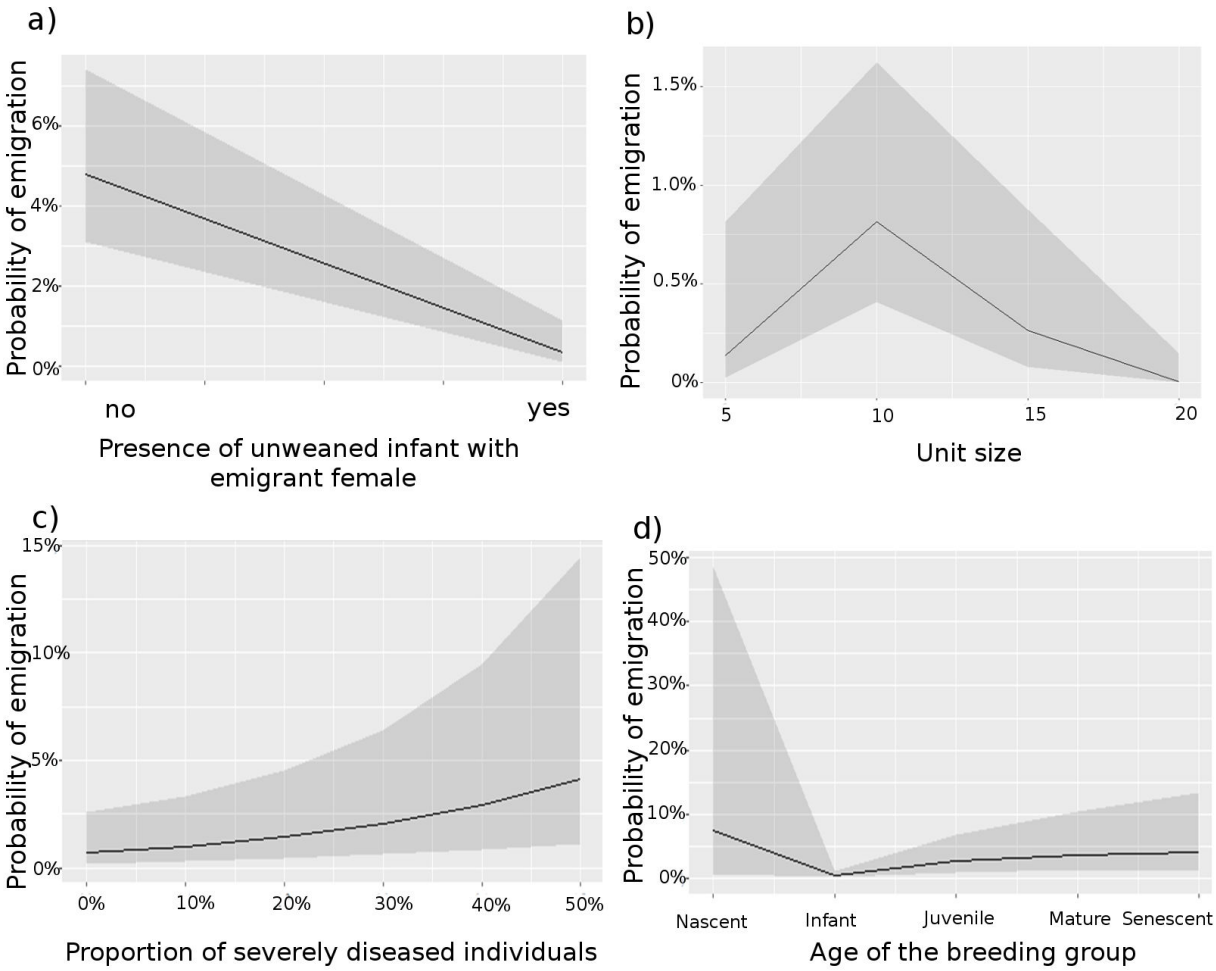


Fig. 2 Marginal effects of presence of unweaned infant on the probability of emigration by adult females in both populations (a), effect of unit size in both populations (b), of the proportion of severely diseased individuals in Romani (c), and of the age of breeding units in Lokoué (d)

c) Factors influencing the immigration of adult females

We recorded 165 unit-years of observations at Lokoué and 147 at Romani. Among those, units targeted by immigrating females totaled 26 and 42 unit-years. Twenty and 29 immigration events targeted breeding units, Five and 13 females joined solitary silverbacks, and one adult female joined a non-breeding unit in Lokoué and none in Romani. We never observed a female immigrating with her infant.

Female immigration in both populations was influenced by the type of social unit in which the silverback lived ($W_{Lokoué}$ = 4.39, $df_{Lokoué}$ = 1, $P_{Lokoué}$ = 0.04; W_{Romani} = 6.89, df_{Romani} = 1, P_{Romani} = 0.009).

The probability for a female to immigrate into a breeding unit was higher than the probability to join a solitary male independently from the proportion of solitary and breeding unit within the population. The skin disease infection status of the silverback had no effect on female immigration ($W_{Lokoué}$ = 5.10, $df_{Lokoué}$ = 2, $P_{Lokoué}$ = 0.08; W_{Romani} = 0.7, df_{Romani} = 2, P_{Romani} = 0.70), with 2 and 11 females joining a diseased male at Romani and Lokoué, respectively. However, there was a contrasted distribution of diseased silverbacks between populations (χ^2 = 4.71, df = 1, P = 0.03). At Lokoué, among diseased silverbacks, only 21.4% (N=1) were leading a breeding unit, and 78.6% (N=13) were unmated, whereas at Romani 54.5% (N=6) were leading a breeding unit and 45.4% (N=5) were unmated.

At both sites, the probability of immigration was best explained by models involving unit age, unit size, the infants-over-adult-females ratio, and the proportion of severely diseased individuals (Table 3). At Romani, selected models also included the squared unit size and the proportion of weakly diseased individuals. At Lokoué, the probability to immigrate into a unit varied significantly with the unit size (positive relationship, Table 3). At Romani, the probability to immigrate into a unit varied significantly with unit age (probability to immigrate into infant and nascent group being higher than into senescent group), unit size and the proportion of severely diseased individuals (negative relationship, Table 3). When both populations were considered together, the model included the effects of interactions of population with all significant selected factors. The most important factors were population, unit age, proportion of severely diseased individuals and unit size (relative importance: 1, 1, 1, 0.74 respectively), interactions between population and unit size and between population and unit age have minor importance (0.44 and 0.13, respectively). Thus variation of immigration probabilities with unit size and unit age did not differ between populations.

Table 3 Best general linear mixed models (ΔAICc<2) estimating effects of immigrating females, silverbacks and units as factors of the probability for female immigration into the Lokoué and Romani populations. Estimates of each effect are presented with slope values for continuous variables, and a + sign for discrete variables. Stars indicate significant values with ANOVA error type II

	Unit age[1]	Unit size	Squared unit size	Infants/ Females[2]	Weakly diseased individual	Severely diseased individual[3]	df[4]	AICc	Δ AICc	Weight[5]
Lokoué										
VIF	1 to 1.9	1.46		1.88		1.07				
	+	**0.26***		-2.32		-6.77	9	86.3	0.00	0.075
	+	**0.24***				-7.8	8	87.1	0.84	0.049
	+	**0.24***		-2.7			8	87.5	1.26	0.04
	1	1	0	0.76	0	1				
Romani										
VIF	1.2 to 6.48	6.2	2.4	2.2	4	5.9				
	+	**-0.5***	0.07			**-7.35***	9	66.5	0.00	0.00025
	+	-0.32				**-5.57***	8	67.0	0.55	0.00019
	+*				5.36		7	67.2	0.71	0.00018
	+*					**-4.97***	7	67.7	1.20	0.00014
	+	-0.24			5.39		8	68.1	1.61	0.00011
	+	-0.36		1.63		**-6.42***	9	68.4	1.92	0.00010
	+	**-0.5***	0.06	1.46		**-7.82***	10	68.4	1.93	0.00010
	1	0.7	0.33	0.18	0.27	0.73				

[1]: Age of the breeding units: nascent, infant, juvenile, mature, senescent

[2]: Proportion of females with an infant

[3]: Proportion of severely diseased individuals in breeding unit

[4]: Degree of freedom

[5]: Weight of the model calculated on all possible models

Manly's index analysis, which explicitly tests selection choice, confirmed that females immigrated preferentially into breeding units (Wi = 1.32, 95% CI = 1.10- 1.55) whereas they avoided solitary silverbacks (Wi = 0.59, 95% CI = 0.31-0.87, Fig. 3a). They significantly selected nascent and infant breeding units (Wi = 3.26, 95% CI = 1.93-4.58; Wi = 1.59, 95% CI = 1.12-2.07) while they avoided mature and senescent units (Wi = 0, 95% CI = 0; Wi = 0.08, 95% IC = -0.13-0.30, Fig. 3b). They significantly selected groups from 2 up to 5 individuals (Wi = 2.54, 95% CI = 1.68-3.40) while

they avoided groups from 10 up to 13 individuals (Wi = 0.40, 95% IC = 0.04-0.76, Fig. 3d). They significantly avoided units with more than half of the individuals showing signs of skin disease (Wi = 0.19, 95% CI = -0.25-0.63, Fig. 3c). There was no significant effect of the stage of the silverback's skin disease on the immigration choice of females. The number of adult females in breeding units did not appear to affect the immigrants' choice.

d) Transfer characteristics

The initial breeding units of transferring females were on average larger than the size of their target units (8.8 *vs.* 5.5, paired Wilcox test, $P = 0.0092$) and had a six-fold higher immatures-per-adult ratio (1.36 *vs.* 0.23, paired Wilcox test, $P = 0.0009$). The number of adult females and the infants-per-adult-female ratio did not differ between initial and target units (3.11 *vs.* 2.74, paired Wilcox test; $P = 0.44$ and 0.37 *vs.* 0.32, $P = 0.62$, respectively). No female transferred into a target unit older than their initial unit, and 58% of the transfers involved females emigrating from senescent or mature units.

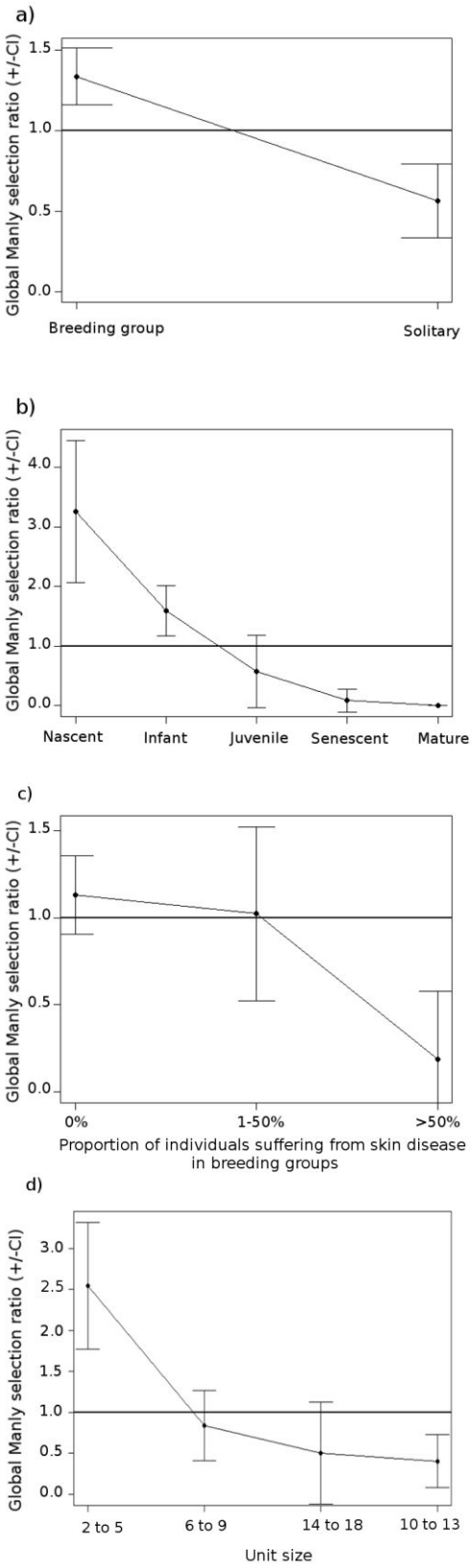


Fig. 3 Manly's selection indices testing the preferences of immigrating females for the type of social unit (a), its age (b), for the proportion of individuals in the unit suffering from skin disease (c) and for the unit size (d). CI: confidence interval 95%

IV Discussion

Social dispersal is an important component of female life history traits that potentially leads to a gain of fitness (Clutton-Brock and Lukas 2012). Females' decision to emigrate or immigrate results from several factors and arises after they have gathered cues from the available social units (*i.e.* social environment), from putative sexual partners, and after estimating the cost/benefit balance of dispersing (Isbell and VanVuren 1996). Their health condition can also influence their decision to disperse - or not (Debeffe et al. 2012).

In western lowland gorilla populations, the presence of an unweaned infant and social unit features, such as their size and age and the prevalence of skin diseases, influenced the emigration and immigration processes of adult females.

a) Factors related to female characteristics

Females' body and physiological condition, potentially linked to their reproductive status, are factors often involved in the decision to disperse (Bowler and Benton 2005). The parity of gorilla adult females had no effect on emigration probability, contrary to our expectations. This is in accordance with a study on mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei)* that indicated that non-natal nulliparous and parous females did not differ in their transfer propensity (Robbins et al. 2009a). Our results suggest that nulliparous females did not behave differently from parous females, so that previous experience did not seem to influence secondary dispersal patterns.

Females with an unweaned infant stayed in their breeding unit, which is in accordance with findings on mountain gorillas (Sicotte 2001). In addition, during the study period, we never noticed a female immigrating into a new unit with her infant. We suppose that, as in mountain gorillas, delaying dispersal until their offspring is weaned is a strategy for adult female gorillas to avoid infanticide. In mountain gorillas, infanticide typically occur when mothers transfer with an infant during group disintegration (Watts 1989) and infants have up to 2.8% probability of being killed due to dominant male replacement (Robbins et al. 2013). However, in western lowland gorillas, transfers of female with infant give rise to only two cases of suspected infanticide, while four mother-infant pairs transferred into new social units where the infants survived (Stokes et al. 2003). At Lokoué during the period of huge demographic disturbance due to Ebola outbreak, two females, respectively accompanied with an unweaned infant and pregnant, joined new breeding groups. Subsequently, their infant survived

despite the fact that the leader silverbacks were likely not their fathers (Genton et al. 2012). Infanticide was considered to be less common than in mountain gorillas (Yamagiwa et al. 2009; Robbins and Robbins 2015). On the other hand, several females emigrated from their breeding unit a few months after their infant's death, which suggests that they might have been searching for a more protective silverback, as also observed in Thomas langur (Sterck 1997).

Contrary to our hypothesis, the skin disease status of females did not negatively influence their probability to emigrate. Dispersal is generally considered to induce energetic and time costs, increase mortality risks, and reduce the advantage of being in a familiar social unit or habitat (loss of social rank or selection of a suboptimal environment, (Bonte et al. 2012). Accordingly, individuals in a better physical condition are supposed to be more prone to disperse (Bowler and Benton 2005). However, studies of the impact of body condition on dispersal yielded contrasting results. In arvicoline rodents (*Arvicolinae* subfamily) for example, dispersers had either a larger, smaller or same body size as residents (Le Galliard et al. 2012). In the same way, body mass had no effect on the dispersal of juvenile roe deer (Loe et al. 2010). The disease status of individuals is assumed to influence their body condition and thus their dispersal. However, to our knowledge, studies investigating the effects of disease on the probability to disperse remain scarce (Brown and Brown 1992; VanVuren 1996; Debeffe et al. 2014). Roe deer highly parasitized by endoparasites were unable to energetically assume locational dispersal (Debeffe et al. 2014). Yellow-bellied dispersing marmots (*Marmota flaviventris*) tended to host higher ectoparasite loads (VanVuren 1996), while heavily parasitized cliff swallows (*Hirundo pyrrhonota*) nestlings dispersed more than lightly parasitized ones (Brown and Brown 1992). In our study, the cost of social dispersal in gorillas could be supported by individuals weakened by skin disease because the impact on their body condition is not deleterious enough to prevent their dispersal. In addition, as in other dispersing primate females, they can take advantage of interunit encounters to switch groups without a risky solitary period and avoid costly long distances (Harcourt 1978; Isbell and VanVuren 1996). Due to the overlap between the home ranges of units, they are also likely to stay in a familiar area.

b) Silverback-related factors

The characteristics of the silverbacks that females leave or join could influence their decision to disperse according to the mate selection theory (Harcourt 1978). After leaving their breeding unit, emigrating females must take subsequent decisions linked to their immigration process. Immigrating western gorilla females preferred to join breeding units rather than solitary silverbacks. We do not know if it is a general dispersal pattern in western gorillas because, to our knowledge, the influence of the reproductive status of available silverbacks (in terms of mated or unmated males) on the immigration decision of females had not been investigated in other populations. Preferences of females between breeding units and solitary silverbacks may also depend on the history of populations. Indeed, in the initial Virunga mountain gorilla population females preferred newly formed groups and lone silverbacks (Harcourt 1978) whereas several years later, females preferred to join multimale groups (Robbins and Robbins, 2015). We did not find any evidence that silverbacks' disease status influenced either the emigration or females' decision to immigrate. However, we should be cautious in interpreting these findings in terms of the absence of skin disease criteria as a factor of females' mate choice. Emigration was analyzed only for breeding units, and only 12 out of 45 breeding units were led by a severely diseased silverback. Concerning immigration, most of adult females already belonged to breeding groups when groups were observed for the first time, and only seven group formations (*i.e.* females joining a solitary silverback) were observed. We may lack the statistical power to detect any avoidance of diseased silverbacks by females. Consequently, despite an apparent discrepancy, our findings do not invalidate a previous study that showed that unmated males (*i.e.* solitaries and silverbacks in non-breeding units) suffered more from skin diseases than mated males (*i.e.* silverbacks in breeding units) in the Lokoué population, suggesting that females avoided mating with diseased silverbacks (Levréro et al. 2007). However, although we confirmed this imbalance of diseased silverbacks depending on reproductive status in Lokoué, we did not find such a pattern in Romani. Therefore, the distribution of skin disease between mated and unmated males cannot be solely explained by female choice. Other factors such as silverback age and body size (Caillaud et al. 2008), or previous interactions between the silverback and the female (including relatedness) could interact with skin disease and blur the females' choice pattern. Further studies are needed to better understand female mate choice in gorilla populations. The link between sexual selection and direct measurement of mates' parasite or virus load has rarely been studied (*i.e.* without

using the expression of a secondary sexual characters as a proxy, (Maan et al. 2008). However, according to (Hamilton and Zuk 1982), the expression of secondary sexual characters should decrease with parasite load to allow females to evaluate their mate.

In our two gorilla populations, the probability for a female to emigrate from small units had a large variance. For some small units, the probability of females to emigrate was low whereas the probability rose up to 12% in some others small units. This could reflect a female sampling of the reproductive value of silverbacks. Comparably, females appeared to “sample” adult males in mountain gorillas (Watts 1990) and in wild horses before choosing when and where to disperse (Linklater and Cameron 2009).

In our two gorilla populations again, immigrating females did not seem to use a high number of adult females in breeding units as an indicator of the good reproductive value of silverbacks. Indeed, we did not observe significant effects of the number of adult females on the immigration probability. Moreover, females’ reproductive success within groups (*i.e.* the proportion of females with an infant) did not influence their dispersal decision, whether to emigrate or to immigrate. Therefore, if female gorillas base their dispersal decision on male quality, they possibly use other proxies than the number of resident females and their reproductive success within groups.

Breeding unit age influenced females’ decision to disperse since they transferred from older breeding units to younger ones in both populations, in accordance with results from the western lowland gorilla population at Mbeli (Parnell 2002) and mountain gorillas of Virunga National Park (Harcourt 1978). In most mammal species, young males are supposed to have reduced access to mates because of a reduced capacity to protect females (Clutton-Brock and McAuliffe 2009). For example, northern elephant seal females (*Mirounga angustirostris*) avoid mating with males that are unable to provide protection and call on older dominant males to get rid of the younger ones that harass them (Pistorius et al. 2001; McMahon and Bradshaw 2004). In our study, we assumed that the oldest breeding groups were led by older silverbacks as compared to younger ones, according to a 5.9 (±3.7)-year average tenure of males (Breuer et al. 2010). Therefore, females preferentially transferred toward younger units, *i.e.* with fully mature males at their peak of physical abilities.

c) Factors related to unit characteristics

Joining a new male involves joining his social unit and the individuals in it. The presence of an infectious disease, the size and the age of the breeding unit appeared to be valuable information for dispersing females. The presence of skin disease in social units determined the dispersal decision of female gorillas in the two populations. In Romani, the probability for a female to emigrate increased with the increased proportion of severely diseased individuals in her social unit. Similarly, immigrating females avoided units with more than half of the individuals diseased. Severely diseased individuals are expected to increase the risk of contamination by inter-individual transmission (Giacani and Lukehart 2014). Hence, by avoiding contact with diseased individuals and leaving their unit, female gorillas lessen the risk of being contaminated, as observed in other species (Kiesecker et al. 1999; Behringer et al. 2006). As female transfers tend to occur during inter-group encounters (Harcourt 1978; Sicotte 2001), we cannot exclude that the avoidance of diseased-unit by immigrant females could partly reflect encounters with fewer neighboring groups due to less widely ranges than that of non-diseased-units. Behavioral social avoidance of contagious individuals by healthy ones has rarely been found in the wild (Behringer et al. 2006; Poirotte et al. 2017). Mandrills (*Mandrillus sphinx*) are able to socially exclude conspecifics infected by endoparasites by avoiding grooming with them (Poirotte et al. 2017). Grooming increased with a decreasing parasite load, revealing that healthy individuals avoided the risk of infection. Chemical mechanisms are supposedly involved in the detection of diseased conspecifics, with cues in the environment (Kiesecker et al. 1999; Behringer et al. 2006) or in the feces (Poirotte et al. 2017). In the case of skin disease in gorillas, we suppose that the intensity of skin lesions represented relevant visual cues of infection risks.

We expected an optimal medium unit size for which emigration would be reduced. Contrary, we detected that emigration probability peaked at 10-15 individuals and it was reduced for smaller and larger unit. Analyses of selection index of immigrant females also revealed that groups from 10 to 13 individuals were significantly avoided whereas small group (from 2 to 5 individuals) were significantly selected. (Stokes et al. 2003) found a positive effect of unit size on emigration rates, but the range of breeding unit size in the Stokes' study was only up to 13 individuals. We observed six breeding units larger than this threshold (15 individuals). Those units were very stable in time and with the largest number of females, which could suggest that the silverbacks were of high quality. Our results are not in accordance with those from mountain gorillas in which females preferentially choose medium-sized

units, providing advantages for their offspring to have enough individuals to interact with, along with reduced competition among females (Harcourt 1978). However, competition for food resources seems low because of the low variability of food availability, except in unusually large groups (Watts 1985; Watts 1998) where nevertheless no effect on female fertility could be detected (Robbins and Robbins 2015). In western gorillas, we suspect that food competition might be more intense because of their higher level of frugivory (Rogers et al. 2004). However, the proportion of infants per female showed no evidence that feeding competition was limiting reproduction in large groups. Competition for protective and reproductive access to the silverback by reproductive females might thus be a limiting factor of the growth of breeding units, and in turn a determining factor of dispersal decisions. However, we showed that the quality of the silverback influence the growth of breeding unit. Indeed, we showed that some silverbacks that led the largest groups could be the most efficient to regulate female-female conflicts and were able to retain females. Concerning immigration, in large groups, the attempts of females to join a breeding unit may be resisted by females in the group of destination due to a higher competition for the proximity of male than in smaller groups as in colobus (Teichroeb et al. 2009), mountain gorillas (Watts 1992),and howler monkeys (Crockett 1984). Nevertheless, in horses, although immigrant mares suffer aggression from the mares in their new groups (Monard and Duncan 1996), they more likely immigrate into groups larger than their former group (Linklater and Cameron 2009) and do not selectively join groups with fewer resident females (in horses, Monard and Duncan 1996).

d) Conclusion & Perspectives

Dispersal of western lowland gorilla female results from a multifactorial decision based on females', silverbacks' and social unit characteristics. Distinction between emigration and immigration phases highlighted differences in decision-making patterns for female gorillas. Our study highlights that the social environment of adult females determines their decision to disperse. The mechanisms of females' evaluation of their social environment remain to be investigated. Intra-unit relationship is probably an additional factor influencing the social decision to disperse. Females can have to leave their unit due to agonistic interactions with dominant individuals. In coyotes for example, emigrating individuals were low-ranking ones with reduced access to food in winter (Gese et al. 1996). However,

there is little evidence of agonistic dominance or coalition in western lowland gorillas (Stokes 2004). On the other hand, resident females with friendly relationships in mountain and lowland gorillas can oppose resistance to their units to immigrating females in order to avoid competition for proximity and protection access to the resident male (Watts 1990; Watts 1991). Further studies are needed on female-female relatedness and coalition or agonistic interactions to specify the role of kinship and social relationships on female dispersal. Indeed, in horses, mares prefer to join groups with familiar females or closely related females (Monard and Duncan 1996), as it has been found in one population of Western gorilla (Bradley et al. 2007).

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Data availability

The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Supplementary material

Table S1 Periods of observation and presence of gorillas on the Lokoué and Romani clearings during each period of the study

Site	Dates	No days of observation	% days of gorilla presence
Lokoué	April 2001 to December 2003	484	87.4
Romani	February 2005 to May 2006	287	62.7
	June 2008 to April 2010	307	48.2
	January 2013 to September 2015	436	47.2

Table S2 Sample data across sites and years

Sites	Years	Number of units[1]	Number of silverbacks	Number of breeding units	Number of solitary silverbacks	Number of non-breeding units[2]	Number of adult females	Number of immigration events	Number of unit-year observations[3]	Number of emigration events	Number of female-year observations[4]
Lokoué	2001	49	49	34	14	1	77	6	53	6	77
	2002	59	59	37	17	5	136	11	63	12	136
	2003	43	43	25	16	3	97	9	49	7	97
Overall		70	64	43	23	5	156	26	165	25	310
Romani	2005	12	12	7	5	0	20	3	14	3	20
	2006	20	20	8	12	0	18	5	23	3	18
	2008	19	19	8	10	1	12	3	21	2	12
	2009	16	16	6	9	1	11	4	18	0	11
	2010	14	14	7	6	1	26	4	16	3	26
	2013	15	15	6	9	0	35	13	24	7	35
	2014	13	13	10	3	0	37	9	17	1	37
	2015	14	14	9	5	0	35	1	14	0	35
Overall		38	31	13	22	3	56	42	147	19	194

[1]: The overall number of different units exceeds the number of silverbacks because some silverbacks have belonged to different unit types (either solitary or within breeding or non-breeding units) in the course of the study

[2]: Only non-breeding units that included one silverback were taken into account

[3]: “Unit-year” observations are all available units in a given year that are, considering each immigrating female, either her target unit or not (binary response variable). The number of unit-year observations differs from the number of available units because a given unit could be a target one for several immigrant females

[4]: “Female-year” observations are all available females in a given year that are categorized either as emigrant from or resident within a breeding unit

Yaws-like skin disease lesions in wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla)* in the Republic of Congo.

Yaws is an infectious disease caused by the bacterium *Treponema pallidum pertenue* (Mitjà et al. 2013). It affects humans in subtropical regions but also non-human primates such as baboons (*Papio cynocephalus,* Zobaníková et al. 2013), *Papio hamadryas* Knauf et al. 2012), chimpanzees (Lovell et al. 2000), and gorillas (Cousins 1972; Lovell et al. 2000; Levréro et al. 2007). In humans, the bacteria are mostly transmitted by skin-to-skin contact and mostly infect children. Sexual transmission might be possible but has been seldom described (Giacani and Lukehart 2014). Contagiousness is stronger during the early stages, and tertiary infection is non-contagious. The primary stage of infection is characterized by skin lesions that form solitary erythematous papules. These lesions are not painful but may be pruritic. The development of secondary lesions can be delayed for up to one to two years from initial exposure (Mitjà et al. 2013; Giacani and Lukehart 2014; Gogarten et al. 2016). It involves skin lesions widely disseminated over the body, and often lymph nodes and bone lesions (Mitjà et al. 2013). Skin lesions are common around the nose and mouth, but are often found on the feet too. During the early stages, periostitis and osteitis may affect the bones of the upper and lower limbs (tibia, fibula, and forearm) and the proximal phalanges of fingers and toes, resulting in bone pain and finger swelling (Giacani and Lukehart 2014). Then, thanks to the host's immune response, lesions can heal spontaneously within weeks or months, and infected individuals can enter a state of latency that can last for a lifetime (Antal et al. 2002; Giacani and Lukehart 2014). In a small percentage of infected individuals, the disease can enter a tertiary phase leading to destructive osteitis and tissue necrosis like saddle nose and perforation/collapse of the palate and nasal septum (Antal et al. 2002; Mitjà et al. 2013; Giacani and Lukehart 2014). Bone lesions, like "saber shin" tibia, are irreversible. Yaws is characterized by periods of remission and relapse (Lovell et al. 2000). Although it is not fatal, it could increase death susceptibility through disabling or increased sensitivity to other infections.

In humans, skin infections may have confounding symptoms with yaws, *e.g.* impetigo (caused by *Staphylococcus aureus*), ecthyma (a pyogenic disease of the skin caused by *Pseudomonas*

species, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus*), leprosy, cutaneous leishmaniasis, scabies, molluscum contagiosum, planar warts, tropical ulcers (a polymicrobial infection), tungiasis (infection by the parasite *Tunga penetrans*), chromomycosis (fungal infections caused by members of the *Dematiaceae* family), sarcoidosis, and psoriasis (Giacani and Lukehart 2014). Diagnosis of skin diseases can be more difficult in non-human primates because it is harder to take blood samples. Diagnosis remains most often limited to visual and clinical signs. In gorillas, diseases such as impetigo (*Staphylococcus aureus*), herpes B and herpes simplex (*Cercopithecine herpesvirus 1* and *Herpes simplex virus*), and monkeypox have been described with confounding symptoms (Bernstein and Didier 2009). Several non-human primates have been reported to exhibit skin ulcerations suggestive of treponemal infection (Levréro et al. 2007; Knauf et al. 2017). The effective presence of *Treponema pallidum* has been demonstrated in baboons (Gogarten et al. 2016) and western lowland gorillas thanks to serology analyses (Karesh 2000). The presence of periostitis and osteomyelitis on the skeletons of gorillas and chimpanzees also indicates yaws-like infection in those species (Lovell et al. 2000).

In our populations, more than 15% of identified gorillas showed skin disease lesions that varied in proportions depending on populations and periods (Table S3). The similarity of symptoms to those described in humans suggests that most of infected gorillas suffered from yaws. Between 7 and 14% of individuals presented a relatively weak stage of skin lesions such as muscle-flesh-colored contagious ulcerations or cicatricial pink or white tissue (Table S3, Fig. S1a). Eight to 18% were more severely infected with red, ulcerative and/or granulomatous papillomas mainly located on their faces (Fig. S1b,c,d) or other parts of their body (Fig. S1e), or deep lesions that had destroyed the soft masses such as ulcerous and mutilating rhinopharyngitis that caused total necrosis of the nose and lips (Fig. S1f,g,h), and some deformities of jaws and limbs such as “saber shin” tibia (Fig. S1i). Individuals can be contaminated early in life because of contact with their infected mother (Fig. S1j,k).

Table S3 Proportions (±standard errors) of individuals weakly and severely diseased by yaws-like infection in the two populations

Sites	Years	Weakly diseased	Severely diseased
Lokoué	2001	5.9	9.1
	2002	7.7	8.3
	2003	7.4	7.8
Mean		7± 0.5	8.4± 0.3
Romani	2005	10.7	17.9
	2006	9.7	15.3
	2008	7.7	15.4
	2009	7.6	12.7
	2010	10.2	14.8
	2013	12.3	4.9
	2014	14.4	4.8
	2015	12.5	5.2
Mean		10.8 ± 0.8	11.4 ± 1.9

Figure S1 Various cases of yaws-like skin lesions in our western lowland gorilla populations. See the text for descriptions. Pictures were adapted from original photographs credited by S. Gatti and F. Levréro (a,e,f,h,i), C. Genton (b,c,g), D. Caillaud (g), A. Lavandier (j), P. Motsch and G. Le Flohic (k), CNRS/University of Rennes.

References

Alexander RD (1974) The evolution of social behavior. Annu Rev Ecol Syst 5:325-383

Altizer S, Harvell D, Friedle E (2003) Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. Trends Ecol Evol 18:589-596

Antal GM, Lukehart SA, Meheus AZ (2002) The endemic treponematoses. Microbes Infect 4:83–94

Barton K (2009) R-Forge: MuMIn - multi-model inference: Project Home. http://R-Forge.R-project.org.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2014) Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv:1406.5823v1 [stat.CO].

Behringer DC, Butler MJ, Shields JD (2006) Avoidance of disease by social lobsters. Nature 441:421-421

Bernstein JA, Didier PJ (2009) Nonhuman primate dermatology: a literature review. Vet Dermatol 20:145–156

Bonte D, Van Dyck H, Bullock JM, Coulon A, Delgado M, Gibbs M, Lehouck V, Matthysen E, Mustin K, Saastamoinen M, Schtickzelle N, Stevens VM, Vandewoestijne S, Baguette M, Barton K, Benton TG, Chaput-Bardy A, Clobert J, Dytham C, Hovestadt T, Meier CM, Palmer SCF, Turlure C, Travis JMJ (2012) Costs of dispersal. Biol Rev 87:290-312

Boulinier T, McCoy KD, Sorci G (2001) Dispersal and parasitism. In: Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichos JD (eds) Dispersal. Oxford University Press, Oxford, pp 169-179

Bowler DE, Benton TG (2005) Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. Biol Rev 80:205-225

Bradley BJ, Doran-Sheehy DM, Vigilant L (2007) Potential for female kin associations in wild western gorillas despite female dispersal. Proc R Soc London 274:2179-2185

Breuer T, Hockemba MBN, Olejniczak C, Parnell RJ, Stokes EJ (2009) Physical maturation, life-history classes and age estimates of free-ranging Western gorillas-insights from Mbeli bai, Republic of Congo. Am J Primatol 71:106-119

Breuer T, Robbins AM, Olejniczak C, Parnell RJ, Stokes EJ, Robbins MM (2010) Variance in the male reproductive success of western gorillas: acquiring females is just the beginning. Behav Ecol Sociobiol 64:515-528

Brom T, Massot M, Legendre S, Laloi D (2016) Kin competition drives the evolution of sex-biased dispersal under monandry and polyandry, not under monogamy. Anim Behav 113:157-166

Brown CR, Brown MB (1992) Ectoparasitism as a cause of natal dispersal in cliff swallows. Ecology 73:1718-1723

Burnham KP, Anderson DR (2003) Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. Springer Science & Business Media, New York

Caillaud D, Levréro F, Cristescu R, Gatti S, Dewas M, Douadi M, Gautier-Hion A, Raymond M, Ménard N (2006) Gorilla susceptibility to Ebola virus: The cost of sociality. Curr Biol 16:R489-R491

Caillaud D, Levréro F, Gatti S, Ménard N, Raymond M (2008) Influence of male morphology on male mating status and behavior during interunit encounters in western lowland gorillas. Am J Phys Anthropol 135:379-388

Clarke MR, Glander KE (2010) Secondary transfer of adult mantled howlers (*Alouatta palliata*) on Hacienda La Pacifica, Costa Rica: 1975-2009. Primates 51:241-249

Clobert J, Danchin E, Dhondt AA (2001) Dispersal. Oxford University Press, Oxford, New York

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

Clutton-Brock TH (1989) Female transfer and inbreeding avoidance in social mammals. Nature 337:70-72

Clutton-Brock TH, Lukas D (2012) The evolution of social philopatry and dispersal in female mammals. Mol Ecol 21:472-492

Cousins D (1972) Diseases and injuries in wild and captive gorillas: *Gorilla gorilla*. Int Zoo Yearb 12:211–218

Crockett CM (1984) Emigration by female red howler monkeys and the case for female competition. In: Small MF (ed) Female primates: studies by women primatologists. Alan R. Liss, New York, pp 159-173

de Castro F, Bolker B (2005) Mechanisms of disease-induced extinction. Ecol Lett 8:117-126

Debeffe L, Morellet N, Cargnelutti B, Lourtet B, Bon R, Gaillard J-M, Hewison AJM (2012) Condition-dependent natal dispersal in a large herbivore: heavier animals show a greater propensity to disperse and travel further. J Anim Ecol 81:1327-1337

Debeffe L, Morellet N, Verheyden-Tixier H, Hoste H, Gaillard J-M, Cargnelutti B, Picot D, Sevila J, Hewison AJM (2014) Parasite abundance contributes to condition-dependent dispersal in a wild population of large herbivore. J Anim Ecol 123:1121-1125

Debeffe L, Richard E, Medill SA, Weisgerber JN, McLoughlin PD (2015) Costs of social dispersal in a polygynous mammal. Behav Ecol 26:1476-1485

Dufty AM, Belthoff JR (2001) Proximate mechanisms of natal dispersal: the role of body condition and hormones. In: Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichos JD (eds) Dispersal. Oxford University Press, Oxford, pp 217-229

Fossey D (1983) Close encounters with great apes. Science Digest 91:66-&

Fox J (2002) An R and S-Plus companion to applied regression. SAGE Publications, London

Fox J, Monette G (1992) Generalized Collinearity Diagnostics. J Am Stat Assoc 87:178-183

Gatti S, Levréro F, Ménard N, Gautier HA (2004) Population and group structure of western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Lokoué, Republic of Congo. Am J Primatol 63:111-123

Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Caillaud D, Pierre JS, Ménard N (2012) Recovery potential of a Western lowland gorilla population following a major Ebola outbreak: results from a ten year study. Plos One 7:(e37106)

Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levrero F, Bigot E, Motsch P, Le Gouar P, Pierre J-S, Menard N (2017) Using demographic characteristics of populations to detect spatial fragmentation following suspected ebola outbreaks in great apes. Am J Phys Anthropol 164:3-10

Genton C, Pierre A, Cristescu R, Levréro F, Gatti S, Pierre J-S, Ménard N, Le Gouar P (2015) How Ebola impacts social dynamics in gorillas: a multistate modelling approach. J Anim Ecol 84:166-176

Gese EM, Ruff RL, Crabtree RL (1996) Social and nutritional factors influencing the dispersal of resident coyotes. Anim Behav 52:1025-1043

Giacani L, Lukehart SA (2014) The Endemic Treponematoses. Clin Microbiol Rev 27:89-115

Gogarten JF, Düx A, Schuenemann VJ, et al (2016) Tools for opening new chapters in the book of Treponema pallidum evolutionary history. Clin Microbiol Infect 22:916–921

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

Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science 218:384-387

Harcourt AH (1978) Strategies of emigration and transfer by primates, with particular reference to gorillas. Z Tierpsychol 48:401-420

Harcourt AH, Greenberg J (2001) Do gorilla females join males to avoid infanticide? A quantitative model. Anim Behav 62:905-915

Isbell LA, VanVuren D (1996) Differential costs of locational and social dispersal and their consequences for female group-living primates. Behaviour 133:1-36

Kappeler PM, Cremer S, Nunn CL (2015) Sociality and health: impacts of sociality on disease susceptibility and transmission in animal and human societies Introduction. Philos Trans R Soc Lond Ser B-Biol Sci 370:20140116.

Karesh WB (2000) Suivi de la santé des gorilles au nord-Congo. La Canopée 16–18

Kennedy P (2003) A guide to econometrics. MIT Press,

Kiesecker JM, Skelly DK, Beard KH, Preisser E (1999) Behavioral reduction of infection risk. Proc Natl Acad Sci 96:9165-9168

Knauf S, Batamuzi EK, Mlengeya T, et al (2012) Treponema infection associated with genital ulceration in wild baboons. Vet Pathol 49:292–303

Knauf S, Gogarten J, Schuenemann VJ, et al (2017) African nonhuman primates are infected with the yaws bacterium Treponema pallidum subsp. pertenue. bioRxiv 135491

Le Galliard J-F, Remy A, Ims RA, Lambin X (2012) Patterns and processes of dispersal behaviour in arvicoline rodents. Mol Ecol 21:505-523

Lefebvre D, Ménard N, Pierre JS (2003) Modelling the influence of demographic parameters on group structure in social species with dispersal asymmetry and group fission. Behav Ecol Sociobiol 53:402-410

Levréro F, Gatti S, Gautier-Hion A, Ménard N (2007) Yaws disease in a wild gorilla population and its impact on the reproductive status of males. Am J Phys Anthropol 132:568-575

Levréro F, Gatti S, Ménard N, Petit E, Caillaud D, Gautier-Hion A (2006) Living in nonbreeding groups: An alternative strategy for maturing gorillas. Am J Primatol 68:275-291

Linklater WL, Cameron EZ (2009) Social dispersal but with philopatry reveals incest avoidance in a polygynous ungulate. Anim Behav 77:1085-1093

Loe LE, Mysterud A, Veiberg V, Langvatn R (2010) No evidence of juvenile body mass affecting dispersal in male red deer. J Zool 280:84-91

Lovell NC, Jurmain R, Kilgore L (2000) Skeletal evidence of probable treponemal infection in free-ranging African apes. Primates 41:275–290

Lüdecke D, Schwemmer C (2017) sjPlot: Data visualization for statistics in social science. http://strengejacke.de/sjPlot.

Lukas D, Clutton-Brock TH (2011) Group structure, kinship, inbreeding risk and habitual female dispersal in plural-breeding mammals. J Evol Biol 24:2624-2630

Maan ME, Van Rooijen AMC, Van Alphen JJM, Seehausen O (2008) Parasite-mediated sexual selection and species divergence in Lake Victoria cichlid fish. Biol J Linn Soc 94:53-60

Manly BB, McDonald L, Thomas D (2012) Resource selection by animals: statistical design and analysis for field studies. Springer Science & Business Media, New York

Marjamaeki PH, Contasti AL, Coulson TN, McLoughlin PD (2013) Local density and group size interacts with age and sex to determine direction and rate of social dispersal in a polygynous mammal. Ecol Evol 3:3073-3082

McCallum H, Jones M, Hawkins C, Hamede R, Lachish S, Sinn DL, Beeton N, Lazenby B (2009) Transmission dynamics of Tasmanian devil facial tumor disease may lead to disease-induced extinction. Ecology 90:3379-3392

McMahon CR, Bradshaw CJA (2004) Harem choice and breeding experience of female southern elephant seals influence offspring survival. Behav Ecol Sociobiol 55:349-362

Mitjà O, Asiedu K, Mabey D (2013) Yaws. Lancet 381:763-773

Monard AM, Duncan P (1996) Consequences of natal dispersal in female horses. Anim Behav 52:565-579

Monard AM, Duncan P, Boy V (1996) The proximate mechanisms of natal dispersal in female horses. Behaviour 133:1095-1124

Nunn CL, Thrall PH, Stewart K, Harcourt AH (2008) Emerging infectious diseases and animal social systems. Evol Ecol 22:519-543

Parnell RJ (2002) Group size and structure in western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Mbeli Bai, Republic of Congo. Am J Primatol 56:193-206

Pistorius PA, Bester MN, Kirkman SP, Taylor FE (2001) Temporal changes in fecundity and age at sexual maturity of southern elephant seals at Marion Island. Polar Biol 24:343-348

Poirotte C, Massol F, Herbert A, Willaume E, Bomo PM, Kappeler PM, Charpentier MJE (2017) Mandrills use olfaction to socially avoid parasitized conspecifics. Sci Adv 3:e1601721-e1601721

R: the R project for statistical computing. (2008) R Foundation for statistical computing. http://www.R-project.org.

Robbins AM, Gray M, Basabose A, Uwingeli P, Mburanumwe I, Kagoda E, Robbins MM (2013) Impact of male infanticide on the social structure of mountain gorillas. Plos One 8:e78256

Robbins AM, Robbins MM (2015) Dispersal patterns of females in the genus Gorilla. In: Furuichi T, Yamagiwa J, Aureli F (eds) Dispersing primate females - Life history and social strategies in male-philopatric species. Springer, Tokyo, pp 75-104

Robbins AM, Stoinski T, Fawcett K, Robbins MM (2009a) Leave or conceive: natal dispersal and philopatry of female mountain gorillas in the Virunga volcano region. Anim Behav 77:831-838

Robbins AM, Stoinski TS, Fawcett KA, Robbins MM (2009b) Does dispersal cause reproductive delays in female mountain gorillas? Behaviour 146:525-549

Rogers ME, Abernethy K, Bermejo M, Cipolletta C, Doran D, McFarland K, Nishihara T, Remis M, Tutin CEG (2004) Western gorilla diet: A synthesis from six sites. Am J Primatol 64:173-192

Sicotte P (2000) A case study of mother-son transfer in mountain gorillas. Primates 41:93-101

Sicotte P (2001) Female mate choice in mountain gorillas. In: Robbins MM, Sicotte P, Stewart KJ (eds) Mountain gorillas: three decades of research at Karisoke. Cambridge studies in biological and evolutionary anthropology, Cambridge, pp 59–88

Sicotte P, Teichroeb JA, Vayro JV, Fox SA, Badescu I, Wikberg EC (2017) The influence of male takeovers on female dispersal in Colobus vellerosus. Am J Primatol 79:e22436

Steenbeek R, van Schaik CP (2001) Competition and group size in Thomas's langurs (Presbytis thomasi): the folivore paradox revisited. Behav Ecol Sociobiol 49:100-110

Sterck EHM (1997) Determinants of female dispersal in Thomas langurs. Am J Primatol 42:179-198

Sterck EHM, Watts DP, Schaik van CP (1997) The evolution of female social relationships in nonhuman primates. Behav Ecol Sociobiol 41:291-309

Sterck EHM, Willems EP, van Hooff J, Wich SA (2005) Female dispersal, inbreeding avoidance and mate choice in Thomas langurs (Presbytis thomasi). Behaviour 142:845-868

Stokes EJ (2004) Within-group social relationships among females and adult males in wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Am J Primatol 64:233-246

Stokes EJ, Parnell RJ, Olejniczak C (2003) Female dispersal and reproductive success in wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Behav Ecol Sociobiol 54:329-339

Teichroeb JA, Wikberg EC, Sicotte P (2009) Female dispersal patterns in six groups of ursine colobus (Colobus vellerosus): infanticide avoidance is important. Behaviour 146:551-582

Tybur JM, Gangestad SW (2011) Mate preferences and infectious disease: theoretical considerations and evidence in humans. Philos Trans R Soc B-Biol Sci 366:3375-3388

VanVuren D (1996) Ectoparasites, fitness, and social behaviour of yellow-bellied marmots. Ethology 102:686-694

Watts DP (1985) Relations between group-size and composition and feeding competition in mountain gorilla groups. Anim Behav 33:72-85

Watts DP (1989) Infanticide in mountain gorillas - new cases and a reconsideration of the evidence. Ethology 81:1-18

Watts DP (1990) Ecology of gorillas and its relation to female transfer in mountain gorillas. Int J Primatol 11:21-45

Watts DP (1991) Harassment of immigrant female mountain gorillas by resident females. Ethology 89:135-153

Watts DP (1992) Social relationships of immigrant and resident female mountain gorillas. 1. male-female relationships. Am J Primatol 28:159-181

Watts DP (1994) Agonistic relationships between female mountains gorillas (Gorilla gorilla beringei). Behav Ecol Sociobiol 34:347-358

Watts DP (1998) Long-term habitat use by mountain gorillas (Gorilla gorilla beringei). 2. Reuse of foraging areas in relation to resource abundance, quality, and depletion. Int J Primatol 19:681-702

Yamagiwa J, Kahekwa J, Basabose AK (2009) Infanticide and social flexibility in the genus Gorilla. Primates 50:293-303

Zobaníková M, Strouhal M, Mikalová L, et al (2013) Whole genome sequence of the treponema Fribourg-Blanc: unspecified simian isolate is highly similar to the yaws subspecies. PLoS Negl Trop Dis 7:e2172

Chapitre 3

Résumé du chapitre 3

Les catastrophes démographiques sont considérées comme des effondrements démographiques (ou « *die-offs* ») lorsque une augmentation du taux de mortalité de 25% est observée (Young 1994; Ameca y Juarez et al. 2012). On parle « d'évènement de mortalité de masse » (EMM) lorsque plus de 90% des individus disparaissent sur une courte période (Fey et al. 2015). Les causes connues des EMM en milieu naturel sont multiples : pathogènes, climat, perturbation humaine, ou biotoxicité. Les conséquences de tels évènements vont dépendre des caractéristiques de l'espèce affectée, comme sa taille corporelle, sa plasticité alimentaire, ses capacités de dispersion ainsi que son écologie sociale (Ameca y Juarez et al. 2012). Mais la difficulté d'obtenir des informations sur le long terme, avec un suivi pré et post perturbation résulte en relativement peu d'études sur le comportement des populations face à ces évènements.

En République du Congo, la population de gorille des plaines de l'ouest de Lokoué a subi une épidémie à virus Ebola, impliquant la disparition de 95% des individus dans une période de 6 mois (Caillaud et al. 2006). Les populations de cette espèce polygyne sont composées de groupes reproducteurs incluant un mâle reproducteur (le dos argenté), plusieurs femelles adultes ainsi que leurs descendants. Environ 42% des dos argentés vivent en groupes non reproducteurs ou sont solitaires (Gatti et al. 2004). Les femelles arrivées à l'âge adulte quittent leur groupe natal pour éviter la reproduction avec leur père (Clutton-Brock 1989). Elles peuvent ensuite disperser secondairement entre différents groupes reproducteurs. L'évènement de mortalité massive a modifié la structure de la population à court terme par la disparition des groupes reproducteurs et donc des femelles adultes et des immatures (Caillaud et al. 2006). Sur le long terme, la population retrouve une structure sociale stable, similaire à celle observée avant l'épidémie mais avec une taille de population fortement réduite (Genton et al. 2015).

Le suivi à long terme de la population de Lokoué représente une opportunité rare d'étudier l'impact d'un EMM sur la dynamique sociale de la population, la dispersion ou les stratégies d'appariement. En lien avec le chapitre 2 de cette thèse, nous avons observé les modifications des modalités d'émigration et d'immigration des femelles adultes, dans une population perturbée.

Cette étude est basée sur des observations à long terme (15 ans) d'une population de gorille des plaines de l'ouest au sein du parc National d'Odzala-Kokoua. Les gorilles sont identifiés individuellement et assignés à un sexe, une classe d'âge, et un groupe social. L'âge des groupes reproducteurs a été défini selon leur composition : naissant, enfant, juvénile, mature, sénescent (Parnell 2002). A chaque observation, les femelles adultes sont catégorisées comme résidentes (si appartenant à la même unité sociale lors de la dernière observation), immigrantes ou émigrantes.

Les facteurs influençant l'émigration ont été étudiés à l'aide d'un modèle linaire généralisé avec le statut de la femelle comme variable réponse. Les variables explicatives sont la période (pre-ebola, post-Ebola court terme, post-Ebola long terme) et son interaction avec la taille du groupe au carré, l'âge du groupe reproducteur, le niveau d'infection par une maladie de peau du dos argenté, et la proportion d'individus fortement ou faiblement infectés par cette maladie dans le groupe. Le choix du groupe reproducteur intégré par les femelles adultes a été analysé à l'aide d'un indice de Manly (type III). Nous avons pu tester l'influence du type d'unité sociale, de l'âge du groupe, du nombre de femelles adultes, de l'intensité de la maladie de peau sur le dos argenté et dans le groupe.

A court terme après l'épidémie, la probabilité d'émigrer des femelles est plus forte, reflétant probablement une nécessité de meilleure protection que dans leur groupe initial. Cet effet peut aussi exprimer la recherche d'un partenaire reproducteur de bonne qualité dans une population à faible effectifs et un choix de partenaires restreint. Il est intéressant de noter que les femelles survivant à Ebola ont tout de même quitté la population, soit pour éviter une possible contamination, soit en recherche d'un mâle reproducteur dans les populations voisines. Cependant, à long terme après l'épidémie, la population de Lokoué semble attractive pour les populations avoisinantes puisque l'on observe un plus grand nombre de femelles immigrantes qu'émigrantes. D'après les connaissances de la région, les populations voisines sont suspectées d'avoir subies la même épidémie (WCS 2009; Genton et al. 2012), mais les conséquences y ont peut-être été moins importantes. Les immigrantes peuvent voir en la clairière de Lokoué une possibilité de réduire les pressions de compétition, mais également de trouver des mâles reproducteurs de qualité qui ont maturés pendant l'épidémie.

A court terme après l'épidémie, le taux d'émigration des femelles au sein de la population décroit avec la taille du groupe. Nous émettons l'hypothèse que les mâles survivants possèdent des avantages sélectifs, incitant les femelles à rester avec eux. La préférence pour des groupes reproducteurs jeunes observée dans le chapitre 2 de cette thèse est retrouvée sur toute la période

d'étude. Cependant, à court terme après l'épidémie, certaines femelles rejoignent des groupes naissants de manière transitoire, en attendant de trouver un meilleur partenaire reproducteur.

Comparativement à la période pré-Ebola, le nombre de mâles reproducteurs disponibles est fortement réduit. Cependant, les patrons de décisions d'immigration sont les mêmes, quelle que soit la période considérée. Les femelles rejoignent préférentiellement des groupes reproducteurs plutôt que des mâles solitaires. La proportion d'individus fortement affectés par la maladie de peau influence négativement le choix des femelles lors de l'immigration. Pourtant, cet effet est moins fort après l'épidémie, avec un mâle fortement infecté formant malgré tout un nouveau groupe reproducteur avec deux femelles adultes. Les autres caractéristiques du dos argentés prévalent peut-être sur son statut infectieux après une perturbation.

Chapitre 3 : Changes in social dispersal of adult females in western lowland gorillas after a demographic crash

Alice Baudouin[1], Sylvain Gatti[1], Florence Levréro[2], Céline Genton[1], Romane Cristescu[3], Peggy Motsch[4], Pascaline Le Gouar[1], Nelly Ménard[1]

[1] UMR 6553, ECOBIO: Ecosystems, Biodiversity, Evolution, CNRS/University of Rennes 1, Biological Station of Paimpont, Paimpont, France,

[2] Université de Saint-Etienne/Lyon, Equipe de Neuro-Ethologie Sensorielle, Neuro-PSI, CNRS UMR 9197, Saint-Etienne, France,

[3] GeneCology, Faculty of Science, Health, Education and Engineering, University of the Sunshine Coast, Sippy Downs, QLD, Australia,

[4] Odzala_Kokoua National Park, African Parks Networks, Mbomo, Republic of Congo

Corresponding author: Alice Baudouin, UMR 6553, ECOBIO: Ecosystems, Biodiversity, Evolution, CNRS/University of Rennes 1, Biological Station of Paimpont, Paimpont, France, Tel.: 33(2)99618170, alice.baudouin@univ-rennes1.fr

I Introduction

Demographic catastrophic events are considered as “population die-offs” with an increase in individual losses of at least 25% in comparison to the annual average mortality rate (Young 1994; Ameca y Juarez et al. 2012) or “Mass Mortality Events” (MME) that affect all individual categories and remove more than 90% of population in a short period of time (Fey et al. 2015). The first causes of MME are diseases (26.3%, Fey et al., 2015). MME due to diseases can be linked to viral or fungal pathogens, or infectious cancer, and have been documented in an increasing number of taxa *i.e. Chytridiomycosis* and *Ranavirosis* in amphibians (Daszak et al. 1999; Green et al. 2002), White-Nose syndrome in bats (Blehert et al. 2009), Devil facial tumour disease in Tasmanian Devils *Sarcophilus harrisii* (Lachish et al. 2007), Ebola virus in great apes (Walsh et al. 2003; Bermejo et al. 2006; Caillaud et al. 2006). Other causes of MME are climate-related processes like weather inducing catastrophic fire in elephant population (Woolley et al. 2008), violent rainstorm in feral horses (Scorolli et al. 2006), thermal stress or starvation (Young 1994), such as important drought in elephant population, accounted collectively for 24.7% of known mass mortality events (Fey et al. 2015). Mass mortality events are also frequently linked to human perturbation (19.3%) or biotoxicity (15.6%) like for blue-green algal intoxication of bats (Pybus et al. 1986) and sheep mortality associated with cyanobactrium (Negri et al. 1995).

Consequences of population die-offs, in terms of extinction risks, will depend on species characteristics like body mass, diet breadth and dispersal capacity but also on their social ecology (Ameca y Juarez et al. 2012). For example, populations of long-lived species with large body size and low reproductive rates would be more likely exposed at extinction risks than species with fast maturation and high reproductive rates (Davidson et al. 2009). In addition to changes in size and density of populations, disturbance events may deeply affect their age structure (Lachish et al. 2009), leading to behavioral responses by animals that may involve changes in dispersal and/or mate choice patterns (Lachish et al. 2011). However, the difficulties in obtaining data over the long-term both before and after a catastrophic event have resulted in a relatively few studies. The European common frog (*Rana temporaria*) infected by a lethal viral pathogen (*Ranavirus*) showed changes in its mating systems towards an assortative mate choice that suggests a MHC involvement. Such behavioral changes limit the inbreeding effect of the disturbance despite a loss of genetic variation (Teacher et al.

2009b; Teacher et al. 2009a; Campbell et al. 2017). In social species, the disappearance of key individuals from social groups may disrupt social relationships and create social instability [*e.g.* in Long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) after a strong mortality event of adult females (Brotcorne et al. 2015). In elephants, a catastrophic fire that caused 18% mortality, predominantly juveniles, and therefore modified the age structure of the studied population induced high stress level and social rearrangements with herd fusions (Woolley et al. 2008). After years of population decline, the newly formed groups may encounter more favorable conditions with less competition and could act as sources and colonize empty habitat patches. One well studied species is the diseased population of Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*) that lost more than 85% of individuals due to facial tumor (Lachish et al. 2011). Subsequently to this mass mortality event, females did not disperse as far or as often compared to healthy populations. Whereas inbreeding coefficient and effective population size did not differ from a non-diseased population, significant changes in gene flow following population decline contributed to maintain genetic diversity in disease-affected areas (Brüniche-Olsen et al. 2013).

In the Republic of Congo, the western lowland gorilla population of Lokoué underwent an Ebola outbreak resulting in a die-offs of more than 95% of individuals within a 6-months period of time (Caillaud et al. 2006). In this polygynous species, populations are structured in one-male breeding units led by a dominant adult male (silverback) with several adult females and their offspring. About 42% of the silverbacks live as solitary or in non-breeding groups (Gatti et al. 2004). Both sexes disperse at maturity. Females disperse from their natal unit to avoid reproducing with their father (Clutton-Brock 1989). They subsequently experience several secondary dispersal events (Stokes et al. 2003). Short-term after the massive mortality event, the demographic structure of the population was highly disturbed because of the disappearance of almost all breeding units, therefore mainly adult females and immature individuals (Caillaud et al. 2006). Two years after the outbreak, the population still showed a weak proportion of group-living individuals, small breeding-group sizes and a small number of adult females per breeding-group (Genton et al. 2012). Six years after the outbreak, demographic and most of social dynamics parameters were comparable to those of the pre-epidemic period, indicating a recovery process, although slow (Genton et al. 2015). However, despite the formation of new breeding groups, the lack of compensatory immigration from surrounding areas maintained a reduced population size, even ten years after the outbreak (Genton et al. 2015; Genton et al. 2017). Two years after Ebola outbreak, breeding groups showed a great instability with groups

disbanding and short tenure of silverbacks. Unexpectedly, a silverback formed a temporary second breeding group just after the outbreak period. Six years after, the newly-formed breeding groups included mostly immigrant females whereas most survival unmated males emigrated, which was not compensated by immigrants (Genton et al. 2012).

The long term monitoring of the Lokoué gorilla population represents a rare opportunity to study the impact of a massive mortality event on processes driving population dynamics such as dispersal and reproductive strategies in a socially structured species. Our study aims to investigate whether and to what extent a mass mortality in a gorilla population does affect dispersal and mating patterns. In undisturbed gorilla populations, emigration is driven by breeding group size and age (chapter 2, this thesis). Adult females more likely emigrated from breeding groups including around ten individuals and from groups older than infant (*census* Parnell 2002). Females more likely immigrate in small nascent groups while they avoid groups with a great proportion of yaw-diseased individuals (chapter 2, this thesis). We examined the availability of sexual partners and breeding units for adult females in the short and long term post-Ebola periods. Then, considering the prevalence of yaw skin disease in the Lokoué population in the pre-Ebola period (Levréro et al. 2007) and its influence in the dispersal patterns of females (chapter 2, this thesis), we investigated the changes in the yaw status of the population after the Ebola outbreak. We examined whether the pre-Ebola undisturbed dispersal patterns differed from that of the short and long-term post-Ebola periods or not. Indeed, Ebola outbreak resulted in reduced breeding group sizes and number of adult females (Genton et al. 2017). In addition, as the population was in a recovery process, we suppose that breeding group ages should be in favor of young groups rather than senescent groups (*census* Parnell, 2002). Finally, the Ebola outbreak may have modified the proportion of individuals affected by skin disease, in breeding groups or among silverbacks. Therefore, we expect that these changes in population composition in the post-Ebola periods influenced the types of breeding units and silverback quality adult females were able to join or stay with.

II Materiel and Methods

a) Study site and population

Demographic data were collected from the salt clearings of Lokoué, (00°54'23''N, 15°10'33''E) in the Odzala-Kokoua National Park (Republic of Congo). We observed gorillas from platforms located at the edge of the clearings, using a Kowa spotting scope (20x60), and either a video camera (Sony Handycam Digital 8 DCR-TRV 620E) or a camera (Canon EOS 40D digital camera equipped with a 600 mm lens and a Teleplus 2X converter). We monitored the Lokoué population for 15 years (2001-2015), which underwent a demographic crash between December 2003 to July 2004 suspected to have been caused by an Ebola outbreak (Caillaud et al. 2006). We distinguished three periods of observations: the pre-epidemic period from (2001-2003), the short-term post-epidemic period (2004-2006), the long-term post-epidemic period (2008-2013) with two interruptions between June 2006-May 2008 and May 2010-December 2012 (see details in Table S1). We excluded the period of huge demographic disturbance from this study.

Data set is based on individual identification of each gorilla using a combination of body features: physical handicaps, hair color pattern, general body shape, scars, wounds, face shape and noseprints. Photos and films were archived and were used to compare gorilla identification between different visiting periods (Table S1). The sex and age-class of each individual were determined according to physical characteristics and behavior (Gatti et al. 2004; Breuer et al. 2009) as follows: infants (≤ 4 years old), juveniles (4 to 7.5 years old), subadults (7.5 to 10 years old for females, 7.5 to 11 years old for males), blackbacks (11- to 14-year-old males), adult females (≥ 10 years old) and silverbacks (≥ 14-year-old males). Sexing immature individuals (infants, juveniles and subadults) is difficult due to their inconspicuous genitals and low sexual dimorphism; however, sexing was occasionally possible when they bent down to lick the soil. We differentiated nulliparous females, which have never been observed with an infant and have non-elongated nipples and undeveloped breasts, from parous females, which have elongated nipples (Breuer et al., 2009). We describe the skin disease intensity for each observed individual (0: no clinical sign; 1: weak intensity, *i.e.* visible signs of skin disease but healed; 2: severely diseased).

Gorilla social units were categorized as breeding units (including adults of both sexes), non-breeding units (without any adult female and typically composed of immature individuals), and solitary

males (Gatti et al. 2004; Levréro et al. 2006). For the purpose of the study, we only took into account the solitary silverbacks, excluding the solitary blackback males because we assume that they are not target of immigrant females. We recorded the size and composition of each social unit visiting the clearings. According to Parnell (2002), we categorized breeding unit ages as “nascent” (one silverback + one or more adult females without an offspring), “infant” (one silverback + adult females with infants), “juvenile” (one silverback + several adult females and offspring up to juveniles), “mature” (one silverback + adult females and offspring up to subadults), “senescent” (one silverback, adult females and several cohorts of offspring from infants to blackbacks).

b) Dispersal status of adult females

At each observation of a social unit we recorded changes, if any, in the composition in adult females. We then categorized each adult female according to her dispersal status in a given year as follows: i) resident female: an adult female that has belonged to the same breeding unit so far; ii) emigrating female: an adult female that has left her breeding unit; iii) immigrating female: a new adult female in a unit. We used the term “transfer event” when we knew both the original and target units of the dispersing female. Females not observed again after emigrating were considered as having emigrated out of the population or into an unknown unit. We could not differentiate them from those who died, but none of them showed evidence of a bad health condition. Females not known within the population before they immigrated were considered to have immigrated from a neighboring population.

c) Analyses of emigration pattern

In order to study if the factors influencing the emigration of adult females changes among periods we used general linear mixed model function *(GLMM*, binomial family, *glmer* function, lme4 R-package, (Bates et al. 2014) with the response variable being the emigration status of the female, either emigrant or resident in a given year. The explanatories variables were the period considered (pre-Ebola, post-Ebola short-term and post-Ebola long-term) and all its interactions with breeding unit size, squared breeding unit size (for quadratic effect), with the breeding-unit age, with the level of skin

disease on the silverback, with the total proportion of individual infected with skin disease, with the proportion of individuals weakly and highly infected by skin disease. First, we used automated model selection (Burnham and Anderson 2003) on the *GLMM* with all explanatory variables (*dredge* function, MUMin R-package, Barton 2009)). The identity of the breeding unit and the year were added as random effects to avoid pseudoreplication effect. Then, we investigate the multicollinearity between variables using the Variance Inflation Factors (VIFs) for the saturated model (Fox and Monette 1992). We excluded all models that included explanatory variables with VIF > 10 (Kennedy 2003). All remaining model with ΔAICc < 2 from the best model were considered equally plausible for explaining variations in the emigration status of females. Finally, we used type III ANOVA (car R package, Fox 2002) to test significance of variables included in bests models, and model averaging to estimate their relative importance (*model.avg* function, MUMin R package).

d) Analyses of immigration pattern

We analyze the number and quality of silverbacks (intensity of skin disease) and the characteristics of units (the unit type, the age of breeding units, the number of adult females within breeding units) to specify unit and silverback availability within Lokoué population for immigrant females in the three periods.

We then tested the choice of unit made by immigrating females using a Manly standardized selection ratio [*widesIII* function, adehabitatHS R package (Manly et al. 2012)] which computes the probability that an individual will use a particular resource, taking into account all the different available resources. Manly's indices were calculated pooling data from the three periods. Indices higher than 1 indicated preferences whereas indices lower than 1 indicated avoidance. We tested the significance of the observed distribution under a null hypothesis of a random choice using the log-likelihood statistic (Manly et al. 2012) for each of the following factors: social unit category, breeding unit age, number of adult females in gorilla units (5 categories: 1 or 2 adult females, 3-4, 5-6, 7-8, >=9), proportion of severely diseased individuals in units (3 categories: 0%, 1-50%, > 50%), and intensity of skin disease on silverbacks.

III Results

a) Gorilla units

During the 15 years of observation of Lokoué's population 51 different breeding units were identified, 34 solitary silverbacks and 6 non breeding units. We observed 76 different silverbacks, either solitary or unit leaders. The number of unit observed per year was variable, but in the two post-Ebola periods it is reduced by up to six times compared to the pre-Ebola period (Tab 1). Breeding units at Lokoué included pre-Ebola 9.7 (3-20), post-Ebola short-term 4.3 (2-6), post-Ebola long-term 8.6 (2-14) individuals on average, and 4.7 (1-11), 2.4 (1-3) and 3.8 (1-6) adult females, respectively. We identified 177 different adult females over the whole period, 153 in the pre-Ebola period, 12 in the post-Ebola short-term and 20 in the post-Ebola long-term. Only six of the females identified in the pre-Ebola period were still observed in the short-term post-Ebola period. We observed 64 different silverback males in the pre-Ebola period. Twelve of the 18 silverbacks identified in the post-Ebola periods were know in the pre-Ebola period, either as silverback (6) or as immature males (6). The six others had immigrated within the population, either as solitary or in a non-breeding unit (4), or as a leader of an already formed breeding unit (2) (Tab 2).

Table 1. Number of the different unit types during the three studied periods.

Unit type	Pre-Ebola period	Post-Ebola short-term	Post-Ebola long-term
Breeding groups	40	3	6
Non-breeding groups	4	0	1
Solitary silverbacks	20	8	6
Total	**64**	**11**	**13**

A total of 186 adult females were identified at Lokoué. Among them, 34 females emigrated from their breeding unit, while 152 females were resident over the whole study period at Lokoué. We also observed 38 females immigrating into breeding units, and 7 females joining a silverback previously observed as solitary.

The percentage of skin-diseased individuals in breeding groups did not significantly differ depending on the period (15.8%, N = 406 in pre-Ebola; 17.9%, N = 28 in short-term post-Ebola; 22.4%, N = 49 in long-term post-Ebola, chisq = 1.45, p = 0.48). Among the breeding groups identified 55.6% (N = 45) have included skin diseased individuals in a varying proportion in the pre-Ebola period, 57.1% (N = 7) in the short-term period and 83.3% (N = 6) in the long-term period.

The proportion of silverbacks that suffered from skin disease at a varying intensity did not differ between periods (22%, N = 64 in pre-Ebola; 18%, N = 11 in short-term post-Ebola; 15%, N = 13 in long-term post-Ebola; chisq = 0.319, p = 0.852).

Table 2 Available silverback males within Lokoué population depending on the period, and the history of their status. BG stands for breeding group and NBG non-breeding group. Status in italic indicates immature males that were not considered as target for immigrant females.

Male name	**Periods**		
	Pre-Ebola	**Short-term post-Ebola**	**Long-term post-Ebola**
Achille	*Blackback in BG*	Solitary silverback	Leader of BG
Arthur	*Solitary blackback*	Leader of BG	Leader of BG
Bangwetu	Solitary silverback	Leader of BG	Solitary silverback
Diyo	Leader of BG, disbanding, then in NBG	Leader of BG, then solitary	Solitary silverback
Gromit	*Solitary blackback*	Solitary silverback	Leader of BG
Merlin	Solitary silverback	Leader of BG	Solitary silverback
Moebus	*Blackback in NBG*	*Solitary blackback*	Leader of BG
Obella	*Blackback in NBG*	*Solitary blackback*	Solitary silverback
Ishi	Solitary silverback, then leader of BG	Leader of BG	BG disappeared
Flamingo	Leader of BG, then solitary silverback	Solitary silverback	disappeared
Rodin	Leader of BG	Leader of BG	BG disappeared
Minimee	*Blackback in NBG*	Solitary silverback	disappeared
64 other silverbacks	46 solitaries or in NBG, 19 leader of BG	disappeared	/
Marcel	/	Leader of BG	BG disappeared
Seb	/	*Blackback in NBG*	Solitary silverback
Hercule	/	/	In NBG
Malembe	/	/	Leader of BG, then solitary
Robin02	/	/	Solitary silverback
Paps	/	/	Leader of BG

b) Factors influencing female emigration

Among the 177 females, 33 emigrated at least once from their breeding unit, while 144 females were resident over the whole study period. Three females emigrated twice. We recorded 417 female-year observations during the study period, 36 observations of emigrating females and 381 events of residency.

Among the best models, when accounting for multicollinearity issues, we obtained three equivalent models that explain emigration probability of adult females (ΔAICc < 2). They included the Ebola period, the interaction between period and squared breeding unit size, the interaction between period and age of unit, and the interaction between period and proportion of severely or weakly diseased individuals within the breeding unit (Tab. 3). Emigration probability was higher in the Ebola short-term than in the other periods (Fig. 1). Relationship between emigration probability and squared unit size was significant for the pre-Ebola and short-term after periods (Fig. 2a,b). A deep negative relationship was detected in Ebola short-term whereas a peak of emigration around medium size was detected for the pre-Ebola period (Fig. 2a). Interaction with age of unit was mainly explained by absence of mature and senescent group in the short-term period.

Table 3 Best general linear mixed models (ΔAICc<2) estimating the effects of periods and breeding units as factors of the probability of female emigration in the Lokoué population. Estimates of each effect are presented with a + sign for discrete variables. Stars indicate significant values with ANOVA error type II.

		Interaction of Ebola period with							
	Ebola period	Squared unit size	Unit age[1]	Weakly diseased individual[2]	Severely diseased individual[2]	Df[3]	AICc	Δ AICc	Weight[4]
	+	+	+			16	227.1	0	0.11
	+	+	+	+		19	228.9	1.8	0.04
	+	+			+	11	229.0	1.9	0.04
Relative importance	**1**	**1**	**0.79**	0.29	0.21				

[1]: Age of breeding units: nascent, infant, juvenile, mature, senescent.

[2]: Proportion of weakly or severely diseased individuals in initial breeding units.

[3]: Degree of freedom.

[4]: Weight of the model calculated on all possible models.

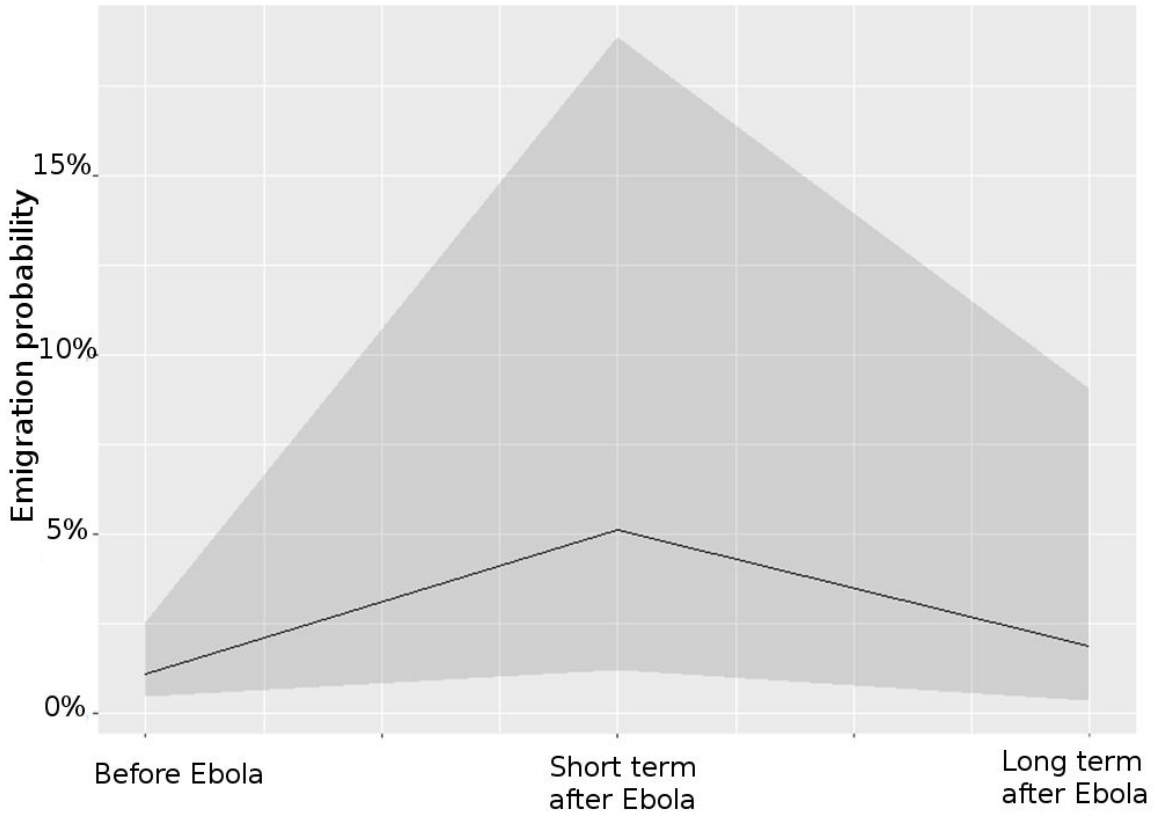


Figure 1 Marginal effect of the study periods on the emigration probability of adult females

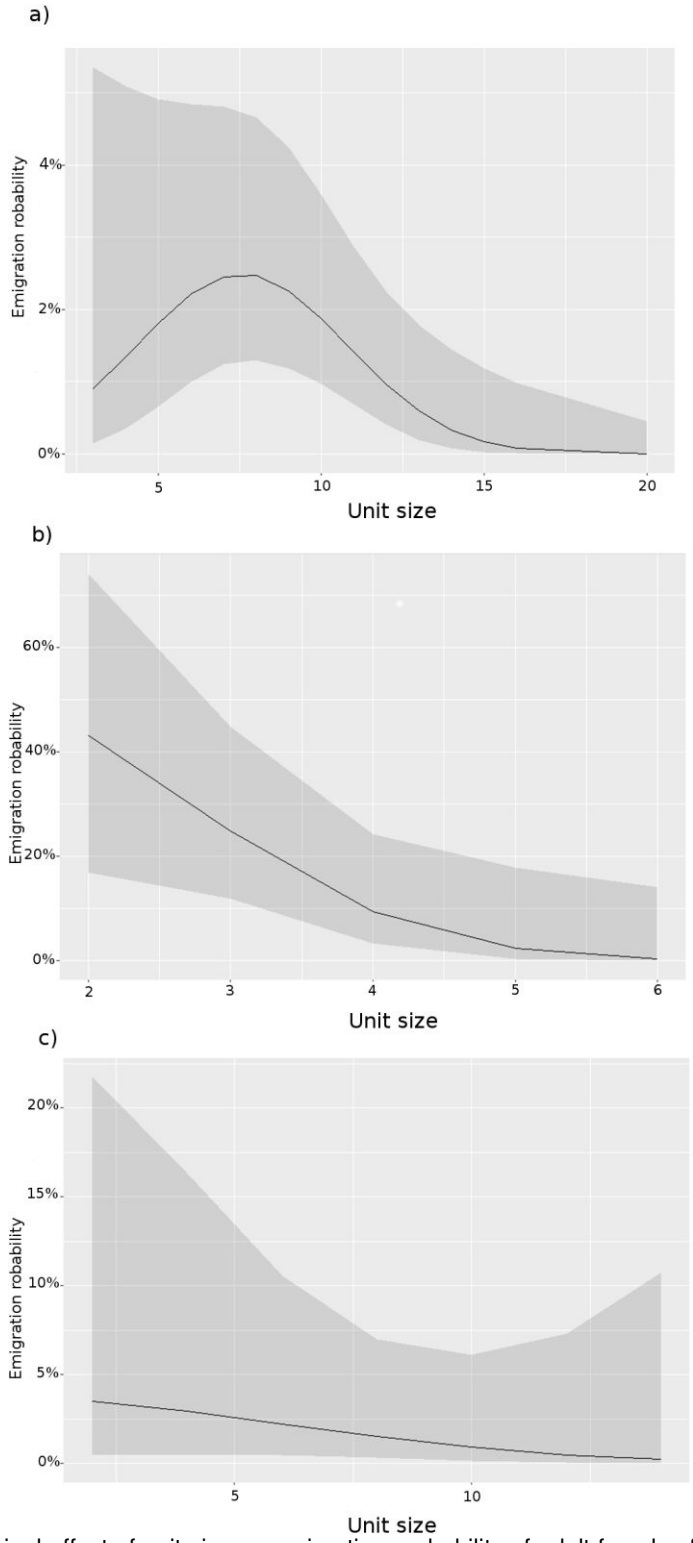


Figure 2 Marginal effect of unit size on emigration probability of adult females for a) before Ebola period, b) short term after Ebola and c) long term after Ebola

c) Factors influencing female immigration

We observed 46 female immigration events during the whole study period, 26 in the pre-Ebola period, 6 in the Ebola short-term and 14 in the Ebola long-term.

Manly's index analysis, which explicitly tests selection choice, confirmed that females immigrated preferentially into breeding units (Wi = 1.45, 95% CI = 1.24- 1.67) whereas they avoided solitary silverbacks (Wi = 0.44, 95% CI = 0.16-0.75, Fig. 3a). 23 of the 26 immigrant females joined breeding units (Tab. 4). They significantly selected nascent breeding units (Wi = 2.15, 95% CI = 1.07-3.02, Fig. 3b, Tab. 4). They significantly preferred groups with no individuals showing sign of disease (Wi = 1.32, 95% CI = 1.09-1.54) whereas they significantly avoided units with individuals showing severe signs of skin disease (Wi = -0.43, 95% CI = 0.003-0.86, Fig. 3c, Tab. 4). There was no significant effect of the stage of the silverback's skin disease neither of the number of adult females on the immigration choice of females (Tab 4).

Table 4 The number of immigrant females and, in parenthesis, the numbers of availabilities of the different categories in the three periods.

		Pre-Ebola period	Post-Ebola short-term	Post-Ebola long-term
Unit type	Breeding groups	23 (98)	4 (9)	11 (11)
	Solitary	3 (57)	2 (8)	3 (14)
Age of unit	Nascent	8 (8)	3 (5)	7 (4)
	Infant	15 (53)	1 (3)	4 (3)
	Juvenile	0 (19)	0 (1)	0 (3)
	Mature	0 (9)	0 (0)	0 (1)
	Senescent	0 (9)	0 (0)	0 (0)
Number of adult females	1-2	7 (33)	4 (7)	6 (5)
	3-4	7 (37)	0 (2)	4 (5)
	5-6	5 (22)	0 (0)	1 (1)
	7-8	2 (4)	0 (0)	0 (0)
	>=9	2 (2)	0 (0)	0 (0)
Proportion of diseased individuals	0%	11 (42)	3 (5)	7 (5)
	1-50%	10 (44)	0 (1)	3 (4)
	>=50%	2 (12)	1 (3)	1 (2)
Silverbacks skin disease	Severely diseased	4 (22)	0 (0)	0 (1)
	Weakly diseased	3 (8)	2 (3)	0 (3)
	Non diseased	19 (125)	4 (14)	14 (18)

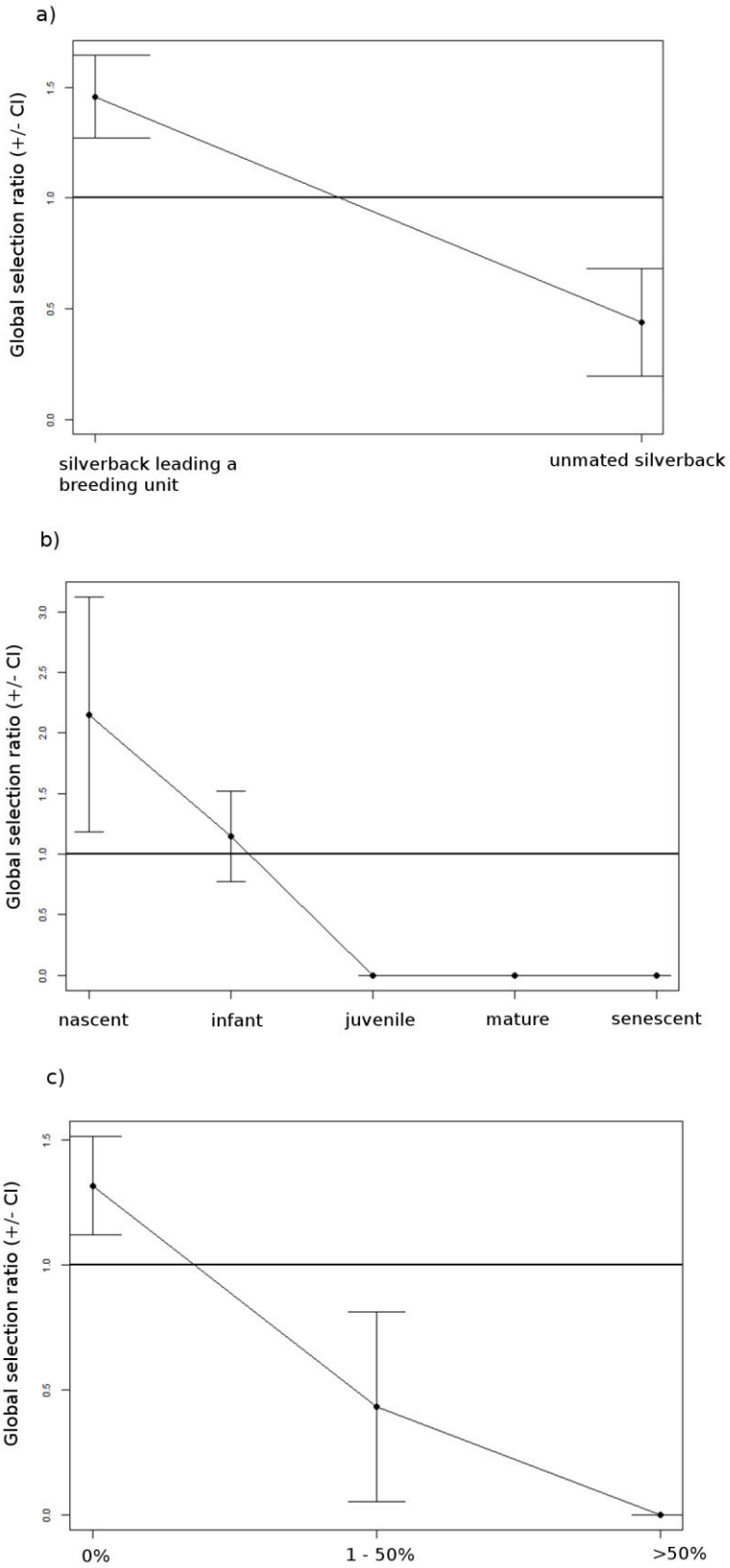


Figure 3 Manly selectivity index for unit type (a), unit age (b) and proportion of severely diseased individuals within the unit (c)

In the short-term and long-term post-Ebola periods, females had a limited choice on the type of unit or silverback they could join because of the disappearance of numerous individuals and the relatively recent formation of new breeding groups after the demographic crash due to Ebola outbreak.

In the short-term post-Ebola period, two females joined two solitary males (Arthur and Marcel) among the eight available (Tab. 2). The six other solitary silverbacks remained as solitary males. Three of the four remaining immigrant females joined the two newly-formed units while the fourth joined Merlin' breeding group that had been formed during the Ebola episode. In the long-term post-Ebola, three out of the 14 immigrant females joined three solitary silverbacks (Achille, Gromit and Moebus). The remaining 11 immigrant females joined either those three newly-formed groups (10) or the Arthur's group formed in the short-term post-Ebola (1). Nine of the 13 available units/silverbacks have never been target of immigrant females. Owing to the decrease in the number of skin-diseased silverbacks after the Ebola period, we could not test the influence of this parameter on female choice. Nevertheless, over the whole post-Ebola period, most of the 20 post-Ebola immigrant females joined non-diseased males. Only two joined the same diseased male (Marcel) in the short-term post-Ebola period. Among the 18 available silverbacks, only six were target males for immigrant females. Four of these six males had matured within Lokoué population and were fully mature young silverbacks of an estimated age of 15 (Arthur), 16 (Moebus), and 18 years (Achille, Gromit) when they formed their first breeding groups. One other (Merlin) was known as a silverback since 2001, formed a breeding group shortly after the Ebola outbreak and its tenure lasted less than 1.5 years when it disbanded. This silverback looked quite old and skinny. Among the 12 never choosen silverbacks, five were already known as solitary silverback and/or leader of breeding groups at the beginning of the study, and two have had at least five years tenure. Two silverbacks were blackbacks in the pre-Ebola period, either as solitary or in non-breeding groups and had an estimated age of 15 (Obella, Minimee) in 2005. One of them was severely affected by skin disease. We did not know the history of the silverbacks of two breeding groups, one non breeding group and two solitary silverbacks that immigrated from neighboring populations. On the whole 19 females immigrated from neighboring population during the post-Ebola periods, 16 joining Lokoué resident silverbacks while three others arrived with already constituted breeding groups.

d) Transfers within Lokoué population and dispersal between Lokoué and surrounding populations

We recorded 11 transfer events, 6 during the pre-Ebola period and 5 during the post-Ebola period. During the pre-Ebola period, most transfers (n = 4) occurred from a mature or senescent breeding unit towards a solitary silverback, or a nascent or infant breeding unit. On the contrary, in the post-Ebola periods as a whole, in most transfers (n = 4), females left a nascent breeding unit to join a solitary silverback or another nascent unit. Their initial breeding units were formed in the very short-term after the Ebola outbreak with three silverbacks (Bangwetu, Merlin, Diyo, but see Tab. 2). Those silverbacks were observed as solitary in the pre-Ebola period and seemed quite old. One of them (Diyo, Tab. 2) was leader of a breeding unit in the pre-Ebola period and was experimenting a second and very short tenure in the short-term post-Ebola.

On the whole study period 27 females emigrated out of Lokoué population, 20 during the pre-Ebola period, 4 during the short-term post-Ebola period, 3 during the long-term post-Ebola period. On another side 28 females immigrated into it, 22 during the pre-Ebola period, 2 during the short-term post-Ebola period, 14 during long-term post-Ebola period.

IV Discussion

As previously shown (Genton et al. 2017) the population size, the numbers of the different units, and the number of adult females in breeding units at Lokoué remained very low in the post-Ebola period, even ten years after the outbreak. The proportion of skin-diseased individuals in breeding groups and that of skin-diseased silverbacks did not differ between periods. Whatever the period, females preferentially choose breeding units affected the less by skin-diseases while they avoided severely affected units. Compared to the pre-Ebola period, silverback and breeding unit availabilities have been dramatically reduced in the two post Ebola periods.

Shortly after the epidemic, the female emigration's probability is higher compared to other periods reflecting the social instability previously highlighted in this population (Genton et al. 2015). This effect can be explained by the need to find reproductive partner. One of the effects of the Ebola outbreak was the reduction of the availability of sexual partners for females. The high emigration probability in the short term period could reflect the difficulty for females to find a suitable partner.

Some of them remained during a short period of time with males that were quite old or in a second tenure, without reproducing, therefore probably searching more for a protective than a reproductive silverback. They may emigrate out of the population in search of a sexual partner with which to reproduce. Alternatively, but not exclusively, females that have survived to the Ebola outbreak could have perceived a risk of disease contamination because they have been in proximity with diseased, subsequently died, unit members. Therefore, we can suggest that they behave to avoid such stressing situation, emigrating toward neighboring regions. In fact, most females that survived to the Ebola outbreak period left the Lokoué population. Behavioral social avoidance of diseased individuals has rarely been showed in wild populations (Behringer et al. 2006; Poirotte et al. 2017). In bullfrogs or mandrills for example, the use of chemicals cues in the environment (Kiesecker et al. 1999; Behringer et al. 2006) or in the feces (Poirotte et al. 2017) have promoted emigration toward healthier populations.

After the Ebola epidemics, the Lokoué population seems to be attractive for females of neighboring populations. Indeed, during the post-Ebola periods, more adult females immigrated into Lokoué population compared to females that emigrated out of it. According to information about gorilla populations in Odzala-Kokoua region, we suspect that neighboring populations had also suffered from Ebola outbreak (WCS 2009; Genton et al. 2012). However, they may have less suffered from Ebola epidemics, or the outbreak has resulted in a different age/sex structure of population compared to Lokoué, with a better survival of females. The immigrant females can join the Lokoué population as an opportunity to reduce the pressure of competition for access to few suitable mating partners. In addition, in the post-Ebola long term period, several resident males at Lokoué have matured as young silverbacks that can be very attractive for foreign females. Indeed, breeding group formation with the immigrant females and those young silverbacks remained relatively stable during the long-term post-Ebola period, showing the classical development of maturing breeding units. Alternatively, the Lokoué clearing could retain some attractive specificities compared to other ones around. However, the persistent decrease of the visiting rate of the clearing by gorillas does not seem to support this hypothesis.

Male and females of western lowland gorillas both have to disperse once they reached sexual maturity. However, little is known about intersexual differences of dispersal pattern in this species. After the epidemic, there were only five silverbacks immigrating into this population, whereas there

were a total of 16 new adult females. This could indicate that males are more prone to be philopatric than females who would emigrate further than males, as already suggested in another population (Bradley et al. 2004). This is in opposition with the findings of further dispersal of males compared to females in mountain gorillas (Roy et al. 2014) and western lowland gorillas based on studies on sex-related genetic markers (Douadi et al. 2007). Females' mountain gorillas mostly dispersed between spatially close groups and males frequently dispersed with females from their natal breeding group (Stoinski et al. 2009). Differences in dispersal patterns between gorilla populations may be conditioned to demographic disturbances due to historical events such as disease occurrences. Further studies on different populations in different environmental contexts are required to better understand the flexibility of dispersal in gorillas.

When joining a new breeding unit, female western gorillas gathered clues on the group's characteristics. The size of the breeding unit is a major factor influencing female emigration probability in western lowland gorilla (chapter 2, this thesis). In an undisturbed population, there is a peak of emigration probability in medium sized breeding groups. However, shortly after the epidemic, the probability of emigration decreased with the size of the group. This is in opposition with Stokes et *al.* (2003) results that found a positive effect of group size on emigration rate, within the same size range than post-Ebola breeding units of this study. Silverbacks that survived to Ebola epidemic might have some specific survival advantages or be of better quality. Then, females would rather gather around those high quality males. The age of the breeding unit is also an important male-related factor influencing females' dispersal decision in undisturbed populations (chapter 2, this thesis) with higher emigration rate from older group and higher immigration rate toward younger unit (Harcourt 1978; Parnell 2002). We assume that silverbacks at their highest physical abilities lead those younger breeding units. This preference for newly formed breeding unit is confirmed for the whole period of this study. Interestingly, for the post-Ebola periods, most transferring females leave nascent breeding groups to join solitaries or another nascent breeding group. This could indicate that shortly after the epidemic, females are mostly looking for immediate protection and then, they might reevaluate their choice and search for a better reproductive partner.

The immigration pattern on the whole study period is in agreement with the immigration pattern observed in undisturbed populations (chapter 2, this thesis). Female western lowland gorillas prefer to join breeding units rather than solitary silverbacks. In mountain gorilla, a first study on females' preferences indicated immigrations toward lone silverbacks or newly formed breeding units (Harcourt 1978) whereas several years later a second study highlighted a preference for multimale groups (Robbins and Robbins 2015). However, multimale groups have never been observed in the studied population nor in other populations of this species. The preference for mated silverbacks was very clear after the Ebola epidemic when females were gathering six silverbacks among the 18 available ones. Those chosen silverbacks might present some valuable characteristics for survival and reproductive success of females. As in undisturbed populations, there is no influence of the skin infectious status of the silverback on the immigration choice of females. However, in the short-term post-Ebola period, two females chose Marcel even though he was weakly infected by skin disease. This could indicate that the presence of skin disease is not a clue used by females to evaluate the quality of males since several other non-infected males were available during that period. However, the small number of infected silverbacks during the post-Ebola periods may have reduced the statistical power of our analyses. Actually, a previous study on Lokoué population showed that unmated males suffered more from skin disease than mated males (Levréro et al. 2007) a difference confirmed in all periods. Other factors may prevail on infection status, such as silverbacks age or body size (Caillaud et al. 2008).

Supplementary material

Table S1 Periods of observation and presence of gorillas on the Lokoué clearings during each period of the study

Period	Dates	Number of days of observation	% days of gorilla presence
Pre-Ebola	2001 April - 2003 December	484	87.4
Short-term post-Ebola	2004 December - 2006 May	344	41.3
Long-term post-Ebola	2008 June - 2010 April	253	22.9
	2013 February - 2015 September	401	14.0

References

Ameca y Juarez EI, Mace GM, Cowlishaw G, Pettorelli N (2012) Natural population die-offs: causes an consequences for terrestrial mammals. TREE 27:272-277

Barton K (2009) R-Forge: MuMIn - multi-model inference: Project Home. http://R-Forge.R-project.org.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2014) Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv:1406.5823v1 [stat.CO].

Behringer DC, Butler MJ, Shields JD (2006) Avoidance of disease by social lobsters. Nature 441:421-421

Bermejo M, Rodriguez-Teijeiro JD, Illera G, Barroso A, Vila C, Walsh PD (2006) Ebola outbreak killed 5000 gorillas. Science 314:1564

Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, Buckles EL, Coleman JTH, Darling SR, Gargas A, Niver R, Okoniewski JC, Rudd RJ, Stone WB (2009) Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? Science 323:227-227

Bradley BJ, Doran SDM, Lukas D, Boesch C, Vigilant L (2004) Dispersed male networks in western gorillas. Curr Biol 14:510-513

Breuer T, Hockemba MBN, Olejniczak C, Parnell RJ, Stokes EJ (2009) Physical maturation, life-history classes and age estimates of free-ranging Western gorillas-insights from Mbeli bai, Republic of Congo. Am J Primatol 71:106-119

Brotcorne F, Fuentes A, Wandia IN, Beudels-Jamar RC, Huynen MC (2015) Changes in Activity Patterns and Intergroup Relationships After a Significant Mortality Event in Commensal Long-Tailed Macaques (Macaca Fascicularis) in Bali, Indonesia. Int J Primatol 36:548-566

Brüniche-Olsen A, Burridge CP, Austin JJ, Jones ME (2013) Disease induced changes in gene flow patterns among Tasmanian devil populations. Biol Conserv 165:69-78

Burnham KP, Anderson DR (2003) Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. Springer Science & Business Media, New York

Caillaud D, Levréro F, Cristescu R, Gatti S, Dewas M, Douadi M, Gautier-Hion A, Raymond M, Ménard N (2006) Gorilla susceptibility to Ebola virus: The cost of sociality. Curr Biol 16:R489-R491

Caillaud D, Levréro F, Gatti S, Ménard N, Raymond M (2008) Influence of male morphology on male mating status and behavior during interunit encounters in western lowland gorillas. Am J Phys Anthropol 135:379-388

Campbell LJ, Head ML, Wilfert L, Griffiths AGF (2017) An ecological role for assortative mating under infection? Conserv Genet 18:983-994

Clutton-Brock TH (1989) Female transfer and inbreeding avoidance in social mammals. Nature 337:70-72

Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. Emerg Infect Dis 5:735-748

Davidson AD, Hamilton MJ, Boyer AG, Brown JH, Ceballos G (2009) Multiple ecological pathways to extinction in mammals. Proc Natl Acad Sci USA 106:10702-10705

Douadi M, Gatti S, Levréro F, Duhamel G, Bermejo M, Vallet D, Ménard N, Petit E (2007) Sex-biased dispersal in western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Mol Ecol 16:2247-2259

Fey SB, Siepielski AM, Nussle S, Cervantes-Yoshida K, Hwan JL, Huber ER, Fey MJ, Catenazzi A, Carlson SM (2015) Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. Proc Natl Acad Sci USA 112:1083-1088

Fox J (2002) An R and S-Plus companion to applied regression. SAGE Publications, London

Fox J, Monette G (1992) Generalized Collinearity Diagnostics. J Am Stat Assoc 87:178-183

Gatti S, Levréro F, Ménard N, Gautier HA (2004) Population and group structure of western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Lokoué, Republic of Congo. Am J Primatol 63:111-123

Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Caillaud D, Pierre JS, Ménard N (2012) Recovery potential of a Western lowland gorilla population following a major Ebola outbreak: results from a ten year study. Plos One 7:(e37106)

Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Motsch P, Le Gouar P, Pierre J-S, Ménard N (2017) Using demographic characteristics of populations to detect spatial fragmentation following suspected ebola outbreaks in great apes. Am J Phys Anthropol 164:3-10

Genton C, Pierre A, Cristescu R, Levréro F, Gatti S, Pierre J-S, Ménard N, Le Gouar P (2015) How Ebola impacts social dynamics in gorillas: a multistate modelling approach. J Anim Ecol 84:166-176

Green DE, Converse KA, Schrader AK (2002) Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. Ann N Y Acad Sci 969:323-339

Harcourt AH (1978) Strategies of emigration and transfer by primates, with particular reference to gorillas. Z Tierpsychol 48:401-420

Kennedy P (2003) A guide to econometrics. MIT Press,

Kiesecker JM, Skelly DK, Beard KH, Preisser E (1999) Behavioral reduction of infection risk. Proc Natl Acad Sci 96:9165-9168

Lachish S, Jones M, McCallum H (2007) The impact of disease on the survival and population growth rate of the Tasmanian devil. J Anim Ecol 76:926-936

Lachish S, McCallum H, Jones M (2009) Demography, disease and the devil: life-history changes in a disease-affected population of Tasmanian devils (Sarcophilus harrisii). J Anim Ecol 78:427-436

Lachish S, Miller KJ, Storfer A, Goldizen AW, Jones ME (2011) Evidence that disease-induced population decline changes genetic structure and alters dispersal patterns in the Tasmanian devil. Heredity 106:172-182

Levréro F, Gatti S, Gautier-Hion A, Ménard N (2007) Yaws disease in a wild gorilla population and its impact on the reproductive status of males. Am J Phys Anthropol 132:568-575

Levréro F, Gatti S, Ménard N, Petit E, Caillaud D, Gautier-Hion A (2006) Living in nonbreeding groups: An alternative strategy for maturing gorillas. Am J Primatol 68:275-291

Manly BB, McDonald L, Thomas D (2012) Resource selection by animals: statistical design and analysis for field studies. Springer Science & Business Media, New York

Negri AP, Jones GJ, Hindmarsh M (1995) Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium anabaena-circinalis Toxicon 33:1321-1329

Parnell RJ (2002) Group size and structure in western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Mbeli Bai, Republic of Congo. Am J Primatol 56:193-206

Poirotte C, Massol F, Herbert A, Willaume E, Bomo PM, Kappeler PM, Charpentier MJE (2017) Mandrills use olfaction to socially avoid parasitized conspecifics. Sci Adv 3:e1601721-e1601721

Pybus MJ, Hobson DP, Onderka DK (1986) Mass mortality of bats due to probable blue-green-algal toxicity. J Wildl Dis 22:449-450

Robbins AM, Robbins MM (2015) Dispersal patterns of females in the genus Gorilla. In: Furuichi T, Yamagiwa J, Aureli F (eds) Dispersing primate females - Life history and social strategies in male-philopatric species. Springer, Tokyo, pp 75-104

Roy J, Gray M, Stoinski T, Robbins MM, Vigilant L (2014) Fine-scale genetic structure analyses suggest further male than female dispersal in mountain gorillas. 14

Scorolli AL, Lopez Cazorla AC, Tejera LA (2006) Unusual mass mortality of feral horses during a violent rainstorm in Parque Provincial Tornquist, Argentina. Mastozool Neotropical 13:255-258

Stoinski TS, Vecellio V, Ngaboyamahina T, Ndagijimana F, Rosenbaum S, Fawcett KA (2009) Proximate factors influencing dispersal decisions in male mountain gorillas, Gorilla beringei beringei. Anim Behav 77:1155-1164

Stokes EJ, Parnell RJ, Olejniczak C (2003) Female dispersal and reproductive success in wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Behav Ecol Sociobiol 54:329-339

Teacher AGF, Garner TWJ, Nichols RA (2009a) Evidence for Directional Selection at a Novel Major Histocompatibility Class I Marker in Wild Common Frogs (Rana temporaria) Exposed to a Viral Pathogen (Ranavirus). PlosOne 4

Teacher AGF, Garner TWJ, Nichols RA (2009b) Population genetic patterns suggest a behavioural change in wild common frogs (Rana temporaria) following disease outbreaks (Ranavirus). Mol Ecol 18:3163-3172

Walsh PD, Abernethy KA, Bermejo M, Beyers R, De Wachter P, Akou ME, Huijbregts B, Mambounga DI, Toham AK, Kilbourn AM, Lahm SA, Latour S, Maisels F, Mbina C, Mihindou Y, Ndong Obiang S, Effa EN, Starkey MP, Telfer P, Thibault M, Tutin CEG, White LJT, Wilkie DS (2003) Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. Nature 422:611-614

WCS (2009) Protection and monitoring of great apes in Odzala-Kokoua national Park, Republic of Congo. Congo

Woolley L-A, Millspaugh JJ, Woods RJ, van Rensburg SJ, Mackey RL, Page B, Slotow R (2008) Population and individual elephant response to a catastrophic fire in Pilanesberg National Park. PlosOne 3

Young TP (1994) Natural die-offs of large mammals - implications for conservation. Conserv Biol 8:410-418

Chapitre 4

Résumé du chapitre

Le complexe majeur d'histocompatibilité est un ensemble de gènes présents dans le génome de tous les primates étudiés jusqu'à présent (Gyllensten et al. 1991; Bonhomme et al. 2007). La plupart de ces gènes sont très variables car ils codent pour des molécules impliquées dans le système immunitaire. La région *DR* est hypervariable car elle code pour les protéines de reconnaissance d'agents pathogènes. Actuellement, 90 séquences du CMH *DRB* de classe II ont été publiées chez le genre *Gorilla*. La structure générale de la région est similaire à celle de l'humain, avec cinq gènes ou pseudogénes *DRB* identifiés, les *DRB* 1,3,5,6 et le *DRB*W exclusif aux primates. Cinq haplotypes *DRB* sont connus chez le gorille (Hans et al. 2015): le groupe de liaison I (*DRB*1*10-*DRB*6*01-*DRB**W8), le groupe de liaison II (*DRB*1*03-*DRB*3*01/04-*DRB*5*01/05-*DRB*6*02), le groupe de liaison III (*DRB*1*03-*DRB*5*02-*DRB*6*01), le groupe de liaison IV (*DRB*1*03-*DRB*3*04), et le groupe de liaison DR8 (*DRB*1*03-*DRB*6*01-*DRB*5*02).

Les populations sauvages de gorilles sont étudiées au travers d'échantillons non-invasifs, ce qui représente un défi méthodologique pour des fragments d'ADN de grande taille comme la région DRB (Taberlet et al. 1996). En effet, l'ADN extrait est en plus faible concentration et de moins bonne qualité que pour des échantillons sanguins ou tissulaires. Des études récentes sur le CMH ont montré la possibilité d'utiliser le séquençage haut débit (NGS) pour l'étude de cette région à partir d'échantillons fécaux (Hans et al. 2015). Cependant, cette méthode nécessite de pouvoir amplifier des fragments de grande taille, ce qui est associé avec un faible taux de réussite et un fort taux *d'allelic dropout* lorsqu'on travaille à partir d'ADN non invasif (Broquet et al. 2007). Dans cette étude nous utilisons une nouvelle approche pour l'identification de la région *DRB* du CMH à partir d'ADN issu d'échantillons non invasifs. Nous proposons d'utiliser un fragment plus court de l'exon 2 permettant de conserver une majorité de la variabilité de cette région. Le séquençage haut débit de cet amplicon plus court est analysé grâce à une méthode bioinformatique basée sur le rassemblement de séquences similaires et la fréquence de leurs allèles.

Grâce à notre jeu d'amorces amplifiant un fragment plus court de l'exon 2 de la région *DRB* nous obtenons de meilleurs taux de couvertures (zones couvertes par un nombre suffisant de lectures) des séquences et captons 68% de la variabilité de cette région. Bien que cela semble suffisant, nous

éprouvons des difficultés à retrouver les clusters *DRB*1*03 et *DRB*3 connus lors de l'utilisation du fragment long. Ceci indique q'une portion du gène définissant ces lignées manque à notre fragment court d'autant qu'elles sont évolutivement issues de recombinaisons (Bergström et al. 1999b). Un réajustement du set d'amorces en visant la zone créant la séparation de ces lignées devrait permettre de retrouver ces clusters.

L'utilisation d'ADN non invasif ajoute un niveau de complexité aux analyses bioinformatiques. Le principal défaut de notre étude est l'absence de PCRs indépendantes qui permettraient de détecter les faux allèles créés lors de la duplication de l'ADN, d'autant que les taux de *drop-out* et de faux allèles sont originellement plus élevés lorsque l'on travaille sur de l'ADN dégradé (Morin et al. 2001). Ainsi, certains nouveaux allèles associés à la lignée *DRB*1*03 ne sont pas encore confirmés. Cependant, nous sommes confiants dans l'identification de nouveaux allèles *DRB*5 (cinq allèles) et *DRB*1*10 (trois allèles). Bien qu'élevé, le nombre de nouveaux allèles observés n'est pas étonnant lorsque l'on s'intéresse à des populations sauvages. Le gène *DRB*6, supposé être un pseudogène et donc très divergeant par rapport aux autres *DRB* (Corell et al. 1992), a nécessité une attention particulière lors du traitement bioinformatique. L'utilisation d'une analyse axée sur sa détection a été indispensable, mais l'a, probablement artificiellement, identifié chez tous les individus de notre étude. Des ajustements sont encore en cours pour des résultats reflétant de manière plus fidèle les génotypes existants dans notre échantillonnage.

Un intérêt particulier de ce travail est l'étude d'individus issus de deux populations ayant souffert d'une épidémie à virus Ebola (Caillaud et al. 2006; Bermejo et al. 2006). La faible taille de notre échantillon n'a pas permis de mettre en évidence l'existence d'une différence entre les génotypes des individus issus des populations pré ou post épidémie. Pour aller plus loin dans cette analyse, il faut envisager la comparaison entre la diversité observée au marqueur CMH soumis à sélection et la diversité de marqueurs microsatellites neutres.

Chapitre 4: Studying MHC class II variability from non-invasive genetic monitoring in a wild great ape.

Alice Baudouin[1], Nelly Ménard[1], Dominique Vallet[1], Eric Petit[2], Armel Salmon[3], Julien Boutte[3], Hélène Rousseau[3], Leslie Knapp[4], Sétphane Dreano[5], Victor Bonet-Arbolí[6], Roser Farres Corell[6], Magdalena Bermejo[6,7], José Domingo Rodríguez-Teijeiro[6], Pascaline Le Gouar[1]

[1] UMR 6553, ECOBIO: Ecosystems, Biodiversity, Evolution, CNRS/University of Rennes 1, Biological Station of Paimpont, Paimpont, France

[2] UMR 985, ESE: Ecology and Ecosystem Health, INRA Rennes Cedex France

[3] UMR 6553, ECOBIO: Ecosystems, Biodiversity, Evolution, CNRS/University of Rennes 1, Rennes, France

[4] Department of Anthropology, University of Utah, 270 1400 E, Salt Lake City, UT 84112, USA

[5] UMR , IGDR : Genetic and Development Institute of Rennes, CNRS Rennes, France

[6] Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Universitat de Barcelona, Spain

[7] Great Apes Conservation/Research Odzala-Lossi, SPAC gGmbH Congo & USFWS Project, Republic of the Congo

I Introduction

The major histocompatibility complex (MHC) is a large gene-rich region confined to a single chromosome in all primate species studied to date (Gyllensten et al. 1991; Bonhomme et al. 2007). The MHC is well studied in humans and is known as the human leukocyte antigens (HLA). MHC polymorphism has been extensively documented for humans and has received attention in recent years in some non-human primate species used for biomedical research (Huchard and Pechouskova 2014). As a consequence, we know a great deal about the MHC of a limited variety of primates and less about other primates that are more closely related and potentially very similar to humans.

MHC *DR* molecules are cell surface glycoproteins, consisting of α and β polypeptide chain subunits. In humans and most other primates, the α chain of a DR molecule is encoded by a monomorphic DRA locus, while the β chain is encoded by one of several polymorphic *DRB* loci (Bergström et al. 1999a; Sommer 2005). Extensive polymorphism, clustered within 'hypervariable' regions of the second exon which encodes the antigen-binding portion of the MHC DR molecule, is a striking feature of MHC *DRB*. This polymorphism means that different allelic products have the capacity to bind different peptides and this observation supports the widely accepted hypothesis that balancing selection is a major force promoting diversity at these loci (Garrigan and Hedrick, 2003; Garamszegi et al, 2011).

The MHC *DRB* region also manifests haplotype polymorphism. Despite the large number of alleles at each locus, the number of haplotypes observed in any species is usually significantly smaller than might be expected. Some alleles tend to co-occur on the same haplotype rather than segregating independently. This is known as linkage disequilibrium (non-random association) and it is found for large segments of the MHC (Hedrick, 1994). Based on extensive study, recombinational events appear to be rare in the MHC *DRB* region, which is almost always inherited *en bloc* as a haplotype.

In humans, the *DRB* loci have been designated *HLA –DRB1* to *HLA –DRB9. DRB1, DRB3, DRB4* and *DRB5* are recognized as the most functionally important human class II genes (Klein and Sato 2000; Reche and Reinherz 2003). Based on study of humans, the *HLA-DRB1* gene is present on every haplotype and displays an extensive amount of polymorphism (reviewed in Bontrop et al. 1999). The

*DRB*3, *DRB*4 and *DRB*5 genes are not always present in a human haplotype, but their presence (or absence) is characteristic of particular human haplotypes.

To date, pooling the results of all studies of MHC on gorillas, 34 different MHC *DRB* sequences have been identified for the genus *Gorilla.* Overall, the basic structure of the gorilla *DRB* sub-region seems similar to humans (Kasahara et al. 1992), with the exception of an additional locus (*DRB*Z or *DRB*W) found only in gorillas. Like in humans, haplotype polymorphism is detected in gorillas. Based on earlier studies, five *DRB* haplotypes have been identified (Hans et al. 2015): the linkage group I (*DRB*1*10-*DRB*6*01-*DRB**W8), the linkage group II (*DRB*1*03-*DRB*3*01/04-*DRB*5*01/05-*DRB*6*02), the linkage group III (*DRB*1*03-*DRB*5*02-*DRB*6*01), the linkage group IV (*DRB*1*03-*DRB*3*04), and the linkage group DR8 (*DRB*1*03-*DRB*6*01-*DRB*5*02).

Wild gorillas were primarily studied using non-invasively collected samples with the challenge to study large DNA fragment with degraded and low concentration DNA extracts (Taberlet et al. 1996). Classical sequencing methods involving cloning or alleles separation on denaturant gradient gel electrophoresis (Kasahara et al. 1992; Kenter et al. 1993; Lukas et al. 2004; Knapp 2005) were associated with high failure rates when using non- invasive samples. Recent studies on wild gorillas demonstrated the feasibility of MHC genotyping from fecal samples using development of next generation sequencing tools (NGS) (Hans et al. 2015). They emphasize the need to control within the bioinformatic workflow for the potential sources of error linked to low quality DNA in particular the PCR artefacts. However this approach relies on the capacity to amplify the partial *DRB* exon 2, a fragment of 296bp. For non-invasive samples, such a fragment size is linked to low amplification success and high allelic drop out rate (Broquet et al. 2007). In this study, we demonstrate a modified approach for identifying MHC *DRB* sequences using noninvasively collected samples. We proposed a study on a shorter fragment of the partial *DRB* exon2 that retain the majority of the know variability of this gene. High throughput sequencing of this short amplicon was analyzed with a bioinformatics workflow based on clustering similarity and frequency criterion in order to detect the real alleles.

II Materials and methods

a) Non invasive genetic monitoring and sampling scheme

Faecal samples were collected from two wild populations of Western lowland gorillas, *Gorilla gorilla gorilla* in the Republic of Congo (tab 1). The Lossi sanctuary population is located in a fragment forest south east from the Odzala-Kokoua National Park (Bermejo 2004) and the Lokoué population is located within the Odzala-Kokoua National Park about 100 km apart from the Lossi population. Samples were collected between 2000 and 2007 (Lossi population) and between 2001 and 2005 (Lokoué population, Le Gouar et al., 2009). Both populations suffered from Ebola outbreaks in 2002/2003 in Lossi and 2004 in Lokoué (Bermejo et al 2006, Le Gouar et al 2009). Faeces were collected to avoid contamination from human DNA, desiccated in silica beds on the field and stored at -80°C at the laboratory. DNA was extracted using the method described in Vallet et al. (2008). Microsatellite genotyping of the samples allows to discriminate individuals and to perform kinship analysis (Le Gouar et al., 2009).

b) Primer definition and amplification of MHC loci short and long products

We design a forward primer that amplified a fragment of approximately 150 bp of the *DRB* exon 2. The new primer was designed using the sequences of MHC-*DRB* in *Gorilla* available in NCBI and focused on conserved regions of exon 2 for MHC-*DRB* genes. The new primer is called 3'M*DRB*-short (5' GTCCTTCTGGCTGTTCG 3'). The reverse primer was the 5'M*DRB* (5' GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC 3').

In order to compare amplification success for long and short products we amplified multiple sequences of MHC with M*DRB* and M*DRB*-short primers from 69 and 114 fecal samples respectively. PCR mix was constituted of 3 µl of genomic DNA, 5 µl of E Buffer (Bioline), 1.5 mM Mg, 2.5 mM of each of the four deoxyribonucleotide triphosphates (dGTP, dATP, dTTP, and dCTP (Invitrogen), 20 pmol (0.3 µl) of each of the primers 5′M*DRB* and 3′M*DRB* or 3'MRDB-short and 1 unit of polymerase (Applied Biosystems, Warrington, UK). H2O was added to reach 25µl of PCR mix. Cycling conditions consisted of 40 rounds of 90s denaturation at 94°C, 90s annealing at 57°C, and 90 s extension at 74°C. Best

amplification results were obtained when the cycling step was preceded by a denaturing step during 3 min at 94°C and followed from an extension step during 10 min at 74°C. PCR success was confirmed using a 1.5% agarose gel.

Table 1 Origin of samples used for NGS analysis. The pedigree indicates the name of the breeding-group or of the individual when identified during the collection of the sample. For the Apollo BG, we have a complete pedigree that allows us to indicate G047 as the mother of G049 and G049, G043 and G057 as half-siblings (HS). The sex has been determined genetically for each individual, M stands for male and F for female. The period of sampling is indicated by PRE (pre-ebola), ebola or POST (post-ebola).

Population	Individual	Pedigree	Genetic gender	Period
Lokoue	G107		M	PRE
	G126		M	PRE
	G139		M	PRE
	G156		F	PRE
	G206		F	PRE
	G212		F	PRE
	G221		F	PRE
	G240		F	PRE
	G606		M	ebola
	G607		F	ebola
	G610		F	ebola
	G612		F	ebola
	G613		F	ebola
	G614		F	ebola
	G669		M	POST
	G765		M	POST
Lossi	G050		F	PRE
	G051		F	PRE
	G049	Mother G047, HS G043 &G057	F	PRE
	G047	Offspring G049	M	PRE
	G043	HS G049 & G057	M	PRE
	G057	HS G049 & G043	F	PRE
	G852		M	POST
	G863		M	POST
	G873		F	POST
	G871		F	POST
	G864		M	POST
	G866		M	POST
	G694		M	POST
Zoological park	G152s		M	

c) NGS library construction

Fecal samples from 16 individuals of Lokoué and 13 individuals of Lossi were selected for NGS analysis (Tab 1). An additional blood sample from a captive gorilla (Romagne zoo) was included as a positive control.

454 pyrosequencing was performed on the amplicons of short MHC *DRB* exon 2 products by the Human and Environmental Genomics facility at OSUR (University of Rennes 1). 15 forward and two reverse fusion primers were designed by adding the GS FLX titanium primer sequence (purified using HPLC) and a 10 bp Multiplex Identifiers (MID, engineered by Roche ©) sequence at the 5' end of the specific primers (see tab 1, supplementary information). This allows us to identify each of the 30 individuals by selecting the combination of a MID at the 5' end and the 3' end of the specific primers (Galan et al 2010). PCR conditions were optimized as follows: 2.5µL of 10X buffer, 0.2µL of dNTP, 0.2µL of each labelled primers (see below), 0.2µL of amplitaq (Thermo Fisher Scientific ©) polymerase and ddH2O for a final volume of 25µL. Cycling conditions consisted of one cycle at 95°C during 15 min then 40 rounds of 30 s denaturation at 95°C, 30 s annealing at 57°C, and 40 s extension at 72°C, one cycle at 72°C during 10 min and a final holding temperature of 4°C. PCR success was confirmed using a 1.5% agarose gel.

Library preparation, emulsion PCR, and pyrosequencing on a Roche/454 GS FLX Titanium instrument were performed according to manufacturer's protocol (454 Life Sciences/Roche Applied Biosystems, Branford, CT, USA) at the Environmental Genomics facility at OSUR. Each sample has been sequenced twice independently.

d) Data analysis

New primer validation

Amplification success rates were computed as the number of successful PCRs on the total number of trials for each set of primer, and compared with a χ^2 test.

All the NCBI sequences (n = 90) were cut to the 143bp product corresponding to the fragment amplified by the M*DRB* short primer. In order to check if the sequences could always been distinguished, we built a bootstrap consensus phylogenetic tree using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987) and 2000 replicates (Felsenstein 1985). The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method (Tamura 1992) and are in the units of the number of base substitutions per site. The differences in the composition bias among sequences were considered in evolutionary comparisons (Tamura and Kumar 2002). Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar et al. 2016). The allele Gogo-*DRB*5*02:01 was excluded due to its unusual placement in the tree, and consistent finding suggesting that this allele is a chimeric sequence (Kenter et al. 1993; Lukas et al. 2004).

NGS analysis

We adapted the data analysis steps presented by Hans et al. (2015) (i) sequence preprocessing; (ii) discrimination of artefacts from true alleles; and (iii) genotype estimation and validation.

(i) Sequence preprocessing.

Low quality sequences, primer and MID have been deleted by the bioinformatics process of the Human and Environmental Genomics facility at OSUR (University of Rennes 1). Reads of each individual (unique MID combination) were identified.

We used the sequence detection workflow developed by (Boutte et al. 2016) to conduct hierarchical clustering of variants based on their frequency. To identify the different sequences present in the amplicon dataset, reads were mapped to a consensus region of 157 bp of the 10 *DRB* sequences available on NCBI. To construct this consensus, the different published alleles were aligned and the most frequent nucleotide at each position was selected. After preliminary analyses, a second consensus sequence was built from *DRB*6 available alleles on NCBI to improve sequence detection for this region. For each *DRB* locus, Roche-454 reads were mapped to consensus sequences using the GSMapper tools from Newbler (Genome Assembler, Roche v 2.6; ml= 80 bp; mi= 80%). SNPs and indels were first detected prior to assemble reads with phased characters into sequences (Boutte et al. 2016). Putative false-positive SNPs

(in homopolymeric regions due to the Roche-454 sequencing technology), and polymorphisms detected in less than 20% of the aligned reads (putative paralogs) were not considered for the sequence detection. Reads were then assembled into sequences when presenting at least 4 identical shared SNPs or indels. Sequences detected and built from less than 10 reads corresponding to putative false-positives due to PCR recombination artefacts were not considered for further analyses.

This workflow used a consensus sequence built with previously MHC sequences published for Western lowland gorilla. However because the pseudo gene *DRB*6 is known to diverge from other *DRB* loci (Corell et al. 1992) its variation may be less retained in the consensus sequence. We thus performed two sets of analysis: one with all published sequences and one with only the *DRB*6 published sequences.

(ii) Discrimination of artefacts from true alleles

Analysis of artefacts was done separately for the *DRB* consensus and the *DRB*6 one. In order to separate PCR artefacts from true alleles we first confirmed alleles if they were present in both sequencing replicates. However, due to allelic dropout that results in preferential amplification of one allele of heterozygous locus, we included sequences present at high frequencies in only one replicate if they were also present in another individual. Then, for each individual, we compiled the similar clusters between the two replicates by comparison of the sequences. This allows us to determine an overall frequency of each sequence and we determine thresholds of 3% under which sequences are considered artefacts.

We then combined the remaining sequences, constructed a multiple alignment using ClustalW and built a neighbour-joining tree based on the number of differences as implemented in the software package MEGA version 6.06 (Tamura et al., 2013). The tree allows us a first detection of chimera. Indeed, when several sequences from a same individual were localised on the same rake, we investigated those specific sequences in order to detect chimeras. Chimeras are easily detectable by eye because they are composed of two half of sequences with parents sequences present in the same individual (Zagalska-Neubauer et al. 2010). Detection of common sequencing mistakes was also done by eye. When sequences differed from one or two base pairs, we looked for functional non-sense with the amino-acid chain. If there is no one, variants differing in 1–2bp to the most frequent sequence within each cluster

were considered as sequencing errors and were excluded from further analysis (Sommer et al. 2013; Stutz and Bolnick 2014; Lighten et al. 2014; Hans et al. 2015). These steps are based on the assumption that true alleles are replicated at higher frequency than artefacts.

(iii) Genotype estimation and validation

All the identified sequences were blasted (BLAST, Altschul et al. 1990); GenBank, Benson et al. 2013) and renamed when they 100% matched an already published sequence. Newly identified sequences were temporarily named accordingly to the closest *DRB* and lineage detected with blast analysis.

Because the number of *DRB* genes may vary among individuals we were unable to evaluate the maximum number of alleles that should be detected. However we can allocate each sequence to a *DRB* for which we expected a maximum of two alleles.

We reconstructed phylogenies for each *DRB* using the neighbour-joining method as for published sequences. When possible we attribute each individual to one of the five previously published *DRB* haplotypes in western gorillas (Hans et al. 2015).

III RESULTS

a) Validation of new primer

Amplification success differed significantly between the two sets of primers ($\chi^2 = 34.9$, df = 1, $p < 0.0001$). Among the 69 extracts amplified with the M*DRB* long primer, 25 (36%) yield a PCR product whereas on the 114 extracts amplified with the M*DRB* short primer, 92 (81%) were successful.

Among the 60 published sequences, 41 could always been distinguished (68%). When analysing the phylogenetic tree of the short fragment (fig 1), *DRB*1*10, *DRB*5, *DRB*6, *DRB**W clusters were consistent with previous findings. Some *DRB1**03 sequences (6 on 10) and some *DRB*3 sequences (4 on 7) were well clustered together. However, 8 sequences were not assigned to their original cluster

(*DRB1**0201, *DRB*1*0312, *DRB*1*0313, *DRB*1*0302, *DRB*1*0304, *DRB*3*0101/02/03, *DRB3**0108, *DRB*3*0104).

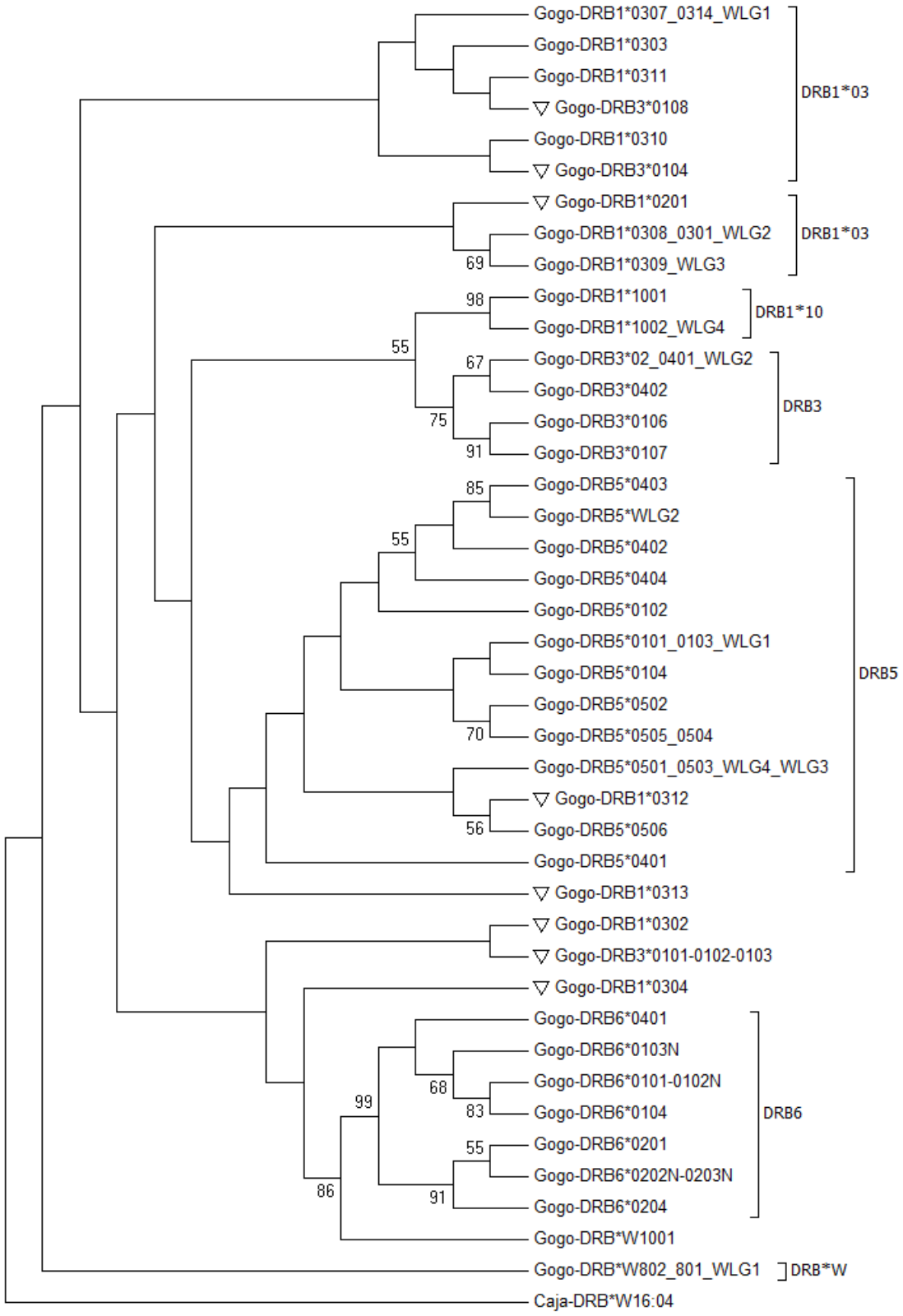


Figure 1 Phylogenetic tree of published gorilla DRB exon 2 sequences cut at the length of the short fragment. Alleles that could not be differentiated using the short fragment are pooled together in the tree. Taxa with inverse triangle were not assigned to their original cluster. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985).

b) NGS analysis

Sequence pre processing

Using the alignment with a global *DRB* consensus sequence, a total of 264624 amplicons/reads/contigs were obtained (mean per replicate per individual: 4410 ± 2167). A total of 4858 (1.8%) were observed once and were therefore discarded (mean per replicate per individual: 81 ± 28). Total read number of both replicates ranged from 1475 to 12915.

Concerning the alignment with a *DRB*6 sequence, a total of 256764 amplicons/reads/contigs was obtained (mean per replicate per individual: 4279 ± 1854). A total of 4962 (1.9%) reads were observed once and were therefore discarded (mean per replicate per individual: 83 ± 33). Total read number of both replicates ranged from 1299 to 11906.

MHC genotype

Results on *DRB* diversity were extracted from analyses using the total *DRB* consensus. Since the analysis using the *DRB*6 consensus was less stringent, we only extracted *DRB*6 alleles out of it, to avoid adding alignment errors. The *DRB6* analysis brought some confusing results as 29 out of 30 individuals presented at least one allele of this pseudo-gene, with very low identity with already published sequences. The mean number of alleles per individual is 3.5 (±1.0), the minimum is two (n=5) and maximum five (n=6) alleles per individual. Only five individuals have all four DRB (1/3/5/W), and only two don't have any DRB1 allele. The DRBW is the least present gene, with 11/30 individuals showing it, followed by the DRB5 (21/30) and the DRB3 (22/30).

Among the 30 individuals we observed a total of 33 *DRB* exon 2 sequences (1/3/5/W), 17 of which had not been previously reported (Tab 2). Only the allele *DRB*3-02 is found in all sub-populations. Eleven

alleles were found in Lokoué pre-Ebola population, 16 in the Lokoué post-Ebola population, 12 in Lossi pre-Ebola population and 17 in Lossi post-Ebola population. Concerning the individuals within the same family, the mother (G047) and her offspring (G049) don't share any allele. Among half-offsprings (G049, G043, G057) only G043 and G057 share two alleles.

Table 2 Gorilla MHC class II alleles identified in the present study and the population where they were found.

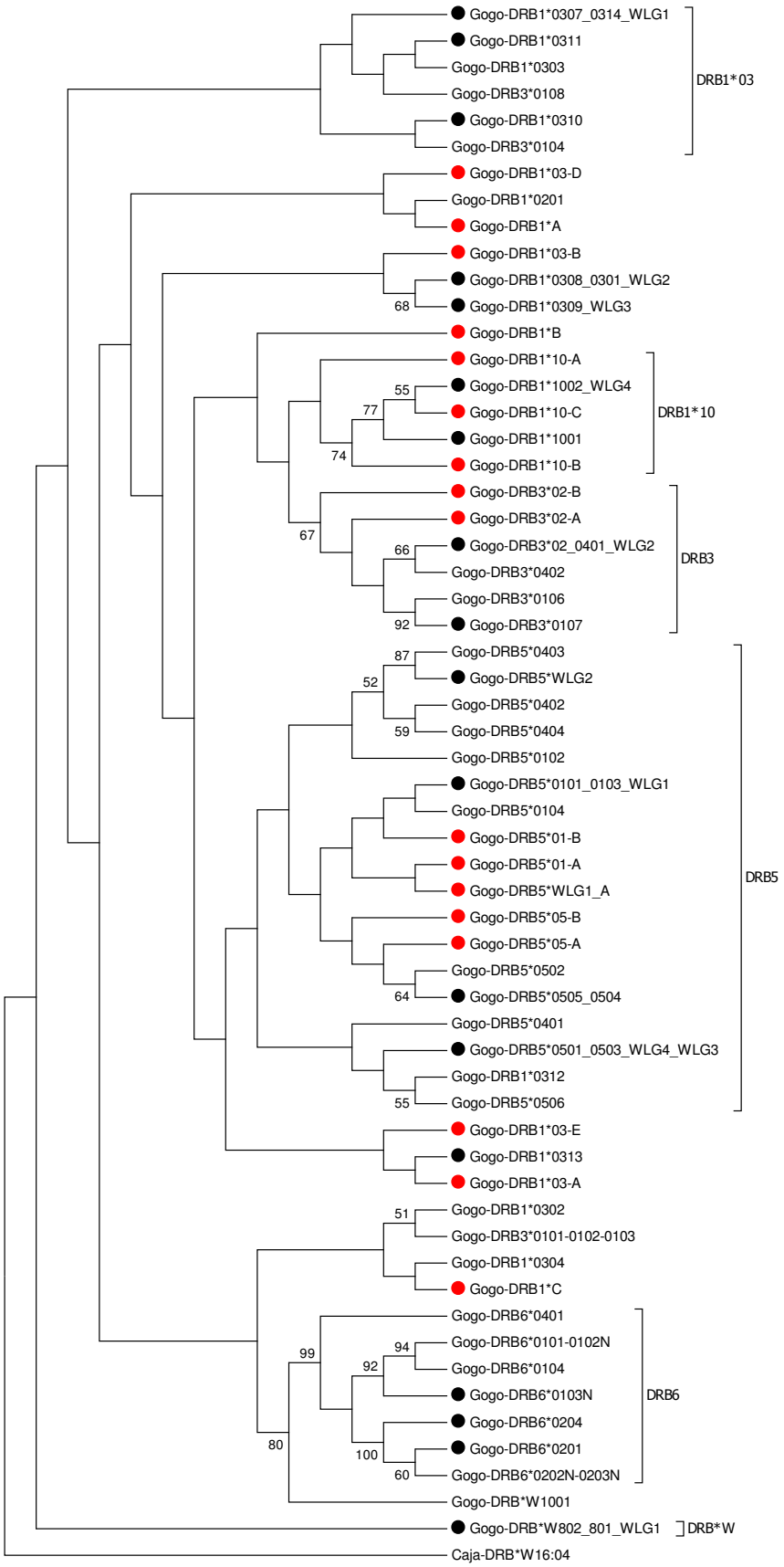
		Population			
Allele	Number of individuals	Lokoué pre-Ebola	Lokoué post-Ebola	Lossi pre-Ebola	Lossi post-Ebola
DRB1-A	6		3	1	2
DRB1-B	1		1		
DRB1-C	1				1
DRB1-0307	2		1		1
DRB1-0308	6	5			1
DRB1-0309	3	2			1
DRB1-0310	1		1		
DRB1-0311	4	2		1	1
DRB1-0313	1			1	
DRB1-03-A	1				1
DRB1-03-B	2			1	1
DRB1-03-D	1	1			
DRB1-03-E	1				1
DRB1-1001	1	1			
DRB1-1002	5		2		3
DRB1-10-A	1				1
DRB1-10-B	7		2		5
DRB3-0107	6		3	3	
DRB3-02	14	5	4	1	4
DRB3-02-A	1			1	
DRB3-02-B	2	1			1
DRB5-0101	14	5	3	3	3
DRB5-0102	1			1	
DRB5-01-A	1				1
DRB5-01-B	1			1	
DRB5-0501	1		1		

DRB5-0505	1		1		
DRB5-05-A	2	1		1	
DRB5-05-B	2		2		
DRB5-WLG2	2	1	1		
DRB5-WLG1-A	2	1	1		
DRB6-0103	24	5	6	6	7
DRB6-0204	11		4	4	3
DRB6-0204-A	9	4	2	1	2
DRBW-802	9		3	4	2
Total	43	14	19	15	21

The inclusion of the new sequences in the phylogenetic analysis did not change the clusters detected with short fragments (fig 2). New DRB5 (n=5) and DRB1*10 (n=3) sequences were well included in their clusters. New DRB3 sequences (n=2) were associated to the DRB3 cluster. New DRB1 sequences were more dispatched in the tree but always associated with a known DRB sequence except DRB1*B.

The inference of the linkage group was possible for 13 out of the 30 individuals. Among the two populations, we only detected the linkage groups I (DRB1/6/W) and II (DRB1/3/6/5). We neither detected the linkage groups III (DRB1/6/5), IV (DRB1/3) nor DRB8 (DRB3/6/5).

Figure 2 Phylogenetic tree of gorilla DRB exon 2 including the new sequences from this study. Sequences with plain circle were the one detected in our data set, the red circle are the new sequences. The common marmoset alleles Caja-DRB*W16:01 taken as the outgroup (Doxiadis 2006). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein 1985).


Gogo-DRB1*0307_0314_WLG1
Gogo-DRB1*0311
Gogo-DRB1*0303
Gogo-DRB3*0108
Gogo-DRB1*0310
Gogo-DRB3*0104
DRB1*03
Gogo-DRB1*03-D
Gogo-DRB1*0201
Gogo-DRB1*A
Gogo-DRB1*03-B
Gogo-DRB1*0308_0301_WLG2
68
Gogo-DRB1*0309_WLG3
Gogo-DRB1*B
Gogo-DRB1*10-A
55
Gogo-DRB1*1002_WLG4
77
Gogo-DRB1*10-C
Gogo-DRB1*1001
74
Gogo-DRB1*10-B
DRB1*10
Gogo-DRB3*02-B
Gogo-DRB3*02-A
67
66
Gogo-DRB3*02_0401_WLG2
Gogo-DRB3*0402
Gogo-DRB3*0106
92
Gogo-DRB3*0107
DRB3
87
Gogo-DRB5*0403
52
Gogo-DRB5*WLG2
Gogo-DRB5*0402
59
Gogo-DRB5*0404
Gogo-DRB5*0102
Gogo-DRB5*0101_0103_WLG1
Gogo-DRB5*0104
Gogo-DRB5*01-B
Gogo-DRB5*01-A
Gogo-DRB5*WLG1_A
Gogo-DRB5*05-B
Gogo-DRB5*05-A
Gogo-DRB5*0502
64
Gogo-DRB5*0505_0504
Gogo-DRB5*0401
Gogo-DRB5*0501_0503_WLG4_WLG3
Gogo-DRB1*0312
55
Gogo-DRB5*0506
DRB5
Gogo-DRB1*03-E
Gogo-DRB1*0313
Gogo-DRB1*03-A
51
Gogo-DRB1*0302
Gogo-DRB3*0101-0102-0103
Gogo-DRB1*0304
Gogo-DRB1*C
Gogo-DRB6*0401
99
94
Gogo-DRB6*0101-0102N
92
Gogo-DRB6*0104
Gogo-DRB6*0103N
Gogo-DRB6*0204
80
100
Gogo-DRB6*0201
60
Gogo-DRB6*0202N-0203N
DRB6
Gogo-DRB*W1001
Gogo-DRB*W802_801_WLG1
DRB*W
Caja-DRB*W16:04

IV DISCUSSION

Compared to model organisms, relatively few studies (less than 20) of MHC have been conducted on gorillas. Most of them used cloning and Sanger sequencing that represented the standard method for MHC characterization but NGS analyses could become more relevant in the study of this highly polymorphic region (Babik et al. 2009; Babik 2010; Sommer et al. 2013; Huchard and Pechouskova 2014). However, the use of non-invasively collected samples constrains the amplification of large fragments (Broquet et al 2007). Then, developing a set of primer amplifying a shorter fragment of the DRB region, while maintaining a sufficient quantity of information, is an attractive goal in study based upon wild populations. Indeed, we captured 68% of the known polymorphism of the *DRB* class II exon using our short fragment. This allows us to have a better depth and coverage rate for the NGS analyses, reducing fragment size errors. However, whereas the proportion of polymorphism obtained with the short fragment seems enough, *DRB*1*03 and *DRB*3 clusters were difficult to detect, which indicates that there is an important missing proportion of the gene allowing the cleavage between those *DRB* Indeed phylogenetic analysis of hominoid MHC *DRB* indicated that the gorilla *DRB*1*03 sequence evolved from a recombination between an ancestral *DRB*3 and *DRB*1*03 (Bergström et al. 1999b), which could explain their similarity on the short fragment. Distinction between *DRB1**03 and *DRB*3 sequences could be improved by developing other primers that target more specific part of these lineages.

The use of non-invasive sample also added an additional complexity to the bioinformatics treatment of NGS data. In the present study, the lack of independent PCR made it more difficult to evaluate drop-outs' and false alleles' rates, that are supposedly higher when non-invasive sampled are used (Morin et al. 2001). Hence, there may still be PCR-related artefacts sequences in our newly found alleles, confusing a bit more the cleavage between lineages, which could be suspected for some new *DRB*1*03 alleles. However new *DRB*5 and *DRB*1*10 sequences were well assigned to cluster indicating that those new sequences were reliable. Five new *DRB*5 and three new *DRB*1*10 were detected adding to the 18 and three already known sequences respectively. Such rate of new alleles is not surprising when studying wild populations and this suggests that much more new alleles could potentially been discovered when applying our new development at a larger population scale.

The *DRB*6 gene is challenging to analyse in this study. This supposedly pseudogene is known to be very divergent from other *DRB* genes (Corell et al. 1992). The first workflow analyses using a consensus alignment prevent us to detect any *DRB*6 gene in the two studied population. Then, the use of a workflow with alignment upon a *DRB*6 sequence allows us to detect it, but it was, probably artificially, present in the genotype of every individual and with sequences difficult to assign to an already known lineage. This indicates the need to pay special attention to this gene when using workflow based upon realignment.

An interesting aspect of this study is to present a sample of individuals from two different populations, both having suffered from an Ebola outbreak (Caillaud et al. 2006; Bermejo et al. 2006). A previous study of the impact of Ebola on genetic diversity of neutral microsatellite markers showed that there was no loss of diversity after the epidemic but a temporal change of allele frequencies in the Lossi population before and after the Ebola outbreak (Le Gouar et al. 2009). With this study, the number of alleles detected in each population did not seem to differ. Our sample size was too small to detect any particular association of *DRB* alleles and Ebola period. A perspective to the current study would be to analyse the genetic diversity of the selected region MHC in comparison to a set of neutral microsatellite markers. The comparison between neutral and selected markers allows hypothesizing on the evolutionary forces acting on the evolution of species.

Supplementary material

Table S1 Fusion primers

Sample name	Primer name	GS FLX adapatator	MID	Specific primer
G1	F-MID1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G2	F-MID2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ACGCTCGACA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G3	F-MID3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	AGACGCACTC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G4	F-MID4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	AGCACTGTAG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G5	F-MID5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ATCAGACACG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G6	F-MID6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ATATCGCGAG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G7	F-MID7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CGTGTCTCTA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G8	F-MID8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CTCGCGTGTC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G9	F-MID10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	TCTCTATGCG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G10	F-MID11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	TGATACGTCT	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G11	F-MID13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CATAGTAGTG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC

G12	**F-MID14**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CGAGAGATAC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G13	**F-MID15**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ATACGACGTA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G14	**F-MID16**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	TCACGTACTA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G15	**F-MID17**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CGTCTAGTAC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG		GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G16	**F-MID1**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G17	**F-MID2**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ACGCTCGACA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G18	**F-MID3**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	AGACGCACTC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G19	**F-MID4**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	AGCACTGTAG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G20	**F-MID5**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ATCAGACACG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G21	**F-MID6**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ATATCGCGAG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G22	**F-MID7**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CGTGTCTCTA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G23	**F-MID8**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CTCGCGTGTC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G24	**F-MID10**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	TCTCTATGCG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC

G25	**F-MID11**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	TGATACGTCT	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G26	**F-MID13**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CATAGTAGTG	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G27	**F-MID14**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CGAGAGATAC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G28	**F-MID15**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	ATACGACGTA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G29	**F-MID16**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	TCACGTACTA	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC
G30	**F-MID17**	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAG	CGTCTAGTAC	GTCCTTCTGGCTGTTCC
	R-Rev1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTCAG	ACGAGTGCGT	GCCTCGAGTGTCCCCCCAGCACGTTTC

References

Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403–410 . doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Babik W (2010) Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. Mol Ecol Resour 10:237–251 . doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02788.x

Babik W, Taberlet P, Ejsmond MJ, Radwan J (2009) New generation sequencers as a tool for genotyping of highly polymorphic multilocus MHC system. Mol Ecol Resour 9:713–719 . doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02622.x

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al (2013) GenBank. Nucleic Acids Res 41:D36–D42 . doi: 10.1093/nar/gks1195

Bergström TF, Engkvist H, Erlandsson R, et al (1999a) Tracing the Origin of HLA-DRB1 Alleles by Microsatellite Polymorphism. Am J Hum Genet 64:1709–1718 . doi: 10.1086/302401

Bergström TF, Erlandsron R, Engkvist H, et al (1999b) Phylogenetic history of hominoid DRB loci and alleles inferred from intron sequences. Immunol Rev 167:351–365 . doi: 10.1111/j.1600-065X.1999.tb01404.x

Bermejo M (2004) Home-range use and intergroup encounters in western gorillas (Gorilla g. gorilla) at Lossi forest, North Congo. Am J Primatol 64:223–232 . doi: 10.1002/ajp.20073

Bermejo M, Rodríguez-Teijeiro JD, Illera G, et al (2006) Ebola Outbreak Killed 5000 Gorillas. Science 314:1564–1564 . doi: 10.1126/science.1133105

Bonhomme M, Blancher A, Jalil MF, Crouau-Roy B (2007) Factors shaping genetic variation in the MHC of natural non-human primate populations. Tissue Antigens 70:398–411 . doi: 10.1111/j.1399-0039.2007.00925.x

Bontrop RE, Otting N, de Groot NG, Doxiadis GGM (1999) Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates. Immunol Rev 167:339–350 . doi: 10.1111/j.1600-065X.1999.tb01403.x

Boutte J, Aliaga B, Lima O, et al (2016) Haplotype Detection from Next-Generation Sequencing in High-Ploidy-Level Species: 45S rDNA Gene Copies in the Hexaploid Spartina maritima. G3 Genes Genomes Genet 6:29–40 . doi: 10.1534/g3.115.023242

Caillaud D, Levréro F, Cristescu R, et al (2006) Gorilla susceptibility to Ebola virus: The cost of sociality. Curr Biol 16:R489–R491 . doi: 10.1016/j.cub.2006.06.017

Corell A, Morales P, Varela P, et al (1992) Allelic diversity at the primate major histocompatibility complex DRB6 locus. Immunogenetics 36:33–38 . doi: 10.1007/BF00209290

Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution 39:783–791 . doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Gyllensten U, Sundvall M, Ezcurra I, Erlich HA (1991) Genetic diversity at class II DRB loci of the primate MHC. J Immunol 146:4368–4376

Hans JB, Haubner A, Arandjelovic M, et al (2015) Characterization of MHC class II B polymorphism in multiple populations of wild gorillas using non-invasive samples and next-generation sequencing. Am J Primatol 77:1193–1206 . doi: 10.1002/ajp.22458

Huchard E, Pechouskova E (2014) The Major Histocompatibility Complex and Primate Behavioral Ecology: New Tools and Future Questions. Int J Primatol 35:11–31 . doi: 10.1007/s10764-013-9700-1

Kasahara M, Klein D, Vincek V, et al (1992) Comparative anatomy of the primate major histocompatibility complex DR subregion: Evidence for combinations of DRB genes conserved across species. Genomics 14:340–349 . doi: 10.1016/S0888-7543(05)80224-1

Kenter M, Otting N, de Weers M, et al (1993) Mhc-DRB and-DQA1 nucleotide sequences of three lowland gorillas. Hum Immunol 36:205–218 . doi: 10.1016/0198-8859(93)90127-M

Klein J, Sato A (2000) The HLA System. N Engl J Med 343:702–709 . doi: 10.1056/NEJM200009073431006

Knapp L a. (2005) Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. Tissue Antigens 65:211–219 . doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00368.x

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 33:1870–1874 . doi: 10.1093/molbev/msw054

Le Gouar PJ, Vallet D, David L, et al (2009) How Ebola Impacts Genetics of Western Lowland Gorilla Populations. PLoS ONE 4:e8375 . doi: 10.1371/journal.pone.0008375

Lighten J, van Oosterhout C, Bentzen P (2014) Critical review of NGS analyses for de novo genotyping multigene families. Mol Ecol 23:3957–3972 . doi: 10.1111/mec.12843

Lukas D, Bradley BJ, Nsubuga AM, et al (2004) Major histocompatibility complex and microsatellite variation in two populations of wild gorillas: GENETIC VARIATION IN WILD GORILLAS. Mol Ecol 13:3389–3402 . doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02353.x

Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (Pan troglodytes verus). Mol Ecol 10:1835–1844 . doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01308.x

Reche PA, Reinherz EL (2003) Sequence Variability Analysis of Human Class I and Class II MHC Molecules: Functional and Structural Correlates of Amino Acid Polymorphisms. J Mol Biol 331:623–641 . doi: 10.1016/S0022-2836(03)00750-2

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–425 . doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front Zool 2:16

Sommer S, Courtiol A, Mazzoni CJ (2013) MHC genotyping of non-model organisms using next-generation sequencing: a new methodology to deal with artefacts and allelic dropout. BMC Genomics 14:542

Stutz WE, Bolnick DI (2014) Stepwise Threshold Clustering: A New Method for Genotyping MHC Loci Using Next-Generation Sequencing Technology. PLoS ONE 9:e100587 . doi: 10.1371/journal.pone.0100587

Taberlet P, Griffin S, Goossens B, et al (1996) Reliable Genotyping of Samples with Very Low DNA Quantities Using PCR. Nucleic Acids Res 24:3189–3194 . doi: 10.1093/nar/24.16.3189

Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. Mol Biol Evol 9:678–687 . doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752

Tamura K, Kumar S (2002) Evolutionary Distance Estimation Under Heterogeneous Substitution Pattern Among Lineages. Mol Biol Evol 19:1727–1736 . doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003995

Zagalska-Neubauer M, Babik W, Stuglik M, et al (2010) 454 sequencing reveals extreme complexity of the class II Major Histocompatibility Complex in the collared flycatcher. BMC Evol Biol 10:395 . doi: 10.1186/1471-2148-10-395

Chapitre 5

Chapitre 5 : Analyse de la diversité du Complexe Majeur d'Histocompatibilité à l'échelle populationnelle en utilisant un suivi de génétique non invasive: développement d'une méthode d'haplotypage par marqueur microsatellite lié.

I Introduction

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire primaire des vertébrés en codant pour des glycoprotéines présentes à la surface des cellules impliquées dans le lien entre les antigènes et les cellules immunitaires (Piertney and Oliver 2005). Au sein de ce complexe de gènes, les gènes de classe II permettent la reconnaissance et la présentation des peptides d'origine extracellulaire (Watts 1997). Les différents loci CMH de classe II contiennent des gènes codant pour les chaînes α et β qui forment la poche à peptides, domaine de liaison extracellulaire. Chez les mammifères, les gènes de ce complexe sont issus de duplications et le nombre de loci varie entre les espèces (Yeager and Hughes 1999). Au sein d'une même espèce le nombre de copies varie entre les individus. Par exemple chez l'Homme le nombre de locus *DRB* fluctue de 1 à 5 (Klein and Sato 2000; Reche and Reinherz 2003). Le CMH montre un fort taux polymorphisme par la présence de plusieurs gènes et un grand nombre d'allèles constituant un important répertoire d'antigènes avec des variations au niveau intra- et interindividuel. Ce fort polymorphisme peut s'expliquer en partie par une sélection balancée exercée par la pression de nombreux pathogènes (Bernatchez and Landry 2003; Spurgin and Richardson 2010).

De nombreuses études ont montré le lien entre la variabilité des gènes de la classes II et la résistance à certaines maladies (Doxiadis et al. 2007, Sommer 2005). Des facteurs secondaires ont été avancés pour expliquer le maintien du polymorphisme tel que le choix d'un partenaire portant un haplotype CMH différent (Penn and Potts 1999) et les interactions fœto-maternelles (Haig 1997). Du fait de ces caractéristiques, le CMH est l'un des marqueurs les plus utilisés pour caractériser la variabilité adaptative d'une population (Spurgin and Richardson 2010). La caractérisation du polymorphisme des gènes du

CMH constitue une mesure du potentiel évolutif et de la santé génétique d'une population et a donc une valeur importante en conservation (Sommer 2005; de Groot et al. 2017).

La complexité structurelle du CMH et la variation hétérogène du nombre de copies du gène *DRB* a longtemps nécessité l'utilisation d'ADN de bonne qualité (sang). Les différents allèles du locus peuvent être obtenus par amplification puis clonage et séquençage de l'exon 2 de 270pb (Kenter et al. 1993). La migration sur gel d'électrophorèse à gradient dénaturant (DGGE) permet également de distinguer les différents allèles qui peuvent être ensuite directement séquencés (Knapp 2005, chapitre 6, cette thèse). Récemment, le développement des méthodes de séquençage haut débit (NGS) permet de séquencer directement les amplicons du locus *DRB* (Doxiadis et al. 2007; Babik 2010; Huchard and Pechouskova 2014, chapitre 4, cette thèse). Cependant, ces méthodes sont couteuses en temps (clonage, DGGE) ou en argent (NGS) et limitent le nombre d'échantillons analysables.

Chez les primates, à proximité de l'exon 2 du locus *DRB* on retrouve un gène microsatellite, le D6S2878 (Epplen et al. 1997; Bergström et al. 1999; Kriener et al. 2000). Chez l'humain et le macaque rhésus, la création d'une paire d'amorces permettant de s'adapter au fort polymorphisme de cette région, ainsi que la mise en évidence du lien entre la longueur du microsatellite et différents *DRB*, ont permis de valider l'utilisation du microsatellite D6S2878 dans l'étude du CMH (Doxiadis et al. 2007). Chez l'homme chaque patron observé au niveau du D6S2878 semble être lié à un haplotype[1] particulier au niveau des gènes *DRB*. L'utilisation du D6S2878 pour l'étude du CMH a été validée chez l'humain (Fig 1; Doxiadis et al. 2009), le chimpanzée (*Pan troglodytes*, Bak et al. 2006; de Groot et al. 2009), le macaque rhésus (*Macaca mulatta*; Doxiadis et al. 2007), le macaque crabier (*Macaca fascicularis* ; de Groot et al. 2008), deux espèces de douroucouli *(A. vociferans* et *A. nancymaae ;* López et al. 2014), le babouin olive (*Papio anubis*; Groot et al. 2017) et le gibbon cendré (*Hylobates moloch* ; de Groot et al. 2017). Toutes ces études ont été menées sur des primates modèles dans le secteur médical et pharmaceutique, principalement à partir d'échantillons sanguins, avec des degrés de connaissance du CMH variables.

[1] haplotype : combinaison de gènes étroitement liés sur un chromosome et qui se transmettent ensemble lors de la méiose

L'utilisation du microsatellite permet un gain de temps et d'argent dans les études du CMH par sa simplicité d'étude, faisant appel à du génotypage plutôt que du séquençage ou du clonage pour les *DRB*. La facilitation des méthodes d'analyses permet également d'envisager des études du CMH au niveau populationnel (Doxiadis et al. 2007).

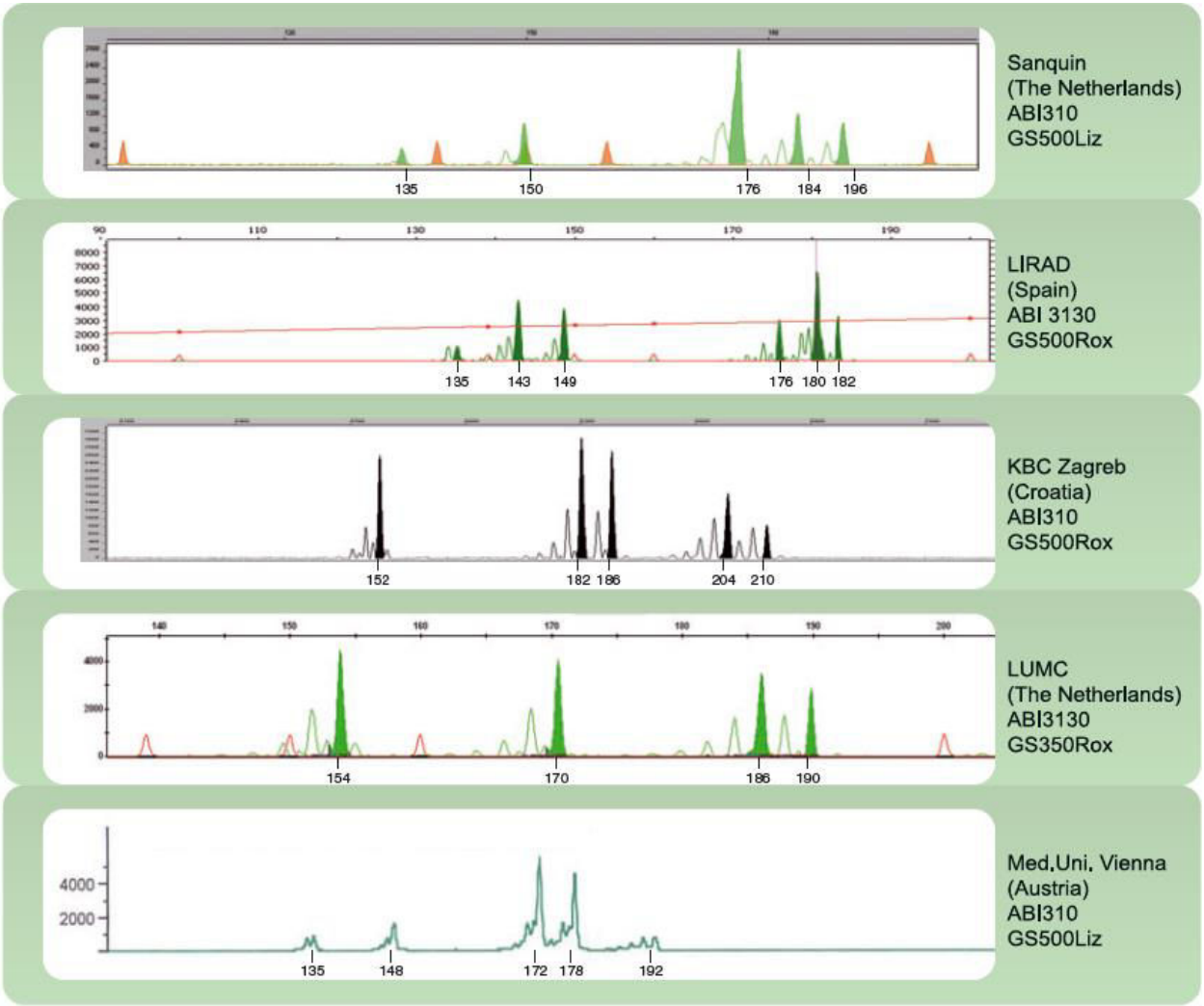


Figure 1 Exemple d'électrophorégrammes présentant les allèles du microsatellite D6S2878 chez cinq sujets humains, d'après Doxiadis et al. (2009). Les pics colorés représentent les allèles identifiés, leur taille étant indiquée sous le pic.

Cette méthode permet également de s'affranchir de la complexité structurelle du CMH, souvent inconnue chez des espèces non modèles, et peut être envisagée pour toute espèce, notamment pour des espèces menacées. Cependant, un défi méthodologique est à relever car pour ces espèces le suivi génétique est souvent non invasif afin de limiter toute perturbation. Les échantillons non invasifs

présentent l'inconvénient d'être de mauvaise qualité (faible concentration, fragmenté, dégradé) ne permettant pas d'amplifier de façon fiable le fragment de 270pb de l'exon 2 du *DRB*. La variabilité génétique des populations étudiées à partir des échantillons non invasifs se fait souvent à partir de marqueurs microsatellites permettant d'amplifier des fragments de petites tailles (Taberlet et al. 1996; Broquet et al. 2007). La méthode d'haplotypage du CMH par le marqueur lié D6S2878 apparait donc comme prometteuse pour ces espèces. Le génotypage de ce microsatellite à partir d'échantillons non-invasifs (fèces) a été réalisé avec succès chez le gibbon cendré (*Hylobates moloch*, de Groot et al. 2017) et le macaque d'Assam (*Macaca assamensis*, Müller et al. 2014).

L'objectif de notre étude est de développer l'haplotypage du CMH via ce marqueur lié pour le gorille des plaines de l'Ouest (*Gorilla gorilla gorilla*). Pour valider cette méthode il est nécessaire de vérifier i) si le marqueur permet d'amplifier plusieurs allèles et si des associations préférentielles entre allèles peuvent être détectées, ii) si pour les individus dont les séquences de l'exon 2 sont connues (voir chapitre 4), la variabilité des allèles du marqueur microsatellite reflète la variabilité de ces séquences, iii) si la ségrégation mendélienne des allèles du marqueur entre individus apparentés est bien vérifiée. Si ces propriétés sont vérifiées, l'utilisation de ce marqueur microsatellite permettra d'analyser la variabilité de la région *DRB* du CMH à l'échelle populationnelle. Afin d'étudier la variation spatiale de la diversité de ce gène, nous avons travaillé sur des échantillons de trois populations : Lokoué, Lossi et Romani. Pour Lokoué et Lossi, deux populations qui ont subi une épidémie à virus Ebola (Bermejo et al., 2006 ; Caillaud et al., 2006), nous avons considéré des individus en périodes pré-Ebola et post-Ebola afin de tester si la variabilité du CMH était affectée par cette perturbation.

II Matériel et Méthodes

a) Schéma d'échantillonnage

Les prélèvements fécaux proviennent de trois populations distinctes de gorilles des plaines de l'ouest en République du Congo (Fig. 3 du chapitre 1). La population de Lossi est localisée dans une forêt au sud-est du parc national d'Odzala-Kokoua (Bermejo et al. 2006) tandis que les populations de Lokoué (Gatti et al. 2004) et Romani sont situées au sein de ce parc (Genton et al. 2012). Les échantillons ont été collectés entre 2000 et 2007 (Lossi), 2000 à 2014 (Lokoué) et 2008 (Romani). Deux des populations ont

subi une épidémie à virus Ebola en 2002/2003 pour Lossi et 2004 pour Lokoué. Les fèces sont collectées de manière à éviter les contaminations par de l'ADN humain, desséchés dans du gel de silice directement sur le terrain puis stockés à -80° au laboratoire. L'ADN est extrait en suivant la méthode décrite dans Vallet et al. (2008).

Genotypage

Afin d'obtenir les haplotypes de l'exon 2 de la région *DRB* du CMH, 30 individus ont été séquencés par pyroséquençage 454 (Next Generation Sequencing) en utilisant une nouvelle amorce permettant l'amplification d'un fragment court de l'exon 2 (voir chapitre 4, cette thèse).

Ces 30 individus ainsi que 125 autres individus (Lokoué 72 individus, Lossi 32 individus, Romani 50 individus, un individu de zoo) ont été génotypés pour le marqueur microsatellite D6S2878. Les conditions de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été optimisées telles que la solution initiale contenait : 1,35µL de tampon, 0,11µL de dNTP, 0,14µL de chaque amorce (l'amorce reverse étant marquée fluorescente), 0,12µL d'amplitaq polymerase, 1,2µL d'ADN puis du ddH2O pour un volume total de 12µL. Les conditions de PCR consistent en un premier cycle de 15min à 95° ; puis cinq cycles d'une minute à 94°, 45 secondes à 58 degrés, 45 secondes à 72° ; suivi de 45 cycles de 45 secondes à 94°, 30 secondes à 58° et 45 secondes à 72°. La phase d'élongation consiste en dix minutes à 72°. Les échantillons ainsi amplifiés sont alors maintenus à 4°. La taille des fragments amplifiés est détectée sur un séquenceur à ADN 3130X (Applied Biosystems) et analysée en utilisant le logiciel GeneMapper (Applied Biosystems) grâce au marqueur de taille LIZ500.

Parmi les échantillons analysés nous disposons de deux pedigrees complets, les familles d'Apollo (un dos argenté, quatre femelles reproductrices, cinq descendants) et d'Ares (un dos argenté, six femelles reproductrices, huit descendants) issus de la population de Lossi. Concernant la famille d'Apollo, une femelle ainsi que son fils ont été séquencés par NGS, de même que deux autres enfants frère et sœur.

b) Analyses

Le taux de faux allèles (FA) a été calculé par individu comme le nombre d'amplifications pour lesquelles un faux allèle est détecté sur le nombre total d'amplifications. Le taux d'*allelic dropout* (ADO) est défini comme le nombre d'amplifications pour lesquelles tous les allèles du génotype consensus n'ont pas été amplifiés, sur le nombre total d'amplifications pour l'individu. Le nombre de répétitions nécessaires *nr* pour l'obtention d'un génotype complet est estimé avec une probabilité $P = \frac{1}{1000}$, $P = ADO^n$.

Le déséquilibre de liaison D a été calculé comme suit : $D = P_{ij} - P_i \times P_j$ j, avec P_{ij} la fréquence relative du génotype comprenant les allèles i et j, P_i et P_j les fréquences relatives des allèles i et j. Le déséquilibre de liaison pour chaque génotype a été testé grâce à un test de χ^2 de conformité avec $\chi^2{}_{obs} = \frac{D^2}{P_i \times P_j}$, le degrés de liberté $= n_{ij} - 1$, et $\chi^2{}_{théorique}$ est fixé avec un seuil à 0,01. Le taux d'hétérozygotie H est calculé comme suit : $H = \left(\frac{n}{n-1}\right) \times (1 - \sum f_i{}^2)$, avec n la taille de l'échantillon et f_i la fréquence observée d'un génotype (plusieurs allèles) donné. Le nombre d'allèles moyen par individu et total, le déséquilibre de liaison et l'hétérozygotie observée sont calculés pour l'échantillon total, ainsi que pour les cinq sous populations : Lokoué pré-Ebola, Lokoué post-Ebola, Lossi pré-Ebola, Lossi post-Ebola et Romani.

Pour les individus appartenant aux familles d'Apollo et Ares, la concordance entre le génotypage et les pedigrees a été analysée.

Le lien entre la variabilité du marqueur microsatellite et le nombre de séquences détectées par NGS a été testé par un test de corrélation de Spearman. L'association des génotypes du marqueur microsatellite aux groupes de liaison des *DRB* connus chez le gorille a été analysée.

III Résultats

Chez le gorille des plaines de l'ouest, le D6S2878 présente un patron de lecture unique constitué de quatre pics (Fig 2). Le choix a été fait de conserver le plus grand des pics. Sur l'ensemble des deux populations 155 individus ont été testés, pour un total de 1148 PCRs. Nous avons ainsi pu génotyper 87

individus ayant au moins un allèle confirmé. Travaillant sur de l'ADN fécal dégradé, un allèle a été confirmé s'il a été vu au moins dans deux PCR indépendantes, avec trois répliquâts par PCR. Le taux d'*allelic dropout* est de 0,37 (±0,28), le taux de faux allèles est de 0,27 (±0,31). Le nombre moyen de répétitions par individu est de 7,95 (±3,00) et 7 répétitions sont estimées nécessaires pour obtenir un génotypage complet. Le taux d'hétérozygotie est de 0,94 pour l'ensemble de la population (Tab 1).

Sur l'ensemble des 87 individus, treize allèles ont été détectés variant de 6 à 9 allèles par sous populations. Le nombre moyen d'allèles par individus est de 2.34. Entre les périodes pre et post épidémiques, nous n'avons pas détecté de différence de nombre d'allèles moyen par individu. 55% et 60% des allèles sont partagés entre les deux périodes à Lokoué et à Lossi respectivement.

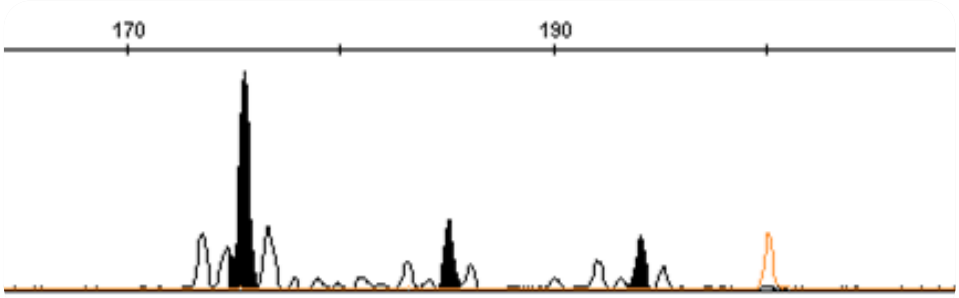


Figure 2 Electrophoregramme du D6S2878 observé chez le gorille avec le logiciel Genemapper, les pics retenus sont noircis.

Le déséquilibre de liaison a été testé au sein du D6S2878, pour la population totale, l'association entre les allèles 139, 170 et 189 est plus fréquente qu'attendue par indépendance d'association ($\chi^2{}_{obs} = 88.78$, $\chi^2{}_{théorique} = 13.82$, $ddl = 2$, $P = 0.01$). En ce qui concerne les sous populations, seule la population de Lossi présente des déséquilibres de liaison. En période pré-Ebola, les associations 144/177/185/195 et 177/180/185/189 sont plus fréquentes qu'attendues (respectivement $\chi^2{}_{obs} = 30.22$, $\chi^2{}_{théorique} = 16.27$, $ddl = 3$, $P = 0.01$ et $\chi^2{}_{obs} = 16.80$, $\chi^2{}_{théorique} = 16.27$, $ddl = 3$, $P = 0.01$). En période post-Ebola, le génotype 139/170/189 présente un déséquilibre de liaison ($\chi^2{}_{obs} = 75.89$, $\chi^2{}_{théorique} = 13.82$, $ddl = 2$, $P = 0.01$).

Tableau 1 Analyse de la diversité du D6S2878 selon la sous population considérée. N représente le nombre d'individus pour lesquels il a été possible d'obtenir un génotypage complet, $N_{allèles}$ le nombre d'allèles observés dans la sous-population, $Nind_{moyen}$ le nombre moyen d'allèles par individu avec l'écart type entre parenthèses, H_{obs} le taux d'hétérozygotie observée.

	Lokoué		Lossi		Romani	Total
	Pré-Ebola	Post-Ebola	Pré-Ebola	Post-Ebola		
N	25	21	24	7	10	87
$Ntotal_{allèles}$	6	8	9	7	6	13
$Nind_{moyen}$	2.12 (0.6)	2.00 (0.55)	2.71 (0.91)	2.28 (0.49)	2.80 (0.41)	2.34 (0.73)
H_{obs}	0.72	0.81	0.96	0.78	0.87	0.94

L'analyse des pedigrees a permis de mettre en évidence trois cas d'inconsistance entre les génotypes des parents et de l'enfant (lignes en rouge, Fig 3). Cependant, la prise en compte d'allèles non confirmés (observés dans moins de deux PCR indépendantes) dans les génotypes des parents ou du descendant, en gras dans la figure 3, permettrait d'obtenir des génotypes en accord avec les pedigrees connus.

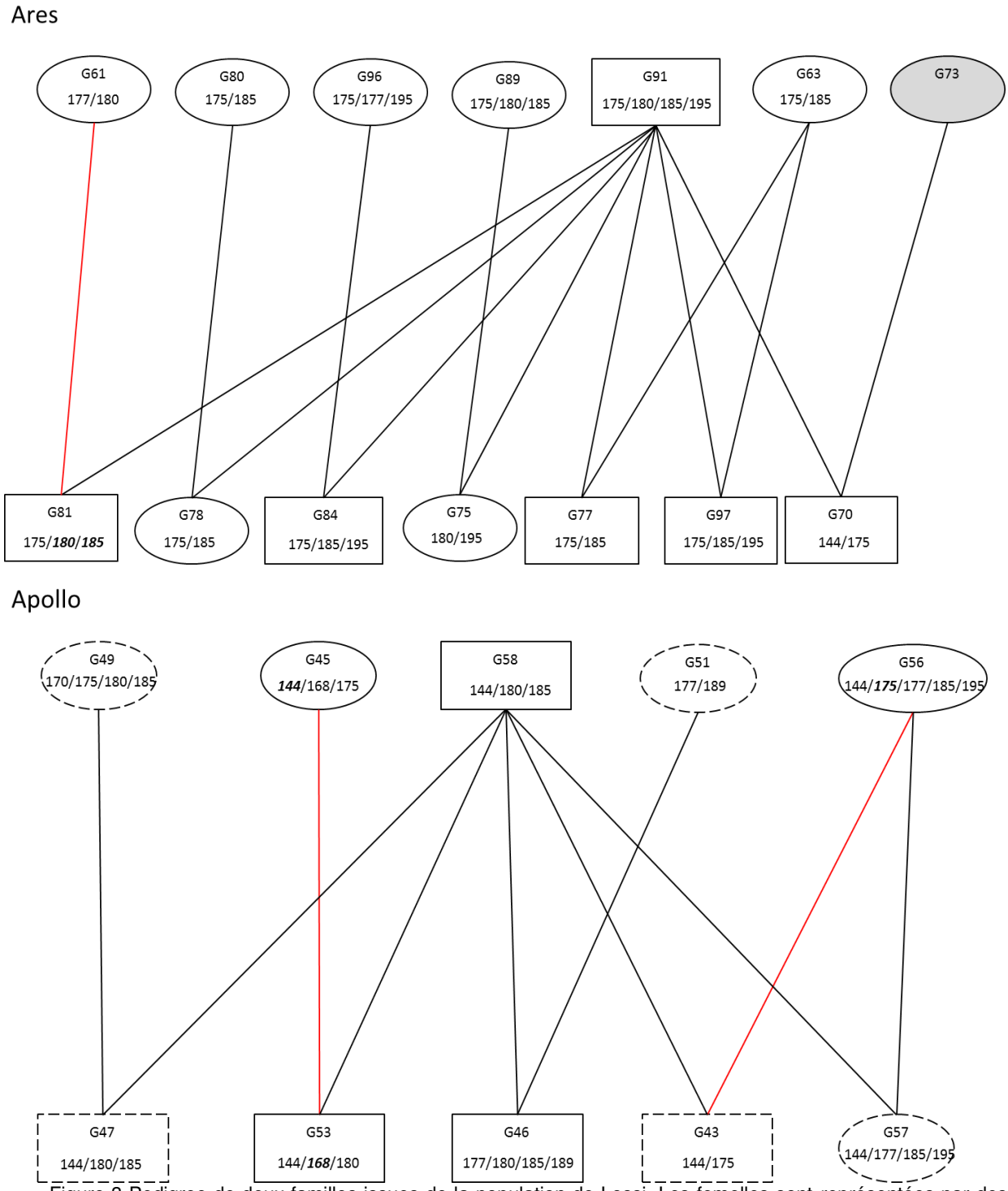


Figure 3 Pedigree de deux familles issues de la population de Lossi. Les femelles sont représentées par des ronds, les mâles par des carrés. Les génotypes au D6S2878 sont indiqués pour chaque individu. Les formes grisées représentent des individus de la famille pour lesquels le génotype du microsatellite n'a pas pu être confirmé. Les traits rouges indiquent la présence d'un allèle chez le descendant qui n'est pas retrouvé chez les parents si l'on ne considère pas les allèles non confirmés en gras. Les allèles inscrits en gras sont « non confirmés ». Les formes en pointillés indiquent les individus séquencés par NGS.

Le nombre d'allèles du marqueur microsatellite et le nombre de séquences *DRB* connues ne sont pas corrélées (r = 0.27, P = 0.16). L'analyse de l'association des génotypes identifiés pour le marqueur D6S2878 et des groupes de liaison *DRB* porté par les individus (tableau 2, détail dans le tableau supplémentaire 1, chapitre 4 de cette thèse) permet de mettre en avant que l'allèle 144 est toujours lié au groupe de liaison I. cependant deux individus appartenant au groupe de liaison I n'ont pas l'allèle 144. Nous n'avons pas pu identifier d'allèles ou d'association d'allèles spécifique au groupe de liaison II. Le groupe d'association IV (n=5) est toujours associé au génotype 175/185. Toutefois ce génotype n'est pas exclusif pour ce groupe d'association puisqu'il est également associé aux deux autres groupes de liaison détectés.

Tableau 2 Association des génotypes identifiés pour le marqueur D6S2878 et des groupes de liaison du des *DRB* du CMH porté par les individus. Groupe I : *DRB*1*10-*DRB*6*01-*DRB**W8, groupe II : *DRB*1*03-*DRB*3*01/04-*DRB*5*01/05-*DRB*6*02, groupe IV *DRB*1*03-*DRB*3*04.

D6S2878	Groupe de liaison *DRB*		
	I	II	IV
144/175	1		
144/177/185/195	1		
144/180/185	2		
175/192	1		
177/185		1	
175/177		1	
185/200		1	
175/185/192		1	
170/175/180/185		1	
175/185	1	1	5
Total	6	6	5

IV DISCUSSION

Cette étude est la première à utiliser un microsatellite lié à la région *DRB* du CMH chez le gorille des plaines de l'ouest. L'amplification de ce marqueur a permis d'identifier 13 allèles sur 87 individus avec une étendue de 139pb à 200pb. La diversité par individu est relativement faible (en moyenne 2.34 allèles par individu) comparé à ce qui est observé chez le chimpanzé (6 à 10 allèles par individu, de Groot et al. 2009) ou chez l'homme (50 allèles en tout Doxiadis et al. 2009). Nous n'avons détecté que quelques associations d'allèles du D6S2878 dans la population de Lossi. Nous avons pu établir une seule association forte entre un allèle du D6S2878 et un groupe de liaison de *DRB* connu. L'établissement de l'haplotypage est donc moins abouti que pour les espèces de primates modèles déjà étudiées pour lesquels chaque séquence de *DRB* peut être associée à un allèle du D6S2878 (Doxiadis et al. 2007; López et al. 2014; de Groot et al. 2017). Nous n'avons pas détecté de corrélation entre le nombre d'allèles du marqueur microsatellite D6S2878 et celui des gènes *DRB* du CMH. Cependant ceci peut être dû au fait que deux *DRB* différents peuvent être liés à des allèles D6S2878 de même taille. Par exemple en étudiant le génome du gorille publié pour un individu (Scally et al. 2012), nous avons pu détecter que deux allèles étaient attendus pour le D6S2878 alors que l'individu présente trois *DRB* différents.

La difficulté de la mise en place de cet haplotypage peut être liée au fait que la variabilité de ce marqueur au sein de notre échantillon n'est pas suffisante pour permettre l'association des différents génotypes microsatellites à des allèles *DRB*. Ceci peut provenir d'un biais d'échantillonnage car seuls 30 individus sont utilisés pour faire le lien entre le marqueur microsatellite et le CMH, ceux-ci pouvant être non représentatifs de l'ensemble de la population. Cette hypothèse semble peu probable car sur les 13 allèles observés sur l'ensemble de notre échantillon (n=87), dix sont retrouvés dans notre sous-échantillon d'analyse NGS. La faible variabilité observée au locus D6S2878 pourrait provenir d'une faible diversité génétique des populations étudiées. Cependant, dans une étude sur des marqueurs neutres dans les populations de Lossi et Lokoué, les taux de polymorphisme et d'hétérozygotie observée indiquent une diversité génétique de bon niveau par rapport aux autres populations de gorilles sauvages (Le Gouar et al. 2009). Une différence de diversité entre des marqueurs neutres et sélectionnés (tel que le

CMH) peut aussi être un signe de balayage sélectif. Par exemple, une épidémie antérieure aux épidémies à virus Ebola observées dans nos populations d'étude pourrait avoir réduit la diversité du CMH en sélectionnant certains génotypes résistants, comme cela a pu être observé pour le CMH I du chimpanzé (Groot et al. 2002).

Enfin, il est possible que la détection de nouveaux allèles D6s2878 soit limitée par la difficulté de lecture de ce marqueur microsatellite. En effet, comme présenté sur la figure 2, ce marqueur présente un patron inhabituel étalé sur quatre paires de bases s'expliquant par son motif de répétition complexe. Ceci empêche la distinction de certains allèles séparés par une ou deux paires de bases comme établi chez l'humain et le macaque rhésus (Fig 1; Doxiadis et al. 2009). Afin de parer aux difficultés dues au locus D6S2878, il est possible d'utiliser un ou plusieurs autres locus microsatellites liés au CMH chez d'autres primates. Ainsi, nous pourrions obtenir une combinaison d'haplotypes entre les différents microsatellites, permettant de couvrir une plus grande diversité de *DRB* (Penedo et al. 2005).

L'analyse des pedigrees des familles d'Ares et Apollo nous a permis de constater que l'obtention du génotypage complet des individus demande de nombreuses répétitions. En effet, la prise en compte d'allèles non-confirmés chez un des parents ou le descendant résout les incohérences observées. Cependant, le processus de confirmation des allèles doit rester strict afin de réduire le nombre de faux allèles. L'obligation de réaliser au moins deux PCR indépendantes est contraignante mais a permis de révéler une influence de la PCR considérée sur la présence de faux allèles et artefacts, sans pour autant que cela soit lié à une contamination. L'analyse de la ségrégation des allèles du marqueur microsatellite lié au sein des pedigrees peut permettre de déterminer la liaison entre les allèles chez les parents. En effet du fait de la liaison physique des différents *DRB* proches sur le chromosome 6, les allèles du D6S2878 ne ségrégent pas de façon indépendante. Cependant le nombre de *DRB* pour chaque individu n'est pas connu, ce qui fait qu'il est difficile de déterminer le genotype par locus *DRB*. Ainsi un génotype 175/185/190 peut être issu d'une association de trois *DRB* tous homozygotes ou de deux hétérozygotes et un homozyote, etc… L'étude des associations d'allèles transmises aux descendants peut permettre de résoudre ces interrogations. Les possibilités d'associations étant nombreuses, il est nécessaire d'avoir beaucoup de descendants pour déterminer les associations les plus probables chez les parents sachant

le génotype des descendants. Un modèle probabiliste est en cours de développement afin de déterminer les haplotypes grâce aux informations de pedigree (collaboration avec JS Pierre).

Bien que l'haplotypage des CMH par le marqueur D6S2878 ne soit pas complet et nécessite encore des développements, nous pensons que l'étude de la variabilité de ce marqueur dans une population ayant subi une perturbation, telle qu'une épidémie à virus Ebola, permet de comprendre son impact sur un marqueur sélectionné. La comparaison entre des populations perturbées comme celles de Lossi et Lokoué, avec des populations non-perturbées comme celle de Romani peut apporter des informations sur les conséquences d'une épidémie sur les gènes du CMH. En effet, notre étude montre que la diversité génétique de la population de Lokoué n'a pas été affectée par l'épidémie, les niveaux de diversité et de déséquilibre étant similaire avant et après l'épidémie. Cependant, dans la population de Lossi, les génotypes présents ainsi que les déséquilibres de liaisons sont différents entre les deux périodes d'étude. Ceci peut s'expliquer par l'arrivée de nouveaux individus dans la population, amenant de nouveaux génotypes. On peut également imaginer une modification des appariements suite à l'épidémie à virus Ebola dans cette population si les individus prélevés après l'épidémie sont des juvéniles. Cette différence de réponse entre les deux populations a aussi été observée lors de l'analyse de la diversité génétique de marqueurs neutres (Le Gouar et al. 2009). Une étude sur l'impact d'une épidémie sur la diversité génétique du CMH a été réalisée chez le diable de Tasmanie (*Sarcophilus harrisii*) touché par un cancer infectieux se transmettant par la morsure (Lachish et al. 2007). Les populations de diable de Tasmanie ont subi un fort déclin suite à cette maladie létale. L'étude de six microsatellites liés au CMH a permis d'écarter l'hypothèse d'allèles résistants (Lane et al. 2012) et donc d'avancer dans l'étude épidémiologique de cette espèce désormais en danger d'extinction. De mêmes objectifs pourraient être atteints chez le gorille des plaines de l'ouest, après la mise au point de la méthode du génotypage du D6S2878.

De plus la diminution du coût et du temps d'analyse nécessaires apportée par l'utilisation du D6S2878 pourrait être un vrai atout dans l'étude du choix de partenaire chez le gorille. En effet, l'implication du CMH dans le choix de partenaire reproducteur a été montrée chez plusieurs espèces de

vertébrés (Huchard et al. 2010; Jaworska et al. 2017). L'étude des génotypes des mâles à dos argentés choisis par les femelles permettrait de déterminer s'ils portent des allèles particuliers par rapport aux mâles non choisis ou si les allèles qu'ils portent sont très différents de ceux des femelles. L'étude du CMH au niveau populationnel permettrait d'étudier son importance dans des populations sauvages de manière non-invasive et de comprendre les règles d'appariement qui régissent la dynamique de cette espèce.

Matériel supplémentaire

Tableau S1 Présentation des individus utilisés pour le génotypage du D6S2878 ayant également été séquencés par NGS pour la région du CMH-*DRB*. La période indique si les prélèvements ont été effectués avant (PRE) ou après (POST) l'épidémie à virus Ebola. La nomenclature pour les différents *DRB* est lignée *allèle pour les séquences issues de NCBI, WLGX pour les séquences issues de Hans et al 2015. Les lettres A, B, C… suivant la lignée concernent les nouveaux allèles détectés dans cette thèse.

Individu	Population	Période	D6S5878	Linkage group	CMH							
					*DRB*1		*DRB*3	*DRB*5		*DRB*	*DRB*6	
G107	Lokoué	PRE	175/185/195		03*09	03*11		01*01			02*A	01*03
G126	Lokoué	PRE	175/185/195		03*08	03*11					MG3	
G139	Lokoué	PRE	175/177	II	03*08		04*01	01*01			02*A	
G156	Lokoué	PRE	175/185	IV	03*08		04*01	01*01			01*03	
G206	Lokoué	PRE	175/185	IV	03*D	10*01	04*B	WLG1*A			01*03	
G212	Lokoué	PRE	175/185/192				04*01	WLG2			02*A	01*03
G221	Lokoué	PRE	175/185	IV	03*08		04*01	01*01				
G240	Lokoué	PRE	175/185/192	II	03*08	03*09	04*01	05*A	01*01		02*A	01*03
G606	Lokoué	POST	175/185		A		04*01	01*01			01*03	
G607	Lokoué	POST	175/185		A	10*02	04*01	WLG1*A			02*04	
G610	Lokoué	POST	175/192	I	10*B			05*B		W8*02	02*04	01*03
G612	Lokoué	POST	175/185	I	A	10*02				W8*02	02*04	01*03
G613	Lokoué	POST	144/180/185	I	10*B	01*07	04*01	01*01		W8*02	01*03	
G614	Lokoué	POST	177/185	II	03*10		01*07	05*05			02*04	01*03
G669	Lokoué	POST	175/185/192		B		04*01	01*01	WLG2		02*04	01*03
G765	Lokoué	POST	185/200	II	03*07		01*07	05*01	05-B		02*04	01*03
G43	Lossi	PRE	144/175	I	10*B					W8*02	02*04	01*03
G47	Lossi	PRE	144/180/185	I	10*B		01*07	05*A		W8*02	02*04	01*03
G49	Lossi	PRE	170/175/180/185	II	03*B		04*01	01*01	01*02		02*04	01*03
G51	Lossi	PRE	177/189				01*07	01*01			01*03	
G57	Lossi	PRE	144/177/185/195	I	03*11	10*B				W8*02	02*04	01*03
G50	Lossi	PRE	144/170/175/185		10*B	A	04*A	01*B			02*04	01*03
G694	Lossi	POST	175/185		10*02	A	04*01	01*B				
G852	Lossi	POST	175/185	IV	03*08	03*09	04*01	01*01			01*03	
G863	Lossi	POST	144/175/185		10*02		04*01	01*01			01*03	
G864	Lossi	POST	175/185		10*02	A	04*01	01*01			02*04	01*03
G866	Lossi	POST	139/170/189		03*A	10*B					02*04	01*03
G871	Lossi	POST	180/185		03*07	10*A					02*04	01*03
G873	Lossi	POST	175/185	IV	03*E	03*B	04*B				02*04	01*03
G152s	St Martin la Plaine	zoo	175/185	II	03*07		04*01	05*01			02*04	01*03

Références

Babik W (2010) Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. Mol Ecol Resour 10:237–251 . doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02788.x

Bak EJ, Ishii Y, Omatsu T, et al (2006) Identification and analysis of MHC class II DRB1 (Patr-DRB1) alleles in chimpanzees. Tissue Antigens 67:134–142 . doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00539.x

Bergström TF, Engkvist H, Erlandsson R, et al (1999) Tracing the Origin of HLA-DRB1 Alleles by Microsatellite Polymorphism. Am J Hum Genet 64:1709–1718 . doi: 10.1086/302401

Bermejo M, Rodríguez-Teijeiro JD, Illera G, et al (2006) Ebola Outbreak Killed 5000 Gorillas. Science 314:1564–1564 . doi: 10.1126/science.1133105

Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? J Evol Biol 16:363–377 . doi: 10.1046/j.1420-9101.2003.00531.x

Broquet T, Ménard N, Petit E (2007) Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conserv Genet 8:249–260 . doi: 10.1007/s10592-006-9146-5

de Groot N de, Doxiadis GGM, Vos-Rouweler AJM de, et al (2008) Comparative genetics of a highly divergent DRB microsatellite in different macaque species. Immunogenetics 60:737–748 . doi: 10.1007/s00251-008-0333-z

de Groot N de, Stanbury K, Vos-Rouweler AJM de, et al (2017) A quick and robust MHC typing method for free-ranging and captive primate species. Immunogenetics 69:231–240 . doi: 10.1007/s00251-016-0968-0

de Groot NG, Heijmans CMC, de Groot N, et al (2009) The chimpanzee Mhc-DRB region revisited: Gene content, polymorphism, pseudogenes, and transcripts. Mol Immunol 47:381–389 . doi: 10.1016/j.molimm.2009.09.003

Doxiadis GGM, de Groot N de, Claas FHJ, et al (2007) A highly divergent microsatellite facilitating fast and accurate DRB haplotyping in humans and rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci 104:8907–8912 . doi: 10.1073/pnas.0702964104

Doxiadis GGM, de Groot N, Dauber E-M, et al (2009) High resolution definition of *HLA-DRB* haplotypes by a simplified microsatellite typing technique. Tissue Antigens 74:486–493 . doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01369.x

Epplen C, Santos EJM, Guerreiro JF, et al (1997) Coding versus intron variability: extremely polymorphic HLA-DRB1 exons are flanked by specific composite microsatellites, even in distant populations. Hum Genet 99:399–406 . doi: 10.1007/s004390050379

Gatti S, Levréro F, Ménard N, Gautier-Hion A (2004) Population and group structure of western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Lokoué, Republic of Congo. Am J Primatol 63:111–123 . doi: 10.1002/ajp.20045

Genton C, Cristescu R, Gatti S, et al (2012) Recovery Potential of a Western Lowland Gorilla Population following a Major Ebola Outbreak: Results from a Ten Year Study. PLOS ONE 7:e37106 . doi: 10.1371/journal.pone.0037106

Groot NG de, Otting N, Doxiadis GGM, et al (2002) Evidence for an ancient selective sweep in the MHC class I gene repertoire of chimpanzees. Proc Natl Acad Sci 99:11748–11753 . doi: 10.1073/pnas.182420799

Haig D (1997) Maternal-fetal interactions and MHC polymorphism. J Reprod Immunol 35:101–109 . doi: 10.1016/S0165-0378(97)00056-9

Huchard E, Knapp LA, Wang J, et al (2010) MHC, mate choice and heterozygote advantage in a wild social primate: MHC and reproductive strategies in Baboons. Mol Ecol no-no . doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04644.x

Huchard E, Pechouskova E (2014) The Major Histocompatibility Complex and Primate Behavioral Ecology: New Tools and Future Questions. Int J Primatol 35:11–31 . doi: 10.1007/s10764-013-9700-1

Jaworska J, Rapacz-Leonard A, Janowski TE, Jezierski T (2017) Does the Major Histocompatibility Complex influence choice of mate in humans and other mammals? - A review. Anim Sci Pap Rep 35:107–122

Kenter M, Otting N, de Weers M, et al (1993) Mhc-DRB and-DQA1 nucleotide sequences of three lowland gorillas. Hum Immunol 36:205–218 . doi: 10.1016/0198-8859(93)90127-M

Klein J, Sato A (2000) The HLA System. N Engl J Med 343:702–709 . doi: 10.1056/NEJM200009073431006

Knapp L a. (2005) Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. Tissue Antigens 65:211–219 . doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00368.x

Kriener K, O'hUigin C, Tichy H, Klein J (2000) Convergent evolution of major histocompatibility complex molecules in humans and New World monkeys. Immunogenetics 51:169–178 . doi: 10.1007/s002510050028

Lachish S, Jones M, Mccallum H (2007) The impact of disease on the survival and population growth rate of the Tasmanian devil. J Anim Ecol 76:926–936 . doi: 10.1111/j.1365-2656.2007.01272.x

Lane A, Cheng Y, Wright B, et al (2012) New Insights into the Role of MHC Diversity in Devil Facial Tumour Disease. PLOS ONE 7:e36955 . doi: 10.1371/journal.pone.0036955

Le Gouar PJ, Vallet D, David L, et al (2009) How Ebola Impacts Genetics of Western Lowland Gorilla Populations. PLoS ONE 4:e8375 . doi: 10.1371/journal.pone.0008375

López C, Suárez CF, Cadavid LF, et al (2014) Characterising a Microsatellite for DRB Typing in Aotus vociferans and Aotus nancymaae (Platyrrhini). PLOS ONE 9:e96973 . doi: 10.1371/journal.pone.0096973

Müller N, Ostner J, Schülke O, Walter L (2014) Towards the non-invasive assessment of MHC genotype in wild primates: Analysis of wild assamese macaque MHC-DRB from fecal samples. Am J Primatol 76:230–238 . doi: 10.1002/ajp.22225

Penedo MCT, Bontrop RE, Heijmans CMC, et al (2005) Microsatellite typing of the rhesus macaque MHC region. Immunogenetics 57:198–209 . doi: 10.1007/s00251-005-0787-1

Penn DJ, Potts WK (1999) The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. Am Nat 153:145–164 . doi: 10.1086/303166

Piertney SB, Oliver MK (2005) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. Heredity 96:7–21 . doi: 10.1038/sj.hdy.6800724

Reche PA, Reinherz EL (2003) Sequence Variability Analysis of Human Class I and Class II MHC Molecules: Functional and Structural Correlates of Amino Acid Polymorphisms. J Mol Biol 331:623–641 . doi: 10.1016/S0022-2836(03)00750-2

Scally A, Dutheil JY, Hillier LW, et al (2012) Insights into hominid evolution from the gorilla genome sequence. Nature 483:169–175 . doi: 10.1038/nature10842

Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front Zool 2:16

Spurgin LG, Richardson DS (2010) How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. Proc R Soc Lond B Biol Sci rspb20092084 . doi: 10.1098/rspb.2009.2084

Taberlet P, Griffin S, Goossens B, et al (1996) Reliable Genotyping of Samples with Very Low DNA Quantities Using PCR. Nucleic Acids Res 24:3189–3194 . doi: 10.1093/nar/24.16.3189

Vallet D, Petit EJ, Gatti S, et al (2008) A new 2CTAB/PCI method improves DNA amplification success from faeces of Mediterranean (Barbary macaques) and tropical (lowland gorillas) primates. Conserv Genet 9:677 . doi: 10.1007/s10592-007-9361-8

Watts C (1997) Capture and Processing of Exogenous Antigens for Presentation on Mhc Molecules. Annu Rev Immunol 15:821–850 . doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.821

Yeager M, Hughes AL (1999) Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. Immunol Rev 167:45–58 . doi: 10.1111/j.1600-065X.1999.tb01381.x

Chapitre 6

Chapitre 6 : Etudes préliminaires

I Etude du choix de partenaire chez le magot

a) Objectifs

La grande variabilité des systèmes sociaux chez les primates en fait un groupe très intéressant pour l'étude de l'impact des systèmes sociaux sur le fonctionnement démographique et génétique des populations. Il existe des espèces solitaires et des espèces qui vivent en paires ou en groupes sociaux. On va aussi retrouver tous les types d'appariement : polyandrie, polyginie ou polygynandrie. Les relations entre les mâles et les femelles vont dépendre du temps de résidence des mâles dans le groupe, de la hiérarchie intra-sexuelle, du degré de certitude de paternité, du risque d'infanticide et du dimorphisme sexuel. Les modalités de choix du partenaire peuvent donc varier avec le système social. Au cours du travail de thèse, la question du choix de partenaire a été étudiée chez le gorille des plaines de l'Ouest, qui présente une structuration sociale en groupes reproducteurs, non reproducteurs et individus solitaires (Gatti et al. 2004). L'appariement est de type polygyne, avec un seul mâle reproducteur par groupe, plusieurs femelles reproductrices et leurs descendants. Afin de mettre en évidence une influence de la structure sociale sur le choix de partenaire, il était nécessaire de travailler sur une espèce au système contrasté par rapport à celui du gorille. Ainsi, la comparaison avec une espèce présentant des groupes sociaux multi-mâles multi-femelles, avec un mode d'appariement avec plus ou moins de promiscuité semblait suffisamment contrastée pour analyser l'influence du système social sur le choix de partenaire. On retrouve ce type de système social chez les 22 espèces de macaques, dont les groupes sont structurés par les lignées matriarcales, les femelles étant philopatriques, avec une hiérarchie de dominance et une tolérance entre femelles variables selon les espèces (Thierry 2007). Les mâles sont quant à eux amenés à changer régulièrement de groupe et leur statut de dominance évolue au cours de leur vie. La diversité au sein des macaques en fait un groupe particulièrement intéressant pour l'étude des relations entre différents traits comportementaux.

Le magot (*Macaca sylvanus*) est la seule espèce de primate vivant au nord du Sahara, et la seule espèce de macaque en dehors de l'Asie (Fa 2012). Cette espèce autrefois répandue en Afrique du nord et en Europe n'est désormais présente que dans des populations relictuelles en Algérie et au Maroc (Ménard and Vallet 1993; Fa 2012). Au Maroc, la population est estimée entre 6000 et 10000

individus (Ross 2004) et a subi un déclin de 50% au cours des trois dernières décennies (Ciani et al. 2005; Ménard et al. 2014). Le massif forestier du Moyen Atlas héberge les principales populations de magots sauvages mais subit une importante pression de pâturage, fragmentant l'environnement des magots et isolant les populations (Ménard et al. 2014). Cette espèce est classée en danger d'extinction depuis 2008 (IUCN 2008).

Les magots vivent en groupes multi-mâles multi-femelles de 10 à plus de 80 individus (Ménard 2002). Les groupes sociaux sont composés d'une lignée matriarcale avec dispersion des mâles arrivés à maturité sexuelle. L'âge de maturité sexuelle est d'environ 3.5-4 ans pour les femelles et 4.5-7 ans pour les mâles. L'âge de première mise bas est d'environ 5.3 ans pour les femelles, avec un intervalle entre deux naissances d'environ 1.3 ans (Ménard and Vallet 1993; Lindenfors 2002). Les sociétés de magots fonctionnent en groupes sociaux habituellement stables (Ménard and Vallet 1993), bien qu'on puisse observer des événements de fusion-fission avec des sous-groupes 15-20 individus dans des milieux contraints (Ménard et al. 1990; Ménard 2002). Les appariements sont de types polygynandrie. Les mâles et les femelles se reproduisent avec plusieurs partenaires. Les comportements de coopération dans l'élevage des jeunes sont très développés (Ménard 2002).

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'existence éventuelle d'un choix de partenaire reproducteur sur la base de leurs caractéristiques génétiques. Pour répondre à cette question, il a fallu établir les pedigrees au sein de plusieurs groupes sociaux. En effet, dans un système d'appariement par promiscuité, une femelle peut s'accoupler avec plusieurs mâles au cours d'une saison de reproduction, rendant incertaine l'identification du père. L'utilisation de marqueurs microsatellites neutres permet d'établir les relations de parentés entre individus et ainsi de préciser quels sont les individus qui se sont reproduits ensemble dans un groupe focal. Une fois les triades père-mère-enfant établies, il est possible de se concentrer sur les gènes d'intérêts dans la sélection de partenaire reproducteur, en comparant les génotypes des individus s'étant reproduit ensemble avec ceux des individus n'étant pas identifiés comme partenaires reproducteurs. Comme pour le gorille (voir chapitre 5), nous nous sommes intéressés à la variabilité du CMH chez cette espèce, en utilisant le marqueur lié D6S2878 car, bien qu'il n'ait pas été établi chez le magot, ce lien l'a déjà été chez plusieurs espèces de macaque (*Macaca fascicularis,* Groot et al., 2008 ; *Macaca mulatta*,

Doxiadis et al. 2007; *Macaca assamensi,* Müller et al. 2014). Aucune étude préalable de ce type n'avait été réalisée sur le magot. Un des défis méthodologiques était donc de valider l'utilisation d'une amorce, créée initialement pour l'humain et validée chez le macaque rhésus (Doxiadis et al. 2007), pour l'amplification du microsatellite lié chez notre espèce d'intérêt. De plus, ce travail a été réalisé à partir d'ADN extrait d'échantillons non-invasifs, ce qui constitue une difficulté méthodologique supplémentaire dans l'étude du polymorphisme génétique.

b) Méthode

Ce travail s'est focalisé sur deux groupes focaux étudiés pendant trois ans (2007-2009) par plusieurs chercheurs du laboratoire ECOBIO au sein de deux populations distinctes localisées dans le Parc National d'Ifrane au Moyen-Atlas marocain. Dans chaque groupe, tous les individus étaient identifiés. Le groupe d'Ain-Kahla (A-K) comptait 23 individus, tandis que le groupe de Seheb était composé de 33 individus. Sur ces groupes, nous disposions de données démographiques permettant de connaitre la mère des jeunes et d'établir une liste de pères potentiels (mâles de plus de 5 ans). Les analyses génétiques ont été réalisées sur des prélèvements fécaux attribués chacun à un individu identifié. Le génotypage complet de 11 marqueurs microsatellites neutres a été réalisé pour 17 échantillons du groupe focal d'A-K, et 24 pour le groupe focal de Seheb. 69 échantillons à A-K et 57 à Seheb hors groupes focaux ont également été génotypés et serviront de base génétique de référence des populations lors des estimations des degrés d'apparentement. Le génotypage du D6S2878 a été réalisé sur la totalité des échantillons disponibles pour les groupes focaux, soit 29 à A-K et 35 à Seheb.

Les taux de drop-outs alléliques (ADO ; élimination d'allèle) ainsi que de faux-allèles (FA) ont été calculés pour les marqueurs neutres selon des méthodes utilisées dans d'autres études (Broquet & Petit 2004 ; Puechmaille & Petit, 2007). La probabilité d'identité (PI : probabilité que deux individus partagent le même génotype au sein d'une population) a été calculée en utilisant la « sibling PI computation » grâce au logiciel GeneCap version 1.1 (Waits et al., 2001 in Wildberg & Dreher, 2004).

Le logiciel GENETIX, version 4.05.2 (Belkhir et al., 1996-2004) a été utilisé pour déterminer les fréquences alléliques aux marqueurs neutres ainsi que celui du D6s2878 pour chacune des deux populations séparément. Ce logiciel a permis de calculer aussi l'hétérozygotie observée et attendue de chaque marqueur neutre, ainsi que la moyenne de l'hétérozygotie (multi-locus) observée et

attendue et les Fis (taux de consanguinité, Fis W&C : Fis selon Weir & Cockerham, 1984). La significativité des Fis moyens entre les deux populations a été testée par permutations (1000 répétitions). Les écarts d'Hardy-Weinberg (Test de H&W) comparant les hétérozygoties observées et attendues de chaque locus et entre les moyennes pour chaque population ont été calculés avec Genepop version 4.2. Des tests de Wilcoxon ont été utilisés pour comparer la diversité allélique et l'hétérozygotie moyenne observée entre les deux populations et un test de Fisher a été utilisé pour comparer la répartition des allèles du CMH entre les groupes focaux.

Une étape importante de ce travail a été l'analyse des relations de parentés et la reconstitution des pedigrees. A partir des données d'observations, six couples mère-enfant ont pu être identifiés et pour les six autres enfants nés avant le début de l'étude, une liste de mères potentielles a été établie. Ensuite, chaque mâle adulte des groupes focaux a été considéré comme père potentiel (Tab 1).

Tableau 1 Description des échantillons disponibles, des mères connues, des mères potentielles et des pères potentiels pour chaque enfant dans chaque groupe.

Groupe	Enfants	Mères connues	Mères potentielles	Pères potentiels
Aïn-Kahla	Piou	Mémère		Pepere/Khol/Papy
	Saly	Mémère		
	Lilly	Clown		
	Angel	Clown		
	Mehdi		Anita/Peggy/Pupuce/Clown/Mémère	
	Trav		Anita/Peggy/Pupuce/Clown/Mémère	
	Happy		Anita/Peggy/Pupuce/Clown/Mémère	
	Azraelle		Anita/Peggy/Pupuce/Clown/Mémère	
	Yougy	Anita		
	Flora		Anita/Peggy/Pupuce/Clown/Mémère	
Seheb	Boully	Béa		Fafa/Pierot/Jah/Balou/ Loulou/Mamouth/Peter/ Chouchou/Iman
	Yaelle		Dany/Betty/Béa/Mireille/Maria	

Le logiciel Coancestry© version 1.0.1.5 (Wang, 2011) a été utilisé pour le calcul du taux d'apparentement dans et entre les deux groupes grâce au coefficient R de Queller & Goodnight (1989) qui représente le degré de partage d'allèles entre dyades d'individus, en utilisant les données des génotypes des populations entières comme références (A-K et Seheb). En théorie, un R de 0,5 indique une dyade de type mère-enfant, père-enfant ou frère-sœur. Lorsque le R est de 0,25, la

relation est de type demi-frère- demi-sœur. Dans le cas d'analyses avec peu de marqueurs, ces valeurs sont testées par rééchantillonnage. Le R est alors significatif lorsque la valeur 0 n'est pas comprise dans l'intervalle de confiance à 95%. Un « bootstrap » est réalisé pour tester les taux d'apparentement entre femelles adultes et entre mâles adultes de chaque groupe focaux (1000 répétitions).

Le logiciel COLONY® 2.0.6.1 (Wang, 2008 ; Wang, 2009) a permis une reconstruction des relations père-enfant et mère-enfant. Ce logiciel permet, à partir des fréquences alléliques à chaque locus, d'assigner des liens de parentés entre individus en utilisant leurs génotypes pour les marqueurs neutres et de calculer la vraisemblance des relations de parenté afin de déterminer les relations d'apparentement les plus probables. Les dyades mère-enfants connues sont indiquées lors du paramétrage de l'analyse.

c) Résultats

Analyses des marqueurs neutres

Le taux de drop-out (ADO), de faux-allèles (FA) et la probabilité d'identité multi-locus (PID) sont présentés dans le tableau 2. La diversité allélique varie de 2 à 7 selon les marqueurs et diffère entre les deux populations pour 7 marqueurs mais cette différence inter-population n'est pas significative (test de Wilcoxon, ddl=10, $p>0,05$). L'hétérozygotie moyenne observée ne diffère pas entre les deux populations (test de Wilcoxon, ddl=10, $p>0,05$). Deux marqueurs différents de l'équilibre d'Hardy Weinberg dans la population de Seheb (D4243 et D10s1432, tableau 3) tandis qu'un seul marqueur dévie de l'équilibre pour A-K (D9S921, tableau 3. Dans les deux populations on trouve des Fis moyens positifs significatifs suggérant un taux de consanguinité plus élevé qu'attendu, en particulier pour les marqueurs D6s501 (A-K) et D10s1432 (Seheb).

Tableau 2 Valeurs des paramètres génétiques pour les marqueurs neutres calculées à partir des données génétiques obtenus sur un échantillon représentatif des populations: 57 individus pour Seheb et 69 pour Aïn-Kahla (*** : valeur significative, xxx : déséquilibre de Hardy & Weinberg). ADO : taux de drop-out allélique, FA : taux de faux-allèles, PID : probabilité d'identité, Nb. all. max. : nombre d'allèle maximal par locus, He. hétérozygotie attendue, Ho.: hétérozygotie observée, Fis (W&C) : taux de consanguinité.

Marqueur micro-satellites	ADO	FA	PID	Aïn-Kahla				Seheb			
				Nb. all. max	He	Ho	Fis (W&C)	Nb. all. max	He	Ho	Fis (W&C)
D1s548	0,18	0,028	0,46	5	0,63	0,58	0,082	5	0,74	0,65	0,112
D2s1326	**0,34**	0,055	0,60	3	0,42	0,39	0,089	3	0,49	0,37	0,246
D3s1768	0,10	0,021	0,48	4	0,62	0,54	0,128	4	0,47	0,49	-0,036
D4s243	0,25	0,013	0,89	2	0,09	0,06	0,308	4	**0,37**	**0,33*** **	0,127
D6s493	0,19	0,022	0,49	4	0,58	0,57	0,017	3	0,46	0,55	-0,182
D6s501	0,16	0,023	0,35	7	0,83	0,74	**0,107** ***	6	0,74	0,69	0,061
D7s2204	0,21	0,020	0,39	6	0,75	0,69	0,080	6	0,82	0,82	0,000
D9s921	0,09	0,008	0,54	5	**0,54**	**0,52** ***	0,052	4	0,33	0,30	0,081
D10s611	0,13	0,028	0,40	5	0,75	0,83	-0,109	5	0,61	0,61	0,006
D10s1432	0,20	0,030	0,48	7	0,60	0,61	-0,019	5	**0,66**	**0,50*** **	**0,242** ***
D19s582	**0,04**	0,006	0,48	4	0,61	0,63	-0,033	5	0,64	0,64	-0,057
Moyenne	**0,17**	**0,02**	**0,0004**	**4,72**	**0,58 ± 0,2**	**0,56 ± 0,2**	**0,042** ***	**4,55**	**0,58 ± 0,16**	**0,54 ± 0,17*** **	**0,055** ***

Analyse du D6S2878

Onze allèles ont été identifiés pour le microsatellite D6S2878 lié au CMH (158pb – 222pb). Un individu peut posséder jusqu'à 6 allèles (Fig.1) et on retrouve en moyenne 2,2 ± 1,4 allèles par individu pour le groupe A-K et 2,8 ± 1,1 allèles par individu pour le groupe Seheb. Un patron de lecture type a été déterminé sur la base de motifs identiques trouvés pour un même individu entre différentes amplifications et pour des individus différents. Tous les motifs identifiés comportaient à chaque lecture plusieurs pics constants en nombre. Nous avons attribué arbitrairement la taille de l'allèle au pic le plus élevé. Neuf allèles différents sont observés dans chaque groupe dont 2 allèles exclusifs à chaque groupe : les allèles 167 et 210 pour Seheb et 172 et 181 pour A-K (Fig. 2). Les allèles 204 et 222 sont fortement partagés par les deux groupes focaux. On trouve 4 allèles majoritaires (167, 204, 210 et 222) dans le groupe Seheb et 2 allèles majoritaires (204 et 222) dans le groupe A-K. On n'observe

pas de différence significative de la répartition des allèles au sein des deux groupes (Test de Fisher, ddl=10, p=0,143).

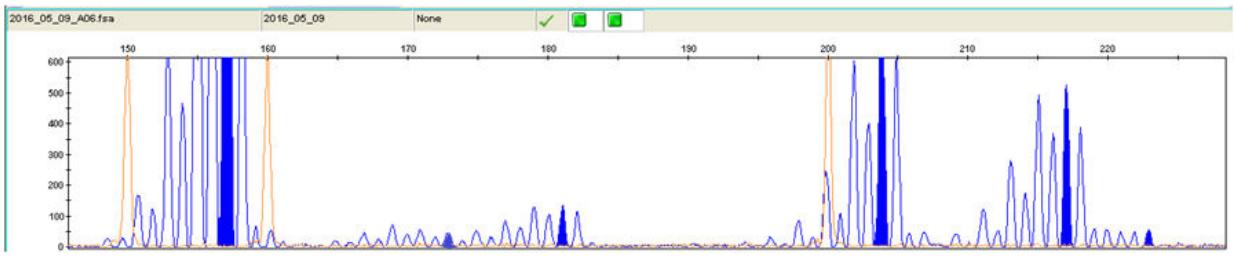


Figure 1 Exemple du génotype d'un individu magot possédant 6 allèles

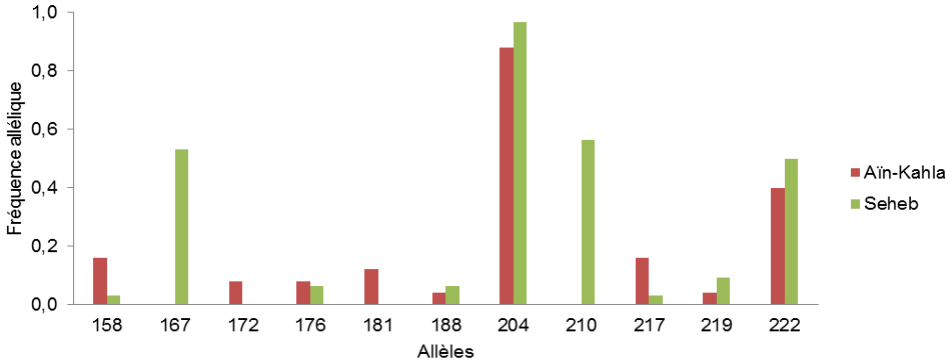


Figure 2 Fréquence des allèles trouvés pour le marqueur lié au CMH au sein des groupes focaux.

Relations de parenté dans les groupes focaux

Cinq triades père-mère-enfant significatives (P ≥ 0,9), deux dyades mère-enfant (P ≥ 0,9) et une dyade père probable-enfant (P ≥ 0,9) ont été identifiées (Tab. 3). Dans les deux groupes, les taux d'apparentement intra- et intersexuel chez les adultes ne sont pas significatifs. Les taux d'apparentement R permettent de mettre en évidence dix et six dyades significativement apparentées pour le groupe Aïn-Kahla et pour le groupe Seheb respectivement (Tab. 4).

Tableau 3 Liens de parentés identifiés par reconstruction (** : relations significatives et prises en compte pour la suite des analyses).

	Enfant	Père potentiel	Mère potentielle	Probabilité
Aïn-Kahla	Piou	Khol	Memere	**1,00 ****
	Azraelle	Khol	Peggy	**1,00 ****
	Sally	Pepere	Memere	**0,95 ****
	Trav	Papy	Pupuce	**0,92 ****
	Happy	Papy	Peggy	0,71
	Angel		Clown	**1,00 ****
	Lily		Clown	**1,00 ****
	Medi		Pupuce	0,71
	Flora	Pepere		**0,91 ****
	Medi	Pépère		0,75
Seheb	Boully	M651	Béa	**0,97 ****
	Yaelle	Balou	Betty	0.53

Tableau 4 Dyades significativement apparentées selon le coefficient R de Queller & Goodnight (** : coefficients significatifs au seuil de 95%).

	Individu 1	Individu 2	R	5%	95%
Aïn-Kahla	Piou	Yougy	**0,31 ****	0,04	0,52
	Piou	Peggy	**0,35 ****	0,01	0,76
	Piou	Mémère	**0,28 ****	0,04	0,53
	Sally	Peggy	**0,33 ****	0,12	0,47
	Sally	Mémère	**0,36 ****	0,16	0,55
	Lily	Clown	**0,60 ****	0,31	0,85
	Angel	Mémère	**0,63 ****	0,33	1
	Trav	Papy	**0,34 ****	0,02	0,56
	Happy	Peggy	**0,55 ****	0,11	0,84
	Peggy	Mémère	**0,46 ****	0,08	0,76
Seheb	Boully	Béa	**0,45 ****	0,26	0,62
	Yaelle	Mireille	**0,55 ****	0,42	0,76
	Dany	Balou	**0,39 ****	0,18	0,59
	Betty	Peter	**0,47 ****	0,28	0,61
	Balou	Loulou	**0,46****	0,13	0,78
	Loulou	Mamouth	**0,59 ****	0,16	0,9

Prise en compte de l'apparentement dans l'analyse du D6S2878

Afin de mettre en évidence un lien entre la parentalité et le génotype du D6S2878 une comparaison des allèles du D6s2878 est faite au sein des triades père-mère-enfant identifiées. Six allèles différents sont présents parmi les mères probables du groupe A-K et deux allèles différents

parmi les mères probables du groupe Seheb. Chez les pères probables, deux allèles sont identifiés pour le groupe A-K et six allèles différents pour le groupe Seheb. Le nombre d'allèles que portent les pères probables ne diffère pas du nombre d'allèles que portent les autres mâles adultes des groupes (3,3 allèles vs 2,7 allèles: test de Mann-Whitney, ddl=10, p>0,05). Sept allèles différents sont identifiés chez les enfants du groupe A-K et trois allèles chez les enfants du groupe Seheb. Dans le groupe d'Aïn-Kahla, le père et la mère des enfants partagent les mêmes allèles dans quatre cas sur cinq (Tab. 5). Dans le groupe Seheb, les deux couples de parents identifiés semblent plus différents. Deux dyades pères-enfants partagent tous leurs allèles et deux en partagent la moitié (enfants homozygotes) dans le groupe A-K. Dans le groupe Seheb, les dyades pères-enfants semblent plus dissimilaires. Les enfants sont très similaires des mères dans les deux groupes excepté pour les enfants homozygotes (Tab. 5).

Tableau 5 Triades de parents-enfants retenues et nombre d'allèles partagés entre les parents (au dénominateur : nombre d'allèles trouvés chez les deux individus).

	Enfants	**Pères**	**Mères**	**Nb allèles partagés entre les parents**	**Nb allèles partagés entre enfant-père**	**Nb allèles partagés entre enfant-mère**
Aïn-Kahla	Piou	Khol	Memere	2/2	2/2	2/2
	Azraelle	Khol	Peggy	2/2	pas d'informations	pas d'informations
	Sally	Pepere	Memere	2/2	1/2 (enf. homozygote)	1/2 (enf. homozygote)
	Trav	Papy	Pupuce	1/3	1/2 (enf. homozygote)	1/3 (enf. homozygote)
	Happy	Papy	Peggy	2/2	2/2	2/2
Seheb	Boully	M651	Béa	1/3	1/5	2/3
	Yaelle	Balou	Betty	2/4	2/4	2/2

d) Discussion et perspectives

Les écarts d'Hardy-Weinberg significatifs semblent indiquer un isolement des différents groupes au sein des populations avec une absence d'échange d'individus, en particulier pour la population de Seheb. Les femelles étant philopatriques, l'arrivée de mâles immigrants est indispensable afin de réaliser un brassage génétique entre les groupes d'une même population (Ménard et al., 2014 ; von Segesser et al., 1999). Cependant, de précédentes publications suggèrent une dispersion limitée entre groupes d'une même population chez le magot, augmentant l'isolement génétique intergroupe (von Segesser et al., 1999), ce qui est en accord avec la significativité des indices de fixation (Fis), pour les deux populations. Cet isolement s'explique aussi par le mode de dispersion des individus chez cette espèce. Les femelles sont philopatriques. Les groupes sont donc constitués de lignées de femelles apparentées. La dispersion des mâles se fait entre des groupes

voisins, limitant encore le brassage génétique entre des groupes éloignés et augmentant l'apparentement au sein d'un même groupe (Ménard & Vallet, 1996).

La diversité allélique observée pour le locus D6S2878, supposé lié au CMH, semble réduite comparée à celle trouvée chez d'autres espèces de macaques. En effet, pour le même marqueur, chez le macaque d'Assam (*Macaca assamensis*), 28 allèles différents ont été retrouvés pour un effectif et une méthode similaire en milieu naturel (Müller et al., 2014), indiquant que les gènes du CMH auraient subi un processus d'expansion (Doxiadis et al., 2007 ; Setchell et al., 2010). Chez le macaque rhésus, sur la base d'échantillons sanguins de 167 individus issus d'élevage ainsi que d'Inde et de Chine, 116 allèles différents ont été identifiés (Müller et al., 2014 ; Doxiadis et al., 2007). Chez le macaque crabier, 60 allèles différents ont été identifiés pour un échantillon de 71 individus issus pour la plupart d'élevage (Müller et al., 2014 ; de Groot et al., 2008). La gamme de longueurs des fragments lors de la lecture du D6S2878 pour le magot est aussi plus réduite : de 158pb à 222pb. En comparaison, la gamme de longueurs de fragments chez le macaque d'Assam est comprise entre 153 et 284 pbs, chez le macaque rhésus entre 153 et 293 pbs et chez le macaque crabier entre 169 et 304 pbs (Müller et al., 2014 ; Doxiadis et al., 2007 ; de Groot et al., 2008). Nos résultats pourraient suggérer que les gènes du CMH chez le magot auraient subi un processus de contraction. Cette explication se justifierait par la divergence plus ancienne du magot d'avec les autres macaques (Thierry et al. 2000; Li et al. 2009), ainsi que par la réduction importante de ses populations et de son aire de répartition. Nos résultats peuvent également indiquer un biais d'échantillonnage, avec une taille des groupes focaux étudiés trop faible pour capter la totalité du polymorphisme au sein de notre population.

Ces résultats préliminaires ne nous permettent pas d'établir des conclusions sur le choix de partenaire chez le magot sur la base des caractéristiques du CMH. Toutefois, cette étude pionnière a permis de mettre au point une méthode d'analyse du polymorphisme du microsatellite D6S2878 supposé lié au complexe majeur d'histocompatibilité. La prochaine étape de ce travail consisterait à séquencer le CMH d'un nombre suffisant de magots afin de valider l'existence d'un tel lien chez cette espèce de macaque. L'existence de pedigrees pour deux groupes focaux est un atout dans de tels questionnements. Une augmentation du nombre de marqueurs neutres utilisés pourrait permettre

d'améliorer notre certitude sur les paternités effectives, et de pouvoir étudier de manière plus pertinente le choix de partenaire sur cette espèce.

II Etude du CMH par l'utilisation d'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant

a) Objectifs

La détection du polymorphisme au niveau populationnel demande souvent l'utilisation de techniques laborieuses et couteuses. L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (EGGD) est une méthode non radioactive qui permet de séparer des brins d'ADN de même taille en fonction de leur séquence nucléotidique et de détecter différents allèles (Miller 1999). C'est une méthode très sensible qui peut permettre de détecter jusqu'à 99% du polymorphisme nucléotidique (SNP en anglais) (Sheffield et al. 1989). Cette électrophorèse est une méthode rapide puisqu'elle peut se réaliser directement après la PCR. Elle est efficace sur des fragments entre 50pb et 500pb. La dénaturation de l'ADN se fait grâce aux propriétés chimiques du gel. Lorsque le fragment atteint son point de dénaturation sur le gel, sa migration est retardée (Fischer and Lerman 1983). Une différence d'un seul nucléotide va altérer le niveau de dénaturation et donc rendre détectable la variation entre les deux fragments. Grâce au gradient dénaturant, les différents fragments peuvent être observés sur un même gel, ce qui rend la détection du polymorphisme plus rapide (Miller 1999). Cette méthode s'est révélée être un très bon outil dans l'étude du CMH. Sur le gel d'électrophorèse, une bande est alors associée à un allèle (Fig 3) et l'ADN contenu dans ces bandes peut être récupéré puis séquencé afin de leur attribuer un allèle donné. Puis, pour des mêmes conditions dénaturantes, une même bande sera toujours associée au même allèle, sans besoin de séquençage (Knapp et al. 1997).

L'objectif de ce travail préliminaire était de déterminer si l'EGGD pouvait être utilisé pour la détection du polymorphisme du CMH chez le gorille à partir d'ADN issus d'échantillons de fèces, en utilisant la nouvelle amorce décrite dans le chapitre 3 de cette thèse. En effet, cette méthode s'est montrée efficace chez plusieurs espèces de primates : le ouistiti pygmée (*Cebuella pygmaea*), le saki à face blanche (*Pithecia pithecia*), l'atèle à ventre blanc (*Ateles belzebuth*), le douroucouli commun (*Aotus trivirgatus*), le tamarin à crète blanche (*Saguinus oedipus*) (Middleton et al. 2004), et le macaque rhésus (Doxiadis et al. 2000). Chez le gorille, des premiers essais ont été réalisés par Wainwright (2002) mais sont restés non publiés. Cependant, elle n'avait jamais été utilisée chez le gorille avec de l'ADN d'échantillons non-invasifs. Ainsi, la mise en place d'un tel protocole, avec

validation par comparaison avec d'autres méthodes d'étude du CMH (NGS, microsatellite lié) permettrait un accès facilité à l'étude du polymorphisme du CMH au niveau populationnel.

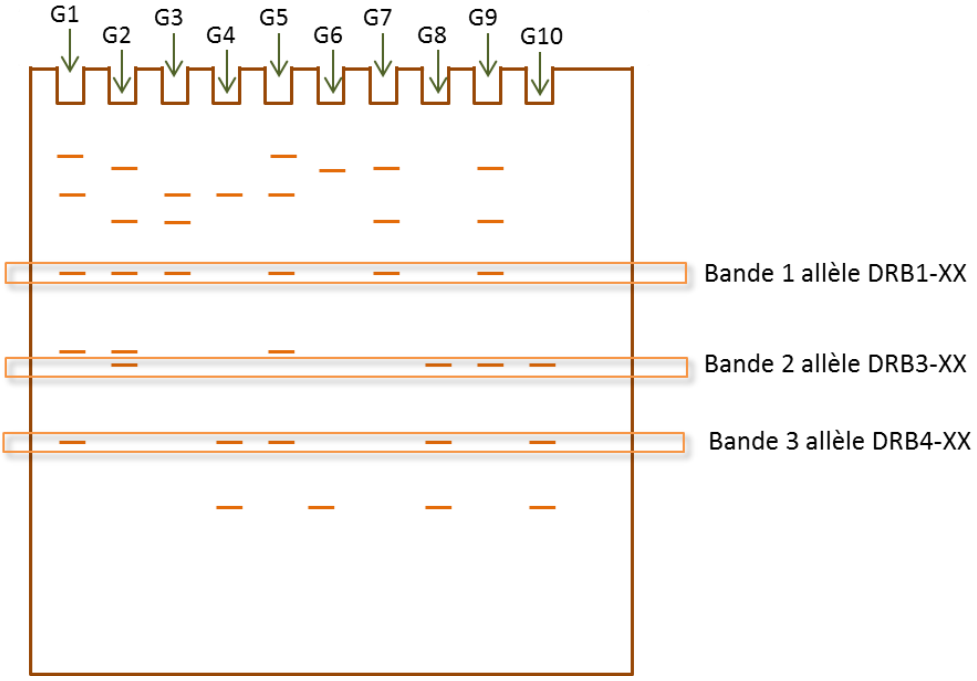


Figure 3 Attribution d'un allèle à chaque bande ce qui permet d'établir un génotype à chaque individu sans séquencer chaque bande.

b) Méthodes et premiers résultats

Les conditions de PCR pour la production des amplicons utilisés pour l'EGGD sont les suivantes : 0.2µL de chaque amorce, 15µL de master mix Qiagen contenant les dNTPs et la taq polymerase, puis du ddH2O pour un volume total de 25µL et 3µL d'ADN. Les conditions de cycle consistent en un premier cycle de 15min à 95° pour la dénaturation. Puis 45 cycles de 30 secondes à 95°, 30 secondes à 58 degrés, 40 secondes à 72° pour l'hybridation et l'extension. Le tout se termine par dix minutes à 72°, les échantillons ainsi amplifiés sont alors maintenus à 4°. Le succès de l'amplification a été vérifié sur un gel agarose à 1,5%.

Le gel d'acrylamide dénaturant présente un gradient de 30% à 55%. Ces conditions dénaturantes sont obtenues à partir de deux solutions à 0 ou 80% d'urée. La solution à 0% est composée de 64.8g d'acrylamide-bis 30%, 3.6g de TAE 50x et la quantité suffisante d'H2O pour 200mL de solution. La solution à 80% est composée de 64.8g d'acrylamide-bis 30%, 3.6g de TAE

50x, 65.2g de formamide, 61g d'urée et la quantité suffisante d'H2O pour 200mL de solution. La solution à 30% est constituée de 5.25mL de solution à 80%, 8.75 mL de solution à 0%, 250uL de colorant, 140uL d'APS et 14uL de TEMED pour un total de 14mL de solution. La solution à 55% est constituée de 9.625mL de solution à 80%, 4.37 mL de solution à 0%, 250uL de colorant, 140uL d'APS et 14uL de TEMED pour un total de 14mL de solution. L'électrophorèse est réalisée sur un appareil BIORAD D-GENE (BioRad, Hemel Hempstead, UK), dans une solution tampon de TAE 1x à 60°C pendant 4h30. A la fin de la migration, les bandes sont révélées grâce à un bain de SYBR-Gold (BioWhittaker, Wokingham, UK) et une illumination UV (Fig 4). Les bandes sont récupérées directement, et diluées dans 50uL d'eau distillée.

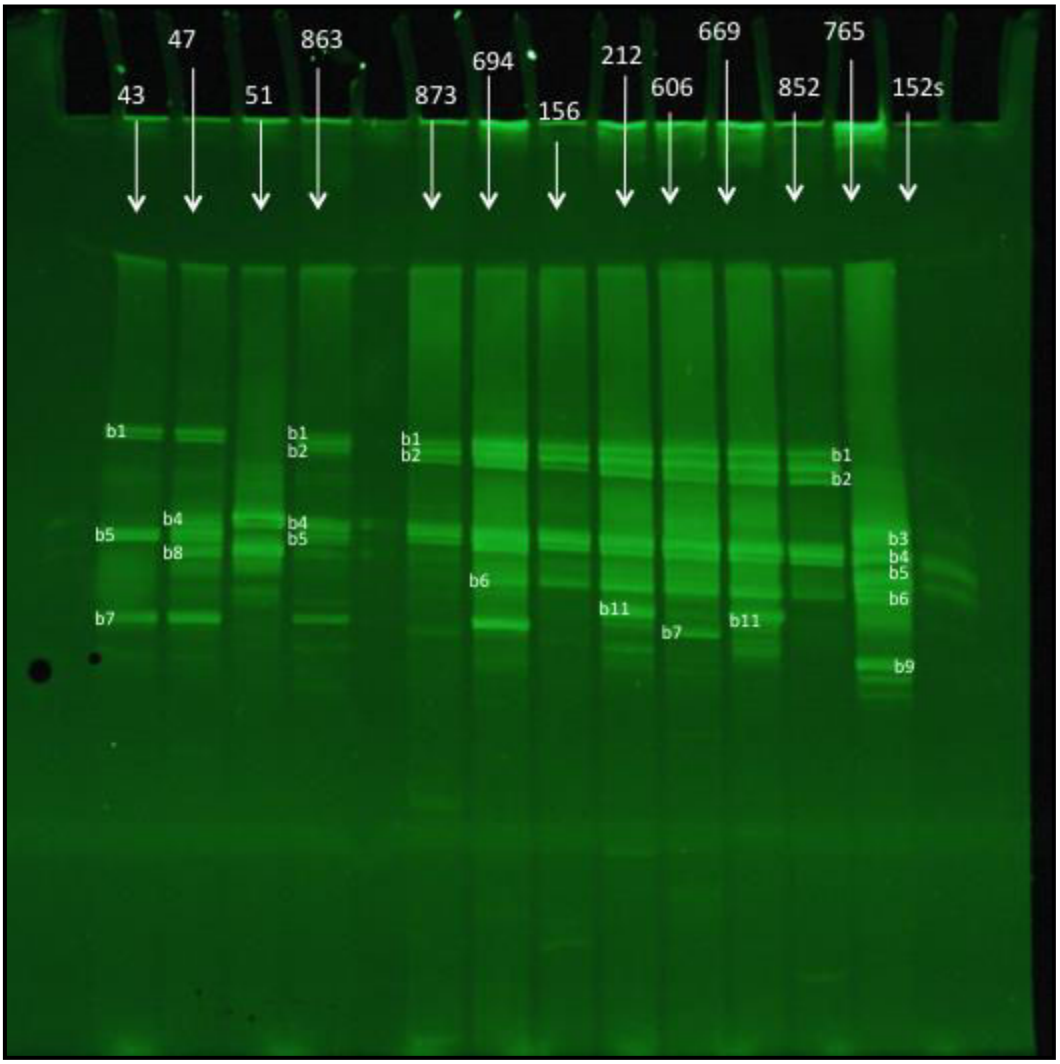


Figure 4 Image d'un gel d'électrophorèse par gradient dénaturant. Les bandes sont nommées en concordance avec les autres EGGD réalisées lors de cette étude (b1-b11). Les produits de PCR sont déposés au niveau des puits, indiqués par les flèches.

Au cours de la thèse, 8 gels EGGD ont pu être réalisés sur un pool de 50 individus dont certains ont également été séquencés par NGS (voir chapitre 4), ainsi que génotypés sur un marqueur

microsatellite lié au CMH (le D6S2878, voir chapitre 5). Cet échantillon comprend des individus de deux familles pour lesquelles nous avons un pedigree complet (25 individus, familles de Apollo et Ares, voir chapitre 4). Chaque individu a été analysé entre une et quatre fois par EGGD (une répétition n = 13, deux répétitions n=24, trois répétitions n=11, quatre répétitions n=1) un échantillon sanguin issu d'un animal captif a été utilisé comme contrôle positif. Le nombre moyen de bandes par individu est de 5.09 ±1.27, avec au moins 2 bandes détectées et au maximum 8 bandes. Pour les individus appartenant aux familles d'Ares et Apollo, les bandes observées chez chaque individu sont présentées dans la figure 5. Cela permet d'observer qu'un seul descendant présente une bande qui n'est pas retrouvée chez ses parents (signifié par les traits rouges pour le trio concerné). Les résultats obtenus par EGGD sont donc consistants avec les pedigrees.

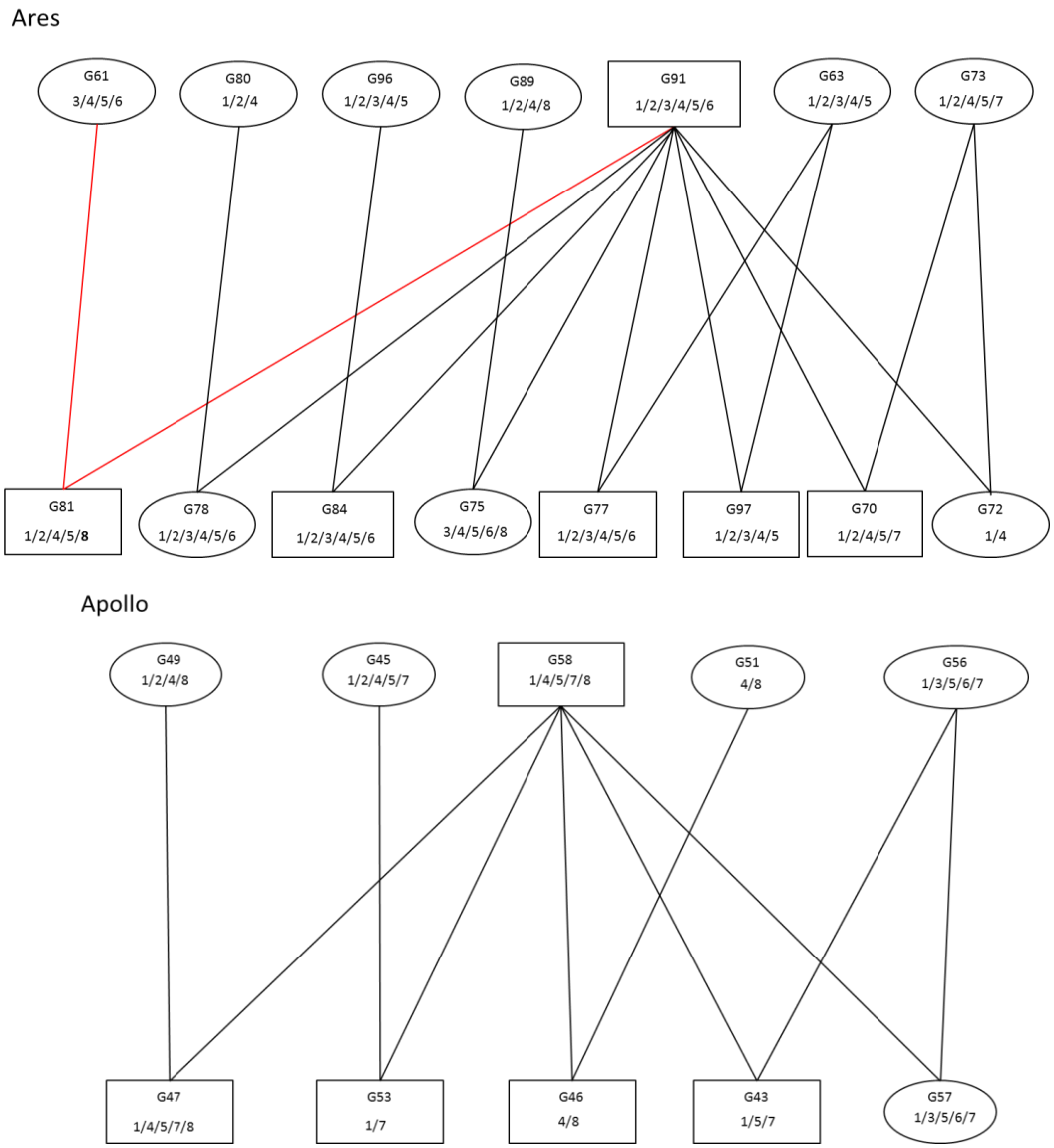


Figure 5 Pedigrees des familles d'Ares et Apollo. Les ronds représentent les femelles et les rectangles les mâles. Les traits rouges indiquent un trio pour lequel le descendant présente une bande non observée chez les parents

L'analyse des gels a permis de détecter 11 bandes différentes qui devraient alors correspondre à 11 allèles différents au sein du pool d'individus étudiés. Ces bandes ont été récupérées et l'ADN contenu dans ces bandes a été séquencé par le séquençage Sanger. Le protocole suivant a été utilisé : 1µL de chaque amorce, 15µL de master mix qiagen contenant les dNTPs et la taq polymerase, puis du ddH2O pour un volume total de 30µL et 20µL d'ADN issu des bandes. La méthode de touch-down PCR a été utilisée, les conditions de cycle consistent en un premier cycle de 15min à 95° pour la dénaturation. Puis 35 cycles de 30 secondes à 95°, 30 secondes à une température croissante de 0.5° à chaque cycle de 59° à 69° pendant 20 cysles puis constante à 59° pendant 15, 40 secondes à 72° pour l'hybridation et l'extension. Le tout se termine par dix minutes

à 72°, les échantillons ainsi amplifiés sont alors maintenus à 4°. Le succès de l'amplification a été vérifié sur un gel agarose à 1,5%.

Les résultats du séquençage sont présentés dans le tableau 6. Lorsqu'elles sont présentes chez plusieurs individus, les bandes ont été séquencées deux fois afin de vérifier la concordance entre bande et allèle. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences CMH connues et publiées sur le site NCBI par blast.

Tableau 6 Résultats des identifications d'allèles après séquençage des bandes issues des EGGD. Les bandes ont été prélevées et séquencées deux fois, lorsque cela était possible, mais pour les bandes 1,2,5 et 8 la qualité du séquençage était insuffisante pour une identification.

Bande	Identification	Score total	Couverture	E value	Identité
1	Séquence de qualité insuffisante				
1	DRB6*CGR2	312	77%	2,00E-81	98%
2	DRB1*08	348	80%	2,00E-92	99%
2	Séquence de qualité insuffisante				
3	**DRB1*MG3**	341	78%	5,00E-90	99%
3	**DRB1*MG3**	341	78%	5,00E-90	99%
4	**DRB5*01**	337	80%	7,00E-89	98%
4	**DRB5*01**	337	80%	7,00E-89	98%
4	DRB3*0107	339	77%	2,00E-89	99%
4	DRBW*802	291	73%	5,00E-75	97%
5	Séquence de qualité insuffisante				
5	DRB5*0310	333	77%	1,00E-87	99%
6	DRB1	348	80%	2,00E-92	99%
6	DRB1*1001	342	75%	1,00E-90	99%
7	DRB1*1001	342	80%	1,00E-90	99%
7	DRB3*0107	339	77%	2,00E-89	99%
8	DRB3*0107	339	77%	2,00E-89	99%
8	Séquence de qualité insuffisante				
9	DRB5-MG3	306	78%	1,00E-79	96%
10	DRB1*0310	333	77%	1,00E-87	99%
11	DRB5*WLG2	341	78%	5,00E-90	99%

Pour les individus étudiés par différentes méthodes de séquençage, la concordance entre les différentes méthodes est présentée dans les tableaux 7 et 8. Le tableau 7 indique le nombre d'allèles identifiés selon les trois méthodes d'études (EGGD, NGS, microsatellite lié). L'individu G240 est le seul pour lequel le nombre d'allèle est identique entre l'EGGD et l'analyse du microsatellite lié. Quant aux individus G866 et G152s, ce sont les nombres d'allèles obtenus par EGGD et NGS qui sont

identiques. Le tableau 8 met en parallèles les séquences récupérées par EGGD avec les séquences obtenues par NGS. La bande séquencée chez l'individu G47 et identifiée comme un DRB3-01*07 est également retrouvée dans le génotype de cet individu obtenu par NGS. Pour les individus G43 et G866, les deux allèles en orange appartiennent à la même lignée de DRB, mais un nouveau séquençage des bandes EGGD est nécessaire pour confirmer leurs identités.

Tableau 7 Concordance entre le nombre d'allèles identifiés selon la méthode utilisée pour les sept individus qui ont été analysés par EGGD, génotypage du microsatellite lié et NGS. Les chiffres en gras indiquent les points de concordance.

Individu	Nombre de bandes EGGD	Nombre d'allèles D6S2878	Nombre d'allèles NGS
G107	6	3	5
G240	**3**	**3**	7
G43	3	2	4
G47	5	3	6
G866	**4**	3	**4**
G871	3	2	4
G152s	**5**	2	**5**

Tableau 8 Concordance entre les allèles identifiés selon la méthode du EGGD et la méthode du NGS pour les sept individus qui ont été analysés des deux façons. Les allèles en gras sont ceux retrouvés dans les deux analyses. Les allèles en orange nécessitent un nouveau séquençage pour vérifier leurs identités.

Individu	EGGD		NGS						
G107	DRB1-10*01		DRB1-03*09	DRB1-03*11	DRB5-01*01	DRB6-02*A	DRB6-01*03		
G240	DRB5-WLG2		DRB1-03*08	DRB1-03*09	DRB3-04*01	DRB5-05*A	DRB5-01*01	DRB6-02*A	DRB6-01*03
G43	DRB1-10*01		DRB1-10*B	DRB6-02*04	DRB6-01*03	DRBW-8*02			
G47	**DRB3-01*07**		DRB1-10*B	**DRB3-01*07**	DRB5-05*A	DRB6-02*04	DRB6-01*03	DRBW-8*02	
G866	DRB1-03*10		DRB1-03*A	DRB1-10*B	DRB6-02*04	DRB6-01*03			
G871	DRB1		DRB1-03*07	DRB1-10*A	DRB6-02*04	DRB6-01*03			
G152s	DRB5-MG3	DRB5-01	DRB1-03*07	DRB3-04*01	DRB5-05*01	DRB6-02*04	DRB6-01*03		

c) Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail préliminaire était de déterminer si l'EGGD pouvait être utilisée pour la détection du polymorphisme du CMH chez le gorille à partir d'ADN issus d'échantillons de fèces, en utilisant la nouvelle amorce décrite dans le chapitre 3 de cette thèse. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs, puisque le profil d'un individu peut être retrouvé au travers de différents gels. Cependant, quelques ajustements méthodologiques sont nécessaires sur la quantité d'ADN utilisée afin d'obtenir une meilleure réplicabilité. En effet, lorsque trop d'ADN est injecté dans les puits, les profils de lecture sont moins clairs. Aussi, on observe différents profils permettant de distinguer les individus, ce qui constitue une base solide pour l'utilisation de l'EGGD dans une étude populationnelle. Enfin, la ségrégation mendélienne des allèles semble être confirmée par une bonne concordance entre les profils de bandes individuels et les pedigrees. Cependant, l'utilisation d'ADN non invasif augmente la quantité de bandes « parasites » dans les profils, ayant une brillance réduite par rapport aux vrais allèles. Une optimisation de la PCR antérieure à l'EGGD afin de réduire l'amplification de séquences permettrait de réduire l'importance de ces bandes.

Le séquençage des bandes a permis la concordance entre les bandes identifiées et un allèle donné pour les bandes 3 et 4 respectivement associées aux allèles DRB1-MG3 et DRB5-01. Pour les bandes 5, 6 et 7, les allèles identifiés chez les individus analysés donnent l'impression d'un décalage entre la bande et l'allèle associé, ce qui ne nous a pas permis d'établir une concordance claire. Pour permettre d'associer de manière plus certaine un allèle à une bande, le séquençage supplémentaire de bandes semble être indispensable. Les EGGD réalisés en 2016 ont permis de prélever des bandes qui sont actuellement en attente de séquençage. Certains prélèvements de bandes n'ont pas donné de séquences de qualité suffisante pour pouvoir être identifiés.

Sur la base des résultats obtenus, un seul allèle sur les huit obtenus par EGGD est également retrouvé par séquençage NGS. Le nombre de bandes observées ne concorde pas avec le nombre d'allèles détectés par NGS ou le nombre d'allèles du microsatellite lié. A ce stade de nos expérimentations, la validation de l'attribution d'une bande à un allèle, grâce au séquençage NGS, n'a pas été possible. Pour permettre une meilleure concordance entre les deux méthodes, il est nécessaire d'améliorer la qualité de l'association entre les bandes et les allèles pour les EGGD.

L'EGGD est une méthode prometteuse pour l'étude du CMH au niveau populationnel. L'observation d'une variabilité du nombre et de l'identité des bandes suffisante pour la discrimination individuelle nous incite à continuer l'optimisation de cette méthode pour l'étude du CMH. En effet, bien que l'utilisation d'ADN non invasif la rende moins précise, elle reste moins chère et le traitement est moins long que pour des analyses NGS. L'utilisation de l'EGGD serait, par exemple, bien adaptée à une étude sur la diversité globale du CMH. Aussi, elle serait une étape préliminaire intéressante pour sélectionner les individus aux profils atypiques pour une analyse plus complète de son génotype par séquençage haut débit.

Références bibliographiques

Ciani AC, Palentini L, Arahou M, et al (2005) Population decline of Macaca sylvanus in the middle atlas of Morocco. Biol Conserv 121:635–641 . doi: 10.1016/j.biocon.2004.06.009

De Groot N de, Doxiadis GGM, Vos-Rouweler AJM de, et al (2008) Comparative genetics of a highly divergent DRB microsatellite in different macaque species. Immunogenetics 60:737–748 . doi: 10.1007/s00251-008-0333-z

Doxiadis GGM, de Groot N de, Claas FHJ, et al (2007) A highly divergent microsatellite facilitating fast and accurate DRB haplotyping in humans and rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci 104:8907–8912 . doi: 10.1073/pnas.0702964104

Doxiadis GGM, Otting N, Groot NG de, et al (2000) Unprecedented Polymorphism of Mhc-DRB Region Configurations in Rhesus Macaques. J Immunol 164:3193–3199 . doi: 10.4049/jimmunol.164.6.3193

Fa JE (2012) The Barbary Macaque: A Case Study in Conservation. Springer Science & Business Media

Fischer SG, Lerman LS (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proc Natl Acad Sci 80:1579–1583

Gatti S, Levréro F, Ménard N, Gautier-Hion A (2004) Population and group structure of western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Lokoué, Republic of Congo. Am J Primatol 63:111–123 . doi: 10.1002/ajp.20045

IUCN (2008) Macaca sylvanus: Butynski, T.M., Cortes, J., Waters, S., Fa, J., Hobbelink, M.E., van Lavieren, E., Belbachir, F., Cuzin, F., de Smet, K., Mouna, M., de Iongh, H., Menard, N. & Camperio-Ciani, A.: The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T12561A3359140. International Union for Conservation of Nature

Knapp LA, Cadavid LF, Eberle ME, et al (1997) Identification of new Mamu-DRB alleles using DGGE and direct sequencing. Immunogenetics 45:171–179 . doi: 10.1007/s002510050186

Li J, Han K, Xing J, et al (2009) Phylogeny of the macaques (Cercopithecidae: Macaca) based on Alu elements. Gene 448:242–249 . doi: 10.1016/j.gene.2009.05.013

Lindenfors P (2002) Sexually antagonistic selection on primate size. J Evol Biol 15:595–607 . doi: 10.1046/j.1420-9101.2002.00422.x

Ménard N (2002) Ecological plasticity of Barbary macaques (Macaca sylvanus). Evol Anthropol Issues News Rev 11:95–100 . doi: 10.1002/evan.10067

Ménard N, Hecham R, Vallet D, et al (1990) Grouping Patterns of a Mountain Population of Macaca sylvanus in Algeria – A Fission-Fusion System? Folia Primatol (Basel) 55:166–175 . doi: 10.1159/000156512

Ménard N, Rantier Y, Foulquier A, et al (2014) Impact of human pressure and forest fragmentation on the Endangered Barbary macaque Macaca sylvanus in the Middle Atlas of Morocco. Oryx 48:276–284 . doi: 10.1017/S0030605312000312

Ménard N, Vallet D (1993) Population dynamics of Macaca sylvanus in Algeria: An 8-year study. Am J Primatol 30:101–118

Middleton SA, Anzenberger G, Knapp LA (2004) Identification of New World monkey MHC-DRB alleles using PCR, DGGE and direct sequencing. Immunogenetics 55:785–790 . doi: 10.1007/s00251-003-0634-1

Müller N, Ostner J, Schülke O, Walter L (2014) Towards the non-invasive assessment of MHC genotype in wild primates: Analysis of wild assamese macaque MHC-DRB from fecal samples. Am J Primatol 76:230–238 . doi: 10.1002/ajp.22225

Ross JF (2004) La forêt de l'Atlas menacée par les singes ? Courr Int

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc Natl Acad Sci 86:232–236

Thierry B, Iwaniuk AN, Pellis SM (2000) The Influence of Phylogeny on the Social Behaviour of Macaques (Primates: Cercopithecidae, genus Macaca). Ethology 106:713–728 . doi: 10.1046/j.1439-0310.2000.00583.x

Discussion Générale et Perspectives

I Choix de partenaires sociaux/sexuels chez les femelles de gorille de plaine de l'ouest

L'objectif principal de cette thèse était de mettre en avant l'existence d'un choix de partenaire reproducteur chez les femelles adultes de gorille de plaine de l'ouest. Le second chapitre de cette étude est un travail pionnier sur cette question en raison de la prise en compte de facteurs relatifs à la femelle, au mâle adulte, mais également au groupe social. Notre analyse a porté sur la dispersion secondaire des femelles adultes, en excluant la dispersion natale, ce qui nous conduisait à écarter l'importance de l'évitement de l'inceste comme facteur influant prédominant. Par contre, la dispersion secondaire concernait aussi bien des femelles nullipares que des femelles multipares. En effet, des femelles nullipares peuvent changer plusieurs fois de groupe reproducteur avant de se reproduire. Ces deux catégories ne montrent cependant pas de différences dans leur choix de partenaires sociaux/sexuels. En premier lieu, nous confirmons que les femelles avec des enfants non sevrés ne dispersent pas, ce qui contribuerait à limiter le risque d'infanticide par le mâle reproducteur du groupe d'arrivée. Ensuite, nous avons pu confirmer la sélection non-aléatoire des mâles reproducteurs par les femelles au travers d'une dispersion sociale non-aléatoire. Les femelles immigrantes rejoignent principalement des mâles à dos argenté dirigeant des groupes reproducteurs plutôt que vers des mâles solitaires. Ceci peut refléter le fait que certains mâles sont plus attractifs que d'autres. Après l'acquisition de leur première femelle et la formation de leur groupe, ils continuent à être la cible d'autres immigrantes qui intègrent ainsi un groupe reproducteur plutôt que de s'associer à un autre mâle solitaire. On peut penser que le choix de ce type d'unité se fonde en partie sur certaines informations recueillies par la migrante. La présence préalable de femelles pourrait par exemple être un indicateur de qualité du mâle. Il pourrait alors s'agir plutôt de qualité protectrice et/ou de tempérament non coercitif plutôt que de qualité reproductrice dans la mesure où nous n'avons pas trouvé de lien entre le choix des femelles et le nombre de femelles avec enfant dans les groupes cibles des migrantes. Les groupes reproducteurs naissants et enfants sont les plus attractifs tandis que les femelles ont une plus forte probabilité d'émigrer des groupes sénescents. Compte tenu des modes de formation des groupes reproducteurs chez les gorilles, il est raisonnable de penser que les mâles des groupes naissants et enfants sont dans la première période de leur tenure de groupe, sont des jeunes adultes au meilleur de leur capacité physique. Bien que nous ne connaissions pas l'âge de

tous les mâles des groupes reproducteurs, nos observations sur quelques mâles reproducteurs dont nous connaissons l'histoire de vie confortent cette hypothèse. Dans ces groupes jeunes, les femelles peuvent profiter d'une meilleure protection ainsi que d'une meilleure valeur reproductive. Il existe par ailleurs une valeur de taille de groupe (environ 10-15 individus) pour laquelle les femelles ont tendance à quitter le mâle adulte, indépendamment d'autres critères tels que le nombre de femelles adultes ou le nombre d'immatures. Chez le gorille de plaine de l'ouest, les groupes reproducteurs sont toujours conduits par un seul mâle adulte. Chez le gorille de montagne au contraire, 40% des groupes comportent deux mâles adultes (souvent père/fils) qui assurent la protection du groupe et permet des tailles de groupes plus importantes (environ 20 individus, Harcourt, 1978; Robbins, 1995). Notre étude montre que des signes extérieurs d'état de santé des individus (des maladies de peau) peuvent être considérés par les femelles lors de leur dispersion. Cependant, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, les femelles n'évitent pas les mâles adultes contaminés alors qu'elles évitent les groupes qui montrent des fortes proportions d'individus affectés. Pourquoi une telle différence et quels sont les mécanismes de choix ? On peut penser que les avantages tirés d'autres qualités perçues chez le mâle choisi surpassent les inconvénients possibles des risques de contamination pour la femelle par le mâle. Cela suppose aussi que les qualités protectrices ou reproductrices du mâle ne sont pas ou peu affectées par la maladie ou seulement dans des cas aigus d'affection. Au contraire, la présence de nombreux individus affectés dans un groupe peut représenter un fort risque de contamination, sans avantages compensatoires. L'importance de l'environnement social sur les décisions de dispersion des femelles a rarement été pris en considération. Ce travail permet de montrer que des paramètres tels que la taille, l'âge, ou la « santé » du groupe social influencent le choix des femelles, qui accumulent le plus d'indices possible dans leur choix de quitter ou rejoindre un partenaire reproducteur. La portée de notre étude réside dans le fait que nous avons travaillé dans deux populations différentes, ce qui autorise une certaine généralisation des conclusions pour les gorilles des plaines de l'ouest.

II Influence d'une perturbation environnementale majeure sur le choix des femelles

Etudier le système d'appariement au sein d'une population est une étape importante dans la connaissance d'une espèce. Cependant, dans un monde changeant, où les habitats naturels sont perturbés par le changement climatique, où les populations peuvent subir des pressions fluctuantes

de la chasse ou de maladies émergentes, observer le comportement des populations face à ces perturbations est une étape cruciale dans leur protection. Chez le gorille de plaine de l'ouest, une espèce en danger d'extinction, plusieurs populations ont subi une épidémie à virus Ebola, provoquant un effondrement démographique (Bermejo et al., 2006; Caillaud et al., 2006). Avec la perte d'un grand nombre d'individus, les relations sociales sont susceptibles d'être profondément modifiées. Après l'épidémie, le nombre de mâles adultes et de groupes disponibles est très faible, ce qui engendre une réduction drastique de choix de destination pour les femelles lors de leur dispersion. Cette situation se traduit sur le court terme après épidémie par une période d'instabilité sociale durant laquelle les femelles semblent surtout rechercher temporairement la protection d'un mâle, même déjà âgé, voire en deuxième tenure de groupe, sans pour autant se reproduire ni rester plus de quelques mois avec lui. Même s'il est difficile de statuer sur les raisons de cette absence de reproduction, telles qu'un mâle trop vieux ou un manque de réceptivité de la femelle, le paramètre qui motive la décision d'immigration de la femelle semble alors plutôt, à défaut d'autre choix possible, de l'ordre de la recherche de protection. Par la suite, le paramètre qui motive la décision d'émigrer des femelles découlerait plutôt d'une recherche de partenaire reproducteur de qualité, ce qui explique que, contrairement à la période non perturbée, elles sont capables de quitter un groupe naissant, mais conduit par un mâle âgé, pour un groupe jeune conduit par un jeune mâle à dos argenté au plus fort de ses capacités physiques. A plus long terme, les femelles choisissent leur partenaire reproducteur selon les mêmes critères que dans une population non-perturbée (chapitre 2 et 3), comme la préférence pour des mâles menant des groupes reproducteurs jeunes plutôt que des mâles solitaires ou des groupes âgés. .Les groupes conduit par des jeunes mâles à dos argenté sont stables dans la mesure où l'émigration des femelles y devient moins probable, ce qui suggère que ces mâles sont de bonne valeur protectrice et reproductrice. Nos travaux soulignent que, malgré des critères relativement généraux qui motivent les décisions des femelles à rester dans un groupe, le quitter et vers quelle destination, ces dernières sont capables d'une certaine flexibilité de ces critères lorsque les choix sont réduits suite à une perturbation démographique importante. La recherche d'une protection par le mâle pourrait alors être le critère prioritaire, gage de survie pour la femelle, avant le critère de reproduction. Il n'est pas impossible qu'un mâle âgé possède une expérience dans la protection d'un groupe qui compense les atouts de meilleure force physique d'un jeune mâle, moins expérimenté. Par ailleurs, les femelles qui ne sont pas accompagnées d'enfants dépendants ne semblent pas limitées dans le nombre de leurs transferts entre groupes, leur séjour dans un même

groupe pouvant être inférieur à un mois, ce qui peut aussi refléter une bonne capacité d'adaptation aux perturbations, lorsque la recherche de partenaire nécessite une plus grande mobilité.

Suite à l'épidémie à virus Ebola, on observe une réduction drastique de la population de Lokoué, en particulier des femelles et des immatures, qui perdure 10 ans après (Genton et al., 2017). Certains indices et résultats de recensements indiquent que les populations avoisinantes ont également été touchées par l'épidémie (Genton et al., 2012; WCS, 2009). A court terme après l'épidémie, on observe peu d'échanges de femelles avec les populations avoisinantes. Par contre, à long terme, on note cinq fois plus d'immigrantes que d'émigrantes (chapitre 3). Ceci peut s'expliquer par un attrait particulier de la clairière ou des mâles de la population de Lokoué. En effet, la récente maturation de certains mâles résidents de la population peut expliquer cette forte augmentation d'immigrantes. Les femelles immigrantes rejoignent ces jeunes mâles et forment avec eux des groupes reproducteurs stables. La reconstruction des groupes et la récupération de la population après épidémie reposent donc en grande partie sur ces immigrantes. Ce déséquilibre entre nombre d'immigrantes et d'émigrantes à Lokoué pose la question de différences de structures démographiques entre populations voisines dans cette région affectée par le virus Ebola. On peut que les effets de l'épidémie n'ont pas été les mêmes dans les populations avoisinantes. Dans la mesure où un faible nombre de jeunes mâles peut devenir les cibles privilégiées des migrantes, il suffit sans doute d'une légère différence de la structure d'âge des mâles entre populations pour expliquer la plus grande attractivité des mâles de Lokoué. On peut difficilement invoquer une meilleure survie des femelles des populations voisines car i) l'épidémie touche particulièrement les individus en groupe, donc les femelles, et ii) tous les groupes déjà constitués qui sont arrivés dans la population sont des groupes naissants, ce qui indique que, aux alentours comme à Lokoué, aucun groupe constitué avant l'épidémie Ebola n'a survécu à l'épidémie.

III L'étude du CMH chez le gorille des plaines de l'ouest

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est une zone chromosomale très polymorphe et partagée par tous les vertébrés. C'est une zone contenant de nombreux gènes impliqués dans la production de molécules de reconnaissance du soi et de pathogène. Les molécules de classe II sont plus particulièrement utilisées dans la détection de pathogènes extracellulaires (Yeager and Hughes, 1999). L'hyperpolymorphisme de cette région est le plus souvent attribué à la sélection balancée

générée par la défense contre les pathogènes (Bernatchez and Landry, 2003). Le travail réalisé lors de cette thèse permet d'envisager des avancées dans notre compréhension de l'implication du CMH dans la récupération d'une population après une perturbation environnementale telle qu'une épidémie. En effet, bien que la méthode soit encore à perfectionner, l'étude de cette région au niveau populationnel, soit par séquençage haut débit (chapitre 4), soit par l'utilisation d'un microsatellite lié (chapitre 5), est devenue possible. L'approche populationnelle permettrait non seulement une étude de la diversité de cette région, mais également d'observer la réponse de ces gènes soumis à sélection. C'est le cas pour la population de Lossi, dans laquelle nous détectons une arrivée de nouveaux individus dans la population, car arrivée de nouveaux génotypes au niveau du marqueur microsatellite D6S2878 (chapitre 5). Ainsi, la diversité du CMH permettrait d'observer une différence de pression de sélection et d'indiquer la santé d'une population (Bowen et al., 2006) et cela se retrouve dans nos étude, avec des niveaux de diversité similaire entre les populations de Lokoué et Lossi ayant subies une épidémie à virus Ebola (chapitre 5).

Il est désormais acquis que la diversité du CMH est entretenue par la diversité des pathogènes, mais les preuves en support d'un rôle important du CMH dans le choix de partenaire sont également grandissantes (Bonhomme et al., 2007; Huchard et al., 2010; Penn and Potts, 1999). Par exemple, les effets démographiques sur la structure génétique d'une population pourraient influencer les stratégies de choix de partenaires. Etablir le lien entre la structure génétique d'une population et la plasticité du choix de partenaire semble un objectif intéressant de l'étude du CMH au niveau populationnel. D'autant plus que les données disponibles grâce aux 15 années de suivis des populations de gorilles de plaines de l'ouest de Lokoué et Romani offrent une opportunité rare d'observer l'évolution de l'appariement génétique au cours d'une perturbation démographique affectant la survie des individus. Aussi, grâce aux histoires de vie disponibles avec un suivi à long terme, il serait possible de suivre la consistance du choix de partenaire sexuel au cours de la vie d'un individu, et mettre cela en relation avec son environnement social ou son état physiologique.

Les primates sont un groupe idéal pour étudier l'influence du système social sur les stratégies d'appariement liées au CMH de par la diversité des systèmes représentés, et la bonne connaissance de leur comportement et écologie (Setchell and Kappeler, 2003). Dans cette thèse, nous avons amorcé l'étude au niveau populationnel de deux espèces de primates, au système social contrasté (chapitre 5 et 6). Les travaux sur les magots et les gorilles présentés ici sont pionniers quant à l'étude

du D6S2878 chez ces deux espèces, mais ouvrent la voie vers une étude comparative. La diversité génétique du CMH pouvant être influencée par le système social chez les rongeurs (Sommer et al., 2002). Ensuite, regarder la réponse de ces deux espèces soumises à des perturbations démographiques (épidémie pour les gorilles, fragmentation de l'habitat pour le magot) permettrait de regarder les changements du système d'appariement en fonction du CMH en réponse à une perturbation. Ainsi, une étude sur les marmottes alpines (*Marmota marmota*) a montré une modification du choix de partenaire reproducteur basé sur le CMH en fonction du contexte social (Ferrandiz-Rovira et al. 2016). Cela encourage à poursuivre des études sur la plasticité du choix de partenaire basé sur des caractéristiques génétiques.

IV Utilisation d'échantillon ADN non-invasif

Au cours de cette étude, l'utilisation d'ADN non-invasif a parfois compliqué l'analyse génétique de par la moins bonne qualité de l'ADN ainsi récolté (chapitre 4 et 5). Cependant, cette méthode de prélèvement est un atout majeur dans l'étude de populations sauvages. En effet, par ce biais il n'est pas nécessaire de capturer, déranger ou même observer les animaux puisque il est possible d'extraire l'ADN à partir de salive, de poils ou de fèces (Smith and Wayne, 1996). Cela permet d'éviter de blesser des individus appartenant à des populations parfois en danger, ou d'induire un stress qui pourrait modifier le comportement de groupes sociaux ainsi perturbés (Taberlet et al., 1996).

L'utilisation d'ADN de moins bonne qualité implique la réplication du génotypage des individus, afin d'augmenter la fiabilité des résultats (Knapp, 2005; Lukas et al., 2004), ce qui a été fait dans cette étude (chapitre 4 et 5). L'ADN dans des échantillons non invasifs étant en plus faible quantité, augmenter le nombre de réplications permet de s'assurer d'avoir capté toute la variabilité génétique existante. Cependant, même avec un grand nombre de répétitions, les génotypes peuvent rester incomplet suite à des erreurs de génotypage ou à *l'allelic dropout* qui sont des problèmes inhérents à l'utilisation d'ADN non invasif (Müller et al., 2014). L'utilisation de tels échantillons augmente également le risque de retrouver des séquences chimériques (Hans et al., 2015). Pour parer à cela, réduire le nombre de cycles de la PCR est une première étape. Il serait également utile de faire des PCR indépendantes pour chaque locus séparément, cela permettant de réduire le nombre de séquences chimériques (Ferrandiz-Rovira et al. 2015). La présence d'inhibiteur de PCR

dans les échantillons peut également réduire le succès du génotypage. Mais le nettoyage au chloroforme des échantillons lors de l'extraction ainsi que l'utilisation de BSA lors de la PCR peuvent en limiter l'impact des inhibiteurs (Müller et al., 2014). Cependant, c'est une attention plus particulière et une analyse de séquences plus astringente qui permettra de réduire les inconvénients liés à l'utilisation d'ADN dégradé.

IV Faire le lien entre les observations directes et les prélèvements génétiques

Lors des prélèvements non-invasifs, il n'est pas toujours possible d'attribuer un échantillon à un individu. Chez le gorille, il faut attendre que les individus quittent la clairière pour pouvoir aller récupérer les fèces. Ainsi, il est possible d'assigner le prélèvement à un groupe social, mais pas à un individu donné. La taille des fèces est parfois utilisée pour définir le sexe et l'âge de l'individu, mais après analyses génétiques il est à noter que ces indices ne sont pas forcément fiables. Cette impossibilité d'associer prélèvements génétiques et observations directes représente une limitation de cette étude sur le long terme associant dynamique et génétique des populations. En effet, grâce aux observations directes, il est possible de connaitre les appariements entre mâles et femelles, ainsi que les mouvements des femelles entre les groupes. Au cours de cette étude, la concordance entre les observations directes et les prélèvements génétiques a pu être établi pour des cas particuliers de femelles changeant de groupes au sein de la population, ou lorsqu'un seul mâle était observé dans le groupe au moment du prélèvement. Mais ces cas sont encore trop souvent anecdotiques. Afin d'établir plus facilement ce lien entre la génétique et la dynamique d'une population, on pourrait envisager d'améliorer le spectre d'échantillonnage en visant, par exemple, les groupes sociaux les plus attractifs pour les migrantes, ou ceux dont les caractéristiques (taille, composition,…) pourraient apporter des informations sur le choix du partenaire reproducteur. En effet, les analyses génétiques ne pouvant être aussi exhaustives que les observations directes, axer les prélèvements sur des groupes d'intérêts permettrait une meilleure capacité de réponse aux questions évoquées dans les paragraphes précédents. Le suivi génétique de l'histoire de vies des individus ne pourra se faire qu'avec un génotypage plus complet de la population permettant d'établir des pedigrees à rapprocher des observations directes.

V Existence d'un choix du mâle

Les femelles sont souvent considérées comme le sexe qui choisit car investissant le plus dans les soins parentaux, tandis que les mâles sont considérés comme le sexe choisi (Trivers, 1972). En

effet, la reproduction des femelles est limitée par leur cycle reproducteur, tandis que la reproduction des mâles est limitée par leur capacité d'accès aux femelles. Ainsi, les femelles ont tout intérêt à choisir leur partenaire reproducteur avec précaution, afin d'assurer une bonne survie à leur descendants, alors que les mâles rechercheront à se reproduire avec le plus de partenaires possible afin d'augmenter le nombre de leurs descendants. Mais depuis une quinzaine d'années, de plus en plus d'évidence sont accumulées indiquant un choix des mâles dirigé vers les femelles (Chapman 2011). Chez le gorille des plaines de l'ouest, peu d'indices suggèrent l'existence d'un tel choix mais cela vient peut-être de nos capacités d'observation limitées. Par exemple, dans le cas de notre étude, nous ne disposons que de peu d'informations sur les relations interindividuelles, car les gorilles ne passent qu'un pourcent de leur temps sur les clairières et peu d'interactions y sont observées. Chez le gorille des montagnes, où l'habituation de groupes reproducteurs a permis l'étude des relations sociales, les femelles adultes ont des interactions neutres ou agressives entre elles (Watts, 2002). Quant aux interactions mâles-femelles, elles sont souvent affiliatives et lorsque qu'agressives de moindre ampleur qu'entre femelles. Les mâles forment des liens durables avec les femelles, ce qui semblent les inciter à rester avec eux (Watts, 2002). Pour observer un éventuel choix du mâle, il parait difficile d'utiliser l'acquisition d'une nouvelle femelle par le mâle comme un choix dirigé particulièrement vers cette femelle. En effet, lors des interactions intergroupes, les mâles entrent en compétition pour favoriser le transfert de femelle vers leur groupe reproducteur (Levréro et al., 2002). Mais il est impossible de distinguer si les mâles cherchent à acquérir le plus grand nombre de femelles, ou si ces démonstrations de force sont le reflet d'un choix de partenaire. A l'inverse, on peut imaginer qu'un mâle multipliant les agressions vers une femelle tentant d'immigrer, ou forçant l'émigration d'une femelle, serait le signe d'un choix de partenaire. Le choix du mâle pourrait également être observé en effectuant des comparaisons intergroupes sur les caractéristiques morphologiques et génétiques des femelles. Nous pourrions ainsi espérer mettre en évidence la préférence d'un mâle pour certaines caractéristiques si toutes les femelles de son groupe les partagent. Enfin, des interactions positives plus fréquentes entre un mâle et certaines femelles pourraient également être le signe d'une préférence du reproducteur.

Références

Acevedo-Whitehouse K, de la Cueva H, Gulland FMD, et al (2003) Evidence of leptospira interrogans infection in california sea lion pups from the gulf of california. J Wildl Dis 39:145–151 . doi: 10.7589/0090-3558-39.1.145

Alexander RD (1974) The Evolution of Social Behavior. Annu Rev Ecol Syst 5:325–383

Altizer S, Nunn CL, Thrall PH, et al (2003) Social Organization and Parasite Risk in Mammals: Integrating Theory and Empirical Studies. Annu Rev Ecol Evol Syst 34:517–547 . doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.030102.151725

Ameca y Juárez EI, Mace GM, Cowlishaw G, Pettorelli N (2012) Natural population die-offs: causes and consequences for terrestrial mammals. Trends Ecol Evol 27:272–277 . doi: 10.1016/j.tree.2011.11.005

Amundsen T (2000) Why are female birds ornamented? Trends Ecol Evol 15:149–155 . doi: 10.1016/S0169-5347(99)01800-5

Andersson MB (1994) Sexual Selection. Princeton University Press

Anthony NM, Johnson-Bawe M, Jeffery K, et al (2007) The role of Pleistocene refugia and rivers in shaping gorilla genetic diversity in central Africa. Proc Natl Acad Sci 104:20432–20436 . doi: 10.1073/pnas.0704816105

Aveling C, Froment JM (2001) L'extension du Parc National d'Odzala, une opportunité de développement. Canopée 13–14

Averbeck C, Plath M, Wronski T, Apio A (2012) Effect of human nuisance on the social organisation of large mammals: group sizes and compositions of seven ungulate species in Lake Mburo National Park and the adjacent Ankole Ranching Scheme. Wildl Biol 18:180–193 . doi: 10.2981/11-025

Babik W (2010) Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. Mol Ecol Resour 10:237–251 . doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02788.x

Bergl RA (2006) Conservation biology of the Cross River gorilla (Gorilla gorilla diehli). PhD Thesis

Bergl RA, Vigilant L (2007) Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (Gorilla gorilla diehli). Mol Ecol 16:501–516 . doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03159.x

Bermejo M (1995) Recensement des gorilles et des chimpanzés du Parc National d'Odzala. Ecofac-Congo

Bermejo M (2004) Home-range use and intergroup encounters in western gorillas (Gorilla g. gorilla) at Lossi forest, North Congo. Am J Primatol 64:223–232 . doi: 10.1002/ajp.20073

Bermejo, M., Rodríguez-Teijeiro, J.D., Illera, G., Barroso, A., Vilà, C., Walsh, P.D., 2006. Ebola Outbreak Killed 5000 Gorillas. Science 314, 1564–1564. doi:10.1126/science.1133105

Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? J Evol Biol 16:363–377 . doi: 10.1046/j.1420-9101.2003.00531.x

Bertram BCR (1975) Social factors influencing reproduction in wild lions. J Zool 177:463–482 . doi: 10.1111/j.1469-7998.1975.tb02246.x

Bertram SM, Loranger MJ, Thomson IR, et al (2016) Linking mating preferences to sexually selected traits and offspring viability: good versus complementary genes hypotheses. Anim Behav 119:75–86 . doi: 10.1016/j.anbehav.2016.06.003

Blehert DS, Hicks AC, Behr M, et al (2009) Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? Science 323:227–227 . doi: 10.1126/science.1163874

Bonhomme, M., Blancher, A., Jalil, M.F., Crouau-Roy, B., 2007. Factors shaping genetic variation in the MHC of natural non-human primate populations. Tissue Antigens 70, 398–411. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00925.x

Borgia G (1995) Complex male display and female choice in the spotted bowerbird: specialized functions for different bower decorations. Anim Behav 49:1291–1301 . doi: 10.1006/anbe.1995.0161

Bowen, L., Aldridge, B., Beckmen, K., Gelatt, T., Rea, L., Burek, K., Pitcher, K., Stott, J.L., 2006. Differential Expression of Immune Response Genes in Steller Sea Lions (Eumetopias jubatus): An Indicator of Ecosystem Health? EcoHealth 3, 109–113. doi:10.1007/s10393-006-0021-0

Breuer T, Breuer-Ndoundou Hockemba M, Olejniczak C, et al (2009) Physical maturation, life-history classes and age estimates of free-ranging western gorillas - insights from Mbeli Bai, Republic of Congo. Am J Primatol 71:106–119 . doi: 10.1002/ajp.20628

Breuer T, Robbins AM, Olejniczak C, et al (2010) Variance in the male reproductive success of western gorillas: acquiring females is just the beginning. Behav Ecol Sociobiol 64:515–528 . doi: 10.1007/s00265-009-0867-6

Breuer T, Robbins AM, Boesch C, Robbins MM (2012) Phenotypic correlates of male reproductive success in western gorillas. J Hum Evol 62:466–472 . doi: 10.1016/j.jhevol.2012.01.006

Brotcorne F, Fuentes A, Wandia IN, et al (2015) Changes in Activity Patterns and Intergroup Relationships After a Significant Mortality Event in Commensal Long-Tailed Macaques (Macaca Fascicularis) in Bali, Indonesia. Int J Primatol 36:548–566 . doi: 10.1007/s10764-015-9841-5

Brown JL, Eklund A (1994) Kin Recognition and the Major Histocompatibility Complex: An Integrative Review. Am Nat 143:435–461 . doi: 10.1086/285612

Bullinger AF, Wyman E, Melis AP, Tomasello M (2011) Coordination of Chimpanzees (Pan troglodytes) in a Stag Hunt Game. Int J Primatol 32:1296–1310 . doi: 10.1007/s10764-011-9546-3

Caillaud D, Levréro F, Cristescu R, et al (2006) Gorilla susceptibility to Ebola virus: The cost of sociality. Curr Biol 16:R489–R491 . doi: 10.1016/j.cub.2006.06.017

Caillaud, D., Levréro, F., Cristescu, R., Gatti, S., Dewas, M., Douadi, M., Gautier-Hion, A., Raymond, M., Ménard, N., 2006. Gorilla susceptibility to Ebola virus: The cost of sociality. Curr. Biol. 16, R489–R491. doi:10.1016/j.cub.2006.06.017

Caillaud D, Levréro F, Gatti S, et al (2008) Influence of male morphology on male mating status and behavior during interunit encounters in western lowland gorillas. Am J Phys Anthropol 135:379–388 . doi: 10.1002/ajpa.20754

Candolin U (2003) The use of multiple cues in mate choice. Biol Rev 78:575–595 . doi: 10.1017/S1464793103006158

Carroll RW (1988) Relative density, range extension, and conservation potential of the lowland gorilla (Gorilla gorilla gorilla) in the Dzanga-Sangha region of southwestern Central African Republic. Mammalia 52:309–324 . doi: 10.1515/mamm-1988-0302

Chapman JR, Nakagawa S, Coltman DW, et al (2009) A quantitative review of heterozygosity–fitness correlations in animal populations. Mol Ecol 18:2746–2765 . doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04247.x

Choudhury S, Black JM (1994) Barnacle geese preferentially pair with familiar associates from early life. Anim Behav 48:81–88 . doi: 10.1006/anbe.1994.1213

Clutton-Brock T (2007) Sexual Selection in Males and Females. Science 318:1882–1885 . doi: 10.1126/science.1133311

Clutton-Brock T (2009) Sexual selection in females. Anim Behav 77:3–11 . doi: 10.1016/j.anbehav.2008.08.026

Clutton-Brock T, McComb K (1993) Experimental tests of copying and mate choice in fallow deer (Dama dama). Behav Ecol 4:191–193 . doi: 10.1093/beheco/4.3.191

Clutton-Brock TH, Deutsch JC, Nefdt RJC (1993) The evolution of ungulate leks. Anim Behav 46:1121–1138 . doi: 10.1006/anbe.1993.1302

Clutton-Brock T, McAuliffe K (2009) Female Mate Choice in Mammals. Q Rev Biol 84:3–27 . doi: 10.1086/596461

Clutton-Brock TH, Hodge SJ, Spong G, et al (2006) Intrasexual competition and sexual selection in cooperative mammals. Nature 444:1065–1068 . doi: 10.1038/nature05386

Craul M, Zimmermann E, Radespiel U (2004) First experimental evidence for female mate choice in a nocturnal primate. Primates 45:271–274 . doi: 10.1007/s10329-004-0097-5

Crowley PH, Travers SE, Linton MC, et al (1991) Mate Density, Predation Risk, and the Seasonal Sequence of Mate Choices: A Dynamic Game. Am Nat 137:567–596 . doi: 10.1086/285184

Dahlgren J (1990) Females choose vigilant males: an experiment with the monogamous grey partridge, Perdix perdix. Anim Behav 39:646–651 . doi: 10.1016/S0003-3472(05)80375-6

Darwin C (1872) The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex. D. Appleton

Daszak P, Berger L, Cunningham AA, et al (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. Emerg Infect Dis 5:735–748

Dechaume-Moncharmont F-X, Brom T, Cézilly F (2016) Opportunity costs resulting from scramble competition within the choosy sex severely impair mate choosiness. Anim Behav 114:249–260 . doi: 10.1016/j.anbehav.2016.02.019

Devos C, Sanz C, Morgan D, et al (2008) Comparing ape densities and habitats in northern Congo: surveys of sympatric gorillas and chimpanzees in the Odzala and Ndoki regions. Am J Primatol 70:439–451 . doi: 10.1002/ajp.20514

Dixson A (2015) Primate sexuality. In: The International Encyclopedia of Human Sexuality. John Wiley & Sons, Ltd

Dumbrell AJ, Clark EJ, Frost GA, et al (2008) Changes in species diversity following habitat disturbance are dependent on spatial scale: theoretical and empirical evidence. J Appl Ecol 45:1531–1539 . doi: 10.1111/j.1365-2664.2008.01533.x

Dunbar RIM (2009) The social brain hypothesis and its implications for social evolution. Ann Hum Biol 36:562–572 . doi: 10.1080/03014460902960289

Fay JM, Agnagna M, Moore J, Oko R (1989) Gorillas (Gorilla gorilla gorilla) in the Likouala swamp forests of north central Congo: Preliminary data on populations and ecology. Int J Primatol 10:477–486 . doi: 10.1007/BF02736372

Ferrandiz-Rovira M, Bigot T, Allainé D, et al (2015) Large-scale genotyping of highly polymorphic loci by next-generation sequencing: how to overcome the challenges to reliably genotype individuals? Heredity 114:485–493 . doi: 10.1038/hdy.2015.13

Ferrandiz-Rovira M, Allainé D, Callait-Cardinal M-P, Cohas A (2016) Mate choice for neutral and MHC genetic characteristics in Alpine marmots: different targets in different contexts? Ecol Evol 6:4243–4257 . doi: 10.1002/ece3.2189

Fey SB, Siepielski AM, Nusslé S, et al (2015) Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. Proc Natl Acad Sci 112:1083–1088 . doi: 10.1073/pnas.1414894112

Fisher RA (1915) The evolution of sexual preference. Eugen Rev 7:184–192

Fisher RA (1930) The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon Press, Oxford

Fünfstück T, Arandjelovic M, Morgan DB, et al (2014) The genetic population structure of wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) living in continuous rain forest. Am J Primatol 76:868–878 . doi: 10.1002/ajp.22274

Fünfstück T, Vigilant L (2015) The geographic distribution of genetic diversity within gorillas. Am J Primatol 77:974–985 . doi: 10.1002/ajp.22427

Galef BG, White DJ (2000) Evidence of social effects on mate choice in vertebrates. Behav Processes 51:167–175 . doi: 10.1016/S0376-6357(00)00126-1

García-Navas V, Ortego J, Sanz JJ (2009) Heterozygosity-based assortative mating in blue tits (Cyanistes caeruleus): implications for the evolution of mate choice. Proc R Soc Lond B Biol Sci 276:2931–2940 . doi: 10.1098/rspb.2009.0417

Garner KJ, Ryder OA (1996) Mitochondrial DNA Diversity in Gorillas. Mol Phylogenet Evol 6:39–48 . doi: 10.1006/mpev.1996.0056

Gatti S (2005) Structure, dynamique et génétique d'une population de gorille de plaine de l'ouest (Gorilla gorilla gorilla) au nord de la République du Congo. Rennes 1

Gatti S, Levréro F, Ménard N, Gautier-Hion A (2004) Population and group structure of western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Lokoué, Republic of Congo. Am J Primatol 63:111–123 . doi: 10.1002/ajp.20045

Genton, C., Cristescu, R., Gatti, S., Levréro, F., Bigot, E., Caillaud, D., Pierre, J.-S., Ménard, N., 2012. Recovery Potential of a Western Lowland Gorilla Population following a Major Ebola Outbreak: Results from a Ten Year Study. PLOS ONE 7, e37106. doi:10.1371/journal.pone.0037106

Genton C, Pierre A, Cristescu R, et al (2015) How Ebola impacts social dynamics in gorillas: a multistate modelling approach. J Anim Ecol 84:166–176 . doi: 10.1111/1365-2656.12268

Gibson RM, Höglund J (1992) Copying and sexual selection. Trends Ecol Evol 7:229–232 . doi: 10.1016/0169-5347(92)90050-L

Grafen A (1991) Modelling in behavioural ecology. Behav Ecol Evol Approach 3:5–31

Gray M, Roy J, Vigilant L, et al (2013) Genetic census reveals increased but uneven growth of a critically endangered mountain gorilla population. Biol Conserv 158:230–238 . doi: 10.1016/j.biocon.2012.09.018

Green DE, Converse KA, Schrader AK (2002) Epizootiology of Sixty-Four Amphibian Morbidity and Mortality Events in the USA, 1996-2001. Ann N Y Acad Sci 969:323–339 . doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04400.x

Greenwood PJ (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. Anim Behav 28:1140–1162 . doi: 10.1016/S0003-3472(80)80103-5

Groves C (2001) Primate Taxonomy. Smithsonian Books

Groves C (2002) A history of gorilla taxonomy. In: Gorilla Biology : A multidisciplinary Perspective. Cambridge University Press, pp 15–34

Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science 218:384–387 . doi: 10.1126/science.7123238

Hans, J.B., Haubner, A., Arandjelovic, M., Bergl, R.A., Fünfstück, T., Gray, M., Morgan, D.B., Robbins, M.M., Sanz, C., Vigilant, L., 2015. Characterization of MHC class II B polymorphism in multiple populations of wild gorillas using non-invasive samples and next-generation sequencing. Am. J. Primatol. 77, 1193–1206. doi:10.1002/ajp.22458

Harcourt, A.H., 1978. Strategies of Emigration and Transfer by Primates, with Particular Reference to Gorillas. Z. Für Tierpsychol. 48, 401–420. doi:10.1111/j.1439-0310.1978.tb00267.x

Harvey PH, Kavanagh M, Clutton-Brock TH (1978) Sexual dimorphism in primate teeth. J Zool 186:475–485 . doi: 10.1111/j.1469-7998.1978.tb03934.x

Heisler I, Andersson MB, Arnold SJ, et al (1987) The evolution of mating preferences and sexually selected traits: group report. Sex Sel Test Altern 96–118

Heuschele J, Mannerla M, Gienapp P, Candolin U (2009) Environment-dependent use of mate choice cues in sticklebacks. Behav Ecol 20:1223–1227 . doi: 10.1093/beheco/arp123

Höner OP, Wachter B, East ML, et al (2007) Female mate-choice drives the evolution of male-biased dispersal in a social mammal. Nature 448:798–801 . doi: 10.1038/nature06040

Huchard, E., Knapp, L.A., Wang, J., Raymond, M., Cowlishaw, G., 2010. MHC, mate choice and heterozygote advantage in a wild social primate: MHC and reproductive strategies in Baboons. Mol. Ecol. no-no. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04644.x

Huchard E, Pechouskova E (2014) The Major Histocompatibility Complex and Primate Behavioral Ecology: New Tools and Future Questions. Int J Primatol 35:11–31 . doi: 10.1007/s10764-013-9700-1

Imong I, Robbins MM, Mundry R, et al (2014) Informing conservation management about structural versus functional connectivity: A case-study of Cross River gorillas. Am J Primatol 76:978–988 . doi: 10.1002/ajp.22287

IUCN (2016a) Gorilla beringei: Plumptre, A., Robbins, M. & Williamson, E.A.: The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T39994A102325702

IUCN (2016b) Gorilla gorilla: Maisels, F., Bergl, R.A. & Williamson, E.A.: The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T9404A102330408

Jennions MD, Petrie M (1997) Variation in Mate Choice and Mating Preferences: A Review of Causes and Consequences. Biol Rev 72:283–327 . doi: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00015.x

Jones AG, Ratterman NL (2009) Mate choice and sexual selection: What have we learned since Darwin? Proc Natl Acad Sci 106:10001–10008 . doi: 10.1073/pnas.0901129106

Jordan WC, Bruford MW (1998) New perspectives on mate choice and the MHC. Heredity 81:127–133 . doi: 10.1046/j.1365-2540.1998.00428.x

Kamiya T, O'Dwyer K, Westerdahl H, et al (2014) A quantitative review of MHC-based mating preference: the role of diversity and dissimilarity. Mol Ecol 23:5151–5163 . doi: 10.1111/mec.12934

Kappeler PM, van Schaik CP (2002) Evolution of primate social systems. Int J Primatol 23:707–740 . doi: 10.1023/A:1015520830318

Kappeler PM (2013) Why Male Mammals Are Monogamous. Science 341:469–470 . doi: 10.1126/science.1242001

Kavanagh RP, Stanton MA (2005) Vertebrate species assemblages and species sensitivity to logging in the forests of north-eastern New South Wales. For Ecol Manag 209:309–341 . doi: 10.1016/j.foreco.2005.02.009

Kempenaers B (2007) Mate Choice and Genetic Quality: A Review of the Heterozygosity Theory. In: Advances in the Study of Behavior. Academic Press, pp 189–278

Knapp LA, Ha JC, Sackett GP (1996) Parental MHC antigen sharing and pregnancy wastage in captive pigtailed macaques. J Reprod Immunol 32:73–88 . doi: 10.1016/S0165-0378(96)00988-6

Knapp, L.A., 2005. The ABCs of MHC. Evol. Anthropol. Issues News Rev. 14, 28–37. doi:10.1002/evan.20038

Kodric-Brown A (1993) Female choice of multiple male criteria in guppies: interacting effects of dominance, coloration and courtship. Behav Ecol Sociobiol 32:415–420 . doi: 10.1007/BF00168825

Korstjens AH, Schippers EP (2003) Dispersal Patterns Among Olive Colobus in Taï National Park. Int J Primatol 24:515–539 . doi: 10.1023/A:1023784213317

Krause J, Ruxton GD (2002) Living in Groups. OUP Oxford

Kutsukake N (2008) Complexity, dynamics and diversity of sociality in group-living mammals. Ecol Res 24:521–531 . doi: 10.1007/s11284-008-0563-4

Lachish S, Miller KJ, Storfer A, et al (2011) Evidence that disease-induced population decline changes genetic structure and alters dispersal patterns in the Tasmanian devil. Heredity 106:172–182 . doi: 10.1038/hdy.2010.17

Lande R (1981) Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. Proc Natl Acad Sci 78:3721–3725

Lawson Handley LJ, Perrin N (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. Mol Ecol 16:1559–1578 . doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03152.x

Lehtonen J, Jaatinen K (2016) Safety in numbers: the dilution effect and other drivers of group life in the face of danger. Behav Ecol Sociobiol 70:449–458 . doi: 10.1007/s00265-016-2075-5

Levréro, F., Gatti, S., Ménard, N., Gautier-Hion, A., 2002. Inter-unit encounters in western lowland gorillas (Gorilla g. gorilla). Folia Primatol. (Basel) 73, 157.

Lukas D, Clutton-Brock TH (2013) The Evolution of Social Monogamy in Mammals. Science 341:526–530 . doi: 10.1126/science.1238677

Lukas, D., Bradley, B.J., Nsubuga, A.M., Doran-Sheehy, D., Robbins, M.M., Vigilant, L., 2004. Major histocompatibility complex and microsatellite variation in two populations of wild gorillas: GENETIC VARIATION IN WILD GORILLAS. Mol. Ecol. 13, 3389–3402. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02353.x

Lynch KS, Stanely Rand A, Ryan MJ, Wilczynski W (2005) Plasticity in female mate choice associated with changing reproductive states. Anim Behav 69:689–699 . doi: 10.1016/j.anbehav.2004.05.016

MacNulty DR, Tallian A, Stahler DR, Smith DW (2014) Influence of Group Size on the Success of Wolves Hunting Bison. PLOS ONE 9:e112884 . doi: 10.1371/journal.pone.0112884

Magliocca F, Querouil S, Gautier-Hion A (1999) Population structure and group composition of western lowland gorillas in North-Western Republic of Congos. Am J Primatol 48:1–14 . doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(1999)48:1<1::AID-AJP1>3.0.CO;2-2

Magliocca F, Gautier-Hion A (2002) Mineral content as a basis for food selection by western lowland gorillas in a forest clearing. Am J Primatol 57:67–77 . doi: 10.1002/ajp.10034

Maisels F (1996) Synthesis of informations concerning the Park National d'Odzala, Congo.

Masi S, Cipolletta C, Robbins MM (2009) Activity patterns of western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Bai-Hokou, Central African Republic. Am J Primatol 71:91–100

Masi S, Mundry R, Ortmann S, et al (2015) The Influence of Seasonal Frugivory on Nutrient and Energy Intake in Wild Western Gorillas. PLOS ONE 10:e0129254 . doi: 10.1371/journal.pone.0129254

Matschie P (1903) Über eined Gorilla aus Deutsch-Ostafrika. Sitzungsberichte DesGesellschaft Naturforschender Freunde 253–259

Matschie P (1904) Bemerkungen über die Gattung Gorilla. Ges Naturforschender Freunde 4553

Matschie P (1914) Neue Affen aus Matsch Mittelafrika. S. Itzungsber Ges Naturforsch Freunde Berl 323–342

McComb KE (1991) Female choice for high roaring rates in red deer, Cervus elaphus. Anim Behav 41:79–88 . doi: 10.1016/S0003-3472(05)80504-4

Mead LS, Arnold SJ (2004) Quantitative genetic models of sexual selection. Trends Ecol Evol 19:264–271 . doi: 10.1016/j.tree.2004.03.003

Ménard N, Querouil S (2000) Rapport de mission

Mesnick SL, Boeuf BJL (1991) Sexual Behavior of Male Northern Elephant Seals: Ii. Female Response To Potentially Injurious Encounters. Behaviour 117:262–280 . doi: 10.1163/156853991X00571

Metsio Sienne J, Buchwald R, Wittemyer G (2014) Plant mineral concentrations related to foraging preferences of western lowland gorilla in central African forest clearings. Am J Primatol 76:1115–1126 . doi: 10.1002/ajp.22297

Meurant G (2012) The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics. Academic Press

Moller AP (1992) Frequency of Female Copulations with Multiple Males and Sexual Selection. Am Nat 139:1089–1101 . doi: 10.1086/285374

Müller, N., Ostner, J., Schülke, O., Walter, L., 2014. Towards the non-invasive assessment of MHC genotype in wild primates: Analysis of wild assamese macaque MHC-*DRB* from fecal samples. Am. J. Primatol. 76, 230–238. doi:10.1002/ajp.22225

Negri AP, Jones GJ, Hindmarsh M (1995) Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium Anabaena circinalis. Toxicon 33:1321–1329 . doi: 10.1016/0041-0101(95)00068-W

Nunn CL, Craft ME, Gillespie TR, et al (2015) The sociality–health–fitness nexus: synthesis, conclusions and future directions. Phil Trans R Soc B 370:20140115 . doi: 10.1098/rstb.2014.0115

Packer C, Herbst C, Pusey AE, et al (1988) Reproductive success in lions. In: Reproductive success : Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems. University of Chicago Press, Chicago, pp 363–383

Parnell RJ (2002) Group size and structure in western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) at Mbeli Bai, Republic of Congo. Am J Primatol 56:193–206 . doi: 10.1002/ajp.1074

Penn, D.J., Potts, W.K., 1999. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. Am. Nat. 153, 145–164. doi:10.1086/303166

Penn DJ (2002) The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex. Ethology 108:1–21 . doi: 10.1046/j.1439-0310.2002.00768.x

Pérez-Barbería FJ, Gordon IJ, Pagel M, Huelsenbeck J (2002) The origins of sexual dimorphism in body size in ungulates. Evolution 56:1276–1285 . doi: 10.1554/0014-3820(2002)056[1276:TOOSDI]2.0.CO;2

Perrin N, Mazalov V (2000) Local Competition, Inbreeding, and the Evolution of Sex- Biased Dispersal. Am Nat 155:116–127 . doi: 10.1086/303296

Pickett STA, Kolasa J, Armesto JJ, Collins SL (1989) The Ecological Concept of Disturbance and Its Expression at Various Hierarchical Levels. Oikos 54:129–136 . doi: 10.2307/3565258

Plavcan JM (2001) Sexual dimorphism in primate evolution. Am J Phys Anthropol 116:25–53 . doi: 10.1002/ajpa.10011

Plumptre AJ, Nixon S, Critchlow R, et al (2015) Status of Grauer's gorilla and chimpanzees in Eastern Democratic Republic of Congo: historical and current distribution and abundance

Popovich DG, Jenkins DJA, Kendall CWC, et al (1997) The Western Lowland Gorilla Diet Has Implications for the Health of Humans and Other Hominoids. J Nutr 127:2000–2005

Portugal SJ, Guillemain M (2011) Vigilance patterns of wintering Eurasian Wigeon: female benefits from male low-cost behaviour. J Ornithol 152:661–668 . doi: 10.1007/s10336-010-0641-6

Potts WK, Wakeland EK (1990) Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. Trends Ecol Evol 5:181–187 . doi: 10.1016/0169-5347(90)90207-T

Pusey AE (1987) Sex-biased dispersal and inbreeding avoidance in birds and mammals. Trends Ecol Evol 2:295–299 . doi: 10.1016/0169-5347(87)90081-4

Qvarnström A (2001) Context-dependent genetic benefits from mate choice. Trends Ecol Evol 16:5–7 . doi: 10.1016/S0169-5347(00)02030-9

Real L (1994) Behavioral Mechanisms in Evolutionary Ecology. University of Chicago Press

Reichard UH, Boesch C (2003) Monogamy: Mating Strategies and Partnerships in Birds, Humans and Other Mammals. Cambridge University Press

Remis MJ (1997) Ranging and grouping patterns of a western lowland gorilla group at Bai Hokou, Central African Republic. Am J Primatol 43:111–133 . doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(1997)43:2<111::AID-AJP2>3.0.CO;2-#

Remis MJ, Dierenfeld ES, Mowry CB, Carroll RW (2001) Nutritional Aspects of Western Lowland Gorilla (Gorilla gorilla gorilla) Diet During Seasons of Fruit Scarcity at Bai Hokou, Central African Republic. Int J Primatol 22:807–836 . doi: 10.1023/A:1012021617737

Robbins AM, Robbins MM (2015) Dispersal Patterns of Females in the Genus Gorilla. In: Furuichi T, Yamagiwa J, Aureli F (eds) Dispersing Primate Females. Springer Japan, pp 75–104

Robbins MM, Bermejo M, Cipolletta C, et al (2004) Social structure and life-history patterns in western gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Am J Primatol 64:145–159 . doi: 10.1002/ajp.20069

Robbins, M.M., 1995. A Demographic Analysis of Male Life History and Social Structure of Mountain Gorillas. Behaviour 132, 21–47. doi:10.1163/156853995X00261

Rogers ME, Maisels F, Williamson EA, et al (1990) Gorilla Diet in the Lopé Reserve, Gabon: A Nutritional Analysis. Oecologia 84:326–339

Rogers ME, Abernethy K, Bermejo M, et al (2004) Western gorilla diet: a synthesis from six sites. Am J Primatol 64:173–192

Rosvall KA (2011) Intrasexual competition in females: evidence for sexual selection? Behav Ecol 22:1131–1140 . doi: 10.1093/beheco/arr106

Roy J, Gray M, Stoinski T, et al (2014) Fine-scale genetic structure analyses suggest further male than female dispersal in mountain gorillas. BMC Ecol 14:21 . doi: 10.1186/1472-6785-14-21

Ruvolo M, Pan D, Zehr S, et al (1994) Gene trees and hominoid phylogeny. Proc Natl Acad Sci 91:8900–8904

Sandell M (1989) The Mating Tactics and Spacing Patterns of Solitary Carnivores. In: Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution. Springer, Boston, MA, pp 164–182

Scorolli AL, Cazorla L, C A, Tejera LA (2006) Unusual mass mortality of feral horses during a violent rainstorm in Parque Provincial Tornquist, Argentina. Mastozool Neotropical 13:255–258

Seddon N, Amos W, Mulder RA, Tobias JA (2004) Male heterozygosity predicts territory size, song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. Proc R Soc Lond B Biol Sci 271:1823–1829 . doi: 10.1098/rspb.2004.2805

Setchell, J.M., Kappeler, P.M., 2003. Selection in Relation to Sex in Primates, in: Advances in the Study of Behavior. Academic Press, pp. 87–173. doi:10.1016/S0065-3454(03)33003-7

Setchell JM, Charpentier MJE, Bedjabaga I-B, et al (2006) Secondary sexual characters and female quality in primates. Behav Ecol Sociobiol 61:305–315 . doi: 10.1007/s00265-006-0260-7

Setchell JM, Smith TE, Knapp LA (2015) Androgens in a female primate: Relationships with reproductive status, age, dominance rank, fetal sex and secondary sexual color. Physiol Behav 147:245–254 . doi: 10.1016/j.physbeh.2015.04.051

Shannon G, Slotow R, Durant SM, et al (2013) Effects of social disruption in elephants persist decades after culling. Front Zool 10:62 . doi: 10.1186/1742-9994-10-62

Shultz S, Opie C, Atkinson Q (2011) Stepwise evolution of stable sociality in primates. Nature 479:219

Silk JB (2007) The adaptive value of sociality in mammalian groups. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362:539–559 . doi: 10.1098/rstb.2006.1994

Sinclair ARE, Byrom AE (2006) Understanding ecosystem dynamics for conservation of biota. J Anim Ecol 75:64–79 . doi: 10.1111/j.1365-2656.2006.01036.x

Smith JM (1991) Theories of sexual selection. Trends Ecol Evol 6:146–151 . doi: 10.1016/0169-5347(91)90055-3

Smith, T.B., Wayne, R.K., 1996. Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford University Press.

Smith TB, Milá B, Grether GF, et al (2008) Evolutionary consequences of human disturbance in a rainforest bird species from Central Africa. Mol Ecol 17:58–71 . doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03478.x

Sommer, S., Schwab, D., Ganzhorn, J., 2002. MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to geographic range and social system. Behav. Ecol. Sociobiol. 51, 214–221. doi:10.1007/s00265-001-0432-4

Sop T, Cheyne SM, Maisels F, Wich SA (2015) Abundance annex: ape population abundance estimates. In: State of the Apes 2015: Industrial Agriculture and Ape Conservation, Cambridge University Press. Arcus Foundation, Cambridge, UK, pp 1–41

Steinfartz S, Glaberman S, Lanterbecq D, et al (2007) Genetic Impact of a Severe El Niño Event on Galápagos Marine Iguanas (Amblyrhynchus cristatus). PLoS ONE 2:e1285 . doi: 10.1371/journal.pone.0001285

Sterck EHM, Bontrop RE, de Groot N, et al (2017) No postcopulatory selection against MHC-homozygous offspring: Evidence from a pedigreed captive rhesus macaque colony. Mol Ecol 26:3785–3793 . doi: 10.1111/mec.14153

Stewart KJ (1988) Suckling and lactational anoestrus in wild gorillas (Gorilla gorilla). J Reprod Fertil 83:627–634 . doi: 10.1530/jrf.0.0830627

Stokes EJ, Parnell RJ, Olejniczak C (2003) Female dispersal and reproductive success in wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Behav Ecol Sociobiol 54:329–339 . doi: 10.1007/s00265-003-0630-3

Stokes EJ (2004) Within-group social relationships among females and adult males in wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla). Am J Primatol 64:233–246 . doi: 10.1002/ajp.20074

Strait SG (1997) Tooth use and the physical properties of food. Evol Anthropol Issues News Rev 5:199–211 . doi: 10.1002/(SICI)1520-6505(1997)5:6<199::AID-EVAN2>3.0.CO;2-8

Stumpf RM, Fleagle JG, Jungers WL, et al (1998) Morphological distinctiveness of Nigerian gorilla crania. 26:213

Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J., 1996. Reliable Genotyping of Samples with Very Low DNA Quantities Using PCR. Nucleic Acids Res. 24, 3189–3194. doi:10.1093/nar/24.16.3189

Taylor AB, Goldsmith ML (2002) Gorilla Biology: A Multidisciplinary Perspective. Cambridge University Press

Trivers, R., 1972. Parental Investment and Sexual Selection, in: Sexual Selection and the Descent of Man 1871-1971. Campbell B., Chicago, pp. 139–179.

Tutin CEG, Fernandez M (1993) Composition of the diet of chimpanzees and comparisons with that of sympatric lowland gorillas in the lopé reserve, gabon. Am J Primatol 30:195–211 . doi: 10.1002/ajp.1350300305

Vanleeuwe H, Cajani S, Gautier-Hion A (1998) Large mammals at forest clearings in the Odzala National Park, Congo. Rev Décologie 53:171–180

Vanpé C, Gaillard J-M, Kjellander P, et al (2010) Assessing the intensity of sexual selection on male body mass and antler length in roe deer Capreolus capreolus: is bigger better in a weakly dimorphic species? Oikos 119:1484–1492 . doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18312.x

Watts, D.P., 2002. Gorilla social Relationships : A comparative overview, in: Gorilla Biology: A Multidisciplinary Perspective. Cambridge University Press, p. 302.

WCS, 2009. Protection and monitoring of great apes in Odzala-Kokoua national Park, Republic of Congo (Final report to USFWS Great Apes Fund).

Widemo F, Sæther SA (1999) Beauty is in the eye of the beholder: causes and consequences of variation in mating preferences. Trends Ecol Evol 14:26–31 . doi: 10.1016/S0169-5347(98)01531-6

Williamson EA, Maisels F, Groves C, et al (2013) Hominidae. In: Handbook of the Mammals of the World, Lynx Edicions. R.A. Mittermeier, A.B. Rylands and D.E. Wilson, Barcelona, Spain, pp 792–854

Williamson EA, Tutin CEG, Rogers ME, Fernandez M (1990) Composition of the diet of lowland gorillas at Lopé in Gabon. Am J Primatol 21:265–277 . doi: 10.1002/ajp.1350210403

Winternitz J, Abbate JL, Huchard E, et al (2017) Patterns of MHC-dependent mate selection in humans and nonhuman primates: a meta-analysis. Mol Ecol 26:668–688 . doi: 10.1111/mec.13920

Woolley L-A, Millspaugh JJ, Woods RJ, et al (2008) Population and Individual Elephant Response to a Catastrophic Fire in Pilanesberg National Park. PLOS ONE 3:e3233 . doi: 10.1371/journal.pone.0003233

Wrangham RW (1980) An Ecological Model of Female-Bonded Primate Groups. Behaviour 75:262–300 . doi: 10.1163/156853980X00447

Yamagiwa J, Kahekwa J, Basabose AK (2003) Intra-specific variation in social organization of gorillas: implications for their social evolution. Primates 44:359–369 . doi: 10.1007/s10329-003-0049-5

Yeager M, Hughes AL (1999) Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and

Ziegler A, Kentenich H, Uchanska-Ziegler B (2005) Female choice and the MHC. Trends Immunol 26:496–502 . doi: 10.1016/j.it.2005.07.003