MASTER
ECOLOGIE-BIODIVERSITE
SPECIALITE MALADIES TRANSMISSIBLES

PARCOURS Dynamique des Interactions Parasite Hôte Environnement

_____

Rapport de stage de Master 2
Année 2015

Sabourin Emeline

Dynamique spatiale de la fasciolose en Camargue







Réalisé sous la direction de : Hurtrez-Boussès Sylvie, Vittecoq Marion, Lounnas Manon
Laboratoire/Organisme : MIVEGEC, Tour du Valat
Période du stage : Du 2 Janvier au 5 Juin

Année universitaire 2014-2015

Remerciements

J’aimerais dire un grand merci à Sylvie Hurtrez-Boussès, Marion Vittecoq et Manon Lounnas pour m’avoir permis d’effectuer ce stage sous leur direction.

Je remercie Sylvie Hurtrez-Boussès de m’avoir donné goût à la génétiques des populations et de son aide pour l’élaboration de ce rapport qui me fut très précieuse.

Je remercie aussi Marion Vittecoq, de m’avoir accompagnée lors de mes sorties de terrain sur le domaine de la Tour du Valat et d’avoir répondu à mes nombreuses questions.

Merci à Manon Lounnas pour sa patience, sa disponibilité, son aide pour l’utilisation des logiciels statistiques et de génétiques des populations et tous ses conseils précieux tout au long de ce stage.

Merci à tous les stagiaires, Sandy pour sa gentillesse, Eric pour son soutien. Florian pour ta délicatesse et ton esprit altruiste et Caro pour ta bonne humeur.

Je n’oublierai pas de remercier l’ensemble de l’équipe et le personnel de la Tour du Valat pour leur accueil, leur bonne humeur et leur aide.

J’aimerais remercier aussi l’ensemble des personnes qui ont pris sur leurs temps de travail et qui ont partagé avec moi leur passion.

Pour finir, je remercie l’Unité MIVEGEC et Fréderic Simard pour m’avoir accueillie au sein de leur équipe et de leur structure.

Résumé

L'émergence et la ré-émergence de maladies que nous connaissons depuis ces cents dernières années représentent une véritable crise sanitaire en grande partie due à des perturbations anthropiques. La fasciolose est une maladie particulièrement sensible aux changements liés à l'Homme. Cette zoonose causée par le parasite *Fasciola hepatica*, est communément reconnue comme un problème vétérinaire et de santé publique majeur. Nous avons étudié la dynamique des populations de *F. hepatica* et de son hôte intermédiaire *Galba truncatula*, un mollusque de la famille des Lymnaeidae, au sein d'une zone d'étude en Camargue nous permettant d'avoir accès aux hôtes définitifs (taureaux) et aux hôtes intermédiaires. Nous avons pu établir que la prévalence de ce parasite est très élevée chez les taureaux de la manade étudiée. De plus l'appartenance de toutes les douves à un même cluster génétique suggère que tous les taureaux seraient infectés à partir d'un seul foyer infectieux. Concernant l'hôte intermédiaire *G. truncatula*, nous avons caractérisé les habitats du site d'étude favorables à leur présence. L'étude de génétique des populations montre que les populations sont moins autofécondantes que dans les études précédentes, probablement du fait des réseaux hydrographiques permanents, offrant une meilleure stabilité aux populations de limnées souvent sensibles aux perturbations des milieux. De plus nous montrons que la structuration des populations explique mieux les patrons génétiques que la structuration en infra-populations. Cependant nous détectons un isolement par la distance et un site où les infra populations sont génétiquement distinctes entres elles, suggérant un modèle en stepping-stone. En conclusion, la persistance des populations de limnées et les fortes prévalences détectées chez les taureaux nous confirme que la fasciolose peut être considérée comme un problème important en Camargue et encourage à poursuivre les travaux sur cette maladie et ses hôtes afin d'avoir une vision plus globale de la circulation du parasite.
Mots clés : *Fasciola hepatica, Galba truncatula*, autofécondation, réseau hydrographique, structure génétique.

Abstract

The emergence and re-emergence of diseases encountered over the last hundred years are a real health crisis largely due to anthropic disturbance. Fasciolosis is particularly sensitive to human related changes. This zoonosis caused by the parasite *Fasciola hepatica*, is commonly recognized as a veterinary problem and major public health problem. We studied the population dynamics of *F. hepatica* and its intermediate host *Galba truncatula* a mollusk of the Lymnaeidae family within a study area in the Camargue allowing us to have access to definitive hosts (bulls) and intermediate hosts. We found that the prevalence of this parasite is very high among bulls in the field. Moreover all the liver flukes belong to the same genetic cluster suggesting that all bulls get probably infected from a single outbreak. Regarding the intermediate host *G. truncatula*, we characterized the favorable habitats in Camargue to their presence. The genetic study of populations showed that population were less self-fertilizing than expected from previous studies, probably due to permanent and stable drainage network, providing higher stability to the fresh-water snails population often proned to environment disturbances. Furthermore, we showed that the structuration in sites better explained the genetic patterns than the infra-population structuration. However, we detect an isolation by distance and a site where infra populations were genetically distinct among eachothers, suggesting a structuration following a stepping-stone model. Finally, the fresh-water snail persistence and high prevalence detected in bulls emphasis that fasciolosis could represent a major problem in the Camargue and encourages further work on this disease and its hosts to have a vision more global of the parasite circulation.
Keywords : *Fasciola hepatica, Galba truncatula*, self-fertilization, drainage networks, genetic structure.

Table des matières

Introduction 1
Matériel et Méthodes 3
Modèles biologiques 3
Territoire d'étude et échantillonnage des mollusques. 3
Détermination des prévalences parasitaires et échantillonnage de douves 4
Biologie moléculaire 4
Extraction d'ADN 4
Génotypage 4
Analyses des données 5
Résultats 6
Prévalence parasitaire 7
Génétique des populations des douves 7
Diversité génétique 7
Ecarts à la panxmie 7
Différenciation entre isolats 7
Caractéristique de l'habitat des populations de *Galba truncatula*. 8
Prévalences parasitaires 8
Génétique des populations de mollusques 8
Discussion 10
Biologie des populations de grande douve 10
Biologie des populations de *Galba truncatula* 10
Structuration génétique des populations 13
Perspectives 15
Bibliographie 16

ANNEXES 21

Enkystement des métacercaires sur des plantes aquatiques





Ingestion par l'hôte définitif

1

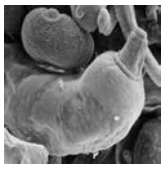
Hôte définitif (Vertébré)

Ovins / Bovins / Homme



6

Multiplication asexuée de la douve dans le mollusque





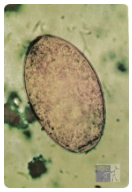
5

Reproduction sexuée de la douve dans les voies biliaires



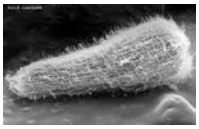
2

Œufs non embryonnés dans les selles



3

Eclosion des œufs dans l'eau donnant des miracidiums



Recherche de l'hôte par la larve miracidium

4



Hôte intermédiaire : Mollusques

(*Galba truncatula*)

Figure 1 : Cycle de vie de *Fasciola hepatica.*

1. Ingestion de métacercaires par l'hôte définitif, un vertébré. Le développement adulte de la douve commence ici. Désenkystement en douve juvénile et migration de la douve jusque dans les canaux biliaires. 2. La douve adulte se reproduit et ses œufs quittent l'hôte via les fèces, les œufs sont non embryonnés et le deviennent dans l'eau. 3. Eclosion des œufs de douve donnant lieu au premier stage larvaire (miracidium) 4. La larve ciliée va rechercher activement l'hôte intermédiaire. 5. Multiplication asexuée dans la limnée : transformation du stade miracidium en sporocytes, puis rédies. 6. Les rédies donnent naissance à des cercaires, dernier stade larvaire. Les cercaires sortent du mollusques et s'enkystent sur des végétaux et deviennent des métacercaires(forme de résistances) prêtes à être ingérées. (Hurtrez- Boussès et al.2001 : Andrews, 1999).

Introduction

Le monde connaît depuis ces cent dernières années une crise sanitaire majeure (Taylor *et al.* 2001). En effet, l'émergence de maladies inconnues jusqu'à une date récente (Sras, grippe aviaire, Ebola etc.), la réémergence de maladies que l'on pensait presque éradiquées (tuberculose, choléra) et les difficultés pour enrayer certaines pandémies comme le Sida font de ces maladies un enjeu majeur (Woolhouse *et al.* 2005, WHO. 2008).

Une des causes principales de ces problèmes sanitaires sont les perturbations anthropiques (Jones *et al.* 2008). Elles peuvent en effet modifier les dynamiques épidémiologiques des maladies infectieuses en créant de nouveaux contacts entre populations, en favorisant la diffusion des parasites, en concentrant les populations d'hôtes et en créant ou intensifiant des pressions de sélection sur les parasites et provoquer ainsi des émergences ou réémergences.

Les maladies liées à l'eau (e.g. paludisme, bilharzioses, choléra, fascioloses etc.) sont particulièrement sensibles aux perturbations anthropiques. L'urbanisation massive, l'extension des zones irriguées, la gestion des zones humides sont autant de pratiques susceptibles de favoriser la réémergence de ces maladies en de nombreux endroits. Ces maladies sont de plus celles qui affectent le plus durement les populations humaines (Jones *et al.* 1990) et pour pouvoir les limiter contrôler et prévenir leur réémergence, il est donc indispensable de cerner les facteurs de risques.

Parmi ces maladies, les trématodoses sont particulièrement étudiées. Elles sont causées par des parasites trématodes (Plathelminthes) qui passent par des mollusques jouant le rôle d'hôtes intermédiaires. Leur transmission, essentiellement liée à l'eau ou à la nourriture, fait que ces parasites sont parmi les plus répandus dans les populations humaines et animales (Rim *et al.* 1994, Taylor *et al.* 2001). De plus, leurs cycles peuvent faire intervenir un à plusieurs hôtes intermédiaires sur lesquels ils exercent de fortes pressions de sélection. Parmi ces trématodes, la grande douve du foie (*Fasciola hepatica*, Plathelminthe, Digène figure 1) est un modèle particulièrement pertinent pour étudier les risques d'émergences. Ce parasite infeste, à l'état adulte, un très large spectre de vertébrés, que ce soient des animaux domestiques (surtout ovins et bovins), une très grande diversité de mammifères sauvages (Hurtrez-Boussès *et al*. 2004) sans oublier l'Homme. Se développant dans le foie, il cause de très graves troubles digestifs, une anémie et peut conduire à une cirrhose, fatale pour l'hôte. Les traitements sont longs et coûteux et des cas de résistance du parasite ont été décrits. La fasciolose est donc une maladie communément reconnue comme étant d'importance vétérinaire et pouvant avoir des forts impacts en santé humaine. Elle affecte durement le bétail entraînant des pertes économiques, dues à la baisse de production de lait, de viande et de laine (Torgerson et Claxon., 1999). De plus, plusieurs études épidémiologiques ont depuis ces 15 dernières années soulevé le

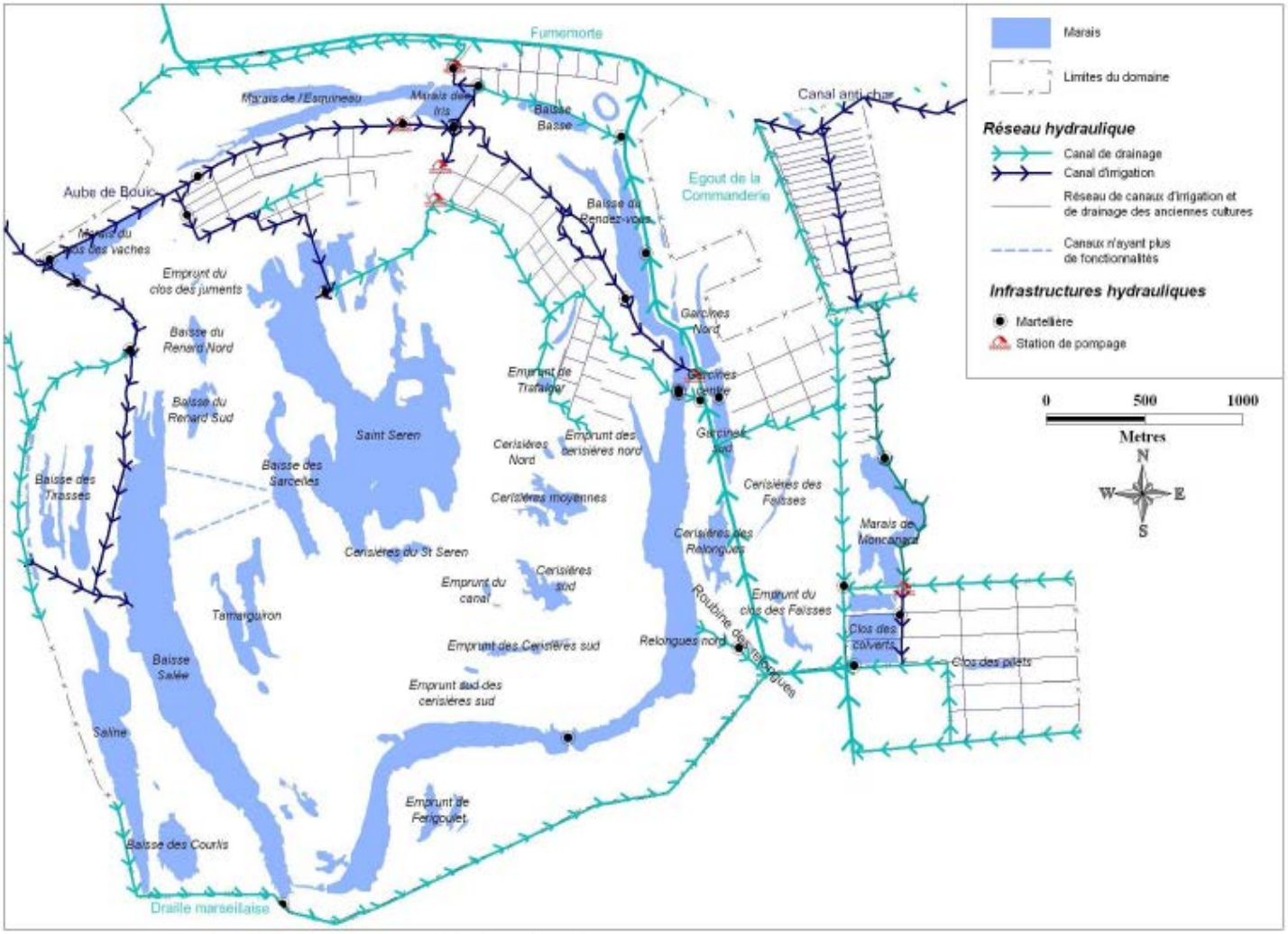


Figure 2 : Fonctionnement hydraulique sur la partie centrale de la Tour du Valat.

problème de la réémergence de la fasciolose chez l'Homme dans de nombreux pays (Bolivie, Pérou, Egypte, Iran, Chine voir pour revue Mas-Coma *et al*. 1999). Contrairement à la majorité des autres digènes, la grande douve du foie a également un spectre d'hôtes intermédiaires très large : elle est capable d'infecter la plupart des Lymnaeidés, voire d'autres gastéropodes dulçaquicoles (Correa *et al*. 2010). La réémergence de cette maladie dans certaines zones est directement corrélée aux perturbations de l'environnement, notamment à l'extension des réseaux d'irrigations dans lesquels le bétail vient s'abreuver (Esteban *et al*. 2002). Il est donc essentiel de mieux comprendre l'épidémiologie de la fasciolose, de mieux cerner les risques d'émergence et les moyens d'y faire face.

Afin d'étudier les dynamiques spatiales de la fasciolose et les liens entre anthropisation et risques il est important de cibler un territoire d'étude où le parasite circule et où nous pouvons avoir une bonne traçabilité des différents acteurs en présence (parasite, hôtes définitifs et intermédiaires). Reconnue comme un point chaud de biodiversité, la zone méditerranéenne et plus particulièrement le territoire camarguais se prête très bien aux questionnements sur la préservation des systèmes écologiques et les risques épidémiologiques. C'est aussi une des régions où les risques d'émergence sont très élevés (Vittecoq *et al*. 2012), les zones humides étant les plus sensibles du point de vue épidémiologique (Jones *et al.* 1990). En effet, la Camargue est une vaste zone humide en plein cœur du bassin méditerranéen qui allie plusieurs caractéristiques en faisant un site de choix pour étudier la dynamique de *F. hepatica* chez son hôte intermédiaire et ses hôtes définitifs. Ce site est composé d'une véritable mosaïque d'écosystèmes, fluctuants dans le temps (marais, sansouïres, étangs, canaux, rizières, bois, salins, etc.). Elle est aussi fortement anthropisée (notamment par la gestion des entrées d'eaux douces) et les contacts entre populations humaines, faune domestique et faune sauvage y sont très courants. Enfin la fasciolose est reconnue comme un problème essentiel dans les élevages de taureaux (PNR 2011).

L'objectif de ce travail est d'étudier la dynamique de la fasciolose au sein d'une zone d'étude dans laquelle nous pouvons simultanément caractériser les habitats, échantillonner les parasites chez les hôtes définitifs et intermédiaires et suivre les populations de mollusques hôtes intermédiaires.

Nous avons donc dans cette étude réalisé un suivi de la grande douve du foie et de son hôte intermédiaire de prédilection, *Galba truncatula,* au sein du domaine de la Tour du Valat, zone où les taureaux de la manade ne sont pas traités par des anti-helminthiques et qui présente un réseau de drainage et d'irrigation dense.

Concernant *F. hepatica*, un suivi des foies des taureaux de la manade de la Tour du Valat a été réalisé afin de (1) établir les prévalences de ce parasite au sein de la Tour du Valat et (2)

Tableau 1: Récapitulatif de l'échantillonnage des limnées. En bleu clair, les infra-populations analysées. Les infra-populations avec une étoile* sont ceux avec des génotypes incomplet.

Date	Lieu	Abréviations	Coordonnée longitude	Coordonnée latitude	Nbr limnées
23/05/2014	Aube de Biouc, Mare 2	ABm2	4°39'08.64	43°30'31.95	20
23/05/2014	Aube de Biouc, Mare 1	ABm1P2	4°39'10.73	43°30'34.02	36
23/05/2014	Aube de Biouc, Mare	ABmP3	4°39'11.28	43°30'33.17	32
23/05/2014	Aube de Biouc, Mare	ABmS5	4°39'12.10	43°30'31.26	5
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal	ABCS1	4°39'24.69	43°30'32.50	2
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal	ABCS2*	4°39'18.54	43°30'33.27	5
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal	ABCS3*	4°39'27.94	43°30'37.56	2
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal b	ABCbS1*	4°39'31.98	43°30'36.66	2
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal b	ABCbS3*	4°39'49.42	43°30'38.29	1
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal b	ABCbS4*	4°39'40.14	43°30'38.01	3
23/05/2014	Aube de Biouc, Saule après mare	ABCsmS2*	4°39'15.37	43°30'34.16	1
23/05/2014	Aube de Biouc, Canal b, Site o, peuplier après mare	ABCbSO	4°39'20.64	43°30'35.77	3
23/05/2014	Mas mon canard plan d'eau ragondins	MCPD1	4°41'36.64	43°29'22.64	34
23/05/2014	Mas mon canard plan d'eau ragondins	MCPD2	4°41'36.97	43°29'23.70	15
23/05/2014	Mas mon canard plan d'eau ragondins	MCPD3	4°41'36.72	43°29'23.30	7
23/05/2014	Mas moncanard, plan d'eau ragondins	MCPD4	4°41'35.25	43°29'22.47	13
23/05/2014	Mas moncanard, plan d'eau ragondins	MCPD5	4°41'34.36	43°29'22.23	9
23/05/2014	Mas moncanard, plan d'eau ragondins centre	MCPDc	4°41'35.80	43°29'23.08	11
23/05/2014	Mas moncanard,canal	MCcS1*	4°41'35.54	43°29'23.09	1
12/11/2014	Aube de Biouc,Extreme Ouest	ABDP	4°39'12.09	43°30'34.25	5
12/11/2014	Aube de Biouc,droite perpendiculaire	ABEO	4°39'17.05	43°30'32.83	15
12/11/2014	Aube de Biouc,pont	ABP*	4°39'23.99	43°30'35.06	2
12/11/2014	Aube de Biouc	AB4*	4°39'30.83	43°30'36.22	1
12/11/2014	Aube de Biouc	AB5*	4°39'35.36	43°30'37.01	1
12/11/2014	Aube de Biouc	AB6*	4°39'42.02	43°30'38.09	1
12/11/2014	Aube de Biouc	AB7	4°39'48.66	43°30'38.16	13
12/11/2014	Aube de Biouc	AB8	4°39'21.35	43°30'31.54	13
12/11/2014	Mas moncanard	MC	4°40'29.30	43°30'41.60	9
12/11/2014	Mas moncanard	MC10	4°39'56.48	43°30'38.23	3
23/01/2015	Roubine des Iris	RIs1	4°40'16.424	43°30'44.177	6
23/01/2015	Roubine des Iris	RIs2	4°40'23.1	43°30'42.3	2
23/01/2015	Roubine des Iris	RIs4*	4°40'29.3	43°30'41.6	3
23/01/2015	Roubine des Iris	RIs5*	4°40'40.4	43°30'38.2	29
23/01/2015	Roubine des Iris	RIs6*	4°40'48.8	43°30'35.4	35
27/01/2015	L'esquineau	ESS1	4°40'10.8	43°30'50.8	12
27/01/2015	L'esquineau	ESS2	4°40'09.4	43°30'51.0	8
27/01/2015	L'esquineau	ESS3*	4°40'07.3	43°30'51.2	4
27/01/2015	L'esquineau	ESS4*	4°40'05.1	43°30'51.3	10
27/01/2015	L'esquineau	ESS5	4°39'46.8	43°30'50.7	14
27/01/2015	L'esquineau	ESS6	4°39'39.2	43°30'50.1	5
27/01/2015	L'esquineau	ESS7	4°39'36.1	43°30'49.7	5
27/01/2015	L'esquineau	ESS8	4°39'33.7	43°30'49.3	24
27/01/2015	L'esquineau	ESS9*	4°39'27.9	43°30'48.4	2
10/02/2015	Aube de Bouic	ABS2	4°39'30.7	43°30'36.6	10
10/02/2015	Aube de Bouic	ABS3	4°39'23.4	43°30'35.2	4
10/02/2015	Aube de Bouic	ABS4	4°39'05.1	43°30'28.7	6
10/02/2015	Aube de Bouic	ABS5	4°38'57.1	43°30'25.7	10
10/02/2015	Aube de Bouic	ABS6	4°38'55.3	43°30'36.6	2
11/02/2015	Terre du Rendez vous mare 1	TRVM1	4°40'43.9	43°30'06.1	26
11/02/2015	Terre du Rendez vous Roubine limite relongue Nord	TRVS1	4°40'49.0	43°29'54.4	19
11/02/2015	Aube de Bouic		4°40'38.4	43°30'23.9	34
17/02/2015	Fangouze rubine Ouest		4°41'19.3	43°30'39.3	15
17/02/2015	Fangouze rubine Ouest		4°41'20.7	43°30'41.1	8
17/02/2015	Fangouze petite rubine parallèle		4°41'21	43°30'41.4	22
17/02/2015	Fangouze rubine Ouest		4°41'24	43°30'45.8	31
17/02/2015	Fangouze petite rubine parallèle		4°41'21.5	43°30'42.1	14
17/02/2015	Fangouze petite rubine parallèle		4°41'22.3	43°30'43.3	19
17/02/2015	Fangouze petite rubine parallèle		4°41'23	43°30'43.9	8
17/02/2015	Fangouze petite rubine parallèle		4°41'24.6	43°30'46.3	12
17/02/2015	Fangouze petite rubine parallèle		4°41'25.6	43°30'47.9	32
17/02/2015	Fangouze rubine Est		4°41'50.4	43°30'49.7	14
17/02/2015	Fangouze rubine Est		4°41'50.3	43°30'47.3	45
03/03/2015	Fangouze rubine sud Est perpendiculaire tronçon 1		4°41'22	43°30'41.5	15
03/03/2015	Fangouze rubine sud Est perpendiculaire tronçon 2		4°41'24	43°30'41.70	6
03/03/2015	Fangouze rubine sud Est perpendiculaire tronçon 3		4°41'26.1	43°30'41.9	3
03/03/2015	Fangouze grosse rubine autre coté Site 1		4°41'19.7	43°30'40.3	41
03/03/2015	Fangouze grosse rubine autre coté Site 2		4°41'21.2	43°30'42.3	3
03/03/2015	Fangouze rubine parallèle à la grosse rubine SO		4°41'21.6	43°30'43.3	25
03/03/2015	Fangouze rubine parallèle à la grosse rubine SO		4°41'19.7	43°30'40.6	1
09/04/2015	Mare Montcanard		4°41'36.4	43°29'21.1	14
31/03/2015	Roubine 2 parallèle Faïsses Est site 1		4°41'41.0	43°30'00.9	16
31/03/2015	Roubine 2 parallèle Faïsses Est site 2		4°41'42.3	43°30'01.1	8
31/03/2015	Roubine 2 parallèle Faïsses Est site 3		4°41'44.3	43°30'01.3	6
31/03/2015	Roubine 2 parallèle Faïsses Est site 4		4°41'45.8	43°30'01.5	12

déterminer les souches en circulation chez l'hôte définitif par une étude de génétique des populations.

Concernant *G. truncatula*, hôte intermédiaire de prédilection de la grande douve du foie en Europe, nous avons réalisé un suivi des populations de limnées en (1) reportant sur une carte les sites où nous avons pu observer l'espèce nous permettant de faire ressortir les habitats favorables à son installation, (2) recherchant la présence de larves de douves dans tous les mollusques échantillonnés et (3) effectuant une étude de génétique des populations. Il s'agissait là de comprendre comment se structurent les populations : comment la variabilité génétique est-elle structurée et quel est le degré de différenciation entre les populations ?

Nous avons pour ces deux espèces, utilisé des marqueurs microsatellites, qui ont l'intérêt d'être très polymorphes (forts taux de mutation) et neutres (non soumis directement à la sélection). Grâce à ces marqueurs moléculaires, des paramètres épidémiologiques importants tels que la structure de la population et le système de reproduction des hôtes et des parasites, peuvent être connus indirectement.

Matériel et Méthodes

Modèles biologiques

Les modèles biologiques choisis sont la grande douve du foie, *Fasciola hepatica* (Platelminthes : Trematoda), son hôte intermédiaire la limnée tronquée, *Galba truncatula* (gastéropode pulmoné d'eau douce, Lymnaeidae), et un de ses hôtes définitifs, le taureau. (Voir Figure 1 pour le cycle de vie de *F. hepatica*).

Territoire d'étude et échantillonnage des mollusques.

Les prélèvements ont été réalisés en Camargue sur le domaine de la Tour du Valat, dans la commune d'Arles, près du hameau du Sambuc (Bouches du Rhône). Un troupeau de bovins de race Camarguaise de 334 têtes pâture sur une grande partie du domaine (Figure 1)

Les mollusques ont été récoltés par chasse à vue dans leurs habitats naturels : berges des roubines (terme local utilisé pour désigner les canaux d'irrigation et de drainage) et des mares lors de différentes campagnes. Trois campagnes exploratoires avaient eu lieu avant le stage entre mai 2014 et novembre 2015 (échantillonnages et identifications effectués par M. Lounnas et d'autres personnes de l'équipe – liste en Annexe 1). Puis durant le stage, j'ai mené huit sessions d'échantillonnage entre janvier et avril (Tableau 1). L'ensemble des dissections et extractions d'ADN a été réalisé au cours de mon stage. Un total de 908 limnées (265 lors des premières campagnes et 643 pendant ce stage) a été collecté dans sept sites sur le domaine de la Tour du Valat. Au sein de chaque site, plusieurs prospections et points d'échantillonnages

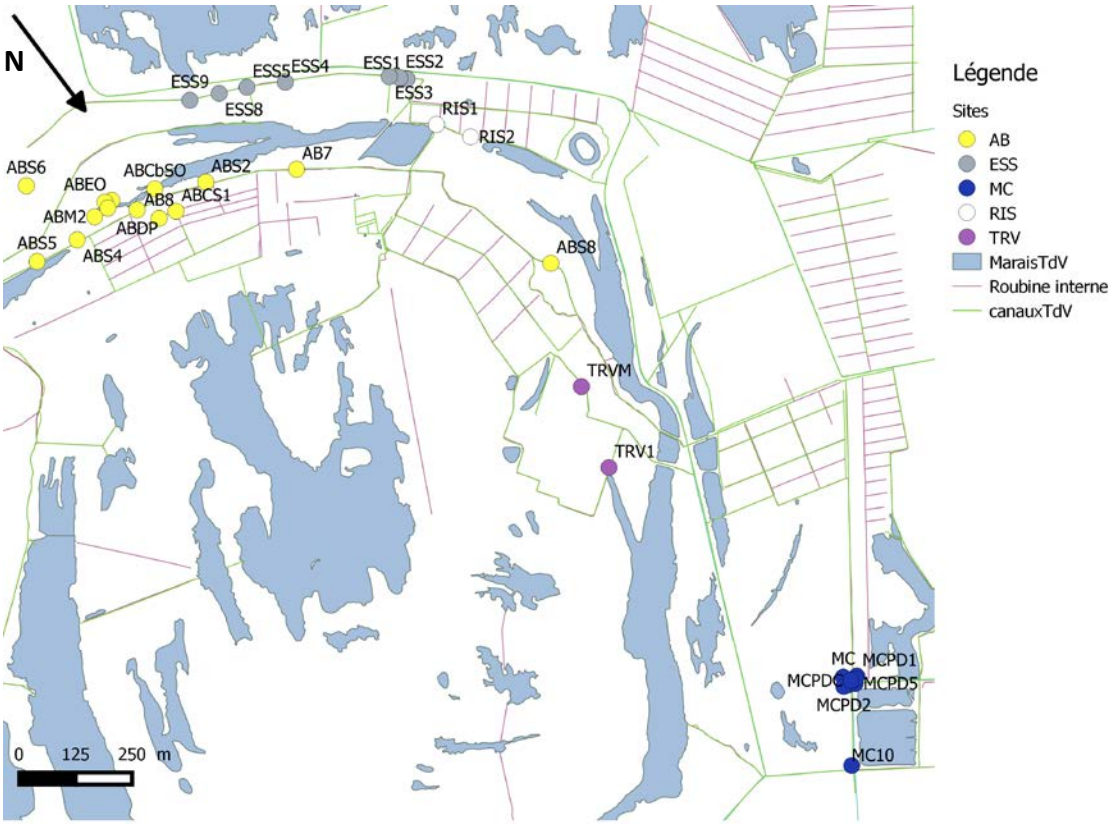


Figure 3 : Carte des infra-populations étudiées.

ont été réalisés. On appellera infra-population, l'ensemble des mollusques collectés à un point d'échantillonnage. Afin de prévenir un effet Wahlund, chaque infra-population a été collectée sur une très petite surface (moins de 2 m le long de la berge). Au total, 74 infra-populations ont été récoltées (nombre moyen d'individus par infra-population : 12 ± 11 SD). Les sites de prélèvements ont été référencés par GPS dans le logiciel QGIS afin de réaliser une carte pour identifier les habitats où se trouvent les limnées (Figure 3). A chaque prélèvement, le pH et la conductivité ont été relevés. Les mollusques collectés ont immédiatement été stockés dans de l'éthanol à 70%.

Détermination des prévalences parasitaires et échantillonnage de douves

Chaque mollusque a été disséqué afin de déterminer son statut (sain ou parasité), par recherche de la présence de larves de douves au niveau de l'hépatopancréas. Le pied de chaque limnée tronquée a été conservé dans l'éthanol 70% afin d'être ensuite utilisé pour les analyses moléculaires.

Les douves adultes ont été échantillonnées aux abattoirs de Tarascon, lors de chaque session d'abattage de taureaux de la manade de la Tour du Valat entre avril 2013 et avril 2015. Jusqu'en janvier 2015, les échantillonnages ont été réalisés par le Dr Hamitou, vétérinaire aux abattoirs, avant que je m'en charge. Le foie de chaque taureau abattu a été soigneusement examiné (après incisions latérales des lobes) pour rechercher la présence de grandes douves. Tous les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 70%. Au total 46 foies ont été examinés et 679 douves ont été collectées. On appellera isolat l'ensemble des parasites collectés chez un même taureau.

Biologie moléculaire

Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait à partir de chaque douve ou du pied de chaque limnée tronquée. Toutes les extractions ont été réalisées dans du Chelex à 5% d'après le protocole d'Estoup et Martin, (1996). (Voir Annexe 2).

Génotypage

Sur les sept sites de limnées récoltées, seuls cinq sites ont pu être analysés suite à des problèmes techniques et un manque de temps (Tableau 1). De plus, seulement 463 individus appartenant à 34 infra-populations ont été utilisés pour les analyses car certains présentaient des génotypes incomplets.

Pour les mêmes raisons, sur les 679 douves collectées, 392 appartenant à 29 isolats ont été génotypées à ce jour, mais dû à des problèmes d'amplification et de séquençage seulement 223 génotypes étaient complets. (Tableau 2)

Tableau 2: Récapitulatif de l'échantillonnage des douves. En violet, les isolats analysés. Les isolats avec une étoile* sont ceux avec des génotypes incomplets.

Date	Individu hôte	Nombre de douves	Age	Sexe
09/04/2013	TaureauA3*	3	Entre 3 ou 5 ans	Mâles castrés
09/04/2013	TaureauA4*	5	Entre 3 ou 5 ans	Mâles castrés
09/04/2013	TaureauA1	7	Entre 3 ou 5 ans	Mâles castrés
09/04/2013	TaureauA2	10	Entre 3 ou 5 ans	Mâles castrés
09/04/2013	TaureauA5	6	Entre 3 ou 5 ans	Mâles castrés
17/04/2013	TaureauE1	7	Entre 18 ou 13 ans	femelle
17/04/2013	TaureauE2	7	Entre 18 ou 13 ans	femelle
29/05/2013	TaureauC1*	12	Entre 2 ou 3 ans	Génisse
29/05/2013	TaureauC2*	13	Entre 2 ou 3 ans	Génisse
29/05/2013	TaureauC3*	10	Entre 2 ou 3 ans	Génisse
26/03/2014	TaureauB1	12	Entre 3 ou 4 ans	Mâles castrés ou 1 étalon
26/03/2014	TaureauB2/3	17	Entre 3 ou 4 ans	Mâles castrés ou 1 étalon
26/03/2014	TaureauB4	12	Entre 3 ou 4 ans	Mâles castrés ou 1 étalon
26/03/2014	TaureauB5	11	Entre 3 ou 4 ans	Mâles castrés ou 1 étalon
26/03/2014	TaureauD1*	10	Entre 3 ou 4 ans	Mâles castrés ou 1 étalon
02/04/2014	TaureauD2*	18	3 ans	Mâles castrés
02/04/2014	TaureauD3*	14	3 ans	Mâles castrés
02/04/2014	TaureauD4	18	3 ans	Mâles castrés
02/04/2014	TaureauD5	14	3 ans	Mâles castrés
02/04/2014	TaureauD6	22	3 ans	Mâles castrés
02/04/2014	TaureauD7	14	3 ans	Mâles castrés
17/03/2015	TaureauF1	26	3 ans	Mâles castrés
17/03/2015	TaureauF2	24	3 ans	Mâles castrés
17/03/2015	TaureauF3	25	3 ans	Mâles castrés
17/03/2015	TaureauF4	29	3 ans	Mâles castrés
17/03/2015	TaureauF5*	7	7 ans	Etalon
17/03/2015	TaureauF6*	sain	3 ans	Mâles castrés
24/03/2015	TaureauG1	39	3 ans	Mâles castrés
24/03/2015	TaureauG2	17	5 ans	étalon
24/03/2015	TaureauG3	22	4 ans	étalon
24/03/2015	TaureauG4	8	3 ans	Mâles castrés
24/03/2015	TaureauG5	6	3 ans	Mâles castrés
24/03/2015	TaureauG6	sains	3 ans	Mâles castrés
24/03/2015	TaureauG7	sains	2 ans	Mâles castrés
31/03/2015	TaureauH1	56	3 ans	Mâles castrés
31/03/2015	TaureauH2	31	3 ans	Mâles castrés
31/03/2015	TaureauH3	6	4 ans	Mâles castrés
31/03/2015	TaureauH4	8	4 ans	étalon
31/03/2015	TaureauH5	7	3 ans	Mâles castrés
31/03/2015	TaureauH6	22	3 ans	Mâles castrés
08/04/2015	TaureauJ1	10	3 ans	Mâles castrés
08/04/2015	TaureauJ2	6	3 ans	Mâles castrés
08/04/2015	TaureauJ3	14	3 ans	Mâles castrés
08/04/2015	TaureauJ4	33	3 ans	Mâles castrés
08/04/2015	TaureauJ5	26	3 ans	Mâles castrés
08/04/2015	TaureauJ6	15	3 ans	Mâles castrés

L'amplification par PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) a été réalisée selon les méthodes décrites par Trouvé *et al.* (2000) pour *G. truncatula* et Hurtrez Boussès *et al.* (2004) pour *F. hepatica*. Pour les deux espèces, des mises au point sur les locus utilisés ont été nécessaires (voir Annexe 3,4 et 5 pour le détail des protocoles). Les individus de *F. hepatica* ont été génotypés à six loci microsatellites (FH15, FH23, FH25, FH26, FH222CBP (=FH40) et FH28/2; numéros respectifs d'accès à Genbank AJ508371, AJ508372, AJ508373, AJ508370, AJ003821 et KM587722. Les limnées tronquées ont été génotypées à six loci microsatellites (LT9, LT16, LT21, LT24, LT36 et LT37 dont les numéros respectifs d'accès à Genbank sont AF226976, AF226978, AF226980, AF226981, AF226984 et AF226985). Toutes les amorces sont marquées par fluorescence ; les génotypages ont été réalisés sur séquenceur automatique monocapillaire ABI-Prism 310 Genetic Analyzer, avec le marqueur de taille GeneScan Liz 500. Les électrophorégrammmes ont été analysés à l'aide du logiciel GeneMapper (Applied Biosystems- Haberl et Tautz (1999)). Les produits de PCR utilisés dans des études antérieures (Trouvé et *al.* 2000, Meunier *et al*. 2001, 2002, 2004a, Hurtrez-Boussès *et al.* 2004, 2010) ont servi de références pour la détermination de la taille des allèles. Les interprétations des électrophorégrammes ont systématiquement été vérifiées par deux personnes afin de limiter les erreurs de lectures (S. Hurtrez et moi-même).

Analyses des données

Vérification de la fiabilité des données

Une analyse de tous les loci microsatellites a été réalisée à l'aide du logiciel Micro-Checker (Van Oosterhout *et al*. 2004), afin d'estimer la fréquence des allèles nuls et de détecter une dominance des allèles les plus courts ou d'éventuelles erreurs de lecture dues à un « bégaiement » de la polymérase (stuttering).

Statistiques sans a priori : approche de clusterisation bayesienne

Afin d'avoir une première idée sur la structure le logiciel STRUCTURE version 2.3.4 a été utilisé : les individus sont assignés dans différents groupes suivant leur probabilité d'appartenance à un groupe plutôt qu'un autre. Une courbe représentant les logarithmes de vraisemblance en fonction du nombre de clusters (k) permet de déterminer le nombre de groupes optimal : c'est celui correspondant à l'inflexion de la courbe.

Analyses de la structure génétique des populations

Le nombre moyen d'allèles par locus et par population a été estimé, ainsi que l'hétérozygotie moyenne observée (Ho), l'hétérozygotie attendue (Hs) (Nei, 1973) et la richesse allélique par locus et population. Les F-statistiques de Wright (1965) (Voir Encadré) ont été estimés selon Weir et Cockerman (1984). L'ampleur des écarts à la panxymie a été évalué par le Fis (Wright *et al.* 1965). Les taux d'autofécondation ont été évalués à partir du Fis mais aussi par le logiciel

Encadré 1. Statistiques de Wright.

Les F statistiques de Wright (1965), sont une approche statistique permettant de décrire la répartition de la variance génétique dans une population sous divisée et entre sous-populations. Cette approche est basée sur trois paramètres : Fis, Fst, Fit.

Ces trois paramètres permettent de mesurer le déficit en hétérozygotie à différents niveaux hiérarchiques ; autrement dit ces statistiques sont une mesure du degré de la consanguinité entre allèles à diffèrent niveaux.

Fis est donc un paramètre de la population qui mesure la consanguinité entre individus, due à l'union non aléatoire des gamètes au sein de chaque sous-population. On l'appelle aussi l'indice de fixation (F) des individus dans les sous populations (s) ou déficit en hétérozygotes.

$$Fis = \frac{He - Ho}{He} = 1 - \frac{Ho}{He}$$

Fis mesure l'écart entre l'hétérozygotie observé et le taux d'hétérozygote attendu d'une population d'individus sous les hypothèses de l'équilibre de Hardy Weinberg, il est appelé aussi l'écart à la panmixie.

Fis proche de 1 = Déficit en hétérozygoties

Fis proche de 0 = Excès en hétérozygoties

A partir du Fis, le taux d'autofécondation peut être estimé.

$$s = \frac{2Fis}{1 + Fis}$$

Plus le Fis est élevé, plus le s est élevé.

Le Fst correspond à la consanguinité entre individus d'une même sous-population relativement à la consanguinité entre sous-populations de la population totale. Il mesure la structuration des populations, c'est-à-dire la part d'homozygotie des individus de la population totale (indice T) provenant de la subdivision de ces derniers en sous-populations de tailles limitées (indice S), on dit aussi qu'il mesure la différenciation génétique entre sous-populations.

$$Fst = \frac{HT - Ho}{HT}$$

Fst proche de 0 = pas de structuration

Fst proche de 1 = Différenciation des populations entre elles.

Fit est une mesure de la consanguinité dans la population totale qui résulte des deux phénomènes cités ci-dessus, cependant on ne s'intéressera pas au Fit dans cette étude.

Dans le cas de marqueurs génétiques hypervariables comme les microsatellites, la valeur maximale du Fst ne sera pas 1 car il y a plus d'allèles que de sous-échantillons.

Pour pallier ce problème, on peut calculer le Fst max = Fst'

Cela nous permet d'avoir une meilleure appréciation du flux de gênes échangés entre les sous-populations échantillonnées.

$$Fst' \frac{Fst}{1 - Hs}$$

Avec Hs, l'estimateur non biaisé de la diversité génétique de Nei (Nei et Chesser. 1983)

RMES (David *et al.* 2009). La différenciation génétique entre chaque paire de populations a été estimée avec le Fst, indice directement relié aux flux de gènes entre populations. Les intervalles de confiance ont été calculés avec la méthode de Boostrapp et de Jackkniffe. Les calculs ont été effectués avec le logiciel Fstat (v.2.9.4; http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm ; Goudet 1999,).

Nos plans d'échantillonnage considèrent *a priori* que les infra-populations de limnées sont définies par un point d'échantillonnage. Afin de tester différents niveaux de structuration nous avons estimé et testé les F-statistiques pour différentes structurations hiérarchiques. Plusieurs niveaux hiérarchiques, tels que l'année d'échantillonnage, la connexion des sites entre eux par le réseau hydrographique puis les sites et les infra-populations ont été testés. Ces analyses ont été effectuées avec le logiciel Hierfstat (De Meeûs et Goudet, 2007). Cette analyse a été complétée par une analyse factorielle des correspondances (AFC) qui permet de représenter graphiquement les proximités entre variables qualitatives et ainsi de visualiser la similarité ou dissimilarité entre infra-populations. L'AFC a été réalisée avec le logiciel Genetix (Belkhir *et al.* (1996-2004)).

Enfin, nous avons construit un réseau de neighbor-joining (NJ) basé sur une matrice de distances génétiques entre les populations, en utilisant la distance génétique de Nei et Li (1974). Ceci a été mis en œuvre avec le logiciel SplitsTree4 (Huson et Bryant. 2006).

Isolement par la distance

L'isolement par la distance a été testé avec un test non paramétrique de Mantel afin de voir si les paires de populations les plus distantes géographiquement sont aussi les plus différenciées génétiquement. Pour cette analyse, nous avons utilisé le web service IBDWS (http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/) qui vérifie une corrélation entre la distance génétique des paires de populations (Rousset *et al.* 1997) et le logarithme de la distance géographique (distance euclidienne en km). Le logiciel calcule aussi la pente et l'intercept de la relation à partir de la méthode RMA (reduced major axis) et leur intervalles de confiance (95%), à partir des méthodes de Jackniffe et Boostraping (Bohonak *et al.* 2002).

En cas de tests multiples, les probabilités données sont celles après correction de Bonferroni (Rice *et al.* 1981).

Résultats

- ***Fasciola hepatica***

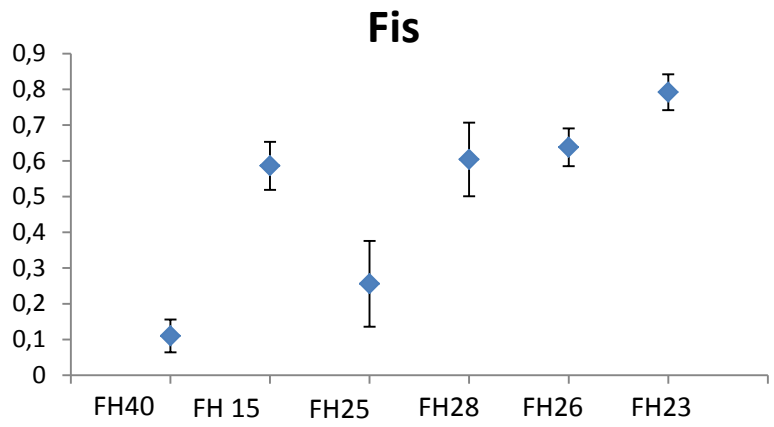


Figure 4: Valeurs moyennes du Fis par locus et écarts types obtenus pour les microsatellites de *Fasciola hepatica.*

Tableau 3 : Diversité génétique(Hs) et richesse allélique de *Fasciola hepatica* au sein de chaque locus.

Locus	Nombre d'allèles	Richesse allélique
FH40	13,000	2,903
FH15	7,000	1,750
FH25	5,000	1,598
Moyenne	8,333	2,084
SD	4,163	0,714

Prévalence parasitaire

Durant toute la campagne de prélèvement, au total, 47 foies de taureaux ont été disséqués et seulement 3 n'étaient pas infestés par *Fasciola hepatica*. Au total 679 douves adultes ont été prélevées avec une intensité moyenne de 15 (± 10 SD) douves par foie.

Génétique des populations des douves

Une première analyse avec Micro-checker a permis de confirmer les difficultés de lecture au niveau du locus FH26 (pics larges qui rendent difficile l'identification des hétérozygotes et engendrent des risques de confusions entre allèles trop proches). Par sécurité, il a été décidé de ne plus inclure ce locus FH26 dans la suite des analyses. Cette analyse a également confirmé l'existence d'allèles nuls (i.e. l'allèle n'est pas amplifié à cause de la présence de mutation sur une des amorces ; De Meeûs *et al.* 2007) au locus FH23, comme déjà montré par Hurtrez-Boussès *et al.* (2004). Suite à des problèmes d'amplification (trop d'individus manquants) pour le locus FH28/2, nous avons décidé de l'exclure aussi. De plus la figure 6, nous indique que les locus FH28, FH26 et FH23 ont des valeurs de Fis nettement supérieures aux autres loci, ce qui confirme une sous-estimation des hétérozygotes (Figure 4). Par sécurité et en attendant de refaire les génotypages qui posent problème, il a été décidé de ne conserver que les loci FH15, FH40 et FH25 pour les analyses présentées ci-dessous.

Diversité génétique

Au total 25 allèles ont été répertoriés. Le nombre moyen par locus est de 8 (± 4 SD). Le locus le plus polymorphe est le locus FH40 (13 allèles), puis le locus FH15 (7 allèles) et le locus FH15 (5 allèles). Aucun déséquilibre de liaison n'a été détecté entre loci (déséquilibre global 0,448 ± 0,385 SD, NS)(Annexe 6).

La richesse allélique moyenne par isolat est de 1,98 (± 0,20 SD), elle varie de 1,3 à 2,4 (Tableau 3). La diversité génétique moyenne est de 0,44 (± 0,09 SD).

La diversité génotypique est élevée, puisque sur 223 individus analysés, très peu d'individus présentaient le même génotype multilocus.

Ecarts à la panxmie

Tous les isolats présentent des valeurs de Fis faibles et non-significatives (Tableau 4 ; moyenne sur l'ensemble des isolats : Fis = 0,28 ± 0,22 SD). Les taux d'autofécondation estimés sont faibles (moyenne 0,11 ± 0,23SD) (Tableau 4).

Différenciation entre isolats

Aucune différenciation significative entre paires d'isolats n'a été trouvée (Fst = 0,025, NS) (Annexe 9). De plus, l'analyse sur le logiciel Structure indique que toutes les douves récoltées n'appartiennent qu'à un seul cluster génétique (Figure 5).

- ***Galba truncatula***

Tableau 4 : Tableau représentant l'Hétérozygotie observée(Ho), la diversité génétique(He), le nombre moyen d'allèles obtenus (Num), le Fis, le taux d'autofécondation(s) corrigés (s*) ou non et la richesse allélique pour les populations de *Fasciola hepatica*.

Pop	Ho	He	Num	Fis	Richesse allélique	s	s*
taurA1	0,278	0,583	4,333	0,524	2,349	0,688	0,000
taurA2	0,256	0,301	2,667	0,149	1,684	0,259	0,000
taurA3	0,333	0,167	1,333	-	1,333	-	0,000
taurA4	0,333	0,389	2,333	0,143	1,889	0,250	-
taurA5	0,333	0,444	3,333	0,250	2,048	0,400	0,000
TaurB1	0,343	0,449	4,000	0,238	1,977	0,384	0,000
TaurB2/3	0,385	0,446	4,333	0,137	2,001	0,241	0,000
TaurB4	0,400	0,454	3,667	0,118	2,014	0,211	0,168
TaurB5	0,317	0,452	4,000	0,298	2,082	0,459	0,000
TaurD4	0,189	0,439	3,000	0,570	1,957	0,726	0,925
TaurD5	0,466	0,489	3,667	0,047	2,057	0,090	0,158
TaurD6	0,425	0,567	6,333	0,250	2,315	0,400	0,099
TaurD7	0,364	0,462	4,333	0,214	2,035	0,353	0,469
TaurE1	0,341	0,513	4,000	0,334	2,122	0,501	0,000
TaurE2	0,300	0,572	3,333	0,476	2,243	0,645	0,000
TaurF1	0,327	0,477	4,000	0,315	1,988	0,479	-
TaurF3	0,357	0,426	3,667	0,163	1,865	0,280	0,000
TaurF2	0,356	0,421	4,000	0,155	1,932	0,268	0,000
TaurF4	0,392	0,496	3,333	0,211	2,035	0,348	0,000
TaurG1	0,083	0,361	2,000	0,769	1,686	0,869	0,171
Moyenne	0,329	0,445	3,583	0,282	1,981	0,413	0,111
SD	0,081	0,092	1,016	0,178	0,222	0,195	0,229

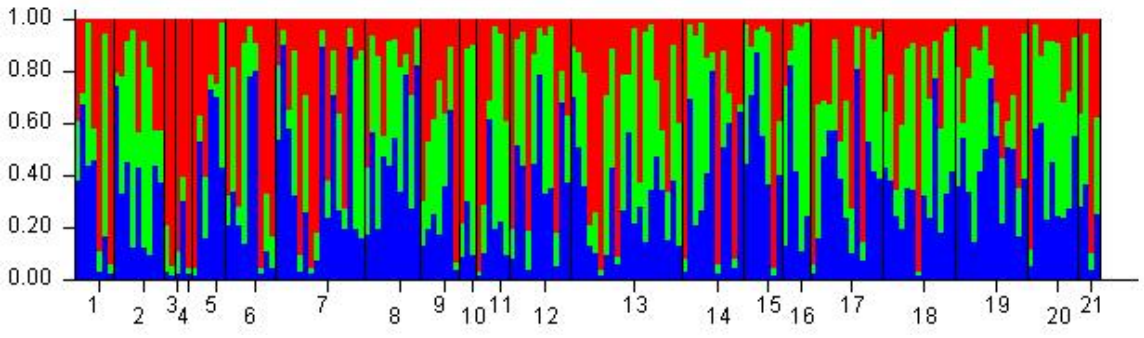


Figure 5 : Représentation de la probabilité(p) d'appartenance à des groupes génétiques tels qu'assignés par STRUCTURE, Chaque couleur représente un cluster, chaque barre représente un individu, Clusters(k) =3.

Caractéristiques de l'habitat des populations de *Galba truncatula*.

Sur les différents lieux prospectés (Figure 8), les limnées ont été trouvées le long des berges des canaux d'irrigation et de drainage lorsque la végétation était composée d'herbacées recouvrant les berges (Figure 6), et lorsque le sol n'était pas piétiné par le bétail. Sur les berges des canaux où il y avait du *Juncus maritimus* (Figure 7), aucune limnée n'a été trouvée.

Prévalences parasitaires

L'ensemble des limnées disséquées, aucune ne s'est révélée infestée par *Fasciola hepatica*, ni par aucun autre Digène.

Génétique des populations de mollusques

Tous les loci utilisés ont été testés avec Micro-checker. Hormis pour les infra-populations MC, AB8 et MCPD5 pour lesquelles plus de 20 % des données sont manquantes par locus, les résultats ne révèlent ni allèles nuls, ni erreurs de lecture. Les analyses ont donc porté sur tous les loci.

Diversité génétique par locus et par infra-population

Sur l'ensemble des six loci, un total de 42 allèles a été répertorié. Le nombre moyen d'allèles par locus est de 7 ± 2 SD (minimum 3 pour le locus Lt37 ; maximum 10 pour le locus Lt16). Aucun déséquilibre de liaison entre locus n'a été détecté (0,16 ± 0,27, NS) (Annexe 6)

Les richesses alléliques moyennes sont données dans le Tableau 7. . La richesse allélique moyenne des infra-populations est de 1,36 (± 0,10 SD), elle varie de 1 à 2,5. La diversité génétique moyenne est de 0,39 (± 0,11 SD) (Tableau 7).

La diversité génotypique est élevée, puisque sur 463 individus analysés, 232 génotypes multilocus différents sont observés.

Ecarts à la panximie

Le Fis moyen sur l'ensemble des infra-populations est de 0,73 (± 0,12 SD) et varie entre 0,217 pour la population ABSc1 et de 1 pour les infra-populations ABCbSO, ESS3, ESS7 et TRVS1 (Tableau 8).

Les taux d'autofécondation (s) estimés à partir des valeurs de Fis sont élevés (moyenne 0,84 ± 0,14 SD ; Tableau 8). Après correction par le logiciel RMES, les valeurs de s sont toujours élevées avec une moyenne de 0,76 (± 0,34 SD) (Tableau 8).

Différenciation inter-infra-populations

Les populations se regroupent en 7 clusters distincts (Figure 9A). Deux grands cas se distinguent :



Figure 6 : *Crédit photo : Sabourin Emeline.* Photo d'un habitat de *Galba truncatula.*



Figure 7: *Crédit photo : Sabourin Emeline*. Photo de *Juncus maritimus.*

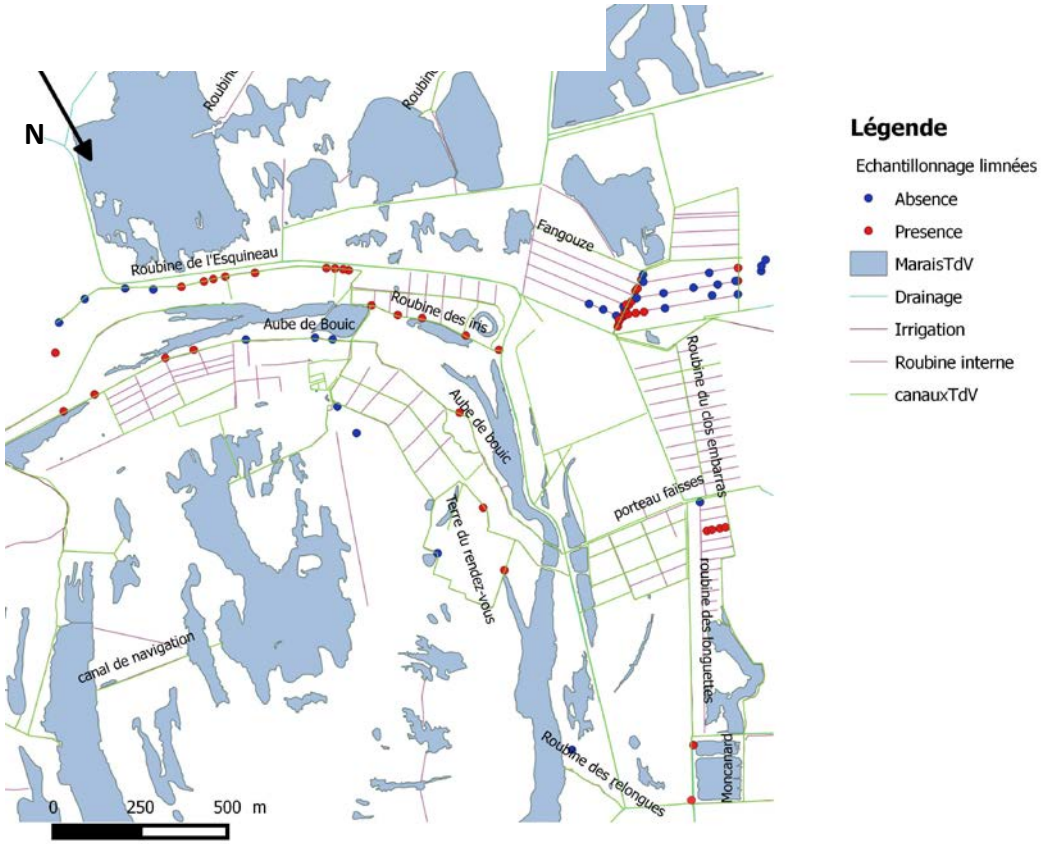


Figure 8 : Carte des sites échantillonnés pour le suivi des populations de limnées. Les points bleus représentent les sites prospectés où aucune limnée n'a été trouvée, les points rouges sont les sites où les limnées ont été retrouvées.

Tableau 7 : Richesse allélique de *Galba truncatula* au sein de chaque locus.

Locus	Nombre d'allèles	Richesse allélique
L9	5,0	1,371
L16	10,0	1,813
L21	8,0	1,546
L37	3,0	1,281
L24	7,0	1,827
L36	9,0	1,747
Mean	7,0	1,598
SD	2,608	0,235

- des infra-populations très structurées telles que celles des sites Aube de Bouic (ABM1P2, ABM2, ABMP3) ou Moncanard (MCPD1 à 5) ;
- des infra-populations dont les individus se répartissent dans plusieurs clusters (admixture) telles que celles du site Esquineau (ESS2, 5 et 9).

La différenciation globale entre infra-populations est significative (Fst = 0,39, p<0,0009) mais les détails par paires d'infra-populations (Annexe 7) ne montrent que quelques paires d'infra-populations significativement différenciées. En effet, seules les infra-populations TRVM, RIS1, ABS8 et ABM1P2 sont significativement différenciées de plusieurs autres infra-populations. (Annexe 7)

Pertinence de la structuration en infra-populations ou en sites

Les analyses de structuration hiérarchique donnent un Fst de 0,24 (p = 0,0005), similaire à la valeur donnée plus haut en considérant l'ensemble des infra-populations sans structure hiérarchique. Les tests de significativité des différentes partitions montrent que les infra-populations et les sites ont un effet sur la structuration génétique (p= 0,001). Nous observons aussi un effet significatif avec la connexion par le réseau hydrographique des sites (p= 0,044) (Figure 10). L'année d'échantillonnage n'influence en rien la structure génétique des limnées (NS). A la suite de ces résultats, nous avons réuni les populations par sites et refait les estimations F-statistiques. Les Fis sont toujours élevés (Fis moyen = 0,796 ± 0,046 SD) soit sensiblement la même valeur que trouvé précédemment (0,732), ce qui confirme que réunir les infra-populations d'un même site est valide (pas d'effet Wahlund). Enfin, la différenciation entre sites est significative (Fst global = 0,203, p=0,005) (Tableau 9). La diversité génétique moyenne dans les sites est de 0,469 (± 0,073 SD) (tableau 8). La différenciation standardisée Fst max obtenue par l'équation Fst'=Fst/ (1-Hs) est donc assez élevée avec une valeur de 0,380, suggérant qu'il y existe une migration entre les sites mais qu'elle est relativement faible.

Les résultats de l'AFC sont présentés dans la figure 9B. Les trois axes contribuent à 80 % de l'inertie totale, les individus se regroupent par site. Les infra-populations de Moncanard et Aube de bouic sont les plus proches. Les infra-populations de Roubines des iris et Terre du rendez-vous sont les plus éloignées des autres. Ces résultats sont confirmés par le réseau NJ (Figure 9C).

Isolement par la distance

Le test de Mantel réalisé montre une relation positive significative entre les distances génétiques et les distances euclidiennes (R^2=0,0486, p=0,001) (Figure 7).

Tableau 8: Tableau représentant l'Hétérozygotie observée(Ho), la diversité génétique(He), le nombre moyen d'allèles obtenus (Num), le Fis, le taux d'autofécondation (s) corrigé (s*) ou non et la richesse allélique pour les populations de *G.truncatula*.

Site	Pop	N°Pop	Ho	Ho	He	He	Fis	Fis	s	s	s*	s*	Num	Num	Richesse allélique	Richesse allélique
Aube de Bouic (AB)	ABM1P2	1	0,119	0,062	0,574	0,227	0,793	0,795	0,885	0,806	0,750	-	6,833	2,167	5,157	1,246
	ABM2	2		0,120		0,394		0,620		0,885		-		2,500		1,382
	ABMP3	3		0,174		0,461		0,623		1,000		0,702		2,833		1,451
	ABCS1	4		0,300		0,383		0,217		0,357		0,628		2,000		-
	ABCbSO	5		0,000		0,556		1,000		0,912		-		1,667		1,200
	ABEO	6		0,150		0,417		0,640		0,780		0,863		2,000		-
	ABDP	7		0,077		0,472		0,838		0,886		0,676		3,167		1,451
	AB7	8		0,141		0,433		0,675		0,765		0,827		2,667		1,420
	AB8	9		0,085		0,409		0,793		0,768		-		3,000		1,395
	ABS5	10		0,050		0,416		0,880		0,873		-		2,833		1,396
	ABS4	11		0,264		0,361		0,269		0,424		-		2,000		1,344
	ABS2	12		0,097		0,431		0,774		0,936		0,999		1,833		1,372
	ABS6	13		0,083		0,470		0,823		0,903		-		2,500		1,443
	ABS8	14		0,183		0,516		0,646		0,785		0,831		3,500		1,508
Moncanard (MC)	MCPD5	15	0,080	0,110	0,451	0,409	0,823	0,730	0,903	0,784	0,627	0,968	3,167	3,167	3,156	1,403
	MCPD1	16		0,093		0,279		0,667		0,920		0,890		2,333		1,271
	MCPD3	17		0,186		0,508		0,634		1,000		0,764		2,333		1,461
	MCPD4	18		0,110		0,453		0,758		0,962		0,960		2,833		1,434
	MCPD2	19		0,129		0,448		0,713		0,771		-		2,000		1,309
	MCPDC	20		0,144		0,475		0,698		1,000		0,743		2,667		1,455
	MC	21		0,144		0,361		0,602		0,941		0,491		3,167		1,354
	MC10	22		0,100		0,480		0,750		0,867		0,343		1,800		-
Roubine des Iris (RISS)	RIS2	23	0,071	0,086	0,500	0,408	0,855	0,790	0,922	0,752	0,845	0,890	4,667	2,833	4,353	1,400
	RIS1	24		0,070		0,262		0,732		0,857		-		2,333		1,258
Esquineau (ESS)	ESS1	25	0,137	0,154	0,439	0,435	0,731	0,645	0,845	0,800	0,778	0,727	4,000	2,667	4,672	1,420
	ESS3	26		0,000		0,600		1,000		0,832		-		2,200		1,419
	ESS2	27		0,052		0,346		0,851		0,776		-		2,000		1,314
	ESS9	28		0,103		0,439		0,765		0,862		-		2,200		-
	ESS5	29		0,027		0,361		0,926		0,844		-		2,333		1,344
	ESS6	30		0,142		0,381		0,628		0,822		-		2,000		1,350
	ESS7	31		0,000		0,133		1,000		0,845		1,000		1,200		-
	ESS8	32		0,047		0,424		0,888		0,883		0,811		3,500		1,412
Terre du Rendez-vous (TR)	TRVM	33	0,083	0,117	0,380	0,244	0,782	0,521	0,878	0,685	0,805	0,663	2,333	1,833	2,329	1,242
	TRVS1	34		0,000		0,049		1,000		1,000		-		1,333		1,047
	Moyenne		0,098	0,106	0,469	0,395	0,797	0,732	0,886	0,832	0,761	0,778	4,200	2,394	3,933	1,362
	SD		0,028	0,069	0,073	0,112	0,046	0,177	0,029	0,138	0,083	0,172	1,713	0,571	1,161	0,097

Discussion

Biologie des populations de grande douve

Nos résultats révèlent une prévalence en grande douve de 85% chez les taureaux de la manade de la Tour du Valat. De plus, l'intensité de l'infestation était en moyenne de 12 douves par taureaux. Cette valeur de prévalence paraît très élevée en comparaison de celle de 18% donnée pour l'ensemble du territoire camarguais par le Parc naturel régional de Camargue (PNR 2011). De même, Mage *et al* (2002) donnent une prévalence de 12% dans le Centre de la France, région où la fasciolose est reconnue comme un problème vétérinaire majeur. Nos résultats confirment que la fasciolose est un problème vétérinaire important en Camargue et représente donc un risque zoonotique élevé. Les très fortes prévalences que nous avons trouvées pourraient s'expliquer par le fait que les animaux de la Tour du Valat ne sont pas traités aux anti-helminthiques. Des suivis sur plusieurs manades et sur des animaux sauvages devront être faits pour confirmer si les taureaux de la Tour du Valat ont des taux de fasciolose exceptionnellement forts ou si le problème est commun à l'ensemble de la région.

Les résultats obtenus pour la génétique des populations de *F. hepatica* sont cohérents avec ceux obtenus en Bolivie par Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) et en Espagne par Vilas *et al* (2012). On observe en effet une forte diversité allélique (5 à 13 allèles par locus) et une absence d'écarts à la panmixie (Fis tous inférieurs à 0,570, NS). Ceci suggère une prédominance de l'allofécondation chez ce parasite hermaphrodite.

Les isolats de *F. hepatica* ne sont pas significativement différenciés génétiquement entre eux (FST = 0,025 ; NS). De plus, aucune agrégation des génotypes multilocus n'a été observée (pas de génotypes multilocus répétés dans un même isolat). Ceci est cohérent avec les résultats de Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) qui n'avaient pas trouvé non plus de différenciation significative entre douves échantillonnés dans des hôtes définitifs provenant d'une même zone. Nos résultats ne sont pas très surprenants, étant donné que les isolats de notre étude proviennent de la même espèce d'hôte (bovins) et de la même manade (Tour du Valat). Toutefois, le territoire sur lequel ont été élevés ces animaux étant de 2600 ha, l'absence de différenciation pourrait suggérer (i) un ou des site(s) de contamination commun(s) et/ou une (ii) une circulation importante des génotypes de douve entre les sites. N'ayant pas trouvé de larves de douve dans les mollusques échantillonnés, il est pour l'instant impossible de tester si les différents sites à limnées hébergent les mêmes souches de douve ou pas.

Biologie des populations de *Galba truncatula*

Caractérisation des gîtes à mollusques

Le premier objectif de cette étude était de caractériser les habitats de *Galba truncatula* en Camargue. Nos résultats montrent que les limnées sont présentes sur les berges des canaux ou des mares qui sont recouvertes d'herbacées et totalement absentes dans les zones à joncs. Ils

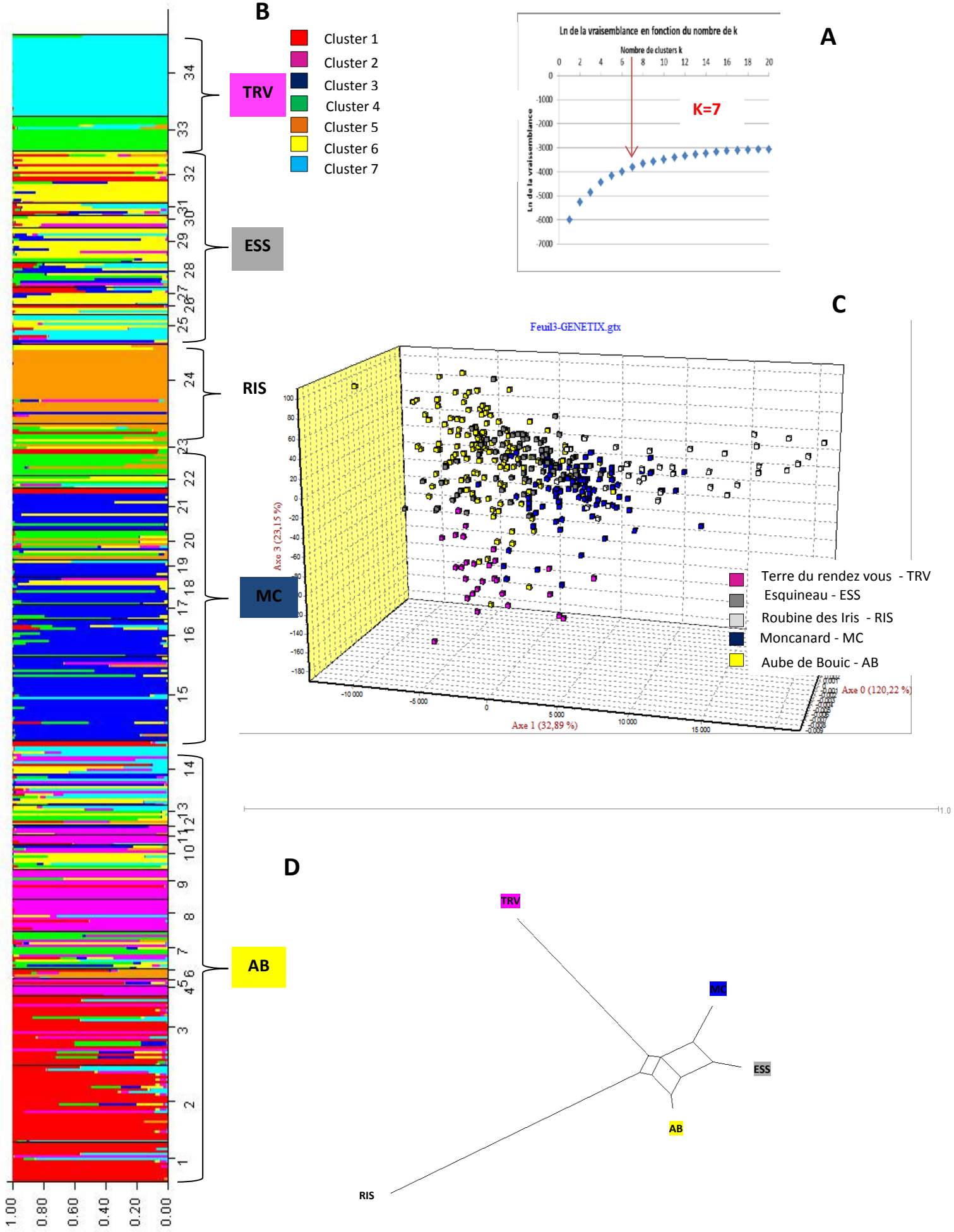


Figure 9 :A. Ln de la vraisemblance en fonction du nombre de k, k étant le nombre de groupes génétiques testés par le logiciel Structure. B. Représentation de la probabilité(p) d'appartenance à des groupes génétiques tels qu'assignés par STRUCTURE. Chaque couleur représente un cluster, chaque barre représente un individu. Les accolades indiquent les sites où se situent les populations. C. Analyse factorielle des correspondances sur génotypes multilocus en trois dimensions sur les individus de limnées, l'inertie est indiquée pour chaque axe. D. Réseau neighbor joining basé sur une matrice de distance génétique de Nei entre les populations des sites.

divergent de ceux de Rondelaud *et al*. (2011), qui montraient que les limnées sont présentes dans les zones à joncs (*Juncus sp*) et considéraient que cette plante pouvait être utilisée comme indicatrice du risque de fasciolose.

Prévalence parasitaire

Aucune des 501 limnées disséquées n'était parasitée. L'absence totale d'infestation par *Fasciola hepatica* n'est pas surprenante et peut être expliquée par plusieurs hypothèses différentes. Tout d'abord, les prévalences déjà reportées dans les différentes études dans les populations naturelles sont généralement très faibles (de 3.3 à 7,2 %, soit en tout 91 individus pour 2782, selon Mage *et al.* (2002)). De plus, un tiers de l'échantillonnage a été réalisé à la fin de l'hiver (janvier, février) or, selon Rondelaud *et al.* (2013) cette période n'est pas propice à la détection des larves de trématodes. En effet, à basse température, les œufs de *F. hepatica* présents dans les fèces des hôtes infectés peuvent avoir un développement retardé de quelques mois (Hurtrez Boussès *et al.* 2001). Toutefois, la dissection de tous les prélèvements n'a pas été terminée. Il n'est donc pas exclu que les sites examinés pour l'instant soient effectivement exempts de parasites et que nous n'ayons pas encore détecté les sites infestés.

Diversité dans les infra-populations

Cette première étude sur la génétique des populations de *Galba truncatula* en Camargue révèle une faible diversité génétique avec des hétérozygoties attendues basses (He <0,5) et de très forts écarts à la panmixie (hétérozygotie observée (Ho) moyenne = 0,106 ± 0,069 SD; Fis moyen : 0,732 ± 0,177 SD). Les infra-populations pour lesquelles les Fis estimés sont non-significatifs (ABS4 : Fis = 0,217, NS ; ABCS1 : Fis = 0,269, NS) sont celles pour lesquelles nous n'avons pu échantillonner qu'un tout petit nombre d'individus, de sorte qu'il n'est pas possible d'interpréter ces données. Exception faite de ces infra-populations ABS4 et ABCS1, nos résultats sont assez concordants avec les études précédentes sur la biologie des populations de *G. truncatula* (Meunier *et al*, 2001, 2004a ; Hurtrez-Boussès *et al.* 2005, 2010). Ces importants déficits en hétérozygotes s'expliquent par deux hypothèses majeures non exclusives qui sont (i) l'effet Wahlund et (ii) l'autofécondation.

(i) L'effet Wahlund peut se produire lorsqu'on considère plusieurs sous populations différenciées comme une seule population, ce qui se traduit par un déficit en hétérozygotes par rapport à l'attendu. Cependant, l'hypothèse de l'effet Wahlund semble peu probable dans notre étude car nous avons veillé à effectuer l'échantillonnage sur des surfaces très faibles (moins de deux mètres linéaires). De plus, dans trois des cinq sites (Aube de bouic, Moncanard, Esquineau), nous n'avons pas trouvé de différenciation entre les infra-population distantes de plusieurs mètres, ce qui rendrait peu probable une différenciation sur des distances plus faibles.

Tableau 9 : Fst par paire de populations de *Galba truncatula* regroupées regroupées par site après Correction séquentielle de Bonferroni. P value *< 5%

AB	0				
MC	0,1450 *				
RIS	0,2588 *	0,3279 *			
ESS	0,1054 *	0,1285 *	0,3300 *		
TRV	0,2458 *	0,3044 *	0,4127 *	0,2991 *	0
	AB	MC	RIS	ESS	TRV

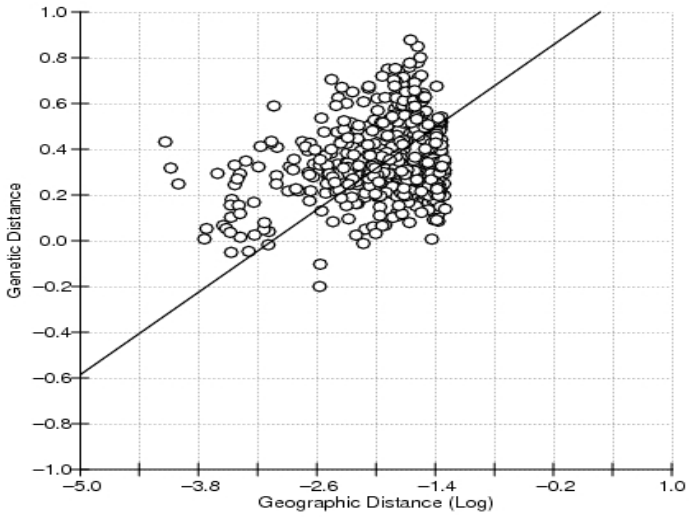


Figure 10: Régression linéaire entre la distance géographique (transformation ln) et la distance génétique (mesurée comme FST/ [1-FST]) entre paires de populations de *G,truncatula*, r=0,2204, P< 0,0010.

(ii) Les valeurs estimées de Fis et les taux d'autofécondation (s) qui en sont déduits (s tous supérieurs à 0,650) suggèrent fortement que les limnées étudiées ici sont essentiellement autofécondantes. En effet, l'autofécondation entraîne une chute rapide du taux d'hétérozygotes (diminution de moitié à chaque génération en cas d'autofécondation stricte (Prugnollle et De Meeûs, 2008). Cette hypothèse est parfaitement concordante avec des travaux empiriques et expérimentaux qui ont montré que l'autofécondation est le régime de reproduction préférentiel des limnées tronquées (Trouvé *et al.* 2005 ; Meunier *et al.* 2001, 2004b ; Hurtrez Boussès *et al.* 2005).

Toutefois, dans notre étude, certaines des infra-populations de limnées présentent des valeurs de Fis entre 0,6 et 0,7 et donc des taux d'autofécondation estimés entre 0,7 et 0,8. Ces résultats diffèrent légèrement de ceux trouvés dans les études antérieures sur *G. truncatula (*Trouvé *et al.* 2005 ; Meunier et *al*. 2001, 2004a ; Hurtrez-Boussès *et al,* 2010) menées sur des populations de Suisse, Bolivie, Espagne, Maroc, Portugal et France (régions Centre et Languedoc-Roussillon) : tous les taux d'autofécondation estimés étaient supérieurs à 80%. Deux hypothèses non exclusives pourraient expliquer les taux d'autofécondation légèrement plus bas que nous trouvons dans les populations étudiées en Camargue : (i) un effet de la densité et/ou (ii) des taux d'autofécondation moins élevés qu'ailleurs. (i) Dans une étude expérimentale Meunier *et al*. (2004b), ont montré que la proportion d'allofécondation peut être augmentée (jusqu'à 39 %) lorsque les limnées sont placées à des densités très élevées. Il se pourrait que les densités de limnées que nous avons échantillonnées soient plus élevées qu'ailleurs, soit de façon permanente (par exemple parce que les habitats seraient plus favorables), soit exceptionnellement cette année (par exemple parce que l'automne a été très pluvieux, offrant des conditions favorables à la prolifération des mollusques). En l'absence de moyens fiables pour estimer les densités sur le terrain, nous ne pouvons pas tester cette hypothèse.

(ii) Il se pourrait que, pour des densités équivalentes, les populations camarguaises pratiquent moins l'autofécondation que leurs congénères des autres régions. La plupart du temps les limnées vivent dans des habitats très temporaires (fossés, mares, zones de piétinement etc.) et les populations bien que très proches les unes des autres, n'échangent que très peu de migrants entre elles. Des événements tels que les assèchements ou les opérations de nettoyage des fossés entraînent des réductions drastiques des effectifs de populations (goulots d'étranglement ; Meunier *et al.* (2004a). Les populations se retrouvent complètement déconnectées et les probabilités de recolonisation sont très faibles. Dans ce type de situation, les individus autofécondants, donc capables de fonder seuls une population, sont censées être fortement avantagés. Le maintien de l'autofécondation à de forts taux peut donc être adaptatif chez des organismes caractéristiques d'habitats temporaires, tels que la limnée tronquée. Le fait que les taux d'autofécondation observés en Camargue sont plus faibles qu'ailleurs pourrait alors être

expliqué par une plus grande stabilité des habitats camarguais. Ceci n'est pas impossible, étant donné que les niveaux d'eau sont gérés et maintenus durant toute l'année.

Un suivi sur plusieurs années permettra de savoir si les Fis faibles que nous avons observés sont exceptionnels ou s'ils se maintiennent. Des études en laboratoire (croisements expérimentaux et tests de descendance, comme dans Meunier *et al*(2004b)) devront être menées pour savoir si les taux d'autofécondation observés ici ont une base génétique (auquel cas l'hypothèse d'une adaptation à des milieux stables pourrait être recevable) ou s'il s'agit de plasticité phénotypique. Les effets de la densité devront aussi être testés expérimentalement.

Structuration génétique des populations

La différenciation génétique entre populations augmente statistiquement avec la distance géographique (isolement par la distance). Ces résultats sont cohérents avec les études précédentes sur *G. truncatula* qui ont révélé un isolement par la distance, à petite échelle (Hurtrez-Boussès *et al.* 2010, Meunier *et al.* 2004a). De plus, dans notre étude tous les canaux sont connectés et sont en grande partie linéaires. Nous pouvons donc supposer que les distances géographiques tendent à être les mêmes que les distances hydrographiques. Ceci expliquerait la structuration des infra-populations par site et le fait que le flux de gènes se ferait entre les infra-populations les plus proches.

D'après nos résultats, les infra-populations de Aube de bouic, Moncarnard et Esquineau se regroupent par site et ne sont pas différenciées au sein des sites (Fst moyen de 0,394, NS). Au contraire, les infra-populations RIS1, RIS2 (Roubine des iris) et TRVM et TRVS (Terre du rendez-vous) sont différenciées entre les infra-populations (Fst moyen = 0,540, $p < 0,0001$) et au sein des sites. Les résultats obtenus pour les infra-populations de Terre du rendez-vous et Roubine des iris sont en accord avec d'autres études où même à faible distance les populations d'escargots d'eau douce sont très différenciées (Mavarez et al. 2002, Hurtrez-Boussès *et al.* 2010, Charbonnel *et al*. 2002, Meunier *et al.* 2001).

Les valeurs de diversité génétique (He moyen 0,469 ± 0,073SD) par site sont plus élevées que les valeurs obtenues pour les infra-populations (He moyen de 0,395 ± 0,112 SD). Ces résultats indiquent que la variabilité génétique des infra-populations est « stockée» à un niveau hiérarchique supérieur (interpopulation). La subdivision des populations permet en principe de maintenir plus de diversité dans une métapopulation, par rapport à une grande population panmictique (Meunier *et al.* 2002). Cela permettrait donc de réduire la dérive génétique des populations due à l'autofécondation. Concernant, la non différenciation des infra-populations au sein des sites d'Aube de bouic, Esquineau et Moncanard, nous pouvons suggérer qu'elles seraient issues d'un effet fondateur ancien. La stabilité du milieu pourrait limiter les effets de la dérive génétique et ainsi limiter la divergence des populations sous l'effet du hasard. (Brousset

et al, 2004). Cependant deux tendances ressortent au niveau de nos résultats de diversité génétique ; premièrement nous retrouvons moins de variabilité génétique qu'à Esquineau, avec au sein des sites d'Aube de Bouic et de Moncanard (avec respectivement 90 génotypes pour 178 individus et 54 génotypes pour 107 individus) et des infra-populations très structurées et distinctes entres elles (2 clusters pour Aube de Bouic et 1 cluster pour Moncanard).A l'inverse, les infra-populations d'Esquinau se répartissent dans plusieurs clusters et, une plus une forte variabilité génétique est observée (50 génotypes pour 79 individus). Sachant que les sites sont connectés entre eux par le réseau hydrographique et qu'Esquineau est en bout de réseau (Figure 1), ces résultats suggèrent un flux de gènes d'Esquineau vers Moncanard et Aube de Bouic ou inversement. Les résultats de Bousset et al (2004) sur l'escargot d'eau douce *Physa acuta* indiquent que la différenciation entre des infra-populations est plus faible dans les habitats permanents que dans les habitats temporaires et que la variation génétique est alors supérieure dans les habitats permanents (un plus grand nombre d'allèles). Les escargots d'eau douce étant caractérisés par une capacité de dispersion faible (Thiele et al. 2013), dans les habitats temporaires, leur dispersion est limitée à des événements rares comme le transport par l'Homme ou les mammifères (Henry *et al*. 2002). Au contraire, dans les habitats permanents, la dispersion est facilitée par la connectivité entre les milieux et le sens du courant (Hurtrez-Boussès et al. 2010). La non-différenciation des infra-populations d'Aube de Bouic, Moncanard et Esquineau pourrait donc être expliquée par le débit continu du canal conduisant à une dispersion des limnées entre infra-populations et un flux de gènes entre les autres sites.

Enfin, à l'intérieur des sites Terre du rendez-vous et Roubine des iris, les infra-populations sont différenciées entre elles (deux clusters distincts); ces sites sont également différenciés des autres. Pour les deux infra-populations de Terre du rendez-vous, leur différenciation peut s'expliquer par le fait qu'elles appartiennent à deux branches différentes d'un canal qui se divise en amont. Elles appartiennent donc à deux habitats différents. L'infra-population TRVS est située sur le canal alors que TRVM est située au bout d'un canal qui forme une mare ; ces deux infra-populations peuvent se trouver isolées des autres sites par l'assèchement du canal en amont en période estivale. Leur différenciation avec les autres sites pourrait donc s'expliquer par deux hypothèses : soit par un effet fondateur récent (i) après un événement climatique comme l'asséchement estival (ii) soit par deux introductions indépendantes, d'une propagule provenant d'un autre site. La première hypothèse pourrait être privilégiée, la population source (avec le même génotype) n'a pas été trouvée dans les populations déjà analysées.

Les deux populations des Roubines des Iris sont aussi différenciées entre elles (deux clusters distincts). Pour l'infra-population RIS1, tous les individus appartiennent à un seul et même cluster génétique alors que pour RIS2, nous observons un mélange de clusters génétiques. Deux hypothèses peuvent être émises : (i) soit ces deux infra-populations sont issues de deux introductions indépendantes à des dates différentes avec RIS1 issue d'un événement fondateur plus récent que RIS2 car RIS1 présente moins de diversité génétique (avec un He de 0,212). Il

n’y aurait donc pas eu encore de restauration de la diversité génétique. (ii) Soit, selon le modèle stepping stone (Kimura et Weiss, 1964) où les migrants se dispersent de proche en proche, la population RIS2 serait issue de la population RIS1. Cette seconde supposition est cohérente avec la différenciation génétique qui augmente avec la distance géographique (Hutchinson and Templeton, 1999). L’achèvement des analyses et le suivi des populations, nous permettront de confirmer les hypothèses émises.

Perspectives

Cette étude préliminaire confirme que la fasciolose peut être considérée comme un problème important en Camargue et encourage à poursuivre les travaux sur cette maladie et ses hôtes afin d'avoir une vision plus globale de la circulation du parasite. Pour poursuivre, il faudra d'une part continuer et intensifier le suivi des populations de limnées, afin d'identifier les zones et périodes de contamination par la grande douve. D'autre part, la recherche des grandes douves et l'analyse de leur structure génétique devra être étendue à d'autres zones (élevages autres que la Tour du Valat) et d'autres hôtes définitifs, notamment sauvages (sanglier, ragondin), pour lesquels nous avons déjà commencé à collecter des échantillons qui n'ont pas encore pu être analysés.

A terme, ces travaux permettront de mieux connaître l'épidémiologie de la grande douve et pourront suggérer des préconisations pratiques (zones à risque où les troupeaux ne devraient pas aller, gestion des niveaux d'eau ou des traitements etc).

Bibliographie

Andrews ST .1999. The life cycle of Fasciola hepatica. In Fasciolosis. Edited by J.P. Dalton. *CAB International, Oxon,* 1-29.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N. 1996-2004. Bonhomme F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions.

Bohonak, A. J. (2002). IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93, 153-154.

Bousset L, Henry P.Y, Sourrouille P, Jarne P.2004. Population biology of the invasive freshwater snail Physa acuta approached through genetic markers, ecological characterization and demography. *Molecular Ecology, 13*, 2023-2036.

Charbonnel N, Quesnoit M, Razatavonjizay R, Bremond P, Jarne P. 2002. A spatial and temporal approach to microevolutionary forces affecting population biology in the freshwater snail Biomphalaria pfeifferi. *The American Naturalist*, 160, 741-755.

Correa A.C., Escobar J.S., Durand P., Renaud F., David P., Jarne P., Pointier J-P., Hurtrez-Boussès S. 2010. Bridging Gaps in the Molecular Phylogeny of Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), Vectors of Fasciolosis. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 381.

David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet, J.2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology,16*, 2474-2487.

De Meeûs T., Mc Coy K., Prugnolle F., Chevillon C., Durand P., Hurtrez-Boussès S., Renaud F. 2007. Population genetics and molecular epidemiology or how to « débusquer la bête ». *Infection genetic and evolution*. 16, 2474-2487

De Meeûs T., Goudet J. A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple. *Infection Genetics and Evolution* ,7, 731-5.

Esteban J.G, González C, Bargues M.D Angles R, Sánchez C., Náquira C, Mas-Coma, S.2002. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Tropical Medicine & International Health*, 7, 339-348.

Goudet J., 1999. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation

indices. Available from http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm.

Haberl M, Tautz D.1999. Comparative allele sizing can produce inaccurate allele size differences for microsatellites. *Molecular Ecology*, 8, 1347–1350.

Hansen, M.M., Kenchington, E.&Nielsen, E.E. 2001. Assigning

Henry P-Y.2002. Dynamique des populations et évolution du système de reproduction. Etude chez le gastéropode *Physa Acuta* (Pulmoné). PhD Thesis, Université Montpellier II, France.

Hurtrez-Bousses S., Meunier C., Durand P., Renaud F., 2001. Dynamics of host– parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (Fasciola hepatica). *Microbes and Infection.* 3, 841–849.

Hurtrez-Bousses S., Durand P., Jabbour-Zahab R., Guegan J.F., Meunier C., Bargues M.D., Mas-Coma S., Renaud F., 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (Fasciola hepatica). *Molecular Ecology*. Notes 4, 689–690.

Hurtrez-Boussès S, Hurtrez J.E, Turpin H, Durand C, Durand P, De Meeüs T, Meunier C, Renaud F. 2010. Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, Galba truncatula. *Infection Genetics and Evolution*, 101, 78-83.

Hutchinson D.W, Templeton A.R.1999. Correlation between pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution,* 53, 1898–1914.

Huson D.H, Bryant D.2006.Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23, 254–67.

Jones H.1990. Population geography. Paul Chapman Publishing Ltd, London. 321 pp.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*,451, 990-993.

Kimura M, Weiss G. H. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, *49*, 561.

Mage C, Bourgneb H, Toullieub J.M, Rondelaud D, Dreyfuss G.2002. Fasciola hepatica and Paramphistomum daubneyi: changes in prevalences of natural infections in cattle and in Lymnaea truncatula from central France over the past 12 years. *Veterinary reshearch*, 33, 439-47

Mas-Coma S, Esteban J.G, Bargues M.D.1999. Epidemiology of the human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin World Health Organization*. 77, 340–346.

Mavárez J, Amarista M, Pointier J-P, Jarne P .2002. Fine-scale population structure and dispersal in *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*, in Venezuela. *Molecular Ecology*, 11, 881–892.

Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Bargues M.D, Mas-Coma S, Pointier J.P, Jourdane J, Renaud F. 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia, *Molecular Ecology*. 10, 11333–1340.

Meunier C .2002. Fonctionnement des populations hôtes et adaptation au parasite dans l'interaction limnée-douve (Mollusque-Trématode), Université Montpellier II PhD Thesis.

Meunier C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Rondelaud D, Renaud F. 2004a. Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda:Pulmonata). *Molecular Ecology*, 13, 2535-2543.

Meunier C, Hurtrez-Boussès S, Jabbour-Zahab R,Durand P, Rondelaud D, Renaud F. 2004b. Field and experimental evidence of preferential selfing in *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity*, 92, 316-322.

Nei M.1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3321–3.

Nei M. Li W.H.1974. Stable linkage disequilibrium without epistasis in subdivided populations. *Theoretical population biology*, 6, 173-183.

Nei M, Chesser R.K.1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of human genetics*, 47,253-259.

PNR Camargue (Parc Naturel Régional de Camargue) 2011. Pour une gestion du risque parasitaire interne chez les taureaux de Camargue. Cahier Technique n°8.

Prugnolle F, De Meeûs T. The impact of clonalty on parasite population genetic structure. 2008. *Parasite.* 15(3), 455-457.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 223-225.

Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, Dreyfuss G, Cabaret, J. 2011. The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Veterinary parasitology*, *181*, 166-173.

Rondelaud D, Titi A, Vignoles P, Mekroud A, Dreyfuss G.2013. Consequence of temperature changes on cercarial shedding from Galba truncatula infected with fasciola hepatica or Paramphistomum daubneyi. *Evolution*, 38, 1358–1370.

Rousset F.1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219–1228.

Rim, H.J., Farag, H.F., Sornmani, S., Cross, J.H., 1994. Food-borne trematodes: ignored or emerging? *Parasitology Today*, 10, 207–209.

Taylor L.H, Latham S.M, Woolhouse M.E. 2001.Risk factors for human disease emergence. *Biologie Science*. 356, 983-989.

Thiele E.A, Corrêa O.G, Gazzinelli A, Minchella D.J, 2013. Elucidating the tem-poral and spatial dynamics of Biomphalaria glabrata genetic diversity in threeBrazilian villages. *Tropical Medecine Interne Health*, 18, 1164–1173.

Torgerson P, Claxton J, 1999. Epidemiology and control. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis. CAB International*, Oxon, pp. 113–149.

Trouve S, Degen L, Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Guegan J.F, Goudet J, Renaud F, 2000. Microsatellites in the hermaphroditic snail, Lymnaea truncatula, intermediate host of the liver fluke, Fasciola hepatica. *Molecular Ecology.* 9, 1662–1664.

Trouve S, Degen L, Goudet J.2005. Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail Galba truncatula. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*, 358-370.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills D.P.M, Shipley P. Micro-shecker : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.2004.*Molecular ecology*.4 , 535-538.

Vilas R, Vázquez-Prieto S, Paniagua E. 2012. Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: Implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 45–52.

Vittecoq M, Thomas F, Gauthier-Clerc M. 2012. Risks of Emerging Infectious Diseases: Evolving Threats in a Changing Area, the Mediterranean Basin. *Transboundary Emerging Diseases*.61 : 17-27.

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

Woolhouse M. E. J. Haydon D.T. Antia R. 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecology Evolution*, 20, 238–244.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2008. The global burden of disease. 2004 update. WHO, Genève, Suisse. Téléchargeable sur : http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.

Wright S.1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 395-420.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des personnes ayant échantillonné et identifié les limnées tronquées

Date de prélèvements	Collecte réalisée par	Identification par
23/01/2015	Lounnas Manon, Hurtrez-Boussès Sylvie, Vazquez Perera Antonio	Jean-Pierre Pointier
27/01/2015	Vittecoq Marion, Lounnas Manon, Hurtrez-Boussès Sylvie, Vazquez Perera Antonio	Vazquez Perera Antonio
10/02/2015	Hurtrez-Boussès Sylvie, Vittecoq Marion, Sabourin Emeline	Sabourin Emeline
11/02/2015	Sabourin Emeline, Vittecoq Marion, Blanchon Thomas	Sabourin Emeline
17/02/2015	Sabourin Emeline, Vittecoq Marion, Blanchon Thomas	Sabourin Emeline, Hurtrez-Boussès Sylvie
03/03/2015	Sabourin Emeline, Vittecoq Marion, Blanchon Thomas	A Disséquer
09/04/2015	Sabourin Emeline, Vittecoq Marion, Blanchon Thomas	A Disséquer
31/03/2015	Sabourin Emeline, Vittecoq Marion, Blanchon Thomas	A Disséquer

ANNEXE 2 : Protocole extraction d'Adn

1. Préparation du chelex 5%, dilution de 2,5g de chelex dans 50mL de buffer TE 10nM
2. Mettre 100µL de chelex dans chaque puits (attention à bien mélanger le chelex avant chaque pipetage).
3. Ajouter 5µl de protéinase K dans chaque puits
4. Couper un morceau de douve ou le pied de la limnée.
5. Déposer dans la plaque
6. Vortexer et centrifuger
7. Incuber à 56°C dans un thermocycleur toute la nuit
8. Vortexer
9. Incuber à 95°C pendant 10min
10. Stocker la plaque au congélateur avec un plan de plaque.

ANNEXE 3 : Protocole PCR *Galba truncatula*

MIX PCR	**Pour 1 tube**
Tampon 5X	2 µl
MgCl2 25 mM	1.2 µl
dNTP Mix 1/10e	0.5 µl
Amorce F	0.2µl
Amorce R	0.2µl
TAQ	0,2 µl
H2O	4.9 µl

PCR : programme TOUCHDOWN : Locus9, Locus21, Locus36, Locus37

1 cycle	3 cycles	4 cycles	4 cycles	4 cycles	21 cycles
94°C : 4 min 56°C : 30 sec 72°C : 30 sec	94°C : 30 sec 56°C : 30 sec 72°C : 30 sec	94°C : 30 sec 54°C : 30 sec 72°C : 30 sec	94°C : 30 sec 52°C : 30 sec 72°C : 30 sec	94°C : 30 sec 50°C : 30 sec 72°C : 30 sec	94°C : 30 sec 48°C : 30 sec 72°C : 30 sec

PCR : programme truncatula : Locus16

1 cycle	31 cycles	1 cycle	1 cycle
94°C : 4 min (step 1)	94°C : 30 sec (step 4)	72°C : 10 min (step 8)	10°C : 30 min (step 9 puis End)
52°C : 30 sec (step 2)	52°C : 30 sec (step 5)		
72°C : 30 sec (step 3)	72°C : 30 sec (step 6) (step 7 : go to step 4, 30 times)		

ANNEXE 4 : Protocole PCR *Fasciola hepatica*

Mix PCR	Pour 1 tube FH15 FH25 FH40 FH26 FH28	Pour 1 tube FH23
Tampon 5X	2 µl	4µl
	1.2µl	1µl
dNTP Mix 1/10e	0.5µl	2µl
Amorce F	0.2µl	0.5µl
Amorce R	0.2µl	0.5µl
TAQ	0,2µl	0.2µl
H2O	4.9µl	7.9µl
Total	9µl +1µl ADN	18µl ADN

Locus 15

1 cycle	31 cycles	1 cycle	1 cycle
94°C : 4 min (step 1)	94°C : 30 sec (step 4)	72°C : 10 min (step 7)	10°C : 30 min (step 8 puis End)
49°C : 30 sec (step 2)	48°C : 30 sec (step 5)		
72°C : 30 sec (step 3)	72°C : 30 sec (step 6)		

Locus 23 et 40

1 cycle	31 cycles	1 cycle	1 cycle
94°C : 4 min(step 1)	94°C : 30 sec (step 4)	72°C : 10 min (step 7)	10°C : 30 min (step 8 puis End)
52°C : 30 sec (step 2)	50°C : 30 sec (step 5)		
72°C : 30 sec (step 3)	72°C : 30 sec (step 6)		

Locus 28

1 cycle	31 cycles	1 cycle	1 cycle
94°C : 4 min(step 1)	94°C : 30 sec (step 4)	72°C : 10 min (step 7)	10°C : 30 min (step 8 puis End)
52°C : 30 sec (step 2)	52°C : 30 sec (step 5)		
72°C : 30 sec (step 3)	72°C : 30 sec (step 6)		

Locus 26

1 cycle	31 cycles	1 cycle	1 cycle
94°C : 4 min(step 1)	94°C : 30 sec (step 4)	60°C : 10 min (step 7)	10°C : 30 min (step 8 puis End)
45°C : 10 sec (step 2) 40°C : 10 sec	45°C : 10 sec (step 2) 40°C : 10 sec		
60°C : 30 sec (step 6)	60°C : 30 sec (step 6)		

Locus25

1 cycle	31 cycles	1 cycle	1 cycle
94°C : 4 min(step 1)	94°C : 30 sec (step 4)	72°C : 10 min (step 7)	10°C : 30 min (step 8 puis End)
51°C : 30 sec (step 2)	51°C : 30 sec (step 5)		
72°C : 30 sec (step 3)	72°C : 30 sec (step 6)		

ANNEXE 5 : Préparation d'une plaque d'ADN pour un génotypage

1. Préparer deux mix (Formamide + Genscan) à raison de 15 µl par puits.
   Tube 1 et 2 : 15 x 48 =720 µl de Formamide
   7,2µl de Genscan

2. Faire une dilution de l'ADN pour chaque locus dans 100µl ou 200µl selon quantité d'ADN amplifiée (gel d'agarose)
   Ajouter 1µl d'ADN issu de la PCR

3. Mettre 3µl par puits de l'ADN dilué de douves (multiplexe FH23, FH26, FH28 et multiplexe FH40, FH25, FH15) ou de limnée (multiplexe L9 L16 L21 et multiplexe L36 L37 L24) dans la plaque contenant le mix.

4. Mettre dans le séquenceur

   NB : Genscan très sensible à la lumière, le sortir qu'au dernier moment. Le Formamide est toxique

ANNEXE 6 : Déséquilibres de liaisons

Pour les locus de *Galba truncatula*

Paire de locus	P-value
9 X 16	0,0288
9 X 21	0,2634
9 X 37	0,0002
9 X 24	0,0391
9 X 36	0,1737
16 X 21	0,0025
16 X 37	0,0498
16 X 24	0,0002
16 X 36	0,0043
21 X 37	0,0073
21 X 24	0,0134
21 X 36	0,9908
37 X 24	0,0250
37 X 36	0,4776
24 X 36	0,2599
MEAN	0,1557
SD	0,2675

Pour les locus de *Fasciola hepatica*

Paire de locus	P-value
40 X 15	0,132
40 X 25	0,061
40 X 28	0,139
15 X 25	0,954
15 X 28	0,615
25 X 28	0,788
MEAN	0,448
SD	0,386

Ensemble des p values pour les déséquilibres de liaison basées sur 5000 permutations

ANNEXE 7 : FST des infra populations *de Galba truncatula*

ABM2	ABM1P2	ABMP3	ABCS1	ABCbSO	MCPD5	MCPD1	MCPD3	MCPD4	MCPD2	MCPDC	ABEO	ABDP	AB7	AB8	MC	MC10	RIS2	RIS1	ESS1	ESS3	ESS2	ESS9	ESS5	ESS6	ESS7	ESS8	ABS5	ABS4	ABS2	ABS6	ABS8	TRVS1	TRVM	
0.0000	0.0404	-0.0177	0.2849	0.2449	0.3612	0.3908	0.3225	0.3054	0.2405	0.3852	0.4086	0.3355	0.3011	0.4022	0.3485	0.4145	0.4015	0.5765	0.3194	0.1274	0.3790	0.2521	0.3879	0.4097	0.3738	0.2736	0.3575	0.3240	0.3686	0.3347	0.2657*	0.6308	0.5537	ABM2
	0.0000	0.0667	0.4258	0.5362	0.4289*	0.4986	0.4263	0.4022	0.3560	0.5100	0.5891	0.4333	0.3869	0.4563*	0.3826*	0.5414	0.5074*	0.6737	0.3431	0.2631	0.4551	0.3790	0.4699	0.5102	0.5006	0.3581	0.4986	0.4265	0.5157	0.4356	0.3436*	0.7127	0.6348*	ABM1P2
		0.0000	0.1681	0.3314	0.2789*	0.3043	0.2249	0.2195	0.2714	0.3064	0.3230	0.2215	0.1961	0.3326	0.2712*	0.3108	0.3307*	0.5088	0.2654	0.1216	0.2889	0.2540	0.3151	0.2687	0.3972	0.1899	0.2955	0.1744	0.2455	0.2505	0.2065	0.5165	0.5064 *	ABMP3
			0.0000	-0.2000	0.3496	0.4863	0.2740	0.2833	0.4400	0.3760	0.4322	0.3101	0.1920	0.3140	0.2988	0.3893	0.4546	0.6101	0.3229	0.1984	0.3412	0.3599	0.4014	0.3868	0.6660	0.2572	0.4247	0.2984	0.3381	0.3446	0.2344	0.8494	0.7230	ABCS1
				0.0000	0.4078	0.4871	0.3490	0.2857	0.2565	0.1619	-0.1028	0.2173	0.3423	0.3807	0.4416	0.1929	0.3122	0.6194	0.4115	0.2383	0.2403	0.4753	0.2561	0.2447	0.6507	0.3416	0.2862	0.4854	0.1303	0.2966	0.0795	0.6906	0.5252	ABCbSO
					0.0000	0.0533	-0.0465	0.0489	0.1805	0.2926	0.4169	0.2320	0.3694*	0.4029*	0.1028	0.2883	0.3434*	0.5620*	0.3617	0.3142	0.2985	0.2773	0.2813	0.2436	0.5033	0.2233	0.2308*	0.3845	0.3552	0.3081*	0.2344*	0.5312*	0.4968*	MCPD5
						0.0000	0.0156	0.0792	0.3486	0.3305	0.4820	0.2334	0.4425	0.4953	0.1560	0.3826	0.3040	0.6168	0.4368	0.3829	0.3635	0.3044	0.3211	0.3932	0.6753	0.2108	0.2296	0.5193	0.4942	0.3427	0.2618	0.6842	0.5649	MCPD1
							0.0000	-0.0508	0.0364	0.2482	0.3560	0.1267	0.3503	0.3460	0.0078	0.2613	0.2768	0.6147	0.2940	0.1711	0.1682	0.1140	0.1706	0.2060	0.4246	0.1400	0.1951	0.3533	0.3207	0.2496	0.1833	0.6840	0.5445	MCPD3
								0.0000	0.1551	0.2448	0.3968	0.0853	0.3093	0.3360	0.1187	0.2084	0.2014*	0.5501	0.2867	0.2174	0.1351	0.1787	0.0917	0.1764	0.4595	0.0908	0.1490	0.3454	0.2866	0.1974	0.1744	0.5807	0.5050*	MCPD4
									0.0000	0.2942	0.5169	0.2456	0.3415	0.2983	0.0531	0.3726	0.3428	0.6443	0.2002	0.2610	0.1973	0.2424	0.2519	0.2537	0.4424	0.2792	0.3726	0.4416	0.4356	0.2944	0.2537	0.7151	0.5498	MCPD2
										0.0000	0.3854	0.2195	0.3802	0.4487	0.3178	0.3175	0.2967	0.4446	0.3897	0.2542	0.3337	0.2964	0.3291	0.3486	0.4665	0.2523	0.3030	0.3937	0.3414	0.3073	0.2644	0.4779	0.5763	MCPDC
											0.0000	0.3561	0.2918	0.5101	0.5235	0.3173	0.3296	0.2781	0.4860	0.4605	0.5985	0.4858	0.5129	0.4810	0.6752	0.4093	0.2856	0.3933	0.4313	0.3827	0.3515	0.7786	0.6079	ABEO
												0.0000	0.3154	0.3510	0.2683	0.2108	0.1088	0.5153	0.3177	0.1019	0.2393	0.0958	0.2246	0.2080	0.3388	0.1622	0.1913	0.2752	0.2160	0.1622	0.1996*	0.4883	0.5289	ABDP
													0.0000	0.2182	0.4019*	0.3577	0.3853*	0.5277	0.2855	0.2579	0.4303	0.3959	0.3998	0.2217	0.5244	0.3210	0.3616	0.0676	0.1534	0.2380	0.2061*	0.6517	0.5682*	AB7
														0.0000	0.4039*	0.4250	0.4151*	0.6075	0.2933	0.3176	0.4248	0.3866	0.4268	0.2712	0.4470	0.3931	0.4235*	0.2938	0.3564	0.3470	0.2652*	0.6976	0.5904 *	AB8
															0.0000	0.3248	0.4016*	0.6285*	0.2960	0.2838	0.2400	0.2091	0.2695	0.3420	0.4546	0.2486	0.3447*	0.4189	0.4275	0.3541	0.2515*	0.5925	0.5517 *	MC
																0.0000	0.3418	0.5667	0.2941	0.0070	0.2670	0.2976	0.2020	0.2339	0.5365	0.1970	0.3223	0.3259	0.2261	0.1388	0.1519	0.6300	0.5484	MC10
																	0.0000	0.4111*	0.3978	0.3305	0.3544	0.2929	0.3016	0.3492	0.5171	0.2401*	0.2617*	0.4372	0.3861	0.2202	0.2852*	0.5023*	0.5202*	RIS2
																		0.0000	0.6254	0.6007	0.6707	0.6309	0.6222	0.6260	0.7507	0.5326	0.5485	0.6174	0.5425	0.5623	0.5043	0.7194	0.7030*	RIS1
																			0.0000	0.2485	0.2703	0.2981	0.3288	0.2944	0.3433	0.2883	0.3653	0.3081	0.3629	0.1672	0.1952	0.6765	0.4339	ESS1
																				0.0000	0.0252	0.1481	0.1900	0.0504	0.2394	0.0610	0.2873	0.1172	0.1099	0.1959	0.2161	0.6245	0.5480	ESS3
																					0.0000	0.0653	0.0245	0.3764	0.3269	0.0316	0.3055	0.4397	0.3687	0.2634	0.2198	0.7531	0.6125	ESS2
																						0.0000	0.2464	0.2499	0.2792	0.2182	0.3676	0.2726	0.2931	0.2826	0.3092	0.6130	0.4585	ESS9
																							0.0000	0.2885	0.4754	0.0832	0.2898	0.4595	0.3755	0.2367	0.1950	0.6508	0.5861	ESS5
																								0.0000	0.4346	0.2271	0.3041	0.2531	0.1862	0.2115	0.2083	0.7587	0.5880	ESS6
																									0.0000	0.4126	0.4327	0.5693	0.5911	0.5156	0.4201*	0.8779	0.5415	ESS7
																										0.0000	0.1538	0.3181	0.2785	0.1962	0.2001*	0.5162	0.5315*	ESS8
																											0.0000	0.4194	0.3541	0.2567	0.2158	0.6260	0.4954 *	ABS5
																												0.0000	-0.0119	0.2551	0.2666	0.8012	0.6264	ABS4
																													0.0000	0.2046	0.2290	0.7768	0.6568	ABS2
																														0.0000	0.1236	0.6284	0.5078 *	ABS6
																															0.0000	0.4506	0.3729 *	ABS8
																																0.0000	0.7051*	TRVS1
																																	0.0000	TRVM

Fst significatif lorsque valeurs* détectée après 50000 permutations.

ANNEXE 8 : Fst des isolats de *Fasciola hepatica*

taurA1																				
taurA2	0,050	0,000																		
taurA3	-0,034	0,212	0,000																	
taurA4	-0,091	0,122	0,010	0,000																
taurA5	-0,047	0,017	0,069	0,020	0,000															
TaurB1	0,024	0,005	0,118	0,058	0,015	0,000														
TaurB2/3	0,043	0,013	0,058	0,067	0,005	-0,018	0,000													
TaurB4	0,010	0,046	0,107	0,091	-0,048	0,008	0,013	0,000												
TaurB5	-0,051	0,047	-0,114	-0,035	-0,024	0,052	0,003	0,019	0,000											
TaurD4	-0,038	0,006	0,000	-0,081	0,008	-0,055	0,008	0,030	0,008	0,000										
TaurD5	0,015	0,005	0,113	0,102	-0,012	-0,010	-0,001	-0,011	0,022	0,022	0,000									
TaurD6	0,007	0,066	0,039	0,034	-0,026	-0,001	0,009	-0,019	0,014	0,019	0,010	0,000								
TaurD7	0,006	0,006	0,081	0,063	-0,040	-0,032	-0,007	-0,037	0,020	-0,017	-0,041	-0,009	0,000							
TaurE1	0,047	0,076	0,143	0,116	0,029	0,000	0,015	0,023	0,071	0,029	0,038	0,005	0,017	0,000						
TaurE2	0,062	0,110	0,175	0,163	0,031	0,031	0,047	0,022	0,097	0,061	0,026	0,009	0,025	-0,086	0,000					
TaurF1	0,026	0,031	0,125	0,083	-0,010	-0,027	0,019	-0,026	0,057	0,010	-0,023	-0,005	-0,031	0,020	0,008	0,000				
TaurF3	0,066	0,075	0,154	0,127	0,100	-0,011	0,043	0,062	0,100	0,001	0,020	0,063	0,023	0,057	0,065	0,014	0,000			
TaurF2	0,025	0 ,062	0,080	0,053	-0,026	-0,026	-0,020	-0,015	0,009	0,000	-0,020	0,004	-0,031	0,033	0,053	-0,015	0,031	0,000		
TaurF4	0,078	0,093	0,157	0,148	0,103	0,041	0,078	0,084	0,107	0,039	0,011	0,081	0,029	0,102	0,100	0,055	0,043	0,079	0,000	
TaurG1	-0,026	0,095	-0,246	-0,141	0,037	0,010	0,019	0,060	-0,064	-0,112	0,061	0,027	0,025	0,086	0,116	0,057	0,046	0,018	0,086	0,000
	taurA1	taurA2	taurA3	taurA4	taurA5	TaurB1	TaurB2/3	TaurB4	TaurB5	TaurD4	TaurD5	TaurD6	TaurD7	TaurE1	TaurE2	TaurF1	TaurF3	TaurF2	TaurF4	TaurG1

Aucune différenciation significative n'a été détectée après 50000 permutations.