



HAL
open science

Étude parasitologique de *Anguilla anguilla* dans deux lagunes de Corse et étude ultrastructurale du tégument de trois digènes parasites de cette anguille

Jean-José Filippi

► **To cite this version:**

Jean-José Filippi. Étude parasitologique de *Anguilla anguilla* dans deux lagunes de Corse et étude ultrastructurale du tégument de trois digènes parasites de cette anguille. Sciences agricoles. Université Pascal Paoli, 2013. Français. NNT : 2013CORT0001 . tel-00819285

HAL Id: tel-00819285

<https://theses.hal.science/tel-00819285>

Submitted on 30 Apr 2013

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.



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 Sciences Pour l'Environnement



Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES –
POPULATIONS – INTERACTIONS
Mention : Biologie des organismes

Soutenue publiquement par
Jean-José FILIPPI

Le 14 Mars 2013

Étude parasitologique de *Anguilla anguilla* dans deux lagunes de Corse et étude ultrastructurale du tégument de trois digènes parasites de cette anguille.

Directeurs :

M. Bernard MARCHAND, Pr, Université de Corse
Mme. Joséphine FOATA, MCF-HDR, Université de Corse

Rapporteurs :

M. Gérard PEAUCELLIER, Pr, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6
M. Carlos FELIU, Pr, Université de Barcelone, Faculté de Pharmacie

Jury

M. Gérard PEAUCELLIER, Pr, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6
M. Carlos FELIU, Pr, Université de Barcelone, Faculté de Pharmacie
M. Jordi MIQUEL, MCF, Université de Barcelone, Faculté de Pharmacie
M. Bernard MARCHAND, Pr, Université de Corse
Mme. Joséphine FOATA, MCF-HDR, Université de Corse
M. Yann QUILICHINI, Dr, Université de Corse



**THESE DE DOCTORAT
UNIVERSITE DE CORSE**

Mention
Biologie des organismes

Présentée par
M^r Jean-José FILIPPI

Pour obtenir le grade de
**Docteur en Physiologie et Biologie des organismes
Populations – Interactions**

**Étude parasitologique de *Anguilla anguilla* dans deux
lagunes de Corse et étude ultrastructurale du tégument
de trois digènes parasites de cette anguille.**

Soutenue le 14 Mars 2013 à Corte

Devant le jury composé de :

M. Gérard PEAUCELLIER, Rapporteur
M. Carlos FELIU, Rapporteur
M. Jordi MIQUEL, Examineur
M. Yann QUILICHINI, Examineur
Mme. Joséphine FOATA, Co-directrice de thèse
M. Bernard MARCHAND, Co-directeur de thèse

Pour mes parents et mes grands-parents.

Remerciements

Je veux tout d'abord exprimer ma reconnaissance aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces trois années de thèse. Je souhaite remercier tout particulièrement Messieurs Gérard Peaucellier et Carlos Feliu qui sont rapporteurs de cette thèse, ainsi que Monsieur Jordi Miquel, membre du jury.

Je tiens à remercier le Pr. Bernard Marchand, directeur du laboratoire Parasites et Écosystèmes Méditerranéens pour m'avoir orienté de la meilleure des façons au cours de mes travaux de recherche. Je remercie également le projet GEM, Paul Bisgambiglia et l'UMR SPE 6134 et plus globalement l'Université de Corse et son Président qui m'ont accueilli au sein de leur structure de recherche et m'ont permis une totale autonomie de travail durant cette thèse, ainsi que les divers stages que j'ai pu y effectuer.

Je remercie également Joséphine Foata, co-directrice de cette thèse, et Yann Quilichini pour m'avoir guidé le long du parcours tumultueux qu'est ce cheminement de thèse, ainsi que pour tout ce qu'ils m'ont apporté. Je remercie particulièrement Joséphine pour l'expérience de Directeur des Études qu'elle m'a permis de vivre durant deux années à l'IUT de Corse.

Un « merci » particulier à Ambre Gamerre, Samuel Greani et Laetitia Antonelli que j'ai pu voir s'épanouir dans leur travaux et avec qui j'ai pu partager quelques uns des meilleurs moments de ma thèse.

Merci à M^{me} Spella, Antoine Berlinghi, Émilie et Mathieu ainsi qu'à François pour leur gentillesse à toute épreuve.

Merci à M^{me} Marchand pour son hospitalité et sa gentillesse.

Je souhaite remercier Jean-Louis Guaitella et Louis Tarallo, pêcheurs de l'étang d'Urbino, ainsi que Pierre Planet et son équipe, pêcheurs de l'étang de Biguglia pour la gentillesse avec laquelle ils m'ont accueilli à chacune de mes visites, ces trois dernières années. Je ne les oublierai jamais. Vous êtes des gens merveilleux.

Merci à tous mes collègues doctorants ou non: Sonia, Fred, Élodie, Jérémie, Benjamin, Anne, Émilie, Pierre, Emmanuelle, Marina, Mighè, Aurélie, Jean-Chri, Anne-Laure, Sacha, Pierre, Christelle, Candice, Greg, Pauline, François, Anaïs. Merci pour tous ces moments partagés. Merci également à tous ceux que j'ai oublié ! Un merci trop tardif à Camille.. Je regrette de ne pas avoir accepté tes sorties hivernales pour cause de surcharge de travail. Nous ne t'oublierons jamais...

Une mention spéciale pour tous les enseignants que j'ai pu côtoyer durant mon expérience de Directeur des Études à l'IUT de Corse, dont certains font partie des meilleurs « profs » qu'il m'ait été donné de rencontrer. Un grand merci à France, Christine, Stéphane, Jean-François, Laetitia, Toussaint, Paul-Fé, Cathy, Jean-Louis, Dumè, Valérie, Muriel, Dominique, Agnès, Isabelle, Olivier, Christine Elisabeth, Patrizia, Santa, Béa, Serge, Vanni, Marc-Antoine, Jo, Marc, Gilles, Alexandra, Baptiste, Elisabeth, Yolanda, Paul, Hugues, Nicolas, Jean-Charles, Nathalie et Nico. Un grand merci également à Jean-Luc, Anne-Marie, Élise, Marina, Marie-Jo, Antea et Christian.

Merci à tous les pompiers du centre de secours de Porto-Vecchio avec qui j'ai passé et je passe encore des moments exceptionnels !

Merci au personnel de l'École Doctorale et à son directeur Jean Costa pour m'avoir permis d'effectuer ces trois années de thèse. Un grand merci également à mes amis de l'association Pro-Doc pour l'aventure que nous avons vécu ensemble !

Je remercie également la plate-forme STELLA MARE, Antoine Aiello et Sylvia Agostini pour l'opportunité professionnelle qu'ils me permettent de vivre au sein de leur équipe après cette thèse. Je remercie évidemment Sonia, Romain et tous mes nouveaux collègues : Marie-France, Fabien, Jean-Sé, Julien, Nico, Laure-Hélène, Éric, Paul, Yannick, Pierre-Mathieu, Fabien, Gery, Seb, Jérémy, Sophie et Andrea. Je remercie également Vanina Pasqualini pour ce qu'elle a fait pour moi. Une nouvelle histoire est en train de s'écrire...

Je suis heureux d'avoir croisé la route de Marie-Cécile Giuliani. Tu es une des plus belles personnes que j'ai rencontré dans ma vie. Tu as été là pour effacer mes doutes et m'ouvrir les yeux. J'espère pouvoir te rendre la pareille un jour, mais en attendant je ne te lâche pas. J'ai hâte de vivre cette vie de Bastiais avec toi et toute ta petite famille ! Ne l'oublie pas: « il pleut des torrents ! ».

Alex, Marie et Bastien: je ne vous remercierai jamais assez dans toute une vie pour les moments de rire et de peine que l'on a vécu ensemble durant cette thèse. Je ne saurai par où commencer tellement il y aurait à dire sur vous, sur nous. Je vais rester simple en disant que je vous adore et que rien n'aurait pu se faire sans votre présence. Je ne vous oublierai jamais, sans vous je n'aurais pas pu y arriver, j'espère ne jamais vous perdre.

Merci à Cédric, Margot, Jean-Phi, Emma, Aline, Céline et tous mes amis pour m'avoir supporté durant ces trois années. Vous êtes mes amis et le resterez toujours.

Un énorme merci à mes beaux-parents Jean-Paul et Marie-Laure pour m'avoir accueilli les midis et les week-ends au salon de thé ou chez eux. Un merci encore plus gros à Anaïs, Margaux, Lucie et Stéphane pour tous les moments de bonheur que l'on passe ensemble. Je n'oublie pas Jean-Paul, Camille et le petit Alexandre: merci pour tout !!

Marion, il me serait difficile de te remercier sur si peu de lignes. Tu m'as toujours soutenu, encouragé et conforté dans mes idées. Je suis heureux de t'avoir rencontré ce 6 décembre, je suis heureux que tu fasses partie de ma vie, je suis heureux de l'avenir que je vais avoir à tes côtés. Quoi qu'il advienne j'aurai la meilleure des vies si tu y marches à mes côtés. Je t'aime.

Je remercie en dernier mes parents, mes grands-parents et mon frère pour tout, tout simplement. Vous êtes tout pour moi, le meilleur de moi-même. Vous m'avez épaulé, accompagné, rassuré et guidé, même si je n'ai pas forcément eu le temps de vous le rendre ces derniers temps. Je ne vous le dis pas souvent, mais sachez que je vous aime plus que tout...

Sommaire

Chapitre I - Introduction générale	1
I.1 LE PARASITISME	2
I.1.1 Ectoparasites	5
I.1.2 Mésoparasites	8
I.2 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ET LE PARASITISME	14
I.2.1 Microscopie électronique à transmission	14
I.2.2 Microscopie électronique à balayage	18
I.3 BUT DE L'ÉTUDE ET OBJECTIFS	20
Chapitre II - Hôte, sites d'étude et espèces parasites observées	22
II.1 L'HOTE : L'ANGUILLE D'EUROPE <i>ANGUILLA ANGUILLA</i>	23
II.2 LES SITES ETUDIÉS	26
II.2.1 La lagune de Biguglia	26
II.2.2 La lagune d'Urbino	28
II.3 LES ESPÈCES PARASITES OBSERVÉES	30
II.3.1 Digènes	30
II.3.2 Monogènes	32
II.3.3 Cestodes	33
II.3.4 Nématodes	35
II.3.5 Acanthocéphales	38
II.3.6 Copépodes	38
II.3.7 Myxozoaires	39
Chapitre III - Parasite communities of European eels <i>Anguilla anguilla</i> Linnaeus, 1758 in two Mediterranean coastal lagoons of the island of Corsica, France	40
III.1 INTRODUCTION	41
III.2 METHODS	43
III.2.1 Localities and sample collection	43
III.2.2 Morphological and epidemiological analyses	45
III.2.3 Statistical analyses	47
III.3 RESULTS	50
III.3.1 Eel silvering stage	50
III.3.2 Composition of the parasite communities	51
III.3.2 Correlations between parasites species abundance	53
III.3.3 Correlations between parasites species abundance and various biometrical indices of sampled eels	54
III.3.4 Similarity between communities	55
III.3.5 Component community structure	56
III.3.6 Intestinal infracommunity structure	58
III.4 DISCUSSION	59
III.4.1 Parasite community structure and comparison between the two lagoons	59
III.4.2 Comparison with other intestinal parasite communities in Mediterranean and European lagoons	68

Chapitre IV - Epidemiological trends of the parasites species of the European eel *Anguilla anguilla* in two Mediterranean lagoons of the island of Corsica, France 76

IV.1	INTRODUCTION	77
IV.2	MATERIALS AND METHODS	79
IV.2.1	<i>Localities and sample collection</i>	79
IV.2.2	<i>Morphological and epidemiological analyses</i>	82
IV.2.3	<i>Statistical analyses</i>	82
IV.3	RESULTS	83
IV.3.1	<i>Parasitic fauna</i>	83
IV.3.2	<i>Seasonal trends of the epidemiological parameters</i>	87
IV.3.3	<i>Eel size and silvering stage relationships with the epidemiological parameters</i>	100
IV.4.	DISCUSSION	109
IV.4.1.	<i>Seasonal fluctuations of the epidemiological parameters</i>	109
IV.4.2.	<i>Influence of host size and silvering stage on epidemiological parameters</i>	119

Chapitre V - Influence of site, season, silvering stage, and length on the parasites of the European eel *Anguilla anguilla* in two Mediterranean coastal lagoons of the island Corsica, France using indicator species method 126

V.1	INTRODUCTION	127
V.2	MATERIALS AND METHODS	129
V.2.1	<i>Sampling</i>	129
V.2.2	<i>Indicator species</i>	132
V.3	RESULTS	135
V.3.1	<i>Indicator species for site</i>	135
V.3.2	<i>Indicator species for season</i>	136
V.3.3	<i>Indicator species for silvering stage</i>	136
V.3.4	<i>Indicator species for length class</i>	137
V.4	DISCUSSION	138
V.4.1	<i>Indicator species for site</i>	138
V.4.2	<i>Indicator species for season</i>	141
V.4.3	<i>Indicator species for silvering stage</i>	141
V.4.4	<i>Indicator species for length class</i>	143

Chapitre VI - Topography and ultrastructure of the tegument of *Bucephalus anguillae* (Digenea: Bucephalidae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyen: Anguillidae) 145

VI.1	INTRODUCTION	146
VI.2	MATERIALS AND METHODS	147
VI.2.1	<i>Specimen collection</i>	147
VI.2.2	<i>SEM</i>	147
VI.2.3	<i>TEM</i>	148
VI.3	RESULTS	148
VI.3.1	<i>SEM</i>	148
VI.3.2	<i>TEM</i>	153
VI.4	Discussion	159
VI.4.1	<i>General organization of tegument</i>	159
VI.4.2	<i>Cytoplasmic expansions</i>	159
VI.4.3	<i>Spines</i>	160
VI.4.4	<i>Vesicles</i>	162
VI.4.5	<i>Sensory receptors</i>	163

Chapitre VII - Topography and ultrastructure of the tegument of *Lecithochirium musculus* (Digenea: Hemiuridae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyes: Anguillidae) 166

VII.1	INTRODUCTION	167
VII.2	MATERIALS AND METHODS	168
VII.2.1	<i>Specimen collection</i>	168
VII.2.2	<i>SEM</i>	168
VII.2.3	<i>TEM</i>	169
VII.3	RESULTS	169
VII.3.1	<i>General organization of the tegument</i>	169
VII.3.2	<i>Sensory receptors</i>	173
VII.4	DISCUSSION	175
VII.4.1	<i>General organization of the tegument</i>	175
VII.4.2	<i>Sensory receptors</i>	178

CHAPITRE VIII - Topography and ultrastructure of the tegument of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenea: Deropristidae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyes: Anguillidae) 182

VIII.1	INTRODUCTION	183
VIII.2	MATERIALS AND METHODS	184
VIII.2.1	<i>Specimen collection</i>	184
VIII.2.2	<i>SEM</i>	185
VIII.2.3	<i>TEM</i>	185
VIII.3	RESULTS	186
VIII.3.1	<i>General organization of the tegument</i>	186
VIII.3.2	<i>Sensory receptors</i>	191
VIII.4	DISCUSSION	195
VIII.4.1	<i>General organization of the tegument</i>	195
VIII.4.2	<i>Spines</i>	197
VIII.4.3	<i>Sensory receptors</i>	198

Chapitre IX - Synthèse, perspectives et conclusion 203

IX.1	Synthèse des principaux résultats	204
IX.1.1	<i>Communautés et diversités parasitaires</i>	204
IX.1.2	<i>Variabilité des communautés parasitaires en fonction de la saison, de la taille ou du stade d'argenture de l'anguille</i>	205
IX.1.3	<i>Espèces parasites indicatrices</i>	206
IX.1.4	<i>Étude tégumentaire de <i>Bucephalus anguillae</i></i>	207
IX.1.5	<i>Étude tégumentaire de <i>Lecithochirium musculus</i></i>	208
IX.1.6	<i>Étude tégumentaire de <i>Deropristis inflata</i></i>	208
IX.2	Perspectives et conclusion	209
IX.2.1	<i>Parasitologie de l'anguille d'Europe en Corse</i>	209
IX.2.2	<i>Étude microscopique des parasites de l'anguille d'Europe</i>	212

Bibliographie 214

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

I.1 LE PARASITISME

Appréhender la biodiversité parasitaire chez l'anguille d'Europe *Anguilla anguilla* dans les lagunes méditerranéennes côtières d'Urbino et de Biguglia en Corse est important dans la compréhension de cet écosystème. Étant donné que les cycles de vie parasites, souvent complexes, sont intégrés dans les chaînes alimentaires de l'écosystème, les parasites peuvent être vus comme un lien entre les différents niveaux trophiques. Les parasites peuvent ainsi être utilisés comme indicateurs de l'écologie trophique, de la structure des chaînes et des préférences alimentaires, et du mode de recherche de nourriture de l'hôte (Brooks & Hoberg, 2000). La compréhension de l'écologie parasitaire permet ainsi de développer les connaissances dans plusieurs domaines : la position trophique d'un hôte dans une chaîne alimentaire, l'utilisation faite et le temps passé dans les différents microhabitats, l'impact du parasite sur l'hôte, les changements alimentaires de l'hôte au cours de son cycle de vie, ainsi que le potentiel migratoire de l'hôte (Brooks & Hoberg, 2000). Toutes ces caractéristiques permettent d'alimenter la base de connaissances sur l'écosystème considéré comme un tout et d'améliorer le monitoring et la protection de cet environnement.

Des millions d'espèces vivantes, animales ou végétales, colonisent la surface de la Terre, dans les différents types de milieux naturels existants. Elles sont parfois indépendantes les unes des autres et se côtoient occasionnellement sans interagir. Cependant le fonctionnement des écosystèmes repose essentiellement sur les interdépendances entre individus vivant dans un même milieu (Combes, 2001). Il existe toute une gamme d'interactions qui s'établissent entre individus d'espèces différentes. Parmi ces interactions, il existe plusieurs types d'associations et de cohabitations entre les êtres vivants, dont le parasitisme fait partie. Il s'agit d'un mode de vie très répandu (à l'heure actuelle près de 50% de la biodiversité totale de la planète serait soumise au parasitisme) dans lequel des individus d'espèces radicalement différents vont vivre en étroite relation (Combes, 2001). C'est en fait

l'exploitation du vivant par le vivant. Un parasite dépend métaboliquement de son hôte. Un parasite est donc un organisme vivant aux dépens d'un autre organisme ; l'association étant bénéfique au parasite et défavorable à l'hôte (Marchand, 1994).

L'association hôte parasite n'est nécessaire qu'au parasite, car lui seul profite de cette coexistence. Il vit aux dépens de son hôte, qui lui fournit une source de nourriture ainsi qu'un habitat. Dans la plupart des cas, s'il ne trouve pas d'hôte, le parasite est voué à une mort certaine. La survie d'un parasite dépend donc de celle de son hôte (Marchand, 1994). On peut considérer le parasitisme comme un cas particulier de prédation (le parasite se nourrit aux dépens de son hôte). Cependant, le parasite n'est pas vraiment un prédateur car il n'a pas pour but de tuer l'hôte (Grabda, 1991). La sélection naturelle favorise les parasites les plus habiles à repérer et à consommer leur nourriture. Le parasitisme peut donc se définir comme une association hétérosécifique obligatoire dont une espèce, l'hôte, sert de milieu à l'autre, le parasite. Le but premier d'un parasite, n'est donc pas de tuer son hôte, mais d'en tirer profit le plus longtemps possible, mis à part ceux pour qui la mort de l'hôte permettra d'assurer la continuité de l'espèce (Grabda, 1991).

Il existe deux modes de parasitisme : le parasitisme temporaire, quand un être vivant est parasite pendant une ou plusieurs périodes de sa vie, et le parasitisme permanent, quand un être vivant est parasite tout au long de sa vie, tant larvaire qu'adulte, avec un même hôte, ou avec plusieurs hôtes. Les parasites sont omniprésents, génération après génération, et chaque espèce animale ou végétale peut subir une infestation par un parasite, voire par un cortège de parasites. Certains sont même parasites de parasites : on les appelle des hyperparasites. Cependant, le fait que les parasites soient peu ou pas visibles a longtemps fait ignorer leur existence. Leur faible contribution en terme de biomasse a fait que leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes a longtemps été considéré comme trivial (Combes, 2001). Le constat que les parasites jouent des rôles importants à différents niveaux pour les

différentes communautés animales, « many roles at many levels », en structurant les communautés par leur intervention dans la compétition inter-spécifique ou en influant sur la biodiversité, fait que leur étude a pris une importance considérable ces dernières années (Poulin, 1999).

Le parasitisme touche toutes les espèces animales et les espèces parasites sont relativement diversifiées. L'hôte est une ressource pour le parasite, sur laquelle il peut se spécialiser. Ainsi, la spécificité des êtres vivants va permettre de créer des « microenvironnements » qui seront autant d'options d'habitats pour les espèces parasites qui font preuve de capacités d'adaptation remarquables. Le parasitisme joue donc un rôle essentiel dans des processus aussi importants que la stabilité, la régulation et la structuration des écosystèmes (Combes, 2001). Son rôle est primordial en écologie, car il intervient dans l'évolution du milieu (Begon *et al.*, 1986). La plupart des parasites semblent jouer un rôle important dans la sélection naturelle et l'évolution. Dès lors, il apparaît certain que des modifications de l'équilibre hôte-parasite pourraient entraîner des modifications considérables de l'environnement.

Les espèces parasites vont se distinguer par leurs adaptations et leurs modes de vie (Marchand, 1994). On peut donc distinguer selon leur situation chez l'hôte, trois catégories de parasites :

- Les ectoparasites vivant aux dépens des téguments de leurs hôtes (Marchand, 1994). Ils vivent sur les parties externes de l'hôte comme la peau ou les cavités ouvertes sur l'extérieur (cavités branchiale et buccale) (Combes, 2001) ;
- Les mésoparasites vivant à l'intérieur de l'hôte (parasites intestinaux par exemple) et se nourrissant du contenu présent ou de la substance de l'hôte (Marchand, 1994) ;

- Les endoparasites vivant à l'intérieur des organes, tissus, espaces intracellulaires ou du système sanguin. Ils sont entièrement enfermés dans l'hôte et doivent obligatoirement percer une ou plusieurs parois pour sortir de l'hôte (Marchand, 1994).

Certains parasites nécessitent plusieurs hôtes pour assurer leur développement au cours de leur cycle de vie. Ils sont dits hétéroxènes. D'autres dépendent et se développent uniquement sur un seul hôte. Ceux-ci sont dits monoxènes (Marchand, 1994).

Les parasites peuvent être classés en fonction de l'écosystème dans lequel ils vivent, leur localisation sur leur hôte et leur cycle de vie. Les modes de vie parasitaire peuvent impliquer un seul (autogénique) ou plusieurs (allogénique) écosystèmes. Les parasites autogéniques complètent leurs cycles parasitaires au sein d'un seul écosystème, dans ce cas un écosystème aquatique. Les parasites allogéniques utilisent un ou plusieurs écosystèmes pour compléter leurs cycles de vie (aquatique puis terrestre) (Esch & Fernández, 1993). Les ectoparasites ont, en général, un cycle de vie direct, où le parasite requiert un seul hôte. Les autres stades du cycle de vie se déroulent sous forme de larve libre (Esch & Fernández, 1993). Les mésoparasites et endoparasites ont généralement un cycle de vie indirect, qui requiert deux ou plusieurs hôtes. Les hôtes intermédiaires sont en général des invertébrés ce qui implique une dépendance plus ou moins marquée vis à vis de ces hôtes. De plus, il peut y avoir plus d'un hôte intermédiaire dans le cycle parasitaire (Esch & Fernández, 1993). Les parasites se reproduisent de façon asexuée et/ou se développent dans l'hôte intermédiaire, cependant la maturité sexuelle est atteinte dans l'hôte définitif (Antonelli, 2010).

1.1.1 Ectoparasites

Les trois principaux groupes d'ectoparasites rencontrés dans cette étude sont les Monogènes, les Copépodes et les Myxozoaires.

Monogènes (*Platyhelminthes, Monogenea*) : La classe des Monogènes est composée de vers plats hermaphrodites rencontrés principalement sur les branchies et la surface externe des poissons. Ils sont rarement considérés comme une menace pour les poissons en conditions naturelles ; cependant, ils peuvent avoir de sérieux impacts sur l'état sanitaire des peuplements piscicoles en conditions d'aquaculture, présentant une forte concentration d'hôtes dans un espace restreint (Roberts & Janovy, 1996).

Les monogènes présentent généralement une symétrie bilatérale. Leur corps est incolore ou gris et peut être divisé en trois régions distinctes : la région céphalique antérieure au pharynx, le corps ou tronc et l'organe d'attachement postérieur ou opisthaptéur (Roberts & Janovy, 1996). Les œufs, les organes internes ou la nourriture ingérée peuvent colorer les monogènes. Leur taille varie généralement entre 1 et 10 mm de longueur, les formes marines étant en général plus grandes que les formes d'eau douce.

D'une façon générale, les monogènes ont un cycle de vie direct (aucun hôte intermédiaire impliqué) incluant les stades œuf, oncomiracidie et adulte. Quand l'oncomiracidie sort de l'œuf après éclosion, elle possède des cils permettant une nage active jusqu'à la rencontre avec l'hôte. Lors du contact avec l'hôte, elle s'attache à celui-ci, perd ses cellules ciliées et se développe jusqu'au stade adulte (Roberts & Janovy, 1996). Bien que ceci soit le cas pour la plupart des Monogènes, il y a quelques exceptions notamment dans le cas des Gyrodactylidae.

Copépodes (*Arthropoda, Copepoda*) : L'ordre des Copépodes comprend à la fois les formes libres et parasites. Les formes parasites sont connues pour infecter les poissons d'eaux douce, saumâtre et marine.

Les membres de la sous-classe parasite présentent des adaptations à ce mode de vie allant de la plus simple à la plus évoluée (Hoffman, 1999), comme une réduction de la taille

des appendices locomoteurs, une modification des appendices utilisés pour l'attachement à l'hôte, une réduction du nombre d'organes sensoriels, et le développement de nouvelles structures morphologiques. Un changement au niveau des proportions et de la segmentation du corps est aussi observé, les copépodes parasites présentant généralement des régions génitales et reproductrices plus développées, ainsi qu'une segmentation externe moins marquée. Pour finir, il a également été observé une réduction du nombre de stades libres, compensés par un développement accru de stades pré-éclosion ainsi que de stades larvaires parasites (Hoffman, 1999).

Généralement, le cycle de vie des copépodes parasites se déroule de façon indirecte. Une larve nauplius éclot d'un œuf, présente généralement trois paires d'appendices, et se transforme au fil de plusieurs mues avec l'ajout de somites et d'appendices. Les derniers stades de développement sont appelés metanauplii (Hoffman, 1999). La métamorphose des nauplii peut être graduelle, étalée sur plusieurs stades, ou très marquée entre un stade et l'autre. Au fil de ces multiples stades, la larve nauplius se transforme en adulte. Dans un cycle direct, un juvénile éclot de l'œuf, et non une larve nauplius. Les juvéniles se distinguent des larves par le fait qu'ils présentent une segmentation complète et des appendices. Cependant, les juvéniles sont sexuellement immatures et doivent se transformer en adultes avant de devenir reproducteurs (Hoffman, 1999).

Myxosporidies (Myxozoa, Myxosporea) : Les myxosporidies sont des Anthozoaires et possèdent des spores multicellulaires avec un nombre variable de cellules valvaires. L'ordre des Myxosporea contient des parasites de poissons, occasionnellement d'amphibiens et de reptiles, exceptionnellement d'annélides. Les espèces les plus primitives sont parasites de cavités. Les plus évoluées sont parasites de tissus. On les retrouve dans la peau, les muscles, les branchies, le cerveau, le foie et éventuellement d'autres organes.

Le cycle de développement de ces parasites est supposé direct, c'est-à-dire sans hôte intermédiaire. Les spores contiennent un sporoplasme renfermant le plus souvent deux noyaux. Ces derniers sont supposés être haploïdes et considérés comme des gamètes. Cependant, la reproduction sexuée n'a jamais été mise en évidence chez ces parasites. Lorsqu'une spore est ingérée par un hôte, ses cellules valvaires libèrent le sporoplasme. Celui-ci se divise plusieurs fois de suite pour donner un amas de cellules parmi lesquelles certaines formeront des cellules valvaires, d'autres des cellules polaires, d'autres enfin des sporoplasmes. De nouvelles spores se formeront ensuite par association de ces cellules (Marchand, 1994).

1.1.2 Mésoparasites

Les quatre principaux groupes de mésoparasites rencontrés dans cette étude sont les Digènes, les Cestodes, les Nématodes et les Acanthocéphales.

Digènes (Platyhelminthes, Digenea) : Les vers appartenant à la classe des Digènes sont généralement hermaphrodites. Les digènes parasitent toutes les classes de vertébrés, en particulier les poissons, et peuvent être présents dans quasiment tous les organes (Roberts & Janovy, 1996). Le plus souvent, les digènes ne portent pas ou presque pas atteinte à l'hôte (Hoffman, 1999).

Le corps du digène est aplati dorso-ventralement et de forme ovale. Il présente généralement une ventouse orale puissante entourant l'orifice buccal, ainsi qu'une ventouse ventrale ou acetabulum souvent présente au milieu de la face ventrale. Cependant, tous les digènes ne suivent pas cette organisation. On constate une grande variété au niveau de la taille, la forme, ainsi que la présence ou l'absence de nombreux organes, faisant de ces derniers des outils d'identification importants. Les digènes ont une taille variant du dixième de millimètre à plus de 5 centimètres de longueur. La présence et la localisation des ventouses sont une des

caractéristiques d'identification des digènes. Un digène monostome ne possède qu'une seule ventouse orale alors qu'un digène amphistome possède une ventouse orale ainsi qu'un acetabulum dans la partie postérieure du corps. Les digènes distomes possèdent une ventouse orale ainsi qu'un acetabulum localisé sur la surface ventrale (Roberts & Janovy, 1996). Les autres critères d'identification majeurs sont la forme et l'orientation des caeca, de la vésicule excrétrice, des ovaires, des testicules, et des glandes vitellogènes (Schell, 1970). L'orientation du gonopore et de la poche du cirre est également un critère très important pour l'identification des digènes (Schell, 1970).

Le cycle de vie des digènes passe par au moins deux hôtes distincts ; un hôte intermédiaire et un hôte définitif (Roberts & Janovy, 1996). Généralement, le cycle de vie d'un digène passe par une miracidie ciliée, larve aquatique libre qui, après éclosion, pénètre dans le premier hôte intermédiaire, en général un mollusque. À ce stade, la larve perd son épithélium cilié et se métamorphose en sporocyste, une sorte de sac à l'intérieur duquel des embryons se développent de façon asexuée pour devenir des rédies (Roberts & Janovy, 1996). Les larves rédies présentent une différenciation plus marquée que le stade sporocyste, avec à la fois un pharynx et une ébauche digestive. Au sein de la rédie, des embryons additionnels se développent, appelés cercaires. Le stade cercaire émerge de l'hôte intermédiaire, et présente souvent une queue pour faciliter la nage (Roberts & Janovy, 1996). Bien que les cercaires soient considérés comme des juvéniles, plusieurs espèces requièrent encore un stade métacercaire avant de pouvoir infester l'hôte définitif, le stade métacercaire étant généralement enkysté. L'hôte définitif est infesté quand il ingère un hôte intermédiaire présentant des métacercaires (Roberts & Janovy, 1996).

Cestodes (Platyhelminthes, Cestoidea) : Les ténias de la classe des Cestodes sont retrouvés dans toutes les classes de vertébrés généralement dans l'intestin ou les diverticules

digestifs (Schmidt, 1970). Ils sont communément présents dans les populations de poissons sauvages et plus rarement dans les poissons d'aquaculture (Roberts & Janovy, 1996).

L'organisation structurelle des ténias consiste en trois régions distinctes : le scolex, le cou et le strobile. Le scolex correspond à la tête ou à l'organe d'adhésion du cestode et est localisé à la partie antérieure terminale du corps. Sa fonction est de maintenir la position du ver dans le tube digestif de l'hôte (Roberts & Janovy, 1996). Le scolex peut présenter des ventouses, des sillons, des crochets, des épines, des glandes, des tentacules, ou une combinaison de ces structures. Bien que la plupart des cestodes possèdent un scolex, certains perdent ce scolex au début de leur vie. Pour ces espèces, la partie antérieure terminale du corps devient alors un pseudoscolex fonctionnel remplaçant le scolex perdu (Roberts & Janovy, 1996).

On dénombre trois principaux organes de type ventouse présents sur le scolex des cestodes : les acetabula, les phyllidia, et les bothria. Les acetabula sont souvent présents sous forme de quatre ventouses uniformément réparties autour du scolex. Ces ventouses sont généralement en forme de coupe, ou approximativement circulaires et bordées par une puissante cloison musculaire (Roberts & Janovy, 1996). Les phyllidia sont également organisées par groupes de quatre. Ce sont des extensions musculaires du scolex pouvant présenter des bords très mobiles en forme de feuille. Pour finir, quand elles sont présentes, on observe souvent de deux à six bothria sur le scolex. Ce sont des dépressions légères ou de longs sillons qui sont arrangés en paires dorso-ventrales ou latérales (Roberts & Janovy, 1996). En plus de ces principaux types de ventouses, des ventouses accessoires peuvent également être présentes. Des crochets peuvent aider à l'ancrage du ver. Quand ils sont présents, les crochets sont généralement organisés sur un rostre (une zone protractile en forme de dôme à l'apex du scolex). La présence, l'absence, la forme et l'organisation des crochets sont des outils taxonomiques importants (Roberts & Janovy, 1996).

Le scolex contient également des ganglions nerveux cérébroïdes (Roberts & Janovy, 1996).

Un cou est communément observé entre le scolex et le strobile. C'est une zone relativement indifférenciée pouvant être longue ou courte. Le cou contient des cellules souches, responsables de l'apparition de nouveaux proglottis. Si aucun cou n'est présent, des cellules similaires sont retrouvées dans la partie antérieure du scolex (Roberts & Janovy, 1996).

Le strobile correspond à une succession linéaire d'organes reproducteurs, pour les deux sexes, contenus dans les proglottis (Roberts & Janovy, 1996) ; un proglottis étant un segment contenant les gonades (Hoffman, 1999). La strobilisation, ou production de nouveaux proglottis, est effectuée près de l'extrémité antérieure du ver. Pendant que de nouveaux proglottis sont produits, les plus anciens évoluent vers la partie postérieure du ver et deviennent sexuellement matures. Les proglottis les plus près de l'extrémité postérieure se sont déjà accouplés entre eux, avec d'autres proglottis du même strobile ou ceux d'autres vers, et ont produit des œufs (Roberts & Janovy, 1996). Les proglottis contenant des œufs totalement développés ou des embryons formés sont considérés gravides. Bien que dépendant du ver, un proglottis gravide se détache quand il atteint la fin du strobile, et passe dans les fèces, ou dégénère et libère les œufs (Roberts & Janovy, 1996).

En général, les cestodes ont un cycle de vie indirect qui inclut à la fois des hôtes intermédiaire et définitif. Les cestodes matures peuvent vivre de quelques jours à plus de dix ans, et produire des millions d'œufs durant cette période. Les cestodes passent par plusieurs formes larvaires, mais n'atteignent la maturité sexuelle que dans leur hôte final (Schmidt, 1970). Les hôtes intermédiaires peuvent être des invertébrés ou des vertébrés, mais font obligatoirement partie du régime alimentaire de l'hôte définitif. Les crustacés, les acariens, les

annélides et les mollusques sont les types d'hôtes intermédiaires les plus courants (Schmidt, 1970).

Nématodes (*Nematoidea, Nematoda*) : Les nématodes constituent un embranchement de vers non segmentés. Le nombre de nématodes est considérable. Il y en aurait au moins 100 000 espèces parasites d'animaux. Il y a des formes libres dans l'eau et le sol et des formes parasites de plantes et d'animaux. Les nématodes sont généralement de petite taille. Ils atteignent au maximum quelques dizaines de centimètres. La plupart sont microscopiques. Leur corps est cylindrique et effilé à ses deux extrémités. Ils possèdent un tube digestif complet avec bouche et anus. La cavité générale est un pseudocœlome. Les nématodes parasites de vertébrés ou d'invertébrés vivent en général dans les cavités (intestin, estomac), dans les vaisseaux sanguins ou dans les tissus.

En raison de la multitude de nématodes, il existe de nombreux types différents de cycles de développement ; mais les premières étapes sont sensiblement identiques chez tous les nématodes et aboutissent à la formation d'une larve contenue dans un œuf. Les œufs sont en général évacués avec les selles et se développent en formant une larve infestante. Lorsqu'ils sont ingérés, ils éclosent et deviennent adultes. Ils s'accouplent, puis, très rapidement les femelles commencent à pondre et le cycle peut recommencer.

Le stade infestant est un œuf ou larve. C'est un terme de passage entre la vie libre et la vie parasite. Cet organisme ne se nourrit ni ne s'accroît. La pénétration de la larve dans son hôte peut se faire directement (cycle monoxène), ou par l'intermédiaire d'un vecteur constitué par un hôte intermédiaire arthropode (cycle hétéroxène) (Marchand, 1994).

Acanthocéphales (*Procoelomata, Acanthocephala*) Les membres du phylum Acanthocephala infestent principalement les poissons, les oiseaux et les mammifères. Ils sont

présents à la fois chez des hôtes aquatiques et chez des hôtes terrestres. Les vers adultes sont retrouvés dans le tube digestif de l'hôte définitif (Arai, 1989).

Les acanthocéphales présentent une symétrie bilatérale, sont fuselés, cylindriques (ou légèrement aplatis) et creux. Leur critère d'identification principal est un proboscis invaginable présent à l'extrémité antérieure (Arai, 1989). Le proboscis est armé de rangées de crochets incurvés postérieurement et utilisés pour l'ancrage du ver. Le nombre, la forme et l'arrangement des crochets est très important pour l'identification des membres de ce phylum (Arai, 1989). Le proboscis, utilisé par le ver pour s'ancrer dans la paroi intestinale de l'hôte, peut infliger de sérieux dommages à celle-ci. Comme le ver change d'emplacement dans l'intestin en rétractant puis en réinsérant le proboscis dans le nouvel emplacement, et étant donné que de nombreux acanthocéphales peuvent infester un même hôte, ceci peut causer de sérieuses lésions intestinales.

Les acanthocéphales sont dioïques, et au moins deux vers de sexe opposé sont requis pour chaque hôte afin d'obtenir une communauté reproductrice viable. Les acanthocéphales présentent un dimorphisme sexuel, la femelle étant la plus imposante des deux (Arai, 1989). La femelle produit des œufs avec des embryons qui sont partiellement développés (acanthors), et libérés dans la lumière intestinale de l'hôte. Ils complètent leur développement embryonnaire au sein de l'œuf tout en étant évacués de l'hôte. Le premier hôte intermédiaire est toujours un arthropode, généralement un insecte, un copépode, un ostracode, un amphipode ou un isopode. Cet hôte intermédiaire est requis pour l'éclosion et le développement de la larve. (Arai, 1989).

I.2 LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ET LE PARASITISME

I.2.1 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission a élargi le champ de recherche en parasitologie en apportant des informations fondamentales sur la structure et les fonctions de nombreux organes clés des helminthes par exemple. Une des plus importantes est la prise en compte de la surface du corps en tant que site principal d'interaction moléculaire avec l'hôte (Halton, 2004).

Avant l'apparition du microscope électronique à transmission, la surface externe des vers plats parasites était considérée comme une cuticule ; la plupart des chercheurs du domaine évoquant une couche élastique de scléroprotéines sécrétées par les cellules sous-jacentes (mésenchyme) (Hyman, 1951). De cette interprétation découlait le concept d'un « blindage » parasite, largement accepté par les parasitologues et permettant d'expliquer la capacité évidente de ces vers à survivre dans un environnement hostile, tel que le tube digestif de l'hôte. La cuticule était alors considérée comme une exceptionnelle protection contre les attaques acides provoquées par la digestion de l'hôte (Halton, 2004).

L'étude qui a remis en cause cette notion de cuticule couvrant le corps des vers plats parasites a été menée par Rothman (1959). Il a démontré que la cuticule du cestode *Hymenolepis diminuta* était capable de réduire le sel de tetrazolium et que sa matrice contenait des populations de mitochondries. Rothman a fourni des preuves suffisantes pour justifier de renommer la cuticule de *H. diminuta* en tégument, terme qui définit encore de nos jours la couche externe des vers plats parasites. Le terme tégument enlève toute connotation de couche inerte, mais distingue également la structure considérée de l'épiderme des vers plats libres, moins complexe. Cette découverte a été développée et exposée par Threadgold (1963) dans deux articles concernant l'ultrastructure des téguments d'un ténia, *Dipylidium caninum*, et de la douve du foie, *Fasciola hepatica*. Son travail a révélé que le tégument avait

une organisation syncytiale unique en cela qu'il est constitué d'une surface anucléée connectée à intervalles irréguliers, via des trabécules ou tubes cytoplasmiques, à une région interne nucléée ou corps cellulaire tégumentaire (Figure I.1) (Halton, 2004).

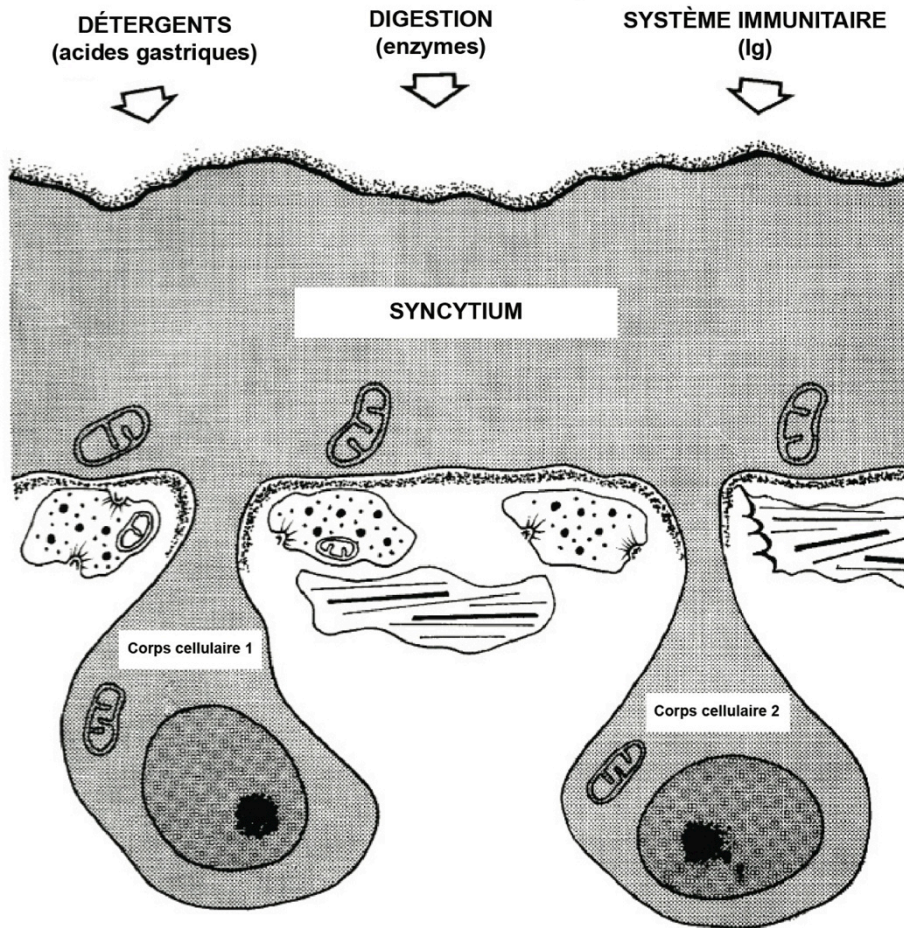


Figure I.1 Schéma général du tégument d'un parasite. D'après Halton (2004).

Le tégument syncytial est présent chez tous les trématodes et cestodes mais des différences ultrastructurales considérables sont observées entre les groupes taxonomiques et entre les espèces. Dans tous les cas, le tégument est bordé par des membranes plasmiques des côtés externe et interne, et couvre la totalité de la surface du corps y compris celle du tube digestif antérieur chez les trématodes. Son caractère syncytial confère aux vers parasites de nombreux avantages (Halton, 2004).

Ainsi, l'absence de limites cellulaires du syncytium lui permet d'être moins vulnérable aux attaques des enzymes digestives, des sucs biliaires ou du système immunitaire de l'hôte, que peut l'être une couche de cellules épithéliales avec des jonctions intercellulaires (Figure I.2) (Halton, 2004).

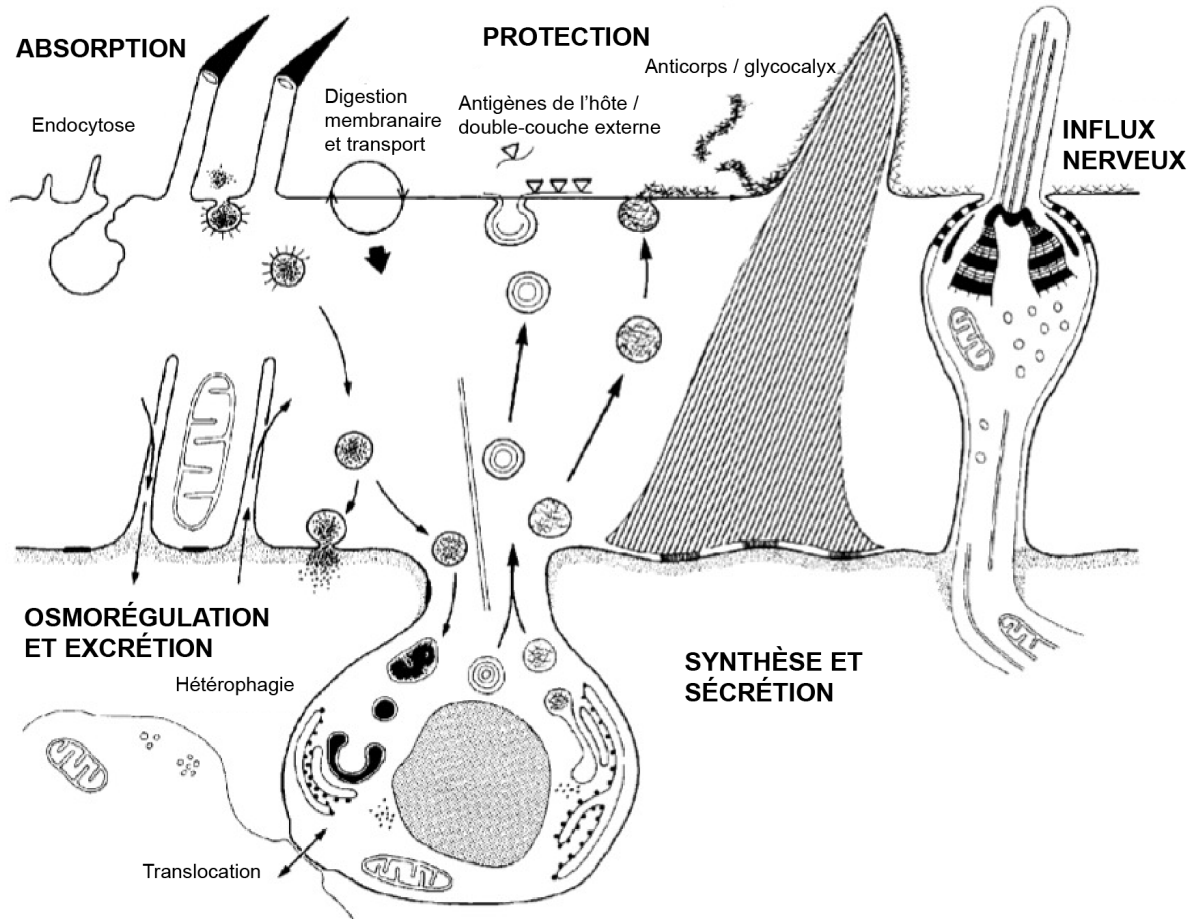


Figure I.2 Schéma résumant les principales fonctions du tégument d'un parasite. D'après Halton (2004).

Par ailleurs, cela implique un transport latéral sans restriction aucune permettant une coopération métabolique. Notons également qu'étant donné que les régions nucléées du tégument sont enfouies sous la couche musculaire, ces dernières sont donc relativement éloignées des attaques de l'hôte. Le contrôle de la différenciation et du bon fonctionnement du tégument est donc moins vulnérable aux sécrétions de l'hôte. Enfin, la séparation entre une région nucléée et l'autre, bien que reliées à la même masse cytoplasmique, permet une spécialisation du tégument propre à chaque région. Cela signifie également que les nouvelles

cellules tégumentaires présentant une information génétique récente peuvent se joindre au système et remplacer les cellules vieillissantes (Halton, 2004).

Aussi compliquée que puisse paraître la structure du tégument, les avancées les plus récentes en microscopie électronique révèlent que la surface de la membrane plasmique tégumentaire est une véritable frontière entre le ver parasite et son hôte. La confirmation de cette hypothèse a révolutionné la compréhension des relations symbiotiques chez les Plathelminthes et a élevé l'interface hôte-parasite au niveau de concept. La surface du parasite est devenue une entité vivante, pouvant répondre de façon dynamique aux changements de conditions environnementales ; la protection envers les potentiels dangers étant plus subtile qu'il n'y paraît car elle implique des processus biochimiques en lieu et place d'une simple exclusion physique (Halton, 2004). Pour finir, cette découverte a permis d'imaginer la possibilité d'un flux de molécules et d'information réciproque entre l'hôte et le parasite, là où les scientifiques ne voyaient qu'une relation unilatérale (de l'hôte vers le parasite). En passant du terme de « cuticule » à celui de « tégument », Rothman et les chercheurs qui l'ont suivi ont lancé un challenge, celui de révéler l'essence même du parasitisme : l'interaction moléculaire entre deux organismes hétérospécifiques (Halton, 2004).

Il n'est pas surprenant que le tégument possède une multitude de fonctions, étant donné qu'il est le siège d'échanges considérables avec l'hôte (Figure I.2). Les observations ultrastructurales du tégument confirment le fait qu'il est doué de quatre fonctions principales :

- L'absorption de matériel exogène, incluant les nutriments, à travers une digestion et un transport membranaire ou par endocytose ;
- La synthèse et la sécrétion de matériel endogène, incluant des composants de la membrane plasmique et du glycocalyx ; la sécrétion et le turnover de ces deux structures ayant un rôle dans la protection contre le système immunitaire de l'hôte ;

- L'osmorégulation et l'excrétion via l'utilisation de pompes ioniques et Na^+/K^+ ATPases, localisées à la surface du tégument et dans les membranes plasmiques basales, établissant un gradient constant pour l'eau et les ions ;
- La réception sensorielle dans la mesure où le tégument porte de nombreux organes supposés sensoriels et connectant le tégument avec le système nerveux du ver parasite (Halton, 2004).

1.2.2 Microscopie électronique à balayage

Depuis les années 1970, la microscopie électronique à balayage a été utilisée de façon intensive comme outil d'investigation dans les études taxonomiques ou structurales. La résolution et le grossissement croissants, allant bien au delà de ceux du microscope photonique, ont permis de détecter des détails de surface, souvent étonnants, et ont également amélioré les connaissances sur les relations hôte-parasite, notamment au niveau des mécanismes d'attache (Halton, 2004).

L'avantage fourni par le microscope électronique à balayage en taxonomie est évident au regard des nombreuses images d'helminthes utilisés dans les clés et guides d'identification. Le pouvoir de séparation élevé du microscope électronique à balayage par rapport au microscope photonique a permis de s'affranchir des contraintes liées au nombre restreint de critères d'identification disponibles en optique et de révéler que les structures morphologiques sont particulièrement nombreuses chez les helminthes et à haute valeur ajoutée pour leur systématique. Ainsi, le microscope électronique à balayage a permis de mettre en exergue des variations inter- et intraspécifiques mais également des différences marquées entre zones d'une même surface tégumentaire (Halton, 2004).

Chez les vers plats, les études en microscopie électronique à balayage se sont concentrées par exemple sur les ouvertures vers l'extérieur des systèmes alimentaires, reproducteurs et excréteurs, la nature et la disposition des organes supposés sensoriels ou la

forme et la distribution des écailles chez les trématodes. La preuve du rôle joué par le tégument dans le traitement des données sensorielles et la transduction du signal vient des études en microscopie électronique à transmission, comme vu plus haut. Les organes sensoriels présumés ne sont pas seulement nombreux dans le tégument des formes larvaires et adultes des Plathelminthes mais chaque espèce examinée en présente différents types auxquels une variété de fonctions ont été attribuées. Les preuves expérimentales de la fonction sensorielle, que ce soit au niveau de la tangoréception, de la photoréception, de la rhéoréception ou de la chémoréception, sont rares étant donné la petite taille des récepteurs présumés rendant les études électrophysiologiques ou d'ablation techniquement difficiles. Cependant, les nombreuses données disponibles sur la structure des récepteurs sensoriels chez les helminthes permettent d'interpréter les réponses comportementales des parasites et fournissent donc, de manière indirecte, des preuves des fonctions sensorielles de ces structures (Halton, 2004). Chez les digènes, on retrouve de nombreuses structures sensorielles sous la forme de protubérances, en dôme ou sphériques, portant des cils ou des cils modifiés (sensilles), distribués sur tout le corps chez les deux sexes. Ces structures portent généralement un ou plusieurs cils (court, long ou rétracté) présentant chacun un axonème « 9 + 2 » et émergeant d'une protubérance basale. Les structures non-ciliées ressemblent à des papilles avec un large bulbe terminal, à de simples élévations tégumentaires en forme de dôme, ou à des structures en forme d'anneaux avec une dépression centrale. La microscopie électronique à transmission a révélé que ces structures sont en fait les terminaisons nerveuses des ramifications du système nerveux périphérique du parasite dans la surface tégumentaire (Halton, 2004).

De plus, en tant que parasites, les helminthes adultes nécessitent une adhésion efficace, ceci est particulièrement important chez les ectoparasites de poisson qui doivent éviter d'être détachés du corps de leur hôte par les mouvements d'eau. Concernant les

trématodes vivants en tant que parasites du tube digestif de vertébrés, ils sont en général plats et utilisent des ventouses afin de rester collés à la muqueuse de l'hôte (Halton, 2004).

I.3 BUT DE L'ÉTUDE ET OBJECTIFS

L'étude parasitaire concernant l'anguille d'Europe que nous avons menée a été réalisée dans deux lagunes côtières méditerranéennes de Corse : les lagunes de Biguglia et d'Urbino.

L'objectif premier de cette étude est de donner une représentation de la parasitofaune de l'anguille d'Europe dans ces deux lagunes. Pour cela, un inventaire des espèces parasites a été réalisé. Le second but est de décrire quantitativement et qualitativement les communautés de parasites recensées lors de ces travaux. Nous avons donc étudié les paramètres épidémiologiques ainsi que la diversité des différentes espèces de parasites. Le troisième but de cette étude est la caractérisation des diverses interactions entre les parasites, leur hôte et le milieu environnant. Ainsi, l'influence de la biométrie de l'hôte, notamment au niveau de l'état d'argenteure ou de la taille, a été prise en compte. Le rôle du milieu environnant sur la structure des communautés de parasites est également pris en compte par l'observation des variations parasitaires à travers les sites d'étude ou les saisons.

Cette étude parasitaire a permis la réalisation de trois publications (sous review), constituant les trois premiers chapitres de résultats :

- La première publication se concentre sur l'inventaire parasitaire effectué dans les deux lagunes tout en comparant les paramètres épidémiologiques et la diversité observés aux niveaux communautaire et infracommunautaires ;
- La seconde publication se concentre sur les variations des paramètres épidémiologiques observés dans les deux lagunes en fonction des saisons, de la taille ou de l'état d'argenteure de l'hôte ;

- La troisième publication enfin se concentre sur l'influence de ces critères biométriques (la taille ou l'état d'argenture) ou sur celle des critères abiotiques (le site d'étude ou la saison) dans la caractérisation d'espèces parasites bioindicatrices selon une méthode statistique particulière : l'analyse de l'espèce indicatrice.

Une étude du tégument en microscopie électronique a été menée sur les digènes parasites de l'anguille d'Europe récoltés au cours de l'étude parasitaire et a également permis la publication de trois articles (acceptés), constituant les trois chapitres de résultats suivants :

- La première publication concerne l'étude en microscopie électronique à balayage et à transmission du tégument de *Bucephalus anguillae* ;
- La seconde publication concerne l'étude en microscopie électronique à balayage et à transmission du tégument de *Lecithochirium musculus* ;
- La troisième publication concerne l'étude en microscopie électronique à balayage et à transmission du tégument de *Deropristis inflata*.

CHAPITRE II

HOTE, SITES D'ETUDE ET ESPECES PARASITES OBSERVEES

II.1 L'HOTE : L'ANGUILLE D'EUROPE *ANGUILLA ANGUILLA*

L'anguille d'Europe *Anguilla anguilla* possède un corps serpentiforme de section circulaire et très allongé, d'une longueur pouvant aller jusqu'à 150 cm, couvert d'une peau lisse et visqueuse, riche en cellules sécrétrices d'un mucus épais (Figure II.1). Le corps est recouvert de petites écailles ovoïdes incluses profondément dans la peau. Ces écailles se mettent en place tardivement. L'anguille peut peser jusqu'à 4 kgs pour les plus grosses femelles. Elle possède un petit œil rond (qui grossit au stade argenté) et une bouche terminale. La mâchoire inférieure est proéminente. L'anguille possède des nageoires pectorales de petite taille et des nageoires dorsale, anale et caudale très longues qui fusionnent au niveau de la queue. L'anguille d'Europe est présente du Sud du Maroc au Nord de l'Islande, de l'Ouest des Açores jusqu'à la mer Noire, au-delà de la Méditerranée de l'Est (Adam *et al.*, 2008).

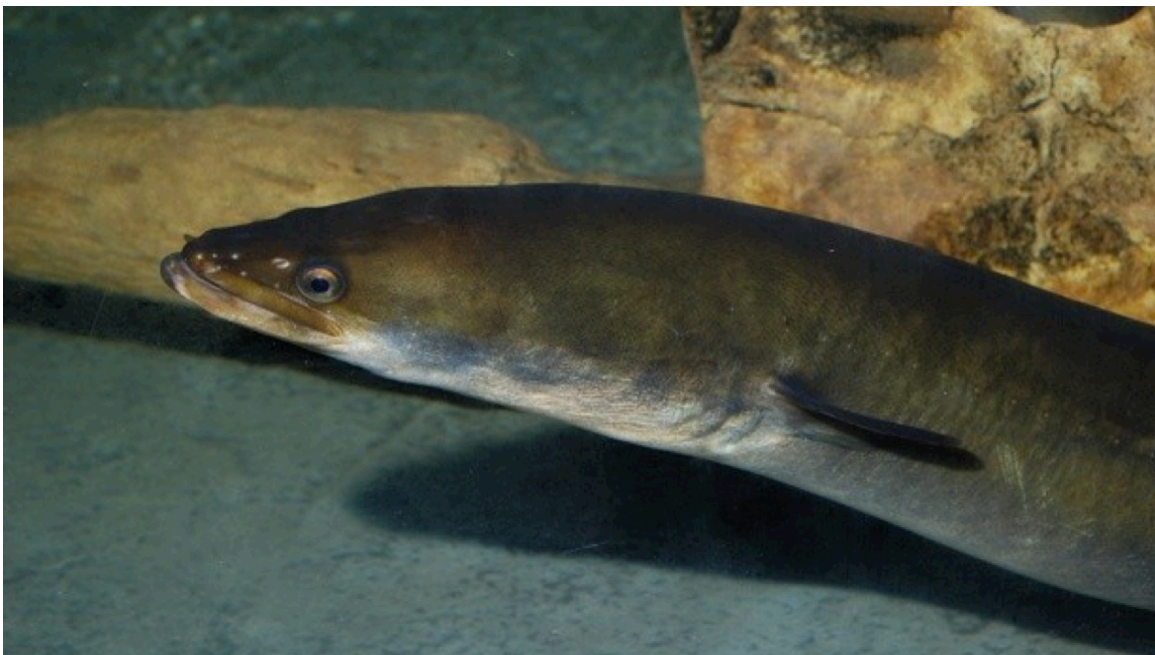


Figure II.1 L'anguille d'Europe *Anguilla anguilla* (Sloth, 2003).

L'anguille est une espèce amphihaline thalassotoque. Elle possède un cycle vital complexe caractérisé par de nombreuses zones d'ombre, notamment en milieu marin. La reproduction n'a jamais pu être observée en milieu naturel. De plus, aucun oeuf ou adulte n'a

jamais été capturé dans l'aire de frai présumée. Des hybridations entre l'anguille européenne (*A. anguilla*) et l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*) ou encore l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*) sont régulièrement constatées, rendant le statut taxonomique de l'espèce encore très imprécis. Cependant, les derniers travaux effectués sur la diversité génétique des anguilles européennes et américaines tendent à montrer une ségrégation bien établie entre les deux espèces atlantiques (Tesch, 1977; Feunteun, 2002).

L'anguille d'Europe est une espèce migratrice. La reproduction s'effectue à des profondeurs supérieures à 400 mètres (Fontaine *et al.*, 1985; Tsukamoto, 1992). À l'instar des autres Anguilliformes, l'anguille d'Europe débute son cycle de vie sous forme de larve leptocéphale. La reproduction est supposée prendre place quelque part dans la Mer des Sargasses, où les plus petites larves leptocéphales ont été retrouvées. Cependant, cette hypothèse n'a jamais été vérifiée car aucun adulte mature, aucun accouplement, ni aucun œuf n'a été observé dans l'océan. Après l'éclosion, les leptocéphales sont orientés vers l'Est par le Gulf Stream vers les côtes européennes et nord-africaines. Très peu de données sont disponibles concernant le stade leptocéphale et la durée de la migration transocéanique est sujette à controverse. Selon certains auteurs (Tesch, 1977; McCleave & Kleckner, 1987), elle dure approximativement trois ans. Mais des études récentes sur la microstructure des otolithes de civelles suggèrent que cette migration est achevée en moins d'un an (Lecomte-Finiger, 1994). À leur arrivée sur le plateau continental, les leptocéphales se métamorphosent en civelles qui vont coloniser les eaux côtières et intérieures, puis enfin en anguilles jaunes. Leur période de croissance durera de 3 à 8 ans pour les mâles et de 8 à 15 ans pour les femelles. Les anguilles représentent, en général, 50 % de la biomasse piscicole résidente dans la plupart des environnements aquatiques européens. De plus, elles participent de façon significative dans les chaînes alimentaires et contribuent au fonctionnement de nombreux hydrosystèmes continentaux et intérieurs. L'anguille est un poisson essentiellement nocturne qui reste enfoui

dans la vase ou caché sur le substrat durant la journée. Elle peut exercer une prédation hors de l'eau grâce au mucus qui protège son corps et l'étroitesse de l'orifice branchial. Lors de la phase de sédentarisation, l'anguille effectue des déplacements au sein d'un domaine vital estimé de un à plusieurs kilomètres carrés. Après cette période de croissance, une seconde métamorphose a lieu : les anguilles jaunes se changent en anguilles argentées et migrent vers l'océan Atlantique où s'effectue la maturation des gonades. Très peu de données sont disponibles sur cette seconde migration transocéanique car elle s'effectue en profondeur, ce qui rend la collecte de données chère et difficile à mettre en œuvre (Feunteun, 2002).

La plupart des spécialistes considèrent l'anguille européenne comme une espèce panmictique ou composée d'un petit nombre de populations très dispersées. Bien qu'il puisse exister un comportement de retour sur plusieurs zones de reproduction au sein de la Mer des Sargasses, les larves d'une portée donnée seront dispersées le long des côtes européennes par le Gulf Stream. Ainsi, un géniteur émigrant d'une rivière donnée en Europe contribue, théoriquement, à un recrutement ultérieur sur toute la zone de distribution continentale (Feunteun, 2002).

L'alimentation de l'anguille dépend de son stade mais son régime alimentaire est varié. En eau douce, ses proies sont principalement constituées de larves d'insectes, de crustacés et de poissons. Au cours de sa migration vers son aire de ponte, l'anguille ne s'alimente pas, elle utilise les réserves lipidiques qu'elle a accumulées au cours de sa vie (Adam *et al.*, 2008).

Depuis les années 80, un déclin général des stocks d'anguilles européennes *A. anguilla* et de leur recrutement a été observé sur l'ensemble de son aire de répartition. Ce déclin est supposé être causé par de nombreux facteurs naturels ou anthropiques tels que l'influence du changement climatique sur la modification du Gulf Stream ou de la dérive Nord-Atlantique, les obstacles à la migration, les agents pathogènes (notamment le Nématode *Anguillicoloides crassus*), la dégradation et la raréfaction des habitats, les polluants ou la surpêche des civelles.

L'anguille d'Europe est désormais considérée en danger critique d'extinction par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (Feunteun, 2002).

Au niveau européen, le règlement n°1100/2007 impose des mesures de connaissance, de protection et gestion restauratoire de l'anguille. Chaque pays doit ainsi mettre en place un plan de gestion visant à reconstituer la biomasse en géniteurs en agissant sur toutes les causes de régression de l'espèce (MEEDDAT *et al.*, 2007).

II.2 LES SITES ETUDIÉS

II.2.1 La lagune de Biguglia

Localisation : La lagune de Biguglia est la plus vaste de Corse. Elle est localisée à l'Est Nord-Est de l'île, plus précisément au Sud de Bastia (Figure II.2). De par sa superficie (14,5 km²), elle constitue la plus grande zone humide de l'île. Elle est séparée de la mer Tyrrhénienne par un simple cordon, le lido de la Marana. Ce cordon, fermant la lagune, a été formé par les alluvions rejetés par le Golo, dans la mer Tyrrhénienne, et ramenés par les courants marins. L'origine de la lagune de Biguglia est ainsi sédimentaire, contrairement à la lagune d'Urbino qui s'est formée sur un effondrement du substrat et a donc une origine tectonique. L'étang est long d'environ 10 km et atteint, à certains endroits, une largeur de 2,5 km. La profondeur maximale est de 1,8 mètres (Pasqualini *et al.*, 2006).

Caractéristiques hydrologiques : L'apport en eau douce est effectué par le bassin versant d'une superficie de 182 km². Le Bevinco constitue le plus important de ces apports. On peut y ajouter le canal du Fossone qui relie le Golo à l'étang, les ruisseaux La Mormorana, Rassignani, et Pietre Turchine, ainsi que tout un réseau de canaux, provenant de la rive Ouest de la plaine de la Marana, qui drainent l'eau et se jettent dans le canal de ceinture de l'étang. Ces canaux jouent un rôle important dans l'apport d'eau douce à la lagune.

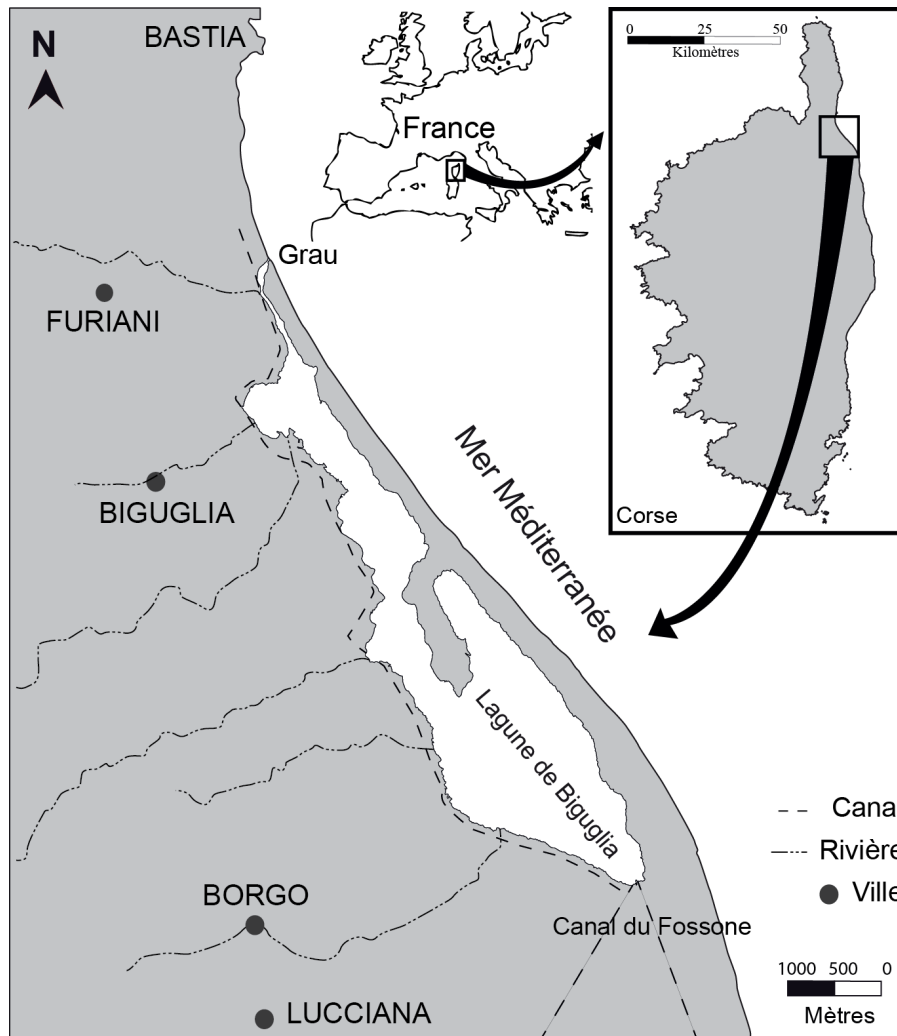


Figure II.2 Localisation de la lagune de Biguglia. D'après Garrido, 2012.

Les évènements pluvieux constituent également un apport d'eau douce pour la lagune. Les apports en eau salée sont effectués par le biais d'un grau naturel (embouchure située à l'extrémité d'un long et étroit chenal qui permet la communication avec la mer Tyrrhénienne au Nord), et créent un gradient de salinité, temporel et spatial, du Nord au Sud de l'étang (salinité de 4‰ au Sud et de 32‰ au Nord près du grau et jusqu'à 37‰ à l'intérieur de celui-ci). La salinité moyenne de l'étang sur l'année est comprise entre 5 et 18‰ (Garrido, 2012). L'eau de la lagune n'est ainsi, ni douce, ni salée, elle est dite saumâtre. Les apports en eau salée ont diminué par la réduction du nombre de graus au cours des dernières années (trois à l'origine) ainsi que par le curage récent du canal du Fossone ce qui a conduit à une désalinisation de la lagune. La gestion du grau pose quelques problèmes car il faut effectuer

une ouverture de celui-ci à la pelle mécanique pendant la période printanière. Cette ouverture est nécessaire à l'entrée des alevins dans la lagune et permet d'éviter l'eutrophisation de celle-ci. De par sa position géographique, cette lagune subit une pression anthropique importante (Orsoni *et al.*, 2001).

Cadre administratif et juridique : La lagune a été acquise par le département de la Haute-Corse en 1988. La réserve naturelle nationale de l'étang de Biguglia a été créée le 9 août 1994, par décret ministériel. Elle a permis de limiter la prolifération d'activités en périphérie de la lagune. Depuis, la compétence en matière d'environnement a été transférée à la Collectivité Territoriale de Corse (CTC) le 22 Janvier 2002, et la gestion de la réserve est désormais déléguée à la région. Cependant l'Etat dispose toujours de la compétence en matière de contrôles. La réserve naturelle comprend les 1450 hectares de l'étang ainsi que les 340 hectares de rives (Pergent-Martini *et al.*, 1997).

Outre le classement en réserve naturelle, l'étang de Biguglia présente d'autres statuts juridiques non moins importants. L'étang est classé Zone humide d'importance internationale, Zone d'Importance Communautaire pour les Oiseaux (ZICO) et Zone de protection du patrimoine Naturel d'Intérêt Ecologique, Floristique et Faunistique (ZNIEFF). L'îlot des pêcheurs situé au nord de l'étang abrite un fortin transformé en éco-musée avec terrasse panoramique pour l'accueil du public.

La pratique de la pêche professionnelle est autorisée (bail de pêche) en mode fixe à l'aide de barrages et de filets qui guident les poissons dans des nasses, et en mode mobile par le biais de filets trémails et de verveux déposés la nuit et remontés au petit matin.

II.2.2 La lagune d'Urbino

Localisation : La lagune est située sur la plaine orientale de la Corse, entre Aléria et Ghisonaccia, au Sud de l'embouchure du Tavignano (Figure II.3). Avec une superficie de 760 hectares et une profondeur maximale de 9,3 mètres, la lagune d'Urbino est la deuxième plus

grande et la plus profonde lagune de Corse. Elle est d'origine tectonique. Il s'agit d'une lagune préservée, incluse dans une zone très peu urbanisée, comprenant un ensemble de petites zones humides périphériques favorables à l'accueil de l'avifaune. De forme sensiblement circulaire, la lagune est séparée en deux par une importante presqu'île à l'Ouest : Isola Longa, et possède une île au Sud-Ouest. La lagune n'est séparée de la mer Tyrrhénienne que par un simple cordon sableux. Le bassin versant est d'environ 31 km². Les activités au niveau du bassin versant sont aujourd'hui peu importantes. L'urbanisation est peu importante et localisée essentiellement à environ 1,5 km en amont de l'étang (Pergent-Martini *et al.*, 1997).

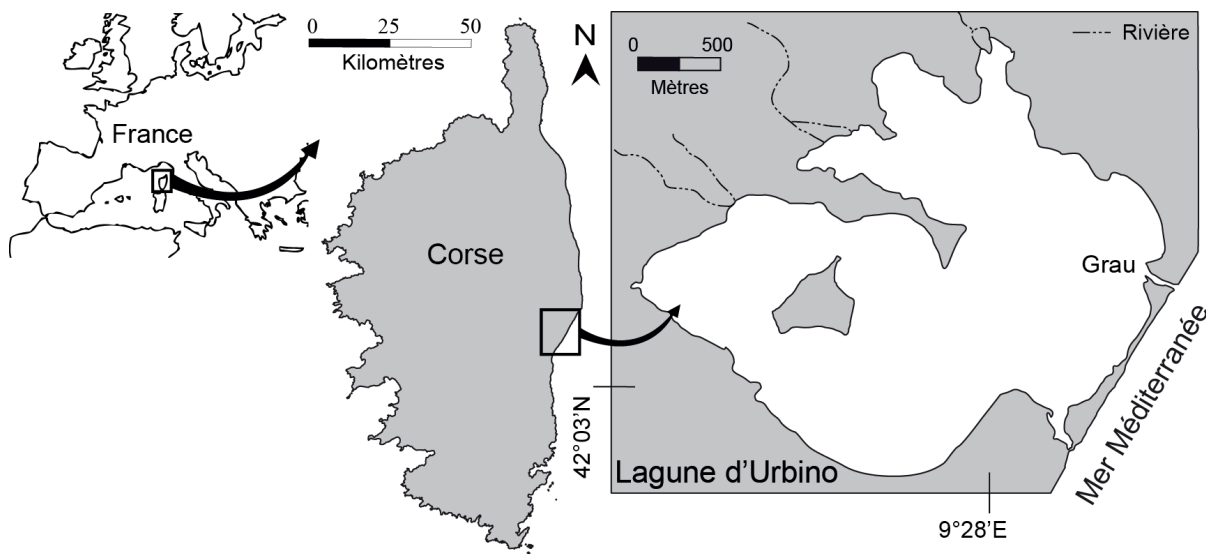


Figure II.3 Localisation de la lagune d'Urbino. D'après Garrido, 2012.

Caractéristiques hydrologiques : La communication avec la mer s'effectue par un grau régulièrement entretenu. Celui-ci, initialement situé au Sud du lido, a été aménagé au Nord afin de permettre à d'importants volumes d'eau de mer de pénétrer dans la lagune, garantissant une bonne oxygénation du plan d'eau, élément important pour l'exploitation conchylicole. L'étude hydrologique de la lagune a démontré que les échanges avec la mer sont prépondérants sous l'effet des variations météorologiques (jusqu'à 10% du volume total de la lagune). Les échanges dus aux marées astronomiques sont faibles. La lagune d'Urbino a

la particularité d'être alimentée à la fois par des ruisseaux qui s'y jettent du côté Nord-Ouest ainsi que par l'eau salée de la mer Tyrrhénienne. La lagune est euhaline avec une salinité moyenne sur l'année supérieure à 30‰. Ainsi, cette lagune est caractérisée par une faible alimentation en eau douce et un renouvellement très limité. Étant donné le faible taux de renouvellement de la lagune, les rejets de matière organique et de détergents par les caves de production vinicole alentours sont susceptibles d'avoir un impact sur la lagune, mais l'eutrophisation du plan d'eau reste limitée par la faible urbanisation périphérique (Pergent-Martini *et al.*, 1997).

Cadre administratif et juridique : Le département de Haute-Corse assure la gestion de la lagune dont les terrains sont la propriété du Conservatoire du littoral. Une convention a été signée en 2006 entre les deux partenaires. L'ostréiculture et la pêche traditionnelle cohabitent dans un relatif équilibre. La lagune est donc un site fréquenté et générateur d'activités pour la micro-région dont le maintien représente un facteur déterminant pour la gestion intégrée des zones côtières (Pergent-Martini *et al.*, 1997).

II.3 LES ESPÈCES PARASITES OBSERVÉES

II.3.1 Digènes

Bucephalus anguillae Špakulová, Macko, Berrilli & Dezfuli, 2002 est un trématode digène de la famille des Bucephalidae (Figure II.4). C'est un parasite spécifique de l'intestin de l'anguille d'Europe. Il est caractérisé par la présence, à son extrémité antérieure, d'un organe de fixation, le rhynchus muni de 7 tentacules rétractiles. Il a été longtemps confondu avec *Bucephalus polymorphus* parasitant les poissons d'eau douce (Di Cave *et al.*, 2001). Son cycle de vie hétéroxène est effectué en eau saumâtre à salée avec le mollusque *Abra tenuis* comme premier hôte intermédiaire et le poisson *Aphanius fasciatus* comme second hôte intermédiaire (Gargouri-Ben Abdallah & Maamouri, 2002).

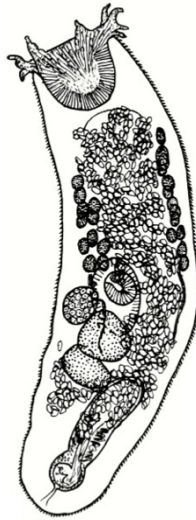


Figure II.4 Schéma de *Bucephalus anguillae*. D'après Špakulová *et al.*, 2002.

Deropristis inflata Molin, 1859 est un trématode digène de la famille des Deropristidae (Figure II.5). C'est un parasite spécifique de l'intestin de l'anguille d'Europe. Il est caractérisé par la présence d'un cou étiré latéralement portant de larges épines tégumentaires ainsi que des anneaux d'écailles autour de la ventouse orale. Il est présent dans des milieux de salinité variable. C'est un parasite hétéroxène et son hôte intermédiaire est le polychète *Nereis diversicolor* (Cable & Hunninen, 1942; Kanev *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2005).

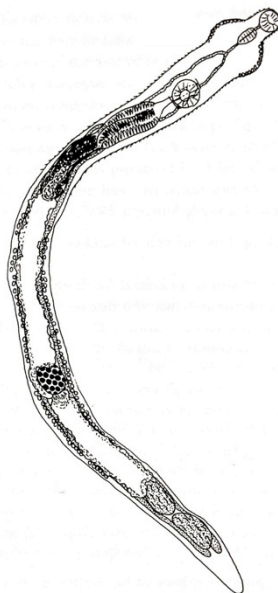


Figure II.5 Schéma de *Deropristis inflata*. D'après Jones *et al.*, 2005.

Lecithochirium musculus Looss, 1907 est un trématode digène de la famille des Hemiuridae (Figure II.6). Il parasite l'estomac de l'anguille d'Europe. Il est également parasite de nombreux poissons prédateurs et de gobiidés. Il est caractérisé par la présence d'un acetabulum ventral (large ventouse d'adhésion) ainsi que par un ecsoma (partie postérieure du corps évaginable). C'est un parasite hétéroxène (Gibson *et al.*, 2002; Vilas *et al.*, 2003).



Figure II.6 *Lecithochirium musculus*.

II.3.2 Monogènes

Pseudodactylogyrus anguillae Yin & Sproston, 1948 est un monogène de la famille des Pseudodactylogyridae (Figure II.7). C'est un parasite des branchies de l'anguille japonaise, mais il a été transféré sur l'anguille d'Europe. L'hypothèse la plus probable de son introduction est l'importation de jeunes anguilles japonaises parasitées vers l'Union Soviétique dans les années 1970. Il est caractérisé par la présence d'un opisthapter qu'il utilise pour s'arrimer de façon durable aux tissus des branchies. C'est une espèce holoxène invasive qui cause de sérieux problèmes en conditions d'aquaculture (Buchmann *et al.*, 1987).



Figure II.7 *Pseudodactylogyryus anguillae*.

Moins étudié qu'*A. crassus*, il peut cependant entraîner des troubles respiratoires graves, particulièrement lorsque les conditions du milieu se dégradent (hausse des températures en été et eutrophisation). Les deux espèces exotiques invasives *P. anguillae* et *P. bini* semblent être responsables de l'extinction du parasite natif et endémique *Gyrodactylus anguillae*. Ce phénomène a été répertorié en Italie dans le Tibre ainsi que dans la rivière Culm et les marais de Exminster en Angleterre (Kennedy *et al.*, 1998; Kennedy & Di Cave, 1998; Amilhat, 2007).

II.3.3 Cestodes

Bothriocephalus claviceps Goeze, 1782 est un cestode de la famille des Bothriocephalidae (Figure II.8). C'est un parasite spécifique de l'intestin de l'anguille d'Europe. C'est un parasite commun et assez répandu (Nie & Kennedy, 1992). Il est caractérisé par la présence d'un scolex portant des bothridies. C'est un parasite hétéroxène qui nécessite la présence d'un copépode Cyclopoïde comme unique hôte intermédiaire (Nie & Kennedy, 1992; Scholz *et al.*, 2004).

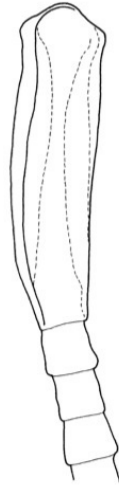


Figure II.8 Schéma du scolex de *Bothriocephalus claviceps*. D'après Scholz et al., 2004.

Proteocephalus macrocephalus Creplin, 1825 est un cestode de la famille des Proteocephalidae (Figure II.9). C'est un parasite spécifique de l'intestin de l'anguille d'Europe. Il est caractérisé par la présence d'un scolex portant quatre ventouses. C'est un parasite hétéroxène qui nécessite la présence d'un copépode Cyclopoïde comme unique hôte intermédiaire (Nie & Kennedy, 1991b; Scholz *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998; Skerikova *et al.*, 2001).

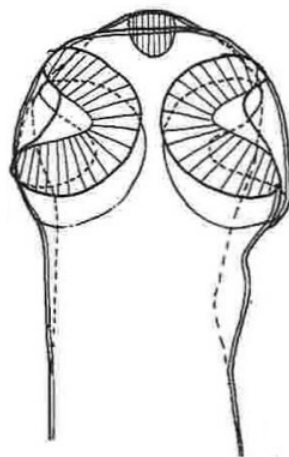


Figure II.9 Schéma du scolex de *Proteocephalus macrocephalus*. D'après Scholz *et al.*, 1998.

Myzophyllobothrium sp. (larve) Shipley & Hornell, 1906 est une larve de cestode de la famille des Phyllobothriidae. Ce type de larve est communément retrouvé chez les

copépodes, les cténaïres, les céphalopodes et les téléostéens (Dollfus, 1964). Il est caractérisé par la présence d'un scolex à quatre phyllidia. La larve présente également une tâche rouge caractéristique (Køie, 1988b). C'est un parasite hétéroxène qui utilise les copépodes comme hôtes intermédiaires obligatoires, alors que les autres invertébrés et les téléostéens (comme l'anguille d'Europe) sont probablement des hôtes de transport facilitant la transmission aux hôtes définitifs, les Elasmobranches (raies et requins) (Køie, 1988b; Marchand, 1994).

II.3.4 Nématodes

Anguillicoloides crassus Kuwahara, Niimi & Hagaki, 1974 est un nématode de la famille des Anguillicolidae (Figure II.10). C'est un parasite spécifique de la vessie natatoire de l'anguille d'Europe. C'est une espèce hétéroxène invasive qui utilise un copépode Cyclopoïde comme hôte intermédiaire (De Charleroy *et al.*, 1987). Il cause de sérieux problèmes de par son régime hématophage qui va affaiblir l'anguille, mais surtout par sa localisation à l'intérieur de celle-ci. En effet, les passages répétés des larves d'*A. crassus* vont fragiliser la paroi de la vessie natatoire de l'anguille. Cette vessie fragilisée risque alors d'empêcher l'anguille d'atteindre son lieu de ponte, à plus de 400 mètres de profondeur. L'hypothèse la plus probable de son introduction est l'importation d'anguilles japonaises parasitées vers une ferme aquacole d'Europe de l'Est dans les années 1980 (Feunteun, 2002; Palstra *et al.*, 2007; Jakob *et al.*, 2009b; Lefebvre *et al.*, 2012).



Figure II.10 *Anguillicoloides crassus* (femelle à gauche, mâle à droite) (Minchin, 2000).

Selon Amilhat (2007), on observe une explosion démographique d'*A. crassus* depuis son apparition en 1982 en Allemagne (Lefebvre *et al.*, 2003). Les populations Méditerranéennes d'*A. crassus* sont différenciées génétiquement des autres populations de l'Atlantique et semblent donc provenir d'un évènement d'introduction différent (Rahhou *et al.*, 2005). Ce parasite nématode s'est remarquablement adapté aux milieux aquatiques européens. Plusieurs caractéristiques lui permettent de maximiser l'efficacité de sa transmission et lui donnent un potentiel exceptionnel de colonisation.

Il utilise une grande diversité d'hôtes intermédiaires et paraténiques présents dans le spectre trophique de l'anguille (Blanc, 1998). Les hôtes paraténiques peuvent être des poissons d'espèces locales ou invasives (Cesco *et al.*, 2001), des mollusques, mais aussi des amphibiens (têtards, tritons) et insectes aquatiques (Moravec & Skorikova, 1998; Amilhat, 2007).

Il peut infester des anguilles de toutes tailles. Capable d'infester les anguilles de petites tailles (6 à 15 cm, dès qu'elles se nourrissent de zooplancton) en adaptant sa taille à la vessie de l'hôte (Banning & Haenen, 1990; Lefebvre *et al.*, 2002a; Amilhat, 2007).

Il possède un cycle rapide, 2 à 4 mois selon Benajiba *et al.* (1994), ce qui expliquerait le faible décalage entre les variations des pics planctoniques et l'augmentation des prévalences (3 à 4 mois plus tard). Cependant, un cycle de 6 mois est vraisemblable selon Lefebvre *et al.* (2002b), qui observent des pics d'*A. crassus* au début de l'été et à la fin de l'hiver (Amilhat, 2007).

Il a un fort potentiel reproducteur. Une femelle d'*A. crassus* peut pondre jusqu'à 150 000 œufs (Vigier, 1997; Amilhat, 2007).

Toujours selon Amilhat (2007), en laboratoire, il est capable de survivre et de se transmettre dans le milieu marin (50% et 100% eau de mer) pendant 6 mois. Il pourrait donc survivre pendant la migration transatlantique (Kennedy & Fitch, 1990; Kirk *et al.*, 2002).

L'adaptation du parasite à son hôte euryhalin est matérialisée par l'osmoconformation avec le plasma de son hôte (Kirk *et al.*, 2002). *A. crassus* survit à une large gamme de salinité (Kirk *et al.*, 2002; Maïllo *et al.*, 2005). Benajiba *et al.* (1994) montrent que les variations de salinité et température au long de l'année dans le milieu naturel (étang de Mauguio) ne semblent pas affecter le déroulement du cycle de *A. crassus*.

***Contracaecum* sp. (larve enkystée)** Raillet & Henry, 1912 est une larve de nématode de la famille des Anisakidae (Figure II.11). La larve a été observée enkystée dans la cavité générale de l'anguille d'Europe, et attachée à l'intestin. L'anguille n'est qu'un hôte intermédiaire voire paraténique. Elle acquiert le parasite en ingérant un hôte intermédiaire invertébré. Les nématodes adultes du genre *Contracaecum* sont parasites du tube digestif d'oiseaux ayant des poissons dans leur régime alimentaire (comme le grand cormoran *Phalacrocorax carbo*) ou de mammifères marins (Køie, 1988b; Moravec, 1994).

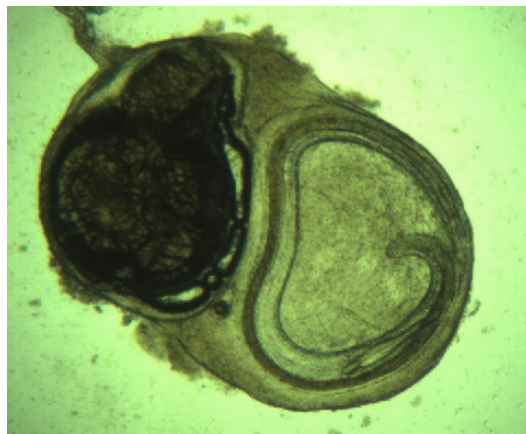


Figure II.11 Kyste contenant une larve de *Contracaecum* sp.

Goezia anguillae Lèbre & Petter, 1983 est un nématode de la famille des Anisakidae (Figure II.12). C'est un parasite spécifique de l'estomac de l'anguille d'Europe. Le cycle de développement de *G. anguillae* n'a pas été encore étudié. Il est caractérisé par un corps robuste et recouvert d'anneaux transversaux. Cependant, il est nécessaire de mentionner que la validité de l'espèce *G. anguillae* est incertaine et que l'espèce *Goezia ascaroides* Goeze, 1782 (parasite du poisson-chat) est peut être plus répandue (Moravec, 1994).

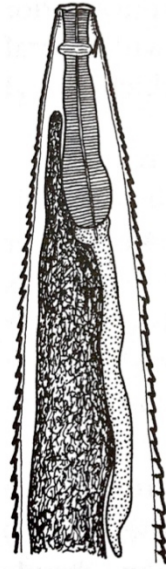


Figure II.12 Schéma de la partie terminale antérieure de *Goezia anguillae*. D'après Moravec, 1994.

II.3.5 Acanthocéphales

Acanthocephaloides incrassatus Molin, 1858 est un acanthocéphale de la famille des Arhythmacanthidae (Figure II.13). C'est un parasite de l'intestin de nombreux téléostéens. Il est caractérisé par une paroi fine et transparente. Le proboscis est court et la taille des crochets présents est décroissante de la pointe vers la base (Petrochenko, 1956).

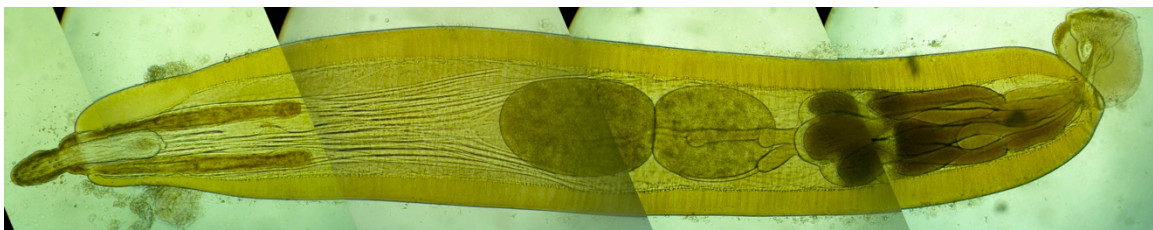


Figure II.13 *Acanthocephaloides incrassatus*.

II.3.6 Copépodes

Ergasilus gibbus von Nordmann, 1832 est un copépode Cyclopoïde de la famille des Ergasilidae (Figure II.14). C'est un parasite spécifique des branchies de l'anguille d'Europe. Il est caractéristique des milieux présentant une faible salinité et une température élevée (Ternengo *et al.*, 2005).

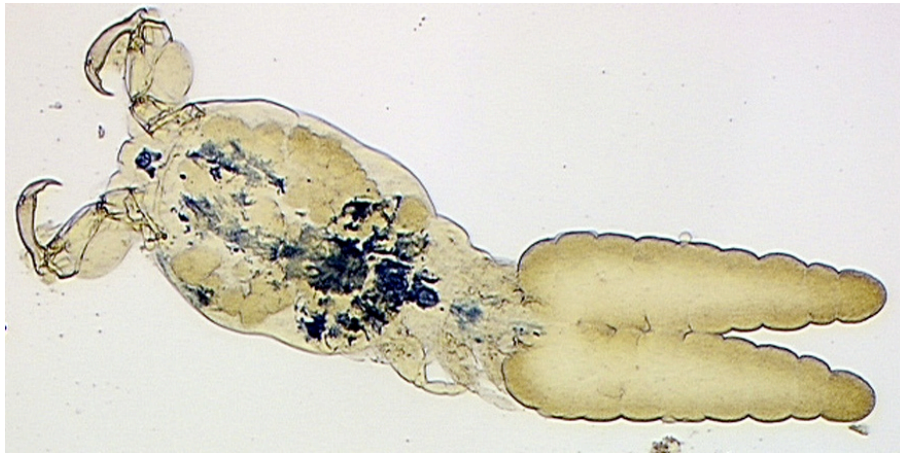


Figure II.14 *Ergasilus* sp.

II.3.7 Myxozoaires

Myxobolus portucalensis Saraiva & Molnár, 1990 est une myxosporidie de la famille des Myxobolidae (Figure II.15). C'est un parasite des tissus branchiaux ou cutanés de l'anguille d'Europe. Il utilise l'oligochète *Tubifex tubifex* Müller, 1774 comme hôte intermédiaire. Au cours de cette étude, il a été impossible de dénombrer le nombre d'individus de cette espèce car il se regroupent par milliers sous forme de kystes blanchâtres très fragiles (El-Mansy *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2005).

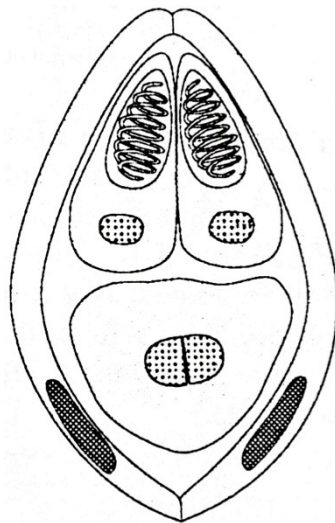


Figure II.15 Schéma d'une myxosporidie du genre *Myxobolus*. D'après Marchand, 1994.

CHAPITRE VI

**TOPOGRAPHY AND ULTRASTRUCTURE OF THE
TEGUMENT OF *BUCEPHALUS ANGUILLAE*
(DIGENEA: BUCEPHALIDAE), A PARASITE OF
THE EUROPEAN EEL *ANGUILLA ANGUILLA*
(OSTEICHTHYEN: ANGUILLIDAE)**

Jean-José Filippi, Yann Quilichini, Joséphine Foata et Bernard Marchand

Ce chapitre fait l'objet d'un article paru dans la revue *The Journal of Parasitology* (IF=1.41).

DOI: 10.1645/GE-2498.1

VI.1 INTRODUCTION

The present study deals with the ultrastructural description of the tegument of *Bucephalus anguillae* Špakulová, Macko, Berrilli & Dezfuli, 2002 (Digenea: Bucephalidae), a trematode that parasitizes the digestive tract of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyen: Anguillidae). In digeneans, the tegument is considered to be the major host-parasite interface (Threadgold, 1984). It is variously involved in osmoregulation and excretion processes, in the adsorption of nutrients, and in protection against the effects of host enzymes and immune systems (Burton, 1966; Lumsden, 1975; Threadgold, 1984; Paperna & Dzikowski, 2006). The tegument has a syncytial organization with a distal cytoplasm lying over cytons (=cell bodies) (Hockley & McLaren, 1973; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984). The 2 layers are separated by a basal matrix and an interstitial matrix which compose the extracellular matrix (Conn, 1993). Tegumental secretions are also known to participate in digestion and suggested to be involved in the defense against immune reactions of the hosts (Lumsden, 1975). Spines and sensory receptors structures are variable in shape, size, terminology and general organization (Bennett, 1975b; Abdul-Salam & Sreelatha, 1992; Mata-López & Leon-Regagnon, 2006). However, spine and sensory receptor structure are not clear, or consistent within the group. Tegumental studies on Digenea have primarily focused on cercaria or metacercaria stages (Fujino *et al.*, 1979a; Matthews & Matthews, 1988b; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004), while several others have emphasized the description of the tegumental structures of adult digenean (Ferrer *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2003; Žd'árská & Nebesářová, 2004). Among the Bucephalidae, cercaria or metacercaria stages of *Bucephalus haimeanus* (Higgins, 1979, 1980), *Bucephaloides gracilescens* (Podvyaznaya & Galaktionov, 2004), *Prosorhynchoides borealis* (Podvyaznaya & Galaktionov, 2008), *Prosorhynchoides gracilescens*, and *Prosorhyncus squamatus* (Podvyaznaya *et al.*, 2004) were studied using electron microscopy. Adults of *Bucephalopsis*

karvei (Pandey & Tewari, 1984) were examined using scanning electron microscopy (SEM). SEM micrographs of *B. anguillae* (Špakulová *et al.*, 2002) and *Bucephalus sextentaculatus* (Whittington & Cribb, 2001) have also been published, but a complete electron microscope investigation was not made. To our knowledge, only 2 adult digenans, *Bucephaloides gracilescens* (Halton & Johnston, 1982b) and *Prosorynchoides arcuatus* (Cohen *et al.*, 1995, 1996), have been studied using both SEM and transmission electron microscopy (TEM).

In the present study, an investigation using SEM and TEM was made on the tegument of numerous specimens of *B. anguillae*. Special consideration was given to the morphology and positioning of sensory receptors and spines.

VI.2 MATERIALS AND METHODS

VI.2.1 Specimen collection

Adult specimens of *B. anguillae* were collected alive from the intestine of 28 eels (*A. anguilla*) obtained from the fishermen of the Urbino lagoon, Corsica, France (42°03'N, 9°28'E) between February and March 2009. The fish were brought alive to the laboratory, anaesthetised in a 10% eugenol solution, killed and dissected the day of the capture. After dissection of the fish intestine, helminths were collected alive with a Pasteur pipette and kept active in a physiological saline solution (0.7% NaCl).

VI.2.2 SEM

Twenty adult flukes were fixed for at least 1 hour in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 and rinsed overnight in the same buffer. Specimens were then dehydrated in a graded acetone series and dried using CO₂ in an Emitech K850 critical point dryer. After mounting, specimens were coated with gold/palladium in a Quorum Technologies SC7640 sputter coater and examined under a Hitachi S-3400N scanning electron microscope at acceleration voltages between 3 and 20 kV.

We chose to define 3 parts of the fluke body. The anterior part extends from the rhynchus to the mouth. The median part is the portion between the mouth and the genital pore. The posterior part extends from the genital pore to the excretory pore. For characterization of average cilia length, 5 specimens were examined. For each one, 20 cilia lengths were measured on the anterior part of body and 20 on its posterior part. Mean cilia length and standard deviation were determined for each specimen and for the whole sample.

VI.2.3 TEM

Transverse sections were made in both anterior and posterior parts of *B. anguillae*. Anterior sections were made in the oral sucker region. Posterior ones were made between the genital and excretory pores. Thus, 5 anterior and 5 posterior parts of *B. anguillae* were fixed for at least 1 hour in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, post-fixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hr, dehydrated in ethanol and propylene oxide, embedded in Spurr (Spurr, 1969) and then polymerized at 60°C for 24 hours. Ultrathin sections (60 nm in thickness) were obtained using an RMC Boeckeler Power Tome PC ultramicrotome, placed on 300-mesh copper grids, and double stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963). The sections were examined using a Hitachi H600 transmission electron microscope at an acceleration voltage of 75 kV.

VI.3 RESULTS

VI.3.1 SEM

Anterior part : The fluke was characterized by the presence of a rhynchus (Figure VI.1A). This structure was constituted by seven fully developed tentacles (Figures VI.1A, B). Tentacles encircled a crescent-shaped formation (Figures VI.1A, C). A disc-like oral sucker was situated below the tentacles (Figures VI.1A, C).

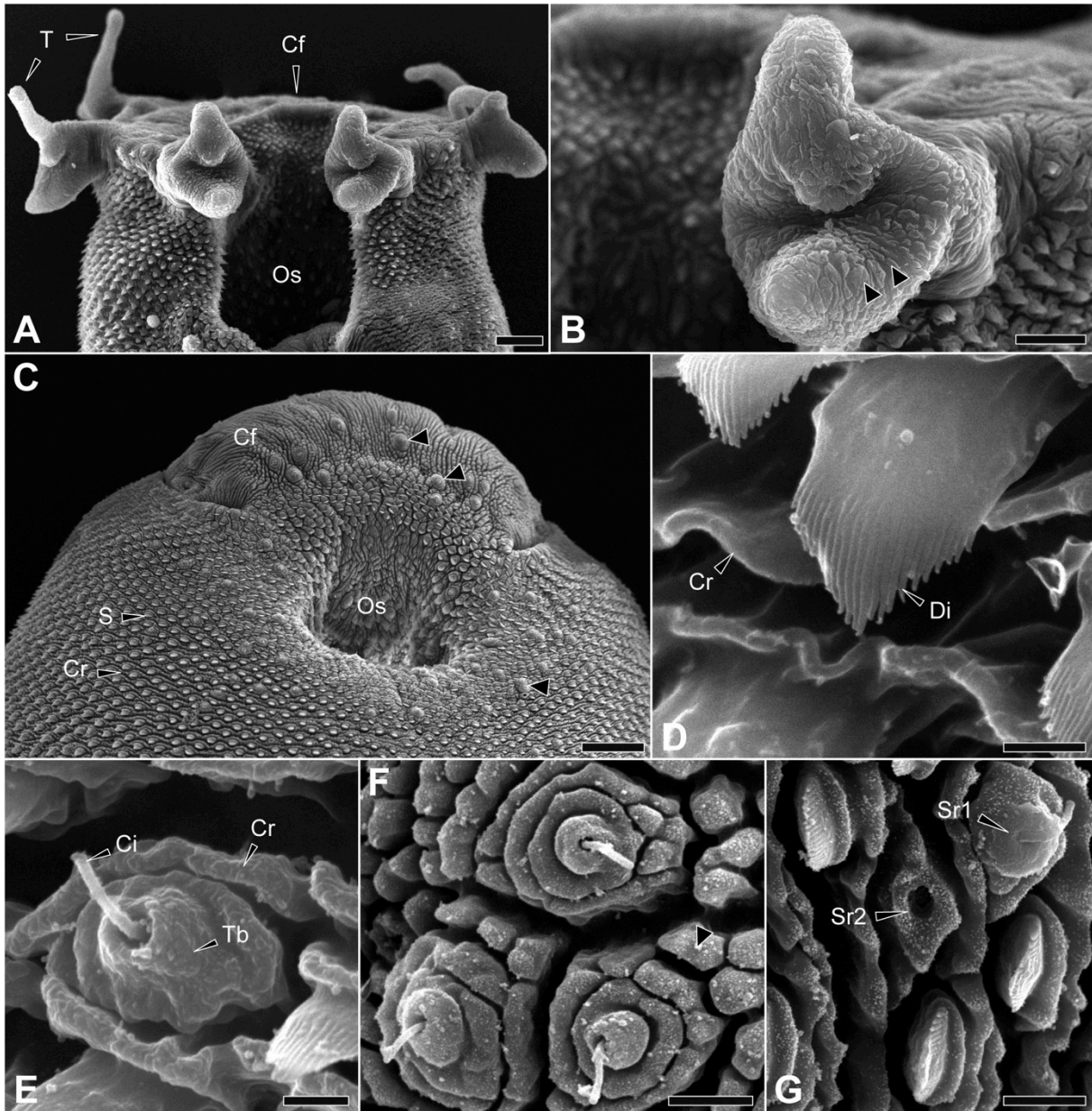


Figure VI.1 Anterior part of *Bucephalus anguillae* by scanning electron microscopy. (A) Front view of the rhynchus showing 7 fully developed tentacles surrounding the crescent-shaped formation just above the oral sucker. Bar = 20 μm . (B) Detail of a tentacle covered by cobblestone-like units of the tegument (arrowheads). Bar = 8 μm . (C) Lateral view of the oral sucker region showing spines protruding from cytoplasmic ridges, tentacles fully retracted around the crescent-shaped formation and sensory papillae (arrowheads) surrounding the oral sucker. Bar = 20 μm . (D) Detail of a digitated spine protruding between cytoplasmic ridges. Bar = 0.9 μm . (E) Detail of type 1 sensory receptor with long cilium and collar-like tegumental base surrounded by a cytoplasmic ridge. Bar = 0.8 μm . (F) Three type 1 sensory receptors grouped in a single papilla surrounded by cobblestone-like units of the tegument (arrowhead). Bar = 2 μm . (G) Detail of a type 2 aciliated sensory receptor with collar-like tegumental base close to a type 1 sensory receptor. Bar = 2 μm . Abbreviations: Cf, crescent-shaped formation of the rhynchus; Ci, cilium; Cr, cytoplasmic ridge; Di, digitation; Os, oral sucker; S, spine; Sr1, type 1 sensory receptor; Sr2, type 2 sensory receptor; T, tentacle; Tb, tegumental base.

Transverse cytoplasmic ridges covered the anterior body surface (Figure VI.1C). On the crescent-shaped formation cytoplasmic ridges were longitudinal and formed cobblestone-like units (Figure VI.1C). Similar units covered the tentacles (Figure VI.1B).

Numerous closely packed claw-shaped spines and sensory papillae protruded from the surface between cytoplasmic ridges (Figures VI.1C, D, VI.2).

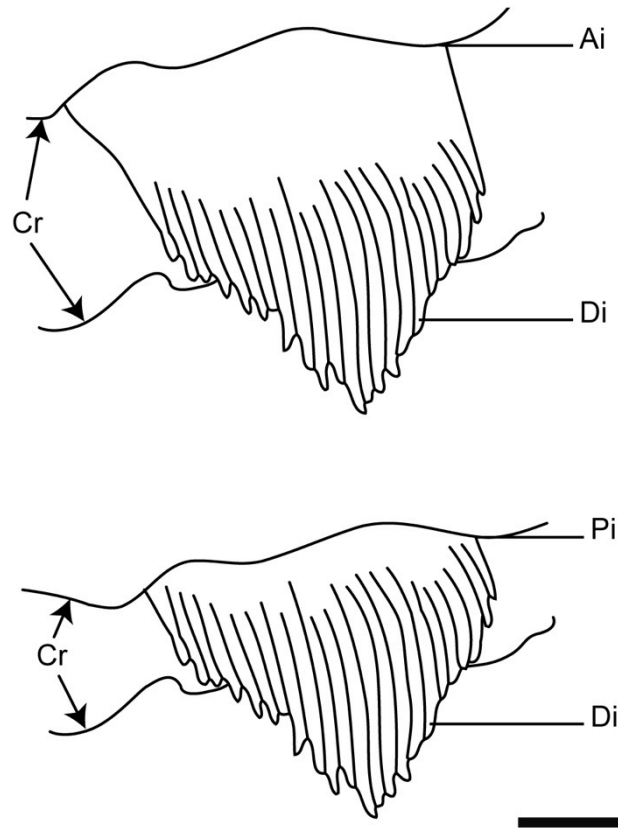


Figure VI.2 Diagram of anterior (top) and posterior (bottom) spines of *Bucephalus anguillae* showing digitations and protruding between cytoplasmic ridges. Bar = 1 μm . Abbreviations: Ai, anterior insertion area; Cr, cytoplasmic ridge; Di, digitation; Pi, posterior insertion area.

Spines were dorso-ventrally flattened, anterior-posteriorly curved and pointed (Figure VI.1D). They were about $2.96 \pm 0.46 \mu\text{m}$ in length and $2.18 \pm 0.26 \mu\text{m}$ in maximum width. Spine width was homogeneous up to a digitated zone located at spines apices where the width was becoming smaller. This zone presented 22 to 23 digitiform projections (Figures VI.1D, VI.2). Minimum digitation length was $0.37 \pm 0.05 \mu\text{m}$ at left and right sides and maximum was $1.15 \pm 0.31 \mu\text{m}$ at the middle of the digitated zone. The spine rose from the tegument at an insertion zone, which was variable between anterior and posterior tegument areas (Figures VI.1D, VI.2). The distance between the extremities of two neighbouring spines was regular and about 3 μm . Spines were absent from the crescent-shaped formation of the rhynchus and

the tentacles (Figures VI.1B, C). Spines were also present on the oral sucker (Figures VI.1A, C).

Sensory receptors were grouped around the anterior sucker and on the crescent-shaped formation of the rhynchus (Figure VI.1C). Two types of sensory receptors were detected on the anterior part of the tegument. Type 1 sensory receptor (Figure VI.1E) was a collar-like uni-ciliated papilla mounted on a tegumental base and surrounded by a cytoplasmic ridge. The cilium was $1.38 \pm 0.37 \mu\text{m}$ in length and 0.2 nm in width. This receptor was located on the anterior part of the body. It was observed alone or associated with 1 or 2 receptors of the same type (Figure VI.1F). Type 2 sensory receptor (Figure VI.1G) was a collar-like non-ciliated papilla, located on the whole body surface. However, they were mainly concentrated around the oral sucker. Type 2 sensory receptors were the least common in *B. anguillae*. They were observed alone, associated with one or two receptors of the same type or associated with type 1 receptors (Figure VI.1G).

Median part : This part showed a highly folded tegument (Figures VI.3A, B) covered by cobblestone-like units. Reduction in the number of sensory structures and spines was also observed (Figures VI.3A, B).

Posterior part : The posterior part of the body also showed a highly folded tegument constituted of numerous cobblestone-like units (Figures VI.3C, D).

A third type of sensory receptor was found at the posterior third of the body. Type 3 sensory receptor (Figures VI.3C, D) was a button-like uni-ciliated papilla. The cilium was $0.58 \pm 0.17 \mu\text{m}$ in length and 0.2 nm in width. Type 3 sensory receptors were grouped around the genital pore and the area between the genital pore and the excretory pore (Figure VI.3D). They were found alone or associated with 1, or more, receptors of the same type (Figures VI.3C, D).

Spines seemed to be absent from cobblestone-like units of the tegument (Figure VI.3C) except near the excretory pore (Figure VI.3D). Here, we found spines that were half-buried in the tegument (Figure VI.3D); these spines were inserted in the tegument just above the digitated zone (Figures VI.2, VI.3D).

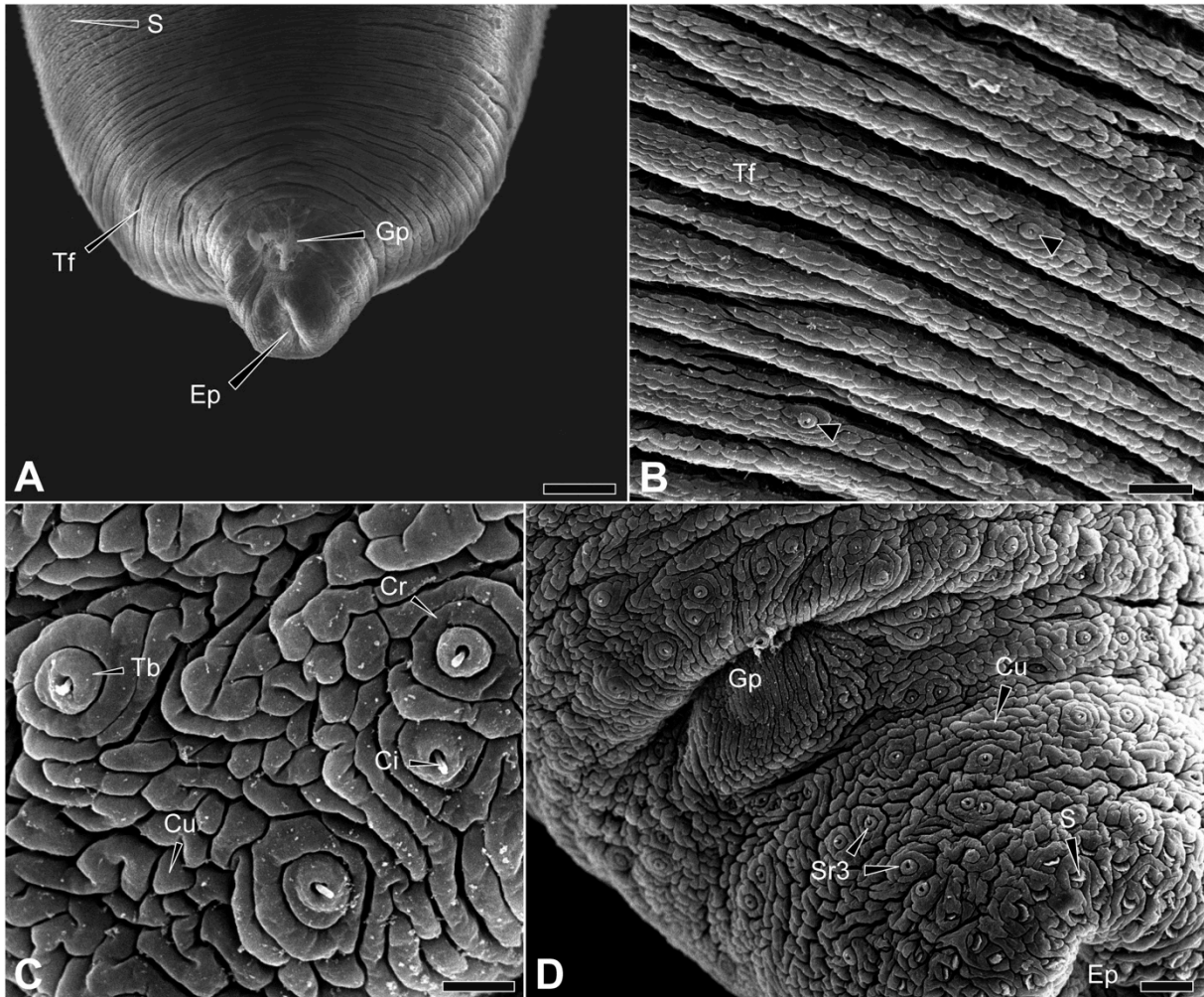


Figure VI.3 Median and posterior parts of *Bucephalus anguillae* by scanning electron microscopy. (A) Large view of the posterior half showing both median and posterior parts. Rarefaction of spines is visible above the genital pore and the excretory pore between tegumental folds. Bar = 30 μm . (B) Detail of an unspined region in the median part showing tegumental folds and rare type 1 sensory receptors (arrowheads). Bar = 6 μm . (C) Detail of type 3 sensory receptors with short cilia and button-like tegumental bases surrounded by cytoplasmic ridges. Cobblestone-like units of the tegument are also visible. Bar = 2 μm . (D) Lateral view of the posterior part showing cobblestone-like units of the tegument, type 3 sensory receptors around the genital pore and spines half-buried near the excretory pore. Bar = 6 μm . Abbreviations: Ci, cilium; Cr, cytoplasmic ridge; Cu, cobblestone-like units of the tegument; Ep, excretory pore; Gp, genital pore; S, spine; Sr3, type 3 sensory receptor; Tb, tegumental base; Tf, tegumental fold.

VI.3.2 TEM

Production of vesicles : The tegument of *B. anguillae* has a syncytial organization. It consisted of a distal cytoplasm lying over a basal matrix and cytons below. Cytoplasmic bridges connected the distal cytoplasm with the cytons beneath the basal matrix. Secretory vesicles produced by cytons in the nucleated region migrated to the distal cytoplasm through cytoplasmic bridges.

Anterior part : Here, the external layer consisted of a glycocalyx on an electron-dense outer membrane about 60 nm thick (Figure VI.4A). The outer membrane delimited the distal cytoplasm (Figure VI.4A).

The distal cytoplasm was about 2 μm thick in unfolded zones, about 3.5 μm where cytoplasmic ridges occurred and about 4.7 μm thick in spine insertion zones (Figure VI.4A).

Numerous spines were inserted in the lower part of the distal cytoplasm (Figures VI.4A, B). Spines were pointed and digitated with an enlarged base (Figures VI.4A, B). At the spine base there was a densification of the spine matrix forming a basal plate about 30 nm thick (Figure VI.4B).

The distal cytoplasm contained numerous mitochondria and 3 types of vesicles (Figures VI.4A, C). Type 1 secretory vesicles were round to elongated, electron-dense (Figure VI.4C), and variable in diameter. They were regularly distributed in the distal cytoplasm (Figure VI.4C). Type 2 secretory vesicles (Figure VI.4C) were smaller electron-dense biconcave disks, and variable in diameter. They were concentrated in the periphery of the distal cytoplasm (Figure VI.4C), and were the thinnest vesicles observed. Type 3 secretory vesicles were round or ovoid membranous bodies, variable in diameter, and filled with a granular material more or less electron lucent (Figure VI.4C). These vesicles were the biggest vesicles observed in the distal cytoplasm.

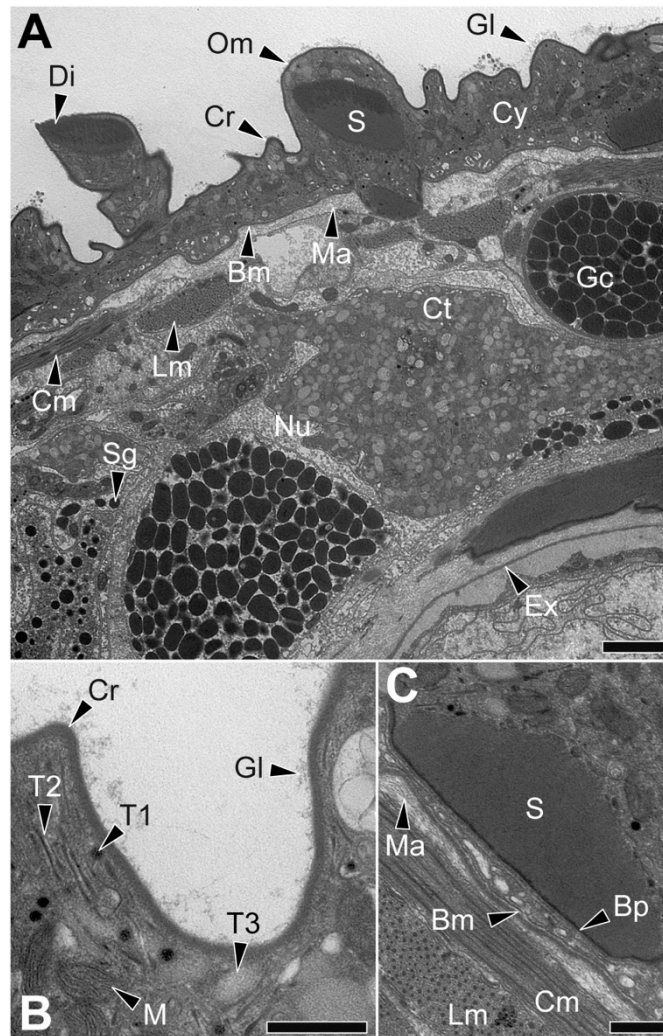


Figure VI.4 Anterior tegument area of *Bucephalus anguillae* by transmission electron microscopy. (A) General organization of the tegument showing distal cytoplasm with cytoplasmic ridges and protruding spines with digitations delimited by an outer membrane and a basal matrix. The outer membrane bears a glycocalyx. Distal cytoplasm is lying over a nucleated region with circular and longitudinal muscle layers, interstitial matrix, gland cells containing secretory granules and cytons. The inner extremity of the syncytial tegument is visible at the bottom. Bar = 2 μm . (B) Detail of spine insertion in the distal cytoplasm showing basal plate over the basal matrix and circular and longitudinal muscle layers of the nucleated region. An interstitial matrix surrounds the muscle layers. Bar = 0.5 μm . (C) Detail of types 1, 2, and 3 secretory vesicles, and mitochondria in the distal cytoplasm. Cytoplasmic ridges and glycocalyx are also visible. Bar = 0.5 μm . Abbreviations: Bm, basal matrix; Bp, basal plate; Cm, circular muscle layer; Cr, cytoplasmic ridge; Ct, cyton; Cy, distal cytoplasm; Di, digitation; Ex, inner extremity of the tegument; Gc, gland cell; Gl, glycocalyx; Lm, longitudinal muscle layer; M, mitochondrion; Ma, interstitial matrix; Nu, nucleated region; Om, outer membrane; S, spine; Sg, secretory granule; T1, type 1 secretory vesicle; T2, type 2 secretory vesicle; T3, type 3 secretory vesicle.

Type 1 sensory receptors were observed in the distal cytoplasm of the anterior part of *B. anguillae* (Figures VI.5A-D, VI.6). Type 2 sensory receptors were not found; type 1 sensory receptors were widely distributed. The ciliated receptor consists of a nerve bulb and a cilium that extends from a centriole (Figures VI.5A, VI.6). The centriole is anchored in the nerve bulb by a striated rootlet (Figures VI.5A, VI.6). A tegumental base encircles the cilium

(Figures VI.5A, VI.6). The cilium was of the 9 + 2 pattern (Figures VI.5B, VI.6). Oblique sections revealed the presence of an electron-dense conical structure surrounding the centriole (Figures VI.5C, VI.6). An attachment site connected this structure to the top of the bulb (Figure VI.5D, VI.6). The nerve bulb is filled with electron-lucent material containing numerous mitochondria (Figures VI.5C, D, VI.6).

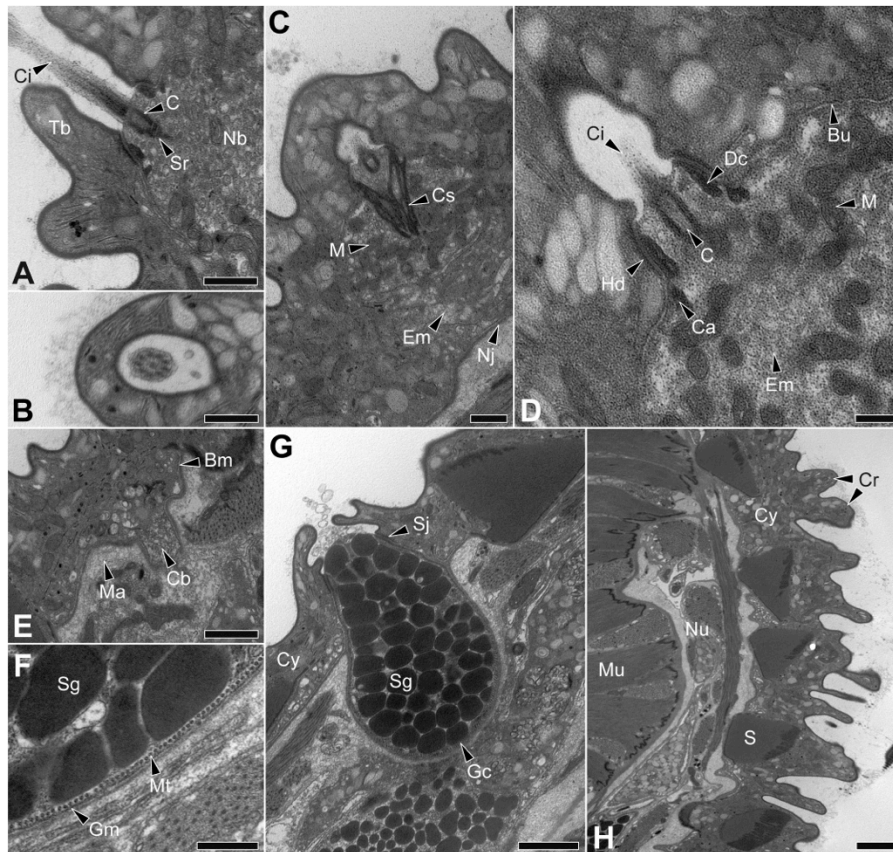


Figure VI.5 Anterior tegument area of *Bucephalus anguillae* by transmission electron microscopy. (A) General view of a type 1 sensory receptor showing cilium extending from a centriole with striated rootlet enclosed in a nerve bulb. Tegumental base is encircling the sensory receptor. Bar = 0.5 μ m. (B) Detail of a transverse section of a sensory receptor cilium showing the 9 + 2 axoneme. Bar = 0.5 μ m. (C) Shift view of type 1 sensory receptor showing nerve junction, mitochondria, electron-lucent material and conical electron-dense structure. Bar = 0.5 μ m. (D) Detail of junctional complex in type 1 sensory receptor composed of a hemidesmosome and a dense collar. Attachment site of the conical electron-dense structure is visible at both sides of the centriole supporting the cilium. Nerve bulb delimited by a membrane contains mitochondria and electron-lucent material. Bar = 0.25 μ m. (E) Cytoplasmic bridge connecting the distal cytoplasm with the nucleated region of the tegument and occurring through the basal matrix and the interstitial matrix. Bar = 1 μ m. (F) Detail of microtubules and membrane of a gland cell enclosing secretory granules in the nucleated region. Bar = 0.4 μ m. (G) Eccrine secretion of a large gland cell containing secretory granules. A septate junction connects the top of the gland with the distal cytoplasm. Bar = 1.5 μ m. (H) Large view of the tegument showing cytoplasmic ridges, spines in the distal cytoplasm and the large oblique muscle layer occurring deep in the nucleated region of the tegument. Bar = 2 μ m. Abbreviations: Bm, basal matrix; Bu, bulb membrane; C, centriole; Ca, attachment site of the conical electron-dense structure; Cb, cytoplasmic bridge; Ci, cilium; Cr, cytoplasmic ridge; Cs, conical electron-dense structure; Cy, distal cytoplasm; Dc, dense collar; Em, electron-lucent material; Gm, gland cell membrane; Hd, hemidesmosome; M, mitochondrion; Ma, interstitial matrix; Mt, microtubule; Mu, muscle layer; Nb, nerve bulb; Nj, nerve junction; Nu, nucleated region; S, spine; Sg, secretory granule; Sj, septate junction; Sr, striated rootlet; Tb, tegumental base.

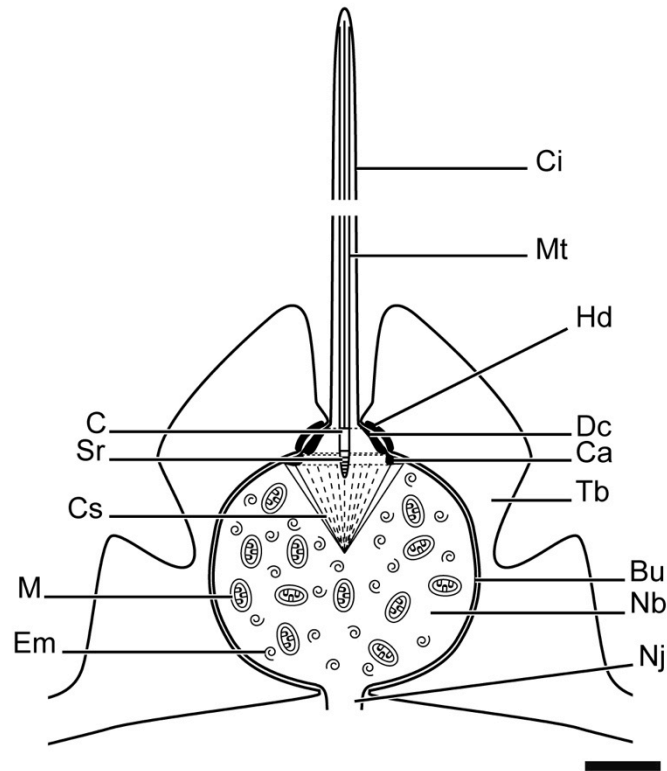


Figure VI.6 Diagram of an anterior sensory receptor of *Bucephalus anguillae*. Bar = 1 μm . Abbreviations: Bu, bulb membrane; C, centriole; Ca, conical structure attachment site; Ci, cilium; Cs, electron-dense conical structure; Dc, dense collar; Em, electron-lucent material; Hd, circular hemidesmosome; M, mitochondria; Mt, microtubules doublets; Nb, nerve bulb; Nj, nerve junction; Sr, striated rootlet; Tb, tegumental base.

A hemidesmosome connects the top of the bulb to the distal cytoplasm (Figures VI.5D, VI.6). An electron-dense collar surrounds the centriole (Figures VI.5D, VI.6). A basal matrix about 55 nm thick is immediately beneath the distal cytoplasm. This matrix marks the separation between the distal cytoplasm and the cytons below (Figures VI.4A, B, VI.5E). Cytoplasmic bridges interrupting the basal matrix are common in the anterior tegument of *B. anguillae* (Figure VI.5E).

There is a layer of interstitial matrix just below the basal matrix in the nucleated region (Figures VI.4A, B, VI.5E). The interstitial matrix surrounds circular and longitudinal muscle layers (Figures VI.4A, B). Cytons are widespread, irregular in shape and enclose, in their cytoplasm, types 1, 2 and 3 secretory vesicles (Figure VI.4A).

Numerous secretory granules are produced within the cytons (Figure VI.4A). These granules are common in *B. anguillae* anterior tegument. They occur in various shapes and

sizes (Figures VI.5F, G). Gland cells enclose secretory granules in a membrane, which is surrounded by numerous cortical microtubules (Figure VI.5F). They pass through the distal cytoplasm and are released via an eccrine secretion (Figure VI.5G). During the secretion, a duct opens over the plasma membrane (Figure VI.5G) while a septate junction connected the gland cell with the distal cytoplasm (Figure VI.5G).

A second muscle layer is present in the sucker tegument below the cytons of the nucleation region (Figure VI.5H). It is by far thicker than the other ones and was mainly constituted by large oblique fibers. The inner extremity of the syncytial tegument is situated under cytons or under the second muscle layer (Figure VI.4A).

Posterior part : In this part of the body, the outer membrane is about 60 nm thick, including the glycocalyx (Figure VI.7A). The syncytial layer is about 3 to 4 μm thick and mitochondria are more numerous than anteriorly (Figures VI.7A, B). Cytoplasmic ridges are less elongated than in the anterior part (Figure VI.7A). The glycocalyx of the posterior tegument area had a strange characteristic as it included numerous bacteria (Figure VI.7B).

Type 3 sensory receptors were also examined (Figure VI.7C). As for type 1 receptors, the nerve bulb of the receptor is linked to the distal cytoplasm by a hemidesmosome. An electron-dense collar consolidates the junction and encircles the centriole that supports the cilium (Figure VI.7C). However, a conical electron-dense structure was not observed.

Types 1, 2, and 3 secretory vesicles were also observed. They had the same variability in shape and size as those in the anterior part of the body (Figure VI.7B).

A basal matrix separates the distal cytoplasm from the nucleated region (Figure VI.7A). Muscle layers are also present under the basal matrix (Figure VI.7A). Cytons are less packed than anterior ones making the interstitial matrix more visible (Figure VI.7A).

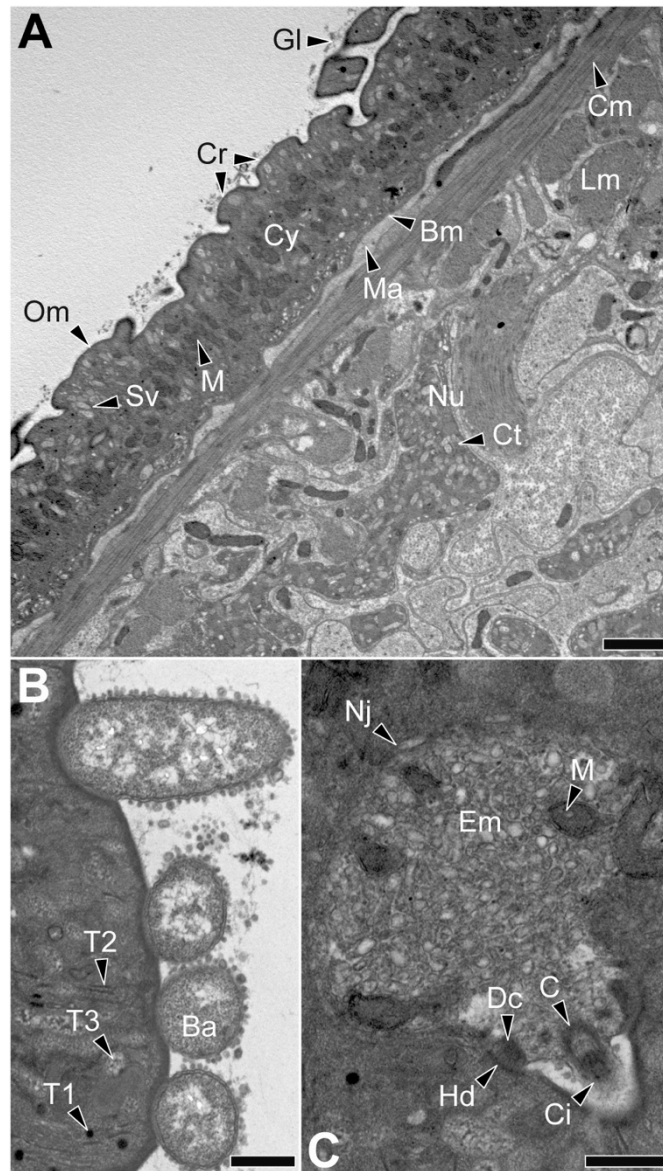


Figure VI.7 Posterior tegument area of *Bucephalus anguillae* by transmission electron microscopy. (A) General organization of the tegument showing distal cytoplasm with cytoplasmic ridges delimited by an outer membrane and a basal matrix. The distal cytoplasm contains mitochondria. The outer membrane bears a glycocalyx. Distal cytoplasm contains secretory vesicles and is lying over a nucleated region. Circular and longitudinal muscle layers and cytons are also visible. An interstitial matrix surrounds the muscle layers. Bar = 2 μm . (B) Detail of the periphery of the distal cytoplasm showing types 1, 2, and 3 secretory vesicles, and bacteria linked to the outer membrane. Bar = 0.5 μm . (C) Detail of junctional complex in type 3 sensory receptor composed of an hemidesmosome and a dense collar. Cilium is extending from a centriole. Nerve bulb is filled with mitochondria and electron-lucent material and connected by a nerve junction. Bar = 0.5 μm . Abbreviations: Ba, bacterium; Bm, basal matrix; C, centriole; Ci, cilium; Cm, circular muscle layer; Cr, cytoplasmic ridge; Ct, cyton; Cy, distal cytoplasm; Dc, dense collar; Em, electron-lucent material; Gl, glycocalyx; Hd, hemidesmosome; Lm, longitudinal muscle layer; M, mitochondrion; Ma, interstitial matrix; Nj, nerve junction; Nu, nucleated region; Om, outer membrane; Sv, secretory vesicle; T1, type 1 secretory vesicle; T2, type 2 secretory vesicle; T3, type 3 secretory vesicle.

VI.4 Discussion

VI.4.1 General organization of tegument

The tegumental organization of *B. anguillae* is similar to the general structure described for digeneans (Morris & Threadgold, 1968; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984). SEM micrographs revealed that the tegument of *B. anguillae* is quite similar to that of *P. arcuatus* (Cohen *et al.*, 1995); they both possess a folded posterior tegument, cobblestone-like units of the tegument, multipointed spines arranged in transverse rows that are infolded at the posterior end, and uni-ciliated sensory receptors with tegumental bases.

The glycocalyx is thought to provide permeability control, ionic regulation, protection against host enzymes, and antibody/antigen reactions (Burton, 1966; Lumsden, 1975; Paperna & Dzikowski, 2006). The cytons are not exposed to any adverse influence of the host, which permits regional differentiation and specialization (Halton & Johnston, 1982a).

VI.4.2 Cytoplasmic expansions

Tegument folds, such as microtrichs, cytoplasmic expansions and cobblestone-like zones, are thought to participate in nutrition by amplifying the free surface area (Paperna & Dzikowski, 2006). Transverse ridges of the tegument have also been observed in SEM micrographs of other digeneans such as *Fasciola hepatica* (Bennett, 1975a) and *Zygocotyle lunata* (Irwin *et al.*, 1991), as well as some monogeneans, such as *Paranaella luquei* (Cohen *et al.*, 2001). According to Williams & McKenzie (1995), transverse ridges could be due to the contraction of longitudinal muscles. Cohen *et al.* (1995) and Whittington & Cribb (2001) showed similar ridges on *P. arcuatus* and *B. sextentaculatus*. In contrast, Pandey & Tewari (1984) observed longitudinal ridges on *B. karvei*. Moreover, the contracted state of the organism may have an impact on the tegumental covering of spines (Threadgold, 1984;

Cohen *et al.*, 1995), thereby explaining the tegumental invagination of spines near the excretory pore in the present study.

The presence of cytoplasmic expansions and cytons made it difficult to accurately measure the thickness of the distal cytoplasm. However, Hockley & McLaren (1973) argue that the thickness of the digenean tegument possibly depends on the environment and the size of the worm.

Cobblestone-like areas of the tegument are present only on the crescent-shaped formation of the rhynchus and at the posterior region of the body, whereas they are present on the whole body surface of *P. arcuatus* (Cohen *et al.*, 1995) and *B. karvei* (Pandey & Tewari, 1984). Similar structures have been described for other digeneans such as *Cyclocoelum mutabile* (Tajrine *et al.*, 1999), *Heterophyopsis continua* (Hong *et al.*, 1991), *Leucochloridiomorpha constantiae* (Font & Wittrock, 1980), and *Metagonimus yokogawai* (Lee *et al.*, 1984).

VI.4.3 Spines

Differences in spine structures and their distribution over the body may involve a significant difference in host-parasite relationships (Chai *et al.*, 2000). For example, Køie (1977) suggests that large pointed spines may be involved in feeding, with spines acting as abrasive structures for host tissue. In contrast, Senft *et al.* (1961) and Lumsden (1975) opined that spines aided in attachment to the host tissue.

Cohen *et al.* (1995) described scale-shaped spines on the tegument of *P. arcuatus* that appeared to be multipointed, with up to 30 digitations, while Pandey & Tewari (1984) found spines with three to 25 digitations in *B. karvei* (Table VI.1).

The latter number of digitations is closer to our results as *B. anguillae* spines have 23 digitations. Pandey and Tewari (1984), however, also reported variability in the digitations over the body of *B. karvei* similar to what we found in *B. anguillae*, although the variability is

not as great as for *B. karvei*. Špakulová *et al.* (2002) indicated that *B. anguillae* spines were 10-12 µm long (Table VI.1). However, when conversion is made between scale bars and spines on their figures, it appears that the length is close to 2-3 µm, as in our results.

Table VI.1 Spines characteristics of studied Bucephalids.

Species	Features	References
<i>Bucephaloides gracilescens</i>	Forebody heavily spined Multipointed	(Halton & Johnston, 1982)
<i>Bucephalopsis karvei</i>	3-25 digitations Posterior third unspined	(Pandey & Tewari, 1984)
<i>Bucephalus anguillae</i>	Pointed 10-12 µm long Crescent-shaped formation unspined Excretory pore surrounded by spines	(Špakulová <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bucephalus anguillae</i>	Multipointed (19-23 digitations) 2.96 ± 0.46 µm long Crescent-shaped formation unspined Excretory pore surrounded by spines	Present study
<i>Bucephalus sextentaculatus</i>	Not defined	(Whittington & Cribb, 2001)
<i>Prosorhynchoides arcuatus</i>	Slightly curved with basal plate Scale-shaped with 30 digitations Infolded at the posterior part of the body	(Cohen <i>et al.</i> , 1995, 1996)

Spine density decreases in the posterior third of *B. anguillae*, *B. gracilescens* (Halton & Johnston, 1982b), and *B. karvei* (Pandey & Tewari, 1984), as seen in Table VI.1. SEM micrographs of *B. anguillae* (Špakulová *et al.*, 2002) also show a decrease of spine density posteriorly, whereas they are evenly distributed for *P. arcuatus* (Cohen *et al.*, 1995).

Rows of spines on the oral sucker have been recorded in some other bucephalid species (Moravec & Sey, 1989; Whittington & Cribb, 2001). According to Bakke (1976) and Bennett (1975b), the absence of spines may be less irritating for the host mucosa. Thus the decrease of spine density may be related to the specialization of the rhynchus and facilitate attachment to the host tissue (Pandey & Tewari, 1984) without excess.

Moreover TEM micrographs of *B. anguillae* revealed basal densifications at spines bases. These are thought to be involved in motility of the spine (Bennett & Threadgold, 1975; Abbas & Cain, 1987; Ferrer *et al.*, 2001) and linked to the attachment function of the rhynchus. Contrariwise closely packed filamentous organization between spine base and musculature, as seen in *Schistosoma mansoni* (Abbas & Cain, 1987), was not observed in *B. anguillae* even if muscle layers were omnipresent under the spines.

VI.4.4 Vesicles

Types 1, 2, and 3 secretory vesicles have been recorded in other adult digeneans such as *Zoogonoides viviparus* (Køie, 1971), *Fasciola hepatica* (Bennett & Threadgold, 1975), *Zygocotyle lunata* (Irwin *et al.*, 1991), and *Proisorhynchoides arcuatus* (Cohen *et al.*, 1996). Secretory vesicles probably contribute to the formation and maintenance of the glycocalyx (Bogitsh, 1968; Shannon & Bogitsh, 1971). Others have suggested that they are involved in maintenance of the outer membrane or in immunoprotection (Lumsden, 1975; Hanna, 1980b, a).

Type 3 secretory vesicles seem similar to the membrane-bound multilamellate vesicles observed in *P. arcuatus* (Cohen *et al.*, 1996). Secretory vesicles pass from cytons to the syncytium using cytoplasmic bridges as in *Schistosoma mansoni* (Hockley & McLaren, 1973).

Large secretory granules enclosed by microtubules in gland cells are common in the anterior third of *B. anguillae* tegument. Swarup & Jain (1984) also recorded a pair of adhesive glands inside the rhynchus of *B. lateroporus*, and in the tegument of other trematodes (Halton

& Dermott, 1967; Halton & Lyness, 1971) and other Platyhelminthes (Jones & Beveridge, 1998). According to Whittington & Cribb (2001), similar secretions are thought to be involved in adhesion to the host mucosa and related to the operation of the rhynchus. Whittington & Cribb (2001) also suggested that other adult bucephalids produce adhesive secretions as well.

VI.4.5 Sensory receptors

The fluke tegument bears numerous sensory papillae scattered over the body. Sensory receptors are common and varied among digeneans. These structures have been studied in species such as *Cryptocotyle lingua* (Køie, 1977), *F. hepatica* (Bennett, 1975b), *Gorgoderina vitelliloba* (Hoole & Mitchell, 1981), and *Heterophyopsis continua* (Hong *et al.*, 1991). Our study showed the presence of 3 types of sensory structures. Uni-ciliated sensory structures have been observed in various monogeneans and digeneans, both singly or grouped, and with short or long cilia (Williams & McKenzie, 1995; Han *et al.*, 2003; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004). According to Dunn *et al.* (1987), these structures may function as tango-, rheo-, or chemo-receptors. Type 1 receptors, mainly concentrated around the oral sucker, may thus, for example, be involved in attachment or site recognition. Type 3 sensory receptors may be involved in sexual recognition. Indeed our study revealed numerous sensory structures massed around the genital pore of *B. anguillae*. In contrast, SEM micrographs of *B. karvei* (Pandey & Tewari, 1984) showed the absence of papillae around both the excretory and genital pores.

Type 1 collar-like, ciliated papillae possess a typical ultrastructural configuration and are similar to those observed in other digeneans (Table VI.2) even though small modifications appear in the junctional complex. The conical electron-dense structure and its attachment site observed in type 1 sensory receptors of *B. anguillae*, however, do not match any of the receptors noted in Table VI.2. The conical electron-dense structure is comparable to the long

rootlet of the type II receptor of *Crepidostomum metoecus* (Žd'árská & Nebesářová, 2004) although our structure is not striated. A similar structure as the conical structure attachment site is visible on the diagram of type 1 receptor of *Echinostoma revolutum* (Žd'árská, 1992).

Table VI.2 Similar sensory receptors structures of some other trematoda as seen in TEM.

Family	Corresponding sensory receptors		References
Species			
Allocreadiidae	Type II	Type I	(Žd'árská & Nebesářová, 2004)
<i>Crepidostomum metoecus</i>			
Bucephalidae	Type 1	Type 3	Present study
<i>Bucephalus anguillae</i>			
Echinostomatidae	Type 1	Type 3	(Žd'árská, 1992)
<i>Echinostoma revolutum</i>			
Fasciolidae	Ciliated papilla		(Bennett, 1975)
<i>Fasciola hepatica</i>			
Heterophyidae	Type 1		(Hong <i>et al.</i> , 1991)
<i>Heterophyopsis continua</i>			

Type 2 collar-like non-ciliated papillae have not been described using TEM; Pandey and Tewari (1984) noted the presence of similar pitted papillae in *B. karvei*. The pits are thought to be involved in sensory reception of various environmental factors, e.g., pH and temperature (Bakke, 1976).

Type 3 button-like ciliated papillae seem similar to type 1 receptors described here, although no conical electro-dense structures were observed. Similar structures have been observed in other species (Table VI.2). Our study revealed a difference in mean cilia lengths between anterior type 1 papillae and posterior type 3. Cohen *et al.* (1995) reported the presence of papillae with retractile cilia in *P. arcuatus* from the Bucephalidae. It is also possible that the SEM preparation may have had an impact on the contraction of the fluke, resulting in the retraction of cilia at the posterior part of the body. Nevertheless TEM micrographs of these sensory receptors do not show any excessive retraction of the cilia.

Though some authors indicated site-specificity in the distribution of sensory receptors (Bogea & Caira, 2001; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004; Mata-López & Leon-Regagnon, 2006), there is no study reporting an anterior-posterior difference between cilia mean lengths. It is interesting to note that cilia lengths are reduced posteriorly, where spines seem to be buried in the tegument. Thus, Bennett (1975b) suggested that cilia may be capable of recording the direction and degree of any pressure acting on the spines as they are protruding to the same height as the surrounding spines.

CHAPITRE VII

TOPOGRAPHY AND ULTRASTRUCTURE OF THE TEGUMENT OF *LECITHOCHIRIUM MUSCULUS* (DIGENEA: HEMIURIDAE), A PARASITE OF THE EUROPEAN EEL *ANGUILLA ANGUILLA* (OSTEICHTHYES: ANGUILLIDAE)

Jean-José Filippi, Yann Quilichini, Joséphine Foata et Bernard Marchand

Ce chapitre fait l'objet d'un article paru dans la revue *Journal of Morphology* (IF=1.54).

DOI: 10.1002/jmor.11032.

VII.1 INTRODUCTION

According to Threadgold (1984), the tegument is considered to be the major host-parasite interface. It is involved in protection against host enzymes and immune systems, in excretion processes, and in absorption of nutrients (Burton, 1966; Lumsden, 1975; Threadgold, 1984; Paperna & Dzikowski, 2006). It may also be involved in ion regulation and osmoregulation (Threadgold, 1984) which makes it a living, complex tissue (Roberts & Janovy, 2000). Detailed studies on the ultrastructural characteristics of digeneans can provide useful information in the taxonomic study of the groups (Mata-López & Leon-Regagnon, 2006).

Among Digenea, studies on tegumental sensory structures mainly focused on cercaria or metacercaria stages (Fujino *et al.*, 1979b; Matthews & Matthews, 1988a; Žd'árská, 1992; Boga & Caira, 2001; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004; Poddubnaya *et al.*, 2010) as they require orientation to stimuli such as light and gravity more than adults do, a condition related to the necessity of finding a host quickly (Roberts & Janovy, 2000). However, some authors have emphasized the description of tegumental structures of adult digeneans (Žd'árská, 1993; Ferrer *et al.*, 1996; Ibraheem, 2000; Filippi *et al.*, 2010). Electron microscopy techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) are of a particular interest in the description of tegumental structures. Indeed, SEM can provide data on the external morphology and localization of these structures, while TEM allows ultrastructural investigations at a cellular level. Thus, the combination of both techniques provides a full range morphological description of the tegumental structures.

Among Digenea, the Hemiuridae (superfamily Hemiuroidea) (Gibson & Bray, 1979) are unusual in that the adults occur in the stomach of marine teleost hosts, where they are exposed to strong proteolytic digestion at pH 1-2 and extremes of osmolarity (MacKenzie & Gibson, 1970; Matthews & Matthews, 1988b). Metacercarial and adult stages of

Brachyphallus crenatus (Køie, 1992) such as adults of *Erilepturus hamati* (Abdou, 2001) have been studied using SEM. Mesocercarial or metacercarial stages of *L. furcolabiatum* (Matthews & Matthews, 1988a) and cercaria of *Vaullegeardi pelseneer* (Popiel, 1978) have been studied using TEM. Only three adult hemiurids have been studied using TEM, i.e., *Hemiurus communis* (Kryvi, 1972; Matthews & Matthews, 1988b), *Lecithochirium rufoviride*, and *Lecithochirium fusiforme* (Matthews & Matthews, 1988b).

To our knowledge, no electron microscope study using both techniques has been made on the tegument of a hemiurid trematode. The aim of this study is to investigate the tegument of *L. musculus* using SEM and TEM giving special consideration to the morphology and distribution of sensory receptors.

VII.2 MATERIALS AND METHODS

VII.2.1 Specimen collection

Adult specimens of *L. musculus* were collected alive from the stomach of 20 eels (*A. anguilla*) obtained from fishermen of the Biguglia lagoon, Corsica, France (42°56'N, 9°51'E) on April 2010. The fish were brought alive to the laboratory, anesthetized, and dissected the day of the capture. During necropsy, helminths from the stomach were collected alive and prepared for SEM and TEM observations at the “Service d'Étude et de Recherche en Microscopie Électronique” of the University of Corsica Pascal Paoli.

VII.2.2 SEM

A total of 19 adult flukes were fixed for at least 1 hour in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. Specimens were then dehydrated in a graded acetone series and dried with the use of CO₂ in an Emitech K850 critical point dryer. Specimens were mounted on aluminium stubs with carbone double-sided adhesive discs. Specimens were then coated with gold/palladium in a Quorum Technologies

SC7640 sputter coater and examined with the use of a Hitachi S-3400N scanning electron microscope at an acceleration voltage of 5 kV.

VII.2.3 TEM

Transverse sections of *L. musculus* were made and fixed for at least 1 hour in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hour, dehydrated in ethanol and propylene oxide, embedded in Spurr (1969), and then polymerized at 60°C for 24 hours. Ultrathin sections (60 to 90 nm in thickness) were obtained with the use of an RMC Boeckeler Power Tome PC ultramicrotome, placed on 300-mesh copper grids, and double stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963). The sections were examined with the use of a Hitachi H-7650 transmission electron microscope at an acceleration voltage of 80 kV.

VII.3 RESULTS

VII.3.1 General organization of the tegument

SEM : The body of *L. musculus* was fusiform (Figure VII.1A). Cytoplasmic ridges covered the body surface (Figure VII.1A-F). The numerous cobblestone-like units of the tegument enhanced the plicated semblance of the tegument of the ventral surface (Figure VII.1C). The dorsal surface of the fluke presented a smoother tegument than on the ventral surface (Figure VII.1D). No rising spines were observed over the body surface. The fluke possessed two suckers. The oral sucker was situated at the anterior extremity on the ventral surface (Figure VII.1A). The ventral sucker, located on the anterior third of the body, was more developed than the oral one (Figure VII.1A, B). Numerous cytoplasmic ridges of the tegument covered this disc-like sucker (Figure VII.1B). On the ventral sucker cobblestone-

like units of the tegument seemed to be absent which made the surface smoother (Figure VII.1B).

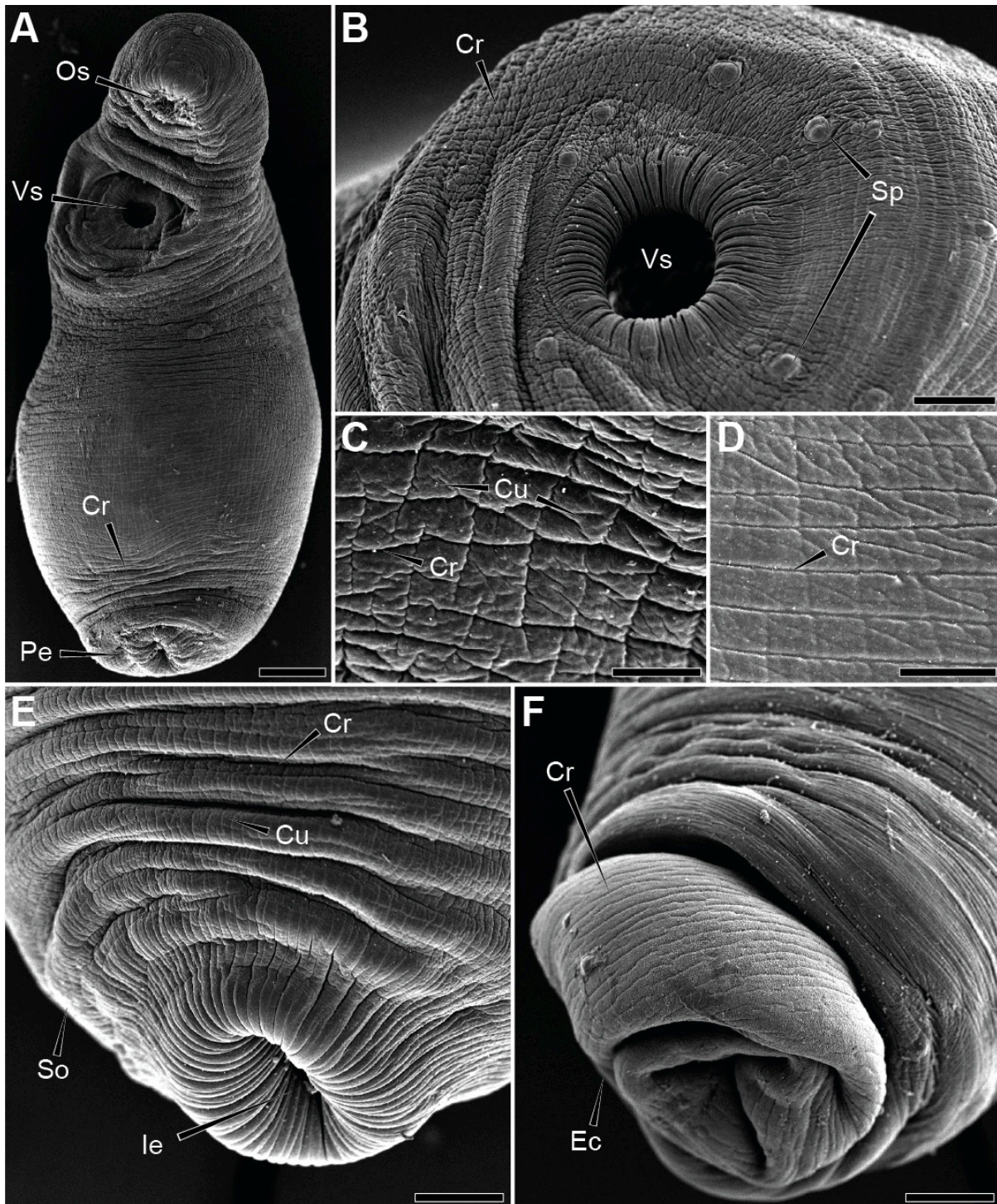


Figure VII.1 Scanning electron micrographs of *Lecithochirium musculus* tegument. (A) Ventral view of the fluke. Bar = 60 μm . (B) Detail of the ventral sucker surrounded by sensory papillae. Bar = 20 μm . (C) Detail of a highly folded tegument of the ventral surface. Bar = 8 μm . (D) Detail of a smooth tegument of the dorsal surface. Bar = 9 μm . (E) Large view of the posterior extremity of the fluke showing invaginated ecsoma. Bar = 25 μm . (F) Large view of the posterior extremity of the fluke showing partially evaginated ecsoma. Bar = 40 μm . Abbreviations: Cr, cytoplasmic ridge; Cu, cobblestone-like unit of the tegument; Ec, ecsoma; Ie, invaginated ecsoma; Os, oral sucker; Pe, posterior extremity; So, soma; Sp, sensory papillae; Vs, ventral sucker.

Numerous sensory papillae were massed around the ventral sucker (Figure VII.1B). The fluke was characterized by the presence of an ecsoma localized at the posterior extremity of the body. It was a retractile piece of the body alternately invaginated (Figure VII.1E) or evaginated from the soma (Figure VII.1F) at the posterior extremity. Cytoplasmic ridges of the tegument were also present on the ecsoma and around the posterior extremity while the ecsoma was invaginated. Moreover, during this phase cobblestone-like units of the tegument seemed to be absent from the posterior extremity, which made the surface smoother than the neighbouring areas (Figure VII.1E).

TEM : The tegument of *L. musculus* was a syncytium. It consisted of a distal cytoplasm delimited by an outer membrane and a basal matrix, lying over a nucleated region with circular and longitudinal muscle layers, interstitial matrix, and cytons producing secretory granules (Figure VII.2A). The external layer was composed of a glycocalyx on an electron-dense outer membrane about 100 nm thick (Figure VII.2B). The outer membrane delimited a distal cytoplasm about 5.8 μm thick (Figure VII.2A). The distal cytoplasm contained a dense granular material and mitochondria (Figure VII.2B). Large secretory vesicles about 1.6 μm in diameter and filled with electron-lucent granular material were present in the distal cytoplasm and released via an eccrine secretion (Figure VII.2B, C). A basal matrix about 200 nm thick was lying beneath the distal cytoplasm. This matrix separates the distal cytoplasm from the nucleated region (Figure VII.2A), and was regularly infolded into the distal cytoplasm (Figure VII.2D). Numerous hemidesmosomes connected the distal cytoplasm to the basal matrix (Figure VII.2D, E). A layer of interstitial matrix was lying just below the basal matrix in the nucleated region (Figure VII.2A, D-G). This layer was composed of an irregular arrangement of microfibrils (Figure VII.2E, F) and surrounded circular and longitudinal muscle layers (Figure VII.2F, G). The interstitial matrix was sometimes interrupted by large hemidesmosomes connecting the basal matrix to the circular

muscle layer below resulting in a soft invagination of the basal matrix (Figure VII.2F).

Mitochondria were enclosed in the muscle layers (Figure VII.2G).

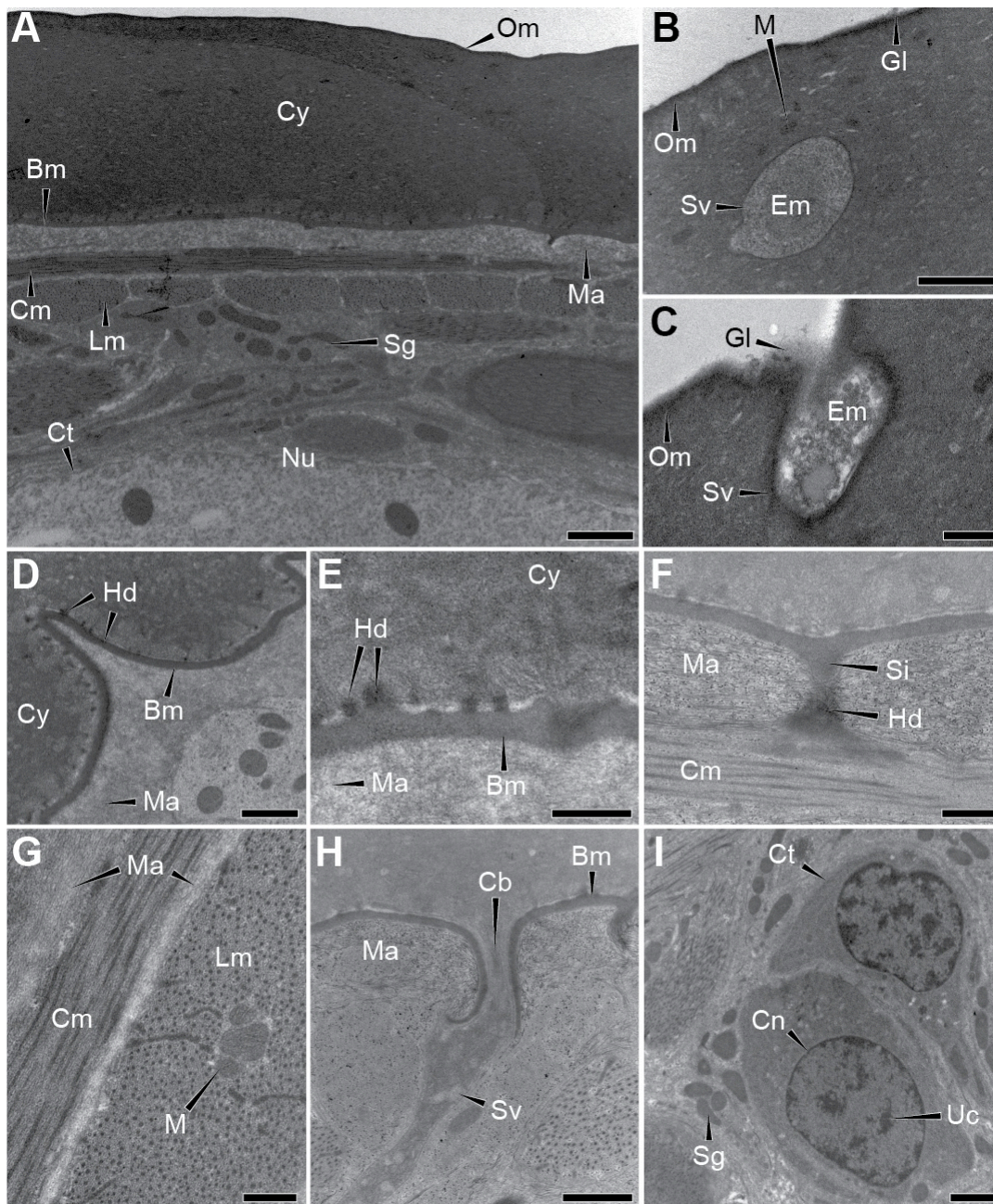


Figure VII.2 Transmission electron micrographs of *Lecithochirium musculus* tegument. (A) General organization of the tegument. Bar = 5 μm . (B) Detail of the external region of the distal cytoplasm. Bar = 1 μm . (C) Ecrine secretion of a secretory vesicle at the surface of the tegument. Bar = 500 nm. (D) Inner region of the distal cytoplasm showing invagination of the basal matrix into the distal cytoplasm and connections made by the hemidesmosomes. Bar = 1 μm . (E) Detail of hemidesmosomes connecting the distal cytoplasm to the basal matrix. Bar = 500 nm. (F) Large hemidesmosome connecting the basal matrix to a circular muscle layer. A soft invagination of the basal matrix through the interstitial matrix is also visible. Bar = 500 nm. (G) Detail of the circular and longitudinal muscle layers of the nucleated region. Bar = 500 nm. (H) Detail of a cytoplasmic bridge linking the distal cytoplasm to the nucleated region of the tegument. Bar = 500 nm. (I) Detail of cytons of the nucleated region. Bar = 1 μm . Abbreviations: Bm, basal matrix; Cb, cytoplasmic bridge; Cm, circular muscle layer; Cn, cell nucleus; Cy, distal cytoplasm; Ct, cyton; Em, electron-lucent material; Gl, glycocalyx; Hd, hemidesmosome; Lm, longitudinal muscle layers; M, mitochondrion; Ma, interstitial matrix; Nu, nucleated region; Om, outer membrane; Sg, secretory granule; Si, soft invagination of the basal matrix; Sv, secretory vesicle; Uc, uncondensed chromatin.

Cytoplasmic bridges regularly interrupted the basal and interstitial matrices. Secretory vesicles migrating from the nucleated region to the distal cytoplasm passed through these cytoplasmic bridges (Figure VII.2H). The deeper layer of the tegument consisted of cytons of various shape and size (Figure VII.2A). Their cell nuclei showed uncondensed chromatin (Figure VII.2I). Numerous electron-dense secretory granules were produced within the cytons (Figure VII.2I). However, no secretion of these granules was observed.

VII.3.2 Sensory receptors

SEM and TEM observations of the body surface of *L. musculus* revealed the presence of numerous intra-tegumental sensory receptors of two types (Table VII.1).

Table VII.1 Morphological characteristics of the sensory receptors of *Lecithochirium musculus* as seen in SEM.

Sensory receptor	Morphology	Length	Width	Localization
Type 1	Domed-like fusiform structure	14 μm	8 μm	Dorsal anterior extremity
Type 2	Bulb-like monolobed or bilobed structure	3,4 to 4,8 μm	3,4 to 4,8 μm	Ventral anterior two-thirds

Type 1 sensory receptor was a domed-like fusiform structure consisting of a smooth elevation of the tegument (Figure VII.3A, B). Only four receptors of this type were present on the dorsal surface of the anterior extremity of the body, forming a square. The receptors of the upper pair were closer (38 μm) than the ones of the lower pair (59 μm) (Figure VII.3A). This receptor was made by the combination of three ovoid structures (Figure VII.3B, C). These structures seemed to be nerve bulbs filled with electron-lucent material and mitochondria. Hemispherical electron-dense collars were observed at the top of the nerve bulbs. Striated rootlets laid just beneath the hemispherical electron-dense collars. (Figure VII.3C).

Type 2 sensory receptor presented two morphological variations, i.e., a bulb-like monolobed structure (Figure VII.3D) and a bulb-like bilobed structure (Figure VII.3E, F). The

bulb-like bilobed variation was observed at a high degree of evagination (Figure VII.3E), and at a low degree of evagination (Figure VII.3F).

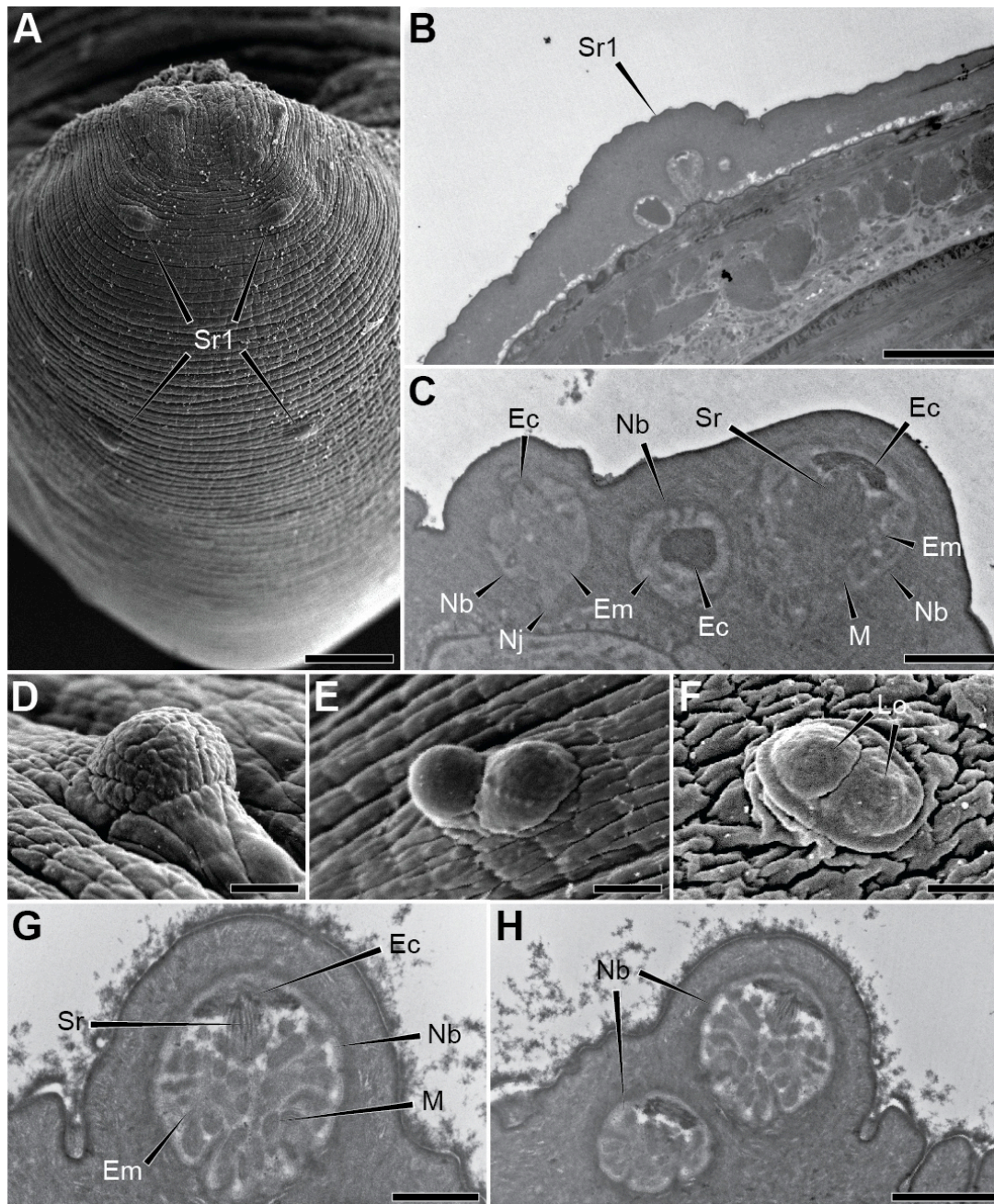


Figure VII.3 Scanning and transmission electron micrographs of the sensory receptors of *Lecithochirium musculus*. (A) Large SEM view of the anterior dorsal surface of the fluke showing the four type 1 sensory receptors forming a square. Bar = 30 μm . (B) Large TEM view of a type 1 sensory receptor showing the smooth elevation of the tegument. Bar = 10 μm . (C) Detail of the structure of a type 1 sensory receptor as seen by TEM showing (from left to right) nerve bulbs in off-axis, transversal, and longitudinal sections. Bar = 2 μm . (D) SEM view of a bulb-like monolobed type 2 sensory receptor. Bar = 4 μm . (E) SEM view of a bulb-like bilobed type 2 sensory receptor at a high degree of evagination. Bar = 4 μm . (F) SEM view of a bulb-like bilobed type 2 sensory receptor at a low degree of evagination. Bar = 3 μm . (G) Detail of the structure of a bulb-like monolobed type 2 sensory receptor as seen by TEM. Bar = 1 μm . (H) Detail of the structure of a bulb-like bilobed type 2 sensory receptor. Bar = 2 μm . Abbreviations: Ec, conical electron-dense collar; Em, electron-lucent material; Lo, lobe; M, mitochondrion; Nb, nerve bulb; Nj, nerve junction; Sr, striated rootlet; Sr1, type 1 sensory receptor.

Each lobe of this receptor possessed its own nerve bulb. Type 2 receptors were massed around the ventral sucker and on the anterior two-thirds of the ventral surface of the body. This receptor consisted of a nerve bulb connected to the nucleated region by a nerve junction (Figure VII.3G). The nerve bulb enclosed a conical electron-dense collar from which extended a striated rootlet. Electron-lucent material and mitochondria also filled the nerve bulb (Figure VII.3H).

VII.4 DISCUSSION

VII.4.1 General organization of the tegument

The tegumental organization of *L. musculus* is similar to the general tegumental structure described for digeneans (Morris & Threadgold, 1968; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000). As for the Monogenea and the Cestoidea, digenean parasites possess a distal continuous and anucleate peripheral layer making up a “sunken” epidermis, also known as a distal cytoplasm. Cytons (=cell bodies containing the nuclei) connected to the distal cytoplasm via cytoplasmic bridges (or internuncial processes) lie beneath a superficial layer of circular and longitudinal muscles (Hockley & McLaren, 1973; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000). An extracellular matrix (ECM) composed of a basal matrix and an interstitial matrix is occurring through this syncytium, between the cytons and the distal cytoplasm (Conn, 1993).

The ecsoma observed in *L. musculus* is a retractile posterior section of the body characteristic of the Hemiuridae family (Matthews & Matthews, 1988a; Gibson, 2002). According to Gibson & Bray (1979), the ecsoma could act as a feeding organ which is extended during periods when the pH or osmolarity of the stomach contents is at a tolerable level. Matthews & Matthews (1988b) indicated a clear demarcation between the function of the tegument covering the ecsoma and that of the rest of the body, or soma. Thus, the ecsomal

tegument serves for absorption and the somal tegument serves for protection against both physico-chemical conditions and mechanical damages caused by prey entering the host's stomach.

Tegumental folds, such as cytoplasmic ridges and cobblestone-like zones, could participate in nutrition by amplifying the free surface area (Paperna & Dzikowski, 2006). Cytoplasmic ridges of the tegument have also been observed in SEM micrographs of other digeneans, such as *Bucephalus anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *Fasciola hepatica* (Bennett, 1975a), and *Schistosoma mansoni* (Hockley, 1973). The contraction of longitudinal muscles are thought to impact on the presence of these ridges (Williams & McKenzie, 1995). Cobblestone-like areas of the tegument have also been described for other digeneans, such as *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *Cyclocoelum mutabile* (Tajrine *et al.*, 1999), *Heterophyopsis continua* (Hong *et al.*, 1991), *Leucochloridiomorpha constantiae* (Font & Wittrock, 1980), and *Metagonimus yokogawai* (Lee *et al.*, 1984). Matthews & Matthews (1988b) found a densely granular distal cytoplasm with an electron-dense outer membrane 0-15 µm in average thickness for the hemiurids *H. communis*, *L. rufoviride*, and *L. fusiforme*. These observations fit to our micrographs of *L. musculus*.

The glycocalyx observed on the outer membrane of *L. musculus* is thought to provide permeability control, ionic regulation, protection against host enzymes, and antibody/antigen reactions (Burton, 1966; Lumsden, 1975; Paperna & Dzikowski, 2006). In our study, the densely granular distal cytoplasm made it difficult to recover types 1 and 2 secretory bodies, usually present in the syncytium of digeneans (Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000). This dense granular cytoplasm has been mentioned in the three hemiurids studied by Matthews & Matthews (1988b), i.e., *H. communis*, *L. rufoviride*, and *L. fusiforme*. However, large secretory vesicles released via an eccrine secretion were found throughout the distal cytoplasm. Similar vesicles were observed in the distal cytoplasm of *H. communis* (Matthews

& Matthews, 1988b). These secretory vesicles are involved in the surface membrane turnover which becomes a protective device for the parasite (Threadgold, 1984).

The basal matrix of the tegument of *L. musculus* was sometimes infolded into the distal cytoplasm and numerous hemidesmosomes connected the distal cytoplasm to the basal matrix as for the tegument of *H. communis* (Matthews & Matthews, 1988b). It is accepted that many of the cells of the flatworms are connected physically to the ECM through intercellular junctions and that hemidesmosomes occur commonly in the parenchyma (Conn, 1993). Thus, basal and interstitial matrices make part of the general structure described for the tegument of digeneans (Threadgold, 1984; Conn, 1993; Roberts & Janovy, 2000). ECM, such as basal or interstitial matrices, are thought to be involved in skeletal support, nutrient storage, motility, transport, oxygen storage, and may be a source of undifferentiated cells for regeneration. It is also admitted that it can be a modified tissue for morphogenesis and that structural interactions with other tissues can occur (Conn, 1993). Cytoplasmic bridges occurring through the ECM and connecting the cytons to the distal cytoplasm were observed in the integument of *L. musculus*. On the contrary, Matthews & Matthews (1988b) did not observed any connection but assumed that they were present in the tegument of the three hemiurid trematodes they studied. Secretory vesicles and granules pass from cytons to the distal cytoplasm via cytoplasmic bridges as for the general tegumental structure described for digeneans (Hockley & McLaren, 1973; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000).

In *L. musculus*, as for other digeneans, cytons of the syncytium occur in the nucleated region of the tegument below the ECM (Morris & Threadgold, 1968; Bennett & Threadgold, 1975; Lumsden, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000; Paperna & Dzikowski, 2006). Thus, the cytons can avoid any adverse influence of the host, thereby permitting regional differentiation and specialization (Halton & Johnston, 1982a).

VII.4.2 Sensory receptors

Two types of sensory structures were observed over the body of *L. musculus*. Two morphological variations were observed for the type 2 sensory receptor. However, the small number of papillae over the body of *L. musculus* with regards to the thickness of TEM sections made it difficult to argue over the presence of a third type of sensory receptor. SEM measurements of these receptors also precluded the possible presence of a third one.

Sensory receptors are common among digeneans and have been examined in various species such as *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *Clonorchis sinensis* (Fujino *et al.*, 1979a), *Cryptocotyle lingua* (Køie, 1977), *F. hepatica* (Bennett, 1975b), *Gorgoderina vitelliloba* (Hoole & Mitchell, 1981), and *H. continua* (Hong *et al.*, 1991). However, among Digenea, intra-tegumental (or non-ciliated) sensory structures have been observed using SEM or TEM in adults of *Brachylaimus aequans* (Žd'árská *et al.*, 1990; Žd'árská, 1993), *C. sinensis* (Fujino *et al.*, 1979a), *Echinostoma paraensei* (Maldonado *et al.*, 2001), *F. hepatica* (Bennett, 1975b), *G. attenuata* and *G. bilobata* (Mata-López & Leon-Regagnon, 2006), *G. vitelliloba* (Hoole & Mitchell, 1981), *Hasstilesia tricolor* (Crites & Jilek, 1981), *Heterophyes nocens* (Chai *et al.*, 1992), *H. continua* (Hong *et al.*, 1991), *Himasthla alincia* (Han *et al.*, 2003), *Karyakartia egyptensis* (Abdou, 2008), *Leucochloridium* sp. (Bakke, 1976), *Metagonimus miyatai* (Chai *et al.*, 1998), *M. takahashii* (Chai *et al.*, 2000), *Nicolla skrajbini* (Moravec, 2009), *Paragonimus westermani* (Choi & Yoo, 1985), *Philophthalmus megalurus* (Edwards *et al.*, 1977), *Pygidiopsis summa* (Chai *et al.*, 2002), and *Transversotrema licinum* (Abdul-Salam & Sreelatha, 1992). Similar receptors have also been recovered in aspidogastreans (Halton & Lyness, 1971; Ip & Desser, 1984; Rohde & Watson, 1990; Gao *et al.*, 2003) and paramphistome digeneans (Dunn *et al.*, 1987; Brennan *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 1991; Mattison *et al.*, 1994).

The topography of the type 1 sensory receptor of *L. musculus* looks like the non-

ciliated prominent plateau of the type 5 papilla of *Paramphistomum epiclitum* (Mattison *et al.*, 1994). Moreover, both receptors are elaborately folded. Type 1 sensory receptor observed in *L. musculus* shows the combination of three nerve bulbs. However, the structure of the receptor made it difficult to obtain a micrograph with a section passing through the middle of the three nerve bulbs. Thus, considering all the TEM sections observed, a diagram showing an interpretation of the structure of the type 1 sensory receptor has been made (Figure VII.4), even if it does not constitute actual data or results.

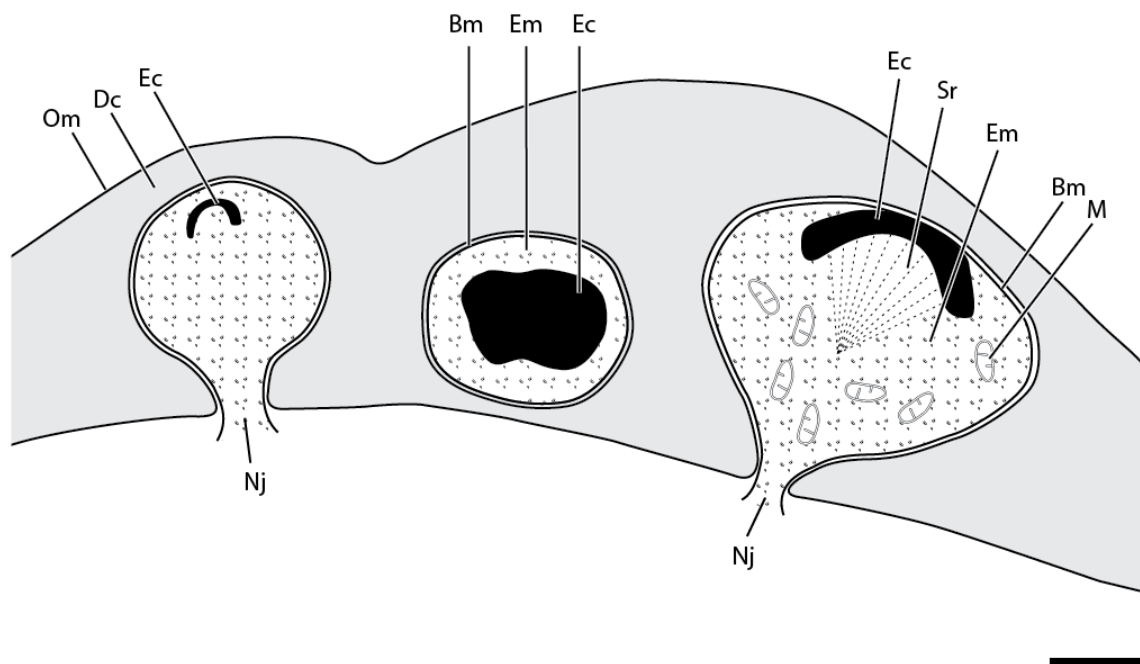


Figure VII.4 Interpretation diagram of a type 1 sensory receptor of *Lecithochirium musculus* showing (from left to right) nerve bulbs in off-axis, transversal, and longitudinal sections. Bar = 1.5 μ m. Abbreviations: Bm, bulb membrane; Dc, distal cytoplasm; Ec, hemispherical electron-dense collar; Em, electron-lucent material; M, mitochondria; Nj, nerve junction; Om, outer membrane; Sr, striated rootlet.

The nervous bulbs could be similar to the type V sensillum described for *Cotylogaster occidentalis* (Ip & Desser, 1984) as the same hemispherical electron-dense structure (or bar here) is present at the top of the striated rootlet. Type 1 sensory receptor of *L. musculus* could also be analogue to the contact receptor described for *F. hepatica* (Bennett, 1975b) but lacking the large ciliary rootlet. However, the combination of the three structures has never been observed among digeneans (Table VII.2).

Table VII.2 Similar sensory receptors structures of some other digeneans as seen in TEM.

Family	Species	Corresponding receptors		References
Fasciolidae	<i>Fasciola hepatica</i>	Domed		Bennett (1975b)
Gorgoderidae	<i>Gorgoderina vitelliloba</i>	Rosette Button		Hoole & Mitchell (1981)
Hemiuridae	<i>Lecithochirium musculus</i>	Type 1	Type 2	Present study

Our study revealed numerous type 2 sensory receptors massed around the ventral sucker and on the anterior two-thirds of the body. Each lobe of this receptor possesses its own nerve bulb. Thus, considering all the TEM sections observed, a diagram showing an interpretation of the structure of one lobe of the type 2 sensory receptor has been made (Figure VII.5), even if it does not constitute actual data or results.

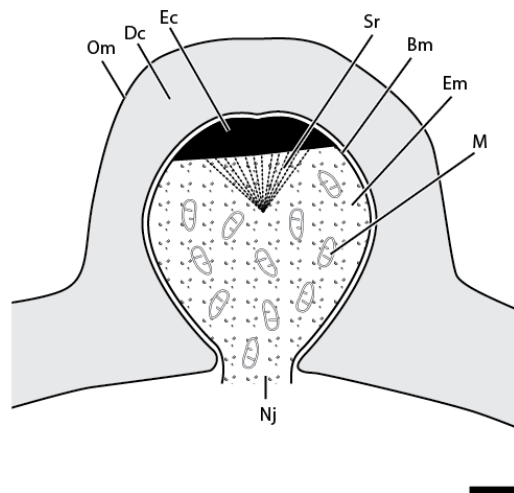


Figure VII.5 Interpretation diagram of one lobe of a type 2 sensory receptor of *Lecithochirium musculus*. Bar = 300 nm.

Abbreviations: Bm, bulb membrane; Dc, distal cytoplasm; Ec, conical electron-dense collar; Em, electron-lucent material; M, mitochondria; Nj, nerve junction; Om, outer membrane; Sr, striated rootlet.

These receptors may be involved in attachment or site identification. A similar sensory receptor has been recovered by Bennett (1975b) around the ventral sucker of *F. hepatica*, even if the topography of its “contact receptor” presents some differences (Table VII.2). Both parasites present the same neural bulb containing an electron-dense collar from which extends a striated rootlet. However, no ciliary basal body has been recovered in the type 2 sensory

receptor of *L. musculus*. The type 2 sensory receptor of *L. musculus* is similar in topography to the button papillae of the oral sucker of *G. attenuata* (Mata-López & Leon-Regagnon, 2006). It also resembles to the single major dome of the type 7 papilla of *P. epiclitum* (Mattison *et al.*, 1994). The ultrastructure of the type 2 sensory receptor of *L. musculus* is similar to the structure described for the rosette and button papillae of *G. vitelliloba* (Hoole & Mitchell, 1981) (Table VII.2). The two dense rings observed by Hoole & Mitchell (1981) in the rosette papillae and the electron-dense bodies of the button papillae could be shift views of the conical electron-dense structure observed in the type 2 sensory receptor of *L. musculus*. The absence of connection to the exterior environment observed for the two types of sensory receptors probably restrain their function as chemoreceptors. They may be specialized to respond to mechanical stimuli (Ip & Desser, 1984). According to Žd'árská & Nebesářová (2003) the lack of connection to the surface indicates that non-ciliate receptors are possibly mechanoreceptors, serving to respond to compression. Several authors suggest that domed or button-like papillae may function as contact receptors (Bakke, 1976; Fujino *et al.*, 1979a; Hoole & Mitchell, 1981). As for *C. metoecus* (Žd'árská & Nebesářová, 2003), type 2 sensory receptor of *L. musculus* are close to the receptors of adult aspidogastreae. The homogeneous distribution of the two types of sensory receptors in *L. musculus* may indicate site-specificity in the distribution of these receptors. Site-specificity in the distribution of sensory receptors has also been reported in other digenean species (Bogea & Caira, 2001; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004; Mata-López & Leon-Regagnon, 2006). Most of the receptors are concentrated in the anterior third of the fluke, which contains oral and ventral suckers. Thus, the distribution of the sensory receptors relates well to the behaviour of the worm because the parasite tends to attach to the host via the ventral sucker and probes the near environment with the oral one.

CHAPITRE VIII

TOPOGRAPHY AND ULTRASTRUCTURE OF THE TEGUMENT OF *DEROPRISTIS INFLATA* MOLIN, 1859 (DIGENEA: DEROPRISTIDAE), A PARASITE OF THE EUROPEAN EEL *ANGUILLA ANGUILLA* (OSTEICHTHYES: ANGUILLIDAE)

Jean-José Filippi, Yann Quilichini et Bernard Marchand

Ce chapitre fait l'objet d'un article paru dans la revue Parasitology Research (IF=2.15).

DOI: 10.1007/s00436-012-3162-9.

VIII.1 INTRODUCTION

According to Threadgold (1984), the tegument is considered to be the major host-parasite interface. It is involved in protection against host enzymes and immune systems, excretion processes, and absorption of nutrients (Burton, 1966; Lumsden, 1975; Threadgold, 1984; Paperna & Dzikowski, 2006). It may also be involved in ion regulation and osmoregulation (Threadgold, 1984) which makes it a living, complex tissue (Roberts & Janovy, 2000). According to Halton (2004), microscopy has for long dramatically expanded horizons in the field of helminthology by providing fundamentally important information on the structure and functional correlates of a number of key organ systems of helminths such as their body surface. Detailed studies on the ultrastructural characteristics of digeneans can provide useful information in the taxonomic study of the groups (Mata-López & Leon-Regagnon, 2006). Moreover, Bakke & Lien (1978) and Southgate *et al.* (1986) considered the microtopographical features, such as papillae, spines and tubercles as taxonomically aspects of adult trematodes.

Among Digenea, studies on tegumental sensory structures mainly focused on cercaria or metacercaria stages (Fujino *et al.*, 1979b; Matthews & Matthews, 1988a; Žd'árská, 1992; Bogea & Caira, 2001; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004; Poddubnaya *et al.*, 2010) as they require orientation to stimuli such as light and gravity more than adults do, a condition related to the necessity of finding a host quickly (Roberts & Janovy, 2000). However, some authors have emphasized the description of tegumental structures of adult digeneans (Žd'árská, 1993; Ferrer *et al.*, 1996; Ibraheem, 2000; Filippi *et al.*, 2010, 2012). Electron microscopy techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) are of a particular interest in the description of tegumental structures. Indeed, SEM can provide data on the external morphology and localization of these structures,

while TEM allows ultrastructural investigations at a cellular level. Thus, the combination of both techniques provides a full range morphological description of the tegumental structures.

Among Digenea, the Deropristidae Cable & Hunninen, 1942 is a small group of digeneans parasitic mainly in the spiral intestine of chondrosteans and, occasionally, the intestine of teleosts in euryhaline conditions in the eastern Nearctic and western Palaearctic region (Choudhury & Dick, 1998; Jones *et al.*, 2005). The genus *Deropristis* has been considered as belonging to families such as the Lepocreadiidae Odhner, 1905 (Cable & Hunninen, 1942), or the Acanthocolpidae Lühe, 1906 (Yamaguti, 1971). Most recent authors have recognized its belonging to the family Deropristidae (Choudhury & Dick, 1998; Jones *et al.*, 2005). Among the Deropristidae, *Deropristis inflata* is the only species that have been studied using SEM (Dezfuli *et al.*, 1997; Kanev *et al.*, 1999). However, the authors focused on the collar region of the fluke and its tegumentary spines. No TEM study has been made on the tegument of a deropristid.

The aim of this study is to investigate the tegument of *D. inflata* using SEM and TEM giving special consideration to the morphology and distribution of sensory receptors. To our knowledge, no electron microscope study using both techniques has been made on the tegument of a trematode of the Deropristidae family.

VIII.2 MATERIALS AND METHODS

VIII.2.1 Specimen collection

Adult specimens of *D. inflata* were collected alive from the intestine of 20 eels (*Anguilla anguilla*) obtained from fishermen of the Urbino lagoon, Corsica, France (42°03'N, 9°28'E) on November 2011. The fish were brought alive to the laboratory, anesthetized in 0.1 mL.L⁻¹ Eugenol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany), and dissected the day of the capture. During necropsy, helminths from the intestine were collected alive and prepared

for SEM and TEM observations at the “Service d’Étude et de Recherche en Microscopie Électronique” of the University of Corsica Pascal Paoli.

VIII.2.2SEM

A total of 35 adult flukes were fixed for at least 1 hour in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. Specimens were then dehydrated in a graded acetone series and dried with the use of CO₂ in an Emitech K850 critical point dryer (Quorum Technologies Ltd, Ashford, United Kingdom). Specimens were mounted on aluminium stubs with carbon double-sided adhesive discs. Specimens were then coated with gold/palladium in a Quorum Technologies SC7640 sputter coater (Quorum Technologies Ltd, Ashford, United Kingdom) and examined with the use of a Hitachi S-3400N scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 5 kV.

VIII.2.3TEM

Transverse sections of ten adult flukes were made and fixed for at least 1 hour in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, dehydrated in ethanol and propylene oxide, embedded in Spurr (1969), and then polymerized at 60°C for 24 hours. Ultrathin sections (60 nm in thickness) were obtained with the use of an RMC Boeckeler Power Tome PC ultramicrotome (Boeckeler Instruments, Inc., Tucson, AZ) placed on 300-mesh copper grids, and double stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963). The sections were examined with the use of a Hitachi H-7650 transmission electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 80 kV.

VIII.3 RESULTS

VIII.3.1 General organization of the tegument

Scanning electron microscopy : The body of *D. inflata* was fusiform. The forebody was concave ventrally. Cytoplasmic ridges covered the body surface. The fluke was characterized by the presence of an oral collar opening ventrally and expanding laterally. The fluke possessed two suckers (Figure VIII.1A, B). The oral sucker was situated at the anterior extremity on the ventral surface (Figure VIII.1A, B). The ventral sucker was located on the anterior third of the body, posterior to the oral collar (Figure VIII.1A). Cobblestone-like units of the tegument were present on the anterior extremity of the body on a semicircle-shaped formation, above the mouth (Figure VIII.1C). Numerous closely packed claw-shaped spines protruded from holes in the surface between cytoplasmic ridges (Figure VIII.1A). Spines were spread on the whole body surface except on the oral and ventral suckers, the semicircle-shaped formation above the oral sucker, and the posterior extremity (Figure VIII.1A-C). Overall spine density decreased from the anterior extremity to the posterior one (Figure VIII.1A). Particular arrangements and variations in the morphology of spines were observed over the whole body surface. Circumoral rings of spines were observed on the anterior extremity (Figure VIII.1B). Two large rows of collar spines were observed following the antero-posterior axis of the fluke body, one on each lateral edge of the oral collar (Figure VIII.1D). On the anterior dorsal side, a tegumental excrescence was observed (Figure VIII.1E). Sparse spines were observed on the ventral area between the two lateral edges of the oral collar, below the oral sucker, and on either side of the collar rows of spines (Figure VIII.1A, D, E). Only one ring of spines was also observed surrounding the ventral sucker (Figure VIII.2A). Furthermore, the area linking the ventral sucker to the rest of the body lacked spines except on the posterior side where sparse ones were observed (Figure VIII.2A).

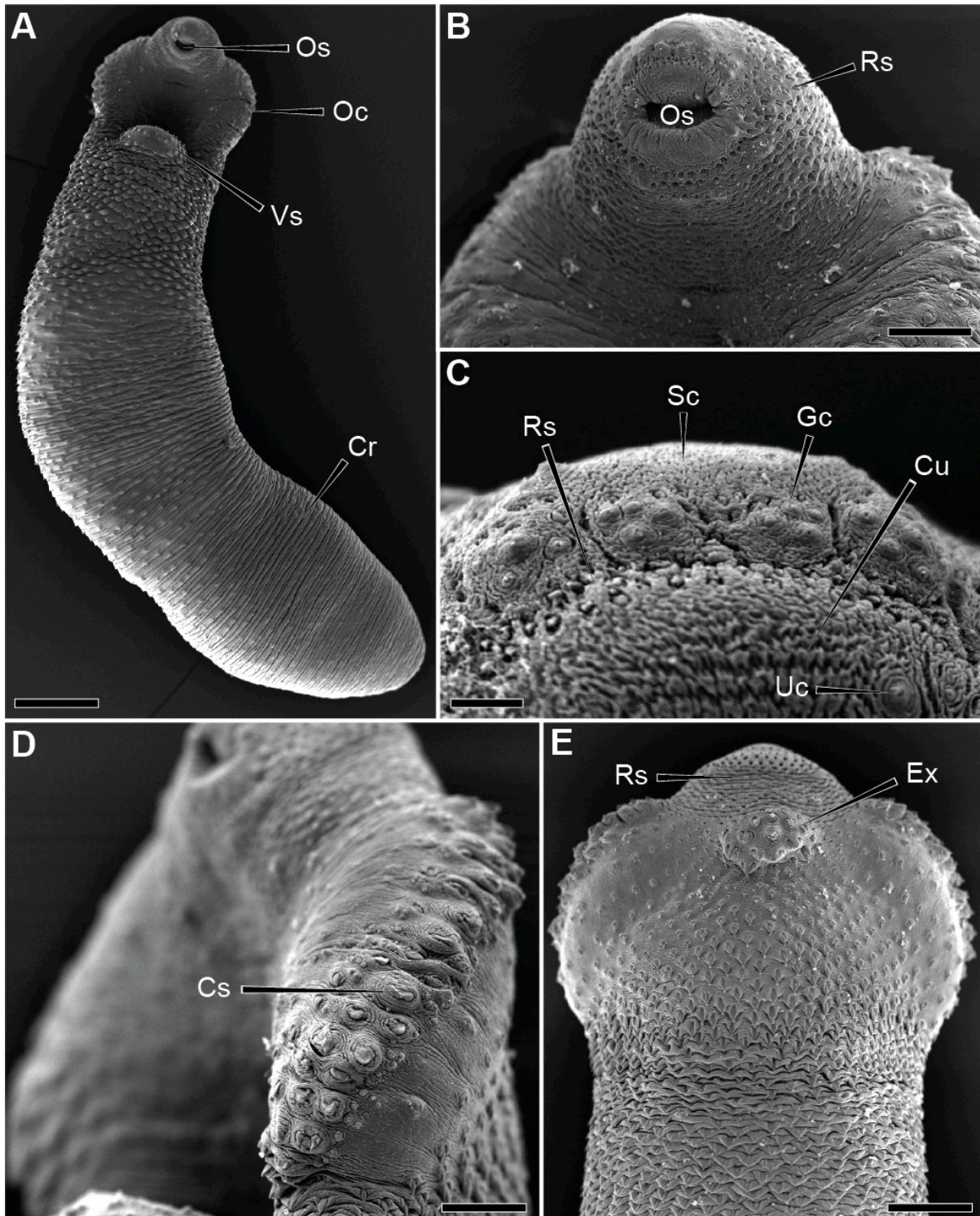


Figure VIII.1 Scanning electron micrographs of *Deropristis inflata* tegument. (A) Ventral view of the fluke. Bar = 150 μ m. (B) Detail of the oral sucker surrounded by circumoral rings of spines. Bar = 40 μ m. (C) Detail of the semicircle-shaped formation above the oral sucker showing sensory receptors. Bar = 60 μ m. (D) Detail of a lateral edge of the oral collar showing a row of large collar spines. Bar = 40 μ m. (E) Dorsal view of the anterior extremity of the fluke showing the tegumental excrescence. Bar = 60 μ m. Abbreviations: Cr, cytoplasmic ridge; Cs, collar spine; Cu, cobblestone-like unit of the tegument; Ex, tegumental excrescence; Gc, group of unciliated sensory receptors; Oc, oral collar; Os, oral sucker; Rs, ring of spines; Sc, semicircle-shaped formation; Uc, unciliated sensory receptor; Vs, ventral sucker.

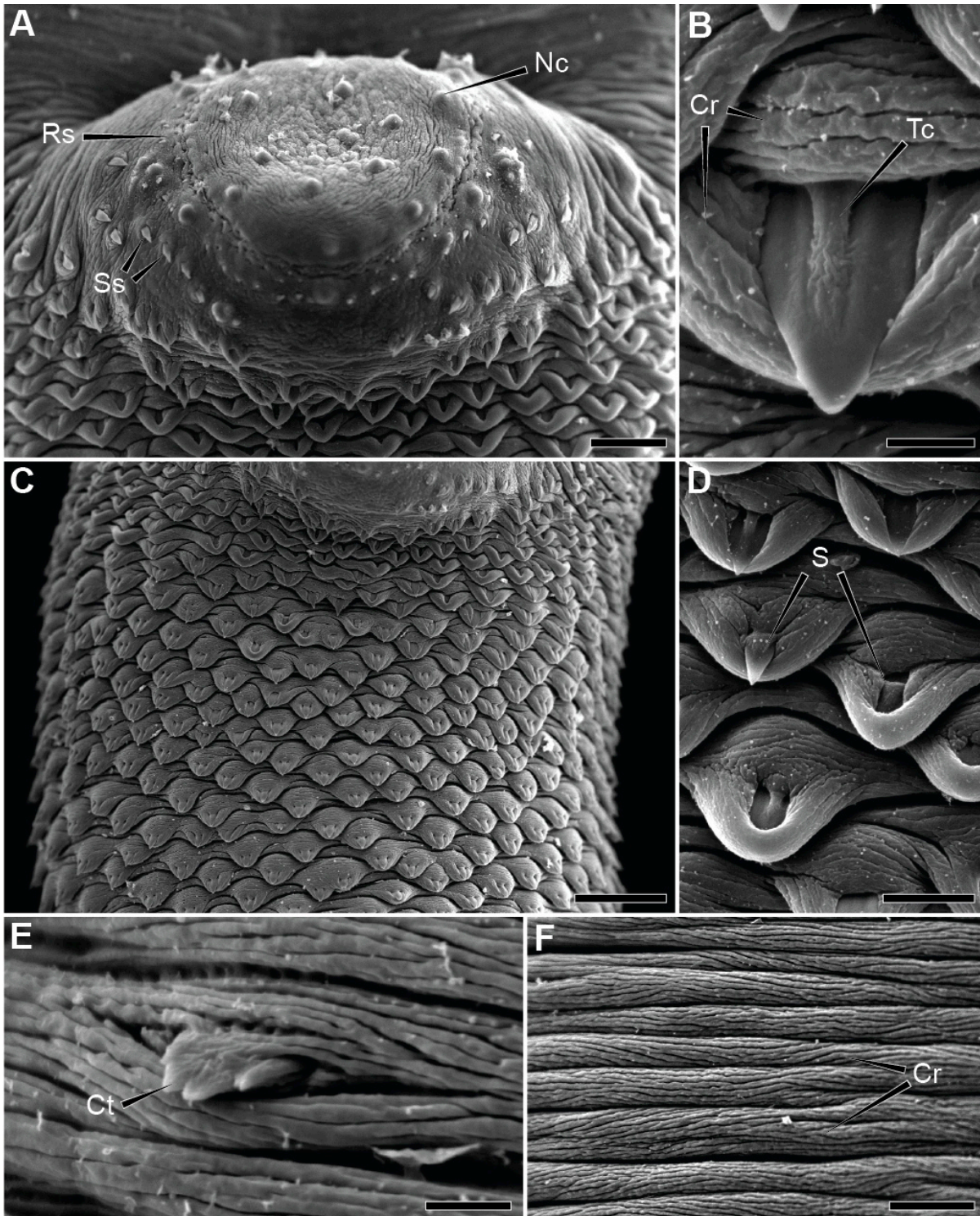


Figure VIII.2 Scanning electron micrographs of *Deropristis inflata* tegument. (A) Detail of the ventral sucker showing the ring of spines. Sparse spines are visible on the posterior side of the area linking the sucker to the rest of the body. Bar = 20 μm . (B) Detail of a thorn-like spine protruding between cytoplasmic ridges. Bar = 3 μm . (C) Detail of the median region of the fluke body showing staggered rows of spines. Bar = 40 μm . (D) Detail of cytoplasmic ridges covering spine tips just below the ventral sucker. Bar = 9 μm . (E) Detail of the crenelated tip of a spine protruding between cytoplasmic ridges in the posterior third of the body. Bar = 3 μm . (F) Detail of the posterior extremity showing the highly folded smooth tegument. Bar = 9 μm . Abbreviations: Cr, cytoplasmic ridge; Ct, crenelated tip; Nc, non-ciliated sensory receptor; Rs, ring of spines; S, spine; Ss, sparse spines; Tc, tegumental connection.

Regarding the morphology of body spines, they were thorn-like, curved anterior-posteriorly, and dorso-ventrally flattened. Spines were about 8 μm in length and 5 μm in width. A prominent tegumental connection linked the upper cytoplasmic ridge with the top of the rising spine (Figure VIII.2B). Over the body, spines were arranged in staggered rows (Figure VIII.2C). Just below the ventral sucker and toward the posterior extremity, spines seemed to be sunk into the tegument with their tips covered by the lower cytoplasmic ridges (Figure VIII.2D). Within the posterior third of the body, spines were about 3 μm in length, 4 μm in width, and showed a crenelated tip (Figure VIII.2E). At the posterior extremity, no spines were observed rising from the numerous cytoplasmic ridges (Figure VIII.2F).

Transmission electron microscopy : The tegument of *D. inflata* had a syncytial organization. It was composed of a distal cytoplasm delimited by an outer membrane and an inner basal matrix. The cytoplasm laid over a nucleated region with circular and longitudinal muscle layers, interstitial matrix, and cytons producing secretory granules (Figure VIII.3A). The external layer was composed of a glycocalyx on an electron-dense outer membrane about 100 nm thick (Figure VIII.3B). The outer membrane delimited a distal cytoplasm about 7.6 μm thick (Figure VIII.3A). The distal cytoplasm contained numerous mitochondria and secretory vesicles (Figure VIII.3B). Numerous spines were inserted in the distal cytoplasm (Figure VIII.3A, C). A basal plate, which consisted of an increase in the density of the spine matrix, was observed at the spine base (Figure VIII.3C). A basal matrix about 100 nm thick lay beneath the distal cytoplasm. This matrix separated the distal cytoplasm from the nucleated region (Figure VIII.3A). A layer of interstitial matrix was lying just below the basal matrix in the nucleated region (Figure VIII.3A, C). Evaginations of the basal matrix into the interstitial matrix region were observed (Figure VIII.3D). The interstitial matrix was composed of an irregular arrangement of microfibrils (Figure VIII.3C, D) and surrounded circular and longitudinal muscle layers (Figure VIII.3A, E).

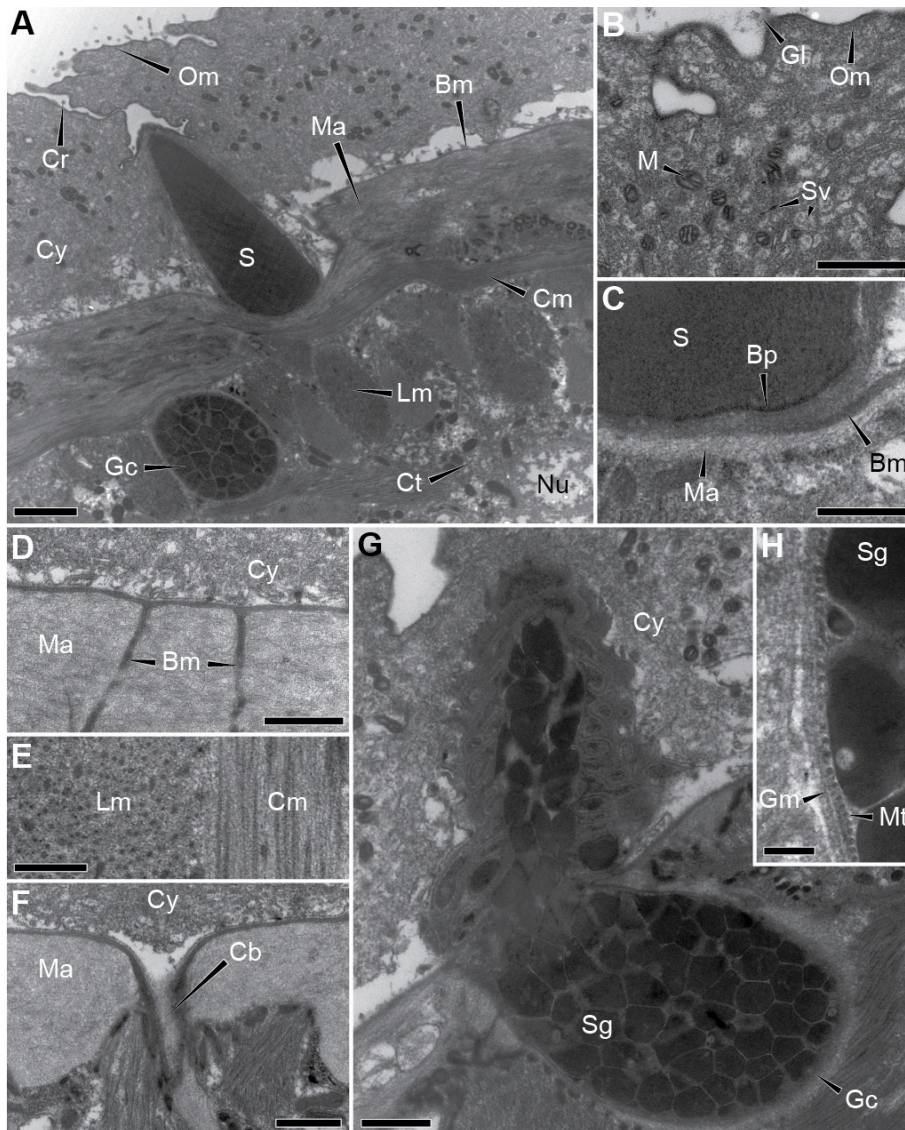


Figure VIII.3 Transmission electron micrographs of *Deropristis inflata* tegument. (A) General organization of the tegument. Bar = 2 μ m. (B) Detail of the external region of the distal cytoplasm. Bar = 1 μ m. (C) Detail of spine insertion in the inner region of the distal cytoplasm. Bar = 500 nm. (D) Inner region of the distal cytoplasm showing evaginations of the basal matrix into the interstitial matrix. Bar = 1 μ m. (E) Detail of the longitudinal and circular muscle layers of the nucleated region. Bar = 500 nm. (F) Detail of a cytoplasmic bridge linking the distal cytoplasm to the nucleated region of the tegument. Bar = 1 μ m. (G) Detail of a large gland cell releasing secretory granules into the distal cytoplasm. Bar = 1 μ m. (H) Detail of microtubules and membrane of a gland cell enclosing secretory granules. Bar = 250 nm. Abbreviations: Bm, basal matrix; Bp, basal plate; Cb, cytoplasmic bridge; Cm, circular muscle layers; Cr, cytoplasmic ridge; Ct, cyton; Cy, distal cytoplasm; Gc, gland cell; Gl, glycocalyx; Gm, gland cell membrane; Lm, longitudinal muscle layers; M, mitochondrion; Ma, interstitial matrix; Mt, microtubule; Nu, nucleated region; Om, outer membrane; S, spine; Sg, secretory granule; Sv, secretory vesicle.

Cytoplasmic bridges regularly interrupted the basal and interstitial matrices (Figure VIII.3F). Gland cells containing secretory granules migrating from the nucleated region to the distal cytoplasm passed through these cytoplasmic bridges (Figure VIII.3G). Numerous cortical microtubules were observed lying below the membrane of gland cells (Figure

VIII.3H). The deeper layer of the tegument consisted of cytons of various shape and size (Figure VIII.3A) producing the secretory vesicles observed in the distal cytoplasm (Figure VIII.3B).

VIII.3.2 Sensory receptors

SEM and TEM observations over the body surface of *D. inflata* revealed the presence of two types of sensory receptors (Table VIII.1).

Table VIII.1 Morphological characteristics of the sensory receptors of *Deropristis inflata* as seen in SEM.

Sensory receptor	Morphology	Length (µm)	Width (µm)	Localization
Type 1	Button-like ciliated structure	4	4	Anterior third
Type 2	Smooth bulb-like structure	4.2-4.6	4.2-4.6	Ventral sucker

Type 1 : This receptor was recovered on the anterior third of the body. Type 1 sensory receptors were observed associated with one to three receptors of the same type in a single papilla. This combination was observed in two separate rows of grouped type 1 sensory receptors starting from the ventral side of the oral collar and ending near the mouth (Figure VIII.4A). Furthermore, a crown of grouped type 1 sensory receptors was observed surrounding the oral sucker (Figures VIII.1C, 4A). Type 1 sensory receptors were also observed alone surrounding the oral sucker (Figure VIII.1C) or on the ventral/dorsal sides of the lateral edges of the oral collar (Figures VIII.1D, VIII.4B). This sensory receptor consisted of a button-like unciliated papilla mounted on a folded tegumental base and surrounded by cytoplasmic ridges (Figure VIII.4C, D). As seen in TEM, this receptor consisted of a nerve bulb (or more if grouped) (Figure VIII.4E) from which a cilium extended from a centriole. An attachment site connected this structure to the top of the bulb. Thus, a hemidesmosome connected the top of the bulb to the distal cytoplasm and an electron-dense collar surrounded the centriole (Figures VIII.4F, VIII.5).

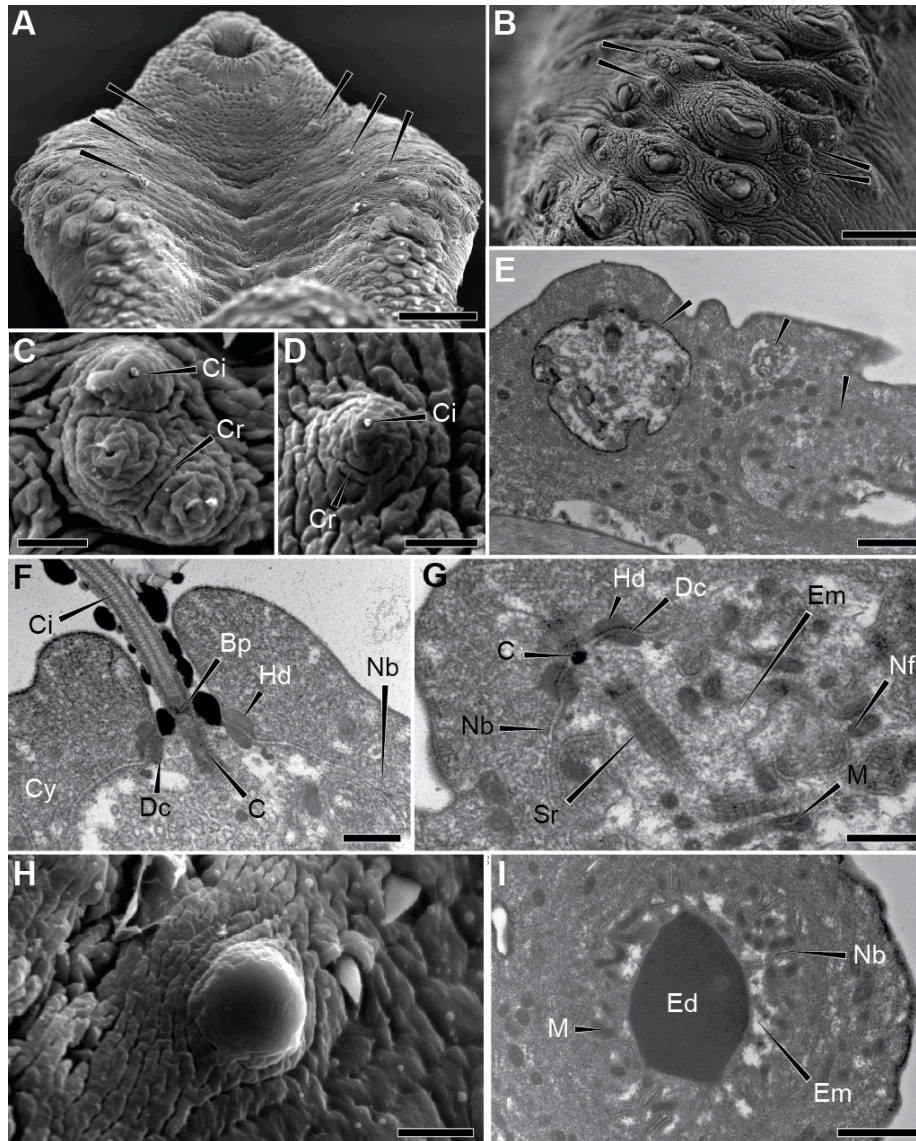


Figure VIII.4 Scanning and transmission electron micrographs of the sensory receptors of *Deropristis inflata*. (A) Large SEM view of the anterior ventral surface of the fluke showing the two rows of groups of type 1 sensory receptors (arrowheads) starting near the bottom of the oral collar and ending in the oral sucker area. Circumoral ring of these groups of type 1 sensory receptors is also visible. Bar = 50 μ m. (B) Detail of a lateral edge of the oral collar showing collar spines surrounded by sensory receptors (arrowheads). Bar = 16 μ m. (C) SEM view of three button-like unciliated type 1 sensory receptors grouped in a single papilla surrounded by cytoplasmic ridges. Bar = 3 μ m. (D) SEM view of a button-like unciliated type 1 sensory receptor surrounded by cytoplasmic ridges (arrowhead). Bar = 3 μ m. (E) Detail of the structure of a group of type 1 sensory receptor as seen by TEM showing three nerve bulbs (arrowheads) in the distal cytoplasm. Bar = 1 μ m. (F) Detail of the top of a type 1 sensory receptor nerve bulb as seen by TEM showing the junctional complex. Bar = 500 nm. (G) General view a type 1 sensory receptor nerve bulb as seen by TEM showing the junctional complex and the striated rootlet surrounded by mitochondria and nerve fibers. Bar = 500 nm. (H) SEM view of a bulb-like non-ciliated type 2 sensory receptor. Bar = 3 μ m. (I) Detail of the structure of a type 2 sensory receptor as seen by TEM showing the ovoid electron-dense structure enclosed in the nerve bulb. Bar = 1 μ m. Abbreviations: Bp, basal plate; C, centriole; Ci, cilium; Cr, cytoplasmic ridge; Cy, distal cytoplasm; Dc, dense collar; Ed, electron-dense structure; Em, electron-lucent material; Hd, hemidesmosome; M, mitochondrion; Nb, nerve bulb; Nf, nerve fiber; Sr, striated rootlet.

The nerve bulb was filled with electron-lucent material containing numerous mitochondria and nerve fibers. A long striated rootlet laid just beneath the centriole (Figures VIII.4G, VIII.5).

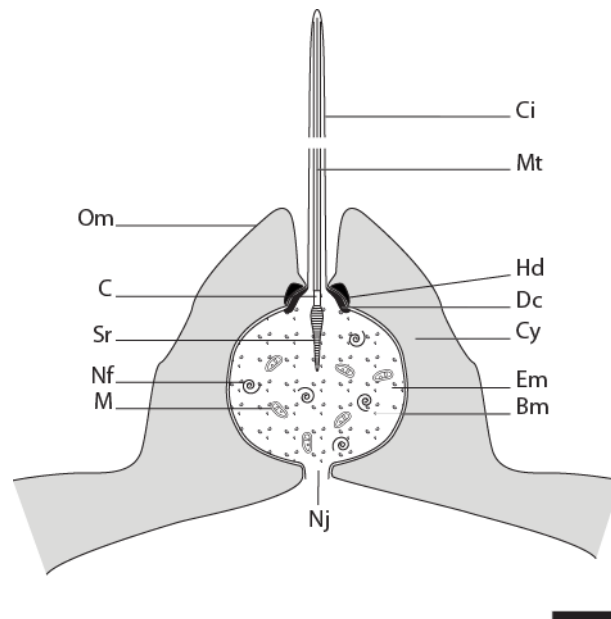


Figure VIII.5 Interpretation diagram of a type 1 sensory receptor of *Deropristis inflata*. Bar = 2 μ m. Abbreviations: Bm, bulb membrane; C, centriole; Ci, cilium; Cy, distal cytoplasm; Dc, dense collar; Em, electron-lucent material; Hd, hemidesmosome; M, mitochondrion; Mt, microtubule; Nf, nerve fiber; Nj, nerve junction; Om, outer membrane; Sr, striated rootlet.

Type 2 : This receptor was a smooth bulb-like non-ciliated papilla (Figure VIII.4H), and was only recovered on the ventral sucker (Figure VIII.2A). As seen in TEM, this receptor consisted of a nerve bulb enclosing an ovoid electron-dense structure. Inside the nerve bulb, numerous mitochondria and some electron-lucent material were observed lying next to the bulb membrane. Numerous invaginations of the bulb membrane were observed (Figures VIII.4I, VIII.6).

The main locations of these two types of sensory receptors are summarized in Figure VIII.7.

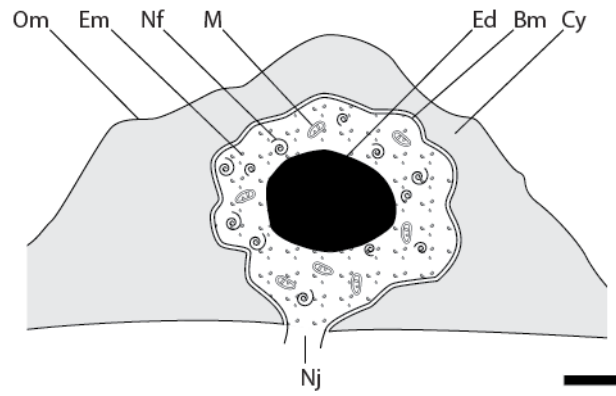


Figure VIII.6 Interpretation diagram of a type 2 sensory receptor of *Deropristis inflata*. Bar = 1 μm . Abbreviations: Bm, bulb membrane; Cy, distal cytoplasm; Ed, electron-dense structure; Em, electron-lucent material; M, mitochondrion; Nf, nerve fiber; Nj, nerve junction; Om, outer membrane.

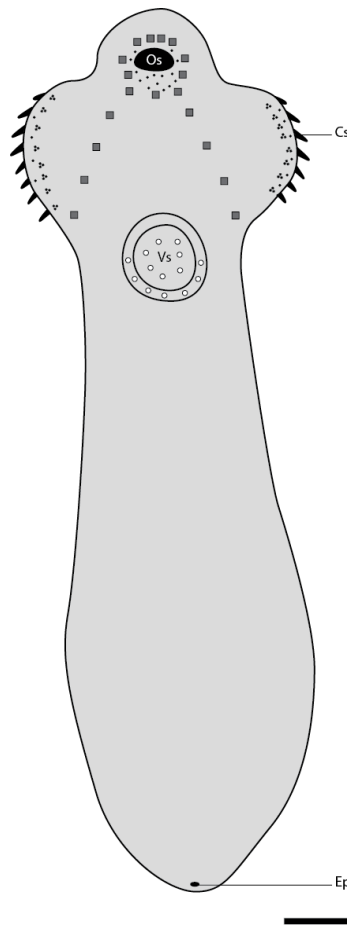


Figure VIII.7 Interpretation diagram showing the main locations of type 1 sensory receptors (black dots), groups of type 1 sensory receptors (gray squares), type 2 sensory receptors (white circles) of *Deropristis inflata* over the fluke body. Bar = 75 μm . Abbreviations: Cs, collar spine; Ep, excretory pore; Os, oral sucker; Vs, ventral sucker.

VIII.4 DISCUSSION

VIII.4.1 General organization of the tegument

The tegumental organization of *D. inflata* is similar to the general tegumental structure described for digeneans (Morris & Threadgold, 1968; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000). As for the Monogenea and the Cestoidea, digenean parasites possess a distal continuous and anucleate peripheral layer making up a “sunken” epidermis, also known as a distal cytoplasm. Cytons (cell bodies containing the nuclei) connected to the distal cytoplasm via cytoplasmic bridges (or internuncial processes) lie beneath a superficial layer of circular and longitudinal muscles (Hockley & McLaren, 1973; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000). An extracellular matrix (ECM) composed of a basal matrix and an interstitial matrix is occurring through this syncytium, between the cytons and the distal cytoplasm (Conn, 1993). Tegumental folds, such as cytoplasmic ridges and cobblestone-like zones, could participate in nutrition by amplifying the free surface area (Paperna & Dzikowski, 2006). Cytoplasmic ridges of the tegument have also been observed in SEM micrographs of other digeneans, such as *Bucephalus anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *Fasciola hepatica* (Bennett, 1975a), *Lecithochirum musculus* (Filippi *et al.*, 2012), and *Schistosoma mansoni* (Hockley, 1973). The contraction of longitudinal muscles is thought to impact on the presence of these ridges (Williams & McKenzie, 1995). Cobblestone-like areas of the tegument have also been described for other digeneans, such as *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *L. musculus* (Filippi *et al.*, 2012), *Cyclocoelum mutabile* (Tajrine *et al.*, 1999), *Heterophyopsis continua* (Hong *et al.*, 1991), *Leucochloridiomorpha constantiae* (Font & Wittrock, 1980), and *Metagonimus yokogawai* (Lee *et al.*, 1984). Such mechanisms increasing the surface area of the body would be beneficial in large, stout worms, which have a much lower surface/volume ratio than smaller species (Dias *et al.*, 2003).

The glycocalyx observed on the outer membrane of *D. inflata* is thought to provide permeability control, ionic regulation, protection against host enzymes, and antibody/antigen reactions (Burton, 1966; Lumsden, 1975; Paperna & Dzikowski, 2006).

Secretory bodies are usually present in the syncytium of digeneans (Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000). These secretory vesicles are involved in the surface membrane turnover which becomes a protective device for the parasite (Threadgold, 1984). Secretory vesicles have been recorded in other adult digeneans such as *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *F. hepatica* (Bennett & Threadgold, 1975), *Proisorhynchoides arcuatus* (Cohen *et al.*, 1996), *Zoogonoides viviparus* (Køie, 1971) and *Zygocotyle lunata* (Irwin *et al.*, 1991). Secretory vesicles probably contribute to the formation and maintenance of the glycocalyx (Bogitsh, 1968; Shannon & Bogitsh, 1971). Others authors have suggested that they are involved in maintenance of the outer membrane or in immuno-protection (Lumsden, 1975; Hanna, 1980a, b). Secretory vesicles pass from cytons to the distal cytoplasm with the use of cytoplasmic bridges such as for *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010) and *S. mansoni* (Hockley & McLaren, 1973).

Large secretory granules enclosed by microtubules in gland cells are common in the *D. inflata* tegument. Similar structures were also recorded in the tegument of other trematodes (Halton & Dermott, 1967; Halton & Lyness, 1971; Swarup & Jain, 1984; Filippi *et al.*, 2010) and other flatworms (Jones & Beveridge, 1998). According to Whittington & Cribb (2001) similar secretions are may be involved in adhesion to the host mucosa.

The basal matrix of the tegument of *D. inflata* was observed infolded into the interstitial matrix. Generally, such structures are considered to be characteristic of epithelia specializing in active transport (Halton, 1972). It is accepted that many of the cells of the flatworms are connected physically to the ECM through intercellular junctions (Conn, 1993). Thus, basal and interstitial matrices make part of the general structure described for the

tegument of digeneans (Threadgold, 1984; Conn, 1993; Roberts & Janovy, 2000). ECM, such as basal or interstitial matrices, are thought to be involved in skeletal support, nutrient storage, motility, transport, oxygen storage, and may be a source of undifferentiated cells for regeneration. It is also accepted that it can be a modified tissue for morphogenesis and that structural interactions with other tissues can occur (Conn, 1993). Cytoplasmic bridges occurring through the ECM and connecting the cytons to the distal cytoplasm were observed in the integument of *D. inflata* as for the general tegumental structure described for digeneans (Hockley & McLaren, 1973; Bennett & Threadgold, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000).

In the tegument of *D. inflata*, as for other digeneans, cytons of the syncytium occur in the nucleated region of the tegument below the ECM (Morris & Threadgold, 1968; Bennett & Threadgold, 1975; Lumsden, 1975; Threadgold, 1984; Roberts & Janovy, 2000; Paperna & Dzikowski, 2006). Thus, the cytons can avoid any adverse influence of the host, thereby permitting regional differentiation and specialization (Halton & Johnston, 1982a).

VIII.4.2 Spines

The shape and distribution of tegumental spines are related to the size or shape of worms and their migration pattern (Lee *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1987). *D. inflata* spines are thought to be an intermediate form between the tegumentary spines of acanthostome parasites of fish and the tegumentary spines of echinostome parasites of birds (Dezfuli *et al.*, 1997). Dezfuli *et al.* (1992) also observed a decrease in spine density in the ventral part of the small portion between the two suckers, while the lateral spines of this region are bigger and stockier than any other spine observed on the entire body surface. However, in their previous study, Dezfuli *et al.* (1992) observed two rings of circumferential spines around the ventral sucker when we only found one. The spines they observed were also slightly shorter (6 μm) than those observed in the present study (8 μm). Circumoral rings of spines are widely spread and

typical for parasites of fish (Yamaguti, 1971). However, Jones *et al.* (2005) mentioned the absence of circumoral rings of spines in their key to the determination of the genus *Deropristis* while other authors recovered such structures (Cable & Hunninen, 1942; Dezfuli *et al.*, 1992; Dezfuli *et al.*, 1997). Spines with a crenelated tip were recovered over the posterior extremity of the body of *D. inflata*. Similar spines were also recovered on the body surface of *Karyakartia egyptensis* (Abdou, 2008). Differences in spine structures and their distribution over the body may involve a significant difference in host-parasite relationships (Chai *et al.*, 2000). K oie (1977) suggested that large pointed spines may be involved in feeding, with spines acting as abrasive structures for host tissue. In contrast, Senft *et al.* (1961) and Lumsden (1975) opined that spines aided in attachment to the host tissue. Some authors also argued that spines could operate in locomotion (Bennett, 1975b; Ursone & Fried, 1995). TEM micrographs of *D. inflata* revealed increased opacity at the base of the spines. These are thought to be involved in spine motility (Bennett & Threadgold, 1975; Abbas & Cain, 1987; Ferrer *et al.*, 2001). Dezfuli *et al.* (1992) showed that the presence of spines on the body surface of *D. inflata* increase the damage to intestinal folds of the eel. Thus, damages to the mucosal structure can affect the absorptive efficiency of the eel's alimentary canal making *D. inflata* responsible for a physiological dysfunction of the *A. anguilla* digestive tract. No spines were recovered on the ventral sucker of *D. inflata*. According to Bakke (1976) and Bennett (1975b), the absence of spines may be less irritating for the host mucosa. The decrease in spine density on the non-feeding sucker (the oral sucker encircled the mouth here) may be related to a specialization of the area which facilitates attachment to the host tissue without causing damage (Pandey & Tewari, 1984).

VIII.4.3 Sensory receptors

The tegument of *D. inflata* bears numerous sensory papillae scattered over the body. Sensory receptors are common and varied among digeneans. These structures have been

studied in species such as *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010), *Clonorchis sinensis* (Fujino *et al.*, 1979a), *Cryptocotyle lingua* (Køie, 1977), *F. hepatica* (Bennett, 1975b), *Gorgoderina vitelliloba* (Hoole & Mitchell, 1981), *H. continua* (Hong *et al.*, 1991), and *L. musculus* (Filippi *et al.*, 2012). According to Halton (2004), these structures represent the terminations of fine nerve processes that extend from the peripheral nervous system to the base of the body surface layer.

Our study showed the presence of two types of sensory structures. Uniciliated sensory structures have been observed in various monogeneans and digeneans, both singly or grouped, and with short or long cilia (Williams & McKenzie, 1995; Han *et al.*, 2003; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004). According to Dunn *et al.* (1987), these structures may function as tango-, rheo-, or chemo-receptors. Moreover, Bennett (1975b) suggested that cilia may be capable of recording the direction and degree of any pressure acting on the spines as they are protruding to the same height as the surrounding spines. Ultrastructural characters, such as tegumentary collar and cilium lengths, provide additional information on the mechanosensitivity of sensory receptors (Bogea & Cairra, 2001). Type 1 receptors, mainly concentrated around the oral sucker, may thus, for example, be involved in attachment or site recognition. Type 1 sensory receptor possessed a typical ultrastructural configuration similar to those observed for other digeneans (Table VIII.2) even though small modifications appeared in the junctional complex. The long striated rootlet observed in the nerve bulb of the type 1 sensory receptor of *D. inflata* is similar to the one observed in the type II receptor of *Crepidostomum metoecus* (Žd'árská & Nebesářová, 2004). Moreover, type 1 sensory receptor of *D. inflata* is similar to the type 3 papilla of *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010). The type 1 papilla of *B. anguillae* (Filippi *et al.*, 2010) could have been similar to the type 1 sensory receptor of *D. inflata*, however no conical electron-dense structure was observed here.

Table VIII.2 Similar sensory receptors structures of some other digeneans as seen in TEM.

Family	Species	Corresponding receptors		References
Allocreadiidae	<i>Crepidostomum metoecus</i>	Type I		Žd'árská & Nebesářová (2004)
Bucephalidae	<i>Bucephalus anguillae</i>	Type 3		Filippi <i>et al.</i> (2010)
Deropristidae	<i>Deropristis inflata</i>	Type 1	Type 2	Present study
Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	Type 3		Žd'árská (1992)
Gorgoderidae	<i>Gorgoderina vitelliloba</i>		Domed papilla	Hoole & Mitchell (1981)
Opisthorchiidae	<i>Clonorchis sinensis</i>		Type C	Fujino <i>et al.</i> (1979a)

Among Digenea, intra-tegumental (or non-ciliated) sensory structures have been observed using SEM or TEM in adults of *Brachylaimus aequans* (Žd'árská *et al.*, 1990; Žd'árská, 1993), *C. sinensis* (Fujino *et al.*, 1979a), *Echinostoma paraensei* (Maldonado *et al.*, 2001), *F. hepatica* (Bennett, 1975b), *Gorgoderina attenuata* and *Gorgoderina bilobata* (Mata-López & Leon-Regagnon, 2006), *G. vitelliloba* (Hoole & Mitchell, 1981), *Hasstilesia tricolor* (Crites & Jilek, 1981), *Heterophyes nocens* (Chai *et al.*, 1992), *H. continua* (Hong *et al.*, 1991), *Himasthla alincia* (Han *et al.*, 2003), *K. egyptensis* (Abdou, 2008), *L. musculus* (Filippi *et al.*, 2012), *Leucochloridium* sp. (Bakke, 1976), *Metagonimus miyatai* (Chai *et al.*, 1998), *Metagonimus takahashii* (Chai *et al.*, 2000), *Nicolla skrajbini* (Moravec, 2009), *Paragonimus westermani* (Choi & Yoo, 1985), *Philophthalmus megalurus* (Edwards *et al.*, 1977), *Pygidiopsis summa* (Chai *et al.*, 2002), and *Transversotrema licinum* (Abdul-Salam & Sreelatha, 1992). Similar receptors have also been recovered in aspidogastreans (Halton & Lyness, 1971; Ip & Dessler, 1984; Rohde & Watson, 1990; Gao *et al.*, 2003) and paramphistome digeneans (Dunn *et al.*, 1987; Brennan *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 1991; Mattison *et al.*, 1994). Sensory receptors with the same external morphology of the type 2 observed here had also been recovered in other trematodes such as *G. attenuata* (Nadakavukaren & Nollen, 1975), *L. musculus* (Filippi *et al.*, 2012), *Phyllodistomum umblae*

(Bakke & Bailey, 1987), and *Stephanostomum egypticum* (Abdou & Ashour, 2000), and *T. licinum* (Abdul-Salam & Sreelatha, 1992). Hoole & Mitchell (1981) recovered domed papillae on the ventral surface of *G. vitelliloba*. These papillae are very similar in morphology and ultrastructure to the type 2 sensory receptor of *D. inflata* as they have the same electron-dense structure contained in a nerve bulb filled with mitochondria. A similar electron-dense structure was also observed on the ventral sucker of newly excysted juveniles of *C. sinensis* by Fujino *et al.* (1979a). Moreover, light microscopical observations on the aspidogastreaan *Multicotyle purvisi* have revealed the presence of a centrally situated mass inside the bulbous extension of the types E and I papillae (Rohde, 1966). This central mass, which stained intensely with urea-silver nitrate, may be comparable to the electron-dense structure recovered within the type 2 sensory receptor of *D. inflata*. The absence of connection to the exterior environment observed for the type 2 sensory receptor probably restrain its function as chemoreceptor. It may be specialized to respond to mechanical stimuli (Ip & Desser, 1984). According to Žd'árská & Nebesářová (2003), the lack of connection to the surface indicates that non-ciliate receptors are possibly mechanoreceptors, serving to respond to compression. Several authors suggest that domed or bulb-like papillae may function as contact receptors (Bakke, 1976; Fujino *et al.*, 1979a; Hoole & Mitchell, 1981). This type of sensory receptor, mostly distributed on or around the oral or ventral suckers of digeneans, is thought to be helpful to the fluke in locating surface for attachment (Abdou, 2001). This position brings it into contact with the plug of host tissue formed by the fluke at the attachment site (Hoole & Mitchell, 1981; Ashour *et al.*, 1994; Ashour, 1995). As for *C. metoecus* (Žd'árská & Nebesářová, 2003), type 2 sensory receptors of *D. inflata* are close to the receptors of adult aspidogastreans.

Cytoplasmic ridges were observed surrounding both type 1 and 2 sensory receptors. These ridges, or infoldings, indicate that sensory receptors may be subject to muscular

movement and have a function in contact communications, as does the regional aggregations of these receptors around the oral sucker (Bakke, 1976). Some authors indicated site-specificity in the distribution of sensory receptors (Bogea & Caira, 2001; Abdul-Salam & Sreelatha, 2004; Mata-López & Leon-Regagnon, 2006). Most of the receptors observed on the *D. inflata* tegument were concentrated in the anterior third of the fluke, which contains oral and ventral suckers. Thus, the distribution of the sensory receptors relates well to the behavior of the worm because the parasite tends to attach to the host via the ventral sucker and probes the near environment with the oral one (surrounding the mouth).

CHAPITRE IX

SYNTHESE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

IX.1 Synthèse des principaux résultats

Une étude parasitaire sur les trois années de thèse a été menée sur la parasitofaune de l'anguille d'Europe *A. anguilla* dans deux lagunes côtières méditerranéennes de la Corse: la lagune de Biguglia et la lagune d'Urbino. Un total de 425 anguilles a été analysé. Ainsi, cette étude Corse a permis de caractériser les interactions entre les parasites, leurs hôtes et l'environnement.

Les résultats obtenus peuvent être divisés en plusieurs ensembles. Une partie de l'étude a été descriptive. Elle a donné une représentation de la parasitofaune de l'anguille dans les deux lagunes. De plus, par le biais de méthodes statistiques (indices de diversité, espèces indicatrices, ...), il nous a été permis de définir les facteurs déterminant la distribution des communautés de parasites. Enfin, l'étude tégumentaire des digènes parasites de l'anguille d'Europe, nous aura permis d'appréhender la relation hôte-parasite chez certains spécimens parasites.

IX.1.1 Communautés et diversités parasitaires

Treize espèces parasites ont été identifiées parmi lesquelles: trois digènes, *Bucephalus anguillae*, *Deropristis inflata*, *Lecithochirium musculus*; un monogène, *Pseudodactylogyrus anguillae*; trois cestodes, *Bothriocephalus claviceps*, *Proteocephalus macrocephalus*, *Myzophyllobothrium* sp. (larve); trois nématodes, *Anguillicoloides crassus*, *Contraecaecum* sp. (larve enkystée), *Goezia anguillae*; un acanthocéphale, *Acanthocephaloides incrassatus*; un copépode, *Ergasilus gibbus*; et un myxozoaire, *Myxobolus portucalensis*. Six de ces espèces ont été observées pour la première fois dans les anguilles d'Europe en Corse au cours de cette étude.

Trois espèces présentent des différences de prévalence significatives entre les deux lagunes: ce sont *B. claviceps*, *A. crassus* et *A. incrassatus*. Des corrélations significatives entre les différentes abondances parasitaires de certaines espèces parasites, mais également

entre ces mêmes abondances parasitaires et les indices biométriques relevés sur les anguilles analysées ont été démontrées.

La richesse spécifique et les valeurs de diversité sont plus élevées pour les parasites des anguilles de la lagune d'Urbino au niveau intestinal métacommunautaire et infracommunautaire. Cependant les valeurs les plus élevées de diversité spécifique et les valeurs de dominance les plus basses ont été calculées pour les communautés parasitaires des anguilles de la lagune de Biguglia. La diversité parasitaire a également été comparée à celles d'autres lagunes d'Europe. Cette comparaison a mis en avant une diversité parasitaire spécifique plutôt faible chez les anguilles des lagunes corses.

Les communautés parasitaires de l'anguille d'Europe dans les lagunes de Biguglia et d'Urbino en Corse sont marquées par l'environnement de leur hôte. Une dépendance vis-à-vis de la salinité de la lagune a ainsi été démontrée. La présence d'espèces parasites d'eau douce dans la lagune d'Urbino (*B. claviceps*) semble due au hasard de l'échantillonnage au regard des faibles valeurs de prévalence, d'intensité et d'abondance, ou à un individu hôte ayant migré depuis les affluents d'eau douce. La présence d'espèces parasites marines dans la lagune de Biguglia (*D. inflata* et *A. incrassatus*) s'explique par l'entrée d'eau salée via le grau au Nord, induisant un gradient de salinité dans la lagune.

La présence d'espèces invasives, notamment le parasite branchial *P. anguillae* et le nématode parasite *A. crassus*, dans les lagunes corses est confirmée. Ces espèces, et particulièrement le monogène, présentent des valeurs épidémiologiques croissantes depuis les dernières études menées (Caillot *et al.*, 1999; Ternengo *et al.*, 2005).

IX.1.2 Variabilité des communautés parasitaires en fonction de la saison, de la taille ou du stade d'argenteure de l'anguille

Une étude des variations des paramètres épidémiologiques (abondance moyenne, intensité moyenne, prévalence) en fonction de la saison, de la taille ou du stade d'argenteure de

l'anguille a été effectué sur 370 individus récupérés dans les lagunes de Biguglia et d'Urbino entre l'hiver 2010 et l'hiver 2012.

Les valeurs d'infestation les plus élevées ont été observées durant les saisons les plus chaudes de l'année pour la majorité des espèces parasites observées (*B. anguillae*, *D. inflata*, *L. musculus*, *P. anguillae*, *P. macrocephalus*, *A. crassus*, les kystes de *Contracaecum* sp., *A. incrassatus* et *E. gibbus*).

Nous avons démontré que l'état d'argenture et la taille ont une influence significative sur les taux d'infestation de sept espèces parasites (*D. inflata*, *L. musculus*, *P. anguillae*, *P. macrocephalus*, les kystes de *Contracaecum* sp., *A. incrassatus* et *E. gibbus*).

IX.1.3 Espèces parasites indicatrices

Au cours de notre étude, la méthode de l'espèce indicatrice a été utilisée pour l'analyse des données parasitaires obtenues sur les 425 anguilles prélevées au cours des trois années de thèse. Cette méthode combine des mesures de fidélité et de spécificité. De plus, grâce à sa capacité à détecter les changements d'abondance, la méthode de l'espèce indicatrice est un indicateur écologique efficace.

Ainsi, la méthode de l'espèce indicatrice a démontré que le site d'étude, la saison, l'état d'argenture ou la taille de l'anguille pouvait influencer sur la présence de certaines espèces parasites. La méthode a identifié dix espèces parasites ayant des valeurs indicatrices significatives pour le critère « site d'étude » (les digènes *B. anguillae* et *L. musculus*, les cestodes *B. claviceps*, *P. macrocephalus* et la larve *Myzophyllobothrium* sp., les nématodes *A. crassus* et la larve enkystée *Contracaecum* sp., l'acanthocéphale *A. incrassatus*, le monogène *P. anguillae* et le copépode *E. gibbus*). Cette méthode a également identifié une espèce parasite ayant une valeur indicatrice significative pour le critère « saison » (l'acanthocéphale *A. incrassatus*) et six espèces parasites ayant des valeurs indicatrices significatives pour le critère « état d'argenture » (les digènes *B. anguillae* et *D. inflata*, la larve

de nématode enkystée *Contracaecum* sp., l'acanthocéphale *A. incrassatus*, le monogène *P. anguillae* et le copéode *E. gibbus*). Enfin, cette méthode a identifié trois espèces parasites ayant des valeurs indicatrices significatives pour le critère « taille » (le cestode *P. macrocephalus*, la larve de nématode enkystée *Contracaecum* sp. et le monogène *P. anguillae*).

IX.1.4 Étude tégumentaire de *Bucephalus anguillae*

Le tégument du parasite intestinal *B. anguillae* a été étudié en microscopie électronique à balayage et à transmission. La surface du tégument est recouverte par des replis tégumentaires transversaux d'où émergent de nombreuses écailles digitées en forme d'ongle. Des unités tégumentaires en forme de « pavés » ont été observées sur la zone lisse du rhynchus ainsi que sur la partie postérieure du corps. Des différences antéro-postérieures ont été observées dans la répartition des écailles, leur insertion et la taille des cils des récepteurs sensoriels. L'étude ultrastructurale du tégument a révélé que le tégument de *B. anguillae* a une organisation syncytiale typique des digènes avec un cytoplasme distal recouvrant une matrice basale et une région nucléée profonde, les ponts cytoplasmiques permettant le transit des vésicules sécrétrices. Trois types de structures sensorielles ont été observées: deux récepteurs uniciliés (types 1 et 3) et un sans cil (type 2). Les récepteurs de types 1 et 3 présentent une différence au niveau de la longueur des cils. Le schéma général de structure des récepteurs ciliés correspond à un bulbe nerveux contenant du matériel réfringent et des mitochondries. Le cil émerge du bulbe nerveux tout en y étant connecté via un col hémisphérique dense aux électrons. L'influx nerveux est transmis dans le bulbe par une racine striée. Dans le récepteur de type 1, une structure conique d'attachement dense aux électrons est présente alors que le type 3 en est dépourvu.

IX.1.5 Étude tégumentaire de *Lecithochirium musculus*

Le tégument du parasite stomacal *L. musculus* a été étudié en microscopie électronique à balayage et à transmission. La surface du tégument est lisse et recouverte de replis cytoplasmiques transversaux. Des unités tégumentaires en forme de « pavés » ont été observées sur la surface ventrale. L'invagination et l'évagination de l'ecsoma induisent également une variation de la surface tégumentaire. L'étude ultrastructurale de tégument a révélé que le tégument de *L. musculus* a une organisation syncytiale typique des digènes avec un cytoplasme distal recouvrant une matrice basale et une région nucléée profonde.

Deux types de structures sensorielles intra-tégumentaires ont été observés. Le récepteur sensoriel de type 1 est une structure fusiforme en dôme consistant en une légère élévation du tégument. Quatre récepteurs de ce type ont été observés sur la surface dorsale antérieure du corps. Ce récepteur est composé de trois bulbes nerveux remplis de matériel réfringent et de mitochondries. Des cols hémisphériques denses aux électrons ont été observés dans la partie supérieure de ces bulbes nerveux, prolongés par des racines striées juste en-dessous. Le récepteur sensoriel de type 2 présente deux variations morphologiques, une structure monlobée en forme de bulbe et une autre bilobée (cette dernière ayant été observée à différents niveaux d'évagination). Dans les deux cas, les bulbes nerveux contiennent des mitochondries, du matériel réfringent et un col conique dense aux électrons d'où part une racine striée. De nombreux récepteurs sensoriels de ce type ont été observés autour de la ventouse ventrale.

IX.1.6 Étude tégumentaire de *Deropristis inflata*

Le tégument du parasite intestinal *D. inflata* a été étudié en microscopie électronique à balayage et à transmission (Filippi *et al.*, 2013). La surface du tégument est recouverte par des replis cytoplasmiques transversaux desquels émergent de nombreuses écailles en forme d'épines, présentant des pointes crénelées dans la partie postérieure du corps. Les écailles sont

organisées en quinconce. Des unités tégumentaires en forme de « pavés » ont été observées sur la formation lisse semi-circulaire de la ventouse orale. Une excroissance tégumentaire a été observée sur la partie dorsale antérieure du corps. L'étude ultrastructurale a révélé que le tégument de *D. inflata* présente une organisation syncytiale typique des digènes avec un cytoplasme distal recouvrant une matrice basale et une région nucléée profonde, les ponts cytoplasmiques permettant le transit des vésicules sécrétrices.

Deux types de structures sensorielles ont été observés. Le récepteur sensoriel de type 1 est une papille uniciliée en forme de bouton présentant une base tégumentaire plissée et entourée de replis cytoplasmiques. Ce récepteur est composé d'un bulbe nerveux et d'un cil s'étendant depuis un centriole. Le récepteur sensoriel de type 2 est une papille lisse non ciliée en forme de bulbe. Il n'a été observé que sur la ventouse ventrale. Ce récepteur est composé d'un bulbe nerveux contenant une structure ovoïde dense aux électrons. Dans le cas des deux récepteurs, les bulbes nerveux contiennent de nombreuses mitochondries, des fibres nerveuses et du matériel réfringent. Une organisation particulière des récepteurs sensoriels a été observée avec une concentration dans le tiers antérieur du corps et autour des ventouses orale et ventrale.

IX.2 Perspectives et conclusion

IX.2.1 Parasitologie de l'anguille d'Europe en Corse

Le suivi parasitaire effectué au cours de ces trois années de thèse devra être poursuivi en tenant compte de plusieurs points.

L'échantillonnage devra être le plus homogène possible. Ainsi, les disparités rencontrées au cours de cette thèse entre les saisons et les lagunes au niveau de la taille ou de l'argenture devront être corrigées. Pour cela, il conviendrait de se détacher de la dépendance vis-à-vis de la pêche artisanale effectuée par les professionnels de chaque lagune. En effet,

l'échantillonnage est dépendant des prises faites par les pêcheurs qui, elles-mêmes, dépendent de nombreuses contraintes. Des pièges réservés à cette étude pourraient être mis en place en collaboration avec les exploitants afin de bénéficier d'échantillons représentatifs de la population d'anguilles d'Europe de chaque lagune. Un échantillonnage plus homogène permettrait ainsi une utilisation plus fiable des méthodes statistiques non-paramétriques, voire l'utilisation d'outils plus puissants appartenant aux méthodes statistiques paramétriques (test *t* de Student, ANOVA, ...).

Il paraît difficile d'échantillonner au « mois » et non à la « saison » de par le nombre conséquent d'individus à prélever sur l'année alors même que l'espèce est en danger d'extinction. Cependant, il serait intéressant d'effectuer un suivi test sur une année et une lagune afin de déceler de potentielles variations intra-saisonniers dans les communautés parasitaires.

L'échantillonnage pourra être étendu aux autres lagunes (Diana, Palo, et Terrenzana) ainsi qu'aux cours d'eau de Corse. Ce dernier point est primordial, notamment dans le cadre de l'état initial imposé par le volet Corse du plan de gestion de l'anguille Européenne (MEEDDAT *et al.*, 2007). Cependant, au vu du nombre assez élevé de bassins versants à étudier, ainsi que du dénivelé conséquent présent sur le tracé de chaque cours d'eau; n'oublions pas que la Corse est une « île dans la mer »; il sera difficile d'effectuer un suivi exhaustif de la parasitofaune des anguilles de rivière. Quelques données ont été récoltées au cours de cette thèse (une soixantaine d'anguilles réparties en différents points), mais les formalités administratives nécessaires à l'organisation de pêches électriques (méthode la plus efficace afin d'avoir un échantillonnage homogène au cours du temps) n'a pas permis la poursuite des prélèvements. Pour cela, il conviendra donc de se concentrer sur un cours d'eau principal pour un voir deux bassins versants. Ainsi, une comparaison pourrait être établie

entre l'Est et l'Ouest de la Corse; les lagunes côtières corses n'étant présentes que du côté Ouest et donc sous l'influence unique de la mer Tyrrhénienne.

La poursuite de cette étude devra se concentrer sur l'analyse des quelques 1700 échantillons d'écotoxicologie (des portions de rein, de muscle, de branchies et de foie) récupérés pour chaque individu analysé. Ces échantillons permettront de déterminer une potentielle contamination par des métaux lourds. Cette donnée sera importante notamment dans le cas de l'analyse de l'influence du bassin versant de la communauté bastiaise sur la lagune de Biguglia (Pergent-Martini *et al.*, 1997). Ces données d'écotoxicologie pourront être couplées aux données parasitaires au vu des relations synergiques entre pathogènes et polluants mis en avant par plusieurs auteurs (Galli *et al.*, 2001; Sures *et al.*, 2003; Geeraerts & Belpaire, 2010).

En parallèle, les deux otolithes de sagitta de chaque individu ont été récoltés. L'analyse des anneaux de croissance présents sur ces otolithes permettra d'avoir des données exactes d'âge et de taux de croissance qui pourront être reliées aux données parasitaires (Panfili & Ximénès, 1994; Fazio *et al.*, 2008) obtenues au cours de cette thèse. Ces otolithes constituent également une source de données non négligeable concernant les dynamiques migratoires (au stade larvaire) ou de mise en place de la migration à l'argenture (Lecomte-Finiger, 1994). Ces échantillons pourront également être utilisés en microanalyse des polluants toujours dans l'optique de caractériser les étapes de vie des individus analysés.

L'étude pourra également prendre en compte l'impact du rhabdovirus EVEX sur les populations d'anguilles d'Europe en Corse comme cela est fait dans d'autres milieux en Europe (Galinier *et al.*, 2012; van Beurden *et al.*, 2012; Van Landeghem *et al.*, 2012). L'impact de ce virus (hémorragies et anémies) en conjonction avec l'effet de la parasitofaune pathogène ainsi que des micropolluants pourrait être important dans les populations d'anguilles en Corse.

IX.2.2 Étude microscopique des parasites de l'anguille d'Europe

La poursuite de l'étude tégumentaire des parasites en microscopie électronique pourra se faire de plusieurs manières.

Il conviendra d'abord d'effectuer l'observation en microscopie électronique du tégument des parasites pathogènes de l'anguille d'Europe, le nématode *A. crassus* et le monogène *P. anguillae*. Quelques micrographies en microscopie électronique à balayage du tégument de ces deux parasites ont déjà été effectuées, notamment par Tarascheski *et al.* (1987) pour *A. crassus*, et par Buchmann *et al.* (1987) pour *P. anguillae*. Cependant, les observations sont de qualité moyenne et jouent un rôle de support à la discussion en ne constituant pas les résultats concrets d'une étude tégumentaire.

L'étude de la relation hôte-parasite implique des processus moléculaires complexes (Threadgold, 1963; Roberts & Janovy, 1996). Il pourrait être intéressant de coupler les recherches en microscopie électronique à des études biochimiques concernant la composition du tégument ou des phénomènes mis en oeuvre pour son fonctionnement. Plusieurs auteurs se sont déjà lancés dans cette voie de recherche et ont récemment publié des d'études couplant plusieurs méthodes (microscopie optique et électronique, génétique, ...) (Knaus & El-Matbouli, 2005; Xavier *et al.*, 2010; Cavaleiro *et al.*, 2012).

Au cours de nos recherches bibliographiques concernant les études tégumentaires de parasites en microscopie électronique, un problème récurrent a été mis en avant. Il correspond à la disparité observée au niveau du classement des différents types de récepteurs (un même type de récepteur sensoriel; type entendu au niveau structural; peut être affublé de multiples dénominations entre auteurs, parasites ou groupes de parasites). Le manque de publications synthétisant l'ensemble de la bibliographie dans ce domaine se fait ainsi cruellement ressentir lors de l'interprétation des résultats. Un travail de synthèse bibliographique concernant les structures sensorielles recensées chez les parasites pourra donc être une des voies de travail de

cette recherche en microscopie. Ce travail aurait de plus un fort potentiel méthodologique et permettrait d'unifier et de cadrer l'ensemble de la recherche dans ce domaine.

Au cours de ces travaux, un grand nombre de données et d'informations a été récolté. Cette étude parasitaire pose les bases des multiples analyses à poursuivre afin de caractériser au mieux les communautés de parasites de l'anguille d'Europe dans les lagunes de Biguglia et d'Urbino en Corse.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas MK, Cain GD, 1987.** Actin and intermediate-sized filaments of the spines and cytoskeleton of *Schistosoma mansoni*. Parasitology Research 73:66-74.
- Abdou NE, Ashour AA, 2000.** Scanning electron microscopy of the tegumental surface of digenetic trematode *Stephanostomum egypticum* from the Red Sea fishes. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 30:341-348.
- Abdou NES, 2001.** Surface topography of *Erilepturus hamati* Manter, 1947 (Digenea, Family: Hemiuridae) by scanning electron microscopy. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 31:199-212.
- Abdou NES, 2008.** Ultrastructure of *Karyakartia egyptensis* Abdou, Dronen and Blend 2006 (Digenea: Lepocreadiidae) from the Red Sea fish *Terapon jarbua*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 38:423-434.
- Abdul-Salam J, Sreelatha BNS, 1992.** The surface topography and ultrastructure of the tegument of the ectoparasitic digenean *Transversotrema licinum*. Zoologischer Anzeiger 228:248-261.
- Abdul-Salam J, Sreelatha BNS, 2004.** Description and surface topography of the cercaria of *Austrobilharzia* sp. (Digenea: Schistosomatidae). Parasitology International 53:11-21.
- Acou A, Boury P, Laffaille P, Crivelli AJ, Feunteun E, 2005.** Towards a standardized characterization of the potentially migrating silver European eel (*Anguilla anguilla*, L.). Archiv für Hydrobiologie 164:237-255.
- Acou A, Lefebvre F, Contournet P, Poizat G, Panfili J, Crivelli AJ, 2003.** Silvering of female eels (*Anguilla anguilla*) in two sub-populations of the Rhône Delta. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 368:55-68.
- Adam G, Feunteun E, Prouzet P, Rigaud C, 2008.** L'anguille européenne. Indicateurs d'abondance et de colonisation. Éditions Quæ, Versailles. 393 p.

Aguilar A, Alvarez MF, Leiro JM, Sanmartin ML, 2005. Parasite populations of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the Rivers Ulla and Tea (Galicia, northwest Spain). *Aquaculture* 249:85-94.

Aho JM, Bush AO, Wolf RW, 1991. Helminth parasites of bowfin (*Amia calva*) from South Carolina. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 58:171-175.

Altizer S, Harvell D, Friedle E, 2003. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 18:589-596.

Amilhat E, 2007. État sanitaire de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* dans le bassin Rhône Méditerranée et Corse : synthèse bibliographique. Rapport Pôle lagunes et Cépralmar. (trans: Translator). Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne. Number of 88 p.

Antonelli L, 2010. Impact de la parasitologie sur la pisciculture en Corse: suivi des parasitoses et étude des transferts de parasites depuis la faune sauvage vers les poissons élevés en mer ouverte. Université de Corse, Corte. 264 p.

Arai HP, 1989. Acanthocephala and Cnideria. In: Margolis L, Kabata Z (eds) *Guide to the Parasites of the Fishes of Canada*, Part III. pp 1-90.

Ashour AA, 1995. Scanning electron microscope observation on *Corrigia vitta* (Dujardin, 1984) Shtrom, 1940 (Trematoda: Dicrocoelidae). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 25:25-30.

Ashour AA, El-Alfy NM, Wanas MQ, 1994. An ultrastructural investigation on the body surface of *Diplodiscus pallascatus* from the toad *Bufo regulatis* from Egypt. *Egyptian Journal of Medical Sciences* 15:567-572.

Audenaert V, Huyse T, Goemans G, Belpaire C, Volckaert FAM, 2003. Spatio-temporal dynamics of the parasitic nematode *Anguillicola crassus* in Flanders, Belgium. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:223-233.

Bakke TA, 1976. Functional morphology and surface topography of *Leucochloridium* sp. (Digenea), revealed by scanning electron microscopy. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research* 51:115-128.

Bakke TA, Bailey RE, 1987. *Phyllodistomum umblae* (Fabricius) (Digenea, Gorgoderidae) from British-Columbia salmonids - a description based on light and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 65:1703-1712.

Bakke TA, Lien L, 1978. Tegumental surface of *Phyllodistomum conostomum* (Olsson, 1876) (Digenea), revealed by scanning electron microscopy. *International Journal for Parasitology* 8:155-161.

Banning PV, Haenen OLM, Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel, *Anguilla anguilla*. In: PAMAQ (ed) *Pathology in Marine Science*, Virginia, USA, 1990. Academic Press, pp 317-330.

Barker DE, Marcogliese DJ, Cone DK, 1996. On the distribution and abundance of eel parasites in Nova Scotia: Local versus regional patterns. *The Journal of Parasitology* 82:697-701.

Begon M, Harper JL, Townsend CR, 1986. *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell, Oxford.

Belpaire C, De Charleroy D, Grisez L, Ollevier F, Spreading mechanisms of the swimbladder parasite *Anguillicola crassus* and its distribution in Belgium and Europe. In: EIFAC (ed) *Working Party on Eel*, Portugal, 1989.

Benajiba MH, Silan P, Marques A, Bouix G, 1994. Protozoan and metazoan parasites of the eel *Anguilla anguilla* L, 1758 - Temporal structures of their population in a mediterranean lagoon. *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et biologie animale* 15:141-149.

Bennett CE, 1975a. Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturation in mouse. *The Journal of Parasitology* 61:892-898.

Bennett CE, 1975b. Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* L. *The Journal of Parasitology* 61:886-891.

Bennett CE, Threadgold LT, 1975. *Fasciola hepatica*: development of tegument during migration in mouse. *Experimental Parasitology* 38:38-55.

Blanc G, 1998. *Anguillicola crassus*, un parasite agressif introduit dans les stocks européens d'anguilles. *Eaux libres*.

Bland JM, Altman DG, 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *British Medical Journal* 310:170-170.

Bogea T, Caira JN, 2001. Chaetotaxy and ultrastructure of sensory receptors in the cercaria of a species of *Allassogonoporus* Olivier, 1938 (Digenea: Lecithodendriidae). *Systematic Parasitology* 50:1-11.

Bogitsh BJ, 1968. Cytochemical and ultrastructural observations on tegument of trematode *Megalodiscus temperatus*. *Transactions of the American Microscopical Society* 87:477-486.

Borgsteede FHM, Haenen OLM, De Bree J, Lisitsina OI, 1999. Parasitic infections of European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the Netherlands. *Helminthologia* 36:251-260.

Brennan GP, Hanna REB, Nizami WA, 1991. Ultrastructural and histochemical observations on the tegument of *Gastrodiscoides hominis* (Paramphistoma: Digenea). *International Journal for Parasitology* 21:897-905.

Brooks DR, Hoberg EP, 2000. Triage for the Biosphere: the need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comparative Parasitology* 67:1-25.

Brown AF, 1986. Evidence fro density-dependent establishment and survival of *Pomphorynchus laevis* (Müller, 1776) (Acanthocephala) in laboratory-infected *Salmo gairdneri* Richardson and its bearing on wild populations in *Leuciscus cephalus* (L.). *Journal of Fish Biology* 28:659-669.

- Buchmann K, 1988.** Interactions between the gill parasitic monogeneans *Pseudodactylogyus anguillae* and *P. bini* and the fish host *Anguilla anguilla*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 8:98-100.
- Buchmann K, 1989.** Relationship between host size of *Anguilla anguilla* and the infection level of the monogeneans *Pseudodactylogyus* spp. Journal of Fish Biology 35:599-601.
- Buchmann K, Bresciani J, 2001.** An introduction to parasitic diseases of freshwater trout. Biofolia, Fredriksberg. 76 p.
- Buchmann K, Lindenstrom T, 2002.** Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. International Journal for Parasitology 32:309-319.
- Buchmann K, Mellergaard S, Koie M, 1987.** *Pseudodactylogyus* infections in eel - A review. Diseases of Aquatic Organisms 3:51-57.
- Burton PR, 1966.** Ultrastructure of the integument of frog bladder fluke, *Gorgoderina* sp. The Journal of Parasitology 52:926-934.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW, 1997.** Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. The Journal of Parasitology 83:575-583.
- Byong-Seol S, Seung-Yull C, Jong-Yil C, 1979.** Seasonal fluctuation of *Ascaris* reinfection incidences in a rural Korean population. Kisaengchunghak Chapchi-Korean Journal of Parasitology 17:11-18.
- Bystydzienska Z, Rolbiecki L, Rokicki J, 2005.** Helminth communities of European eels *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758) from the Vistula Lagoon and Puck Bay, Poland. Wiadomosci Parazytologiczne 51:145-150.
- Cable RM, Hunninen AV, 1942.** Studies on *Deropristis inflata* (Molin), its life history and affinities to trematodes of the family Acanthocolpidae. Biological Bulletin 82:292-312.

Caillot C, Morand S, Müller-Graf CM, Faliex E, Marchand B, 1999. Parasites of *Dicentrarchus labrax*, *Anguilla anguilla*, and *Mugil cephalus* from a pond in Corsica, France. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 66:95-98.

Carreras-Aubets M, Montero FE, Kostadinova A, Gibson DI, Carrasson M, 2012. Redescriptions of two frequently recorded but poorly known hemiurid digeneans, *Lecithochirium musculus* (Looss, 1907) (Lecithochiriinae) and *Ectenurus lepidus* Looss, 1907 (Dinurinae), based on material from the western Mediterranean. *Systematic Parasitology* 82:185-199.

Cavaleiro FI, Pina S, Russell-Pinto F, Rodrigues P, Formigo NE, Gibson DI, Santos MJ, 2012. Morphology, ultrastructure, genetics, and morphometrics of *Diplostomum* sp. (Digenea: Diplostomidae) metacercariae infecting the European flounder, *Platichthys flesus* (L.) (Teleostei: Pleuronectidae), off the northwest coast of Portugal. *Parasitology Research* 110:81-93.

Cesco H, Lambert A, Crivelli AJ, 2001. *Pseudorasbora parva* (Téléostéen, Cyprinidae) espèce invasive, nouvel agent du maintien et de la dissémination de l'anguillicolose en France ? *Parasite-Journal de la Société Française de Parasitologie* 8:75-76.

Chai JY, Chung HL, Choi MH, Sohn WM, Hong SJ, Lee SH, 1992. Surface ultrastructure of *Heterophyes nocens* (Trematoda: Heterophyidae). *The Korean Journal of Parasitology* 30:75-82.

Chai JY, Guk SM, Han ET, Seo M, Shin EH, Sohn WM, Choi SY, Lee SH, 2000. Surface ultrastructure of *Metagonimus takahashii* metacercariae and adults. *The Korean Journal of Parasitology* 38:9-15.

Chai JY, Kang YJ, Choi SY, Guk SM, Yu JR, Lee SH, 1998. Surface ultrastructure of *Metagonimus miyatai* metacercariae and adults. *The Korean Journal of Parasitology* 36:217-225.

- Chai JY, Sohn WM, Choi SY, Lee SH, 2002.** Surface ultrastructure of *Pygidiopsis summa* (Digenea: Heterophyidae) adult flukes. The Korean Journal of Parasitology 40:107-112.
- Chan B, Wu B, 1984.** Studies on the pathogenicity, biology and treatment of *Pseudodactylogyus* for the eels in fish-farms. Acta Zoologica Sinica 30:173-180.
- Chappell LH, 1969.** The parasites of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. from a Yorkshire pond. I. Seasonal variation of parasite fauna. Journal of Fish Biology 1:137-152.
- Choi WY, Yoo JE, 1985.** Ultrastructure of the integument of adult *Paragonimus westermani*. The Korean Journal of Parasitology 23:111-122.
- Choudhury A, Dick TA, 1998.** Systematics of the Deropristiidae Cable and Hunninen, 1942 (Trematoda) and biogeographical associations with strugeons (Osteichthyes: Acipenseridae). Systematic Parasitology 41:21-39.
- Chubb JC, 1961.** A preliminary investigation of the parasitic fauna of the fish of Llyn Tegid (Bala Lake), Merionethshire. University of Liverpool, Liverpool.
- Chubb JC, 1964.** Occurrence of *Echinorhynchus clavula* (Dujardin, 1845) nec Hamann, 1892 (Acanthocephala) in the fish of Llyn Tegid (Bala Lake), Merionethshire. The Journal of Parasitology 50:52-59.
- Chubb JC, 1979.** Seasonal occurrence of helminths in freshwater fishes. Part II. Trematoda. Advances in Parasitology 17:141-313.
- Chubb JC, 1982.** Seasonal occurrence of helminths in freshwater fishes. Part IV. Adult Cestoda, Nematoda and Acanthocephala. Advances in Parasitology 20:1-192.
- Cohen SC, Kohn A, Baptista-Farias MF, 2001.** Scanning and transmission electron microscopy of the tegument of *Paranaella luquei* Kohn, Baptista-Farias & Cohen, 2000 (Microcotylidae, Monogenea), parasite of a Brazilian catfish, *Hypostomus regani*. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz 96:555-560.

Cohen SC, Kohn A, Barth OM, 1995. Scanning electron microscopic study of *Proisorhynchoides arcuatus* (Linton, 1900) (Bucephalidae: Digenea). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 90:25-32.

Cohen SC, Kohn A, Barth OM, 1996. Ultrastructure of the tegument of *Proisorhynchoides arcuatus* (Linton, 1900) Bray, 1984 (Trematoda, Bucephalidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 91:463-469.

Combes C, 2001. Les associations du vivant. L'art d'être parasite. Flammarion, Paris.

Conn DB, 1993. The biology of flatworms (Platyhelminthes): parenchyma cells and extracellular matrices. *Transactions of the American Microscopical Society* 112:241-261.

Conneely JJ, McCarthy TK, 1986. Ecological factors influencing the composition of the parasite fauna of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.) in Ireland. *Journal of Fish Biology* 28:207-219.

Connor RS, 1953. A study of the seasonal cycle of a proteocephalan cestode *Proteocephalus stizostethi* Hunter and Bangham, found in the yellow pikeperch, *Stizostedion vitreum vitreum* (Mitchill). *The Journal of Parasitology* 39:621-624.

COSEWIC, 2006. COSEWIC assessment and status report on the American eel *Anguilla rostrata* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada (trans: Translator). Ottawa. Number of 71 p.

Crites JL, Jilek R, 1981. Surface topography of *Hasstilesia tricolor* (Trematoda: Brachylaimidae) as demonstrated by scanning electron microscopy. *Ohio Journal of Science* 81:120-124.

Csaba G, Lang M, Salyi G, Ramotsa J, Glavits R, Ratz F, 1993. The nematode *Anguillicola crassus* (Nematoda, Anguillicolidae) and its role in the death of eels in Lake Balaton during 1991. *Magyar Állatorvosok Lapja* 48:11-21.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD, 2000. Wildlife ecology - Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449.

Daverat F, Elie P, Lahaye M, 2004. Microchemistry contribution to a first approach to the diversity of life histories of eels from the lower part of the Gironde-Garonne-Dordogne watershed. *Cybium* 28:83-90.

Davydov ON, 1978. Growth, development and fecundity of *Bothriocephalus gowkangensis* (Yeh, 1955), a cyprinid parasite. *Journal of Hydrobiology* 14:60-66.

De Charleroy D, Thomas K, C. B, Problems concerning the species determination, biology and diagnostic methods of *Anguillicola* a swimbladder nematode in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Europe. In: EIFAC (ed) Working Party on Eel, Bristol, 13-16 April 1987.

Dezfuli BS, Fioravanti ML, Onestini S, Rossi R, 1992. *Deropristis inflata* (Platyhelminthes: Digenea) parasite of *Anguilla anguilla* (L): morphology of parasite and intestinal pathology of host. *Parassitologia* 34:205-206.

Dezfuli BS, Nestorov M, Kanev I, Fied B, 1997. Scanning electron microscopy of the tegumentary spines of *Deropristis inflata* and *Pseudechinoparyphium echinatum* (Trematoda). *Dokladi na B"lgarskata akademiâ na naukite* 50:81-84.

Dezfuli BS, Szekely C, Giovinazzo G, Hills K, Giari L, 2009. Inflammatory response to parasitic helminths in the digestive tract of *Anguilla anguilla* (L.). *Aquaculture* 296:1-6.

Di Cave D, Berrilli E, De Liberato C, Orecchia P, Kennedy CR, 2001. Helminth communities in eels *Anguilla anguilla* from Adriatic coastal lagoons in Italy. *Journal of Helminthology* 75:7-13.

Dias MLGG, Santos MJ, Souza GTR, Machado MH, Pavanelli GC, 2003. Scanning electron microscopy of *Ithyoclinostomum dimorphum* (Trematoda: Clinostomidae), a parasite of *Ardea cocoi* (Aves: Ardeidae). *Parasitology Research* 90:355-358.

- Dogiel VA, Petrushevski GK, Polyanski YI, 1961.** Parasitology of Fishes translated by Z. Kabata. Oliver and Boyd, London. 384 p.
- Dollfus P, 1964.** Énumération des cestodes du plancton et des invertébrés marins (6^e contribution). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 39:329-379.
- Dufrêne M, Legendre P, 1997.** Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. Ecological Monographs 67:345-366.
- Dunn TS, Hanna REB, Nizami WA, 1987.** Ultrastructural and cytochemical observations on the tegument of three species of Paramphistomes (Platyhelminthes:Digenea) from the Indian water buffalo, *Bubalus bubalis*. International Journal for Parasitology 17:1153-1161.
- Dupont F, 1984.** Biologie des populations de *Bothriocephalus claviceps* cestode Pseudophyllidea parasite de l'anguille européenne. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Dupont F, Petter AJ, 1988.** *Anguillicola*, a multispecific epizootic in Europe - Appearance of *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculidae) in the European eel *Anguilla anguilla* in Camargue, Southern France. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 308:38-41.
- Durif C, Dufour S, Elie P, 2005.** The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. Journal of Fish Biology 66:1025-1043.
- EC, 2007.** Council Regulation 1100/2007: establishing measures for the recovery of the stock of European eel. vol L248. Official Journal of the European Union.
- Edwards HH, Nollen PM, Nadakavukaren MJ, 1977.** Scanning and transmission electron microscopy of oral sucker papillae of *Philophthalmus megalurus*. International Journal for Parasitology 7:429-437.

- El-Mansy A, Molnar K, Szekely C, 1998.** Development of *Myxobolus portucalensis* Saraiva & Molnar, 1990 (Myxosporidia : Myxobolidae) in the oligochaete *Tubifex tubifex* (Muller). Systematic Parasitology 41:95-103.
- Esch GW, Fernández JC, 1993.** A functional biology of parasitism: ecological and evolutionary implications. Chapman & Hall, London. 337 p.
- Esch GW, Kennedy CR, Bush AO, Aho JM, 1988.** Patterns in helminth communities in freshwater fish in Great Britain: alternative strategies for colonization. Parasitology 96:519-532.
- Eure H, 1976.** Seasonal abundance of *Proteocephalus ambloplitis* (Cestoda: Proteocephalidae) from largemouth bass living in a heated reservoir. Parasitology 73:205-212.
- Fazio G, Sasal P, Lecomte-Finiger R, Da Silva C, Fumet B, Mone H, 2008.** Macroparasite communities in European eels, *Anguilla anguilla*, from French Mediterranean lagoons, with special reference to the invasive species *Anguillicola crassus* and *Pseudodactylogyrus* spp. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 6:390-391.
- Fernandez C, Pasqualini V, Boudouresque CF, Johnson M, Ferrat L, Caltagirone A, Mouillot D, 2006.** Effect of an exceptional rainfall event in a Mediterranean coastal lagoon. Estuarine, Coastal and Shelf Science 68:259-270.
- Ferrer J, González-Moreno O, Gracenea M, 2001.** Actin cytoskeleton in adults and metacercariae of *Brachylaima* sp. Journal of Helminthology 75:337-344.
- Ferrer JR, Gracenea M, Trullols M, González-Moreno O, 1996.** Ultrastructural observations of the tegument of *Postorchigenes gymnesicus* (Digenea: Lecithodendriidae). Journal of Helminthology 70:13-19.
- Feunteun E, 2002.** Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. Ecological Engineering 18:575-591.

Filippi JJ, Quilichini Y, Foata J, Marchand B, 2010. Topography and ultrastructure of the tegument of *Bucephalus anguillae* (Digenea: Bucephalidae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyen: Anguillidae). *The Journal of Parasitology* 96:1102-1111.

Filippi JJ, Quilichini Y, Foata J, Marchand B, 2012. Topography and ultrastructure of the tegument of *Lecithochirium musculus* (Digenea: Hemiuridae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyen: Anguillidae). *Journal of Morphology* 273:361-370.

Filippi JJ, Quilichini Y, Marchand B, 2013. Topography and ultrastructure of the tegument of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenea: Deropristidae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyen: Anguillidae). *Parasitology Research* 112:517-528.

Fischer H, Freeman R, 1969. Penetration of parenteral plerocercoids of *Proteocephalus ambloplitis* (Leidy) into the gut of smallmouth bass. *The Journal of Parasitology* 55:766-774.

Foata J, Mouillot D, Culioli JL, Marchand B, 2006. Influence of season and host age on wild boar parasites in Corsica using indicator species analysis. *Journal of Helminthology* 80:41-45.

Foata J, Quilichini Y, Dal Pos N, Greani S, Marchand B, 2012. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Acanthocephaloides incrassatus* (Molin, 1858) (Acanthocephala, Paleacanthocephala, Arhythmacanthidae) from *Anguilla anguilla* (Pisces, Teleostei) in Urbino ponds (Corsica Island). *Parasitology Research* 111:271-281.

Font WF, Wittrock DD, 1980. Scanning electron microscopy of *Leucochloridiomorpha constantiae* during development from metacercaria to adult. *The Journal of Parasitology* 66:955-964.

Fontaine YA, 1994. L'argente de l'anguille : métamorphose, anticipation, adaptation. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 67:171-185.

Fontaine YA, Dufour S, Alinat J, Fontaine M, 1985. A long immersion in deep sea stimulates the pituitary gonadotropic function of the female european eel (*Anguilla anguilla*

L.). Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences Serie III - Sciences De La Vie - Life Sciences 300:83-87.

Frankland HMT, 1955. The life history and bionomics of *Diclidophora denticulata* (Trematoda: Monogenea). Parasitology 45:313-351.

Fries LT, Williams DJ, Johnson SK, 1996. Occurrence of *Anguillicola crassus*, an exotic parasitic swim bladder nematode of eels, in the Southeastern United States. Transactions of the American Fisheries Society 125:794-797.

Frisoni GF, 1984. Contribution à l'étude du phytoplancton dans le domaine paralique. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. 171 p.

Fujino T, Ishii Y, Choi DW, 1979a. Surface ultrastructure of the tegument of *Clonorchis sinensis* newly excysted juveniles and adult worms. The Journal of Parasitology 65:579-590.

Fujino T, Ishii Y, Choi DW, 1979b. Ultrastructural characterization of the tegument of *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) cercaria. Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research 60:65-76.

Galinier R, van Beurden S, Amilhat E, Castric J, Schoehn G, Verneau O, Fazio G, Allienne J, Engelsma M, Sasal P, Faliex E, 2012. Complete genomic sequence and taxonomic position of eel virus European X (EVEX), a rhabdovirus of European eel. Virus Research 166:1-12.

Galli P, Crosa G, Mariniello L, Ortis M, D'Amelio S, 2001. Water quality as a determinant of the composition of fish parasite communities. Hydrobiologia 452:173-179.

Gao Q, Nie P, Yao WJ, 2003. Scanning electron microscopy of *Aspidogaster ijimai* Kawamura, 1913 and *A. conchicola* Baer, 1827 (Aspidogastrea, Aspidogastriidae) with reference to their fish definitive-host specificity. Parasitology Research 91:439-443.

- Gargouri-Ben Abdallah L, Maamouri F, 2002.** Life cycle of *Bucephalus anguillae* Spakulova, Macko, Berrilli & Dezfuli, 2002 (Digenea, Bucephalidae), a parasite of *Anguilla anguilla* (L.). Systematic Parasitology 53:207-217.
- Gargouri-Ben Abdallah L, Maamouri F, 2006.** Spatio-temporal dynamics of the nematode *Anguillicola crassus* in Northeast Tunisian lagoons. Comptes Rendus Biologies 329:785-789.
- Garrido M, 2012.** Structure et fonction des communautés phytoplanctoniques en milieux côtiers marin et lagunaire (Méditerranée - Corse) dans une optique de gestion. Université de Corse / Université de Liège, 219 p.
- Geeraerts C, Belpaire C, 2010.** The effects of contaminants in European eel: a review. Ecotoxicology 19:239-266.
- Gibrat B, Nielsen T, 1985.** Recherches sur la nutrition des juvéniles de l'anguille (*Anguilla anguilla*, 1758). Conditionnement alimentaire et croissance en circuit fermé. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse. 323 p.
- Gibson DI, 2002.** Family Hemiuridae Looss, 1899. In: Gibson DI, Jones A, Bray RA (eds) Keys to the Trematoda, Vol 1. ©CAB International and The Natural History Museum, London, pp 305-340.
- Gibson DI, Bray RA, 1979.** The Hemiuroidea: terminology, systematics, and evolution. Bulletin of the British Museum (Natural History): Zoology series 36:35-146.
- Gibson DI, Bray RA, 1986.** The Hemiuridae (Digenea) of fishes from the north-east Atlantic. Bulletin of the British Museum (Natural History): Zoology series 51:1-125.
- Gibson DI, Jones A, Bray RA (eds), 2002.** Keys to the Trematoda, Vol. 1. ©CAB International and The Natural History Museum, London. 521 p.
- Ginetsinskaya TA, 1958.** The life cycles of fish helminths and the biology of their larval stages. In: Dogiel VA, Petrushevski GK, Polyanski YI (eds) Parasitology of Fishes. Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh and London, pp 140-179.

- Goater CP, Bush AO, 1988.** Intestinal helminth communities in long-billed curlews: the importance of congeneric host-specialists. *Holarctic Ecology* 11:140-145.
- Gonzalez-Lanza C, Alvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A, 1991.** Diplectanidae (Monogenea) infestations of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish area. Histopathology and population dynamics under culture conditions. *Parasitology Research* 77:307-314.
- Grabda J, 1991.** Marine fish parasitology: an outline. Polish Scientific Publishers, Warszawa. 306 p.
- Granath WOJ, Esch GW, 1983.** Temperature and other factors that regulate the composition and infrapopulation densities of *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda) in *Gambusia affinis* (Pisces). *The Journal of Parasitology* 69:1116-1124.
- Gregory RD, Woolhouse MEJ, 1993.** Quantification of parasite aggregation: a simulation study. *Acta Tropica* 54:131-139.
- Guelorget O, Frisoni GF, Perthuisot JP, Amanieu M, Le rôle du confinement dans l'écosystème lagunaire méditerranéen.** In: XXVIIIème congrès - Assemblée plénière de la CIESM, Cannes, 1982.
- Haenen OLM, Van Banning P, Dekker W, Wijngaarden T, Pathology and immunology of *Anguillicola crassus* related to European eel.** In: *Anguillicola* and Anguillicolosis of Eels, České Budějovice, 1993.
- Hahlbeck E, The actual distribution of the swimbladder nematode (*Anguillicola crassus*) in the European eel (*A. anguilla*) in the coastal area of Mecklenburg-Vorpommern (Germany, Baltic Sea).** In: EIFAC (ed) Working Party on Eel, Olsztyn, 1993.
- Halton DW, 1972.** Ultrastructure of the alimentary tract of *Aspidogaster conchicola* (Trematoda: Aspidogastrea). *The Journal of Parasitology* 55:455-467.
- Halton DW, 2004.** Microscopy and the helminth parasite. *Micron* 35:361-390.

- Halton DW, Dermott E, 1967.** Electron microscopy of certain gland cells in two digenetic trematodes. *The Journal of Parasitology* 53:1186-1191.
- Halton DW, Johnston BR, 1982a.** Functional morphology of the metacercarial cyst of *Bucephaloides gracilescens* (Trematoda: Bucephalidae). *Parasitology* 85:44-52.
- Halton DW, Johnston BR, 1982b.** Occurrence and infectivity of *Bucephaloides gracilescens* (Trematoda: Bucephalidae) in angler fish from the Irish sea. *Irish Naturalist's Journal* 20:526-531.
- Halton DW, Lyness RA, 1971.** Ultrastructure of the tegument and associated structures of *Aspidogaster conchicola* (Trematoda: Aspidogastrea). *The Journal of Parasitology* 57:1198-1210.
- Han ET, Han KY, Chai JY, 2003.** Tegumental ultrastructure of the juvenile and adult *Himasthla alincia* (Digenea: Echinostomatidae). *The Korean Journal of Parasitology* 41:17-25.
- Hanna REB, 1980a.** *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Experimental Parasitology* 50:155-170.
- Hanna REB, 1980b.** *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology* 50:103-114.
- Hermida M, Saraiva A, Cruz C, 2008.** Metazoan parasite community of a European eel (*Anguilla anguilla*) population from an estuary in Portugal. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 28:35-40.
- Higgins JC, 1979.** Role of the tegument of the metacercarial stage of *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) in the absorption of particulate material and small molecules in solution. *Parasitology* 78:99-106.

Higgins JC, 1980. Formation of the cyst wall and related changes in the structure of the tegument of *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) during its metamorphosis from the cercarial to the metacercarial stage. *Parasitology* 81:47-59.

Hockley DJ, 1973. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. *Advances in Parasitology* 11:233-305.

Hockley DJ, McLaren DJ, 1973. *Schistosoma mansoni* changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal for Parasitology* 3:13-25.

Hoffman GL, 1999. *Parasites of North American Fresh Water Fishes* (2nd ed.). Cornell University Press, Ithaca. 539 p.

Holmes JC, Price PW, 1986. Community of parasites. In: Kikkawa J, Anderson DJ (eds) *Community ecology: pattern & process*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 187-213.

Hong SJ, Chai JY, Lee SH, 1991. Surface ultrastructure of the developmental stages of *Heterophyopsis continua* (Trematoda: Heterophyidae). *The Journal of Parasitology* 77:613-620.

Hoole D, Mitchell JB, 1981. Ultrastructural observations on the sensory papillae of juvenile and adult *Gorgoderina vitelliloba* (Trematoda: Gorgoderidae). *International Journal for Parasitology* 11:411-417.

Hopkins CA, 1959. Seasonal variations in the incidence and development of the cestode *Proteocephalus filicollis* (Rud. 1810) in *Gasterosteus aculeatus* (L. 1766). *Parasitology* 49:529-542.

Hughes GM, 1966. The dimensions of fish gills in relation to their function. *Journal of Experimental Biology* 45:179-195.

Hurlbert SH, 1978. The measurement of niche overlap and some relatives. *Ecology* 59:67-77.

Hutcheson K, 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology* 29:151-154.

Hyman LH, 1951. *The Invertebrates, Volume II: Platyhelminthes and Rhynchocoela, The Acoelomate Bilateria.* McGraw-Hill, New York. 550 p.

Ibraheem MH, 2000. A light and electron microscope study on *Diplostomum tregenna*, Nazmi Gohar 1932 (Digenea: Diplostomatidae). *Helminthologia* 37:137-142.

Ip HS, Desser SS, 1984. Transmission electron microscopy of the tegumentary sense organs of *Cotylogaster occidentalis* (Trematoda: Aspidogastrea). *The Journal of Parasitology* 70:563-575.

Irwin SW, McCloughlin TJ, Fried B, 1991. Scanning and transmission electron microscopical observations on the tegument of excysted metacercariae and adults of *Zygocotyle lunata*. *Journal of Helminthology* 65:270-274.

Jakob E, Hanel R, Klimpel S, Zumholz K, 2009a. Salinity dependence of parasite infestation in the European eel *Anguilla anguilla* in northern Germany. *Ices Journal of Marine Science* 66:358-366.

Jakob E, Walter T, Hanel R, 2009b. A checklist of the protozoan and metazoan parasites of European eel (*Anguilla anguilla*): checklist of *Anguilla anguilla* parasites. *Journal of Applied Ichthyology*:1-49.

Jarecka L, 1964. Cycle évolutif à un seul hôte intermédiaire chez *Bothriocephalus claviceps* (L.) (Goeze, 1782), cestode de *Anguilla anguilla* L. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 41:429-442.

Jarroll CR, 1979. Population biology of *Bothriocephalus rarus* (Cestoda) Thomas (1837) in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens* Raf. *Parasitology* 79:183-193.

Jeacock A, 1969. The parasites of the eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Parasitology* 59:16-16.

- Jones A, Bray RA, Gibson DI (eds), 2005.** Keys to the Trematoda, Vol. 2. ©CAB International and The Natural History Museum, London. 745 p.
- Jones MK, Beveridge I, 1998.** *Nybelinia queenslandensis* sp. n. (Cestoda : Trypanorhyncha) parasitic in *Carcharhinus melanopterus*, from Australia, with observations on the fine structure of the scolex including the rhyncheal system. *Folia Parasitologica* 45:295-311.
- Kabata Z, 1981.** Copepoda (Crustacea) parasitic on fishes: problems and perspectives. *Advances in Parasitology* 19:1-71.
- Kanev I, Dezfuli BS, Nestorov M, Fried B, 1999.** Scanning electron microscopy of the collar region of *Deropristis inflata* and *Echinostoma revolutum*. *Journal of Helminthology* 73:51-57.
- Kažić DM, 1970.** Endohelminths of economically most important fishes in Lake Skadar (Yugoslavia). Veterinary Faculty, Sarajevo.
- Kažić DM, Ubelaker JF, Čanković M, 1982.** Endohelmini jegulje (*Anguilla anguilla*, Linne. 1758) Skadarskog jezera i nekih pritoka. *Acta Biologica Yugoslavia, Ichthyologia* 14:41-53.
- Kennedy CR, 1975.** *Ecological Animal Parasitology*. Blackwell, Oxford. 163 p.
- Kennedy CR, 1977.** The regulation of fish parasite populations. In: Esch GW (ed) *Regulation of Parasite Populations*. Academic Press, New-York, pp 63-109.
- Kennedy CR, 1978.** The parasite fauna of resident char *Salvelinus alpinus* from Arctic Islands, with special reference to Bear Island. *Journal of Fish Biology* 13:457-466.
- Kennedy CR, 1984.** The dynamics of a declining population of the acanthocephalan *Acanthocephalus clavula* in eels *Anguilla anguilla* in a small river. *Journal of Fish Biology* 25:665-677.
- Kennedy CR, 1990.** Helminth communities in freshwater fish: structured communities or stochastic assemblages? In: Esch GW, Bush AO, Aho JM (eds) *Parasite communities: patterns and processes*. Chapman & Hall, London, pp 131-156.

Kennedy CR, 1994. A checklist of British and Irish freshwater fish parasites with notes on their distribution. *Journal of Fish Biology* 6:613-644.

Kennedy CR, 1997. Long-term and seasonal changes in composition and richness of intestinal helminth communities in eels *Anguilla anguilla* of an isolated English river. *Folia Parasitologica* 44:267-273.

Kennedy CR, 2007. The pathogenic helminth parasites of eels. *Journal of Fish Diseases* 30:319-334.

Kennedy CR, Berrilli F, Di Cave D, De Liberato C, Orecchia P, 1998. Composition and diversity of helminth communities in eels *Anguilla anguilla* in the River Tiber: long-term changes and comparison with insular Europe. *Journal of Helminthology* 72:301-306.

Kennedy CR, Bush AO, Aho JM, 1986. Patterns in helminth communities: why are birds and fish different? *Parasitology* 93:205-215.

Kennedy CR, Di Cave D, 1998. *Gyrodactylus anguillae* (Monogenea): The story of an appearance and a disappearance. *Folia Parasitologica* 45:77-78.

Kennedy CR, Di Cave D, Berrilli E, Orecchia P, 1997. Composition and structure of helminth communities in eels *Anguilla anguilla* from Italian coastal lagoons. *Journal of Helminthology* 71:35-40.

Kennedy CR, Fitch DJ, 1990. Colonization, larval survival and epidemiology of the nematode *Anguillicola crassus*, parasitic in the eel, *Anguilla anguilla*, in Britain. *Journal of Fish Biology* 36:117-131.

Kennedy CR, Hine PM, 1969. Population biology of the cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch) in dace *Leuciscus leuciscus* (L.) of the River Avon. *Journal of Fish Biology* 1:209-219.

Kirk RS, Morrith D, Lewis JW, Kennedy CR, 2002. The osmotic relationship of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* with seawater eels. *Parasitology* 124:339-347.

- Knaus M, El-Matbouli M, 2005.** Characterisation of carbohydrate-binding sites in developmental stages of *Myxobolus cerebralis*. Parasitology Research 97:505-514.
- Køie M, 1971.** On the histochemistry and ultrastructure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Zoogonoides viviparus* in the first intermediate hosts. Ophelia 9:165-206.
- Køie M, 1977.** Stereoscan studies of cercariae, metacercariae, and adults of *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825) Fiscoeder 1903 (Trematoda: Heterophyidae). The Journal of Parasitology 63:835-839.
- Køie M, 1988a.** Parasites in eels, *Anguilla anguilla* (L.) from eutrophic Lake Esrum (Denmark). Acta Parasitologica 33:89-100.
- Køie M, 1988b.** Parasites in European eel *Anguilla anguilla* (L.) from Danish freshwater, brackish and marine localities. Ophelia 29:93-118.
- Køie M, 1991.** Swimbladder nematodes (*Anguillicola* spp.) and gill monogeneans (*Pseudodactylogyryus* spp.) parasitic on the European eel (*Anguilla anguilla*). Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer 47:391-398.
- Køie M, 1992.** Life-cycle and structure of the fish digenean *Brachyphallus crenatus* (Hemiuridae). The Journal of Parasitology 78:338-343.
- Kristmundsson A, Helgason S, 2007.** Parasite communities of eels *Anguilla anguilla* in freshwater and marine habitats in Iceland in comparison with other parasite communities of eels in Europe. Folia Parasitologica 54:141-153.
- Kryvi H, 1972.** The ultrastructure of the external tegument of *Derogenes varicus* and *Hemiurus communis* (Trematoda). Norwegian Journal of Zoology 20:243-254.
- Latha BB, Aiyasami SS, Pattabiraman G, Sivaraman T, Rajavelu G, 2004.** Seasonal activity of ticks on small ruminants in Tamil Nadu State, India. Tropical Animal Health and Production 36:122-133.

- Lecomte-Finiger R, 1983a.** Contribution à la connaissance de l'écobiologie de l'anguille, *Anguilla anguilla* L. 1758, des milieux lagunaires méditerranéens du golfe du Lion, Narbonnais et Roussillon. Université de Perpignan, Perpignan. 203 p.
- Lecomte-Finiger R, 1983b.** Régime alimentaire des civelles et anguillettes (*Anguilla anguilla*) dans trois étangs saumâtres du Roussillon. Bulletin d'Écologie 14:297-306.
- Lecomte-Finiger R, 1994.** Contribution de l'otolithométrie à l'étude de la dynamique de la migration larvaire de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 335:17-31.
- Lee SH, Hong SJ, Chai JY, Seo BS, 1985.** Studies on intestinal trematodes in Korea. XV. Tegumental ultrastructures of *Fibricola seoulensis* according to developmental stages. The Seoul Journal of Medicine 26:52-63.
- Lee SH, Seo BS, Chai JY, Hong SJ, 1984.** Study on *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) in Korea. Electron microscopic observation on the tegumental structure. The Korean Journal of Parasitology 22:1-10.
- Lee SH, Sohn WM, Hong ST, 1987.** Scanning electron microscopical findings of *Echinochasmus japonicus* tegument. Kisaengchunghak Chapchi-Korean Journal of Parasitology 25:51-58.
- Lefebvre F, Acou A, Poizat G, Crivelli AJ, Contournet P, Priour F, Soulas O, 2003.** L'anguillicolose chez les anguilles argentées: un suivi sur deux ans dans quatre habitats de Camargue (delta du Rhône, Sud de la France). Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 368:97-108.
- Lefebvre F, Contournet P, Crivelli AJ, 2002a.** The health state of the eel swimbladder as a measure of parasite pressure by *Anguillicola crassus*. Parasitology 124:457-463.

- Lefebvre F, Contournet P, Priour F, Soulas O, Crivelli AJ, 2002b.** Spatial and temporal variation in *Anguillicola crassus* counts: results of a 4 year survey of eels in Mediterranean lagoons. *Diseases of Aquatic Organisms* 50.
- Lefebvre F, Wielgoss S, Nagasawa K, Moravec F, 2012.** On the origin of *Anguillicoloides crassus*, the invasive nematode of anguillid eels. *Aquatic Invasions* 7:443-453.
- Legendre P, Legendre L, 1998.** Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam. 853 p.
- Loucif N, Meddour A, Samraoui B, 2009.** Biodiversité des parasites chez *Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758 dans le Parc National d'El Kala - Algérie. *European Journal of Scientific Research* 2:300-309.
- Lumsden RD, 1975.** Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Experimental Parasitology* 37:267-339.
- Lysne DA, Hemmingsen W, Skorping A, 1997.** Regulation of infrapopulations of *Cryptocotyle lingua* on cod. *Parasitology* 114:145-150.
- MacKenzie K, Gibson DI, 1970.** Ecological studies on some parasites of plaice, *Pleuronectes platessa* (L.) and flounder *Platichthys flesus* (L.). *Symposia of the British Society for Parasitology* 8:1-42.
- Magurran AE, 1988.** Ecological diversity and its measurement. Croom-Helm, London. 179 p.
- Maillo PA, Vich MA, Salvado H, Marques A, Gracia MP, 2005.** Parasites of *Anguilla anguilla* (L.) from three coastal lagoons of the River Ebro delta (Western Mediterranean). *Acta Parasitologica* 50:156-160.
- Maldonado AJ, Loker ES, Morgan JA, Rey L, Lanfredi RM, 2001.** Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes:Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitology Research* 87:840-848.

Marchand B, 1994. Les animaux parasites. Biologie et systématique. Les Nouvelles Éditions Africaines du Sénégal, Dakar. 294 p.

Marchelidon J, Le Belle N, Hardy A, Vidal B, Sbaihi M, Burzawa-Gerard E, Schmitz M, Dufour S, 1999. Etude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison: Application à la caractérisation du stade argenté. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 355:349-368.

Marcogliese DJ, Esch GW, 1989. Alternations in seasonal dynamics of *Bothriocephalus acheilognathi* in a North Carolina cooling reservoir over a seven-year period. The Journal of Parasitology 75:378-382.

Marques JF, Santos MJ, Cabral HN, 2009. Zoogeographical patterns of flatfish (Pleuronectiformes) parasites in the Northeast Atlantic and the importance of the Portuguese coast as a transitional area. Scientia Marina 73:1-5.

Mata-López R, Leon-Regagnon V, 2006. Comparative study of the tegumental surface of several species of *Gorgoderina* Looss, 1902 (Digenea: Gorgoderidae), as revealed by scanning electron microscopy. Comparative Parasitology 73:24-34.

Matejusova I, Simkova A, Sasal P, Gelnar M, 2003. Microhabitat distribution of *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini* among and within gill arches of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Parasitology Research 89:290-296.

Matthews BF, Matthews RA, 1988a. The ecsoma in Hemiuridae (Digenea, Hemiuroidea) - Tegumental structure and function in the mesocercaria and the metacercaria of *Lecithochirium furcolabiatum* (Jones, 1933) Dawes, 1947. Journal of Helminthology 62:317-330.

Matthews BF, Matthews RA, 1988b. The tegument in Hemiuridae (Digenea: Hemiuroidea): structure and function in the adult. Journal of Helminthology 62:305-316.

- Mattison RG, Hanna RE, Nizami WA, 1994.** Ultrastructure and histochemistry of the tegument of juvenile paramphistomes during migration in Indian ruminants. *Journal of Helminthology* 68:211-221.
- McCleave JD, Kleckner RC, 1987.** Distribution of leptocephali of the catadromous *Anguilla* species in the western Sargasso Sea in relation to water circulation and migration. *Bulletin of Marine Science* 41:789-806.
- McGeoch MA, Chown SL, 1998.** Scaling up the value of bioindicators. *Trends in Ecology and Evolution* 13:46-47.
- MEEDDAT, ONEMA, MAP, 2007.** Plan de gestion Anguille de la France : volet local de l'unité de gestion Corse. Préfecture de la région Rhône-Alpes.
- Mo TA, Sterud E, 1998.** First observations of *Pseudodactylogyrus* spp. and other parasites in wild eel (*Anguilla anguilla* L.) in Norway. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology* 8:1-5.
- Molnár K, Székely C, Baska F, 1991.** Mass mortality of eel in Lake Balaton due to *Anguillicola crassus* infection. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 11:211-212.
- Molnár K, Szekely C, Perenyi M, 1994.** Dynamics of *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) infection in eels of Lake Balaton. *Folia Parasitologica* 41:193-202.
- Moravec F, 1985.** Occurrence of endoparasitic helminths in eels (*Anguilla anguilla* (L.)) from the Mácha lake fishpond system, Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* 32:113-125.
- Moravec F, 1994.** Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London. 473 p.
- Moravec F, 2009.** Surface morphology of *Nicolla skrjabini* (Trematoda: Opecoelidae), a common parasite of European freshwater fishes, as revealed by SEM. *Parasitology Research* 105:577-578.

- Moravec F, Sey O, 1989.** Some trematodes of freshwater fishes from North Vietnam with a list of recorded endohelminths by fish hosts. *Folia Parasitologica* 36:243-262.
- Moravec F, Skorikova B, 1998.** Amphibians and larvae of aquatic insects as new paratenic hosts of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea), a swimbladder parasite of eels. *Diseases of Aquatic Organisms* 34:217-222.
- Moriarty C, Dekker W, 1997.** Management of European eel, vol 15. Fisheries Bulletin. Dublin. 108 p.
- Morris GP, Threadgold LT, 1968.** Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 54:15-27.
- Mouillot D, Culioli JM, Do Chi T, 2002.** Indicator species analysis as a test of non-random distribution of species in the context of marine protected areas. *Environmental Conservation* 29:385-390.
- Nadakavukaren MJ, Nollen PM, 1975.** A scanning electron microscopic investigation of outer surfaces of *Gorgoderina attenuata*. *International Journal for Parasitology* 5:591-595.
- Nagasawa K, Kim YG, Hirose H, 1994.** *Anguillicola crassus* and *A. globiceps* (Nematoda: Dracunculoidea) parasitic in the swimbladder of eels (*Anguilla japonica* and *A. anguilla*) in East Asia: a review. *Folia Parasitologica* 41:127-137.
- Nie P, Kennedy CR, 1991a.** Occurrence and seasonal dynamics of *Pseudodactylogyrus anguillae* (Yin and Sproston) (Monogenea) in eel, *Anguilla anguilla* (L), in England. *Journal of Fish Biology* 39:897-900.
- Nie P, Kennedy CR, 1991b.** Population biology of *Proteocephalus macrocephalus* (Creplin) in the european eel, *Anguilla anguilla* (Linnaeus), in 2 small rivers. *Journal of Fish Biology* 38:921-927.

- Nie P, Kennedy CR, 1991c.** Seasonal population-dynamics of *Paraquimperia tenerrima* (Linstow) (Nematoda) in the european eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus) in 3 localities of Southwest England. *Journal of Fish Biology* 39:441-449.
- Nie P, Kennedy CR, 1992.** Populations of *Bothriocephalus claviceps* (Goeze) (Cestoda) in the european eel, *Anguilla anguilla* (L), in 3 localities in Southwest England. *Journal of Fish Biology* 41:521-531.
- Norton J, Lewis JW, Rollinson D, 2003.** Parasite infracommunity diversity in eels: a reflection of local component community diversity. *Parasitology* 127:475-482.
- Oliver G, 1982.** *Microcotyle chrysophrii* Van Beneden et Hesse, 1863 (Monogenea, Polyopisthocotylea, Microcotylidae) parasite de *Sparus aurata* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Sparidae) dans les étangs littoraux du Languedoc-Roussillon (France). *Bulletin de la Société Zoologique de France* 20:113-118.
- Orecka-Grabda T, Wierzbicka J, 1994.** Metazoan parasites of the eel, *Anguilla anguilla* (L.) in the Szczecin lagoon and River Odra mouth area. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 24:13-18.
- Orsoni V, Souchu P, Sauzade D, 2001.** Caractérisation de l'état d'eutrophisation des trois principaux étangs corses (Biguglia, Diana et Urbino), et proposition de renforcement de leur surveillance. Rapport final (trans: Translator). Number of 171 + annexes p.
- Outeiral S, Álvarez MF, Iglesias R, Paniagua E, San Martín ML, 2002.** Non-digenean parasites of eels from estuaries in North-West Spain. *Helminthologia* 39:91-97.
- Outeiral S, Álvarez MF, Paniagua E, Leiro L, San-Martín ML, 2001.** Digenean parasites of the European eel from estuaries in North-West Spain. *Helminthologia* 38:85-92.
- Palstra AP, Heppener DFM, van Ginneken VJT, Szekely C, van den Thillart G, 2007.** Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352:244-256.

Pandey KC, Tewari SK, 1984. SEM studies on *Bucephalopsis karvei* Bhalerao, 1937, an intestinal parasite of the fish, *Xenentodon cancila* (Ham.). Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Animal Sciences) 93:527-533.

Panfili J, Ximénès M-C, 1994. Évaluation de l'âge et de la croissance de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) en milieu continental : méthodologies, validation, application en Méditerranée et comparaisons en Europe. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 335:43-66.

Pankhurst NW, 1982. Relation of visual changes to the onset of sexual-maturation in the european eel *Anguilla anguilla* (L). Journal of Fish Biology 21:127-140.

Paperna I, Diamant A, Overstreet RM, 1984. Monogenean infestations and mortality in wild and cultured Red Sea fishes. Helgoländ Meeresunters 37:445-462.

Paperna I, Dzikowski R, 2006. Digenea (Phylum Platyhelminthes). In: Woo PTK (ed) Fish diseases and disorders, Vol 1, 2nd ed Protozoan and metazoan infections. ©CAB International, Wallingford, UK, pp 345-390.

Pasqualini V, Pergent-Martini C, Fernandez C, Ferrat L, Tomaszewski JE, Pergent G, 2006. Wetland monitoring: aquatic plant changes in two Corsican coastal lagoons (Western Mediterranean Sea). Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 16:43-60.

Pergent-Martini C, Fernandez C, Agostini S, Pergent G, 1997. Les étangs de Corse, Bibliographie - Synthèse 1997 (trans: Translator). Number of 269 p.

Peters G, Hartmann F, 1986. *Anguillicola*, a parasitic nematode of the swim bladder spreading among eel population in Europe. Diseases of Aquatic Organisms 1:229-230.

Petrochenko VI, 1956. Acanthocephala (thornyheads) of domestic and wild animals. Vol. II. Izd. Akad. Nauk., Moscow. 458 p.

Petter A, Fontaine YA, Le Belle N, 1989. Étude du développement larvaire de *Anguillicola crassus* (Dracunculoidea, Nematoda) chez un Cyclopidae de la région parisienne. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 64:347-355.

Poddubnaya LG, Mishina E, Zhokhov AE, Gibson DI, 2010. Ultrastructural features of the tegumental surface of a new metacercaria, *Nematostrigea* sp. (Trematoda: Strigeidae), with a search for potential taxonomically informative characters. Systematic Parasitology 75:59-73.

Podvyaznaya IM, Galaktionov KV, 2004. An ultrastructural study of the cercarial excretory system in *Bucephaloides gracilescens* and *Proisorhynchus squamatus*. Journal of Helminthology 78:147-158.

Podvyaznaya IM, Galaktionov KV, 2008. An ultrastructural study of the early cercarial development in *Proisorhynchoides borealis* (Digenea: Bucephalidae) with special reference to formation of the primitive epithelium. Journal of Helminthology 82:101-108.

Podvyaznaya IM, Galaktionov KV, Irwin SW, 2004. An ultrastructural study of excretory system development in the cercariae of *Proisorhynchoides gracilescens* (Rudolphi, 1819) and *Proisorhynchus squamatus* Odhner, 1905 (Digenea, Bucephalidae). Parasitology 129:165-179.

Popiel I, 1978. Ultrastructure of daughter sporocyst tegument of cercaria *Vaullegeardi pelseneer* (Digenea, Hemiuridae). Zoologica Scripta 7:155-157.

Poulin R, 1996. Measuring parasite aggregation: defending the index of discrepancy. International Journal for Parasitology 26:227-229.

Poulin R, 1999. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? International Journal for Parasitology 29:903-914.

Poulin R, 2000. Variation in the intraspecific relationship between fish length and intensity of parasitic infection: biological and statistical causes. Journal of Fish Biology 56:123-137.

Price PW, 1980. Evolutionary Biology of Parasites. Princeton University Press, Princeton. 256 p.

- Quilchini Y, Foata J, Mouillot D, Mattei J, Marchand B, 2010.** The influence of altitude, hydrographic network and season on brown trout parasites in Corsica using indicator species analysis. *Journal of Helminthology* 84:13-19.
- Rahhou I, Morand S, Lecomte-Finiger R, Sasal P, 2005.** Biogeographical relationships of the eel parasite *Anguillicola crassus* revealed by random amplified polymorphic DNA markers (RAPDS). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 378-379:87-98.
- Reynolds ES, 1963.** Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-212.
- Roberts LS, Janovy J, 1996.** *Foundations of Parasitology*. Brown, W. C., Dubuque. 659 p.
- Roberts LS, Janovy J, 2000.** Trematoda: form, function, and classification of Digeneans. In: Schmidt GD, Roberts LS (eds) *Foundations of parasitology*, 6th ed. McGraw-Hill Companies, Dubuque, IA, pp 670-696.
- Robertsen G, Olstad K, Plaisance L, Bachmann L, Bakke TA, 2008.** *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, Gyrodactylidae) infections on resident Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in southern Norway. *Environmental Biology of Fishes* 83:99-105.
- Rodino E, Comparini A, 1978.** Genetic variability in the European eel, *Anguilla anguilla* L. In: Battaglia B, Beardmore JA (eds) *Marine Organisms, Genetics, Ecology and Evolution* Nato Conf Series IV, vol 2. Plenum Press, New-York, pp 389-424.
- Rohde K, 1966.** Sense receptors of *Multicotyle pruvisi* Dawes 1941 (Trematoda, Aspidobothria). *Nature* 211:820-822.
- Rohde K, 1991.** Intra- and interspecific interactions in low density populations in resource-rich habitats. *Oikos* 60:91-104.
- Rohde K, Watson N, 1990.** Non-ciliate sensory receptors of larval *Multicotyle purvisi* (Trematoda: Aspidogastrea). *Parasitology Research* 76:585-590.

Rolbiecki L, Rokicki J, 2006. Parasite fauna of the eel, *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758), from the Polish part of the Vistula Lagoon. *Wiadomosci Parazytologiczne* 52:115-119.

Rothman AH, 1959. The physiology of tapeworms, correlated with structures seen with the electron microscope. *The Journal of Parasitology* 45:1-28.

Saraiva A, Antão A, Cruz C, 2005. Comparative study of parasite communities in European eel *Anguilla anguilla* from rivers of northern Portugal. *Helminthologia* 42:99-106.

Saraiva A, Chubb JC, 1989. Preliminary observations on the parasites of *Anguilla anguilla* (L.) from Portugal. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 9:88-89.

Schabuss M, Kennedy CR, Konecny R, Grillitsch B, Schiemer F, Herzig A, 2005. Long-term investigation of the composition and richness of intestinal helminth communities in the stocked population of eel, *Anguilla anguilla*, in Neusiedler See, Austria. *Parasitology* 130:185-194.

Schabuss M, Konecny R, Belpaire C, Schiemer F, 1997. Endoparasitic helminths of the European eel, *Anguilla anguilla*, from four disconnected meanders from the rivers Leie and Scheldt in western Flanders, Belgium. *Folia Parasitologica* 44:12-18.

Schell SC, 1970. How to Know The Trematodes. Brown, W. C. Company Publishers, Dubuque. 355 p.

Schmidt GD, 1970. How to Know The Tapeworms. Brown, W. C. Company Publishers, Dubuque. 266 p.

Scholz T, Drabek R, Hanzelova V, 1998. Scolex morphology of *Proteocephalus* tapeworms (Cestoda : Proteocephalidae), parasites of freshwater fish in the Palaearctic Region. *Folia Parasitologica* 45:27-43.

Scholz T, Kepr T, 1988. The first finding of the tapeworm *Proteocephalus macrocephalus* (Creplin, 1825) (Cestoda: Proteocephalidae) in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* 35:111-111.

Scholz T, Skerikova A, Shimazu T, Grygier MJ, 2004. A taxonomic study of species of *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808 (Cestoda : Pseudophyllidea) from eels in Japan: morphological and molecular evidence for the occurrence of *B. claviceps* (Goeze, 1782) and confirmation of the validity of *B. japonicus* Yamaguti, 1934. *Systematic Parasitology* 57:87-96.

Scholz T, Spakulova M, Snabel V, Kralova I, Hanzelova V, 1997. A multidisciplinary approach to the systematics of *Proteocephalus macrocephalus* (Creplin, 1825) (Cestoda: Proteocephalidae). *Systematic Parasitology* 37:1-12.

Senft AW, Philpott DE, Pelofsky AH, 1961. Electron microscope observations of the integument, flame cells, and gut of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 47:217-229.

Seyda M, 1973. Parasites of eel *Anguilla anguilla* (L.) from the Szczecin Firth and adjacent waters. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 3:67-75.

Shannon WA, Bogitsh BJ, 1971. *Megalodiscus temperatus*: comparative radioautography of glucose-3H incorporation. *Experimental Parasitology* 29:309-319.

Skerikova A, Hypsa V, Scholz T, 2001. Phylogenetic analysis of European species of *Proteocephalus* (Cestoda : Proteocephalidea): compatibility of molecular and morphological data, and parasite-host coevolution. *International Journal for Parasitology* 31:1121-1128.

Southgate VR, Rollinson D, Vercruyse J, 1986. Scanning electron microscopy of the tegument of adult *Schistosoma curassoni*, and comparison with male *Schistosoma bovis* and *Schistosoma haematobium* from Senegal. *Parasitology* 93:433-442.

Špakulová M, Macko JK, Berrilli F, Dezfuli BS, 2002. Description of *Bucephalus anguillae* n. sp (Trematoda: Bucephalidae), a parasite of the eel *Anguilla anguilla* (Anguillidae) from a brackish water lagoon of the Adriatic Sea. *The Journal of Parasitology* 88:382-387.

- Spurr AR, 1969.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research 26:31-43.
- Strazhnik LV, Davydov ON, 1975.** On the role of increased temperatures in the activity of certain fish cestodes. Parazitologiya 9:37-46.
- Sures B, Knopf K, Würtz J, Hirt J, 1999.** Richness and diversity of parasite communities in European eels *Anguilla anguilla* of the River Rhine, Germany, with special reference to helminth parasites. Parasitology 119.
- Sures B, Streit B, 2001.** Eel parasite diversity and intermediate host abundance in the River Rhine, Germany. Parasitology 123:185-191.
- Sures B, Zimmermann S, Sonntag C, Stuben D, Taraschewski H, 2003.** The acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* as a sensitive indicator of the precious metals Pt and Rh from automobile catalytic converters. Environmental Pollution 122:401-405.
- Swarup M, Jain SP, 1984.** *Bucephalopsis lateroporus* n. sp. (Trematoda: Bucephalidae Poche, 1907) from an Indian fresh water fish. Rivista di Parassitologia 1:415-417.
- Tajrine DD, Kapoor NN, McLaughlin JD, 1999.** Scanning electron microscopy of newly excysted juvenile and adult *Cyclocoelum mutabile* (Digenea). Canadian Journal of Zoology 77:1111-1116.
- Taraschewski H, Moravec F, Lamah T, Anders K, 1987.** Distribution and morphology of two helminths recently introduced into European eel populations - *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala, Tenuisentidae). Diseases of Aquatic Organisms 3:167-176.
- Ternengo S, Levron C, Desideri F, Marchand B, 2005.** Parasite communities in European eels *Anguilla anguilla* (Pisces, Teleostei) from a Corsican coastal pond. Vie et Milieu-Life and Environment 55:1-6.

- Ternengo S, Levron C, Mouillot D, Marchand B, 2009.** Site influence in parasite distribution from fishes of the Bonifacio Strait Marine Reserve (Corsica Island, Mediterranean Sea). *Parasitology Research* 104:1279-1287.
- Tesch FW, 1977.** The Eel. Biology and Management of Anguillid Eels. Chapman & Hall Ltd., London.
- Thomas K, Ollevier F, 1992.** Population biology of *Anguillicola crassus* in the final host *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms* 14:163-170.
- Thomas K, Ollevier F, 1993.** Hatching, survival, activity and penetration efficiency of second-stage larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Parasitology* 107:211-217.
- Threadgold LT, 1963.** The tegument and associated structures of *Fasciola hepatica*. *Quarterly Review of Microscopical Science* 104:505-512.
- Threadgold LT, 1984.** Parasitic platyhelminths. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS (eds) *Biology of the integument, Vol 1 Invertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 132-191.
- Tsukamoto K, 1992.** Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature* 356:789-791.
- Tsukamoto K, Nakai I, Tesch WV, 1998.** Do all freshwater eels migrate? *Nature* 396:635-636.
- Tzeng WN, Severin KP, Wickström H, 1997.** Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology-Progress Series* 149:73-81.
- Uriarte J, Llorente MM, Valderrabano J, 2003.** Seasonal changes of gastrointestinal nematode burden in sheep under an intensive grazing system. *Veterinary Parasitology* 118:79-92.
- Ursone RL, Fried B, 1995.** Light and scanning electron microscopy of *Echinostoma caproni* (Trematoda) during maturation in ICR mice. *Parasitology Research* 81:45-51.

- van Beurden SJ, Engelsma MY, Roozenburg I, Voorbergen-Laarman MA, van Tulden PW, Kerkhoff S, van Nieuwstadt AP, Davidse A, Haenen OLM, 2012.** Viral diseases of wild and farmed European eel *Anguilla anguilla* with particular reference to the Netherlands. *Diseases of Aquatic Organisms* 101:69-86.
- Van Landeghem S, Hakala K, Ronnqvist S, Salakoski T, Van de Peer Y, Ginter F, 2012.** Exploring biomolecular literature with EVEX: Connecting genes through events, homology, and indirect associations. *Advances in bioinformatics* 2012:582765-582765.
- Vigier JF, 1997.** Les pathologies des anguilles: synthèse des connaissances sur la pathologie des différentes espèces du genre *Anguilla* (trans: Translator). Number of 198 p.
- Vilas R, Paniagua E, Sanmartin ML, 2003.** On the presence of *Lecithochirium musculus* (Digenea : Hemiuridae) in *Conger conger*. *Folia Parasitologica* 50:154-156.
- Walkey M, Kortin W, 1985.** Thermal alterations of pyruvate kinases in the fish tapeworm *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research* 71:527-532.
- Whittington ID, Cribb BW, 2001.** Adhesive secretions in the Platyhelminthes. *Advances in Parasitology* 48:101-224.
- Williams JB, McKenzie J, 1995.** Scanning electron microscopy of *Polystoma integerrimum* (Monogenea, Polystomatidae). *International Journal for Parasitology* 25:335-342.
- Winger AC, Kanck M, Kristoffersen R, Knudsen R, 2008.** Seasonal dynamics and persistence of *Gyrodactylus salaris* in two riverine anadromous Arctic charr populations. *Environmental Biology of Fishes* 83:117-123.
- Wootton R, 1973.** The metazoan parasite fauna of fish from Hanningfield Reservoir, Essex, in relation to features of the habitats and host populations. *Journal of Zoology (London)* 171:323-331.

- Wootten R, 1974.** Studies on the life history and development of *Proteocephalus percae* (Müller) (Cestoda: Proteocephalidae). *Journal of Helminthology* 48:269-281.
- Würtz J, Knopf K, Taraschewski H, 1998.** Distribution and prevalence of *Anguillicola crassus* (Nematoda) in eels *Anguilla anguilla* of the rivers Rhine and Naab, Germany. *Diseases of Aquatic Organisms* 32:137-143.
- Xavier AML, Magalhaes JAS, Cunha GDP, Silva AC, Tavares DAG, Sarro-Silva MD, Neto A, 2010.** Morphological tegument alterations of adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non anti-helminthic treated, high-immune-tolerogenic and low-inflammatory mice. *Acta Tropica* 116:95-99.
- Yamaguti S, 1971.** Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates, vol 1. Keigaku Publishing Co., Tokyo, Japan.
- Žd'árská Z, 1992.** Transmission electron microscopy of sensory receptors of *Echinostoma revolutum* (Froelich 1802) cercaria (Digenea: Echinostomatidae). *Parasitology Research* 78:598-606.
- Žd'árská Z, 1993.** Transmission electron microscopy of ventral sucker papillae of *Brachylaimus aequans* (Digenea: Brachylaimidae). *Folia Parasitologica* 40:203-207.
- Žd'árská Z, Nebesářová J, 2003.** Transmission electron microscopy of intra-tegumental sensory receptors in the forebody of *Crepidostomum metoecus* (Digenea: Allocreadiidae). *Folia Parasitologica* 50:215-219.
- Žd'árská Z, Nebesářová J, 2004.** Transmission electron microscopy of presumed sensory receptors in the forebody papillae of *Crepidostomum metoecus* (Digenea: Allocreadiidae). *Folia Parasitologica* 51:27-32.
- Žd'árská Z, Soboleva NT, Valkounová J, Štěrba J, 1990.** Ultrastructure of the general body tegument of trematode *Brachylaimus aequans*. *Helminthologia* 27:3-9.

Résumé

Une étude parasitaire de l'anguille d'Europe a été menée dans les lagunes de Biguglia et d'Urbino en Corse.

La composition des communautés de parasites a été décrite. Treize espèces parasites ont été identifiées parmi lesquelles: trois digènes, *Bucephalus anguillae*, *Deropristis inflata*, *Lecithochirium musculus*; un monogène, *Pseudodactylogyrus anguillae*; trois cestodes, *Bothriocephalus claviceps*, *Proteocephalus macrocephalus*, *Myzophyllobothrium* sp. (larve); trois nématodes, *Anguillicoloides crassus*, *Contracaecum* sp. (larve enkystée), *Goezia anguillae*; un acanthocéphale, *Acanthocephaloides incrassatus*; un copépode, *Ergasilus gibbus*; et un myxozoaire, *Myxobolus portucalensis*.

La présence d'espèces invasives, notamment le parasite branchial *P. anguillae* et le nématode parasite *A. crassus*, dans les lagunes corses est confirmée. Ces espèces, et particulièrement le monogène, présentent des valeurs épidémiologiques croissantes depuis les dernières études menées.

Plusieurs espèces présentent des différences de prévalence significatives entre les deux lagunes. Des différences au niveau de la richesse spécifique et des valeurs de diversité, plus élevées pour les parasites des anguilles de la lagune d'Urbino au niveau intestinal métacommunautaire et infracommunautaire, ont été démontrées. Cependant les valeurs les plus élevées de diversité spécifique et les valeurs de dominance les plus basses ont été calculées pour les communautés parasitaires des anguilles de la lagune de Biguglia. Nous avons également mis en avant une diversité parasitaire spécifique plutôt faible chez les anguilles des lagunes corses par rapport aux autres lagunes d'Europe. Les communautés parasitaires de l'anguille d'Europe dans les lagunes de Biguglia et d'Urbino en Corse sont marquées par l'environnement de leur hôte. Une dépendance vis-à-vis de la salinité de la lagune a ainsi été démontrée.

Les valeurs d'infestation les plus élevées ont été observées durant les saisons les plus chaudes de l'année pour la majorité des espèces parasites observées (*B. anguillae*, *D. inflata*, *L. musculus*, *P. anguillae*, *P. macrocephalus*, *A. crassus*, les kystes de *Contracaecum* sp., *A. incrassatus* et *E. gibbus*).

Nous avons également démontré que l'état d'argenture et la taille ont une influence significative sur les taux d'infestation de sept espèces parasites (*D. inflata*, *L. musculus*, *P. anguillae*, *P. macrocephalus*, les kystes de *Contracaecum* sp., *A. incrassatus* et *E. gibbus*). La méthode de l'espèce indicatrice a confirmé que le site d'étude, la saison, l'état d'argenture ou la taille de l'anguille pouvait influencer sur la présence de certaines espèces parasites.

Le tégument de trois digènes parasites de l'anguille d'Europe, *B. anguillae*, *L. musculus* et *D. inflata*, a été étudié en microscopie électronique à balayage et à transmission. Nous avons démontré la présence de structures caractéristiques de l'organisation tégumentaire des digènes ainsi que de formations spécifiques, notamment au niveau de la structure des récepteurs sensoriels et des écailles.

Mots-clés: Anguille d'Europe, communautés parasitaires, interactions, diversité, espèces indicatrices, lagunes, digènes, microscopie électronique, tégument.

Abstract

A survey of the parasitic fauna of the European eel has been conducted in the Biguglia and Urbino lagoons in Corsica.

The composition of the parasite communities was determined. Thirteen parasite species were identified namely: three digeneans, *Bucephalus anguillae*, *Deropristis inflata*, *Lecithochirium musculus*; one monogenean, *Pseudodactylogyrus anguillae*; three cestodes, *Bothriocephalus claviceps*, *Proteocephalus macrocephalus*, larvae of *Myzophyllobothrium* sp.; three nematodes, *Anguillicoloides crassus*, encysted larvae of *Contracaecum* sp., *Goezia anguillae*; one acanthocephalan, *Acanthocephaloides incrassatus*; one copepod, *Ergasilus gibbus*; and plasmodia of one myxozoan, *Myxobolus portucalensis*.

The presence of invasive species in lagoons from Corsica, namely the gill monogenean *P. anguillae* and the swimbladder nematode *A. crassus*, was confirmed. These species, particularly the monogenean, exhibit increasing infection rates since the last studies conducted.

Many species showed significant differences in prevalence between the two lagoons. Differences in the species richness and higher values of diversity for the intestinal parasite component communities and infracommunities of eels from the Urbino lagoon were demonstrated. However, highest values of richness and lowest dominance values were observed for the parasite communities of eels from the Biguglia lagoon. We also demonstrated lower values of diversity for the parasite communities of eels from Corsica in comparison to eels from other European lagoons. The environment of the host (in particular the salinity range) has been demonstrated to have a significant influence on the composition of the parasite communities of eels from the Biguglia and Urbino lagoons.

Highest values of infestation were observed for the warmer seasons of the year for the majority of the parasite species (*B. anguillae*, *D. inflata*, *L. musculus*, *P. anguillae*, *P. macrocephalus*, *A. crassus*, encysted larvae of *Contracaecum* sp., *A. incrassatus*, and *E. gibbus*).

We also demonstrated that silvering stage and length have a significant influence on the rates of infestation by seven parasite species (*D. inflata*, *L. musculus*, *P. anguillae*, *P. macrocephalus*, cysts of *Contracaecum* sp., *A. incrassatus* et *E. gibbus*). The indicator species method confirmed the assumption that site sampling, season, silvering stage and length of the eel could have an influence on the presence of parasite species.

The teguments of three digeneans (*B. anguillae*, *L. musculus* and *D. inflata*) recovered within the European eel were studied using scanning and transmission electron microscopy. We showed the presence of structures characteristic of the tegumental organization of digeneans but also the presence of specific structures such as various types of sensory receptors and spines.

Keywords: European eel, parasite communities, interactions, diversity, indicator species, lagoons, Digenea, electron microscopy, tegument.