



**HAL**  
open science

# Parasites Chromidina et Dicyémides des sacs rénaux de Céphalopodes : évaluation de leur biodiversité morphologique et moléculaire

Dhikra Souidenne

► **To cite this version:**

Dhikra Souidenne. Parasites Chromidina et Dicyémides des sacs rénaux de Céphalopodes : évaluation de leur biodiversité morphologique et moléculaire. Microbiologie et Parasitologie. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS; Université de Carthage (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016MNHN0009 . tel-01781044v2

**HAL Id: tel-01781044**

**<https://theses.hal.science/tel-01781044v2>**

Submitted on 24 Sep 2019

**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.







## Remerciements

Je remercie tout d'abord le professeur **Philippe Grellier** pour m'avoir confié ce projet et m'avoir permis de réaliser une thèse sur ce sujet passionnant. Rien de tout ce travail n'aurait pu être réalisé sans son investissement, son soutien et sa disponibilité surtout dans les moments délicats. Il n'a cessé de m'aider sur tous les plans, en commençant du début de la thèse quand il m'a initié et formé aux techniques d'étude de ces parasites, en passant par les préparations de communications, des demandes de financement et des missions d'échantillonnages à Concarneau... jusqu'aux nombreuses relectures de ce manuscrit qui m'ont permis d'aborder la soutenance avec sérénité. Philippe, je ne te remercierai jamais assez pour ton aide et ton soutien qui m'ont été précieux et qui ont rendu possible de mener à son terme cette thèse.

Je remercie ma directrice de thèse, professeur **Isabelle Florent**, pour avoir accepté de diriger ce travail malgré son planning chargé, pour sa confiance et la liberté dans le choix d'orientation de mes manipulations. Merci de ton encadrement et ton intérêt pour ce projet de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, professeur **Mohamed Salah Romdhane** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de son intérêt dans le projet. Merci pour votre confiance et votre encouragement.

Je remercie Professeur **M'Hamed El Cfsi** pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie également pour tous ce que j'ai eu l'opportunité d'apprendre de vous durant mes années d'études universitaires. Merci pour la façon dont vous motivez et conseillez vos étudiants même après la fin de leurs études, et merci pour nous avoir transmis votre passion pour le monde animal et le monde de la mer.

Je remercie Dr **Isabelle Arzul**, pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de cette thèse et nous faire profiter de son expérience dans l'étude des parasites de mollusques.

Je remercie Pr **Angel Guerra** de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de nous faire également bénéficier de sa grande expérience dans l'étude des céphalopodes et leurs parasites.

Je remercie sincèrement Dr **Nicolas Puillandre** d'avoir accepté de juger mon travail et pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions avec enthousiasme.

Je remercie du fond du cœur, Professeur **Hidetaka Furuya**, professeur à l'Université d'Osaka au Japon de m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir formé à l'étude des dicyémides et d'avoir toujours répondu à toute mes questions même à distance. C'était une expérience magnifique de découvrir le monde de la recherche dans ce pays exceptionnel et de rencontrer cette équipe de jeunes chercheurs passionnés et dynamiques : Takahito Suzuki, Naoki Hisayama, Fuko Onoda et tous les autres membres du labo...

« 筆者を研究室に迎え入れ、指導し、優れた研究チームの方々にお会いする機会を与えてくださった古屋秀隆先生に感謝の意を表するとともに、この研究を捧げます。 »

Je remercie Dr. **Marc Dellinger** pour tous ce qu'il m'a appris sur l'étude des ciliés à l'occasion des missions d'échantillonnage à Concarneau et pour ses précieux conseils sur mon travail portant sur les chromidinés et toutes les conversations scientifiques qui m'ont guidé dans les réflexions et manipulations scientifiques sur les ciliés.

Je remercie **Dr Agnès Travers** pour ses conseils et son intérêt pour mon sujet de thèse lors des comités de thèse.

Merci aux membres de l'Unité Scientifique MNHN 405 de la Station de Biologie Marine de Concarneau :

Je remercie du fond du cœur Dr Elena Luchetti, sans son aide, aucune mission d'échantillonnage n'aurait pu être possible. Merci Elena pour ton accueil chaleureux, pour avoir mis à ma disposition ton bureau, tout le matériel et les produits de ton laboratoire, de m'avoir accompagné à la criée au port de pêche de Concarneau tous les jours des missions d'échantillonnage. Je te remercie aussi pour les longues discussions et échanges intéressants.

Un grand merci aussi à Mme Aïcha Badou, pour m'avoir également aidé, renseigné et de m'avoir donné accès à tout le matériel dont j'ai eu besoin une fois au laboratoire de la station marine de Concarneau.

Je remercie également Dr Samuel Iglésias pour m'avoir accompagné de nombreuses fois à la criée et de m'avoir mis en contact avec certains pêcheurs du port de Concarneau pour assurer un approvisionnement quotidien en échantillons de céphalopodes fraîchement pêchés.

Je remercie également le chef de l'entreprise de mareyage « MCD Marée », Michel Croizette Desnoyers pour nous avoir également aimablement fourni des céphalopodes frais vendus au port de Concarneau.

Je tiens à remercier tous les programmes et les organismes financeurs de cette thèse : le Ministère de l'enseignement supérieur de la recherche scientifique tunisien, les ATM : «micro-organismes», «cycle», «barcode» et «génomique et collections», et l'agence universitaire de la francophonie (AUF). Merci à Mme Nezha Zaki (AUF Maroc), Mme Catinca Birna (AUF Paris) et Mme Boutheina Bouziri (AUF Tunis) pour leur aide, leur réactivité et amabilité à chaque fois que j'ai eu besoin de les contacter.

Je merci à tous mes collègues, à présent amis, membres de l'équipe BAMEE :

Je remercie Dr Coralie Martin, coresponsable de l'équipe BAMEE pour ses encouragements et sa positivité même dans les moments les plus durs. Merci Coralie de savoir soutenir et motiver les membres de ton équipe.

Je remercie sincèrement nos formidables « Linda <sup>2</sup> » : Un grand merci au Dr Linda Kohl, pour avoir accepté de partager son bureau ces derniers mois et de m'avoir soutenu et encouragé surtout en cette dernière période critique de la thèse. Merci pour tes encouragements, d'avoir toujours répondu présente à chaque fois j'ai eu besoin de toi scientifiquement et personnellement, et pour tous ce que tu fais pour la vie du labo. Merci aussi pour ses moments conviviaux quand tu nous réunis souvent autour de tes délicieux desserts, sans jamais oublier d'éviter les ingrédients que 'je n'aime pas'. Je tiens également à remercier de tout cœur également Dr Linda Duval pour m'avoir beaucoup encouragé, d'avoir été toujours à mon écoute et surtout pour avoir toujours cru en moi et me répéter que j'étais capable de surmonter tous les obstacles. Merci beaucoup aux meilleures Linda(s) du monde.

Mille fois merci à toi Emilie d'avoir été mon épaule au quotidien. Merci d'avoir été pour moi une amie protectrice et généreuse qui m'a soutenu à tout moment sur le plan professionnel et personnel.

Cette expérience de thèse m'a permis de rencontrer deux amis pour la vie : mes très chers amis et complices Karl et Cécile avec qui le début de cette thèse était un vrai plaisir. Je n'oublierai jamais les longues journées de manips dans la bonne humeur et nos petites sorties en dehors des heures du travail. Merci Cécile et Karl, votre amitié compte beaucoup pour moi.

Un grand merci aussi à Soraya et Amandine pour leur amitié, pour avoir toujours été là pour moi et pour avoir donné un coup de main dans les manips de ce projet quand on était pressé par le temps.

Brice, merci pour tout le travail administratif énorme que tu as fait lors de l'organisation des missions d'échantillonnage, la participation aux congrès, l'organisation logistique de la soutenance de thèse...mais surtout pour ton amitié et tous les mots « dur » de français que tu m'as appris et que tu m'expliquais toujours avec des mots encore « plus dur ».

Je remercie Elizabeth et Lisy avec qui j'ai partagé leur bureau pendant 3 ans (ainsi que Soraya et Amandine), c'était vraiment un plaisir de travailler avec des gens sympathiques et aimables comme vous.

Merci à mes amis post-doctorants, doctorant et stagiaire du labo pour cette bonne ambiance de travail au quotidien: un grand merci au Dr Lotfi Bounaadja, Dr Gregory Karadjian, Dr Nicolas Pionnier, Dr Nathalie Vallarino, Dr Cissé Sow, Mélanie Dacheux, Frédéric Fercoq, Joy Alonso et Estelle Rémission.

Merci à tous les enseignants chercheurs et tous les membres de l'équipe BAMEE.

Je remercie également tous les membres de l'unité de recherche « Ecosystèmes et Ressources Aquatiques » de l'Institut National Agronomique. Un merci du fond du cœur Pr Amel Jenhani qui, même à distance, n'a cessé de m'encourager et me conseiller. Merci également au Dr Frida Lasram et Dr Chiheb Fissaoui. Un grand merci mes amis du laboratoire ERA pour la bonne ambiance et leur esprit d'équipe : Merci Leila, Moez, Nadia et Souhir.

Je remercie également les parasitologues de la faculté des sciences de Tunis : les docteurs Bouchra Benmansour, Lamia Gargouri et Souad Ben Jemaa, merci pour avoir toujours cru en moi, conseillé et motivé.

Ma reconnaissance se dirige également vers ma famille. Un grand merci à ma merveilleuse mère pour son soutien moral et financier au cours de toutes mes années d'études. Ma soeur, je ne te remercierai jamais assez pour tous ce que tu as fait pour moi. Rien de tout ce que j'ai accompli n'aurait pu être possible sans le soutien inconditionnel d'une maman formidable et d'une merveilleuse sœur comme vous l'êtes toutes les deux. Merci à mon cher beau frère de m'avoir épaulé et d'avoir été un véritable soutien pour moi. Merci à mes frères et mes belles sœurs qui malgré la distance, m'ont toujours encouragé pour atteindre mes objectifs et m'ont gâté une fois rentrée en Tunisie. Merci à mon amie Ines pour ta présence, et ta précieuse amitié. Enfin, je tiens à dédier ce travail aux plus chers pour moi : Myriam, Moemen, Youssef, Yassin, Hamza et Mayar.



## Résumé

Les sacs rénaux des céphalopodes sont communément le siège d'infections parasitaires spectaculaires provoquées principalement par des ciliés apostomes du genre Chromidina et des mésozoaires, les dicyémides. Les formes végétatives sont vermiformes et peuvent atteindre plusieurs mm de long. Elles sont fixées par leur partie antérieure aux cellules rénales. La diversité de ces parasites énigmatiques, basée sur des morpho-espèces, reste très mal connue pour les chromidinés et aucune donnée moléculaire n'est disponible pour ces ciliés. Les Dicyémides ont été en revanche plus étudiés mais les données morphologiques et moléculaires sont parcellaires et leurs relations phylogénétiques restent débattues.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes proposés d'étudier ces deux groupes afin d'évaluer leur biodiversité chez les céphalopodes méditerranéens et d'Atlantique, et de fournir plus d'éléments pour la compréhension de leur systématique et de leur phylogénie. Ainsi, à partir d'un large échantillonnage de céphalopodes d'Atlantique (Concarneau, France) et méditerranéens (La Goulette, Tunisie) prélevés sur 3 années consécutives, nous avons entrepris de caractériser morphologiquement et génétiquement ces parasites en réalisant une analyse moléculaire du marqueur ADNr 18S afin d'aborder la notion d'espèce, de préciser leur spécificité d'hôte, de corrélérer la diversité morphologique et génétique, et de mesurer la variabilité génétique au sein d'une même morpho-espèce.

Dans nos échantillonnages, la prévalence de l'infection par des chromidinés s'est révélée faible, certainement biaisée par les milieux échantillonnés, essentiellement benthiques, alors que les chromidinés infectent préférentiellement les céphalopodes pélagiques. Nous pouvons cependant prédire que leur biodiversité est sous-estimée, car deux nouvelles espèces ont pu néanmoins être décrites. Nous avons pu obtenir pour la première fois des séquences de l'ADNr 18S de ces parasites. Les analyses phylogénétiques robustes montrent que les chromidinés se positionnent parmi les ciliés apostomes au sein de la classe des Oligohymenophorea.

La prévalence des dicyémides était beaucoup plus importante (88%). Un problème important dans la systématique des dicyémides est que bon nombre de morpho-espèces nommées sont basées sur des descriptions morphologiques incomplètes qui entraînent des ambiguïtés dans leur détermination. Ceci nous a amenés à redécrire de façon détaillée sur tous les stades de développement l'espèce *Dicyemnea eledones* rencontrée dans nos échantillonnages. Les analyses phylogénétiques des séquences du marqueur ADNr 18S obtenues au cours de cette étude et intégrant les séquences de dicyémides déjà connues, nous ont permis de définir 10 clades robustes. Les morpho-espèces ne se distribuent pas de façon non ambiguë au sein de ces clades puisque certaines morpho-espèces se retrouvent dans plusieurs clades et que certains clades peuvent regrouper plusieurs morpho-espèces. Ceci pose la question de la pertinence de ce marqueur ADNr 18S pour l'identification des espèces, voire même des genres, et pose également la question de la pertinence des marqueurs morphologiques utilisés à ce jour pour la systématique des dicyémides.



## Abstract

The renal sacs of cephalopods are an uncommon habitat for two phylogenetically distant parasites, dicyemid mesozoa and ciliate chromidinids. These are wormlike organisms, which can reach a few millimetres in length and are attached to the renal epithelia by their anterior part. Information was mainly based on morphological criteria and little is known about the biodiversity and taxonomy of these enigmatic parasites. Concerning the chromidinids, only 4 morpho-species have been described and there are no molecular data available. Dicyemids have been a little more studied, but morphological criteria are still incomplete for some species and not all life stages have been studied. The molecular data are sparse and the phylogenetic position of these organisms is uncertain.

During this thesis, we have undertaken to study these two groups with regard to their biodiversity in cephalopods from the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean. The aims are to obtain more elements for the comprehension of their systematics and phylogeny. Starting from a large sample of cephalopods from the Atlantic Ocean (Concarneau, France) and the Mediterranean Sea (La Goulette, Tunisia), fished during 3 consecutive years, we characterized the parasites from a morphological and molecular point of view. We realised a molecular analysis of the 18S rDNA marker in order to look at the notion of species, to precise their host specificity, to correlate the morphological and genetic diversity and to measure the genetic variability within one morpho-species.

In our samples, the prevalence of the infection by chromidinids was revealed to be weak, probably biased by the position of the collection in the water column. The sampled hosts were predominantly benthic, while chromidinids mainly infect pelagic cephalopods. We predict that the diversity is underestimated, even if we were able to describe two new species. We obtained for the first time molecular data from the 18S rDNA marker. The robust phylogenetic analyses show that chromidinids are positioned within the apostome ciliates, belonging to the Oligohymenophorea.

In our samples, the prevalence of the infection by dicyemids was shown to be more important (88%). A major problem in the dicyemid systematics is that a large number of named morpho-species are based on incomplete morphological descriptions, entailing ambiguities in their identification. We therefore redescribed all stages of the development of the species *Dicyemenea eledones* of our samples in detail. Phylogenetic analyses of the 18S rDNA marker sequences of our samples, combined with the sequences available in databases, allowed us to define 10 robust clades. The morpho-species are not distributed in a non ambiguous manner within these clades, as some can be found in different clades and some clades can regroup more than one morpho-species. This leads to the question of the relevance of the 18S rDNA marker for the identification of species and even genera. It also challenges the relevance of morphological criteria currently used for the dicyemid systematics.





# Table des matières

Chapitre 1. Les céphalopodes. ....	19
1.1. Généralités sur les céphalopodes.....	19
1.2. Anatomie interne des céphalopodes. ....	19
1.3. Systématique des céphalopodes. ....	21
1.3.1. Critères d'identification morphologique des céphalopodes. ....	21
1.3.2. Systématique moléculaire des céphalopodes : barcoding et phylogénie. ....	21
1.4. Parasitofaune des Céphalopodes. ....	23
1.5. Micro-habitats des dicyémides et chromidinés, parasites de céphalopodes. ....	26
1.5.1. Les sacs rénaux. ....	26
1.5.2. Les sacs pancréatiques. ....	29
1.5.3. Les cœurs branchiaux. ....	30
Chapitre 2 : les chromidinés. ....	31
2.1. Les apostomes. ....	31
2.1.1. Caractéristiques morphologiques. ....	31
2.1.2. Classification. ....	31
2.1.3. Cycle de vie. ....	32
2.1.4. Exemple d'Apostome, le genre <i>Synophrya</i> (Foettingeriidae). ....	33
2.2. La famille des Opalinopsidae Hartog, 1906. ....	34
2.3. Le genre <i>Chromidina</i> Gonder 1905. ....	36
2.3.1. Habitat. ....	36
2.3.2. Distribution géographique. ....	37
2.3.3. Morphologie. ....	37
2.3.4. Historique et position phylogénétique. ....	38
2.3.5. Cycle de vie. ....	39
2.3.6. Systématique des <i>Chromidina</i> . ....	40
2.3.7. Co-infestation des sacs rénaux de céphalopodes par les dicyémides et les chromidinés. .	46
2.3.8. Limites des connaissances sur les chromidinés et problématique. ....	47
Chapitre 3 : les Dicyémides. ....	49
3.1. Morphologie. ....	49
3.1.1. Les stades adultes. ....	50
3.1.2. Les stades larvaires. ....	53
3.3. La physiologie des dicyémides. ....	57

3.4. Systématique des Dicyémides.....	58
3.4.1 Historique.....	58
3.4.2. Classification.....	58
3.5. Diversité morphologique des Dicyémides : limites et robustesse des critères d'identification morphologiques.....	61
3.6. Position phylogénétique des Dicyémides : controverses.....	61
3.7. Limites des connaissances sur les Dicyémides et problématiques.....	63
Problématique de la thèse et objectifs scientifiques.....	65
Chapitre 4 : Méthodologies.....	67
4.1. Échantillonnage des hôtes.....	67
4.1.1. Sites d'échantillonnage et leurs caractéristiques.....	67
4.1.2. Méthodes de pêche.....	68
4.1.3. Hôtes examinés et prélèvements biologiques.....	70
4.2. Prélèvement des parasites.....	70
4.2.1. Préparation des parasites pour les études morphologiques.....	71
4.2.2. Préparation des parasites pour les études moléculaires.....	72
4.3. Etudes moléculaires.....	73
4.3.1. Extractions d'ADN.....	73
4.3.2. Amplifications d'ADN.....	74
4.3.3. Séquençages.....	79
4.3.4. Clonages.....	80
4.3.5. Analyse bioinformatique des séquences.....	80
Chapitre 5 : Résultats et discussions.....	85
5.1. Etudes morphologiques.....	85
5.1.1 Hôtes examinés.....	85
5.1.2. Dicyémides : Résultats morphologiques.....	87
5.1.3. Morphologie des Dicyémides : discussion.....	100
5.1.4. Etude morphologique des chromidinés : résultats et discussion.....	107
5.2. Etude moléculaire.....	121
5.2.1. Etude moléculaire des dicyémides.....	121
5.2.2. Etude moléculaire des chromidinés : résultats et discussion.....	146
CONCLUSION GENERALE.....	157
Annexe 1. Liste des échantillons issus de toutes les campagnes.....	165
Annexe 1.1. Liste des échantillons issus de la mission à Concarneau en mai 2011.....	165
Annexe 1.2. Liste des échantillons issus de la mission à Concarneau en juillet 2012.....	166

Annexe 1.3. Liste des lames issues de la mission à Concarneau en juillet 2012.....	171
Annexe 1.4. Liste des échantillons issus de la mission en Concarneau en 2013.....	175
Annexe 1.5. Liste des échantillons issus de la mission en Tunisie en 2013. ....	177
Annexe 1.6. Liste des échantillons issus de la mission en Tunisie en 2014. ....	182
Annexe 2. Article 1 .....	185
Annexes 3. Article 2.....	199



## Liste des figures :

Figure 1. Représentation schématique de l'anatomie interne d'un céphalopode. ....	20
Figure 2. Vue ventrale d'une dissection des organes du système circulatoire et respiratoire de <i>Sepia officinalis</i> .....	20
Figure 3. Relations phylogénétiques au sein des céphalopodes .....	22
Figure 4. Illustration des parasites de céphalopodes les plus prévalents et pathogènes, et leurs sites d'infection (Pascual, González et al. 2007).....	23
Figure 5. Vue ventrale et dorsale des organes des viscères de <i>Sepia officinalis</i> . Photo : Katja Wolfram (2004). ....	26
Figure 6. Stades vermiformes de dicyémides attachés aux sacs rénaux de <i>Sepia elegans</i> . ....	26
Figure 7. Trois degrés de complexification de la surface externe des sacs rénaux. ....	28
Figure 8. Sacs rénaux de céphalopodes infestés par des chromidinés. Les images sont issues des lames originales de Chatton et Lwoff conservées dans la Collection de Protistes du MNHN. ....	28
Figure 9. Cycle de vie de <i>Synophrya hypertrophica</i> (Chatton et Lwoff, 1935).. ....	34
Figure 10. <i>Opalinopsis sepiolae</i> Foettinger, 1881.....	36
Figure 11. Cycle de vie de <i>Chromidina elegans</i> (Furuya, Ota et al. 2004) modifié.....	40
Figure 12. <i>Chromidina coronata</i> (Hochberg 1990).....	41
Figure 13. Morphologie de <i>Chromidina elegans</i> . ....	45
Figure 14. Epithélium rénal présentant un cas de coinfection dicyémides/chromidinés. ....	47
Figure 15. Organisation générale du corps d'un dicyémide. ....	50
Figure 16. Scénario simplifié du cycle de vie d'un dicyémide mettant en valeur les différents stades de développement (Hochberg 1983). ....	52
Figure 17. Schéma de l'organisation générale d'une larve infusoriforme à 39 cellules.....	54
Figure 18. Cycle de vie et reproduction d'un dicyémide d'après Nouvel (1947) modifié. ....	55
Figure 19. Diagramme des calottes polaires définissant les différents genres de dicyémides .....	60
Figure 20. Préparation des parasites pour les études morphologiques. ....	71
Figure 21. Représentation schématique de la position des amorces sur le locus ADNr 18S d'un Dicyémide .....	78
Figure 22. Distribution, par espèce, des 200 spécimens d'hôtes céphalopodes, examinés durant l'ensemble de l'étude.....	86
Figure 23. Prévalence des 8 morpho-espèces de dicyémides, pour l'ensemble de l'étude. Sur cette figure, les morpho-espèces sont hiérarchisées en fonction de leur prévalence globale dans les hôtes..	90
Figure 24. <i>Dicyemenea gracile</i> chez <i>Sepia officinalis</i> . ....	90
Figure 25. Caractéristiques morphologiques de <i>Dicyema typus</i> (Nouvel, 1947). ....	92
Figure 26. Schéma d'un nématogène de <i>Dicyema moschatum</i> (Nouvel, 1947).....	93
Figure 27. Caractéristiques morphologiques de <i>Pseudicyema truncatum</i> (Nouvel, 1947). ....	95
Figure 28. Schéma des différents stades de développement de <i>Conocyema polymorpha</i> (Nouvel, 1947).....	97
Figure 29. <i>Microcyema vespa</i> chez <i>Sepia officinalis</i> . ....	98
Figure 30. Morphologie de <i>Chromidina</i> de la seiche <i>Sepia officinalis</i> S50. ....	108
Figure 31. Distribution des classes de tailles pour les chromidinés prélevés sur l'hôte <i>Sepia officinalis</i> S50.....	109
Figure 32. Morphologie de <i>Chromidina chattoni</i> .....	110
Figure 33. Distribution des classes de tailles pour <i>Chromidina chattoni</i> prélevés sur <i>Loligo vulgaris</i> .....	111
Figure 34. Arbre phylogénétique enraciné des dicyémides prélevés sur 76 individus hôtes. ....	125

Figure 35. Arbre phylogénétique non enraciné des dicyémides prélevés sur 76 individus hôtes. ....	127
Figure 36. Arbre phylogénétique non enraciné des dicyémides de Méditerranée et d'Atlantique, prélevés sur 76 individus hôtes. ....	129
Figure 37. Représentation des divergences génétiques entre les différents clades de dicyémides.....	137
Figure 38. Représentation schématique du seuil limite. ....	144
Figure 39. Analyse des divergences génétiques au sein des 76 séquences d'ADNr 18S de dicyémides obtenues au cours de notre étude. Flèches : seuils de divergences.....	145
Figure 40. Arbre phylogénétique* non enraciné des chromidinés prélevés sur 5 individus hôtes incluant 17 séquences d'ADNr 18S d'Apostomes disponibles dans les bases de données. ....	151
Figure 41. Arbre phylogénétique* enraciné des chromidinés prélevés sur 5 individus hôtes incluant 21 séquences d'ADNr 18S de ciliés disponibles dans les bases de données.....	153

## **Liste des tableaux :**

Tableau 1. Critères communs et distinctifs d'identification des genres <i>Opalinopsis</i> et <i>Chromidina</i> .....	35
Tableau 2. Bilan des méthodes de pêche et des espèces récoltées au cours des différentes campagnes. ....	69
Tableau 3. Amorces utilisées pour amplifier les gènes ADNr18S et Cox1 de dicyémides et de chromidinés. ....	77
Tableau 4. Bilan quantitatif et comparatif des hôtes exploitables selon les études. ....	85
Tableau 5. Indication de la présence (+) d'une des huit morpho-espèces de dicyémide (première colonne) en fonction des hôtes céphalopodes (deuxième colonne), pour chacune des cinq campagnes d'échantillonnage.. ....	89
Tableau 6. Prévalence pour les huit morpho-espèces de dicyémides inventoriées au cours de l'ensemble de l'étude.. ....	89
Tableau 7. Inventaire de la parasitofaune de dicyémides en Atlantique et en Méditerranée (littérature et présent travail) ; selon les hôtes céphalopodes. ....	107
Tableau 8. Tableau récapitulatif des principaux critères d'identification des espèces connues de chromidinés. ....	117
Tableau 9. Diversité des chromidinidés inventoriés sur les céphalopodes. ....	119
Tableau 10. Détection de phénomène de saturation des substitutions pour le marqueur ADNr 18S des dicyémides par la méthode de Xia (2003). ....	122
Tableau 11. Tableau représentant l'occurrence des différents clades au cours des différentes années d'échantillonnage et dans les deux sites (Tunisie, Concarneau). ....	132
Tableau 12. Estimation du taux de divergence entre les dix clades, par paires.. ....	134
Tableau 13. Variabilité génétique entre les séquences d'Apostomes générée.....	149





## **Chapitre 1. Les céphalopodes.**

### **1.1. Généralités sur les céphalopodes.**

La classe des céphalopodes a été créée au 18<sup>ème</sup> siècle par Schneider (1784) et fait partie de l'embranchement des Mollusques avec les Monoplacophores, les Polyplacophores, les Gastéropodes et les Bivalves. Les céphalopodes sont exclusivement marins et ubiquistes. Ils peuvent avoir une répartition verticale et être pélagiques (vivant dans la couche superficielle de l'eau) comme les *Illex*, ou benthiques (vivant sur le fond marin) comme les *Sepia* et les *Octopus*. Cette répartition n'est cependant pas figée et les céphalopodes réalisent des migrations verticales diurnes ou nocturnes ou saisonnières, à la recherche de proie, ponte, etc...

La présence d'une coquille externe, qui participe à l'équilibre hydrostatique, était au Cambrien un critère commun à tous les céphalopodes (Bonnaud, Boucher-Rodoni et al. 1994). Cette coquille externe a disparu chez la plupart des céphalopodes actuels. Comme les poissons, les céphalopodes ont développé des adaptations morphologiques et anatomiques particulières pour s'adapter à leur milieu de vie. Ils restent différents par certains aspects de leur biologie et écologie.

### **1.2. Anatomie interne des céphalopodes.**

Les céphalopodes se caractérisent par un corps fusiforme présentant des chromatophores leur permettant de mimer la couleur de leur environnement et de se camoufler afin d'éviter leurs prédateurs (Fig. 1).

Ces mollusques se caractérisent par la présence d'une coquille externe qui a persisté chez les Nautiloïdes. Cependant, les calmars et les seiches possèdent un reliquat de coquille interne qui disparaît totalement chez les poulpes et les éledones. La bouche des céphalopodes est chitineuse, similaire à un bec de perroquet et munie d'une radula. Cette bouche est entourée de bras portant des rangées de ventouses ou des crochets.

Le système circulatoire présente 3 cœurs : un cœur systémique et deux petits cœurs branchiaux. Le système respiratoire (Fig. 2) est composé de branchies assurant les échanges respiratoires. Le système nerveux est très développé avec un cerveau large formé par un ensemble de ganglions cérébroïdes fusionnés, et plusieurs connections périphériques. Le système excrétoire est formé par les sacs rénaux, les glandes péricardiales, les cœurs branchiaux et les branchies.

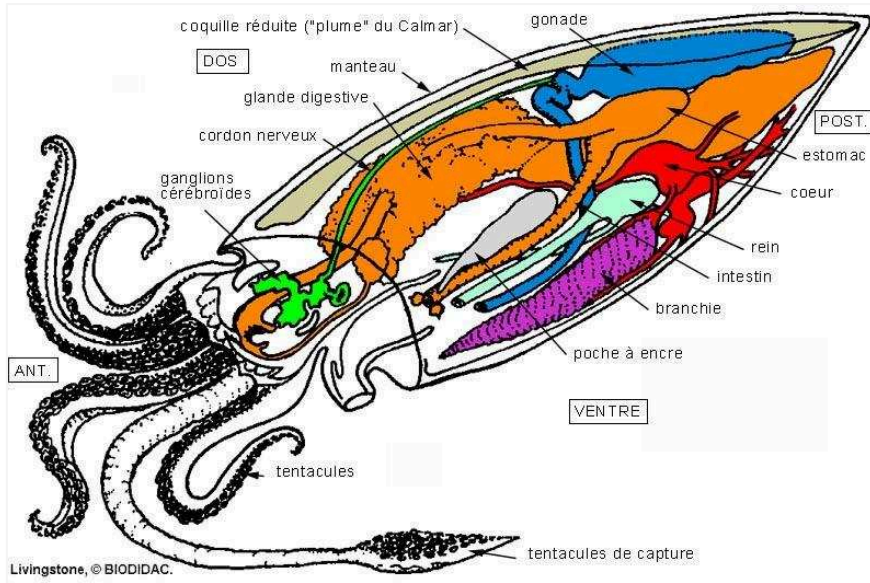


Figure 1. Représentation schématique de l'anatomie interne d'un céphalopode.

(<http://sites.unice.fr>).

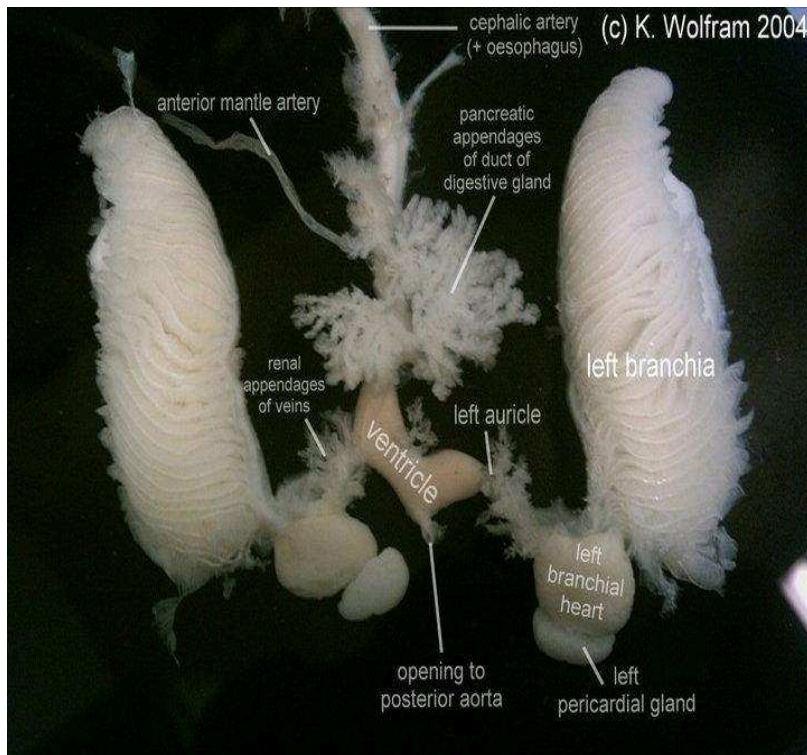


Figure 2. Vue ventrale d'une dissection des organes du système circulatoire et respiratoire de *Sepia officinalis*.

(Photo : Katja Wolfram, 2004).

### **1.3. Systématique des céphalopodes.**

#### **1.3.1. Critères d'identification morphologique des céphalopodes.**

Les céphalopodes actuels comprennent environ 800 espèces. 11000 espèces de céphalopodes fossiles ont été recensées. La classe des céphalopodes regroupe 6 sous-classes : les Ammonoidés, les Nautiloidés, les Coléoidés, les Orthoceratoides, les Actinoceratoidés et les Endoceratoidés. Les céphalopodes actuels appartiennent uniquement aux sous-classes des Nautiloidés et des Coléoidés (Bonnaud 1995). Le genre Nautilus est le seul représentant actuel des Nautiloidés.

La sous-classe des Coléoidés renferme neuf ordres dont les Decabrachia et les Octobrachia qui diffèrent par la taille de la cavité cœlomique, l'attachement de la tête au manteau, la présence ou l'absence des piliers buccaux, la présence d'anneaux cornés sur les ventouses, la présence d'un septum dans le manteau, mais surtout par le nombre de « bras » (Leach 1817; Teichert 1967). Les Octobrachia ont 8 bras, les Decabrachia ont 8 bras et 2 tentacules.

Les travaux de paléontologie de d'Orbigny, (Naef 1912) ont conduit à séparer les Octobrachia en deux ordres : les Octopoda et les Vampyromorpha. Pareillement, les Decabrachia ont été divisés en Theitoida (calmars) et Sepioida (seiches, sépioles...). La classification morphologique consensuelle est celle de (Voss 1977). D'autres études sur la systématique des céphalopodes ont décrit de nouveaux caractères (Roper 1969; Toll 1982; Hess 1987; Nesis 1987), mais une étude plus large sur une plus grande diversité d'espèces est nécessaire pour les valider (Lindgren, Pankey et al. 2012).

#### **1.3.2. Systématique moléculaire des céphalopodes : barcoding et phylogénie.**

La systématique des céphalopodes a été confortée par des arguments issus d'études moléculaires qui ont généré les premières séquences du marqueur mitochondrial Cox1 et du marqueur ARNr 18S (Bonnaud, Boucher-Rodoni et al. 1997; Carlini et Graves 1999; Carlini, Reece et al. 2000; Carlini, Young et al. 2001). Ces études moléculaires montrent que les céphalopodes constituent un groupe monophylétique et supportent la classification issue de l'analyse des critères morphologiques (Fig. 3). Carlini, Young et al. (2001) notent cependant des divergences entre la morphologie et les données moléculaires au sein des Octobrachia. Lindgren, Giribet et al. (2004) en combinant des études morphologiques et moléculaires associant trois marqueurs nucléaires (ADNr 18S, fragments de l'ADNr 28S, histone H3) et le marqueur mitochondrial Cox1, confirme la monophylie des céphalopodes mais soulignent des ambiguïtés sur les relations phylogénétiques entre certains ordres tels que les Cirroctopoda et

les Octopoda, qu'ils corrélient à des paramètres écologiques. Une étude récente combinant critères morphologiques de différentes espèces de céphalopodes et leurs séquences Cox1 et d'ADNr 18S montre une concordance entre la systématique basée sur la morphologie et les données moléculaires (Gebhardt et Knebelsberger 2015).

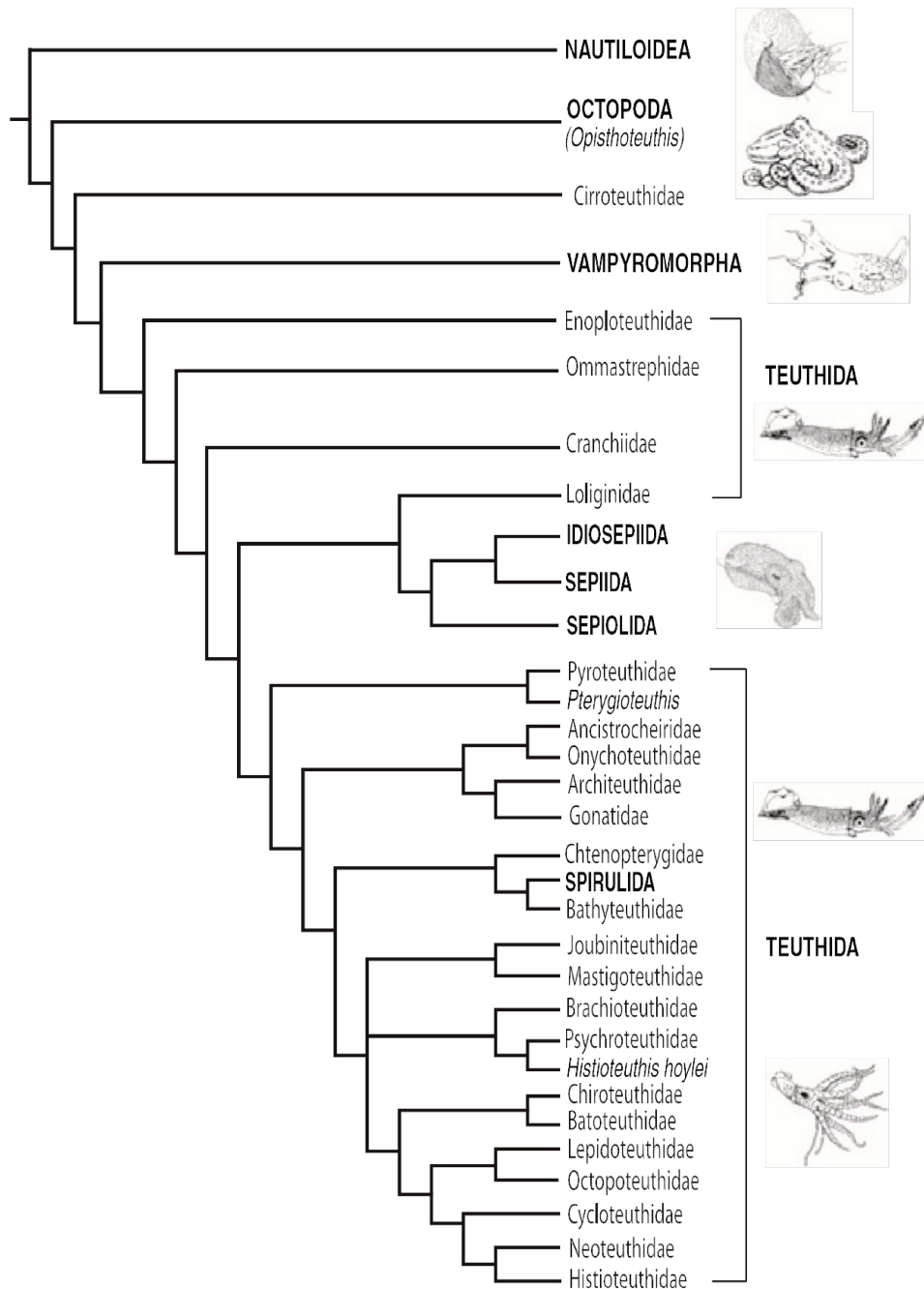


Figure 3. Relations phylogénétiques au sein des céphalopodes  
(Lindgren, Pankey et al. 2012).

#### 1.4. Parasitofaune des Céphalopodes.

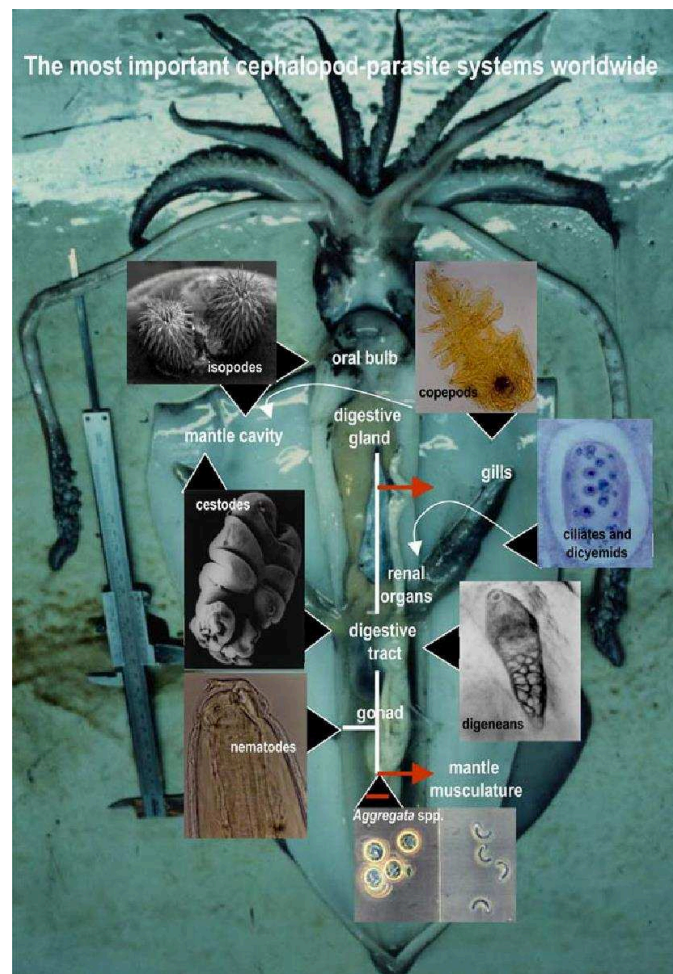


Figure 4. Illustration des parasites de céphalopodes les plus prévalents et pathogènes, et leurs sites d'infection (Pascual, González et al. 2007).

La première référence à un parasite de céphalopode date de l'ouvrage de Redi (1684). Des décennies plus tard, quand l'intérêt pour les céphalopodes s'est accru en tant que ressource halieutique importante et maillon important des écosystèmes marins, un grand nombre de taxons ont été signalés comme parasites de ces mollusques. Dans ce qui suit, nous faisons le point sur les principaux groupes de parasites de céphalopodes (Fig. 4).

#### Procaryotes.

Les bactéries infestant les céphalopodes sont généralement du genre *Vibrio*, telle *Vibrio carchariae*, qui cause des mortalités importantes chez les poulpes. Des infections à *Pseudomonas* et *Aeromonas* sont également rencontrées (Hanlon, Forsythe et al. 1984). Les sites d'infection sont généralement les branchies qui peuvent s'hypertrophier, présenter des

nécroses et entrainer des difficultés de respiration pour l'animal. Les bactéries peuvent causer des ulcérations de la peau surtout sur les parties sensibilisées suite à une blessure lors de leur capture par exemple, ou en cours de cicatrisation. Les yeux sont un site d'infection secondaire. Les bras et le manteau sont à l'abri de l'infestation parasitaire (Gestal, Pascual et al. 2010).

### Fungi.

Un seul champignon, *Cladosporium sphaerospermum*, a été signalé comme parasite de céphalopodes (Kinne 1980).

### Protozoaires.

Les protozoaires endoparasites de céphalopodes infestent le tractus digestif et surtout les caecums, ce qui nuit à l'absorption des nutriments. Les protozoaires les plus connus comme parasites de céphalopodes sont les coccidies du genre *Aggregata* qui ont des effets délétères sur l'hôte. L'infection à *Aggregata* provoque la rupture de la membrane basale des muqueuses et le détachement de l'épithélium ayant pour conséquence une atrophie des muqueuses de l'intestin et des caecums (Poynton, Reimschuessel et al. 1992; Gestal, Abollo et al. 2002; Castellanos-Martínez, Pérez-Losada et al. 2013). Dans le cas d'infections sévères, l'infection peut s'étendre à d'autres tissus épithéliaux, aux branchies, jusqu'au manteau (Mladineo et Bočina 2007).

Des flagellés, des dinoflagellés et des ciliés ont également été signalés comme parasites de céphalopodes. Cependant, n'ayant pas une incidence importante sur l'état sanitaire des céphalopodes, ils sont plutôt considérés comme des endosymbiontes (Hochberg 1990; Castellanos-Martínez, Pérez-Losada et al. 2013).

### Métazoaires.

Les céphalopodes sont l'hôte définitif de plusieurs parasites métazoaires à cycle dixène qui ont été inventoriés dans les travaux d'Hochberg (1990). Ils présentent un élément important dans l'étude des relations trophiques des céphalopodes. En effet, les parasites métazoaires sont un outil de marquage (tag) efficace de leur hôtes céphalopodes (Pascual et Hochberg 1996; González, Pascual et al. 2003; Castellanos-Martínez, Pérez-Losada et al. 2013). Le cycle de vie et les niches écologiques occupées par les céphalopodes les exposent à des infestations par des groupes spécifiques de métazoaires parasites (Clarke 1996; González, Pascual et al. 2003)

comme :

- Les cestodes. Sur les côtes européennes le cestode *Dinobothrium* infeste les calmars *Illex coindetti* et *Loligo vulgaris*, les seiches *Sepia officinalis* et *Sepia orbignyana*, le poulpe *Octopus vulgaris* et l'*Eledone cirrhosa*.
- Les trématodes. Les plus fréquemment signalés chez les céphalopodes sont les métacercaires de Didimozoidés qui se trouvent généralement dans le tractus digestif. Leur identification au niveau de l'espèce reste un défi et très souvent, lors d'inventaire de la parasitofaune des céphalopodes, ils sont généralement regroupés sous le seul nom du genre (Vidal et Haimovici 1999).
- Les céphalopodes sont généralement des hôtes intermédiaires de nématodes ou peuvent être également des hôtes paraténiques (Mattiucci, Farina et al. 2008). Ainsi, on retrouve plutôt des larves de nématodes qui parasitent les gonades et les tissus connectifs des organes. Les seiches *Sepia officinalis* et *Sepia orbignyana* par exemple sont parasitées avec une grande prévalence par le nématode *Anisakis* (Pascual et Hochberg 1996).
- Les crustacés sont généralement parasites des branchies ou de la cavité du manteau. Le copépode *Penella* est souvent rencontré dans ces micro-habitats chez *Illex coindetti*, *Loligo vulgaris* et *Eledone cirrhosa*. Cependant, l'infestation par les isopodes est accidentelle car ils sont mieux adaptés aux branchies des poissons (Hochberg 1990).

Ainsi, les céphalopodes abritent une grande diversité d'espèces parasites dont on ignore pour certains leurs effets sur leurs hôtes. Seuls les parasites des sacs rénaux de céphalopodes sont strictement spécifiques de ces mollusques (Hochberg 1990; Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya, Ota et al. 2004). Il s'agit des protozoaires ciliés « les chromidinés » et des métazoaires « dicyémides ». Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la diversité de ces deux parasites.



## 1.5. Micro-habitats des dicyémides et chromidinés, parasites de céphalopodes.

### 1.5.1. Les sacs rénaux.

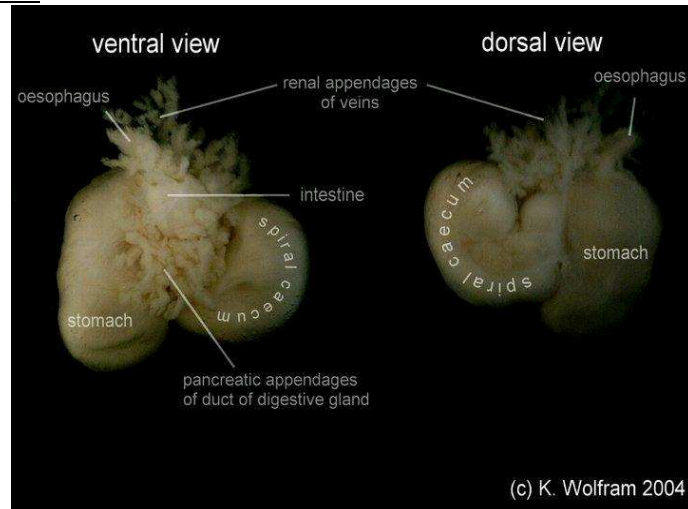


Figure 5. Vue ventrale et dorsale des organes des viscères de *Sepia officinalis*. Photo : Katja Wolfram (2004).

Ce micro-habitat inhabituel constitue une niche écologique favorable au développement d'une variété de parasites dont les dicyémides et les chromidinés. Ce milieu de vie protégé représente un environnement constant, statique, et procure aux parasites, de façon continue, tous les nutriments simples dont ils ont besoin (Fig.5).

#### 1.5.1.1. Les sacs rénaux de céphalopodes comme micro-habitat des dicyémides.

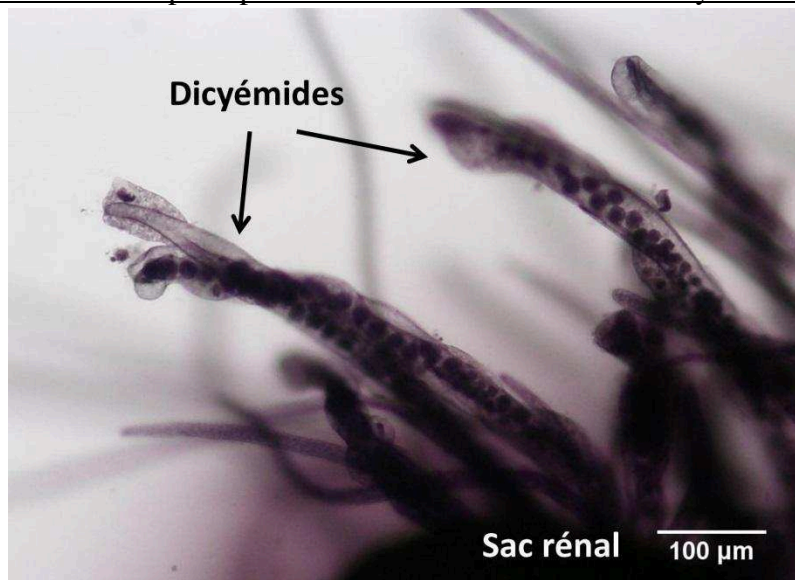


Figure 6. Stades vermiformes de dicyémides attachés aux sacs rénaux de *Sepia elegans*.

Les images sont issues des lames originales de Chatton et Lwoff conservées dans la Collection de Protistes du MNHN.

Les sacs rénaux des céphalopodes sont le principal environnement pour le développement des dicyémides (Fig. 6) (Hochberg 1982; 1983). Ce sont les parasites les plus rencontrés dans les sacs rénaux de céphalopodes benthiques (seiches et poulpes) (Nouvel 1947; McConnaughey 1960; Short et Hochberg 1969; Furuya et Tsuneki 2003). Ils sont particulièrement bien adaptés à cet habitat et s'attachent à l'épithélium rénal grâce à la partie antérieure de leur corps, la calotte polaire. Le polymorphisme de la calotte polaire, observé entre espèces de dicyémides, est le résultat de leur adaptation aux différentes morphologies des reins chez les céphalopodes (Furuya, Hochberg et al. 2003).

Une faible prévalence de dicyémides a été signalée dans les sacs rénaux des céphalopodes juvéniles ou de petite taille. La structuration de la surface de leurs sacs rénaux est très simple et soutient difficilement l'attachement des parasites. C'est également le cas d'espèces de céphalopodes, qui même à l'âge adulte, conservent une structuration simple de la surface rénale. Comme par exemple la seiche *Idiosepius paradoxus*, une des seiches les plus petites en taille et chez laquelle, aucun dicyémide n'a été signalé.

D'une façon générale, la prévalence des dicyémides augmente considérablement avec l'âge des céphalopodes (Hochberg 1990; Furuya, Ota et al. 2004). En effet, la structuration de la surface des sacs rénaux se complexifie au fur et à mesure qu'ils se développent. Plus la surface des reins est rugueuse et repliée, plus elle présente un point d'appui pour les dicyémides qui pourront alors mieux s'accrocher par leur calotte polaire, l'attachement du corps étant soutenu par les tissus rénaux de part et d'autre, et leur évitant ainsi ainsi d'être évacués avec l'urine. De plus, plus la surface rénale est repliée et complexe (Fig.7), plus la surface disponible pour que les parasites s'attachent augmente. Les dicyémides à calotte polaire conique sont généralement les premiers parasites à s'implanter.

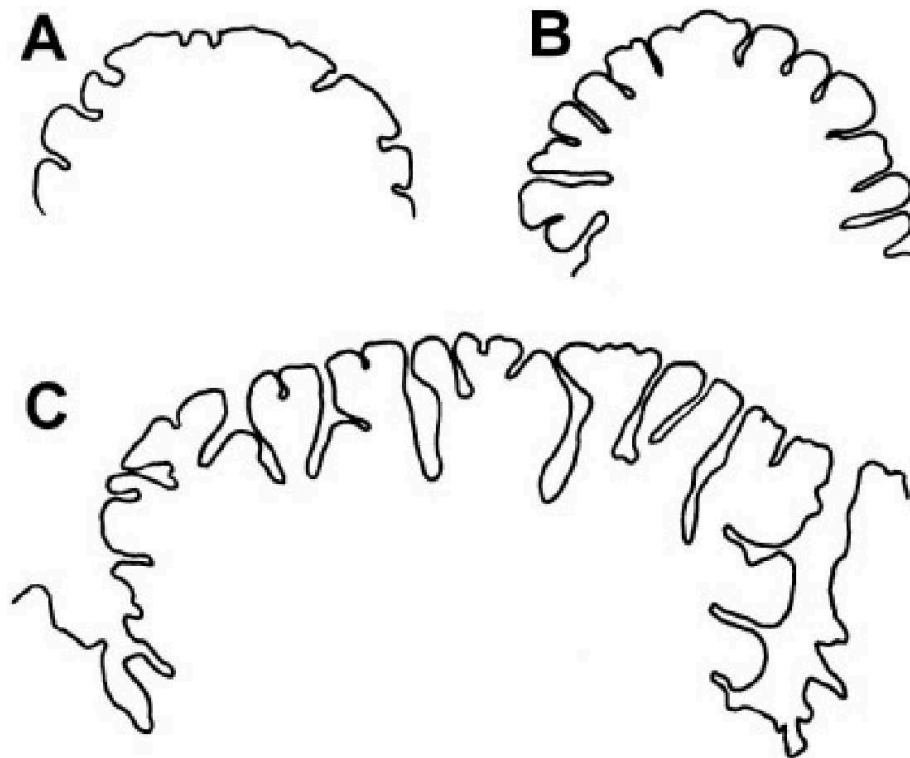


Figure 7. Trois degrés de complexification de la surface externe des sacs rénaux. A : surface externe simple ; B : surface externe complexe ; C : surface externe la plus complexe (Furuya, Ota et al. 2004).

1.5.1.2. Les sacs rénaux de céphalopodes comme micro-habitat des chromidinés.

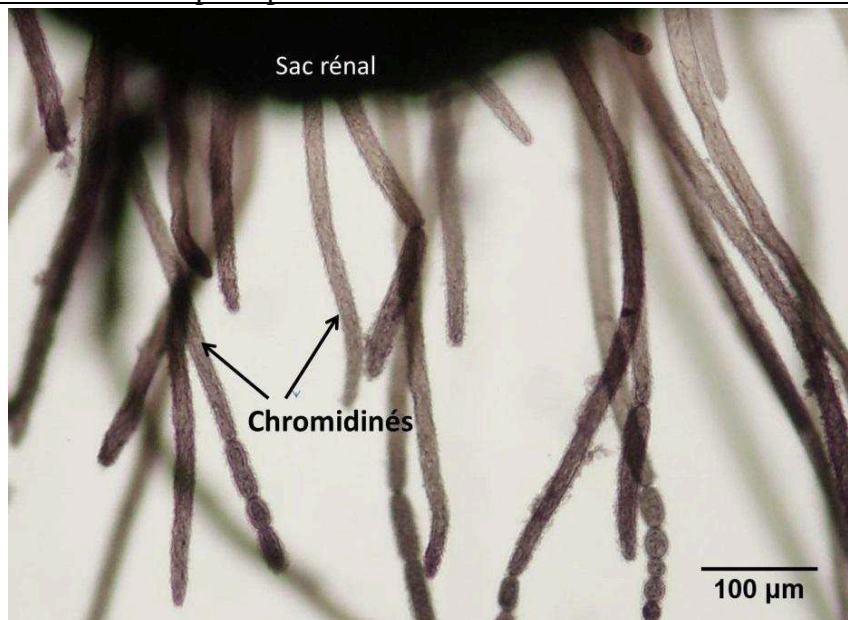


Figure 8. Sacs rénaux de céphalopodes infestés par des chromidinés. Les images sont issues des lames originales de Chatton et Lwoff conservées dans la Collection de Protistes du MNHN.

Comme les dicyémides, les chromidinés ont une morphologie très bien adaptée aux exigences de la vie parasitaire dans ce biotope inhabituel (Hochberg 1982). Ils se développent après attachement aux replis des sacs rénaux et se comportent comme les dicyémides dans leur manière de s'attacher à la convolution de l'épithélium rénal (Fig. 8). La forme de la partie antérieure des chromidinés ressemble à celle des dicyémides. Par exemple, la partie antérieure de *Chromidina elegans* ressemble à celle des dicyémides ayant une calotte conique et la tête de *Chromidina coronata* est similaire à celle des dicyémides présentant une calotte en forme de disque. Cette adaptation à cet environnement particulier explique la convergence morphologique observée entre dicyémides et chromidinés qui appartiennent à des clades très différents (métazoaires pour l'un et protiste ciliés pour l'autre). Ils coexistent cependant très rarement dans les sacs rénaux ce qui suggère l'absence de compétition entre ces deux parasites (Furuya, Ota et al. 2004).

#### 1.5.2. Les sacs pancréatiques.

Les sacs pancréatiques (Fig.5) présentent également un habitat pour les dicyémides et les chromidinés simultanément aux sacs rénaux au sein d'un même hôte. Cependant, ils sont rencontrés uniquement dans les sacs pancréatiques de céphalopodes décapodes (seiches, calmars). Jusqu'à maintenant aucun dicyémide n'a été observé dans les sacs pancréatiques de poulpes.

Les sacs pancréatiques des *Octobranchia* présentent une membrane épithéliale unique. Ils ont essentiellement un rôle digestif, et donc pas excrétoire. Ils ne présentent pas de connexion anatomique avec l'épithélium rénal et sont ainsi dans l'impossibilité d'assurer des échanges ou de participer avec le rein à la fonction excrétrice (Bidder 1966).

Chez les *Decabranchia*, les sacs rénaux et pancréatiques présentent un cœlome similaire et sont constitués de deux épithéliums. L'épithélium externe des sacs pancréatiques est connecté à l'épithélium terminal des sacs rénaux (Furuya, Ota et al. 2004). Cette coopération serait à l'origine de la petite taille des sacs rénaux des céphalopodes décapodes qui partagent le travail avec les sacs pancréatiques. L'anatomie des sacs pancréatiques diffère entre seiches et calmars.

Une répartition entre dicyémides et chromidinés est observée dans les sacs pancréatiques selon la taille de l'individu céphalopode hôte :

- Chez les seiches de grande taille on trouve uniquement des dicyémides.
- Chez les seiches de taille moyenne on peut trouver à la fois des chromidinés et des dicyémides.

- Chez les seiches de petites tailles, les sacs pancréatiques ne sont pas parasités.
- Chez les calmars on trouve souvent des chromidinés et des dicyémides dans les sacs pancréatiques, en même temps.

### 1.5.3. Les cœurs branchiaux.

Les céphalopodes possèdent trois cœurs : le cœur systématique qui a pour rôle de pomper le sang vers tout le corps du céphalopode, et les deux autres, les cœurs branchiaux, qui ont pour rôle de pomper le sang vers les branchies pour que celles-ci le chargent en oxygène afin qu'il puisse être distribué par le cœur systématique à l'organisme entier (Mangold-Wirz 1963) (Fig.2). Jusqu'à présent, une seule espèce de dicyémide a été décrite dans les cœurs branchiaux de céphalopodes (Hoffman 1965). Il s'agit de *Dicyemenea brevicephaloides* qui semblerait avoir une spécificité stricte pour les cœurs branchiaux de *Rossia pacifica* (Furuya, Ota et al. 2004). Cependant, ce dicyémide a également été rencontré dans les sacs rénaux de ce céphalopode (Eshragh et Leander 2014). Ces études n'ont porté que sur un nombre très réduit de spécimens. Une étude plus large explorant un nombre plus élevé de spécimens est donc nécessaire pour préciser la stricte occurrence ou non de *Dicyemenea brevicephaloides* dans les cœurs branchiaux de *Rossia pacifica*.

La raison pour laquelle ce dicyémide peut infester les cœurs branchiaux est inconnue. Ils participent à la fonction excrétrice et constituent avec les glandes péricardiques le complexe des cœurs branchiaux. Ces organes sont décrits comme un site d'ultrafiltration de l'urine afin de produire « une urine primaire » (Potts et Todd 1965; Martin 1975). Par ailleurs, le complexe rénal (sacs rénaux et appendices pancréatiques) a pour rôle d'évacuer de l'ammoniac (Martin 1975; Schipp et Boletzky 1975; Budelmann, Schipp et al. 1997). La composition de l'urine est donc différente entre le complexe rénal et le complexe des cœurs branchiaux. Furuya, Ota et al. (2004) suggèrent que *Dicyemenea brevicephaloides*, contrairement aux autres dicyémides, se serait adapté à ce micro-habitat particulier et aurait une préférence pour l'urine primaire produite par les cœurs branchiaux de *Rossia pacifica*.

## **Chapitre 2 : les chromidinés.**

Les chromidinés sont des ciliés apostomes de la famille des Opalinopsidae (Hartog 1906; Chatton et Lwoff 1935; Lynn 2008; Landers 2010). Dans ce qui suit, nous présentons une synthèse des connaissances de ce taxon très peu étudié.

### **2.1. Les apostomes.**

Les Apostomes sont des ciliés vivant en symbiose principalement avec les crustacés marins (Chatton et Lwoff 1935; Landers 1991; Bradbury, Zhang et al. 1996; Gomez-Gutierrez, Struder-Kypke et al. 2012). On peut les rencontrer également chez les cnidaires, les échinodermes, les annélides ... Ce nom leur a été attribué afin de mettre en valeur le caractère commun de tous les membres de ce taxon qui est la régression progressive du cystostome (bouche), qui peut même aller jusqu'à sa disparition.

#### **2.1.1. Caractéristiques morphologiques.**

Les Apostomes présentent une grande plasticité morphologique illustrée par plusieurs auteurs au travers de l'étude de cycles de vie de différents Apostomes (Kudo, Yoshii et al. 1966; Capriulo et Small 1986; Landers, Confusione et al. 1996; Ohtsuka, Suzaki et al. 2015).

Leurs critères morphologiques distinctifs sont :

- La présence d'une rosace buccale : on la trouve chez les stades tomite et trophonte, et sa fonction reste inconnue.
- La ciliature du trophonte, organisée en des rangées hélicoïdales avec raccourcissement de la ciliature buccale.
- Le macronoyau, qui a une forme ovale et peut être plus au moins allongé. Il y a un seul micronoyau et une seule vacuole contractile.

#### **2.1.2. Classification.**

La classification des Apostomes est basée essentiellement sur leur morphologie. Les Apostomes tels que définis par (Chatton et Lwoff 1935) constituent la sous-classe des Apostomatia Chatton & Lwoff 1928, des ciliés de la classe Oligohymenophorea. Les Apostomatia se décomposent en 6 grandes familles réparties en 3 ordres (Lynn 2008):

- Ordre des Apostomatida Chatton et Lwoff, 1928 :

- Famille des Colliniidae Cépède, 1910.
- Famille des Cyrtocaryidae Corliss, 1979.
- Famille des Foettingeriidae Chatton, 1911.
- Famille des Pseudocolliniidae Chantangsi, Lynn et al. (2013)
- Ordre des Astomatophorida Jankowski 1966 :
  - Famille des Opalinopsidae Hartog, 1906.
- Ordre des Pilisuctorida Jankowski 1966 :
  - Famille des Conidophryidae Kirby, 1941.

Chatton et Lwoff (1935) ont initialement reconnu les Apostomes comme des organismes faisant partie des ciliés de la classe des Phyllopharyngea. Ils se sont basés sur :

- La présence, au milieu de la face ventrale du trophonte, d'un cytostome.
- Une fibre orale massive qui serait l'homologue du « cyrtos » des Phyllopharyngea.
- La présence d'organelles telles que les canalicules et la rosace qui serait l'homologue de certaines organelles des Phyllopharyngea.

Cependant, toujours sur des études morphologiques (par microscopie optique et électronique), Small et Lynn (1985) ont rapproché les Apostomes des ciliés Oligohymenophorea. Cette appartenance est soutenue par des analyses phylogénétiques utilisant le gène de l'ARNr 18S de Foettingeridés (Clamp, Bradbury et al. 2008).

### 2.1.3. Cycle de vie.

Généralement, le cycle de vie des Apostomes est complexe. Un cycle typique est composé de 4 stades de développement différents :

- Le phoronte, qui est la forme enkystée attachée sur la surface du corps de l'hôte.
- Le trophonte, qui est le résultat de l'éclatement du kyste des phorontes et se nourrit du liquide exuvial ou des tissus de l'hôte.
- Le tomonte, qui est la forme adulte du trophonte, capable de produire des tomites par palintomie (processus de multiplication par division binaire successives).
- Le tomite, qui est la forme libre responsable du passage de l'infestation d'un hôte à un autre.

Ces stades sont distincts sur le plan morphologique et fonctionnel, et certains stades peuvent disparaître selon l'espèce (Chatton et Lwoff 1935; Bradbury, Zhang et al. 1996; Bradbury, Song et al. 1997).

Les Apostomes infestant exclusivement l'endocuticule de crustacés peuvent présenter un autre

stade de développement intermédiaire entre le trophonte et le tomonte, appelé orthotomonte ou prototomonte.

#### 2.1.4. Exemple d'Apostome, le genre *Synophrya* (Foettingeriidae).

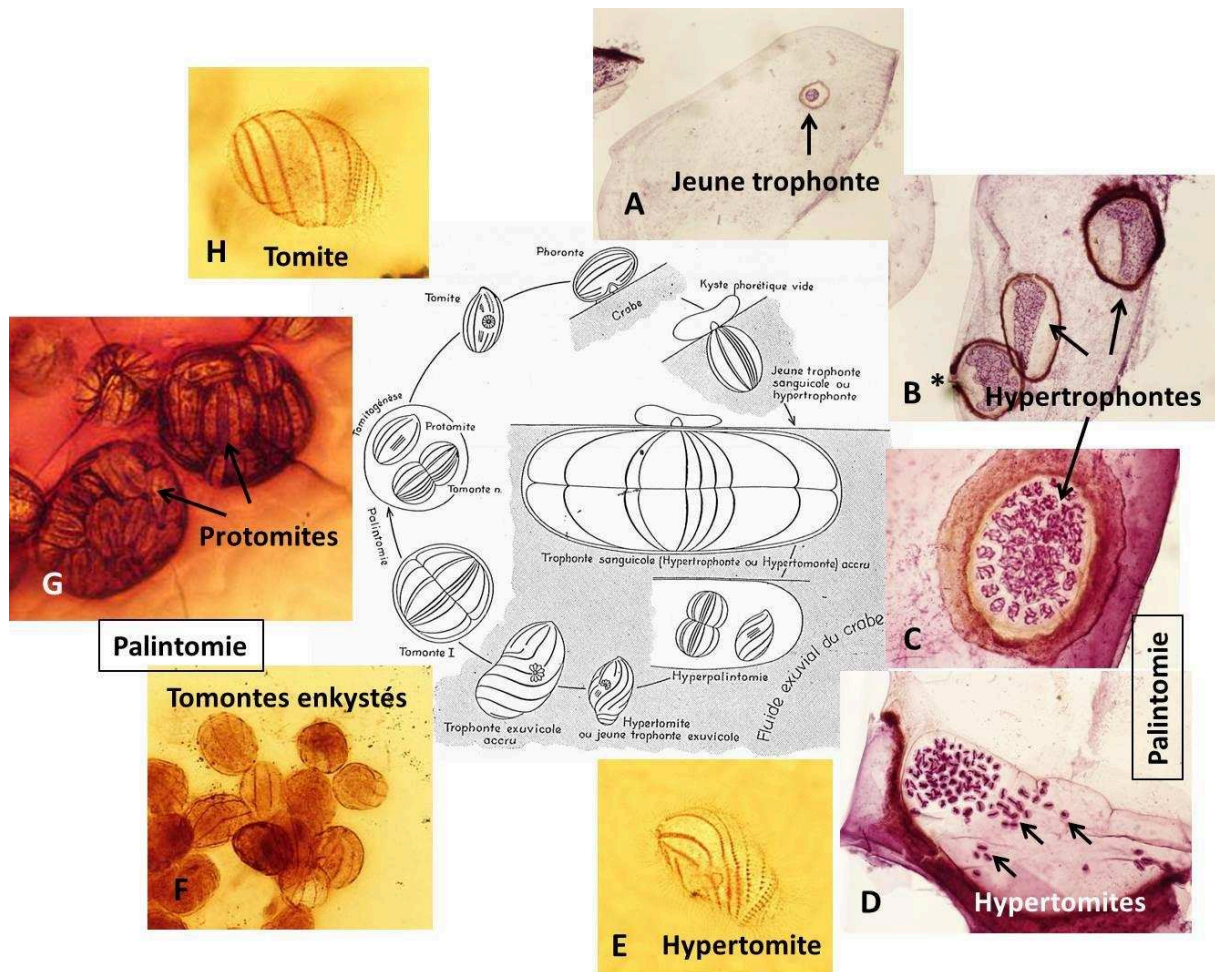
Afin d'illustrer le cycle de vie des Apostomes, nous avons choisi celui du genre *Synophrya* qui présente plusieurs homologues avec notre taxon d'intérêt qui est celui des Chromidinés. Son cycle de vie est un des plus complexes des Apostomes avec tous les stades de développement connus.

Les *Synophrya* sont des Apostomes phorétiques rencontrés chez les crustacés du genre *Portunus* et *Carcinus*, qui passent par un stade parasitaire interne avant de réaliser un développement exuvial. Les *Synophrya* présents chez les *Portunus* ont des trophontes rencontrés uniquement dans la branchie. Chez les *Carcinus*, les trophontes sont rencontrés sous le tégument de la cavité branchiale et du bouclier céphalothoracique.

Le cycle de *Synophrya* a été étudié par Chatton et Lwoff (1935); Landers (2010). Il ne se présente que chez un seul hôte mais c'est un cycle à double parasitisme car il existe sur un même individu hôte à deux stades de développement distincts et alternes qui se nourrissent successivement du liquide exuvial et du sang.

Cycle de vie de *Synophrya* (Fig. 9): Le stade de dispersion, le tomite (Fig. 9H), s'enkyste sans s'accroître (stade phoronte ou kystes phorétiques) à la surface des téguments de la branchie ou de la cavité branchiale d'un crabe. Dans un délai minimum de 30 heures, le phoronte perce la paroi de son kyste et le tégument sous-jacent, s'inocule sous la peau du crabe, s'y immobilise, résorbe sa ciliature (Fig. 9A) et s'accroît considérablement en un parasite interne, l'hypertrophonte (Fig. 9B). Le parasite est isolé du tissu de l'hôte par une double enveloppe et en position d'attente. Au moment de la pré-mue du crabe et seulement à ce moment-là, l'hypertrophonte entre en division (hyperpalintomie) (Fig. 9C, D) pour donner de nombreux petits ciliés libres, les hypertomites (Fig. 9D, E), qui se dispersent dans la dépouille de la mue. Ils suivent alors la phase exuviale classique des Apostomes : les hypertomites se nourrissent de liquide exuvial, croissent en taille et deviennent des trophontes exuviaux qui s'enkystent en tomontes (Fig. 9F). Ces derniers entrent en division par palintomie (tomitogénèse) pour produire de 2 à 16 tomites (Fig. 9G). L'éclatement du kyste permet la libération des tomites (Fig. 9H) et leur propagation pour s'enkyster sur le même crabe ou un autre crabe.





**Figure 9.** Cycle de vie de *Synophrya hypertrophica* (Chatton et Lwoff, 1935). **A** : Pénétration et développement du phoronte en un jeune trophonte dans le feuillet des branchies du crabe *Portunus*. **B** : Développement de l'hypertrophonte (l'asterisque indique le point de pénétration du phoronte). **C** : division de l'hypertrophonte lors de la pré-mue du crabe (hyperpalintomie). **D** : hypertomites issues de la palintomie. **E**. Hypertomite libre. **F** : Enkystement du trophonte exuvial en tomonte. **G** : Tomitogenèse (palintomie) avec production de protomites au sein du kyste qui se différencieront en tomites lors de l'éclatement du kyste. **H** : Tomite libre. **A-D** : Coloration à l'hématoxyline. **E-H** : Imprégnation à l'argent de l'infrastructure. Les images sont issues des lames originales de Chatton et Lwoff conservées dans la Collection de Protistes du MNHN.

## **2.2. La famille des Opalinopsidae Hartog, 1906.**

Gonder (1905); Dobell (1908) ont initialement décrit cette famille comme étant constituée de ciliés holotriches présentant des bandelettes ciliaires hélicoïdales et recouvrant deux genres : les parasites des reins (*Chromidina*, Fig. 12-13) et les parasites du foie des céphalopodes (*Opalinopsis*, Fig. 10). Leur noyau forme un réseau présent sur la totalité de leurs corps. Foettinger (1881) pense qu'ils se multiplient par bourgeonnement alors que Dobell (1908) pense que les Opalinopsides se multiplient par segmentation. La plupart des stades de

développement sont très labiles et sensibles à l'eau de mer. Leur mode de dissémination et leur cycle biologique complet restent encore inconnus (Chatton et Lwoff 1928).

Le tableau 1 regroupe des critères distinctifs entre les deux genres de ciliés.

	<b>Opalinopsis (Fig 10)</b>	<b>Chromidina (Fig.12-13)</b>
Nombre de morpho-espèces décrites	2	4
<b><u>Critères Communs</u></b>		
<b><u>Ciliature</u></b>	Holotriche, ciliature hélicoïdale très dense	
<b><u>Noyau</u></b>	Noyau lanciné, très réticulé, dissocié en masses fusiformes, sphériques ou vésiculeuses	
<b><u>Critères Distinctifs</u></b>		
<b><u>Forme</u></b>	Claviforme	Vermiforme
<b><u>Microhabitat</u></b>	Foie et intestins des céphalopodes	Sacs rénaux des céphalopodes
<b><u>Bouche</u></b>	Astomes	Présente probablement pour certains stades
<b><u>Nutrition</u></b>	Diffusion	Ingestion des cellules rénales
<b><u>Hôte</u></b>	Sepiotes, poulpes et hétéropodes	Céphalopodes
<b><u>Mobilité</u></b>	Peut être libre dans le foie ou fixé en masse à l'épithélium des canaux hépatiques et de l'intestin par leur pôle antérieur élargi et pourvu d'une papille saillante, large, dépourvue de ciliature et d'infaciliature	Fixé par leur partie antérieure à l'épithélium rénal mais peuvent nager dans l'urine une fois détaché
<b><u>Cinétie</u></b>	Cinétie avec lacune	Cinétie sans lacune
<b><u>Vacuole</u></b>	Présence d'une vacuole pulsatile au pôle postérieur	Présence uniquement chez le tomite
<b><u>Macronoyau</u></b>	Macronoyau circonvolutionné et réticulé situé dans la zone médullaire	Macronoyau dans tout le corps
<b><u>Micronoyau</u></b>	Micronoyau unique éllipsoïdal	Micronoyau unique de forme fuselée
<b><u>Nombre De Stries</u></b>	30 stries ciliaires n'atteignant ni le pôle antérieur ni le pôle postérieur qui sont largement dénudés	12-14 stries
<b><u>Trichocystes</u></b>	Absence	Présence
<b><u>Multiplication</u></b>	Scission équatoriale	Sectionnement de la région distale en plusieurs segments capable de reproduire l'individu adulte
<b><u>Physiologie</u></b>	Survivent assez longtemps en eau de mer	Meurent en présence d'eau de mer

**Tableau 1.** Critères communs et distinctifs d'identification des genres Opalinopsis et Chromidina.

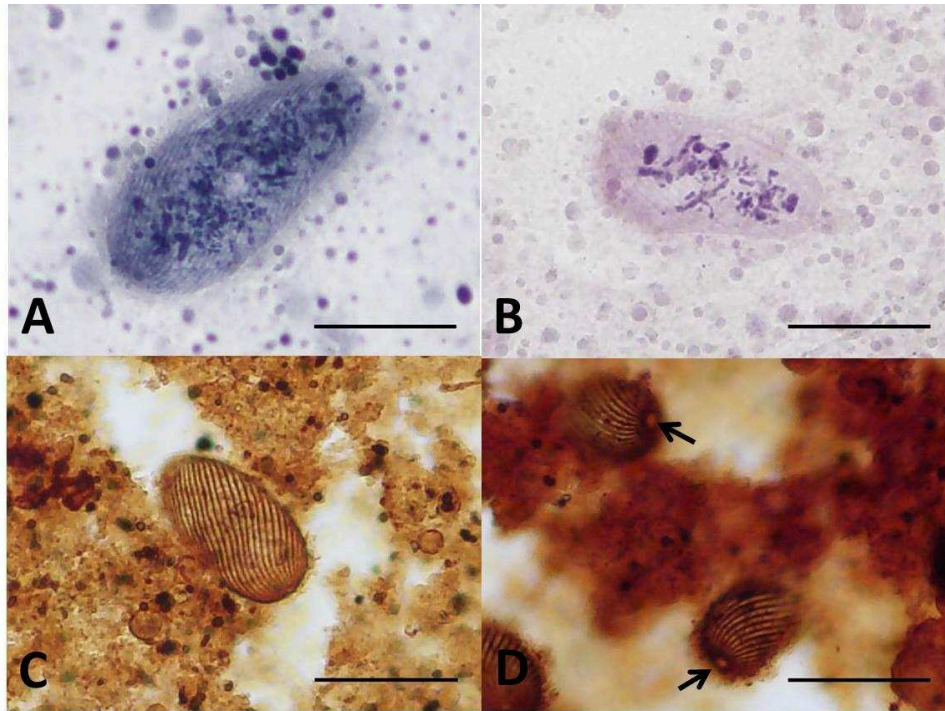


Figure 10. *Opalinopsis sepiolae* Foettinger, 1881

**A-B** : Coloration de la chromatine (Bleu de méthylène et hématoxyline) montrant l'aspect réticulé et dissocié en masse de la chromatine. **C-D** : Imprégnation argentique de l'infacillature constituée de 30 stries hélicoidales qui ne se rejoignent pas aux pôles antérieur et postérieur (flèches). Barre : 50  $\mu$ m. Les images sont issues des lames originales de Chatton conservées dans la Collection de Protistes du MNHN.

### **2.3. Le genre Chromidina Gonder 1905.**

Synonymie: *Bendenia* Foettinger 1881; *Opalinopsis* Bütschli 1889.

#### **2.3.1. Habitat.**

Les chromidinés sont les parasites les plus fréquemment rencontrés dans les sacs rénaux de céphalopodes, après les dicyémides (Hochberg 1982; 1983; 1990). Au total, 23 espèces de céphalopodes ont été signalées comme hôtes de chromidinés. Contrairement aux dicyémides qui préfèrent généralement infester les céphalopodes benthiques, les chromidinés se rencontrent dans les sacs rénaux de céphalopodes océaniques et précisément les calmars et les poulpes épi- et mésopélagiques. La présence de chromidinés dans des céphalopodes benthiques et épibenthiques est occasionnelle et concerne uniquement les céphalopodes ayant un stade juvénile planctonique au cours de leur développement (par ex : *Eledone cirrhosa*, *Octopus*

*salutii*, *Scaevurgus unicirrhus*...) et les seiches ayant des stades juvéniles nectoniques se nourrissant à la surface de l'eau.

### 2.3.2. Distribution géographique.

Notre connaissance sur leur distribution est limitée à cause du faible nombre d'espèces de chromidinés signalées.

- En Méditerranée et en Manche, *Chromidina coronata* a été signalée chez *Octopus vulgaris*, *Sepioloa rondeleti*, *Illex coindetti*, *Eledone cirrhosa* et *Scaevurgus unicirrhus*, (Dobell 1909; Collin 1914; 1914b; 1915; Chatton et Lwoff 1928; 1931; 1935; Hochberg 1971; 1982; 1983; 1990).

- *Chromidina elegans* a été signalée chez *Sepia elegans*, *Sepia orbignyana* et *Illex coindetti* en Méditerranée et en Manche. *Chromidina elegans* a été reportée chez *Todarodes sagittatus* et *Octopus salutii* uniquement en Méditerranée (Nouvel 1945; Hochberg 1971). Wermel (1928) a identifié cette espèce en Russie sur *Loligo* sp. ; et Jepps (1931); Clarke (1970) l'ont observée sur *Spirula spirula* en Atlantique.

- *Chromidina cortezi* a été signalée sur *Pterygioteuthis giardi* dans les Golfes de Californie et du Mexique par Hochberg (1971, 1990).

- *Chromidina* sp. a été décrite par Landers (2010) dans le Golfe du Mexique.

Ainsi, dans notre zone d'étude en Méditerranée et en Atlantique, uniquement deux espèces de *Chromidina* ont été décrites : *Chromidina elegans* (Foettinger 1881) et *Chromidina coronata* (Foettinger 1881).

### 2.3.3. Morphologie.

Le genre *Chromidina* a été bien décrit par (Chatton et Lwoff 1935) dans leur manuscrit sur les ciliés Apostomes, où ils les ont reconnus comme des Apostomes atypiques.

Les stades vermiformes des *Chromidina* ont un corps allongé cylindrique présentant une extrémité postérieure arrondie. L'extrémité antérieure est généralement plus large que le reste du corps et s'effile vers la partie postérieure du corps de telle sorte qu'elle forme un réel renflement céphalique ou « tête », semblable à un rostre. Leur taille varie de 200 µm à 2000 µm en fonction de l'espèce (Fig. 12, 13).

Pour les 4 espèces décrites, on remarque généralement deux types de morphologies des vermiformes : *Chromidina coronata* présente une extrémité antérieure enflée entourée d'une couronne de long cils alors que *Chromidina elegans*, *Chromidina cortezi* et *Chromidina sp.* ne présentent pas cette couronne ciliaire apicale. L'infra-ciliature du tropho-tomonte est organisée en hélice droite et en rangées étroites. Ces rangées sont formées de cils continus de la partie antérieure jusqu'à la partie postérieure. Les espèces décrites de *Chromidina* présentent 12 (*Chromidina sp.*, *Chromidina cortezi*) ou 14 cinéties (*Chromidina elegans*) (Fig.13), sachant que le nombre de cinéties pour *Chromidina coronata* n'a pas été décrit. Le macronoyau des *Chromidina* forme un réseau de chromatine présent dans tout le corps du chromidiné. Le micronoyau a la forme d'un petit fuseau et se situe dans la partie postérieure terminale du corps, proche de la future région de palintomie. L'apparition des trichocystes dans cette région terminale du corps indique le signal du début de la palintomie.

Les stades vermiformes de *Chromidina* se distinguent des autres ciliés Foettingeriidae par :

- L'absence de formation de kystes précédant la segmentation.
- La disparition de cytotome.
- L'absence de rosace buccale.
- L'absence de vacuole contractile.

A chaque division successive, les cinéties du tropho-tomonte se raccourcissent et se serrent. Une fois que le tomite se détache du chromidiné parental, il forme un cytotome, une rosace buccale et une vacuole contractile. L'aspect des noyaux change considérablement durant la palintomie. A la fin de sa phase de développement, le tomite présente un aspect général piriforme, avec une face dorsale convexe et une face ventrale plate ou concave. Sa taille varie entre 15 µm et 30 µm et présente beaucoup de similitudes avec les tomites des Foettingeriidae.

#### 2.3.4. Historique et position phylogénétique.

Foettinger (1881) a nommé, lors de ses premières observations, ces ciliés parasites des sacs rénaux de céphalopodes « *Bendenia* » afin de rendre hommage au chercheur belge Edouard Van Beneden. Il a suggéré que les *Bendenia* ainsi que les *Opalinopsis* seraient proches de la famille des Opalines. Cependant, Bütschelli (1889) reconnaît uniquement le genre *Opalinopsis* en les classant parmi les Opalinina. Gonder (1905), faisant partie de l'école chromidiale, restitue le genre *Bendenia* en le renommant *Chromidina* et le différencie du genre *Opalinopsis*.

Il reconnaît l'existence de la bouche chez quelques stades de développement des chromidinés et décrit leur noyau cellulaire. Le noyau des chromidinés n'est pas individualisé mais se présente dans le protoplasme sous forme de poussière chromatique (chromidie, sporéties) qui se regroupe en noyaux secondaires. Les travaux de Hartog (1906) valident les genres *Chromidina* et *Opalinopsis* qu'ils groupent dans la famille des *Opalinopsidae* qu'il a créée.

Dobell (1908) ainsi que Caullery et Mesnil (1903) suggèrent que les *Opalinopsidés* auraient des affinités plutôt avec les astomes *Anoplophryides*, Les travaux de Chatton et Lwoff (1926); Chatton et Lwoff (1928) réfutent cette association et affilient les *Opalinopsides* aux *Apostomes* avec lesquels ils partagent de nombreuses similitudes : structures cytoplasmiques et nucléaires, organisation ciliaire de l'appareil buccal, cycle évolutif, micronoyau unique présent dans tous les stades, macronoyau réticulé et superficiel. L'étude des tomites des *Chromidina* par Chatton et Lwoff (1931) souligne la présence : d'une bouche dans chaque tomite une fois la palintomie terminée, d'une ciliature buccale constituée de 6 stries et de garnitures de trichocystes sur les stries ciliaires qui apparaissent au début de la palintomie. Ces caractères que l'on retrouve chez les tomites de l'*Apostome Foettingeriia*, confortent l'affiliation des *Chromidina* aux *Apostomes*.

Wermel (1928) a étudié des chromidinés de calmars et confirme les études de Chatton et Lwoff (1926; 1928; 1931; 1935) énonçant que les tomites sont la forme de dissémination chez les chromidinés.

Hochberg (1982; 1990) suggère que les *Chromidina* seraient des organismes proches des *Foettingeriidae* qui auraient subi des métamorphoses afin de s'adapter au mode de vie endoparasite. Sachant que les *Foettingeriidae* sont considérés comme les ciliés *Apostomes* les plus primitifs, l'existence de caractère synapomorphique entre les stades tomites des *Foettingeriidae* et des *Chromidina* confère une origine primitive de ces derniers.

#### 2.3.5. Cycle de vie.

Les *Chromidina* sont des *Apostomes* ayant un cycle de vie partiellement connu. Chatton et Lwoff (1935) présumant qu'il s'agit d'un cycle phorétique actuel ou bien ancestral de crustacés parasites de céphalopodes. L'hôte intermédiaire est présumé être un crustacé par analogie à d'autres *Apostomes* mais aucune espèce de crustacé précise n'a été identifiée. Il s'agit d'espèces parasites connues seulement à l'état tropho-tomonte et tomite pour l'instant.

*Chromidina elegans* (Foettinger, 1881) est l'espèce type de ce genre. Une seule partie de son cycle est connue (Fig. 11). Les tropho-tomontes sont les stades vermiformes observés



chez *Sepia elegans*. Ils sont attachés aux sacs rénaux des céphalopodes par leur papille antérieure. Ils sont dépourvus de bouche et se nourrissent donc de l'urine par diffusion. Leur croissance se fait en longueur contrairement aux autres Apostomes. Cette croissance s'accompagne de scissions successives ou simultanées (palintomie) à l'extrémité distale du vermiforme formant des petits segments ou « tomites » attachés les uns aux autres, pouvant être de taille égale ou inégale, et donner par la suite des segments secondaires. Ils forment ainsi des chaînes palintomiques à huit, douze, seize et jusqu'à vingt-quatre segments (Fig. 13). Une fois que la phase de segmentation des tomites est achevée, la bouche ainsi qu'un champ ciliaire oral apparaissent.

Le tropho-tomite est un stade de vie très fragile et survit très peu de temps après la mort de son hôte (il ne dépasse pas les 24 heures) alors que le tomite peut survivre jusqu'à cinq jours. Cependant, le devenir du tomite reste inconnu.

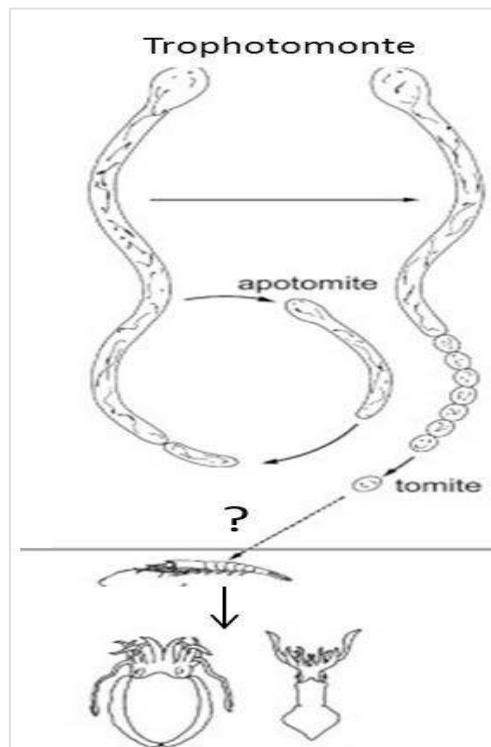


Figure 11. Cycle de vie de *Chromidina elegans* (Furuya, Ota et al. 2004) modifié.

### 2.3.6. Systématique des Chromidina.

Actuellement, 4 morpho-espèces de chromidinés ont été décrites : *Chromidina coronata* (Foettinger 1881), *Chromidina elegans* (Foettinger 1881), *Chromidina cortezi* (Hochberg 1971)

et *Chromidina* sp. Landers (2010). Cependant, d'autres morphologies ont été observées mais pas formellement décrites (Hochberg 1971; 1982; 1990).

#### 2.3.6.1. *Chromidina coronata* Foettinger, 1881.

**Synonymie:** *Chromidina coronata* Gonder, 1905. (Fig. 12).

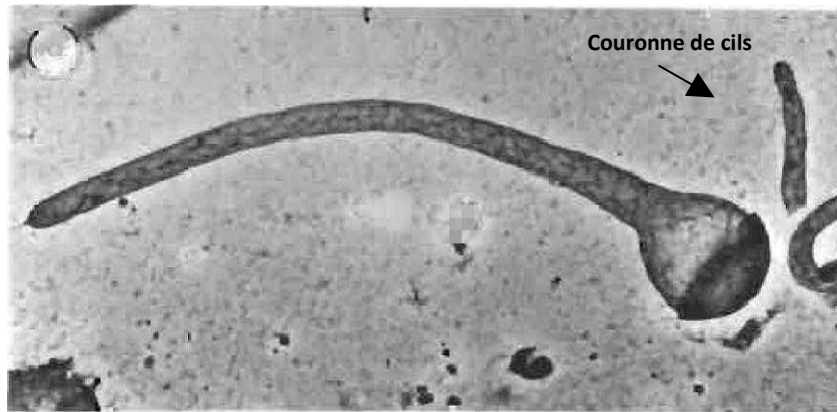


Figure 12. *Chromidina coronata* (Hochberg 1990).

- Distribution géographique : cette espèce a été prélevée pour la première fois à Naples en Italie.
- Hôtes : *Eledone cirrhosa*, *Sepiola rondeleti*, *Scaevurgus uniccirrhus*, *Illex coindetti* et *Octopus vulgaris*.

Ces chromidiniés présentent un système ciliaire en forme de couronne de longs cils à la base de la tête. Les stades hypertrophonte, tomite et trophonte sont inconnus ainsi que le nombre de stries. Cette espèce se caractérise par une terminaison antérieure claviforme et enflée. Sur les spécimens étudiés, de larges bourgeons libres étaient présents mais aucune chaîne de bourgeons (chaîne palintomique) n'a été observée.

#### 2.3.6.2. *Chromidina elegans* Foettinger, 1881.

**Synonymie:** *Benedenia elegans* Foettinger, 1881, *Chromidina elegans* Gonder, 1905 (Fig.13).

Distribution géographique : collecté au Japon, à Banyuls-sur-mer et à Naples.

Hôtes: cette espèce a été signalée chez différents hôtes.

- *Sepia elegans* par Foettinger (1881) ; Gonder (1905) ; Dobell (1909) ; Collin (1914, 1915).
- *Sepia orbignyana* par Dobell (1909).
- *Illex coindetti* par Gonder (1905) et Dobell (1909).
- *Loligo* sp. par Wermel (1923).
- *Todarodes sagittatus* par Hochberg (1971).
- *Octopus salutti* par Hochberg (1971)



**Description** (Fig. 13):

**Les formes végétatives** vermiformes sont fixées par une papille antérieure aux cellules rénales de céphalopodes (Fig. 13A). Ils se caractérisent par les aspects suivant :

- Absence de bouche.
- Nutrition par **voie diffusive**.
- Croissance **surtout en longueur** : scissions successives ou simultanées séparant à l'extrémité distale plusieurs courts segments (Fig. 13F, H, I, J).
- Apparition dans chacun des segments, d'un champ ciliaire et d'une bouche quand les divisions sont achevées.
- Corps très fragile qui meurt rapidement (24 heures maximum après la mort de l'hôte).
- Habitat : les lacunes sanguines réno-pancréatique (Collin 1915).
- Céphalisation prononcée (Fig. 13B-E).
- Position postérieure du micronoyau.
- Formation de trichocystes (fréquemment des éléments cuticulaires, situés entre les grains basaux).
- taille : de 30-1200  $\mu\text{m}$  de long et 10-18  $\mu\text{m}$  de large, pouvant atteindre 5 mm chez les individus peuplant les lacustres sanguines.
- **Présence d'une papille apicale** (Fig. 13E): pas d'orifice buccal mais **un complexe oro-vésical** situé un peu au-dessus du niveau moyen du corps à côté du micronoyau uniquement chez les germes et jamais chez les adultes.
- L'absence de vacuole pulsatile,
- Pas d'interruption des stries ciliaires, en aucun point (Fig. 13G),
- Le **cytoplasme** : homogène et optiquement vide, il contient de fins chondriosomes bacilliformes visibles in vivo. Selon l'individu, le protoplasme est souvent très chargé de vacuoles et d'enclaves à contours très fins et très nets. Les enclaves sont très nombreuses, inégalement ou uniformément réparties. Des masses de chromatine granuleuses et des enclaves basophiles colorables au rouge neutre sont visibles entre les vacuoles.
- **Les noyaux** : macronoyau réticulé se présentant sous forme d'un réseau chromatique (Fig. 13B, H), micronoyau au milieu du lacis des cordons macronucléaires et de la masse basophile.

- **Le système ciliaire** : holotriche, stries ciliaires (14) à partir de l'apex en tourbillon très dense et formant une hélice à pas très courts (Fig. 13C, G, I-J). Chaque strie est formée d'une file de grains basaux rangés le long d'une bandelette pectinée homogène considérée comme fibrille contractile. Des blépharoplastes contractiles sont en arrière du cordon, présentant 2 structures : granules infraciliaires et corpuscules ciliaires. Présence de trichocystes : irrégulièrement espacés, petits pivots très réfringents à pointe profonde, toujours appendus aux stries ciliaires, et leur présence est liée à la prépalintomie.

**Les segments ou les tomites** (Fig. 13F, H, I, J) sont le potentiel agent de l'expansion externe de l'infection. Ils peuvent survivre 4-5 jours après la mort de l'hôte. Ils mesurent 20-30  $\mu\text{m}$  de long et 15-20  $\mu\text{m}$  de large. Ils ont une morphologie ellipsoïdale, aplatie dorso-ventralement, présentent une grosse vacuole postérieure à canal efférent, contiennent des plaquettes réfringentes légèrement osmio-réductrices et colorables au rouge neutre, présentent 14 stries avec de larges espaces entre les stries.

### Morphologie de *Chromidina elegans*.

**A** : Vue d'ensemble de tropho-tomontes ancrés aux cellules rénales de *Sepia elegans*. **B** : Tropho-tomonte (coloration à l'hématoxyline), le renflement antérieur « céphalique » est clairement visible ainsi que l'aspect lancé et réticulé de la chromatine. **C** : Renflement céphalique du tropho-tomonte, partie du corps qui se fixe aux cellules rénales, l'imprégnation argentique met en évidence le réseau hélicoïdal de cinéties (14) qui recouvre tout le corps du chromidiné. **D** : Renflement céphalique, la coloration met en évidence les cils qui recouvrent tout le corps. **E** : Renflement céphalique, l'extrémité antérieure du chromidié se termine par une papille apicale. **F** : Chromidiné dont l'extrémité postérieure subit une segmentation (palintomie) qui génère les tomites. **G** : Corps du chromidiné, l'imprégnation argentique met en évidence le réseau hélicoïdal de cinéties qui recouvre tout le corps. **H** : Renflement céphalique (partie antérieure) et tomites en formation (partie postérieure) de deux tropho-tomontes (coloration à l'hématoxyline). **I-J** : Segmentation de la partie postérieure du chromidiné en apotomites et tomites (imprégnation argentique). Barre = 100  $\mu\text{m}$  sauf quand indiqué. Les images sont issues des lames originales de Chatton & Lwoff conservées dans la Collection de Protistes du MNHN.

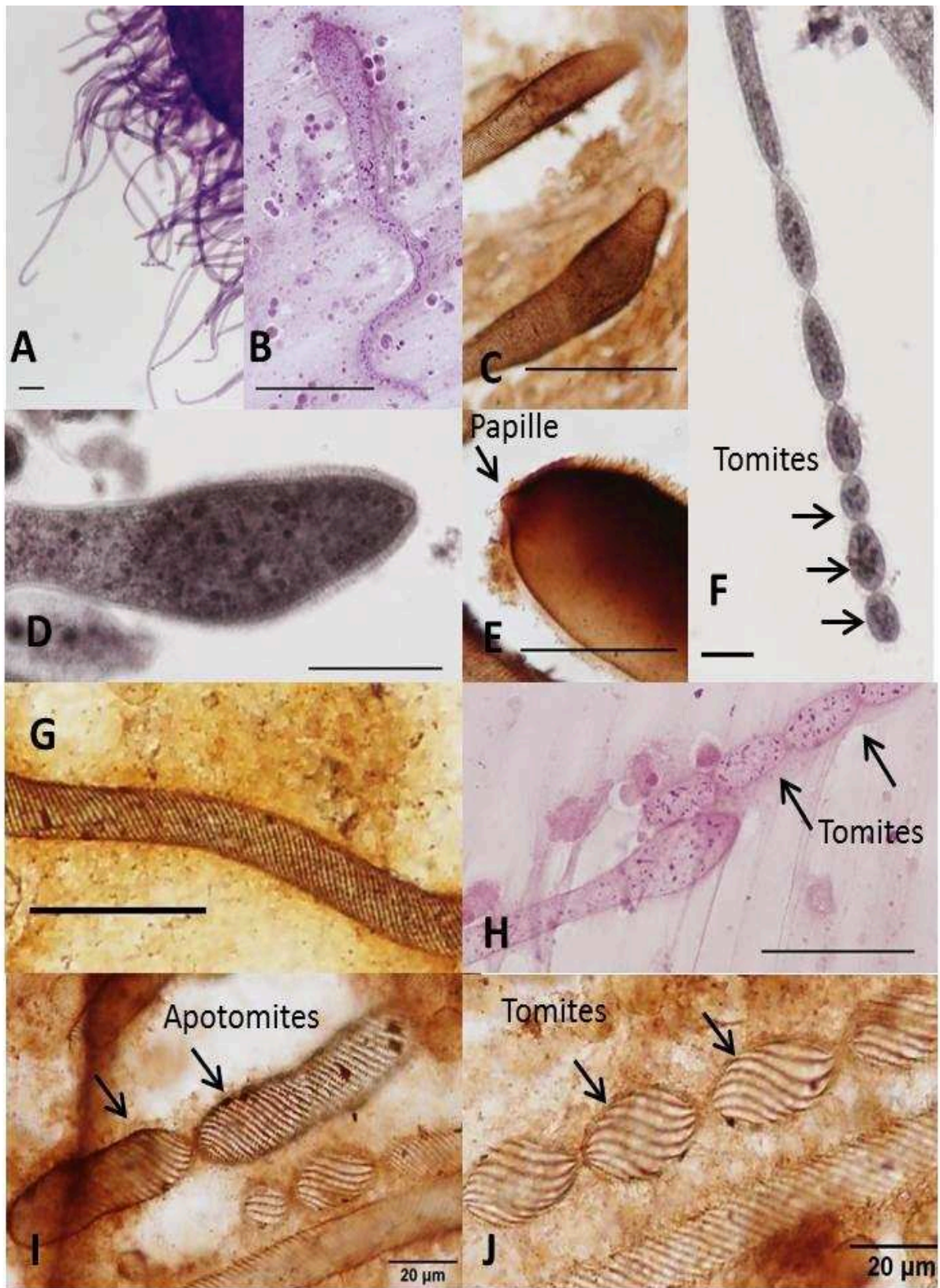


Figure 13. Morphologie de *Chromidina elegans*.

#### 2.3.6.3. Chromidina cortezi (Hochberg, 1971).

Cette espèce a été prélevée sur *Pterygioteuthis giardi* dans le Golfe de Californie d'où son appellation (Golfe de Californie connu sous le nom de Golfe de Cortez). *Chromidina cortezi* se caractérise par des tropho-tomontes minces et allongés. La longueur du corps varie de 250  $\mu\text{m}$  jusqu'à 2000  $\mu\text{m}$ . Sa largeur est de 12 à 28  $\mu\text{m}$ . Les cinéties sont au nombre de 12 spires.

Des stades apotomites de *Chromidina cortezi* ont été observés. Les chaînes palintomiques présentent 8 segments. Ces tomites ont un diamètre de 15-30  $\mu\text{m}$  sur 15-20  $\mu\text{m}$ . *Chromidina cortezi* est proche morphologiquement de *Chromidina elegans*. Cependant, il s'en distingue par sa distribution géographique, l'espèce hôte, la taille du tropho-tomonte légèrement supérieure, l'absence d'hypertrophontes, la présence d'apotomites et de chaînes palintomiques formées typiquement de 8 tomites (Hochberg 1971).

#### 2.3.6.4. Chromidina sp. Landers (2010).

Le tropho-tomonte de cette espèce présente un apex conique ou en forme de bulbe. Sa taille varie entre une longueur dépassant 1500  $\mu\text{m}$  et une largeur de 30  $\mu\text{m}$ . Les cinéties présentent 12 stries de cils ininterrompues tout au long du tronc du tropho-tomonte. Le macronoyau est présent sur la totalité du corps du chromidiné jusqu'à la partie antérieure. Le cytoplasme est riche en vacuoles associées à des microtubules. Pas de bouche observée chez le tropho-tomonte. Sa partie postérieure présente soit un seul segment, soit plusieurs tomites.

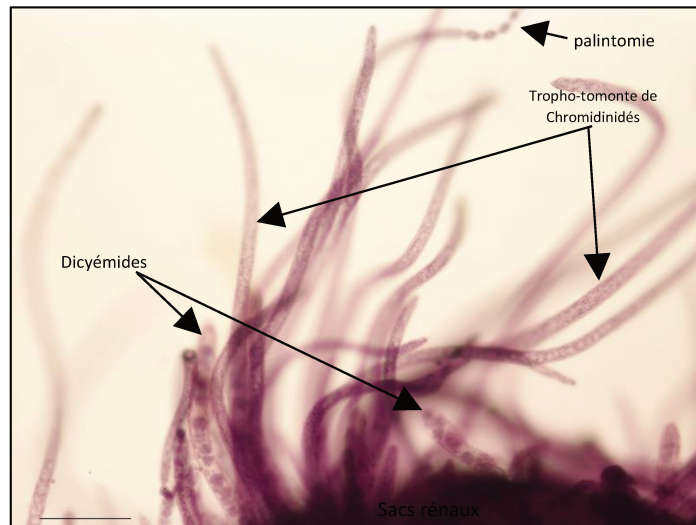
#### 2.3.7. Co-infestation des sacs rénaux de céphalopodes par les dicyémides et les chromidinés.

Les dicyémides ainsi que les *Chromidina* peuplent les replis des sacs rénaux et pancréatiques des céphalopodes. La co-infection par ces deux groupes phylogénétiquement distincts a été occasionnellement reportée chez (Nouvel 1937; Furuya et Hochberg 1999; Furuya, Ota et al. 2004) sur :

- Des Octobranchia : *Eledone cirrhosa*, *Octopus salutii*.
- Un calmar : *Todarodes pacificus*. Cependant, cette signalisation reste à confirmer car elle était uniquement observée chez un seul individu.
- Des seiches : *Sepia kobeensis*, *Sepia peterseni* et *Euprymna morsei*.

La coinfection de ces seiches par des dicyémides et des chromidinés (Fig. 14) est expliquée par l'infection de ces hôtes au début de leurs vies, quand ils sont encore des larves planctoniques, par des chromidinés. Quand ils évoluent et deviennent benthiques, et donc s'installent à

proximité du fond marin, ces hôtes peuvent rencontrer les dicyémides et perdent alors leurs faunes de chromidinés laissant la place aux dicyémides (Furuya, Ota et al. 2004).



**Figure 14.** Epithélium rénal présentant un cas de coinfection dicyémides/chromidinés.

Echelle : 500  $\mu$ m. Lames originales de Chatton et Lwoff conservées dans la Collection de Protistes du MNHN.

#### 2.3.8. Limites des connaissances sur les chromidinés et problématique.

Très peu d'études font référence à ces apostomes qui apparaissent comme des parasites exclusifs des sacs rénaux des céphalopodes pélagiques et mésopélagiques. Ainsi, jusqu'à aujourd'hui, uniquement 4 espèces ont été signalées et leur biodiversité est très certainement sous-estimée (Hochberg 1971; 1983; 1990; Furuya, Ota et al. 2004; Ohtsuka, Suzuki et al. 2015). Nous ignorons toujours plusieurs aspects de leur biologie et de leur cycle de développement, les formes de dissémination ainsi que leurs hôtes intermédiaires, dans l'hypothèse où il s'agirait d'un cycle hétéroxène comme pour la plupart des apostomes.

- ✓ Les chromidinés sont typiquement des parasites de céphalopode pélagiques. Cependant, peu d'études portent sur leur spécificité d'hôte.
- ✓ La distribution géographique telle que suggérée par les travaux de Hochberg (Hochberg 1971; 1982; 1983; 1990) correspond à la distribution des espèces de chromidinés connus et est limitée à des sites ponctuels. Une étude plus large explorant une plus grande diversité d'espèces hôtes sur différentes localités est nécessaire afin d'évaluer leur véritable distribution géographique.

✓ La classification des chromidinés parmi les Apostomes est basée uniquement sur des critères morphologiques. Aucune étude moléculaire n'a été réalisée afin d'élucider leurs affinités phylogénétiques et de mettre en valeur leur diversité moléculaire sur la base de la comparaison des séquences d'ADN d'un marqueur discriminant. L'étude des relations phylogénétiques au sein des Apostomes s'est limitée aux autres genres dont l'échantillonnage est plus aisé. L'absence de données sur les chromidinés font que la position phylogénétique des Apostomes reste incomplètes (Greenwood, Sogin et al. 1991; Lynn, Gomez-Gutierrez et al. 2014; Ohtsuka, Suzaki et al. 2015).

### **Chapitre 3 : les Dicyémides.**

La première signalisation de la présence des dicyémides date des travaux de Krohn (1830) qui observe « des parasites filiformes, couvert de cils vibratiles et ressemblant à des infusoires de vers ciliés ». Filippo Calvolini en 1839 complète ces observations. Erdl (1843) réalise une première description plus ou moins détaillée de ces parasites en les considérant comme étant des Entozoaires mais sans pour autant discuter leurs affinités phylogénétiques. Siebold (1845) pense que ces parasites seraient une forme agame de vers à génération alternante. Kolliker (1849) nomme ces parasites « Dicyema » quand ce chercheur reconnaît la présence de deux types distincts d'embryons et leur attribue un nom qui exprime cette variété embryologique. Cet auteur considère les dicyémides comme des vers indéterminés : Entozoaires, Planaires, Némertiens, ou tout autre type de vers. Il les qualifie de tubes creux qui forment dans leurs cavités, par voie asexuée, des embryons vermiformes qui en évoluant ressembleront à leurs parents, ou des embryons infusoriformes. Il n'a cependant pas pu se prononcer sur le devenir des infusoriformes. Il considère que ces vers parasites ont la même morphologie et les regroupe tous sous le nom de *Dicyema paradoxum*.

Wagener (1854) décrit deux espèces différentes de dicyémides en prenant en considération de nouveaux critères d'identification. De même, Van Beneden (1876) détaille la description de quelques dicyémides. Claparede (1857) considère que les dicyémides seraient des infusoires voisins des Opalines. Van Beneden pense que les *Dicyema* sont proches des Grégarines, sans se prononcer de manière définitive. Ce n'est que suite aux travaux de Lankester (1873) que la pluricellularité des *Dicyema* a été reconnue, réfutant ainsi toutes possibilités d'affinités avec les grégarines ou les infusoires. Cet auteur propose alors que dicyémides seraient des vers dégradés.

Van Beneden (1882) a créé l'embranchement des mésozoaires auquel appartiendraient les dicyémides, en se basant sur l'observation que ces parasites présentent des caractères spécifiques à la fois aux Protozoaires et aux Métazoaires. Il considère ainsi que les dicyémides seraient la forme intermédiaire entre ces deux embranchements ou le lien du passage de l'unicellularité à la multicellularité. Il croit à l'affinité entre Orthonectidés et dicyémides comme les deux survivants actuels de l'embranchement des mésozoaires, composé des deux ordres : les Orthonectidés et les Rhombozoaires auquel appartiennent les dicyémides.

#### **3.1. Morphologie.**

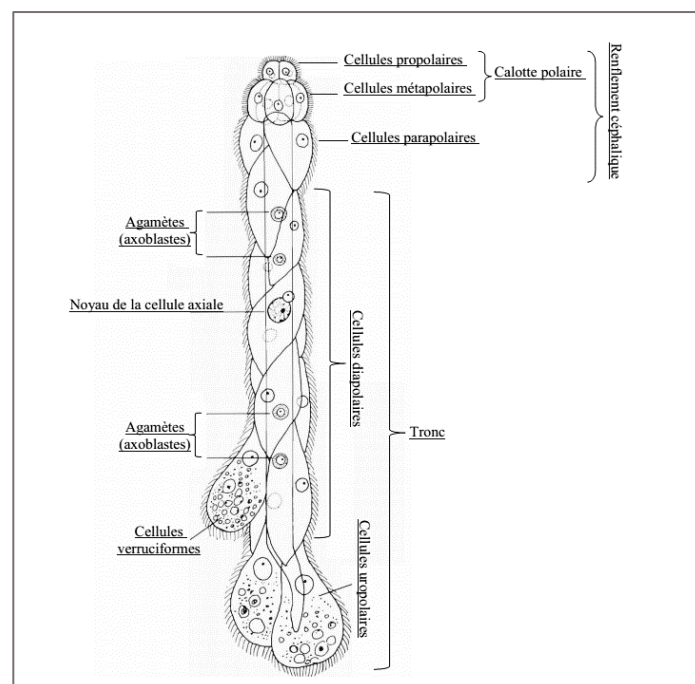
Les Dicyémides sont des parasites très polymorphes et leur morphologie diffère selon leur stade



de développement (Delage et Herouard 1899). Cavolini (1787) décrit les dicyémides comme un phénomène singulier : « d'innombrables petits animaux infusorigènes ayant une barbe tremblante ». Krohn (1830) les a qualifiés à l'époque de parasites filiformes couverts de cils vibratiles rappelant la forme d'infusoires ou celle des vers vibratiles.

### 3.1.1. Les stades adultes.

Treize ans après la première description des dicyémides, Erdl (1843) a complété la description des stades adultes en décrivant deux types de larves. Nous décrirons dans ce qui suit, les traits morphologiques communs d'un adulte de la famille de Dicyémides (Fig. 15).



**Figure 15.** Organisation générale du corps d'un dicyémide.

D'après McConnaughey (1951) légèrement modifié.

Le corps : le dicyémide adulte est vermiforme, couvert de cils et a une longueur de 2 à 3 mm. Le corps présente globalement deux parties distinctes : l'extrémité antérieure ou la tête présente un aspect renflé et dite calotte polaire. L'extrémité postérieure a un aspect effilé et correspond au tronc.

Le corps des dicyémides est composé d'une unique cellule axiale centrale couverte par une couche de cellules périphériques.

Ces cellules périphériques forment un revêtement ectodermique continu autour de la cellule axiale. Elles présentent un certain nombre de caractères communs : le noyau est vésiculeux, leurs parois couvertes de cils sont épaisses mais ne forment pas une membrane continue afin de permettre aux larves qui traversent ces cellules, de rompre la paroi et de sortir du corps du dicyémide. Les parois se ressoudent rapidement et facilement.

Les cellules périphériques diffèrent selon leur position par rapport à la cellule axiale (Fig. 15) :

- Les cellules périphériques de la calotte polaire se distinguent de celles du corps par un aspect plus courts, plus épais et plus granuleux, et des cils courts et plus serrés.

- Les cellules périphériques s'organisent en deux rangées en cercle autour de l'axe du corps. La rangée terminale est composée de 4 cellules dites « propolaires » correspondant à l'extrémité de la calotte et donc de tout le corps. La jonction des 4 cellules propolaires forme le signe d'une addition « + ».

- La rangée de cellules périphériques sous-jacente aux propolaires est formée de cellules métapolaires dont le nombre varie, selon le genre auquel appartient le dicyémide, de 4 à 5 cellules.

- Les cellules propolaires forment avec les métapolaires « la calotte ou la coiffe polaire » et leurs arrangements (selon 4 formes de base) participent à la définition d'espèce chez les dicyémides. Cette région céphalique du corps des dicyémides présente la zone de contact avec le tissu de l'hôte qui leur permet de s'attacher à l'épithélium rénal (Furuya, Hochberg et al. 2003). Les dicyémides présentent des formes variées de calotte polaire (conique, plate, globuleuse,...) qui a été souvent considérée comme un critère spécifique des dicyémides et qui intensifie la séparation des niches écologiques de ces parasites. La forme de la calotte et sa fonction chez les dicyémides ont été bien étudiées dans les travaux de Furuya (Furuya 2002; Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya et Tsuneki 2003).

- Les cellules périphériques du corps ou les cellules du tronc : la rangée succédant celle des métapolaires n'appartient plus à la calotte même si elle garde la même épaisseur que les pro/métapolaires. Ces cellules sont dites les « parapolaires ». Selon Van Beneden (1876) le nombre des parapolaires varierait entre 0 et 4 alors que Whitman (1883) n'a constamment observé que deux parapolaires. Le reste des cellules périphériques couvrant le corps sont dites « diapolaires ». Celles-ci sont peu épaisses, ayant une surface externe convexe et couverte de cils plus longs et plus clairsemés alors que la partie adhérent à la cellule axiale présente une forme concave. Le nombre des diapolaires varie selon les espèces entre 12 et 20 cellules.

- Les cellules périphériques de la partie inférieure du corps ressemblent beaucoup aux diapolaires. Cette rangée terminale est formée de deux cellules « uropolaires » qui se joignent en pointe.

- Remarques : les granules des cellules périphériques peuvent être parfois très abondants et font ainsi augmenter le volume de ces cellules formant des bosses pendantes. Ces cellules périphériques sont appelées dans ce cas des « verrues ».

La cellule axiale : cellule de grande taille formant la majeure partie du corps du dicyémide. Sa partie supérieure est couronnée par les propolaires alors que la partie inférieure de la cellule axiale s'insinue en pointe entre les 2 uropolaires. Le noyau se trouve généralement au centre de celle-ci, grand et vésiculeux. Le cytoplasme est vacuolaire et réduit à un réticulum de filaments irréguliers baignant dans une substance cytoplasmique. La cellule axiale est également porteuse de tous les embryons à différents stades de développement (Fig. 16).

❖ Les différents stades de développement (Fig. 16).

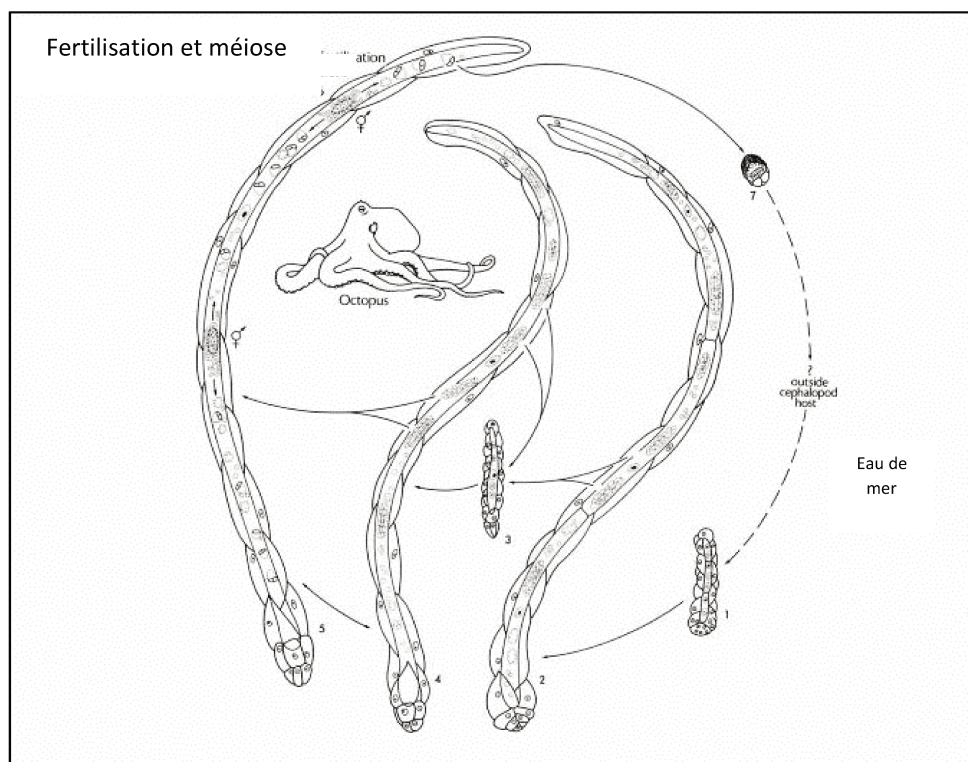


Figure 16. Scénario simplifié du cycle de vie d'un dicyémide mettant en valeur les différents stades de développement (Hochberg 1983).

1-larve vermiforme. 2-4-nématogène. 3-embryon vermiforme. 5-rhombogène. 6-infusorigène. 7-infusoriforme.

- Dimorphisme adultes : selon la forme des embryons portés, deux types de vermiformes sont décrits (Van Beneden 1876):

▪ **Les vermiformes nématogènes ou gynogènes** : il s'agit de vermiformes provenant des nématogènes fondateurs. Ils se caractérisent par une longueur plus importante, une cellule centrale effilée aux deux extrémités, un nombre de cellules périphériques fixe, un noyau unique. Ils se reproduisent exclusivement par voie asexuée.

▪ **Les vermiformes rhombogènes ou androgènes** : la taille du vermiforme est petite, les cellules polaires sont peu épaisses, le nombre de cellules périphériques est variable.

Remarques : van Beneden (1876) a été le premier auteur à décrire les cellules périphériques des stades vermiformes. Whitman (1883); Gersch (1938); Furuya, Hochberg et al. (2001) considèrent que le nombre de ces cellules est constant. Cependant, McConnaughey (1941); Nouvel (1947) ont réalisé des études sur un grand nombre d'espèces de dicyémides et ont signalé des variations du nombre des cellules périphériques selon l'espèce considérée.

### 3.1.2. Les stades larvaires.

Ce sont les travaux de Kölliker (1849) qui ont donné aux dicyémides le nom de « Dicyema » afin de signaler la présence de 2 stades de développement dans le cycle de ces parasites. Les deux types d'embryons de dicyémides sont : un embryon infusoriforme et un embryon vermiforme. Une fois que ces deux embryons quittent la cellule axiale de l'adulte, ils se transforment respectivement en larve infusoriforme et en larve vermiforme.

### **Larve fondatrice.**

Plusieurs études ont essayé d'élucider l'origine de la larve fondatrice en cherchant des dicyémides dans des céphalopodes provenant d'élevages aquacoles, mais sans succès (Nouvel 1947; Catalano, Whittington et al. 2013). Cependant, Nouvel (1947) a pu observer à plusieurs reprises les cellules abortives des larves fondatrices. Ce sont de minuscules cellules rapidement résorbées, présentes chez les larves les moins évoluées et infestant les céphalopodes fraîchement pêchés. Quoique la présence de ces cellules présente un indicateur d'un développement embryologique plus complexe que celui des vermiformes sédentaires, la signification embryologique des cellules abortives reste énigmatique.

### Larves vermiformes.

Les embryons vermiformes quittant la cellule axiale se transforment en larves vermiformes. Elles se caractérisent par un nombre de cellules égal à celui de l'adulte dont elles sont générées, du futur adulte qu'elles formeront et elles s'organisent de la même manière. Les cellules des

larves vermiformes augmentent de taille pour devenir le futur nématogène.

### Larves sédentaires.

-Les larves sédentaires vermiformes sont différentes de la génération fondatrice. Les larves des nématogènes primaires présentent une cellule axiale unique abritant des cellules germes qui donneront elles aussi à leur tour d'autres nématogènes primaires pour plusieurs générations encore. Le nombre de cellules périphériques est inférieur à celui des vermiformes fondateurs.

-Les larves infusoriformes (Fig. 17).

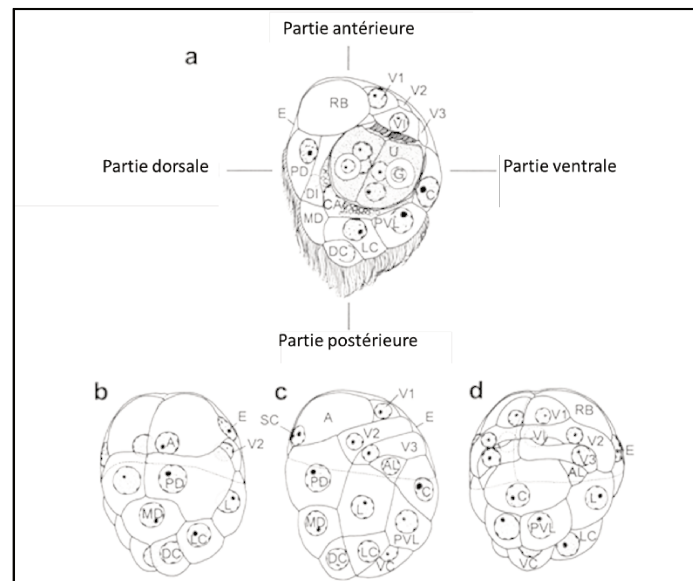


Figure 17. Schéma de l'organisation générale d'une larve infusoriforme à 39 cellules.

**a**, coupe sagittale **b**, vue dorsale; **c**, vue latérale; **d**, vue ventrale. RB, corps réfringent; SC, cils courts. D'après Furuya, Hochberg et al. (2004) modifié.

Elles représentent des larves atypiques et différentes de toutes les formes larvaires des invertébrés, ayant un nombre de cellules plus important et une organisation plus complexe que celle de la forme adulte (Furuya, Hochberg et al. 2004). Leur partie postérieure est ciliée et elles possèdent deux corps réfringents dans la partie antérieure. La composition et le nombre de cellules des infusoriformes sont des critères d'identification de l'espèce de dicyémide (Short 1971; Furuya, Tsuneki et al. 1992; Furuya 1999; Furuya et Hochberg 1999; Furuya, Hochberg et al. 2004), même si nous ignorons jusqu'à aujourd'hui la description de ce stade de développement pour plus de la moitié des espèces de dicyémides connues (Furuya, Hochberg et al. 2004).

### 3.2. Cycle de vie et sexualité des dicyémides.

Différentes questions se posent à propos du cycle de vie atypique des dicyémides. En effet, en plus de sa partie qui demeure toujours énigmatique (passage de l'infestation d'hôte à un autre), leur cycle de vie présente plusieurs variantes d'une espèce à une autre, selon la longévité et la biologie de l'hôte ou la composition du liquide urinaire et ainsi, certains stades de développement peuvent disparaître. Cependant, nous présentons ici le cycle de vie détaillé d'un dicyémide avec toutes les étapes de développement signalées dans la littérature (Fig. 18).

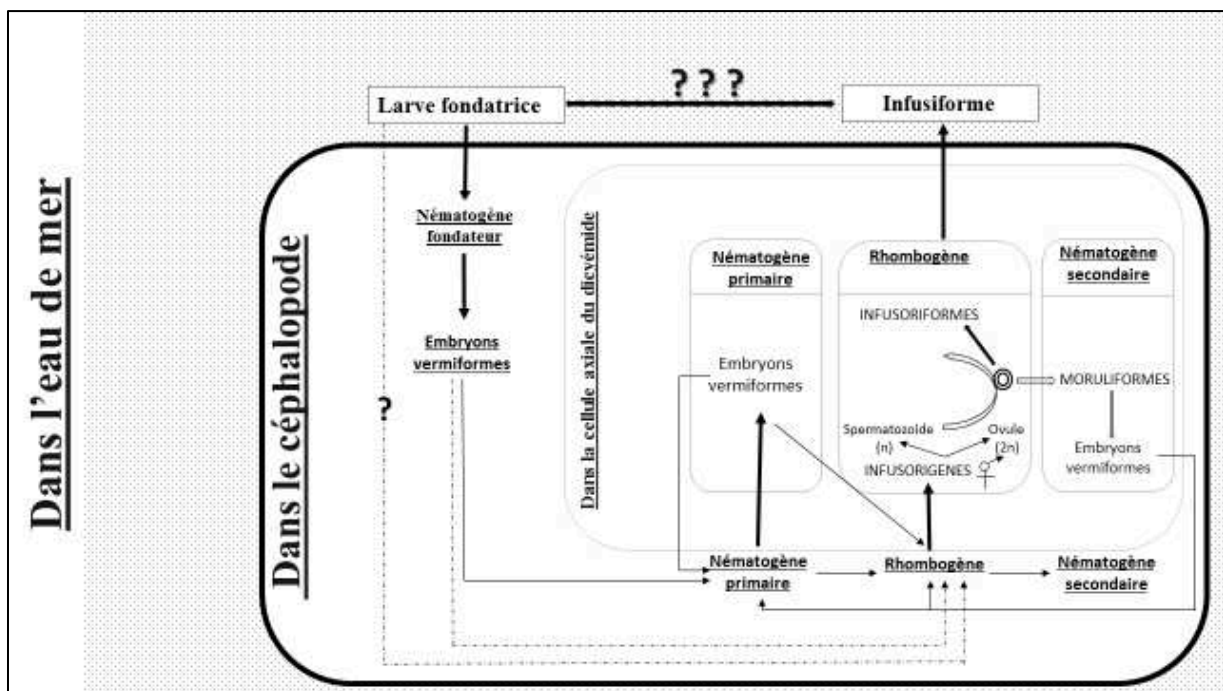


Figure 18. Cycle de vie et reproduction d'un dicyémide d'après Nouvel (1947) modifié.

La larve vermiforme fondatrice infeste un jeune céphalopode et s'installe dans ses sacs urinaires. Les cellules de cette larve augmentent de taille mais leur nombre reste inchangé. Cette larve se transforme en un nématogène fondateur qui est un vermiforme ayant 2 à 3 cellules axiales entourées d'une couche de cellules périphériques aplaties et ciliées. Les cellules germinales des cellules axiales subissent une segmentation pour donner naissance à des embryons vermiformes. Ces embryons ont une organisation plus simple et différente de la génération fondatrice et évoluent en nématogènes primaires. Dans leurs cellules axiales, les cellules germinales du nématogène primaire se transforment à leur tour en de nouveaux embryons vermiformes donnant de nombreuses autres générations de nématogènes primaires formant ainsi une population parasitaire dense sur les sacs rénaux.

Quand le céphalopode atteint la maturité sexuelle, les cellules germes ne se transforment plus en embryons vermiformes et la reproduction asexuée donnant des nématogènes est interrompue. Ainsi, les cellules germes dégènèrent ou deviennent des « noyaux » accessoires. Cependant, d'autres cellules germes donnent par reproduction sexuée des infusorigènes qui deviennent plus tard des infusoriformes. Le nématogène transformé devient un rhombogène secondaire. Toutefois, les rhombogènes primaires sont formés directement à partir des derniers embryons vermiformes produits par les nématogènes.

Lorsque la période d'activité sexuelle du céphalopode s'achève, le rhombogène, à son tour, peut se transformer en un nématogène secondaire. Ainsi, les infusorigènes ne produisent plus d'infusoriformes et leurs cellules germes se transforment en embryons vermiformes. Ces nématogènes secondaires produiront par la suite des nématogènes primaires.

Les infusorigènes présentent la génération sexuée emboîtée et ne quittent pas la cellule axiale du rhombogène. La cellule folliculeuse présente à sa surface les ovules portant des éléments germinaux mâles produisant des spermatozoïdes afin d'assurer l'autofécondation et la pseudogamie. Une fois l'ovule fécondé, le spermatozoïde est expulsé et l'ovule devient un infusoriforme qui quittera la cellule axiale parentale quand il aura atteint la maturité. Ces larves infusoriformes seront expulsées avec l'urine et libérées en mer.

Quand la production des infusoriformes s'achève, l'ovule, qui leur a donné naissance, se segmente en moruliformes ou en blastomères capables de devenir des embryons vermiformes et transformant ainsi le rhombogène en un nématogène secondaire.

Le mode de transmission de l'infestation d'un hôte à un autre reste énigmatique. Le devenir de l'infusoriforme une fois qu'il a quitté son hôte reste inconnu.

#### Remarques :

-Van Beneden (1876); Delage et Hérouard (1899) pensaient que les dicyémides étaient gonochoriques et que les infusoriformes étaient la forme mâle et que les nématogènes et les rhombogènes étaient la forme femelle des dicyémides. Les travaux de Nouvel, Short, Hochberg et Furuya ont pu élucider une grande partie du mystère du cycle de vie des dicyémides.

-Le dicyémide change de type de reproduction et le nématogène évolue en rhombogène (de la reproduction asexuée à la reproduction sexuée), soit quand la densité de la population parasitaire devient très élevée ou que le céphalopode atteint la maturité sexuelle (Furuya and Tsuneki 2003).

### **3.3. La physiologie des dicyémides.**

#### **- Microhabitat.**

Les dicyémides se rencontrent principalement dans les sacs rénaux des céphalopodes (Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya, Ota et al. 2004). Aucun dégât causé par la présence de ces parasites n'a été reporté sur les tissus infectés (Furuya, Ota et al. 2004). Les adultes vermiformes (nématogènes et rhombogènes) se fixent par leurs calottes polaires à l'épithélium rénal des céphalopodes benthiques et leurs corps « nagent » dans le fluide environnant (Nouvel, 1947, McConnaughey, 1951, Hochberg, 1990). La forme de la calotte présente une grande capacité d'attachement et d'adaptation à ce micro-habitat. Les vermiformes adultes se détachent rarement de l'épithélium et ne se trouvent donc presque jamais complètement immergés dans l'urine (Delage and Hérouard 1899; Furuya, Hochberg et al. 2003). Après la mort du céphalopode, sa parasitofaune se détache de l'épithélium et meurt quelques heures après. Il est ainsi recommandé de travailler sur du matériel biologique vivant ou des hôtes fraîchement pêchés pour pouvoir examiner les parasites en bon état et toujours attachés aux reins (en cas d'étude histologique).

Les tissus des vermiformes sont rapidement détruits sous l'action de l'eau de mer et ne survivent que dans le liquide rénal. Par contre, les infusoriformes survivent plus longtemps au contact de l'eau de mer ce qui renforce l'hypothèse qu'ils seraient responsables de la transmission de l'infestation d'un hôte à un autre.

#### **- Mobilité.**

Les adultes vermiformes attachés à l'épithélium réalisent plusieurs contractions et des inflexions du corps produisant des déformations cellulaires locales. Une fois libres dans l'urine, tous les stades de développement des dicyémides peuvent nager rapidement grâce à leurs cils. Les vermiformes nagent dans le sens de leurs calottes polaires. Cette activité ciliaire serait responsable d'un flux constant d'urine facilitant l'évacuation de l'urine (Lapan et Morowitz 1972; Lapan 1975; Furuya, Ota et al. 2004).

#### **- Comportement trophique.**

Les adultes vermiformes attachés à l'épithélium rénal ne se nourrissent pas de l'urine mais ils absorbent par osmose les sucs des cellules épithéliales et le sang arrivant par les veines rénales. Les infusoriformes seraient incapables de se nourrir, leur seule fonction serait la reproduction



sexuée. Delage and Hérouard (1899) ont observé un infusoriforme nageant dans l'urine afin d'étudier son mode de nutrition. Cette larve s'arrête brusquement en effectuant une grande contraction afin de vider le contenu de son urne et continue par la suite sa nage, sans aucun autre comportement trophique. Les dicyémides libres dans l'urine tireraient leurs besoins métaboliques des nutriments dissouts dans l'urine (Hochberg, 1982).

#### -Respiration.

Les dicyémides respirent par osmose l'oxygène dissout dans le liquide rénal. Cependant, ce milieu a une très faible concentration en oxygène.

### **3.4. Systématique des Dicyémides.**

#### 3.4.1 Historique.

Actuellement, 122 morpho-espèces de dicyémides ont été décrites dans la littérature en faisant abstraction des débats sur leur validité (Catalano, Whittington et al. 2015). La première systématique des dicyémides a été proposée par van Beneden (1876). Elle a été largement débattue vu qu'elle se basait sur la notion de spécificité stricte d'hôte supprimant ainsi toutes possibilités d'infections multiples. Cette théorie a été contestée par Whitman (1883) qui a décrit avec plus de précision les espèces de dicyémides en tenant compte des cas d'infections avec plusieurs dicyémides et des cas des dicyémides à spécificité sténoxène infestant des hôtes de familles apparentées. Dans son manuscrit, Whitman basait sa classification sur la constitution cellulaire de la calotte polaire. Les travaux de Nouvel (1933; 1947) ont complété les critères d'identification utilisés par Whitman en décrivant les larves fondatrices et les infusoriformes chez quelques espèces de dicyémides. Ses travaux présentent la seule véritable clé d'identification disponible pour ces parasites. Ce travail a été complété par les travaux de Hochberg et Furuya qui ont permis de classer la plus grande partie de la parasitofaune pacifique (Furuya, Tsuneki et al. 1992; Furuya 1999; Furuya et Hochberg 1999; Furuya, Hochberg et al. 2001; Furuya 2002; Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya et Tsuneki 2003; Furuya, Hochberg et al. 2004; Furuya, Ota et al. 2004; Furuya 2006; Furuya 2008; Furuya 2009; Castellanos-Martinez, Gomez et al. 2011).

#### 3.4.2. Classification

Les dicyémides se classent essentiellement en deux grandes familles (van Beneden, 1882, Nouvel, 1947) :

- **la famille des Dicyemidés (Dicyemida, van Benden, 1982)** : cette famille est constituée de parasites vermiformes sédentaires ayant un aspect corporel allongé présentant un renflement céphalique antérieur qui est la calotte polaire. Leurs cellules périphériques sont bien développées, distinctes les unes des autres, ciliées, entourent la/les cellule(s) axiale(s) et leur nombre est supérieur ou égal à 16 cellules. Cette famille comprend 5 genres :
- Le genre *Dicyema* Kölliker 1879, Whittman 1883 :  
Ce genre comprend des formes de calottes en octamère, appelé également initialement Octodicyémides. Leurs propolaires et métapolaires sont opposées.
  - Le genre *Dicyemenea* Whittman 1883 :  
La calotte polaire des stades vermiformes de ce genre présentent 4 cellules propolaires et 5 métapolaires.
  - Le genre *Dicyemodeca* Wheeler, 1897:  
La calotte polaire des stades vermiformes est formée de 4 cellules propolaires et 6 métapolaires. Nouvel (1947) considère ce genre douteux car l'auteur ne donne pas de précision sur l'hôte et se base uniquement sur le nombre de cellules polaires des stades vermiformes, mais il a été validé par des descriptions, dessins et images des adultes et des larves de *Dicyemodeca anthinocephalum* Wheeler, 1897 dans les travaux de Furuya (1999).
  - Le genre *Pseudicyema* Nouvel (1933):  
La calotte polaire des stades vermiformes est formée de 4 cellules propolaires et 4 métapolaires mais diffère du genre *Dicyema* par la position des deux types de cellules polaires les unes par rapport aux autres. Les vermiformes du genre *Pseudicyema* ont les cellules propolaires et métapolaires alternes.
  - Le genre *Dodecadicyema* Kalavati et Narasimhamurti, 1980 :  
La calotte polaire des dicyémides de ce genre se distingue par la présence des parapolaires dans le renflement céphalique. La cellule axiale s'arrête avant les parapolaires et n'atteint pas les métapolaires. Le nombre total des cellules polaires varie entre 11 et 12 cellules (12 : 3 propolaires + 4 métapolaires + 5 parapolaires ; 11 : 2 propolaires + 4 métapolaires + 5 parapolaires).

➤ **la famille des Hétérocyémidés (Heterocyemidae, van Beneden, 1982) :**

Les représentants de cette famille ont généralement des vermiformes sédentaires de petite taille et ayant une forme indéfinie. Ils sont le résultat d'une formation précoce même si leurs cellules ont pu achever leurs formations et ont un aspect bien individualisé (Delage et Hérouard 1899). Ces cellules peuvent être couvertes de cils à l'état larvaire et leur nombre est faible. Cependant, au cours de leur croissance, elles perdent leurs cils et fusionnent leurs cytoplasmes en un plasmode (Nouvel, 1947). Cette famille comporte deux genres représentés chacun par une espèce.

- Le genre *Conocyema* (van Beneden, 1882):

Ce genre se distingue par la transformation des 4 cellules polaires en cellules ventruées, amiboïdes, de grande taille et portant des corpuscules réfringents. van Beneden les a appelées « verrues terminales ». L'espèce présentant ce genre est *Conocyema polymorpha* (van Beneden, 1982).

- Le genre *Microcyema* (van Beneden, 1882):

Ce genre se caractérise par l'absence de forme définissable chez les individus des phases vermiformes. Les 10 cellules périphériques forment également un plasmode abritant une cellule axiale étalée en lame mince en forme d'amibe. Leurs embryons peuvent être ciliés en forme de bilboquet dits embryons de Wegener, ou peuvent être plus globuleux. Ce genre est présenté par *Microcyema vespa* Lemeere, 1916.

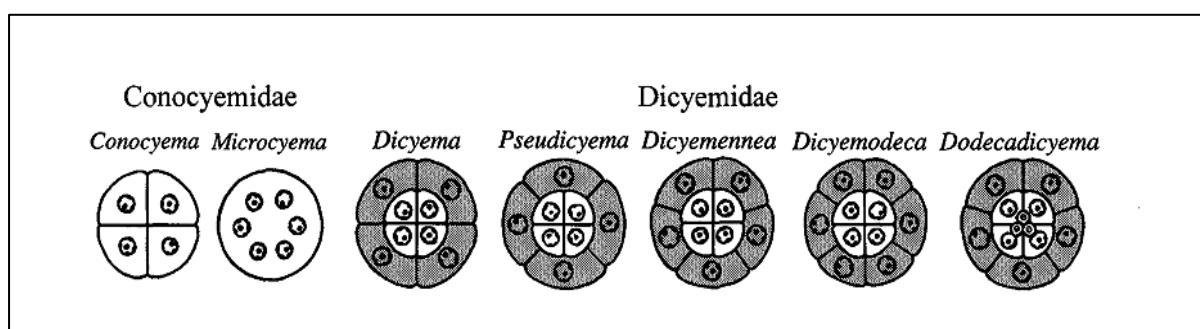


Figure 19. Diagramme des calottes polaires définissant les différents genres de dicyémides d'après (Furuya 2006).

Quant à la systématique à l'échelle de l'espèce, les critères pris en considération sont :

- La forme générale de la calotte polaire : il existe globalement 4 types de formes de calottes polaires (conique, plate, en forme de disque et de forme irrégulière) (Furuya, Hochberg et al. 2003) (Fig. 19).

- La position de l'axe de la calotte par rapport à l'axe du corps : calotte plagiotope (calotte prolongeant le corps sur le même axe) ou orthotope (calotte forme un angle par rapport à l'axe du corps) (Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya, Ota et al. 2004).
- Forme et taille relative des cellules polaires.
- Position des cellules parapolaires : appartiennent-elles aux cellules de la calotte polaire et donc au renflement céphalique ou bien se trouvent-elles plutôt dans l'axe du corps ?
- Nombre et disposition des cellules diapolaires.
- Présence ou non et nombre des cellules verruciformes.
- Nombre total des cellules périphériques.
- Taille totale du corps.
- Organisation cellulaire des stades infusoriformes : il s'agit d'un critère d'identification spécifique indubitable selon Nouvel (1947).
- Organisation cellulaire des embryons vermiformes (Furuya, Hochberg et al. 2001).
- Et à moindre importance, la spécificité d'hôte.

### **3.5. Diversité morphologique des Dicyémides : limites et robustesse des critères d'identification morphologiques.**

La systématique des dicyémides basée uniquement sur les critères morphologiques est de plus en plus remise en question. Catalano, Whittington et al. (2015) estiment que la description de 20% des taxons est douteuse et porte à confusion. Les dicyémides correspondent aux cas d'espèces cryptiques et présentent un grand polymorphisme. De plus, un grand nombre d'espèces de dicyémides sont décrites partiellement, sans spécimens types déposés dans des collections accessibles. Nous ignorons les stades de développement larvaire pour un grand nombre d'espèces alors que dans plusieurs cas, les divergences interspécifiques ne sont observées qu'à l'état larvaire (Nouvel 1947; Furuya, Hochberg et al. 2004).

### **3.6. Position phylogénétique des Dicyémides : controverses.**

La position phylogénétique des dicyémides est sujette à controverse et reste non résolue jusqu'à ce jour à cause de l'organisation du corps chez ces parasites, caractérisée par l'absence totale de caractères synapomorphes. Plusieurs hypothèses ont été émises et vérifiées par différentes méthodologies.

Les premières études qui se sont intéressées aux céphalopodes ont considéré que les dicyémides seraient des parasites primitifs Mésozoaires. Ils présentent à la fois des caractères morphologiques semblables aux protozoaires et aux métazoaires (Van Beneden 1876; Delage et Hérouard 1899; Benham 1901; Garbowski 1903; Neresheimer 1908; Mendes 1940; McConnaughey 1960; McConnaughey 1963; Ivanov 1983; Czaker 2000). Le terme mésozoaire fait référence à leur degré intermédiaire d'organisation.

Par ailleurs, d'autres auteurs suggèrent que les dicyémides seraient des protozoaires évolués, ils seraient les premiers protistes multicellulaires, tout en gardant la classification des dicyémides parmi les mésozoaires (Cavalier-Smith 1993). Les dicyémides présentent en effet une symétrie bilatérale mais sont dépourvus de tissus, cavités, organes différenciés, système nerveux, systèmes gastro-intestinaux, suggérant un lien évolutif avec les protozoaires (Hyman 1959; Lapan et Morowitz 1972; Czaker 2000).

D'autres auteurs suggèrent que les dicyémides seraient des métazoaires qui auraient subi une dégénérescence secondaire. Les sacs rénaux de céphalopodes étant un milieu d'habitat très particulier, les parasites doivent simplifier leur organisation afin de s'adapter au mode de vie parasitaire (Nouvel 1947; McConnaughey 1951; Stunkard 1954). Les premiers arbres phylogénétiques construits à partir des séquences du marqueur ribosomal ARNr 5S suggèrent que les dicyémides auraient subi une divergence précoce des Eumetazoaires (Ohama, Kumazaki et al. 1984; Hori et Osawa 1987).

Noto et Endoh (2004) ont réalisé des analyses phylogénétiques de séquences d'acides aminés de la  $\beta$  tubuline. Ils suggèrent que les dicyémides seraient des chimères exposées à un flux continu d'information génétique en se nourrissant des tissus de l'hôte par endocytose. Ainsi, les propres gènes des dicyémides auraient été remplacés par des gènes dérivés de l'hôte par transfert latéral de gènes. Ce transfert serait alors la force motrice qui dirigerait l'évolution des dicyémides. Les auteurs ne rejettent pas du tout l'éventualité que les dicyémides soient des parasites primitifs Mésozoaires ou des protozoaires évolués et gardent la classification des dicyémides en sein des mésozoaires.

Ce positionnement des dicyémides est remis en cause par les analyses phylogénétiques du gène de l'ARNr 18S qui classe les dicyémides parmi les triploblastiques suggérant que les membranes germinales embryonnaires auraient été perdues au cours de l'évolution de ces parasites. McConnaughey et. (1951); Stunkard (1954); (1972; 1982); Katayama, Wada et al. (1995); Pawlowski, Montoya-Burgos et al. (1996) ont suggéré que les dicyémides seraient un

groupe frère des platyhelminthes, les dicyémides seraient des platyhelminthes dégénérés. Une autre étude du gène ADNr 18S a également suggéré que ces parasites seraient proches des myxozoaires, nématodes et des vers plats (platyhelminthes) (Katayama, Wada et al. 1995).

Actuellement, deux théories sur l'origine des dicyémides sont retenues:

- **Première théorie : les dicyémides seraient des organismes évolués (des Lophotrochozoaires).**

Des études du gène homéotique « Hox-like » *otx* et du gène du facteur de transcription *brachyury* ont classé les dicyémides parmi les représentants du super-phylum des Lophotrochozoaires (Kobayashi, Furuya et al. 1999). Cependant, Czaker a étudié l'ultrastructure de la gonade male et la spermiogenèse chez *Dicyema typus* et en a conclu qu'il n'existerait aucune synapomorphie entre les dicyémides et les autres membres des Lophotrochozoaires ou les métazoaires « inférieurs » (Czaker 2011).

- **Deuxième théorie : les dicyémides seraient des métazoaires bilatériens.**

Des études moléculaires se basant sur l'analyse moléculaire, la présence et l'expression des gènes *Pax6*, *Zic* (Aruga, Odaka et al. 2007), *Hox*, *otx* et *brachyury* (Kobayashi, Furuya et al. 2009), ou la séquence en acides aminés de l'innexine (Suzuki, Ogino et al. 2010), ont proposé que les dicyémides seraient des métazoaires bilatériens à organisation simple proche des Lophotrochozoaires évolués.

Cette théorie a été aussi remise en question vu que ces études ne prenaient pas en compte plusieurs taxons de dicyémides et n'examinaient pas les relations interspécifiques au sein des dicyémides, mis à part l'approche morphologique classique (Catalano, Whittington et al. 2014; Catalano, Whittington et al. 2015).

Pour résumer, les travaux moléculaires n'ont pas pu donner une réponse commune et unique sur l'origine et la phylogénie des dicyémides mais ont plutôt apporté de nouvelles théories accentuant les controverses à ce sujet. Cependant, actuellement, la théorie retenue sur la position phylogénétique des dicyémides semble être que ces parasites seraient des métazoaires triploblastiques qui auraient perdu leurs membranes germinales embryonnaires. Ainsi, la position phylogénétique précise des dicyémides reste à déterminer.

### **3.7. Limites des connaissances sur les Dicyémides et problématiques.**

Les Dicyémides ont une large distribution géographique : la mer d'Okhotsk, la mer du Japon, la partie Nord-Est et Est de l'Océan Pacifique, la Nouvelle-Zélande, la partie Nord de l'Océan

Indien, la Méditerranée Nord-Est, la partie Est de l'Océan Atlantique, le golfe du Mexique, l'Océan Antarctique, et la mer des Tchoukches de l'Océan Arctique (Furuya 2010).

Sur les côtes tunisiennes, la composition de la parasitofaune de dicyémides reste inconnue et très peu d'études ont porté sur les dicyémides des côtes nord-ouest françaises. Nous n'avons aucune idée ni sur la prévalence ni sur la richesse spécifique des dicyémides dans ces zones. Ainsi, à l'heure actuelle uniquement 18 espèces ont été signalées au Nord-Est de l'Océan Atlantique, en Méditerranée et en Manche (Nouvel 1947; Hochberg 1990; Furuya et Hochberg 1999), et la plupart de ces parasites nécessite une description détaillée de leur composition cellulaire et de la morphologie de leurs embryons. En effet, depuis les travaux sur la diversité morphologique de Nouvel (1947) :

- aucune étude n'a évalué la prévalence et la diversité spécifique des dicyémides sur les côtes atlantiques et méditerranéennes ;
- aucune nouvelle espèce n'a été décrite depuis les travaux de Nouvel pour ces régions ;
- les descriptions morphologiques des espèces signalées sont restées parcellaires et nous ignorons les stades de développement larvaires pour la plupart d'entre elles. Ces descriptions sont essentielles pour la taxonomie des dicyémides vu qu'une identification solide ne peut être soutenue que par une description morphologique complète de tous les stades de développement surtout les embryons infusoriformes (Furuya, 2004).
- aucune analyse de la diversité génétique n'a été réalisée alors que l'identification des espèces basée sur l'ancienne littérature porte à confusion surtout pour un observateur inexpérimenté (Hochberg, 1990).

Ainsi, l'identification des espèces au sein de ce groupe reste ambiguë et jusqu'à maintenant, aucune étude n'a exploré la diversité d'hôtes céphalopodes afin d'évaluer la diversité spécifique des dicyémides.

## **Problématique de la thèse et objectifs scientifiques.**

Prenant en compte le fait que la définition des espèces, leur biodiversité et leurs relations phylogénétiques aux autres organismes vivants sont actuellement très mal documentées, à la fois pour les Chromidinés et les Dicyémides, deux parasites des sacs rénaux des céphalopodes, nous avons proposé de mener une étude intégrée : (1) sur ces deux types d'organismes, (2) dans deux environnements peu ou pas inventoriés pour leur occurrence, et (3) à l'aide de deux méthodes d'investigation complémentaires : la morphologie et les études moléculaires.

**Ainsi, au cours de ce travail de thèse nous nous sommes proposés de :**

- examiner les espèces de céphalopodes communes dans la pêcherie de notre zone d'étude (Atlantique et Méditerranée) et prélever le maximum de parasites à tous les stades de développement présents.
- évaluer la biodiversité et la prévalence des dicyémides des côtes atlantiques françaises et des côtes tunisiennes ainsi que des chromidinés.
- effectuer des études morphologiques afin de déterminer la diversité morpho-spécifique des dicyémides et des chromidinés, en nous appuyant sur les travaux de la littérature.
- réaliser des analyses du marqueur moléculaire de l'ADNr 18S afin de pouvoir évaluer la diversité génétique de ces parasites.
- déterminer leurs spécificités d'hôtes.
- établir des corrélations entre les diversités morphologiques et les données moléculaires.
- revoir toute la littérature concernant les données moléculaires sur ces parasites (disponibles seulement pour les Dicyémides) et étudier si ces données, associées à celles obtenues au cours de cette étude, permettent de préciser la position phylogénétique de ces parasites.





## **Chapitre 4 : Méthodologies.**

### **4.1. Échantillonnage des hôtes.**

#### **4.1.1. Sites d'échantillonnage et leurs caractéristiques.**

Les sites d'échantillonnage ont été sélectionnés à la fois pour leur intérêt faunistique et pour leur localisation pratique, à proximité de laboratoires permettant une analyse rapide du matériel biologique qui optimise la qualité de collecte des parasites.

#### **Port de pêche de La Goulette.**

Nous avons utilisé dans cette étude des céphalopodes provenant de la pêche côtière du Golfe de Tunis, débarqués au port de La Goulette en janvier 2013 et 2014. Le choix de ce site d'échantillonnage est lié en partie à sa proximité du laboratoire de recherche (Unité de recherche « Ecosystèmes Et Ressources Aquatiques », Tunisie), facilitant l'examen rapide des céphalopodes frais et donc l'observation puis la collecte de parasites vivants, mais aussi à l'importance de ce site en Méditerranée. En effet, le détroit Silico-Tunisien, qui sépare la Méditerranée en deux bassins (oriental et occidental), constitue un site ayant une biodiversité importante, endémique de la Méditerranée et représentative des deux bassins surtout pour les espèces démersales, sans oublier le large flux d'espèces exotiques atlantiques et indo-pacifiques qui passent par ce site.

Située à une dizaine de kilomètres au nord-est de Tunis, la ville de la Goulette abrite, en plus du port commercial et surtout de voyageurs, un port de pêche où se pratiquent les activités de pêche côtière hauturière. Le port de La Goulette est situé à 36° 49'9.11''N, 10° 18'22.49''W sur la côte nord-est du golfe de Tunis. Dans cette zone, les valeurs mensuelles des températures des eaux de surface varient entre 14°C et 30°C.

#### **Port de pêche de Concarneau.**

L'étude des céphalopodes des côtes nord-est de l'Atlantique a porté sur les céphalopodes communs dans les pêcheries du port de pêche de Concarneau. Le choix de ce site est dû à plusieurs raisons :

-Sa situation géographique : le port de Concarneau est situé sur la côte méridionale du Finistère (47° 82'50''N, 3° 94'50''W). Son plan d'eau de 10 ha occupe le fond d'une rade naturelle prolongée par le Moros qui est une petite rivière. Quoique n'étant pas éloigné de la Manche où quelques études ont prospecté les céphalopodes pour la présence de dicyémides, ce port

situé sur le littoral nord-ouest français au niveau de la Baie de la Forêt présente une bonne richesse biologique en ressources halieutiques et plus précisément en céphalopodes. De plus, étant au 3ème rang des ports de pêche français par le tonnage et la valeur des captures débarquées et ayant une flottille composée de plus d'une centaine de navires, le port de pêche de Concarneau offre une source d'approvisionnement régulier en céphalopodes frais pour toutes nos missions d'échantillonnage.

-Sa proximité du laboratoire de la Station de Biologie marine de Concarneau (MNHN), qui offre une infrastructure et du matériel pour préparer tous les échantillons nécessaires à notre étude, et permet de travailler rapidement sur les céphalopodes fraîchement pêchés, optimisant la collecte de parasites encore vivants.

#### 4.1.2. Méthodes de pêche.

Tous les échantillons récoltés au cours des campagnes d'échantillonnage proviennent de la pêche côtière. L'avantage de ce mode de pêche est que les embarcations utilisées ne s'aventurent pas très loin de la côte et assurent une capture d'individus parmi la teuthofaune de chaque site d'échantillonnage.

Les campagnes d'échantillonnage à Concarneau (2011, 2012, 2013) ont porté sur des céphalopodes provenant de chalutiers, embarcations qui utilisent le chalut benthique qui racle le fond pour récupérer la faune benthique ou démersale. Ce qui explique qu'au cours de deux premières campagnes sur les côtes françaises, nous avons récolté principalement les céphalopodes benthiques : *Eledone cirrhosa* et *Sepia officinalis*, et peu de seiches *Sepia orbignyana*. La pêche au chalut permet de capturer certains céphalopodes necto-pélagiques au moment de leur rapprochement du fond marin à la recherche de nourriture. Durant la dernière campagne à Concarneau (2013), les pêcheurs ont utilisé en outre des filets qui ciblent davantage la faune pélagique. Dans le port de pêche de Concarneau, deux types de filets sont utilisés :

- le filet maillant droit qui est formé d'une unique nappe de mailles ciblant principalement les espèces pélagiques ou démersales ;
- le filet emmêlant trémail qui est formé de trois nappes dont les deux extérieures présentent de larges mailles. Cependant, les mailles de la nappe intérieure (la flue) ont des tailles inférieures afin de piéger l'espèce cible par emmêlement. Le trémail est une technique de pêche qui cible des espèces benthiques et démersales.

Au cours des campagnes d'échantillonnage sur le site de La Goulette (2013, 2014) la pêche des céphalopodes a été faite principalement à l'aide de gargoulettes. Les gargoulettes ou karour sont destinées à la pêche aux céphalopodes ; ce sont des pots en terre cuite, de deux volumes différents (2,5 et 5 Litres). Ces gargoulettes sont disposées en chapelet sur les fonds marins sur une profondeur de 2 à 5 mètres. Les gargoulettes sont examinées quotidiennement grâce à un crochet (laskoum). Ce mode de pêche considéré comme traditionnel est en train de prendre de l'envergure mais risque de devenir néfaste car les unités par pêcheur se comptent actuellement par milliers au port de pêche de La Goulette (Romdhane 1998).

Le tableau 2 récapitule les lieux des campagnes d'échantillonnage, le type d'embarcation utilisé ainsi que les méthodes de pêche, et les espèces qui ont été récoltées.

Campagne d'échantillonnage	Type d'embarcation	Méthode de pêche	Espèces de céphalopodes
Concarneau 2011	Chalutier	Chalut benthique	Eledone cirrhosa Sepia officinalis Sepia orbignyana
Concarneau 2012	Chalutier	Chalut benthique	Eledone cirrhosa Sepia officinalis Sepia orbignyana
Concarneau 2013	Chalutier artisanal	Chalut, filet	Eledone cirrhosa Sepia officinalis Sepia orbignyana Loligo vulgaris
La Goulette 2013	Petites barques pour la pêche artisanale	Filet trémail, chalut et gargoulette	Eledone cirrhosa Sepia officinalis Loligo vulgaris Octopus vulgaris Eledone moschata
La Goulette 2014	Petites barques pour la pêche artisanale	Filet trémail, chalut et gargoulette	Eledone cirrhosa Sepia officinalis Loligo vulgaris Octopus vulgaris Eledone moschata

Tableau 2. Bilan des méthodes de pêche et des espèces récoltées au cours des différentes campagnes.

#### 4.1.3. Hôtes examinés et prélèvements biologiques.

Au cours de notre étude, nous avons pu examiner des espèces communes aux deux sites d'échantillonnage qui sont *Eledone cirrhosa*, *Sepia officinalis* et *Loligo vulgaris*. Cependant, il y a des espèces qui sont spécifiques à un site et pas à l'autre car elles y sont accidentelles ou peu fréquentes. Les espèces de céphalopodes *Octopus vulgaris* et *Eledone moschata* sont présentes uniquement dans les pêcheries tunisiennes alors que *Sepia orbignyana* a été pêchée uniquement à Concarneau.

Les campagnes d'échantillonnage représentent un grand travail de terrain qui consiste à aller chaque jour à la criée et sélectionner les hôtes qui nous intéressent. Nous avons essayé de cibler les céphalopodes communs dans les pêcheries en provenance de la pêche côtière, vu que la pêche hauturière est également pratiquée dans le port de Concarneau par exemple.

Une fois rapatriés au laboratoire, nous examinons minutieusement nos spécimens hôtes afin de consigner les critères d'identifications morphologiques. Nous nous sommes basés sur les critères cités dans les clés d'identification (Jereb et Roper 2005; Jereb et Roper 2011) et la description des espèces sur « Marine Species Identification portal <http://species-identification.org> ».

Chaque spécimen est pesé à l'aide d'une balance de précision. La taille de son manteau est mesurée. Ceci est simple pour les céphalopodes décapodes car le manteau présente un aspect individualisé avec une limite détachée du reste du corps. Cependant, pour les poulpes la limite du manteau s'arrête au niveau de l'œil.

Pour chaque hôte, nous avons prélevé un petit morceau du corps qui a été conservé dans de l'éthanol (70%). Nous avons également prélevé et conservé dans de l'éthanol (70%) : le bec, s'il s'agit d'un octopode et l'os, s'il s'agit d'une seiche.

Puis, une dissection du corps a été réalisée en effectuant une section longitudinale du manteau afin de mettre en évidence les organes intérieurs et plus précisément, les sacs rénaux.

#### **4.2. Prélèvement des parasites.**

L'ensemble des organes internes des céphalopodes sont enveloppés par une couche mince d'épithélium. Afin de ne passer à côté d'aucun parasite, nous repérons la position des sacs rénaux, et nous insérons la pointe d'une pipete pasteur afin d'aspirer doucement le maximum d'urine possible sans causer une pression qui détacherait les parasites de leur sac rénal. L'urine récupérée est déposée dans une boîte de pétri et examinée pour la présence des espèces de

parasites qui baignent dans ce liquide.

Par la suite, les sacs rénaux de céphalopodes disséqués sont coupés en plusieurs petits bouts d'un cm de longueur maximale. Un bout des reins portant les parasites est transféré dans une boîte de pétri avec de l'eau distillée. Il est nécessaire d'éviter l'eau de mer qui a une action délétère sur les parasites. En effet, en contact avec l'eau de mer, le corps de ces parasites gonfle et se désagrège rapidement (Foettinger 1881).

La petite partie du rein disséqué destinée à l'étude moléculaire est alors secouée un peu dans l'eau afin de libérer les parasites attachés par leurs calottes polaire à l'épithélium rénal. A l'aide d'une pipette nous prélevons les parasites et on les transfère dans une deuxième boîte de pétri afin de faire un deuxième nettoyage. Cette dernière boîte contient de l'eau distillée stérilisée par autoclave. Cette étape permet d'éliminer les tissus de l'hôte qui restent potentiellement attachés à la membrane du parasite.

#### 4.2.1. Préparation des parasites pour les études morphologiques.

- Méthodes de prélèvement et de fixation :



Figure 20. Préparation des parasites pour les études morphologiques.

Nous découpons de petits morceaux de sacs rénaux ayant 1 cm de diamètre. Ces échantillons sont alors frottés contre une lame dans un sens unidirectionnel (Fig. 20). Les frottis sont immédiatement fixés dans le liquide de Bouin pendant 24 heures puis stockés dans de l'éthanol (70%) ; ils seront colorés ultérieurement, une fois la mission d'échantillonnage achevée. Dans

l'organisation du travail, la priorité est accordée à la dissection immédiate du plus grand nombre possible de spécimens de céphalopodes et la préparation en parallèle du maximum d'échantillons pour des études à la fois moléculaires et morphologiques. Ces études elles même sont hiérarchisées en réalisant d'abord les observations morphologiques et ensuite les extractions pour analyses moléculaires.

- Coloration des lames :

Les lames de frottis de parasites, rapatriés à l'issue des campagnes, sont colorées à l'hématoxyline d'Ehrlich et contre colorées à l'éosine. Elles sont ensuite surmontées d'une lamelle fixée à l'aide du Baume de Canada (Furuya, 1999).

Les parasites dicyémides et chromidinés sont observés à l'aide d'un microscope optique ce qui permet des agrandissements jusqu'à 2000x. Les mesures des tailles des parasites observés sont faites à l'aide d'un micromètre oculaire. Des clichés sont pris ainsi que des films, et des dessins sont réalisés.

L'identification morphologique des morpho-espèces a été faite par référence aux descriptions réalisées dans la littérature selon (Nouvel 1947; Short et Damian 1966; Furuya, Tsuneki et al. 1992; Furuya 1999; Furuya et Hochberg 1999).

4.2.2. Préparation des parasites pour les études moléculaires.

-Méthodes de prélèvement, fixation et conservation :

Nous transférons un bout de sacs rénaux dans une boîte de pétri contenant de l'eau distillée et nous réalisons des observations au stéréomicroscope. Généralement, vingt à cinquante parasites sont transférés dans une nouvelle boîte de pétri, dans le but d'éliminer au maximum les débris de tissu de l'hôte, afin de limiter la contamination des échantillons par des cellules de l'hôte et éviter ensuite la présence de matériel génétique provenant de l'hôte dans les extraits d'ADN.

Un premier tri des parasites est effectué selon leur aspect morphologique, qui sont séparés et regroupés avant d'être stockés dans de l'éthanol, dans des eppendorfs. Ainsi, pour un même hôte disséqué, plusieurs échantillons de parasites ont été préparés en fonction de leur diversité morphologique. Ceci permet d'optimiser les résultats obtenus pour un hôte donné.

### **4.3. Etudes moléculaires.**

#### **4.3.1. Extractions d'ADN.**

##### **-Extraction de l'ADN par la méthode du Chelex™.**

Nous avons procédé à une extraction d'ADN total de la plupart des échantillons de parasites par la méthode dite au Chelex™ optimisée au laboratoire (Dellinger, Labat et al. 2014). Le Chelex™ est une résine commercialisée par la société Biorad, qui a des propriétés chélatantes et qui a pour rôle de préserver l'ADN et de fixer les inhibiteurs de la PCR. Par exemple, les ions magnésiums, qui sont des cofacteurs essentiels au fonctionnement des DNAases possiblement libérées dans le milieu durant la manipulation des parasites (suite à la lyse de leurs cellules), pourront être chélatés par le Chelex™, inactivant ainsi ces DNAases. Pour être utilisé, le Chelex™ est resuspendu stérilement dans 10 mM Tris pH 8,0 à la concentration de 10%, et ce mélange est aliquoté en tubes eppendorfs de 1,5 ml.

Pour effectuer une préparation d'ADN, on part d'un tube eppendorf contenant les parasites conservés dans l'éthanol à 70%, et on réalise alors les étapes suivantes :

- deux lavages des parasites dans 10 mM Tris pH 8,0. Chaque tube est centrifugé rapidement et à basse vitesse (<1 min, <1000g) ; le surnageant est ôté et remplacé par 100 µl de 10 mM Tris pH 8,0 (2 fois) et en fin de procédure, on laisse un volume de tampon <10µl sur le culot de parasites ;
- on ajoute ensuite 111 µl d'un mélange contenant du Chelex™ 10% en Tris 10 mM pH 8,0, 10 µl Triton X100 et 1µl de Protéinase K dont la concentration finale est 50 µg/ml ;
- les tubes sont alors incubés 30 minutes à 65°C puis bouillis 5 minutes, pour inactiver la protéinase K ;
- le surnageant, qui contient l'ADN des parasites est alors prélevé, sans les billes de Chelex™, et soigneusement stocké dans un eppendorf stérile.

Cette méthode de préparation des acides nucléiques dite au Chelex™ permet d'obtenir l'ADN génomique et mitochondrial mais n'élimine pas les parois cellulaires et autres débris ; en pratique, elle n'est utilisée qu'en vue d'une amplification des acides nucléiques par PCR.

##### **- Extraction d'ADN par la méthode phénol/chloroforme.**

La méthode utilisée s'appuie sur un protocole mis au point au laboratoire pour isoler l'ADN génomique de *Plasmodium falciparum* (Florent, Mouray et al. 2000). Le culot de parasites lavé comme à l'étape 1 ci-dessus est repris dans <10 µl de tampon 10 mM Tris pH 8,0. Puis :



- on lui ajoute 90µl de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA, 0,5% SDS, RNase A à 20 µg/ml final) ; on homogénéise par aspiration-refoulement ; on incube 1 heure à 37°C ;
- on ajoute à nouveau de la RNase A pour obtenir une concentration finale de 40µg/ml et on incube à nouveau 30 minutes à 37°C ;
- on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 100 µg/ml et on incube 2h30 min à 50°C ;
- on ajoute un volume de phénol neutralisé avec du Tris 500 mM pH 8,0 et on vortexe ;
- on centrifuge 5 minutes à 15000 g ;
- on récupère le surnageant dans un nouveau tube eppendorf ; le phénol permet l'élimination des protéines et des lipides membranaires par solubilisation de ceux-ci et l'ADN se maintient dans la phase aqueuse (supérieure) ;
- on réalise une seconde extraction phénolique de ce surnageant puis une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24/1) dans les conditions ci-dessus ; on récupère le dernier surnageant dans un nouvel eppendorf ;
- on précipite alors l'ADN présent dans ce surnageant en ajoutant 0,5 volumes d'acétate d'ammonium 10 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu ; le tube est placé à -20°C pour au moins 10 minutes. L'ADN peut être conservé sous cette forme ;
- lorsque on a besoin d'amplifier cet ADN, il faut au préalable le laver, deux fois, dans de l'éthanol à 80% pour éliminer les sels. Le tube est centrifugé 10 minutes à 15000g à 4°C, le surnageant vidé est remplacé par un large volume (centaines de µl) d'éthanol 80%. Après le dernier lavage, l'éthanol est entièrement éliminé à l'aide d'une pipette pasteur effilée et le culot d'ADN mis à sécher (1-2 heures) avant resuspension du culot dans un petit volume (10-20 µl) d'eau bi distillée stérile.

Cette méthode de préparation de l'ADN total des parasites est plus laborieuse et chronophage que la méthode au Chelex™ mais permet d'obtenir du matériel nucléique de meilleure qualité. Notre expérience au laboratoire a montré que cette méthode de préparation est importante pour le succès des amplifications PCR qui sont réalisées avec des amorces dégénérées.

#### 4.3.2. Amplifications d'ADN.

##### - Construction des amorces ciblant les gènes des Dicyémides.

La plupart des amorces utilisées au cours de cette étude ont été conçues et optimisées au

laboratoire ou sont issues de la littérature, et ciblent les marqueurs ADNr18S et Cox1 des parasites. La conception des amorces et le calcul de leurs températures de dissociations ont été réalisés en utilisant le logiciel AmplifX (version 1.5.4) (Jullien 2013).

Le logiciel en ligne Oligo Calc a été utilisé afin de vérifier l'absence d'hybridation des amorces en boucle d'épingle et pour calculer les températures de dissociation des amorces (liste des amorces dans le tableau 3).

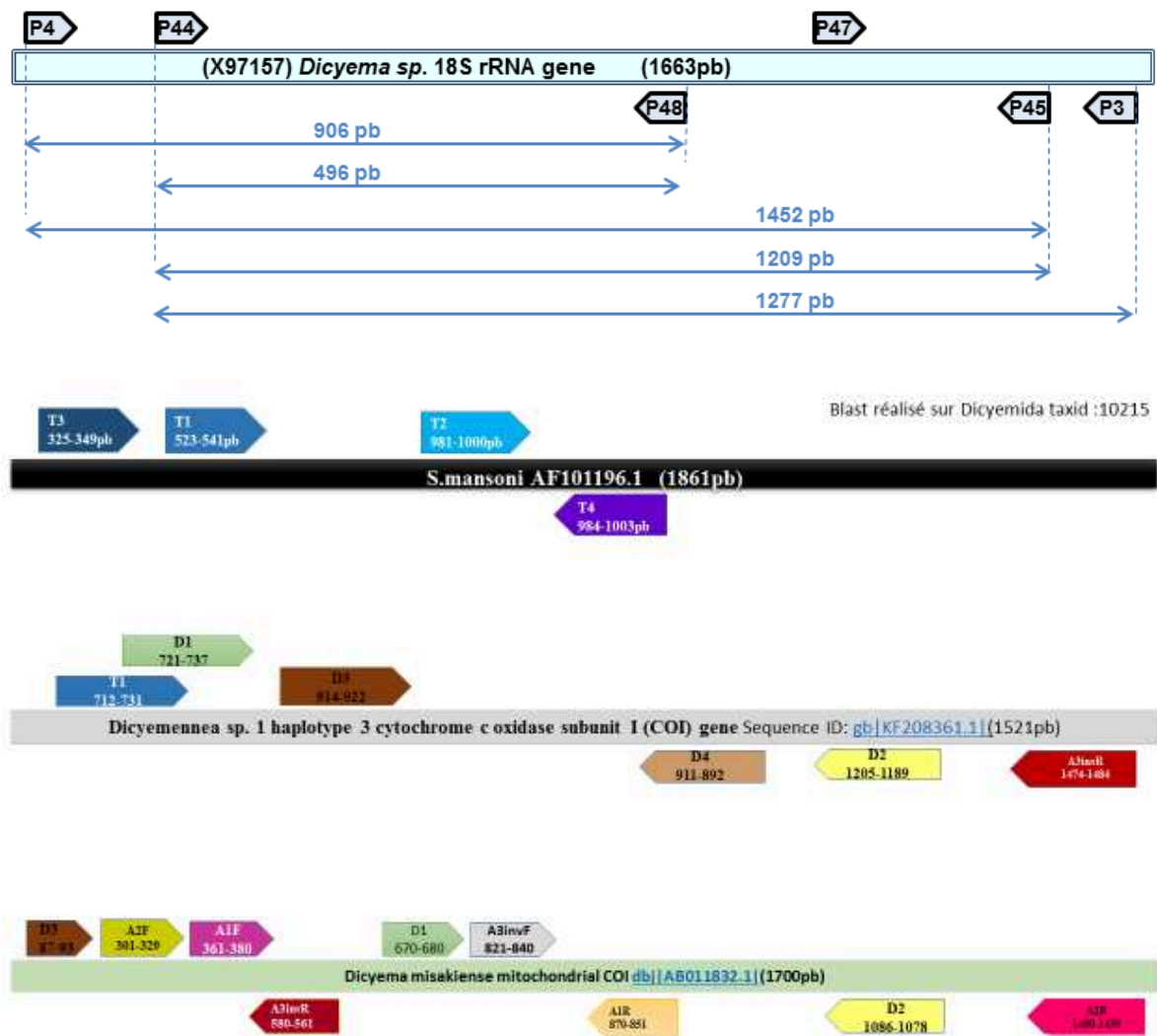
Nom de l'amorce	Séquences	Direction	Référence	Gène	Parasite cible
MDP2	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Réverse	Conçu au laboratoire par Dr. Marc Dellinger	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides
MDP3	GACGGGCGGTGTGTAC	Réverse	Lara, Berney et al. (2007); Sina M. Adl (2014)	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides
MDP4	CTGGTGATCCTGCCAG	Sens	Lara, Berney et al. (2007); Sina M. Adl (2014)	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides
MDP44	AATTAGATGTCCGCCCA	Réverse	Conçu au laboratoire par Dr. Marc Dellinger	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides
MD P45	CCTTGTGCACGAGGAATA	Réverse	Conçu au laboratoire par Dr. Marc Dellinger	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides
MDP47	ACCCGGGCCGAACACAGT	Sens	Conçu au laboratoire par Dr. Marc Dellinger	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides
MDP48	CTACGACGAGATCTAATCGAC	Réverse	Conçu au laboratoire par Dr. Marc Dellinger	<i>ADNr 18S</i>	dicyémides

D1	GTTTTTGGACATCCTGAGGT	Sens	Catalano, Whittington et al. (2015)	Cox1	dicyémides
D2	AGGACATAGTGGAAAGTGTGCT ACAAC	Réverse	Catalano, Whittington et al. (2015)	Cox1	dicyémides
D3	GCCTTATTTTAGTACAGTGTGC	Sens	Catalano, Whittington et al. (2015)	Cox1	dicyémides
D4	CGAGTATCAATATCTATACCAG ATG	Réverse	Catalano, Whittington et al. (2015)	Cox1	dicyémides
T1→COI5B	TGRTTYTTYGGNCAYCCTGA	Sens	Telford, Herniou et al. (2000)	Cox1	dicyémides
T2→LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATA TT	Sens	Telford, Herniou et al. (2000)	Cox1	dicyémides
T3→COI3A	TCAGGRTGNCCRAARAAYCA	Sens	Telford, Herniou et al. (2000)	Cox1	dicyémides
T4→TGR+COI 5B+TGA	TGR TGRTTYTTYGGNCAYCCTGATG A	Réverse	Telford, Herniou et al. (2000)	Cox1	dicyémides
LCOI490- COIEUC	GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG	Sens	Folmer, Black et al. (1994)	Cox1	dicyémides
HCO2198- COIEUC	TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA	Réverse	Folmer, Black et al. (1994)	Cox1	dicyémides
A1F	CCTTTGTCCTCTTTATCCCC	Sens	Awata, Noto et al. (2005)	Cox1	dicyémides
A1R	AGCCGTGAAATACGAACGAG	Réverse	Awata, Noto et al. (2005)	Cox1	dicyémides
A2F	CCTTTTCTTTATCCTTGCTATT GTTTT	Sens	Awata, Noto et al. (2005)	Cox1	dicyémides
A2R	TCTTTTCATAAATGAAATGCG CACAGT	Réverse	Awata, Noto et al. (2005)	Cox1	dicyémides

A3-invF	ATATGTACTACTGCGGGTCTG	Sens	Awata, Noto et al. (2005)	Cox1	dicyémides
A3-invR	AGATTAGCGTGATGCCGACA	Réverse	Awata, Noto et al. (2005)	Cox1	dicyémides
MA1-F	AAYCATRTTGAYGTDGCVAT	Sens	Présent travail	Cox1	dicyémides
MA1-R	GMCGRGGYATMGCAGARTA	Réverse	Présent travail	Cox1	dicyémides
NEA1-F	TGTTTCGTCTWCARYTAAG	Sens	Présent travail	Cox1	dicyémides
NEA1-R	CCYTGATAATGCTGTAATGC	Réverse	Présent travail	Cox1	dicyémides
F388dT	TGTA AACGACGGCCAGTGG WKCBA AAGATGTWGC	Sens	Micheala et al (2010)	Cox1	chromidinés
F199dT-A	TGTA AACGACGGCCAGTTCA GGWGCTGCAHTAGC	Sens	Micheala et al (2010)	Cox1	chromidinés
F298dT	TGTA AACGACGGCCAGTG CN CAYGGTYAATNATGGT	Sens	Micheala et al (2010)	Cox1	chromidinés
R1184dT	CAGGAAACAGCTATGACTADA CYTCAGGGTGACCRAAAAATC A	Réverse	Micheala et al (2010)	Cox1	chromidinés
FurF-16mer	GCAGGCGCGTAAATTA	Sens	Furuya et al (Unpublishe d)	<i>ADNr 18S</i>	chromidinés
FurR-18mer	CACTCGAAATCGGTAGCA	Réverse	Furuya et al (Unpublishe d)	<i>ADNr 18S</i>	chromidinés

Tableau 3. Amorces utilisées pour amplifier les gènes *ADNr 18S* et *Cox1* de dicyémides et de chromidinés. Le code IUPAC est utilisé i.e. M=A,C ; N=A,T,C,G ; R=A,G ; V=A,C,G.

La Figure 21 permet de visualiser la position des amorces synthétisées et, pour le locus *ADNr18S*, la taille des amplicons générés en fonction des couples d'amorces utilisés.



**Figure 21.** Représentation schématique de la position des amorces sur le locus ADNr 18S d'un Dicyémide (séquence de référence choisie, *Dicyema* sp. X97157 (Pawlowski, Montoya-Burgos et al. 1996)) et la position de quelques amorces sur le locus Cox1 d'un métazoaire (séquence de référence choisie, mRNA de *Schistosoma mansoni* (AF101196.1)). Les tailles théoriques attendues pour les amplicons avec chaque couple d'amorces d'ADNr 18S, sont également indiquées.

- Amplifications par PCR

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide de l'enzyme "HOT FIREPol® DNA Polymerase » (Solis Biodyne). Le mélange réactionnel, pour un volume final de 50µl comprend :

- Le tampon recommandé par le fournisseur supplémenté de 2mM MgCl<sub>2</sub> ;
- 200 µM de chaque dNTP ;
- 200 nM de chaque amorce (sens et reverse) ;
- 0,3 µl d'enzyme ;

- 1 µl d'ADN de parasite (préparé par la méthode Chelex<sup>TM</sup> ou phénol/chloroforme).

Les réactions PCR consistent en la réalisation des étapes suivantes:

1. Dénaturation initiale de 12 min at 94°C,
2. 35 cycles de :
  - Dénaturation de 30s à 94°C,
  - Hybridation 1min at 50°C,
  - élongation de 2 min à 72°C,
3. Elongation finale de 7 min à 72°C.

- Analyses des amplicons.

En fin de PCR, on effectue une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en tampon 0,5 x TAE (usuellement on dépose 10µl de mélange réactionnel sur les 50µl amplifiés) afin d'évaluer le succès de la PCR (présence ou absence de bande, unicité et intensité de la bande), et valider la taille et l'abondance des amplicons. Le tampon TAE 50x contient : 242g de base Tris (121,1 g/mol), 57,1 ml d'acide acétique glacial, 100 ml d'EDTA 0,5 M pH 8.0 pour 1 litre. Il est stérilisé par autoclavage. On utilise un marqueur de taille de référence le GeneRuler Ladder 1kb DNA de la société Thermofischer. Après migration, l'ADN est coloré au bromure d'éthidium et visualisé sous éclairage UV dans un appareil à prises de vues numériques adapté.

4.3.3. Séquençages.

Les produits amplifiés par PCR sont directement séquencés dans les deux directions (i.e.; sur les deux brins) en utilisant les amorces de l'amplification initiale et des amorces internes listées dans le tableau 3. Les séquençages ont été réalisés auprès de deux prestataires externes distincts : MWG-eurofins et Beckman Coulter Genomics. Ces deux prestataires utilisent la méthode de Sanger et nous retournent à la fois les séquences brutes et les électrophorégrammes. A la réception de ces données brutes, la première étape consiste en la reconstruction de la séquence consensus pour chaque échantillon de parasite analysé, en assemblant toutes les données brutes simple brin (amorces des PCRs et amorces internes) et en vérifiant, base à base, la cohérence entre les différents séquençages. En cas d'incohérence, on ré analyse les électrophorégrammes. Dans la majorité des cas, une séquence unique et non ambiguë a pu être reconstruite. Pour certains échantillons, des séquences brouillées et non exploitables ont été obtenues,

correspondant à des problèmes techniques ou des situations de coïnfections, qui n'ont été qu'en partie résolues dans le temps de la thèse. Les séquences ont été analysées et assemblées à l'aide des logiciels BioEdit 7.1.3.0 (Hall 1999) et MEGA6 (Tamura, Stecher et al. 2013).

#### 4.3.4. Clonages.

Certains fragments amplifiés par PCR ont dû être clonés avant séquençage. Pour cela, les amplicons ont été purifiés en solution sur des minicolonnes (Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare, France) et ont été ligaturés dans le plasmide pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison WI, USA), selon les recommandations des fournisseurs. Le mélange de ligation est alors utilisé pour transformer des bactéries compétentes *Escherichia coli* Top10 (Promega) qui sont ensuite étalées sur milieu sélectif semi-solide LB-agar, supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline, d'Xgal (50µg/ml) et d'IPTG (1mM). Les clones blancs se développant overnight à 37°C sur ce milieu sélectif, et qui hébergent donc potentiellement des plasmides recombinants, sont alors criblés directement par PCR selon une méthode dite « PCR-de-colonies » pour identifier les positifs. Brièvement, chaque clone d'intérêt est prélevé à l'aide d'une anse stérile et inoculé à 20 µl d'eau stérile contenant 0,5% de Tween 20, dans un eppendorf stérile. Le tube est bouilli 5 minutes puis ce mélange est utilisé comme source d'ADN dans une réaction d'amplification PCR réalisée comme décrit ci-dessus mais en présence des amorces spécifiques du site de clonage de ce plasmide : les amorces universelles T7 et Sp6. Les amplicons issus de ces « PCR-de-colonies » sont analysés par électrophorèse sur gels d'agarose 1% en tampon 0,5x TAE afin de sélectionner les bandes de tailles attendues (=taille de l'amplicon de départ + ~200 bp correspondant au site de clonage du plasmide, entre les positions des amorces T7 et Sp6). Ces amplicons sont alors envoyés au séquençage par Sanger, auprès de nos prestataires, à l'aide des amorces T7, Sp6 et des amorces internes. Les données obtenues sont alors traitées comme décrit ci-dessus (section 4.3.3) pour l'assemblage, en prenant soin d'éliminer les nucléotides correspondant au plasmide. On crible usuellement 10 clones par mélange de ligation.

#### 4.3.5. Analyse bioinformatique des séquences.

Suite à l'assemblage des séquences consensus pour chacun des échantillons de parasites, nous avons construit des arbres phylogénétiques à partir d'alignements multiples des séquences, et avons également estimé la divergence génétique entre ces séquences.

- Alignements de séquence.

Les séquences ont été alignées en ligne avec le logiciel MAFFT version 7 (Katoh et Toh 2008). MAFFT est un logiciel basé sur un algorithme de calcul de la transformation de Fourier rapide (FFT) et une méthode d'approximation des distances (Jones, Taylor et al. 1992). Ce logiciel emploie des méthodes permettant de considérer l'information des structures secondaires des marqueurs ribosomaux par estimation de la probabilité d'appariement des bases (Katoh et Toh 2008).

- Calcul des divergences génétiques.

On évalue l'information génétique de chaque marqueur du jeu de données par le calcul de la divergence génétique entre les échantillons de parasites étudiés. Une matrice de distance génétique entre les échantillons de parasites pour chaque marqueur est calculée à l'aide du logiciel MEGA version 5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Il s'agit d'une méthode qui donne la proportion de sites pour lesquels on note une différence entre deux échantillons de parasites. Le calcul de la proportion des sites variables se fait en calculant ce rapport : nombre de différences observées/nombre total de sites. Il s'agit donc d'une comparaison par paires sachant que l'analyse ne prend pas en considération les sites présentant des trous (gaps).

- Evaluation de la saturation des substitutions

L'information génétique de chaque marqueur du jeu de données est estimée par l'évaluation d'une présence de saturation des substitutions. Un taux de substitution trop élevé entre les séquences étudiées peut induire une diminution, voir la perte, de l'information phylogénétique (Philippe et Forterre 1999; Xia, Xie et al. 2003). Cette méthode estime un index de saturation de substitution (ISS) qui est le rapport entre l'entropie observée des fréquences nucléotidiques sur celle estimée dans le cas extrême où les fréquences nucléotidiques sont égales. Cet index est ensuite comparé à une valeur ISS critique théorique (ISSc) dont le signal de saturation simulées en fonction : de la longueur des séquences ; du nombre d'unité taxonomique (OTU) analysés ; et d'une topologie dites symétrique ou asymétrique (Xia, Xie et al. 2003).

- Choix des groupes externes

Le principe de l'intégration de groupes externes correspond à la méthode la plus utilisée afin d'évaluer la situation de l'ancêtre. Ajouter les groupes externes à une phylogénie classique



consiste à intégrer des échantillons assez éloignés évolutivement pour jouer le rôle d'un groupe externe. Pour l'étude de l'histoire évolutive des Dicyemides, quatre espèces ont été choisies appartenant à des groupes qui ont été suggérés dans la littérature comme groupes frères ou proches : *Daptonema* sp. (Nematoda, Xyalidae), *Theristus agilis*, de Man, 1880 (Nematoda, Xyalidae), *Polyarthra remata*, Skorikov, 1896 (Rotifera, Synchaetidae), *Lindia tecusa* (Harring et Myers, 1922) (Rotifera, Lindiidae). De ce fait, deux alignements ont été produits : une matrice avec les groupes externes et une sans.

- Choix du modèle d'évolution et partition.

Un modèle d'évolution correspond à un ensemble de paramètres émettant différentes hypothèses sur des probabilités d'événements évolutifs (fréquence en base, taux de substitution). Le modèle d'évolution le mieux adapté aux alignements de séquences est évalué à l'aide de JmodelTest version 2 (Darriba, Taboada et al. 2012). Il s'agit d'un programme qui compare les différents modèles d'évolution selon le gain de vraisemblance qu'ils apportent et de leur richesse en paramètres pour un alignement donné. Le calcul d'une estimation des scores de vraisemblance est réalisé sur 56 modèles d'évolutions candidats (7 matrices différentes de taux de substitution, une fréquence égale ou inégale en base, avec ou sans une proportion de sites invariables et avec ou sans un taux de variation gamma entre les sites). Nous définissons le modèle le plus adapté à l'aide du critère d'information akaike (AIC) avec correction. Le modèle avec la valeur d'AIC la plus faible est sélectionné.

- Méthode probabiliste : inférence du maximum de vraisemblance.

La méthode du maximum de vraisemblance sélectionne l'arbre qui présente la probabilité la plus élevée d'avoir conduit aux données observées avec un modèle d'évolution donné. Les analyses par maximum de vraisemblance ont été faites à l'aide du logiciel RaXML (Stamatakis 2014). Pour toutes les analyses, la robustesse des nœuds de la topologie des arbres phylogénétiques est testée par la méthode des bootstraps avec 1000 réplicats. Le bootstrap consiste à réaliser un test statistique non paramétrique de ré-échantillonnage aléatoire (Felsenstein 1985). Les N sites de la matrice étudiée sont tirés aléatoirement N fois avec remise afin de construire une nouvelle matrice. Une analyse phylogénétique sur la matrice issue de l'échantillonnage aléatoire est réalisée. Cette analyse est identique à celle réalisée sur la matrice initiale. Ces deux étapes sont reproduites, dans le cas de la présente étude 1000 fois. Ainsi, le

consensus majoritaire des 1000 topologies analysées est généré avec des valeurs de bootstrap aux nœuds. Les bootstraps présentent le pourcentage de fois où le nœud est présent dans les topologies (Felsenstein 1985).



## **Chapitre 5 : Résultats et discussions.**

### **5.1. Etudes morphologiques.**

#### 5.1.1 Hôtes examinés.

Selon le type d'étude effectuée, le nombre de céphalopodes pris en considération varie. En effet, nous effectuons immédiatement une dissection sur les céphalopodes récupérés et nous examinons à la loupe leurs sacs rénaux. Suite à cette observation, nous notons le nombre de céphalopodes présentant des individus vermiformes correspondant soit à des dicyémides soit à des chromidinés. Cependant, le nombre de céphalopodes qui nous fournissent des parasites adéquats pour une analyse morphologique et une analyse moléculaire est inférieur à ce que nous observons au moment du prélèvement des parasites au cours des missions d'échantillonnage (tab. 4).

<b>Manipulation</b>	<b>Nombre d'individus céphalopodes</b>	<b>Prévalences</b>
Nombre total de céphalopodes échantillonnés	200	*****
Nombre de céphalopodes sur lesquels nous avons observé des parasites vermiformes immédiatement après la dissection.	182	91 %
Nombre de céphalopodes sur lesquels nous avons observé des dicyémides immédiatement après la dissection.	175	88 %
Nombre de céphalopodes infestés par des morpho-espèces de dicyémides sur lesquels nous avons réalisé une identification morphologique non ambiguë.	53	26,5 %
Nombre de céphalopodes infestés par des dicyémides suite à l'étude moléculaire (positifs en PCR).	76	38 %
Nombre de céphalopodes sur lesquels nous avons observé des chromidinés immédiatement après la dissection.	6	3 %
Nombre de céphalopodes infestés par des morpho-espèces de chromidinés.	7	3,5 %
Nombre de céphalopodes infestés par des chromidinés suite à l'étude moléculaire (positifs en PCR).	4	2 %

Tableau 4. Bilan quantitatif et comparatif des hôtes exploitables selon les études.

Nous avons réalisé cinq campagnes d'échantillonnage : trois missions à Concarneau et deux en Tunisie. Ces campagnes nous ont permis de prélever 200 spécimens de céphalopodes.

L'examen des sacs rénaux de tous ces mollusques au stéréomicroscope a révélé que 182 individus étaient infestés par des parasites vermiformes, parmi lesquels 175 étaient infectés par des dicyémides et 7 étaient infectés par des chromidinés. Un seul céphalopode présentait à la fois des dicyémides et des chromidinés, la seiche *Sepia officinalis* S50 (voir Annexe 1).

Sur les 200 spécimens de céphalopodes examinés :

- ✓ 177 sont des céphalopodes benthiques comprenant :
  - 86 spécimens de céphalopodes strictement benthiques qui sont *Octopus vulgaris* (18), *Eledone cirrhosa* (48), *Eledone moschata* (20) ;
  - 91 spécimens de céphalopodes démersaux ou necto-benthiques qui sont *Sepia officinalis* (60) et *Sepia orbignyana* (31) ;
- ✓ 23 spécimens sont des céphalopodes pélagiques qui correspondent tous à des calamars appartenant à l'espèce *Loligo vulgaris*.

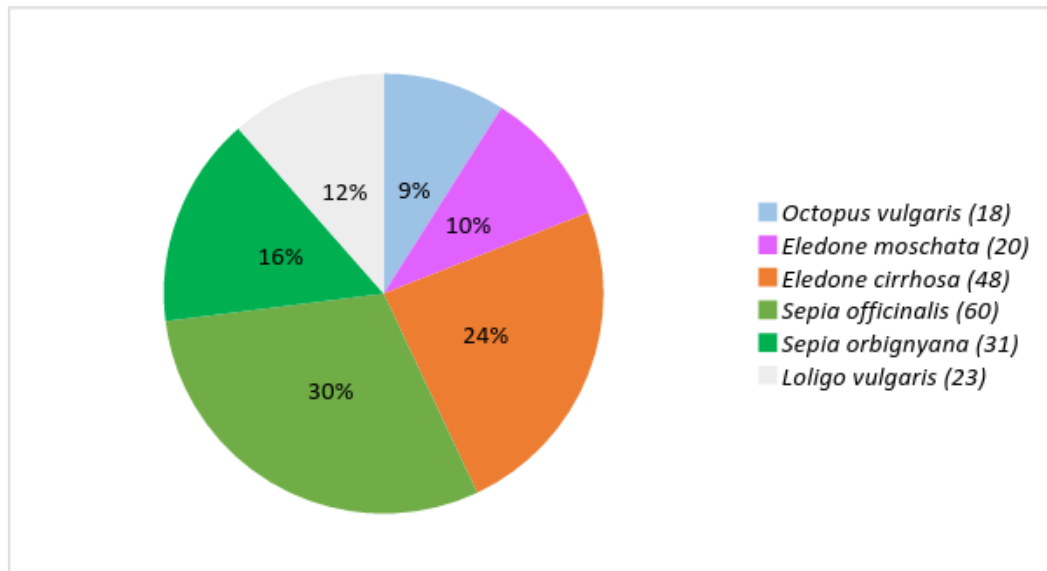


Figure 22. Distribution, par espèce, des 200 spécimens d'hôtes céphalopodes, examinés durant l'ensemble de l'étude. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'individus inventoriés pour chaque espèce.

Les espèces de céphalopodes collectées, avec leur code de référence (O pour *Octopus vulgaris*, E pour *Eledone moschata*, P ou L pour *Eledone cirrhosa*, S pour *Sepia officinalis* ou *Sepia orbignyana*), la taille de leurs manteaux et leurs poids sont indiqués dans l'Annexe 1. La figure 22 représente le nombre d'individus échantillonnés par espèce, pour l'ensemble de l'étude.

Nous avons envisagé de calculer les paramètres parasitologiques selon les critères de Margolis et al. (1982) et de Bush et al. (1997), qui se définissent comme suit :

- **La prévalence**, qui est le **rapport** du nombre d'individus d'une espèce hôte infestée par une espèce de parasite **par** le nombre total d'hôtes examinés, exprimé en pourcentage.

- **L'intensité moyenne**, qui est le **rapport** du nombre total de parasites dans tous les individus d'une espèce hôte, **par le** nombre d'hôtes infestés par ce parasite, soit le **nombre moyen de parasites par hôte infesté dans un échantillon**.

- **L'abondance**, qui est le **rapport** du nombre total d'individus d'une espèce parasite dans un échantillon d'une espèce hôte, **par** le nombre total d'hôtes dans l'échantillon, soit le **nombre moyen de parasites par hôte examiné**.

Mais nous n'avons pas pu calculer ces intensités moyennes ni ces abondances, car il est difficile, voire impossible, de compter le nombre de parasites dans un hôte infecté, aussi bien pour les dicyémides que pour les chromidinés. En effet, s'il est possible de visualiser des centaines de parasites, attachés à l'épithélium rénal par leurs parties antérieures, leur enchevêtrement et les mouvements de leur corps, empêchent tout dénombrement.

#### 5.1.2. Dicyémides : Résultats morphologiques.

Parmi les 200 céphalopodes examinés, 175 étaient infestés par des dicyémides ; la prévalence de toutes les espèces de dicyémides est donc de **88 %**.

De même, sur les 200 spécimens de céphalopodes examinés, 177 individus étaient des céphalopodes benthiques et 23 individus des pélagiques. La prévalence des dicyémides parmi les céphalopodes benthiques est donc de **99,4 %**. A contrario, aucun céphalopode pélagique n'abritait de dicyémide dans ses sacs rénaux ; la prévalence des dicyémides parmi les céphalopodes pélagiques est de **0 %**.

Les identifications morphologiques de ces dicyémides reposent sur la qualité de colorations réalisées sur les lames. Cependant, il nous est arrivé à plusieurs reprises de ne pouvoir observer aucun parasite, pour des raisons principalement techniques : problèmes au moment de la fixation des tissus ou colorations inappropriées, ne pouvant mettre en valeur les critères spécifiques d'identification pour plusieurs raisons (long lavages à l'eau, prise de couleur insuffisante, mise au point du protocole de préparation des colorants, ....). De ce fait, nous

n'avons retenus à l'issue de ce travail d'inventaire, que **53 individus hôtes qui présentaient des morpho-espèces non ambiguës** (Annexe 1).

L'étude morphologique des dicyémides a permis d'attribuer des noms aux morpho-espèces observées pour ces **53** individus hôtes. Les critères utilisés pour ces identifications sont ceux détaillés dans l'introduction (Nouvel, 1947 ; Furuya, 1999). Ils ont porté principalement sur le nombre de cellules périphériques, la forme de la calotte polaire, le nombre de cellules de l'infusoriforme et le nombre de noyaux de l'urne.

Sur le site tunisien de La Goulette, les céphalopodes étudiés sont infestés par 8 morpho-espèces différentes :

- *Pseudicyema truncatum* Whitman, 1883.
- *Microcyema vespa* van Beneden, 1882.
- *Dicyemenea gracile* Wagener, 1857.
- *Dicyemenea eledones* Wagener, 1857.
- *Dicyema paradoxum* von Kölliker, 1849.
- *Dicyema typus* van Beneden, 1876.
- *Conocyema polymorpha* van Beneden, 1882.
- *Dicyema moschatum* Whitman, 1883.

Sur le site français de Concarneau, nous n'avons prélevé que 2 morpho-espèces de dicyémides, qui sont également présentes sur le site de La Goulette :

- *Dicyemenea eledones* Wagener, 1857.
- *Pseudicyema truncatum* Whitman, 1883.

La présence de ces 8 morpho-espèces dans les différents hôtes inventoriés, ainsi que les valeurs de prévalence et d'intensité sur les deux sites, et au cours des différentes campagnes d'échantillonnage, sont récapitulés dans les tableaux 5 et 6, et la Figure 23. Notons que chez cinq hôtes (S82, S84, S85, O2 et O9) nous avons observé plusieurs morpho-espèces de dicyémides.

Morpho-espèce	Hôte	Concar-neau (mai) 2011	Concar-neau (juillet) 2012	Tunisie (janvier) 2013	Concar-neau (septembre) 2013	Tunisie (janvier) 2014
Pseudicyema truncatum	S. officinalis		+	+	+	+
Microcyema vespa	S. officinalis			+		+
Dicyemenea gracile	S. officinalis			+		+
Dicyemeneaeledones	E. cirrhosa	+	+	+	+	+
	E. moschata			+		+
Dicyema moschatum	E. moschata			+		+
Dicyema paradoxum	O. vulgaris			+		+
Dicyema typus				+		+
Conocyema polymorpha				+		+
Ø	S. obignyana	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Ø	L. vulgaris	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tableau 5. Indication de la présence (+) d'une des huit morpho-espèces de dicyémide (première colonne) en fonction des hôtes céphalopodes (deuxième colonne), pour chacune des cinq campagnes d'échantillonnage. Le sigle « Ø » indique une absence d'infestation.

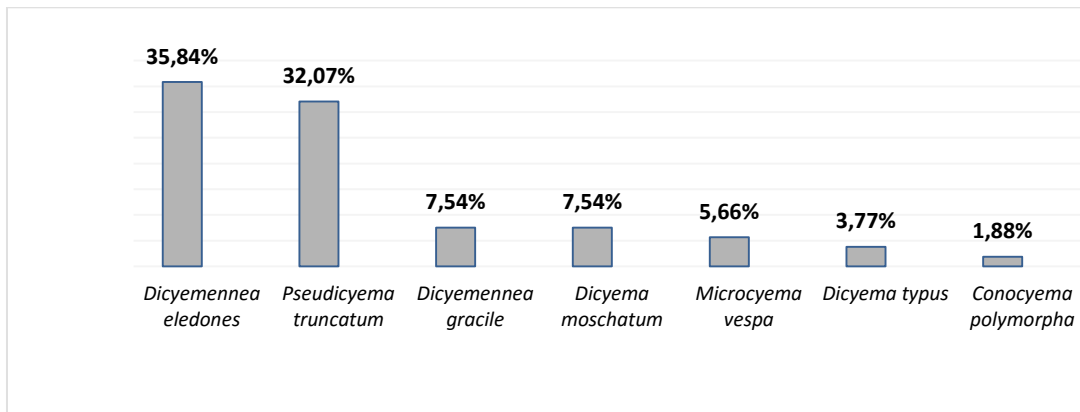
Morpho-espèces	Code de l'individu hôte	Prévalence
Pseudicyema truncatum	S31/S32/S33/S43/S49/S50/S72/S73/S74/S78/S80/S81/ <b>S82</b> /S83/ <b>S84/S85</b> /S86	32,07%
Microcyema vespa	S75/ <b>S82/S84</b>	5,66%
Dicyemenea gracile	S76/S77/ <b>S82/S85</b>	7,54%
Dicyemeneaeledones	L4/L12/L13/L20/L21/L22/L23/L24/L25/L26/L27/L28/L30/L31/L29/E14/E15/E16/E19	35,84%
Dicyema moschatum	E2/E6/E7/E18	7,54%
Dicyema paradoxum	<b>O2/O9</b> /O13	5,66%
Dicyema typus	<b>O2</b> /O11	3,77%
Conocyema polymorpha	<b>O9</b>	1,88%

Tableau 6. Prévalence pour les huit morpho-espèces de dicyémides inventoriées au cours de l'ensemble de l'étude.

La prévalence a été calculée sachant que le nombre total d'hôtes examinés où des morpho-espèces ont pu être déterminées sans ambiguïté est de 53. Les hôtes en gras et soulignés correspondent aux spécimens présentant des infections multiples. Pour rappel : S, Sepia



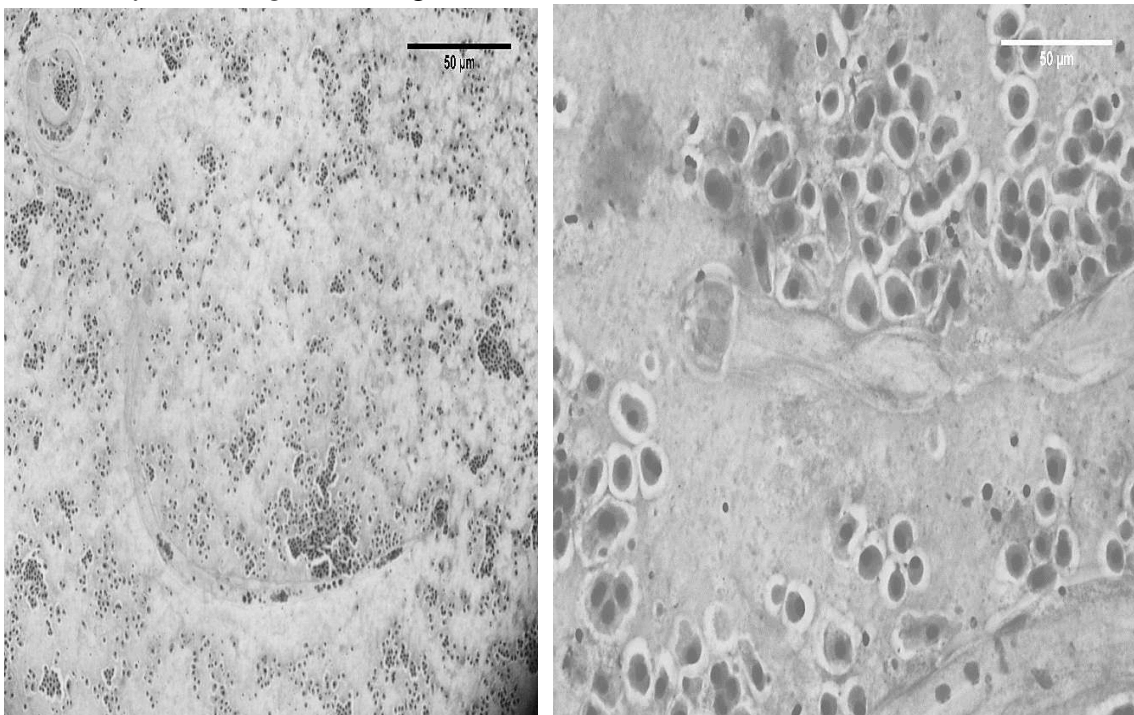
officinalis ou *Sepia orbignyana* ; L, *Eledone cirrhosa* ; E, *Eledone moschata* ; O, *Octopus vulgaris*.



**Figure 23.** Prévalence des 8 morpho-espèces de dicyémides, pour l'ensemble de l'étude. Sur cette figure, les morpho-espèces sont hiérarchisées en fonction de leur prévalence globale dans les hôtes.

Chacune des 8 les morpho-espèces identifiées au cours de notre étude avait été signalée auparavant, en Méditerranée mais uniquement en Italie, ainsi qu'en Atlantique mais uniquement en Manche. Nous récapitulons ci-dessous les données disponibles dans la littérature pour chacune de ces 8 morpho-espèces, auxquelles nous avons ajouté nos propres résultats.

#### 5.1.2.1. *Dicyemenea gracile* Wagener, 1857.



**Figure 24.** *Dicyemenea gracile* chez *Sepia officinalis*.

- Autres appellations :
  - Dicyema gracile Wagener 1857
  - Dicyemina Köllikeriana Ed Van Beneden, 1876
- Hôte : *Sepia officinalis*
- Localisation géographique :
  - Chez *Sepia officinalis* : Manche et Méditerranée (Italie, Monaco, France) Wagener (1857), Whitman (1883), Braun (1887), Nouvel (1933, 1938, 1947) ;
  - Chez *Sepia orbignyana* : Méditerranée (France, Espagne) par Wagener (1857), Whitman (1883), Braun (1887), Nouvel (1933, 1938, 1947)
  - Dans le cadre de notre étude : récolté uniquement en Tunisie (2014), sur l'espèce *Sepia officinalis*.

Cette espèce a été très brièvement décrite par Nouvel (1947) qui a donné quelques critères caractéristiques de l'adulte vermiforme mais, en ne représentant que la partie antérieure du corps. Une brève description de l'aspect général de l'infusoriforme a été fournie par Nouvel mais sans détail sur la composition cellulaire ni schéma représentatif. Les grands individus peuvent avoir des longueurs entre 4 et 6 mm (Nouvel, 1947).

- Prévalence : 7,54%

Dans nos échantillons, nous avons pu observer des individus qui ont une longueur allant jusqu'à 8 mm. Il s'agit donc de dicyémides qui se caractérisent par un corps long, fin et cylindrique. Cette espèce se caractérise par une calotte très caractéristique par sa forme très globuleuse et très marquée, et par le fait qu'elle ne partage son habitat avec aucun autre Dicyémide. La taille des propolaires et des métapolaires est tellement plus importante que les parapolaires sont presque masquées. Les métapolaires ont une forme plus large dans la région antérieure de la calotte. Les cellules périphériques sont au nombre de 23 cellules. L'infusoriforme est le plus volumineux de tous les dicyémides et atteint 37  $\mu\text{m}$ . Il est composé de 37 cellules au total et son urne présente 2 noyaux.

#### 5.1.2.2. Dicyema typus van Beneden, 1876.



Figure 25. Caractéristiques morphologiques de *Dicyema typus* (Nouvel, 1947).

- Hôte : *Octopus vulgaris*
- Localisation géographique :
  - Nord-Est de l'Océan Atlantique : Floride USA, golfe du Mexique par McConnaughey et Kritzler (1952) ;
  - Manche (France et Angleterre) par van Beneden (1876),
  - Nord Est de l'Océan Atlantique (France) par Nouvel (1932a, b, 1933, 1947).

Dans notre étude, nous avons observé *Dicyema typus* chez *Octopus vulgaris* en Tunisie en 2013 et en 2014.

- Prévalence : 3,77 %

Les adultes vermiformes (Fig. 25) peuvent atteindre 1 mm de longueur. Sur les échantillons que nous avons observés, la longueur n'a pas dépassé 0,9 mm. La calotte est conique globuleuse, semi ellipsoïdale en vue latérale. Les noyaux des cellules propolaires se caractérisent par une taille plus petite que les noyaux des métapolaires. Le renflement céphalique est constitué dans sa majeure partie par les cellules parapolaires volumineuses. Les stades vermiformes présentent 18 cellules périphériques. Les infusiformes ont une taille à peu près de 37 μm et leurs corps est formé de 35 cellules. La cellule de l'urne présente 2 noyaux comme tous les autres *Dicyema*. Sur la plupart des lames, *Dicyema typus* était souvent accompagné de *Dicyema paradoxum*.

#### 5.1.2.3. *Dicyema paradoxum* von Kölliker, 1849.

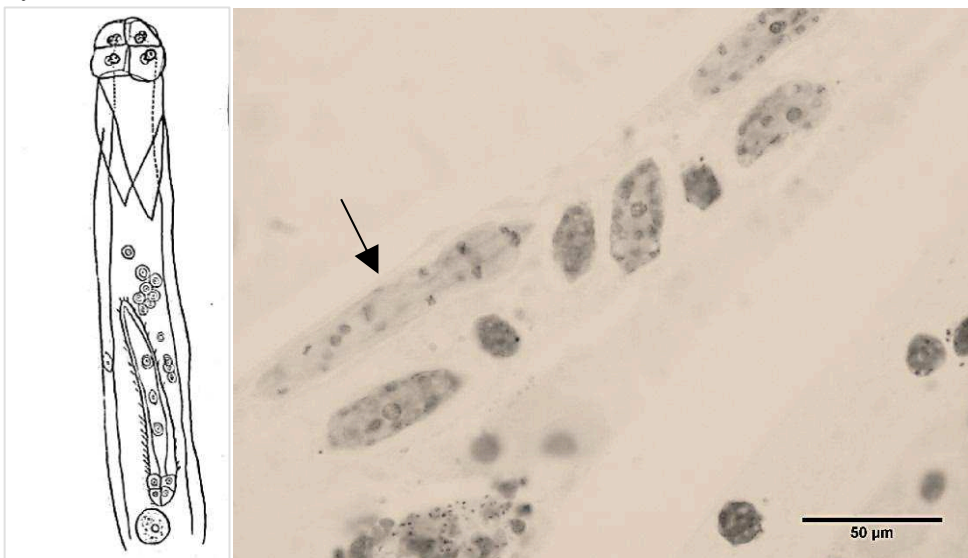
- Autres appellations :  
*Dicyema clausiana* van Beneden 1876.  
*Dicyema typus* Whitman 1883.  
*Dicyema clausianum* Nouvel 1938.
- Hôte : *Octopus vulgaris*
- Localisation géographique :
  - Manche: von Kölliker (1849), van Beneden (1876).
  - Méditerranée (Monaco, France), l'Atlantique est (Mauritanie) : Whitman 1883, Nouvel (1932, 1933, 1934, 1947).

Nous avons prélevé cette espèce sur des *Octopus vulgaris* en Tunisie (2013, 2014).

- Prévalence : 5,66 %

Les adultes vermiformes ont une taille d'environ 3 mm (Fig. 25). La calotte peut être conique ou plate et forme un renflement céphalique massif (sans les parapolaires). Le corps est formé de 28 cellules périphériques. L'infusoriforme mesure 25 µm et est formé de 39 cellules. On remarque que l'urne comporte 2 noyaux.

#### 5.1.2.4. *Dicyema moschatum* Whitman, 1883.



**Figure 26.** Schéma d'un nématogène de *Dicyema moschatum* (Nouvel, 1947). Observation microscopique des embryons vermiformes de *Dicyema moschatum*.

- Autres appellations :  
     Dicyema eledones Wagener 1857.  
     Dicyemella wagneri van Beneden 1876.
- Hôte : Eledone moschata
- Localisation géographique :
  - Chez Eledone moschata : Méditerranée : Italie, France par van Beneden (1876), Whitman (1883), Hartmann (1906), Nouvel (1947) ;
  - Chez Sepiola rondeleti : Méditerranée (Monaco, France) Whitman (1883), Nouvel (1944, 1947).

Il s'agit d'un dicyémide fréquemment prélevé sur Eledone moschata qui est un céphalopode qu'on a pu examiner uniquement en Tunisie (2013, 2014).

- Prévalence : 7,54%

Les adultes vermiformes sont très longs, la plupart ayant 5 mm de longueur. Leur corps est composé de 22 à 26 cellules périphériques avec la présence d'une ou deux cellules verruciformes. La calotte polaire est conique. Les cellules parapolaires ne font pas partie du renflement céphalique. L'infusoriforme mesure de 25 à 26 µm. Cet embryon est composé de 39 cellules et l'urne présente 2 noyaux. On peut, sur certains individus infusoriformes, observer deux corps réfringents.

5.1.2.5. *Pseudicyema truncatum* Whitman, 1883.

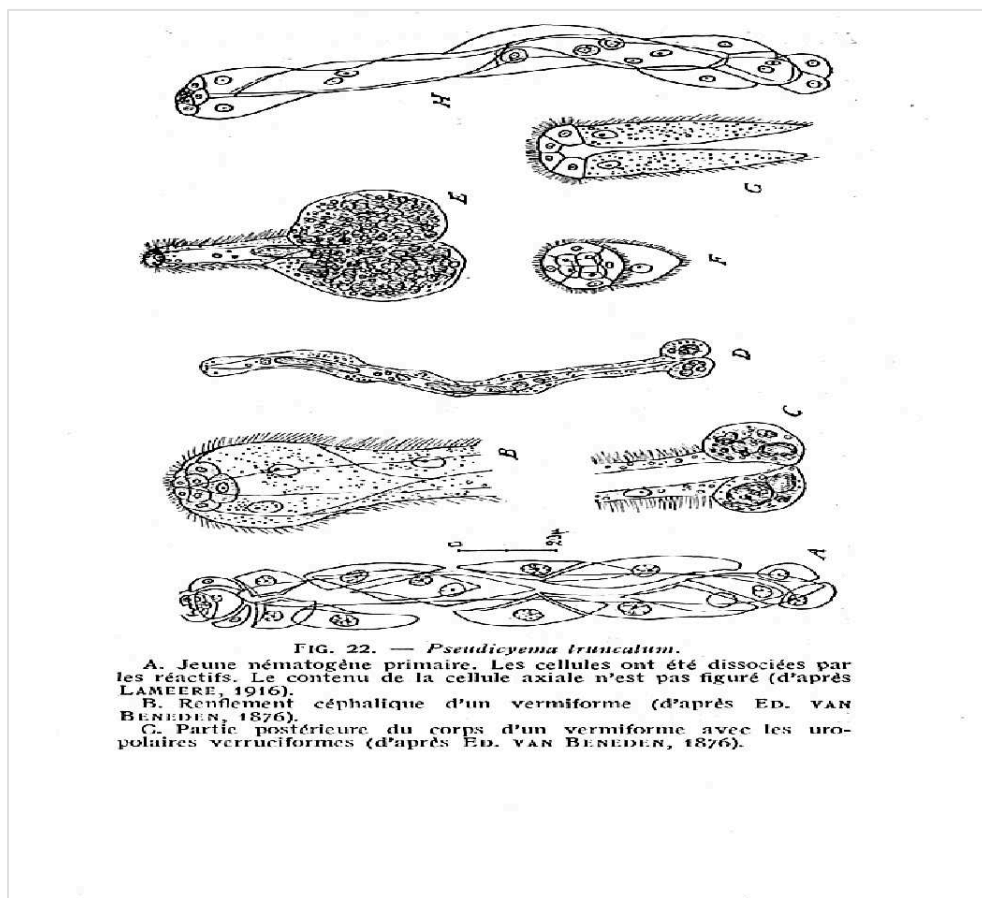
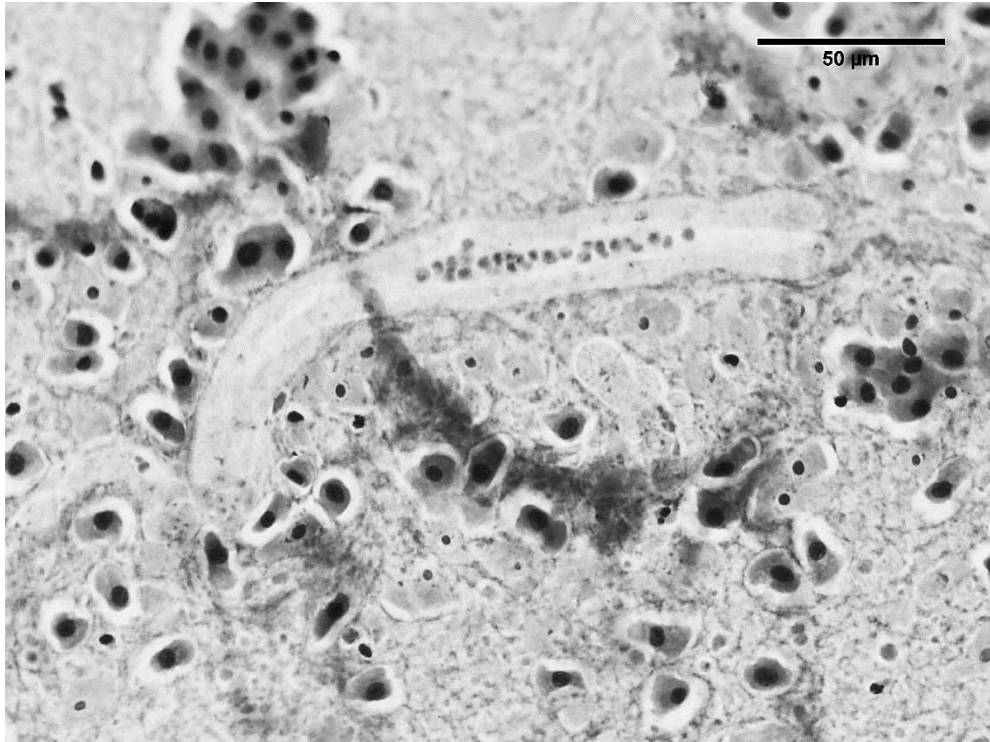


Figure 27. Caractéristiques morphologiques de *Pseudicyema truncatum* (Nouvel, 1947).

- Autres appellations :
  - Dicyema gracile Wagener 1857
  - Dicyema köllikeriana van Beneden 1876
- Hôte : *Sepia officinalis*
- Localisation géographique :
  - Chez *Sepia esculenta* : Nord-Est de l'Océan Pacifique (Japon) Nouvel (1947)
  - Chez *Sepia officinalis* : Nord-Est de l'Océan Atlantique (France) Whitman (1883), Manche, Méditerranée (Italie, France, Espagne) Nouvel (1933b, 1947).
  - Chez *Rossia macrosoma* : Méditerranée (Italie, France, Monaco) Whitman (1883), Nouvel (1944, 1947).

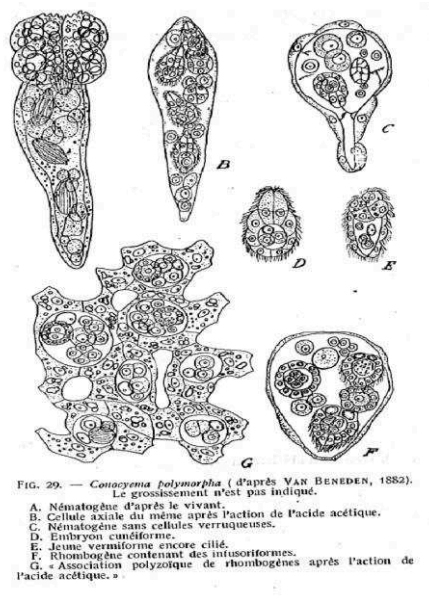
Dans notre étude, nous avons récolté *Pseudicyema truncatum* sur *Sepia officinalis* en Tunisie (2013, 2014) et à Concarneau (2012, 2013).

- Prévalence : 32,07 %

Les adultes vermiformes (Fig. 27) présentent un corps de petite taille ne dépassant pas 1 mm. La calotte polaire a une forme plate. Les 4 cellules propolaires alternent avec les 5 métapolaires. La cellule axiale atteint les cellules métapolaires et les cellules parapolaires font partie du renflement céphalique. Les cellules périphériques sont au nombre de 22 cellules. Les cellules uropolaires sont très caractéristiques et ont un grand volume. L'infusoriforme mesure de 33 à 35 µm. Son corps est composé de 39 cellules et l'urne présente 2 noyaux.



### 5.1.2.6. *Conocyema polymorpha* van Beneden, 1882.



**Figure 28.** Schéma des différents stades de développement de *Conocyema polymorpha* (Nouvel, 1947).

- Hôte : *Octopus vulgaris*
- Localisation géographique :
  - Chez *Octopus vulgaris* : Nord-Est de l'Océan Atlantique (Suède, Norvège) ; Méditerranée : Italie, France par van Beneden (1876), Whitman (1883), Hartmann (1906), Nouvel (1947).
  - Chez *Sepiola rondeleti* : Méditerranée (Monaco, France) Whitman (1883), Nouvel (1944, 1947).

Dans notre étude, nous avons observé cette espèce une seule fois, en Tunisie (2013), chez le poulpe *Octopus vulgaris* (O9).

- Prévalence : 1,88 %

Les adultes sont courts, longs ou arrondis, de façon irrégulière (Fig. 28). La calotte est irrégulière et le corps de l'adulte présente 12 cellules périphériques. L'infusoriforme est de petite taille, composé de 37 cellules et l'urne porte 2 noyaux. Dans notre étude, l'*Octopus vulgaris* O9 présentait une co-infection avec *Dicyema paradoxum*.



#### 5.1.2.7. *Microcyema vespa* van Beneden, 1882

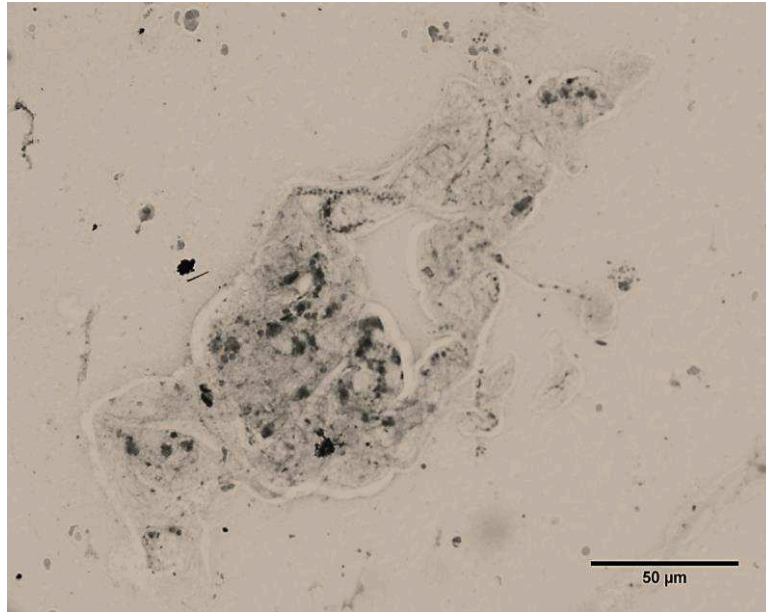


Figure 29. *Microcyema vespa* chez *Sepia officinalis*.

- Hôte : *Sepia officinalis*
- Localisation géographique :
  - *Microcyema vespa* est spécifique de l'espèce de céphalopode *Sepia officinalis* et a été récolté par van Beneden (1882), Lameere (1916) en Manche et en Méditerranée par Lameere (1918, 1919), Hartman (1939) et Schartau (1940).

Nous avons récolté *Microcyema vespa* chez des *Sepia officinalis* pêchée en Tunisie en 2013 et 2014.

- Prévalence : 5,66 %

Les adultes sont sans forme précise ; leur calotte est irrégulière. Ils présentent 10 cellules périphériques autour d'une cellule axiale longue et ramifiée. Cette espèce se caractérise aussi par des embryons en forme de bilboquet dit embryon de Wagener. Les infusoriformes mesurent 25 µm. Ils présentent au total 39 cellules et l'urne a un seul noyau.

#### 5.1.2.8. *Dicyemenea eledones*.

- Hôte : *Eledone cirrhosa*, *Eledone moschata* (Tunisie)
- Autres appellations :

*Dicyema eledones* Whitman 1883

*Dicyemella wagneri* van Beneden 1876

- Localisation géographique :
  - Chez *Eledone moschata* : France, par van Beneden (1876), Whitman (1883), Hartmann (1906), Nouvel (1947) ;
  - Chez *Sepiola rondeleti* : Méditerranée (Monaco, France) Whitman (1883), Nouvel (1944, 1947) ;
  - Chez *Eledone cirrhosa* : Nord Est de l'Océan Atlantique (Suède, Norvège), Méditerranée (Italie).

Nous avons récolté ce dicyémide dans toutes les missions et dans les deux localités prospectées.

- Prévalence : 35,84 %

Cependant, la description disponible pour ce dicyémides est brève et ne fournit que peu de détails concernant la morphologie et la composition cellulaire des infusoriformes, qui sont un critère déterminant dans l'identification morphologique des espèces chez les dicyémides. Nous avons donc entrepris de re-décrire *Dicyemenea eledones* et de décrire ses stades de développement embryonnaires dans l'article (Annexe 2) : **REDESCRIPTION OF DICYEMENEA ELEDONES (PHYLUM: DICYEMIDA) FROM ELEDONE CIRRHOSA (MOLLUSCA: CEPHALOPODA: OCTOPODA).**

### 5.1.3. Morphologie des Dicyémides : discussion.

La plus grande partie de notre échantillonnage de céphalopodes (88%) est représentée par des céphalopodes benthiques (Fig. 22). Ceci est dû aux méthodes de pêche utilisées par les pêcheurs qui nous ont fourni le matériel biologique au cours des cinq campagnes. Les céphalopodes necto-benthiques que nous avons examinés (les seiches) sont issus de la pêche côtière qui n'explore pas des zones à de très grandes profondeurs. Ainsi ces seiches, qui habitent des zones marines de faible profondeur et ont un mode de vie démersal, ont été regroupées dans la catégorie des céphalopodes benthiques.

La prévalence des dicyémides parmi les céphalopodes benthiques est de **99,4%**, alors qu'aucun céphalopode pélagique n'abrite de dicyémide dans ses sacs rénaux. Ceci confirme que les dicyémides sont des parasites exclusifs des sacs rénaux de céphalopodes benthiques (Nouvel 1947; McConnaughey 1960; Short and Hochberg 1969; Furuya 1999; Furuya and Tsuneki 2003).

Les contraintes techniques ne nous ont pas permis de déterminer les morpho-espèces de dicyémides des 175 hôtes infestées. Les morpho-espèces de seulement 53 hôtes ont pu être identifiées sans ambiguïté. Nous remarquons que la diversité spécifique des morpho-espèces pêchées en Tunisie (8 morpho-espèces distinctes) est plus importante que celle des côtes nord-ouest françaises (2 morpho-espèces, rencontrées en Tunisie également). Ceci ne reflète pas forcément une richesse de dicyémides plus faible dans ce dernier site d'échantillonnage, mais serait plutôt lié au fait que le nombre d'espèces hôtes examinées en Tunisie (5 espèces de céphalopodes) est supérieur au nombre d'espèces d'hôtes examinées à Concarneau : seulement 3 espèces de céphalopodes.

Aucune morpho-espèce de dicyémide n'a pu être fixée et colorée afin d'être identifiée morphologiquement au cours de notre étude sur l'espèce *Sepia orbignyana*. Wagener (1857), Whitman (1883), Nouvel (1933, 1932, 1947) et Hochberg (1990) signalent que cette espèce de seiche est très rarement infestée en Méditerranée. Whitman (1883), Nouvel (1933, 1932, 1947) n'ont observé que *Pseudicyema truncatum* chez *Sepia orbignyana*. Au cours des missions d'échantillonnage, nous avons remarqué que la seiche rosée (nom commun de *Sepia orbignyana*) était très souvent pêchée morte. Des parasites ont pu être observés lors de la

dissection sous stéréomicroscope mais ils étaient immobiles et en état de dégradation partielle. L'étape de fixation des parasites sur lames dans ces cas échoue. Cette espèce de seiche est de plus de petite taille (10 à 15 cm) par comparaison à la seiche *Sepia officinalis* (15 à 25 cm). Ces observations confortent les travaux de Nouvel (1937); Hochberg (1990); Furuya, Tsuneki et al. (1992); Furuya, Ota et al. (2004) qui indiquent que les céphalopodes juvéniles ou de petite taille ne sont généralement pas infestés par les dicyémides ou, si ces parasites sont présents, leur prévalence est très faible. En effet, la structure simple (sans invaginations et convolutions) des reins des céphalopodes jeunes ou de petite taille, prive les dicyémides d'un habitat adéquat, qui leur permet de s'accrocher à l'épithélium rénal. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des dicyémides présentant une calotte conique, tels *Dicyemenea gracile*, qui a besoin, comme point d'appui au rein de son hôte céphalopode de l'espace entre les replis de l'épithélium rénal. Elle peut y accrocher sa calotte et son long corps est alors soutenu par les bords des replis l'épithélium rénal.

Dans les échantillons de poulpes (*Octopus vulgaris*) infestés uniquement par l'espèce *Dicyema paradoxum*, la calotte polaire de cette espèce est de forme conique (Nouvel, 1947) et arrondie (cap-shaped) selon (Furuya, Hochberg et al. 2003). Ces derniers auteurs ont prospecté une grande diversité de céphalopodes et ont comparé la forme des calottes des dicyémides qui les infestaient. Ils en ont conclu qu'un individu hôte ne peut pas être co-infesté par deux espèces de dicyémides présentant la même forme de calotte polaire. Cette conclusion a été vérifiée dans d'autres études également faites par les mêmes auteurs.

Chez le poulpe *Octopus vulgaris* O13 de notre échantillonnage, présentant une mono-infestation, le dicyémide *Dicyema paradoxum* prend la même forme citée dans la littérature c'est-à-dire la forme conique. Cependant, nous avons observé chez le poulpe *Octopus vulgaris* O2, co-infecté à la fois par *Dicyema paradoxum* et *Dicyema typus*, une variation de la forme de la calotte polaire de *Dicyema paradoxum* qui devient plate chez quelques individus. Dans le poulpe O2, *Dicyema typus* présente une forme de calotte conique. Le changement de la forme de la calotte polaire chez *Dicyema paradoxum*, de la forme conique à la forme plate, serait une forme d'adaptation afin de pouvoir cohabiter avec *Dicyema typus*. En séparant leurs niches écologiques, *Dicyema typus*, en s'attachant aux zones de l'épithélium rénal ayant des formes de replis arrondies, s'imbriquerait exactement avec la forme de sa calotte, en lui permettant un meilleur attachement, alors que *Dicyema paradoxum* habiterait la partie du repli rénal en forme

aplatie. Les deux espèces éviteraient ainsi la compétition interspécifique et survivraient toutes les deux dans les sacs rénaux du poulpe.

Dans le poulpe *Octopus vulgaris* O9, co-infectés par *Dicyema paradoxum* et *Conocyema polymorpha*, *Dicyema paradoxum* présente une calotte polaire de forme conique. Ceci peut être expliqué par la forme différente (forme irrégulière) de la calotte de *Conocyema polymorpha*. Cette divergence de forme de la calotte entre les deux espèces épargne à *Dicyema paradoxum* la nécessité de modifier la forme de sa calotte : il peut ainsi garder une calotte conique et occuper une niche séparée de celle de *Conocyema polymorpha*.

Chez l'espèce *Octopus vulgaris*, nous avons observé trois espèces de dicyémides : *Conocyema polymorpha*, *Dicyema paradoxum* et *Dicyema typus*. Nouvel (1932,1933, 1947) et Hochberg (1990) ont signalé trois autres espèces infectant *Octopus vulgaris* en Méditerranée : *Dicyema megaloccephalum* (Nouvel, 1934), *Dicyema monodi* (Nouvel, 1934) et *Dicyema Lameerei* (Nouvel, 1932). Plusieurs raisons non exclusives pourraient expliquer l'absence de ces espèces dans notre inventaire :

-La localisation géographique : ces espèces ont été récoltées par ces auteurs en Méditerranée, mais sur les côtes italienne et française, et en Atlantique, mais sur les côtes mauritaniennes.

-Ces espèces ont une faible prévalence et sont rarement rencontrées, selon ces auteurs. Malgré notre faible effectif, les *Octopus vulgaris* récoltés semblent préférentiellement infestés par les espèces à calotte conique *Dicyema paradoxum* et *Dicyema typus*. *Dicyema megaloccephalum*, *Dicyema monodi* et *Dicyema Lameerei* présentent également des calottes coniques. Ces différentes espèces peuvent donc entrer en compétition pour leur niche écologique. Vu la faible prévalence de *Dicyema megaloccephalum*, *Dicyema monodi* et *Dicyema Lameerei*, un échantillonnage plus important est donc nécessaire afin de préciser l'absence d'infection d'*Octopus vulgaris* des côtes tunisiennes par ces dicyémides.

La plupart des céphalopodes sont infestés par une seule espèce de dicyémides qui lui est strictement spécifiques (van Beneden, 1976, Hochberg et Furuya, 2002, Furuya 1999, 2006). Une probabilité de 94% a été donnée par Furuya, Hochberg et al. (2003) pour qu'un hôte soit infesté par une espèce unique de dicyémide. Les cas des co-infestations ou d'infestations multiples semblent faibles dans l'étude de ces derniers auteurs (6%). Dans notre étude, nous

avons 4 cas (S84/S85/O2/O9) de céphalopodes présentant des co-infestations (7,5%) et un seul cas (S82) d'infestation triple (voir tableau 6). Dans ces co-infections, la théorie de la divergence des formes de calotte polaire est vérifiée dans tous les cas. Nous n'avons en aucun cas d'infection par 4 espèces de dicyémides chez un même individu hôte. Ce résultat est conforté par les résultats de (Furuya, Hochberg et al. 2003) qui estiment que les cas de co-infestations multiples sont à une fréquence extrêmement faible.

Dans nos échantillons, on a pu également observer quelques variations par rapport aux données citées dans la littérature. La taille de l'infusoriforme chez certaines espèces ne correspondait pas exactement à la taille décrite dans les premières descriptions (cet écart ne dépassant cependant jamais 5  $\mu\text{m}$ ). Ceci est dû à la différence de taille de l'individu vermiforme adulte qui, lorsqu'il a une longueur ou une largeur plus importante, peut présenter des tailles de l'infusoriforme plus élevées. Ce même type de variation a été observé dans les travaux de (Furuya, Hochberg et al. 2001; Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya 2007).

Nous présentons dans cette partie, une clé pratique pour l'identification des dicyémides que nous avons recensés sur les côtes méditerranéennes (La Goulette, Tunisie) et nord-est Atlantique (Concarneau, France). Cette clé est basée sur les critères déterminants d'identification de parasites rencontrés dans la littérature et sur nos propres observations au cours de cette étude. Nous concluons par une liste (tab. 7) qui regroupe la parasitofaune méditerranéenne et du nord-est Atlantique ainsi que les critères d'identification qui pourraient faciliter les études futures de la parasitofaune de dicyémides dans ces régions.



## Clé d'identification des dicyémides méditerranéens et atlantique Nord

**Phylum Dicyemida (van Beneden, 1876).....1**  
Parasites vermiformes, corps allongé, renflement céphalique antérieur (calotte polaire), cellules périphériques bien développées, individualisées, ciliées, qui entourent la/les cellule(s) axiale(s).

- 1 Petite taille, forme du corps indéfinie, cellules périphériques  $\leq 12$ .....2  
1 Corps allongé, individus vermiformes, cellules périphériques  $\geq 16$ .....3

### **2 Famille des Conocyemidae**

Présence de 4 cellules polaires chez le vermiforme adulte.....4

Formes indéfinies du vermiforme adulte.....5

**4 Conocyema** : le genre est présenté par une seule espèce

*Conocyema polymorpha* van Beneden, 1882.

Vermiformes courts et massifs, calotte de forme irrégulière, 12 cellules périphériques, 37 cellules chez l'infusoriforme, 2 noyaux dans la cellule de l'urne.

**5 Microcyema** : le genre est présenté par une seule espèce :

*Microcyema vespa* van Beneden, 1882.

Adultes sans forme définissable, calotte de forme irrégulière, 10 cellules périphériques, 39 cellules chez l'infusoriforme, 1 noyau unique dans la cellule de l'urne, présence de l'embryon de Wagener.

### **3 Famille des Dicyemidae**

-Calotte octamère, 4 cellules propolaires et 4 métapolaires opposées ; calotte conique, 2 noyaux de la cellule de l'urne .....**Dicyema**

Adulte vermiforme de grande taille entre 5 et 6 mm, calotte conique, cellules périphériques entre 22 et 26 cellules, infusoriformes ayant 39 cellules, 2 noyaux dans la cellule de l'urne : **Dicyema moschatum**.

Adulte vermiforme de taille intermédiaire, 3 mm en moyenne, calotte conique, ou plate, cellules périphériques entre 22 et 26 cellules, infusoriformes ayant 39 cellules et de très petite taille (22  $\mu\text{m}$ ), 2 noyaux dans la cellule de l'urne : **Dicyema paradoxum**.

-Adulte vermiforme de petite taille environ 1 mm (0,9 mm en moyenne), calotte conique, cellules périphériques entre 18 et 19 cellules, infusoriformes ayant 35 cellules et de très petite taille (22  $\mu\text{m}$ ), 2 noyaux dans la cellule de l'urne : **Dicyema typus**.

-Calotte polaire formée de 4 cellules propolaires et 4 métapolaires, cellules propolaires et métapolaires alternes, différent des *Dicyema* par la position des deux types de cellules polaires les unes par rapport aux autres. : **Pseudicyema**

Une seule espèce : calotte plate, 22 cellules périphériques, infusoriforme ayant 39 cellules, 2 noyaux dans la cellule de l'urne : **Pseudicyema truncatum**.

-Calotte polaire des stades vermiformes formée de 4 cellules propolaires et 5 métapolaires : **Dicyemenea**.

Calotte polaire conique, 23 cellules périphériques infusoriformes ayant 37 cellules et de très petite taille (22  $\mu\text{m}$ ), un seul noyau dans la cellule de l'urne : **Dicyemenea eledones**



Dicyémides	Localité	Type de calotte	Nombre de cellules périphériques	Nombre de cellules de l'infusoriforme	Nombre de noyaux de l'urne
<b><i>Eledone moschata</i></b>					
<b><i>Dicyema moschatum</i> Whitman, 1883</b>	Méditerranée	conique	22-26	39	2
<b><i>Dicyemenea eledones</i> (Wagener), 1857</b>	Méditerranée	conique	23	37	1
<b><i>Eledone cirrhosa</i></b>					
<b><i>Dicyemenea eledones</i> (Wagener), 1857</b>	Méditerranée	conique	23	37	1
<b><i>Dicyemenea lameerei</i> Nouvel, 1932</b>	Méditerranée Manche	conique	23	37	1
<b><i>Octopus vulgaris</i></b>					
<b><i>Dicyema megalcephalum</i> Nouvel, 1934</b>	Mauritanie		16	inconnu	inconnu
<b><i>Dicyema monodi</i> Nouvel, 1934</b>	Mauritanie	conique	16	inconnu	inconnu
<b><i>Dicyema paradoxum</i> von Kolliker, 1849</b>	Méditerranée Mauritanie Manche	Plate ou conique	24-28	39	2
<b><i>Dicyema typus</i> van Beneden, 1876</b>	Méditerranée Mer du Nord Manche	conique	18,19	35	2
<b><i>Dicyemenea lameerei</i> Nouvel, 1932</b>	Méditerranée Manche	conique	23	37	1
<b><i>Conocyema polymorpha</i> van Beneden, 1882</b>	Méditerranée	irrégulier	12	37	2
<b><i>Sepia officinalis</i></b>					
<b><i>Dicyema whitmani</i> Furuya &amp; Hochberg, 1999</b>	Méditerranée	plat	26-28	39	1
<b><i>Pseudicyema truncatum</i> (Whitman), 1883</b>	Méditerranée Manche	plat	22	39	2
<b><i>Dicyemenea gracile</i> Wagener, 1857</b>	Méditerranée	conique	23	37	2
<b><i>Microcyema vespa</i> van Beneden, 1882</b>	Méditerranée Manche	irrégulier	10	39	1

<i>Sepia orbignyana</i>					
<i>Pseudicyema truncatum</i> (Whitman), 1883	Méditerranée Manche	plat	22	39	2
<i>Dicyemenea gracile</i> Wagener, 1857	Méditerranée	conique	23	37	2

Tableau 7. Inventaire de la parasitofaune de dicyémides en Atlantique et en Méditerranée (littérature et présent travail) ; selon les hôtes céphalopodes.

#### 5.1.4. Etude morphologique des chromidinés : résultats et discussion

##### 5.1.4.1 Résultats de l'étude morphologique des chromidinés

Au cours des campagnes d'échantillonnage 2011, 2012 et 2013, à Concarneau, nous n'avons pu prélever aucun échantillon de chromidinés. Seules les campagnes d'échantillonnages réalisées en Tunisie en 2013 et 2014 ont permis d'observer des chromidinés sur une seiche et sur cinq calmars.

#### **- L'espèce de chromidiné observée sur la seiche *Sepia officinalis* :**

Cette espèce de chromidiné a été obtenue sur les sacs rénaux d'une seiche *Sepia officinalis* nommée S50. Les observations directes après dissection de la seiche n'ont pas permis d'observer des chromidinés sur les sacs rénaux ; ils ont été observés par la suite, sur des frottis sur lames. Cependant, nous avons observé des parasites vermiformes qui se sont révélés être des dicyémides. Deux lames ont été fixées au Bouin et colorées à l'hématoxyline à partir de frottis de sacs rénaux de la seiche S50. Les morpho-espèces observées sur ces lames sont présentées dans la Figure 30. Nous avons observé plusieurs fois ce type de chromidiné et nous avons compté sur ces lames, 37 individus ayant le même aspect morphologique.

Ces parasites ont un corps moyennement long. La taille moyenne de ces individus chromidinés est de 253,1  $\mu\text{m}$  ( $\pm 93 \mu\text{m}$ ) (n=37). L'individu le plus court mesure 99,6  $\mu\text{m}$  et la longueur maximale observée sur ces parasites est de 481,1  $\mu\text{m}$ . La plupart (fréquence=9) des individus observés ont une taille comprise entre 200 et 225  $\mu\text{m}$  (Fig. 31).

Des taches de chromatine sont observables sur tout le corps mais ne forment pas de réseau correspondant à un macronoyau habituel de ciliés.

Ces chromidinés ne présentent pas de renflement céphalique globuleux. Cependant, l'apex est une continuation du corps sans élargissement céphalique et l'apex présente une forme pointue très marquée. La coloration met en évidence l'absence de bouche et la présence d'une papille apicale.

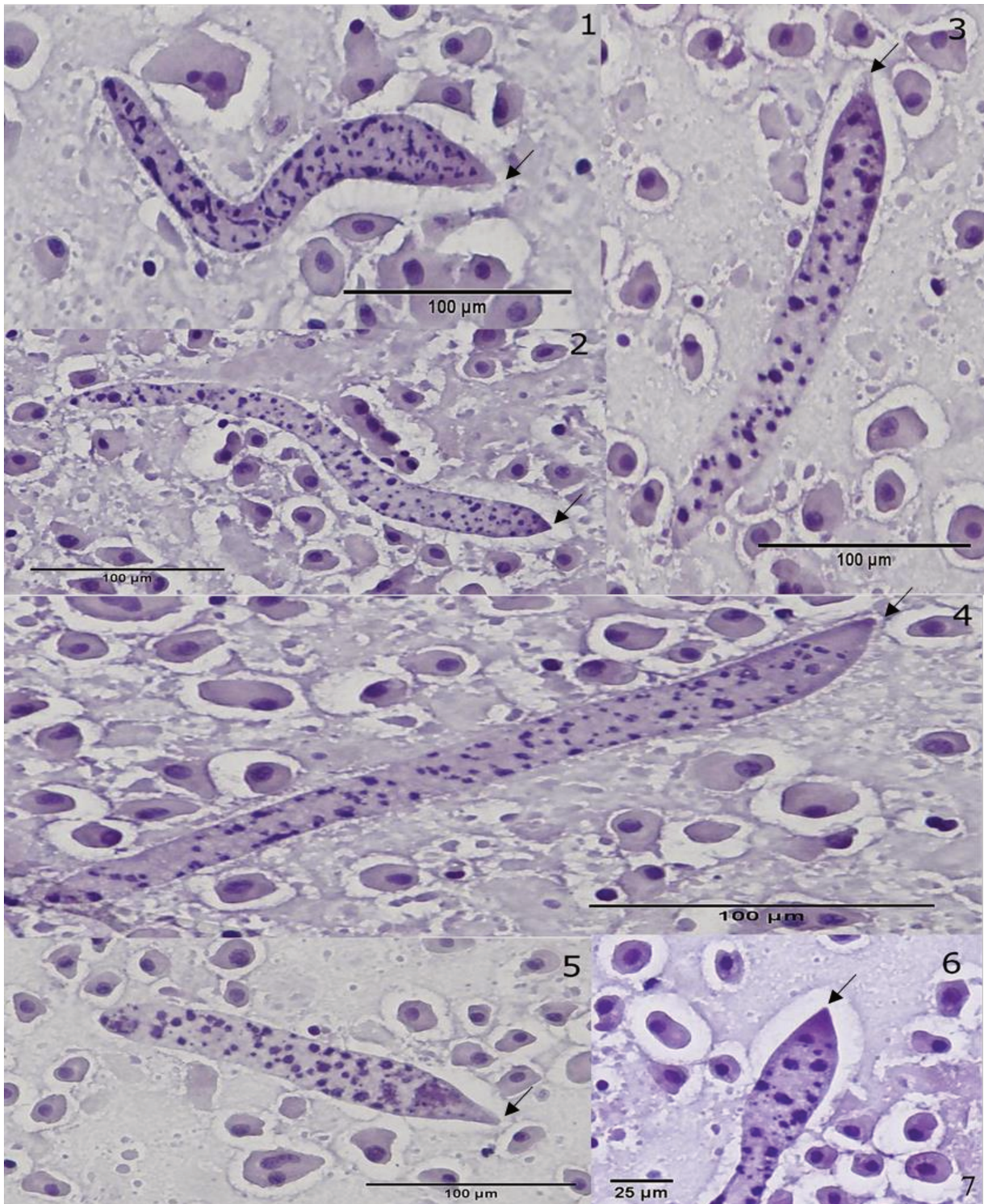
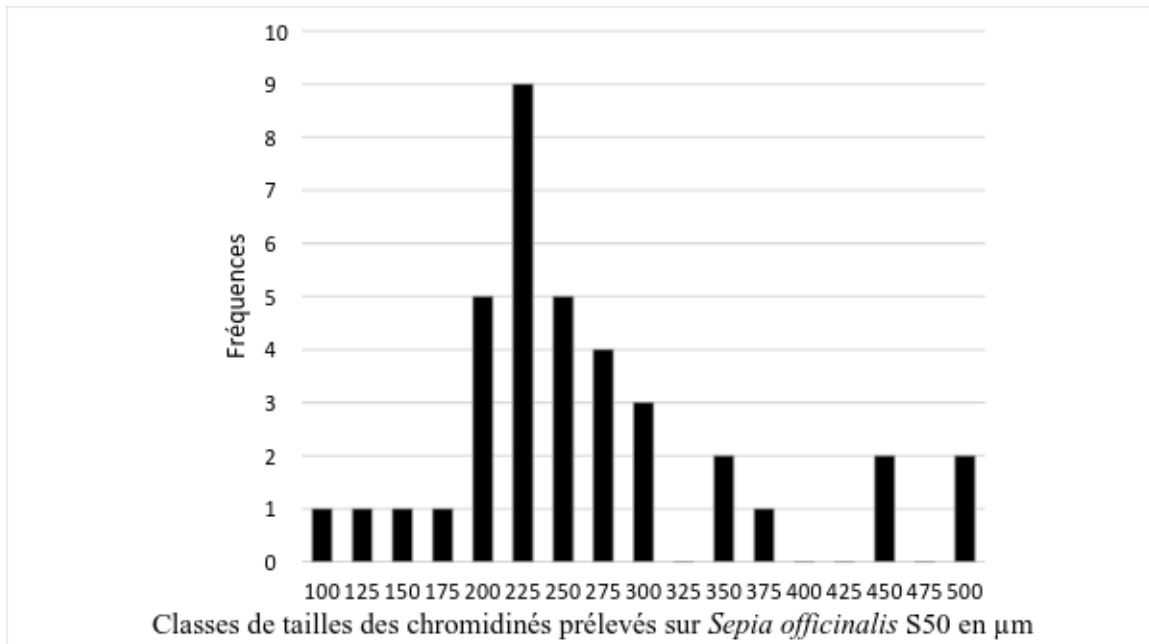


Figure 30. Morphologie de Chromidina de la seiche *Sepia officinalis* S50.

**De 1 à 5.** Plusieurs tropho-tomontes ayant différentes tailles (coloration à l'hématoxyline) mettant en évidence un corps vermiforme, court et relativement trapu. **6 :** Renflement céphalique ou apex qui a une forme pointue très marquée. La coloration met en évidence l'absence de bouche et la présence d'une papille apicale (flèche).



**Figure 31.** Distribution des classes de tailles pour les chromidinés prélevés sur l’hôte *Sepia officinalis* S50 (N=37 individus examinés).

- **L’espèce de chromidiné observée sur le calmar *Loligo vulgaris* : *Chromidina chattoni***

Au cours de la dernière campagne d’échantillonnage en Tunisie (2014), nous avons pu examiner des calmars de l’espèce *Loligo vulgaris* fraîchement pêchés. Des chromidinés vermiformes étaient très nombreux et denses, sur trois spécimens (C21, C22, C23) facilement observables grâce à leur grande taille qui peut atteindre une longueur maximale du corps de 1889 µm (Fig. 33). Cependant, les individus les plus fréquents sont de petite taille (entre 100 et 200 µm). Les individus les plus fréquents ont une largeur du corps entre 17 et 21 µm. La tête de ce chromidiné est nettement plus large que le corps et a une forme arrondie. Nous avons pu observer des segments primaires à la terminaison du tropho-tomonte ayant une forme différente de l’individu parental car il ne présente pas d’élargissement céphalique. D’autres tropho-tomontes réalisent des palintomies produisant des chaînes de tomites. Le macronoyau, présent sous forme de chromatine dissociée, ne forme pas de réseau apparent (Fig. 32).

La tête montre des cinéties partant du centre de l’apex au nombre de 13 spires.



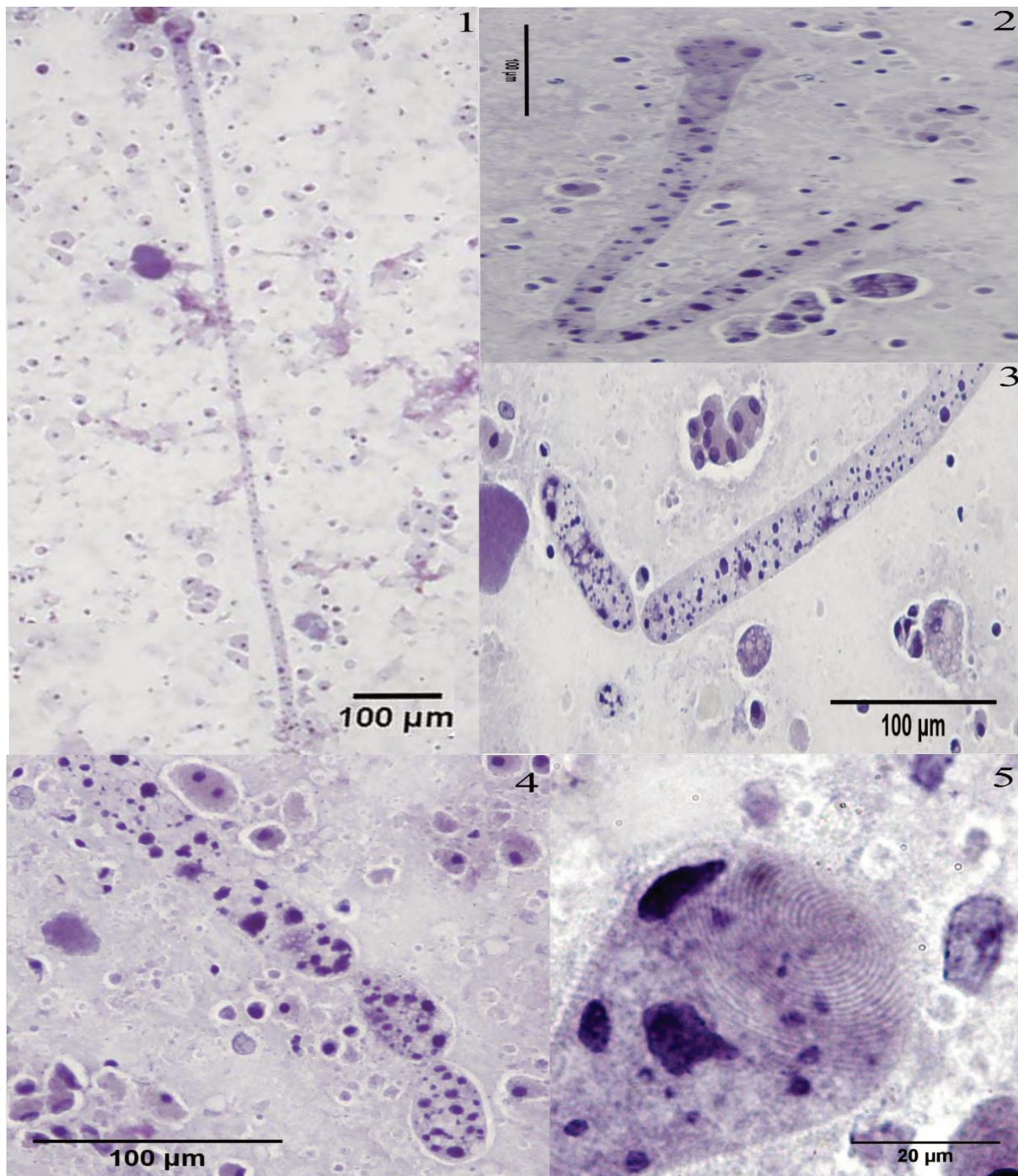


Figure 32. Morphologie de *Chromidina chattoni*.

**1** : Tropho-tomonte (coloration à l'hématoxyline), corps long droit. **2** : Tropho-tomonte montrant le renflement antérieur « céphalique ». **3** : Tropho-tomonte réalisant une monotomie produisant un segment primaire. **4** : Palintomie ou segmentation de la partie postérieure du chromidiné en tomites. **5** : Renflement céphalique ou apex, la coloration met en évidence un réseau hélicoïdal de 13 cinéties et l'absence de bouche.

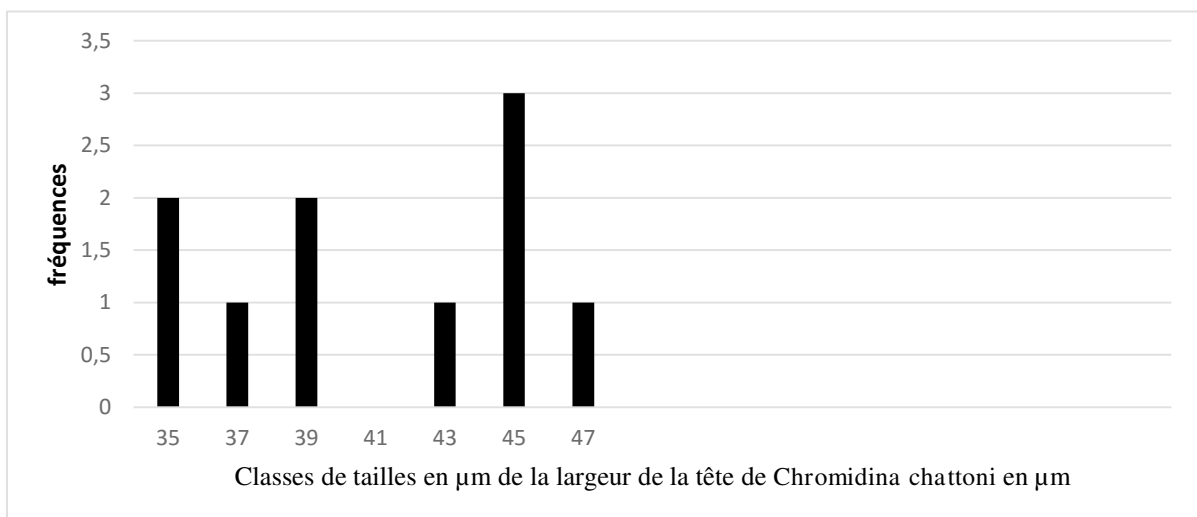
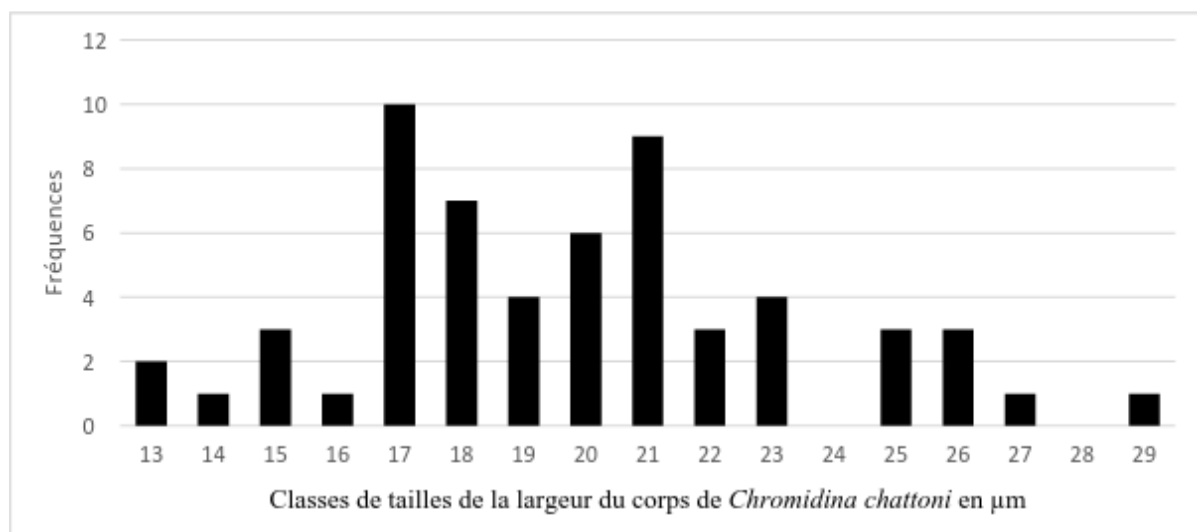
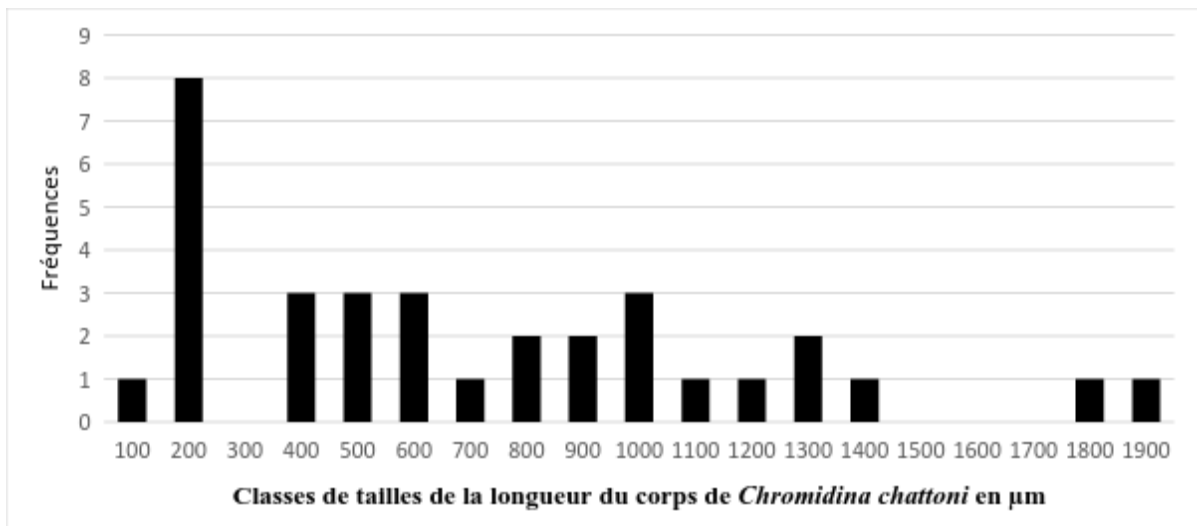


Figure 33. Distribution des classes de tailles pour *Chromidina chattoni* prélevés sur *Loligo vulgaris* (de haut en bas : Classes de tailles de la longueur totale du corps, Classes de tailles de la largeur totale du corps, Classes de tailles de la largeur de la tête de *Chromidina chattoni*).

#### 5.1.4.2. Discussion de l'étude morphologique des chromidinés.

Au cours des campagnes Concarneau 2011 et 2012, nous n'avons pas pu récolter d'échantillons de chromidinés. En effet, les embarcations du port de pêche de Concarneau pratiquant la pêche côtière sont, pour la plupart, des petits chalutiers raclant le fond marin et collectant ainsi des espèces benthiques et démersales (*Sepia officinalis*, *Eledone cirrhosa*, et *Sepia orbignyana*). Durant la campagne d'échantillonnage suivante à Concarneau (2013), nous avons eu l'occasion d'examiner 18 *Loligo vulgaris* mais qui ne présentaient pas de chromidinés sur leurs sacs rénaux. Ces calmars étaient de petites tailles (Annexe 1) et donc n'avaient pas encore atteint un âge et une taille permettant l'infestation par des chromidinés. De plus, les petits chalutiers pratiquant la pêche côtière sont amenés à pêcher des céphalopodes qui ont été rejetés vers la côte par d'autres pêcheurs et donc ces céphalopodes sont généralement pêchés morts. Sachant que les chromidinés ont une durée de vie très limitée après la mort de leur hôte (24 h au plus), il est difficile de les observer quand les hôtes ne sont pas frais.

Concernant la seiche S50, nous n'avons pas pu observer de chromidinés vivants sur les sacs rénaux de la seiche fraîchement pêchée. La coinfection des sacs rénaux de cette seiche par une autre espèce de parasite, le dicyémide *Pseudicyema truncatum*, qui est un parasite de taille plus importante, nous a certainement empêchés de les observer. Nous avons cependant pu observer les chromidinés sur les frottis réalisés à partir des sacs rénaux.

Les chromidinés observés pour la seiche S50 ont un macronoyau en forme de fragments dispersés et non en forme de réseau de chromatine. Ceci est peut être expliqué par deux hypothèses :

- Cet aspect du macronoyau pourrait présenter un phénomène de caryolyse, observé auparavant par Collin (1914, 1915) et par Hochberg (1990) chez les hypertrophontes (chromidinés longs pouvant aller jusqu'à 5000  $\mu\text{m}$  observés uniquement et rarement au début de l'infestation) de *Chromidina elegans*. Il pourrait être dû à une croissance en longueur très rapide. Cette hypothèse est peu probable dans le cas de nos chromidinés de S50 vu que les tropho-tomontes les plus longs observés font 481,1  $\mu\text{m}$  de longueur et nous n'avons pas pu observer d'hypertrophontes.

- Hochberg (1982) a observé un macronoyau fragmenté dans le cas des chromidinés fixés immédiatement après la dissection de céphalopodes fraîchement pêchés (ce qui est le cas de nos spécimens). Hochberg a relevé la limite des observations qu'on peut faire sur ce type de noyau. En effet, il explique que l'observation de la fragmentation ne reflète pas l'aspect réel du macronoyau car il existe des liaisons très fines entre les granules de chromatine. Ces liaisons ne sont pas donc mises en évidence par la coloration à l'hématoxyline, induisant ainsi l'observation d'un macronoyau fragmenté et non en réseau. Ces connections sont très difficilement observables même avec des colorations au Feulgen testées par Hochberg.

L'espèce de chromidiné prélevée sur *Sepia officinalis* est certainement une nouvelle espèce de part sa morphologie et parce que c'est la première fois qu'une espèce de chromidiné est décrite infestant ce céphalopode. Le corps court et la terminaison apicale en forme conique pointue sont caractéristiques de cette espèce. Des stades de développement avec une terminaison apicale similaire ont été observés chez *Chromidina cortezi* décrite par Hochberg (1971) sur les sacs rénaux de la seiche *Pterigioteuthis giardi*. Ces stades sont les stades phorontes secondaires, protropho-tomonte et apotomite qui présentent également une région apicale pointue. Le stade phoronte secondaire correspond à un stade immédiatement antérieur à l'infestation du céphalopode et donc sur l'hôte intermédiaire qui est probablement un crustacé. Le stade protropho-tomonte représente les premiers individus vermiformes peuplant les reins du céphalopode. Les apotmites sont des bourgeons longs résultant de la monotonie des tropho-tomontes qui vont coloniser les sacs rénaux.

Notre espèce diffère des stades phorontes car elle n'était pas observée chez l'hôte intermédiaire mais chez l'hôte définitif. Elle diffère également du protropho-tomonte qui est connu pour être la forme observée au début de l'infestation du céphalopode jeune fréquentant la zone épi et mésopélagique. Quand le céphalopode atteint la maturité sexuelle et s'installe dans le fond marin, il commence à perdre sa parasitofaune de chromidinés récupérée au cours de sa vie juvénile en zone pélagique, et qui sera progressivement remplacée par les dicyémides qui sont mieux adaptés à la vie benthique. Ainsi, les formes phoronte et protropho-tomonte ne peuvent être rencontrées que chez les céphalopodes épi et mésopélagiques. Dans le cas de la seiche S50, il s'agit de *Sepia officinalis* qui est une espèce vivant sur le fond et chez qui nous avons observé des dicyémides indiquant que S50 est en phase de perte des chromidinés qui sont en cours de



remplacement par des dicyémides. L'infestation de S50 par des chromidinés n'est donc pas récente mais au contraire en sa phase finale. Les formes de chromidinés observées chez S50 ne peuvent pas correspondre à des phorontes et protropho-tomontes de *Chromidina cortezi* qui ne sont observés qu'au début d'une infestation par des chromidinés, au début de la vie du céphalopode en zone pélagique.

Le stade apotomite de *Chromidina cortezi* présente un apex très pointu mais avec une augmentation nette de la taille de la tête globuleuse. Nous n'observons pas sur notre tropho-tomonte de S50 cette tête nettement plus large que le corps mais plutôt une tête filiforme sans une divergence marquée entre la taille du corps et de la tête du chromidiné.

Selon Hochberg (1982), *Chromidina cortezi* est spécifique de la seiche *Pterigoteuthis giardi* et est présent uniquement dans l'Océan Pacifique alors que les chromidinés de S50 sont signalés en Méditerranée (Tunisie) chez une espèce différente de seiche (*Sepia officinalis*)

Une nouvelle espèce de chromidiné est signalée pour la première fois chez *Loligo vulgaris* et en Méditerranée. Nous avons décidé de nommer cette espèce *Chromidina chattoni* en l'honneur du protistologue français Edouard Chatton et co-auteur de l'ouvrage de référence décrivant les apostomes et, entre autres, les chromidinés.

Cette espèce de chromidinés diffère des autres décrites dans la littérature par l'espèce d'hôte qu'elle infeste. En effet, *Chromidina elegans* est signalé chez *Sepia elegans*, *Sepia orbignyana*, *Todarodes sagittatus* et *Octopus vulgaris*; *Chromidina coronata* a été prélevée sur les reins d'*Eledone cirrhosa*, *Sepiola rondeleti*, *Scaevurgus unicolor*, *Illex coindetti* et *Octopus vulgaris*; *Chromidina cortezi* infeste les reins de *Pterigoteuthis giardi*; *Chromidina* sp. parasite le calmar *Illex coindetti*.

La parasitofaune méditerranéenne de chromidinés identifiés jusqu'à maintenant est composée des espèces *Chromidina elegans* et *Chromidina coronata*, échantillonnées à Banyuls-sur-mer et à Naples. Quant à notre espèce de chromidiné de calmars, elle est signalée pour la première fois sur le site de La Goulette en Tunisie.

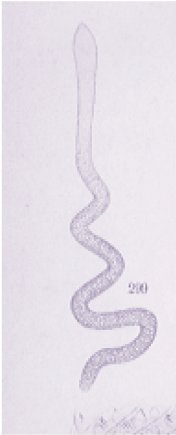



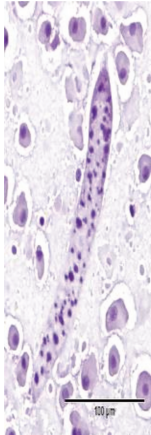
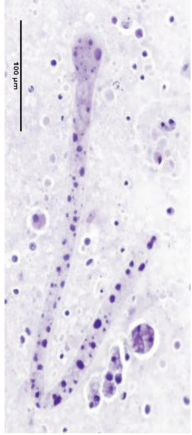
Les différences présentées par les chromidinés de *Loligo vulgaris* ne concernent pas uniquement la spécificité d'hôte et la localité, mais aussi les critères morphologiques :

- Ils se distinguent par une terminaison apicale de forme arrondie et globuleuse alors que *Chromidina elegans* est en forme de tête de club de golf et *Chromidina cortezi* a un

apex pointu, l'apex de *Chromidina coronata* est claviforme et celui de *Chromidina* sp. est en forme de bulbe.

- Certains tropho-tomontes de *Chromidina chattoni* que nous avons prélevés chez *Loligo vulgaris* réalisent une monotomie produisant un segment primaire qui pourrait devenir un apotomite. Ce stade de développement est absent chez *Chromidina elegans* et *Chromidina coronata*.
- Contrairement à *Chromidina cortezi* et *Chromidina elegans*, nous n'avons observé aucun hypertrophonte chez les chromidinés de *Loligo vulgaris*.
- Aucune chaîne palintomique n'a été observée chez *Chromidina coronata*. Dans notre étude, nous avons observé des spécimens de tropho-tomontes qui réalisent des chaînes palintomiques.
- Chez les autres espèces de chromidinés, le nombre de spires observées est de 12 ou 14. Nous avons compté sur plusieurs tropho-tomontes de calmars que nous avons observés, des cinéties formées de 13 spires.
- Le macronoyau observé ne présente pas de réseau de chromatine marqué. Nos chromidinés ont été fixés et colorés à partir de spécimens frais et en bon état, rapidement après la pêche des calmars et leur dissection. Nous excluons ainsi que cet état fragmenté du macronoyau soit dû à l'état de dégradation du parasite. Pareillement à ce que nous avons expliqué auparavant pour le cas des chromidinés de *Sepia officinalis*, il existerait probablement des liaisons très fines entre les granules de chromatine non observables avec ce type de coloration. Hochberg (1982) a signalé également que chez les tropho-tomontes en phase de palintomie on assiste à une fragmentation du macronoyau dû aux divisions que subi le corps pour produire des tomites.

Le tableau 8 est un tableau récapitulatif des principaux critères d'identification des espèces connues de chromidinés alors que le tableau 9 présente une liste des différentes espèces de chromidinés signalées et leurs localités.

Espèce	<b>Chromidina elegans</b> Gonder, 1905	<b>Chromidina coronata</b> Foettinger, 1881	<b>Chromidina cortezi</b> , Hochberg, 1971	<b>Chromidina</b> sp., Landers, 2010	<b>Chromidina</b> sp1. (présent travail)	<b>Chromidina</b> chattoni
Nombre de spires	14	inconnu	12	12	inconnu	13
Hôtes	<b>Sepia elegans</b> par Foettinger (1881) ; Gonder (1905) ; Dobell (1909) ; Collin (1914, 1915) <b>Sepia orbignyana</b> par Dobell (1909) Illex coindetti par Gonder (1905) et Dobell (1909) Loligo sp. par Wermel (1923) <b>Todarodes sagittatus</b> par Hoschberg (1971) <b>Octopus salutti</b> par Hoschberg (1971)	<b>Eledone cirrhosa</b> (Lamark, 1798) <b>Sepiola rondeleti</b> (Steenstrup, 1876) <b>Scaevargus unicirrhus</b> (d'Orbigny, 1839) <b>Illex coindetti</b> par Gonder (1905) et Dobell (1909) <b>Octopus vulgaris</b> (Lamark, 1700)	<b>Pterygioteuthis giardi</b>	<b>Illex coindetti</b>	<b>Sepia officinalis</b>	<b>Loligo vulgaris</b>
Localité	Japon, Banyuls-sur-mer et Naples	Naples, Italie	Golfe de Californie	Golfe du Mexique	La Goulette, Tunisie, Méditerranée	La Goulette, Tunisie, Méditerranée
Image						
Apex	pointu	claviforme	Pointu	En forme de bulbe	Pointu	Arrondi et globuleux

Couronne de cils	-	+	-	-	-	-
Présence d'apotomite	-	-	+	+	-	-
Présence d'hypertrophonte	+	-	+	-	-	-
Présence de tomite	+	-	+	+	-	+
Présence de vacuole	-	Inconnu	-	+	-	-

Tableau 8. Tableau récapitulatif des principaux critères d'identification des espèces connues de chromidinés.

	<u>Chromidinidés</u>	<u>Localité</u>	<u>Référence</u>
<b>ORDRE DES SEPIOIDEA</b>			
<b>Spirula spirula</b>	Chromidina ' <i>elegans</i> '	Nord-est de l'Océan Atlantique (Les îles Canary)	Jepps (1931), Clarke (1970)
<b>Sepia elegans</b>	Chromidina <i>elegans</i> (= <i>Benedenia</i> )	Méditerranée (Italie, Monaco, France)	Foettinger (1881), Gonder (1905), Dobell (1909), Collin (1914, 1915), Chatton et Lwoff (1931, 1935), Nouvel (1935, 1945)
<b>Sepia orbignyana</b>	Chromidina <i>elegans</i>	Méditerranée (Italie, Monaco, France)	Dobell (1909), Nouvel (1945)
<b>ORDRE DES SEPIOLIOIDEA</b>			
<b>Heteroleuthis hawaiiensis</b>	Chromidina sp.A	Partie nord du centre de l'Océan Pacifique (Hawaii, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Sepiola rondeleti</b>	Chromidina <i>coronata</i>	Méditerranée (France)	Collin (1915)
<b>S.rondeleti</b>	Opalinopsis <i>sepiolae</i>	Méditerranée (Italie, Monaco, France)	Foettinger (1881), Gonder (1905), Dobell (1909), Collin (1915)
<b>Sepia officinalis</b>	<b>Chromidina n. sp</b>	<b>Méditerranée : Tunisie</b>	<b>Présent travail</b>
<b>ORDRE DES TEUTHOIDEA</b>			
<b>Loligo sp.</b>	Chromidina ' <i>elegans</i> '	Japon (USSR)	Wermel (1928)
<b>Abralia trigonura</b>	Chromidina sp.C	Partie nord du centre de l'Océan Pacifique (Hawaii, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Abraliopsis brevis</b>	Chromidina sp.B	Partie nord du centre de l'Océan Pacifique (Hawaii, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Abraliopsis falco</b>	Chromidina sp.H	Nord-est de l'Océan Pacifique (California, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Abraliopsis felis</b>	Chromidina sp.H	Nord-est de l'océan pacifique (Mexico)	Hochberg (1971)
<b>Pterygioteuthis giardi</b>	Chromidina <i>cortezi</i>	Golfe de Californie / Nord- est de l'Océan Pacifique (Mexico)	Hochberg (1971)
<b>Pterygioteuthis microlampas</b>	Chromidina sp.F	Partie nord du centre de l'Océan Pacifique (Hawaii, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Gonatus sp.</b>	Chromidina sp.H	Nord-est de l'Océan Pacifique (Oregon, USA)	Hochberg (1971)
<b>Histioteuthis heteropsis</b>	Chromidina sp.G	Nord-est de l'Océan Pacifique (California, USA ; Mexico)	Hochberg (1971)
<b>Clenopteryx sacula</b>	Chromidina sp.D	Partie nord du centre de l'Océan Pacifique (Hawaii, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)

<b>Dosidicus gigas</b>	Chromidina sp.E	Golfe de Californie / Nord-est de l'Océan Pacifique (Mexico)	Hochberg (1971)
<b>Illex coindetti</b>	Chromidina elegans	Méditerranée (Italie, Monaco, France)	Gonder (1905), Dobell (1909), Nouvel (1945)
<b>I.coindetti</b>	Chromidina coronata	Méditerranée (Italie)	Dobell (1909)
<b>Sthenoteuthis oualaniensis</b> (=Symplectoteuthis)	Chromidina sp.E	Partie nord du centre de l'Océan Pacifique (Hawaii, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Todarodes pacificus</b> (=Ommastrephes sloanipacificus)	Chromidina sp.G	partie est du centre de l'Océan Pacifique (Japon)	Hochberg (1971)
<b>Todarodes sagittatus</b> (=Ommatostrephes)	Chromidina elegans	Méditerranée (Monaco, Spain)	Nouvel (1945), Hochberg (1971)
<b>Chiroteuthis calyx</b>	Chromidina sp.H	Nord-est de l'Océan Pacifique (Californie, USA)	Hochberg (Hochberg, 1990)
<b>Mastigoteuthis pyroides</b>	Chromidina sp.H	Nord-est de l'océan pacifique (Mexico)	Hochberg (1971)
<b>Loligo vulgaris</b>	<b>Chromidina chattoni</b>	<b>Méditerranée : Tunisie</b>	<b>Présent travail</b>
<b>ORDRE DES OCTOPODA</b>			
<b>Japatella diaphana</b>	Chromidina sp.G	Nord-est de l'Océan Pacifique (Californie, USA ; Mexico)	Hochberg (1971)
<b>Eledone cirrhosa</b> (=E.Aldrovandii, Acantheledone)	Chromidina coronata	English Channel (England), Méditerranée (Italie, France)	Gonder (1905), Nouvel (1935, 1937, 1945), Rees (1956), Mohr(Hochberg, 1990), Hochberg (1971)
<b>Octopus salutii</b> (=O.saluzzi)	Chromidina 'elegans'	Méditerranée (Monaco, France)	Nouvel (1945), Hochberg (1971)
<b>Octopus vulgaris</b>	Chromidina coronata	Méditerranée (Italie, Monaco, France)	Foettinger (1881), Gonder(1905)
<b>Scaevargus unicolor</b>	Chromidina 'coronata'	Méditerranée (France)	Hochberg (1971)

Tableau 9. Diversité des chromidinidés inventoriés sur les céphalopodes.



## **5.2. Etude moléculaire.**

### **5.2.1. Etude moléculaire des dicyémides.**

#### **5.2.1.1. Résultats de l'étude moléculaire des dicyémides.**

Plus de 500 préparations distinctes d'ADN ont été effectuées, correspondant à 1 à 4 isolats distincts de parasites par hôte inventorié, comme indiqué dans le chapitre Méthodologie. L'étude moléculaire de ces >500 échantillons d'ADN de parasites, nous a permis de réaliser l'assemblage de la plus grande partie du locus ADNr18S des dicyémides (~1600pb), pour 76 individus hôtes, soit 43% des hôtes observés infectés par des dicyémides lors des dissections. L'absence de données moléculaires pour les 57% restant résulte d'une absence d'amplification positive lors de tous les essais effectués ou encore, de l'obtention de données amplifiées non exploitables à l'issue du séquençage.

Les séquences de ces locis d'ADNr18S sont assemblées pour les 76 hôtes, soit 82 séquences car il y a des cas de coinfections chez certains hôtes. Nous les avons alignées entre elles et avec les 12 séquences de dicyémides disponibles dans les bases de données, avec l'aide du logiciel MAFFT (Katosh and Toh, 2010), par la méthode d'estimation de la probabilité d'appariement des bases en considérant l'information des structures secondaires des marqueurs ribosomiaux. Ainsi, nous pouvons mesurer, à l'aide de ce marqueur génétique, la similitude des séquences entre elles et avec les données de référence. Deux alignements ont été réalisés.

Le premier inclut les 82 séquences de notre étude, les 12 séquences de dicyémides disponibles dans les bases de données et les séquences de 4 groupes externes qui sont : *Daptonema* sp. (Nematoda, Xyalidae), *Theristus agilis*, de Man, 1880 (Nematoda, Xyalidae), *Polyarthra remata*, Skorikov, 1896 (Rotifera, Synchaetidae), *Lindia tecusa* (Harring & Myers, 1922) (Rotifera, Lindiidae), soit 98 séquences ; le second comprend toutes ces séquences à l'exclusion des groupes externes soit 94 séquences. Le nombre de bases prises en considérations dans les analyses ultérieures réalisées à partir de ces deux alignements sont 1299 bp pour le premier alignement et 1232 bp pour le second alignement.



### 5.2.1.1.1. Etude de la saturation de la substitution dans les alignements.

Nous avons réalisé une estimation de la saturation de la substitution sur le premier alignement (98 séquences, dont les 4 groupes externes), par la méthode de Xia (2003) dont les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Dans ce tableau, « N » représente le nombre d'unités taxonomiques (OTU) analysées simultanément ; « DF » est le nombre de nucléotides considérés dans l'analyse ; « ISS » représente l'index estimé de saturation des substitutions dans notre alignement ; « ISScSym » est l'index de saturation des substitutions critiques pour une topologie extrême symétrique et « ISScAsym » celui pour une topologie extrême asymétrique. Une valeur « ISS » supérieure à un index ISS critique indique une saturation du signal. La différence entre l'ISS et l'ISS critique est ensuite estimée par un test t bilatéral et la p-value est indiquée.

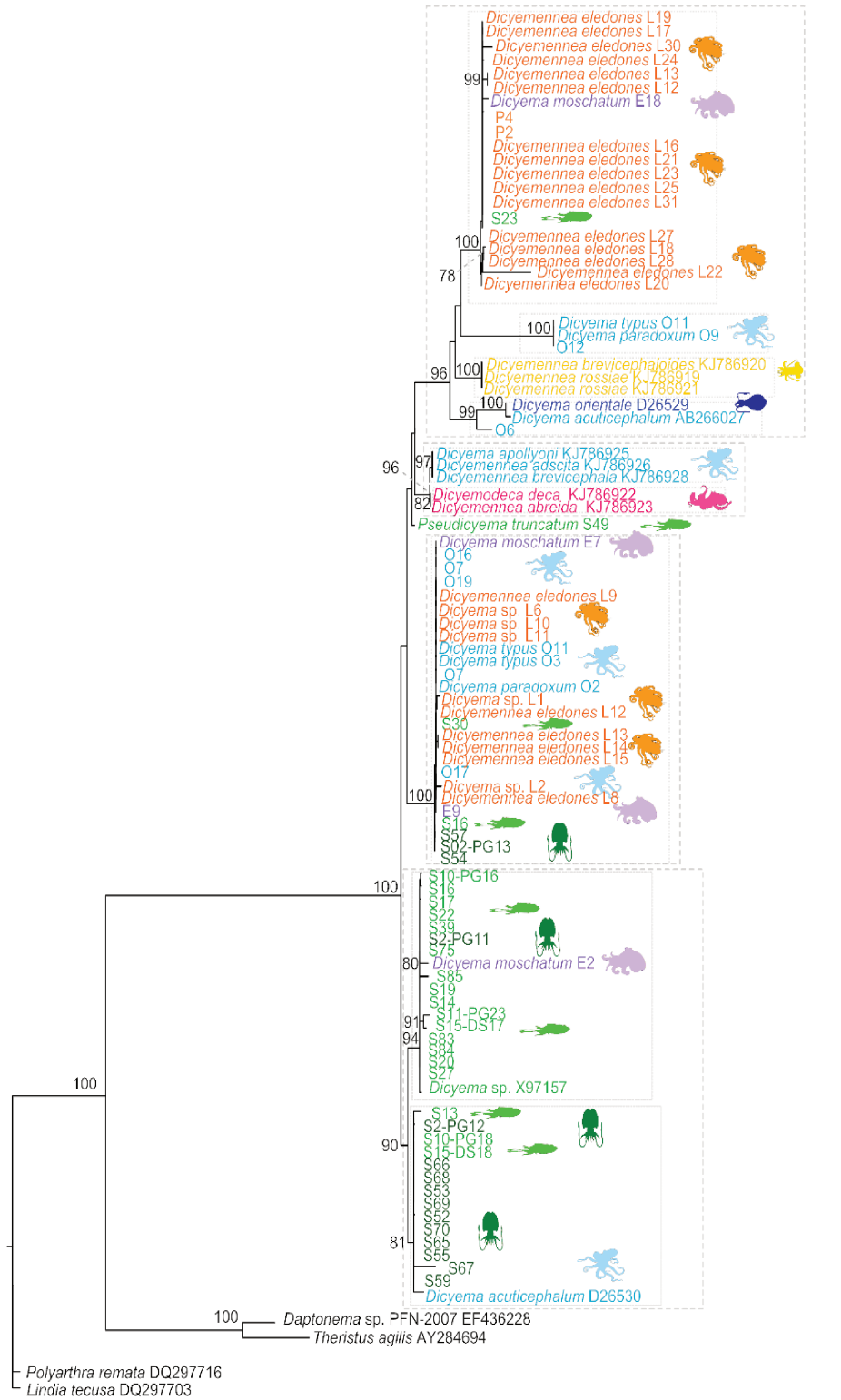
Nous remarquons d'après les valeurs du tableau 10 que l'« ISScSym » et « ISScAsym » sont bien supérieurs à l'« ISS ». Ainsi, ces valeurs confortent notre choix des groupes externes. Les p values obtenues sont hautement significatives.

Marqueur	N	DF	ISS	ISScSym	p-value	ISScAsym	p-value
ADNr 18S	4	1232	0,199	0,827	0	0,796	0
	8	1232	0,191	0,799	0	0,696	0
	16	1232	0,199	0,783	0	0,592	0
	32	1232	0,217	0,762	0	0,469	0
<u>ADNr 18S</u>	<u>4</u>	<u>1299</u>	<u>0,285</u>	<u>0,829</u>	<u>0</u>	<u>0,798</u>	<u>0</u>
<u>±</u>	<u>8</u>	<u>1299</u>	<u>0,298</u>	<u>0,802</u>	<u>0</u>	<u>0,7</u>	<u>0</u>
<u>groupes</u>	<u>16</u>	<u>1299</u>	<u>0,328</u>	<u>0,785</u>	<u>0</u>	<u>0,597</u>	<u>0</u>
<u>externes</u>	<u>32</u>	<u>1299</u>	<u>0,364</u>	<u>0,766</u>	<u>0</u>	<u>0,475</u>	<u>0,0018</u>









Tableau 10. Détection de phénomène de saturation des substitutions pour le marqueur ADNr 18S des dicyémides par la méthode de Xia (2003).

#### 5.2.1.1.2. Description de la topologie des arbres phylogénétiques.

A partir du premier alignement, le modèle d'évolution le mieux adapté a été sélectionné sur la base du critère d'information d'Akaike (AIC), par le programme JmodelTest (Darriba et al., 2012). Il s'agit du modèle : GTR+G+I. Le modèle GTR (pour Generalised Time-Reversible) sert à estimer l'évolution des séquences d'ADN et à évaluer leurs relations hiérarchiques. Il s'agit du modèle d'évolution à sites indépendants le plus général caractérisé par la propriété de réversibilité. Il intègre la proportion des sites invariables significatifs (I) et la distribution gamma estimée du taux de variation des sites (G). Le logiciel RaxML (Stamatakis, 2006) nous a généré un arbre à partir de l'alignement des 98 séquences, correspondant à la vraisemblance maximale, c'est-à-dire celui qui a la plus forte probabilité de décrire notre matrice de données sous le modèle d'évolution « GTR + G + I ». Cet arbre a été enraciné par des groupes externes avec des séquences d'ADNr 18S provenant de deux nématodes et de deux rotifères (Fig. 34).



Hôtes:

<i>Eledone moschata</i>		O	<i>Rossia pacifica</i>		S
<i>Eledone cirrhosa</i>		c	<i>Sepioteuthis lessoniana</i>		e
<i>Octopus vulgaris</i> et <i>O. rubescens</i>		t	<i>Sepia officinalis</i>		p
<i>Enteroctopus dofleini</i>		o	<i>Sepia orbignyana</i>		i
		p			d
		d			a
		a			

**Figure 34.** Arbre phylogénétique enraciné des dicyémides prélevés sur 76 individus hôtes, incluant 12 séquences d'ADNr 18S de dicyémides disponibles dans les bases de données et quatre séquences de groupes externes.

Le nombre de positions prises en compte est de 1299 pb. L'analyse phylogénétique a été réalisée par inférence du maximum de vraisemblance (ML), les bootstraps sont indiqués au-dessus des nœuds. Les espèces de céphalopodes hôtes infestées par des dicyémides ayant des séquences intégrées dans le jeu de données sont indiquées par des couleurs différentes : violet pour les dicyémides prélevés sur *Eledone moschata*, orange pour les dicyémides prélevés sur *Eledone cirrhosa*, bleu ciel pour les dicyémides prélevés sur les *Octopus vulgaris* et *O. rubescens*, rose pour les dicyémides prélevés sur *Enteroctopus dofleini*, jaune pour les dicyémides prélevés sur *Rossia pacifica*, bleu pour les dicyémides prélevés sur *Sepioteuthis lessoniana*, vert vif pour les dicyémides prélevés sur *Sepia officinalis*, vert foncé pour les dicyémides prélevés sur *Sepia orbignyana*. L'arbre est enraciné par deux espèces de nématodes (*Daptonema* sp. et *Theristus agilis*) et deux espèces de rotifères (*Polyarthra remata* et *Lindia tecusa*). Les numéros d'accès des séquences récupérées dans les bases de données sont indiqués sur les séquences sur l'arbre.

Afin de mieux visualiser les différents clades au sein des dicyémides, nous avons construit un arbre non enraciné (Fig. 35) en utilisant le deuxième alignement, pour lequel la recherche de meilleur modèle d'évolution a également indiqué : « GTR + G + I », par JModelTest. Cet alignement comprend donc les 94 séquences d'ADNr 18S de dicyémides (nos 82 nouvelles séquences et les 12 déjà présentes dans les bases de données) sans les groupes externes. Comme déjà indiqué, il prend en compte 1232 positions. Cet arbre permet de définir 10 clades au sein des dicyémides, nommés de I à X (Fig. 35). Les nœuds entre les différents clades sont fortement soutenus par un bootstrap égal à 100. Seul le nœud à la base de l'ensemble IV est moins soutenu que les autres avec un bootstrap de 77.

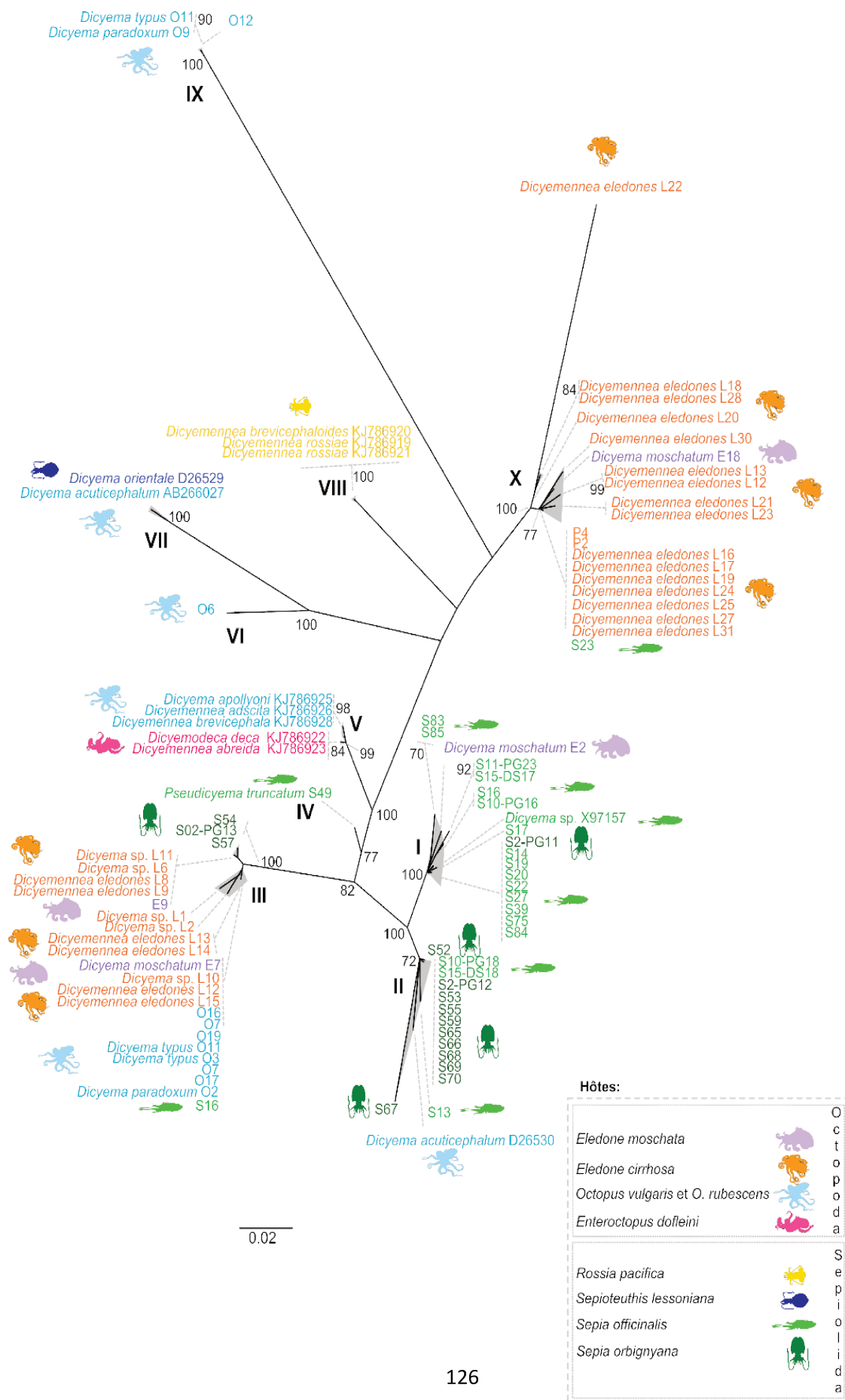
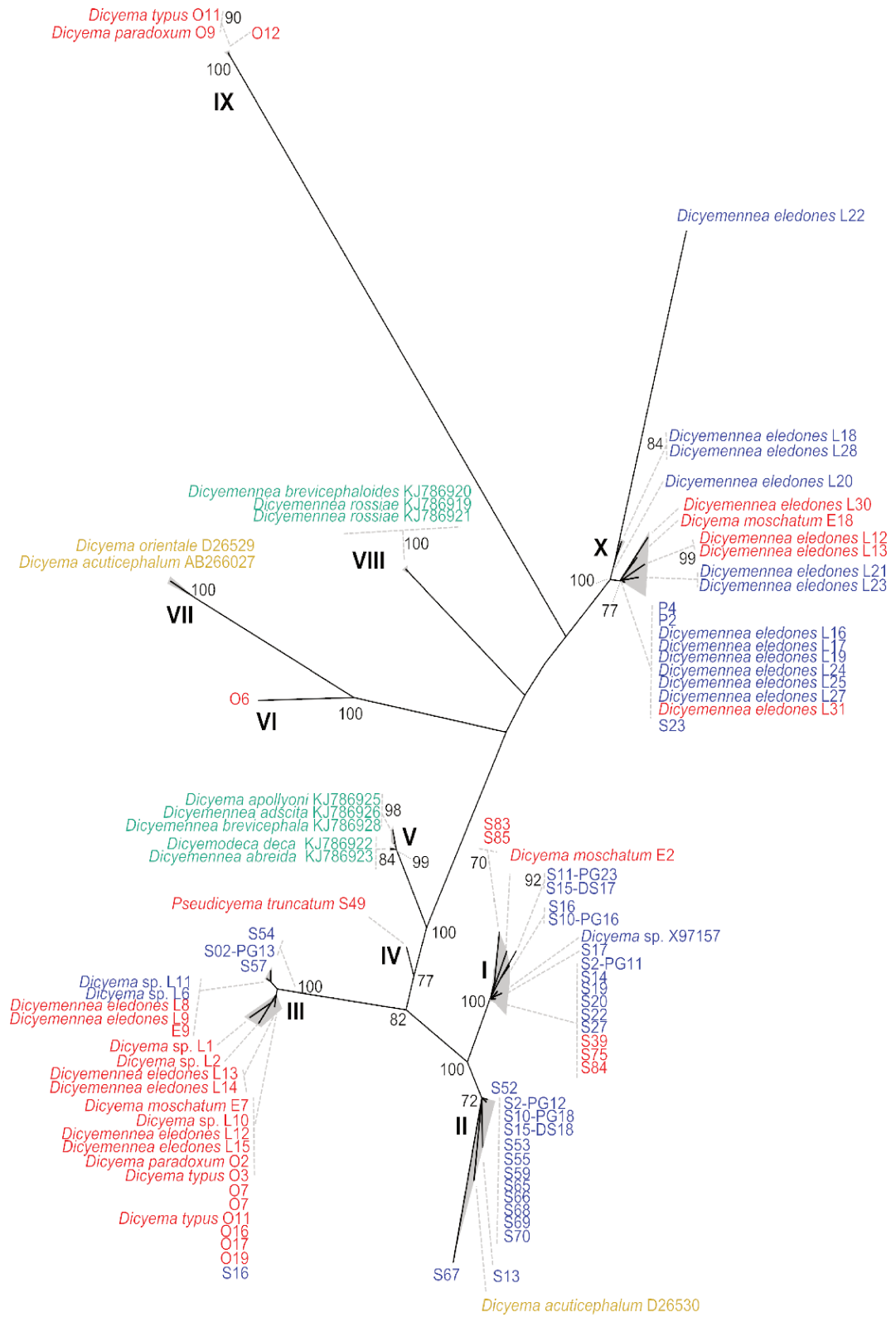


Figure 35. Arbre phylogénétique non enraciné des dicyémides prélevés sur 76 individus hôtes incluant 12 séquences d'ADNr 18S de dicyémides disponibles dans les bases de données.

Le jeu de données comprend 94 séquences et 1232 pb. L'analyse phylogénétique est réalisée par inférence du maximum de vraisemblance (ML), les bootstraps sont indiqués en face des nœuds. Les espèces de céphalopodes hôtes infestées par des dicyémides ayant des séquences intégrées dans le jeu de données sont indiquées par des couleurs différentes : violet pour les dicyémides prélevés sur *Eledone moschata*, orange pour les dicyémides prélevés sur *Eledone cirrhosa*, bleu ciel pour les dicyémides prélevés sur les *Octopus*, rose pour les dicyémides prélevés sur *Enteroctopus dolfleini*, jaune pour les dicyémides prélevés sur *Rossia pacifica*, bleu pour les dicyémides prélevés sur *Sepioteuthis lessoniana*, vert vif pour les dicyémides prélevés sur *Sepia officinalis*, vert foncé pour les dicyémides prélevés sur *Sepia orbignyana*. Les numéros d'accession des séquences récupérées dans les bases de données sont indiqués sur les séquences sur l'arbre.

Afin d'évaluer la répartition des clades entre les deux sites d'échantillonnage, nous avons présenté le même arbre, non enraciné, mais en utilisant un autre code couleur, prenant cette fois en compte les sites de prélèvement des hôtes. Nous remarquons que les clades I, III et X sont communs à nos deux sites d'échantillonnage, France et Tunisie. Le clade II semble seulement être présent en Atlantique ; aucune donnée de Tunisie n'appartient à ce clade. A l'inverse, les super-groupes IV et IX semblent être présents uniquement en Tunisie (Fig. 36).



0.02

**Pays de collecte:**

- Tunisie
- France
- Japon
- Canada

Figure 36. Arbre phylogénétique non enraciné des dicyémides de Méditerranée et d'Atlantique, prélevés sur 76 individus hôtes incluant 12 séquences d'ADNr 18S de dicyémides disponibles dans les bases de données.

Le jeu de données comprend 94 séquences et prend en compte 1232 pb. L'analyse phylogénétique est réalisée par inférence du maximum de vraisemblance (ML) les bootstraps sont indiqués en face des nœuds. Le lieu de prélèvement des dicyémides dont les séquences sont intégrées à ce jeu de données sont indiqués par des couleurs différentes. Le code couleur étant : séquences de dicyémides prélevés en France (Atlantique) : bleu ; séquences de dicyémides prélevés en Tunisie (Méditerranée) : rouge ; séquences de dicyémides prélevés au Japon (Océan Pacifique Est) : marron ; séquences de dicyémides prélevés au Canada (Océan Pacifique Est) : vert. Les numéros d'accession des séquences récupérées dans les bases de données sont indiqués sur les séquences sur l'arbre.



**-le clade I** : ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,12%. Il est composé majoritairement par des séquences de dicyémides prélevées sur des seiches *Sepia officinalis* (15 seiches). Une séquence prélevée à partir de l'élédone *Eledone moschata* E2 s'apparie avec les autres séquences de ce clade ainsi qu'une séquence de *Sepia orbignyana* (S2). Ce clade comporte des séquences de spécimens récoltés en Tunisie en 2013 et en 2014, et à Concarneau, uniquement en 2012.

**-le clade II** : ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,05%. Il est composé majoritairement par des séquences prélevées sur des seiches *Sepia orbignyana* (11). Trois séquences observées à partir de trois seiches *Sepia officinalis* (S10, S13 et S15) s'apparient avec les autres séquences de ce super-groupe. Ce clade comporte des séquences récoltées uniquement à Concarneau en 2012 et 2013.

**-le clade III** : ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,26%. Il est composé majoritairement par des séquences prélevées sur des poulpes et des éledones en Tunisie en 2013 et 2014. A Concarneau, des séquences du type III ont été amplifiées chez *Sepia orbignyana*, durant deux années différentes (2012, 2013).

**-le clade IV** : ce clade est représenté par une seule séquence obtenue à partir de dicyémides de *Sepia officinalis*. Il s'agit d'un type rare que nous n'avons pu prélever que sur S49, seiche pêchée en Tunisie en 2013.

**-le clade V** : ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,24%. Il présente exclusivement des séquences disponibles dans les bases de données générées à partir de dicyémides de céphalopodes prélevés dans des eaux canadiennes du Pacifique (Eshrag et al. (2015). Aucune de nos données ne leur sont apparentées.

**-le clade VI** : ce clade est représenté par une seule séquence obtenue à partir de dicyémides d'*Octopus vulgaris*. Il s'agit d'un type rare que nous n'avons pu prélever que sur le poulpe O6, pêché en Tunisie en 2013.

**-le clade VII** : ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,4%. Il correspond à des séquences disponibles dans les bases de données, générées à partir de dicyémides de céphalopodes des eaux japonaises (Katayama et al. 1995 , Aruga et Furuya, 2007).

**-le clade VIII** : ce clade présente une divergence intra-spécifique nulle dans notre analyse. Il est représenté par des séquences disponibles dans les bases de données générées à partir de dicyémides de céphalopodes des eaux canadiennes du Pacifique (Eshrag et al., 2015).

**-le clade IX** : ce clade présente une divergence intra-spécifique nulle dans notre analyse. Il est composé uniquement par des séquences prélevées sur les poulpes *Octopus vulgaris* O11, O12 et O9 en Tunisie en 2013.

**-le clade X** : ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,32%. Il est composé majoritairement par des séquences prélevées sur des *Eledones cirrhosa* pêchées en Tunisie en 2013 et en 2014, et à Concarneau en 2013. Des séquences du type X ont été observées une seule fois chez *Eledone moschata* en Tunisie en 2014 (E18) et une seule fois également chez *Sepia officinalis* (S23) en 2012 à Concarneau.

Le tableau 11 résume l'occurrence des différents clades chaque année et dans les deux sites d'échantillonnage, le nombre de séquences de dicyémides dans un clade donné et le nombre et le pourcentage de séquences de dicyémides appartenant à un clade donné, prélevé sur une espèce donnée de céphalopodes.

Clade N°	Conc. 2011	Conc. 2012	Conc. 2013	Tunisie 2013	Tunisie 2014	Statistiques au sein du clade
Clade I	+	+	-	+	+	-Total clade I =17 séquences de dicyémides -15 séquences de dicyémides prélevés sur <i>S. officinalis</i> →représentent 88,2% du clade I 1 <i>E. moschata</i> →5,9% 1 <i>S. orbignyana</i> → 5,9%
Clade II	-	+	+	-	-	-Total clade II =14 séquences de dicyémides -11 séquences de dicyémides prélevés sur <i>S. orbignyana</i> →représentent 78,7% du clade II 3 <i>S. officinalis</i> → 21,3%
Clade III	-	+	+	+	+	-Total clade III =24 séquences de dicyémides -11 séquences de dicyémides prélevés sur <i>E. cirrhosa</i> → 45,8% -8 <i>O. vulgaris</i> →33,3% -3 <i>S. orbignyana</i> →12,5% -1 <i>S. officinalis</i> → 4,3%
Clade IV	-	-	-	+	-	Retrouvé uniquement chez une seule seiche <i>S. officinalis</i> S49 en Tunisie en 2013
Clade VI	-	-	-	+	-	Retrouvé uniquement chez un seul poulpe <i>O. vulgaris</i> O6 en Tunisie en 2013
Clade IX	-	-	-	+	-	Représenté par 3 séquences de dicyémides prélevées sur <i>O. vulgaris</i> en Tunisie en 2013
Clade X	+	+	+	+	+	-Total clade X =20 séquences de dicyémides -18 <i>E. cirrhosa</i> →90% -1 <i>E. moschata</i> →5% -1 <i>S. officinalis</i> →5%

**Tableau 11.** Tableau représentant l'occurrence des différents clades au cours des différentes années d'échantillonnage et dans les deux sites (Tunisie, Concarneau).

### 5.2.1.1.3. Diversité génétique.

La diversité génétique chez les dicyémides a été estimée par le calcul des distances génétiques entre les différentes séquences d'ADNr 18S générées. L'étude de la divergence inter et intra spécifiques des clades permet de mettre en évidence la variabilité génétique pour l'ensemble des données au sein de ce groupe de parasites (tab. 12).

<b>Clade 1</b>	<b>Clade 2</b>	<b>divergence génétique (en %)</b>
I	I	0,12 %
II	II	0,05 %
III	III	0,26 %
IV	IV	n/c
IX	IX	0,00 %
V	V	0,24 %
VI	VI	n/c
VII	VII	0,40 %
VIII	VIII	0,00 %
X	X	0,32 %
I	III	3,10 %
I	VIII	6,73 %
I	V	3,95 %
I	IX	11,97 %
I	VI	7,13 %
I	IV	2,29 %
II	X	5,72 %
II	I	1,27 %
II	III	2,21 %
II	VIII	6,09 %
II	V	3,10 %
II	IX	11,15 %
II	VI	7,09 %
II	IV	1,24 %
III	VIII	6,49 %
III	V	3,69 %
III	IX	11,17 %
III	VI	7,47 %
III	IV	2,23 %
IX	VI	11,13 %
IX	IV	10,53 %
V	IX	10,93 %
V	VI	5,51 %
V	IV	1,86 %
VI	IV	6,28 %
VII	II	6,98 %
VII	X	5,70 %

VII	I	7,44 %
VII	III	7,39 %
VII	VIII	4,15 %
VII	V	6,17 %
VII	IX	10,73 %
VII	VI	3,64 %
VII	IV	6,98 %
VIII	V	4,25 %
VIII	IX	9,31 %
VIII	VI	4,45 %
VIII	IV	5,26 %
X	I	6,35 %
X	III	7,28 %
X	VIII	3,59 %
X	V	5,45 %
X	IX	10,18 %
X	VI	5,20 %
X	IV	5,33 %

Tableau 12. Estimation du taux de divergence entre les dix clades, par paires. Le nombre de sites différents est indiqué en pourcentage. L'estimation de l'erreur standard a donné une valeur nulle. Cette analyse a été réalisée à partir de 94 séquences nucléotidiques. Toutes les positions présentant des gaps et des informations manquantes ont été éliminées de l'analyse. Analyse évolutive générée par MEGA6 (Tamura, Stecher et al. 2013). n/c : non calculé. Le nombre de positions prises en compte dépend de la paire considérée.

Les clades IV et VI sont représentés par une seule séquence, aucune divergence génétique ne peut être calculée. Les clades VIII et IX ont une divergence intra-spécifique nulle car toutes les séquences sont identiques entre elles. Le clade II présente la variabilité génétique la plus faible parmi nos différents clades (0,05 %) et le groupe le plus hétérogène est le clade VII, qui présente le pourcentage de divergence intra-spécifique le plus élevé (0,40 %). La divergence intra-spécifique moyenne des groupes de séquences de dicyémides est de 0,14 % et est donc inférieure à la divergence inter-spécifique moyenne qui est de 6,14 %.

Afin de mieux illustrer la variabilité génétique entre nos différents clades, nous avons reporté ces taux de divergences sur l'arbre phylogénétique non enraciné de la figure 37, mettant en valeur des distances faibles entre les clades proches et des distances plus élevées entre les clades les plus divergents (Fig. 37).

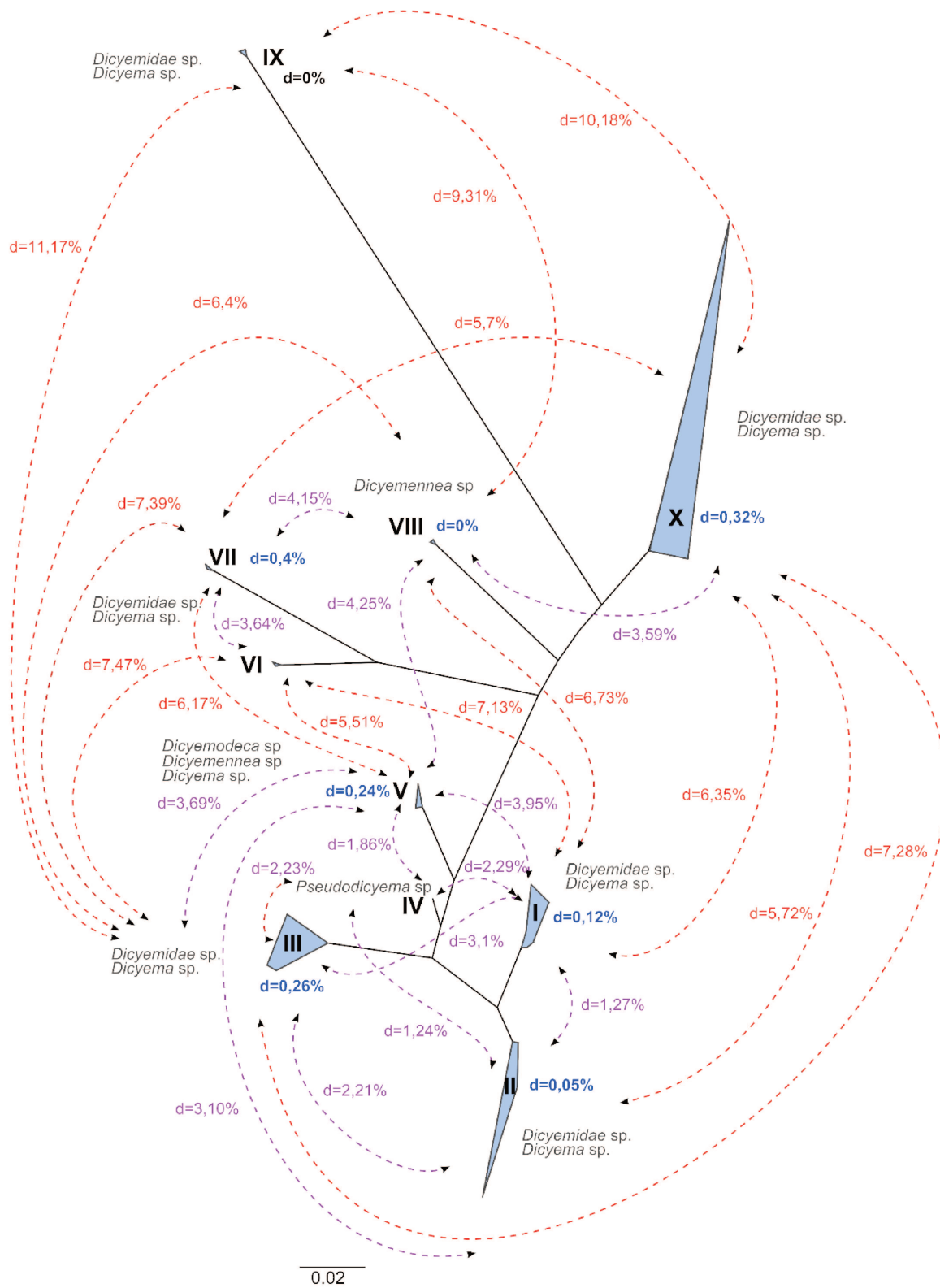


Figure 37. Représentation des divergences génétiques entre les différents clades de dicyémides.

Les différents clades sont indiqués par les chiffres romains (I à X) ; les genres qui ont pu être identifiés dans chacun de ces clades sont indiqués en noir (*Dicyema* sp., *Dicyemidae* sp., *Dicyemodeca* sp., *Dicyemenea* sp., *Pseudodicyema* sp.). Les divergences intra-spécifiques pour chacun des clades sont indiquées en bleu et les divergences inter-spécifiques sont notées en rouge et violet.



## 5.2.1.2. Discussion de l'étude moléculaire des dicyémides.

### 5.2.1.2.1 Diversité des clades et spécificité d'hôte.

Notre étude moléculaire, intégrant les données issues de la littérature, nous a permis de définir 10 clades parmi les dicyémides (Fig. 35). Les séquences d'ADNr 18S générées au cours de notre travail se regroupent dans 7 de ces clades : I, II, III, IV, VI, IX, X et ont permis de définir 5 nouveaux clades (clades III, IV, VI, IX, X). L'étude de l'arbre enraciné (Fig. 35) montre que les séquences se classent en deux grands groupes : le premier est formé par les clades I et II ; et le deuxième est formé par les clades III à X. Le nœud séparant ces deux groupes est soutenu par un bootstrap de 100.

**Le clade I** présente une divergence intra-spécifique faible de 0,12%. Les dicyémides du clade I sont distribués indifféremment entre le site méditerranéen d'échantillonnage et le site atlantique. 88,2% des séquences appartenant à ce clade correspondent à des dicyémides qui ont été prélevés sur des seiches *Sepia officinalis*. Les dicyémides du clade I sembleraient avoir cet hôte comme préférence. Ceci est conforté par la séquence X97157 de *Dicyema* sp. isolée de *Sepia officinalis* par (Pawlowski, Montoya-Burgos et al. 1996) qui clustérise avec ce clade. Cette spécificité d'hôte n'est cependant pas stricte car une séquence provient de dicyémides prélevés chez la seiche *Sepia orbignyana* (S2). Ceci n'est pas surprenant car ces deux espèces de seiches partagent les mêmes niches écologiques et de mêmes espèces de dicyémides sont connues pour infester à la fois ces deux types d'hôte comme par exemple *Pseudicyema truncatum* et *Dicyemenea gracile*, qui infestent les céphalopodes de l'ordre des Sepioidea (Wagener, 1857 ; Nouvel 1947, Hochberg 1990). Une séquence de dicyémide obtenue à partir de l'élédone *Eledone moschata* E2 clustérise également avec les séquences de ce clade, pour laquelle une morpho-espèce a été identifiée sans ambiguïté comme étant *Dicyema moschatum*. La faible divergence intra-spécifique de ce clade suggérerait que les spécimens de ce clade correspondraient à cette morpho-espèce. Cependant, aucune espèce de dicyémide n'a encore été signalée à la fois chez les *Eledone moschata* et les *Sepia*, et *Dicyema moschatum* n'a à ce jour jamais été signalée chez une seiche. Les *Eledone moschata* fréquentent essentiellement les eaux méditerranéennes (Mangold 1983). Elles sont rarement pêchées en Atlantique (Guerra 1992). La méditerranée est une zone encore peu prospectée pour la présence de dicyémides et

on ne connaît que deux espèces parasites de ce céphalopode, *Eledone moschata* (Wagener, 1857 ; Whitmann, 1883 ; Nouvel 1947).

**-le clade II** : ce clade présente une divergence intra-spécifique la plus faible de 0,05%. 78,8% de dicyémides sont prélevés sur *Sepia orbignyana* et 21,4% sont présentés par *Sepia officinalis*. Ce groupe clustérise avec la séquence D26530 récupérée dans les bases de données et nommée par erreur *Dicyema acuticephalum* au lieu de *Dicyema orientale*. Nous pensons en effet qu'il y a eu erreur lors de la soumission des séquences par les auteurs (Katayama, Wada et al. 1995) qui ont inversé les séquences car dans l'article, les morpho-espèces sont assignées à l'inverse de celles déposées dans la base de donnée NCBI. *Dicyema orientale* a été signalée dans le Pacifique par Nouvel (1947) sur la seiche *Sepioteuthis lessoniana*. Ce clade serait spécifique de l'ordre des Sepioidea puisque dans 3 études cette espèce n'a été signalée que chez des seiches. En dépit du grand nombre de seiches examinées en Tunisie, aucune n'a présenté d'infection par des dicyémides du clade II, contrairement aux seiches pêchées à Concarneau. Ceci pourrait être expliqué par une préférence des dicyémides du clade II pour *Sepia orbignyana* qui est absente en Tunisie.

**-le clade III** : ce clade présente une divergence intra-spécifique faible de 0,26%. Malgré cette faible divergence, il est très hétérogène en terme de morpho-espèces, il serait composé au moins des espèces *Dicyemenea eledones*, *Dicyema moschatum*, *Dicyema paradoxum* et *Dicyema typus*. Les dicyémides de ce clade présentent un caractère euryxène à spécificité large puisque 45,8% des céphalopodes infestés par les dicyémides du type III sont des *Eledone cirrhosa*, 33,3% *Octopus vulgaris*, 12,5% *Sepia orbignyana* et 4,2% *Sepia officinalis*. Ce clade aurait une distribution géographique large puisque nous avons pu le récolter en Tunisie ainsi qu'à Concarneau.

**-le clade IV** : ce clade est représenté par une seule séquence obtenue à partir de dicyémides de *Sepia officinalis* (S49) pêchée en Tunisie en 2013. Cette séquence correspond à la morpho-espèce *Pseudicyema truncatum*. Le genre *Pseudicyema* comprend cette seule espèce et a été créé par Nouvel (1947) qui a séparé cette espèce du genre *Dicyema* à cause de différences morphologiques surtout au niveau de l'organisation des cellules de la calotte polaire. La très faible représentativité de cette séquence parmi les 82 séquences obtenues est surprenante vue la forte prévalence observée pour cette morpho-espèce *Pseudicyema truncatum* (32%) lors de notre étude. Elle met en évidence un biais dans notre approche qui résulte certainement de

difficultés techniques à amplifier le locus de l'ADNr18S de cette espèce due à un jeu inapproprié d'amorces. Le nœud qui fait ce clade avec les autres est relativement soutenu (bootstrap de 77) et les pourcentages de divergences avec les autres clades (jusqu'à 10,5% avec le clade IX par exemple) soutiennent la séparation de ce genre des autres dicyémides.

**-les clades VI et VII :** le clade VI, représenté par la seule séquence du poulpe O6, et le clade VII, représenté par des séquences de *Dicyema acuticephalum* (voir commentaire sur *Dicyema acuticephalum* et *Dicyema orientale* dans le paragraphe concernant le clade II qui nous fait penser que les deux séquences de ces deux espèces correspondent en fait à celle de *Dicyema acuticephalum*) sont très proches (faible divergence génétique de 3,6% entre les deux clades) mais distincts si l'on considère la valeur de bootstrap de 100 du nœud qui les lie. Les lames réalisées à partir du poulpe O6 n'étaient malheureusement pas suffisamment informatives pour déterminer l'espèce sur le plan morphologique. Nous avons décidé de séparer les deux clades même si on peut penser que les dicyémides d'O6 pourrait être des *Dicyema acuticephalum* car cette espèce n'a été signalée que sur les *Octopus vulgaris* au Japon (Nouvel, 1947).

**-le clade IX :** ce clade présente une divergence intra-spécifique nulle dans notre analyse. Il est composé uniquement par des séquences issues des poulpes *Octopus vulgaris* O11, O12 et O9 en Tunisie en 2013. Deux interprétations sont possibles. Il pourrait y avoir une spécificité géographique de ce dicyémide qui infeste uniquement des céphalopodes des eaux tunisiennes. Cependant, les dicyémides du type IX auraient plutôt une spécificité phylogénétique qui fait qu'ils n'infestent qu'*Octopus vulgaris*. Une étude des dicyémides de poulpes d'autres localités pourrait trancher entre les deux possibilités. L'espèce *Octopus vulgaris* était absente dans les pêcheries de Concarneau.

**-le clade X :** ce clade présente une divergence intra-spécifique de 0,32%. 90% des séquences ont été prélevées sur des *Eledone cirrhosa* pêchées en Tunisie en 2013 et en 2014, et à Concarneau en 2013. Une séquence du type X a été observée une seule fois chez une *Eledone moschata* en Tunisie en 2014 (E18) et chez *Sepia officinalis* (S23) en 2012 à Concarneau. *Eledone moschata* et *Sepia officinalis* seraient des hôtes accidentels des dicyémides de ce clade. L'étude morphologique indique que les séquences de type X sont assignées à la morpho-espèce *Dicyemenea eledones*. Cependant une morpho-espèce *Dicyema moschatum* retrouvée chez *Eledone moschata* (E18) est également regroupée à ce clade.

Il ressort de notre étude que la spécificité d'hôte peut être large. Les séquences du clade III par exemple ont été prélevées sur *Eledone cirrhosa* et *Eledone moschata* principalement, mais également sur *Sepia orbignyana* et *Sepia officinalis*. Certains auteurs suggèrent que les dicyémides auraient un large spectre d'hôte (Whitman, 1883, Nouvel, 1947) alors que d'autres privilégient une spécificité stricte (Beneden 1876; Furuya et Hochberg 1999; Furuya et Hochberg 2002; Furuya 2006). Notre étude montre que les dicyémides peuvent infester des hôtes préférentiels mais qu'il pourrait y avoir des infestations accidentelles d'autres espèces d'hôtes sympatriques. La transmission des dicyémides d'un hôte à un autre s'effectue probablement lors de l'ingestion d'une proie qui serait un hôte intermédiaire. Dans le cas des dicyémides du clade III, *Eledone cirrhosa* et *Eledone moschata* partagent les mêmes habitats et les mêmes proies. Les deux espèces de céphalopodes peuvent ainsi se rencontrer et échanger leur parasitofaune. Ce type d'infestation par la même espèce de dicyémide chez des hôtes du même genre a été déjà signalé auparavant (Furuya, 1999, Catalano et al., 2015). La question de la spécificité d'hôte des dicyémides reste cependant toujours d'actualité tant que des problèmes d'identification morphologique détaillée persistent pour certaines espèces, et surtout tant que les études moléculaires n'arrivent pas à préciser la notion d'espèce chez ces parasites.

#### 5.2.1.2.2. Définition d'espèce chez les dicyémides : morphotype versus genotype.

Darwin a refusé de donner une définition d'une espèce et considère que toute définition est erronée en démontrant que cette notion d'espèce ne prend pas en compte la pression de l'évolution. Les études post-darwiniennes ont opté pour une conceptualisation des espèces selon les critères pris en considération sans qu'un concept réussisse à faire l'unanimité. Généralement, la limite des espèces chez les Eucaryotes est souvent basée sur la barrière reproductive impliquant que la notion d'espèce selon le concept biologique (Mayr 1982) se définit par une population interféconde entre ses taxons et capable d'engendrer une progéniture d'individus fertiles.

L'objectif de notre étude est de vérifier par des outils moléculaires si la morphologie permet de définir la notion d'espèces chez les dicyémides. Les études de ces parasites ce sont toujours basées sur le concept typologique, qui énonce qu'une espèce est un groupe d'organismes ayant une organisation morphologique semblable. Par ailleurs, ce concept implique forcément qu'une variabilité morphologique observée doit forcément refléter une variabilité génétique (Mayr 1969; Lincoln, Boxshall et al. 1982). Notre étude tend à montrer que ce dernier concept ne s'applique pas aux dicyémides. En effet, l'association des données moléculaires des séquences

d'ADNr 18S des dicyémides aux données morphologiques a permis de souligner que pour certains cas, une morpho-espèce appartient à différents clades ou inversement plusieurs morpho-espèces sont assignées à un même clade. Par exemple :

-La morpho-espèce *Dicyemenea eledones* prélevée sur des *Eledone cirrhosa* a été assignée à des séquences des clades III et X.

-La morpho-espèce *Dicyema moschatum* a été retrouvée dans les clades I, III et X.

-Les morpho-espèces *Dicyema typus* et *Dicyema paradoxum* sont associées à plusieurs clades et dans le clade IX, présentent les mêmes séquences d'ADNr 18S.

- Dans le clade III, des séquences d'ADNr 18S très similaires (divergence génétique de 0,26%) sont attribuées à quatre morpho-espèces différentes : *Dicyemenea eledones* (L12, L15), *Dicyemenea moschatum* (E7), *Dicyema typus* (O11, O13) et *Dicyema paradoxum* (O2).

Cette situation soulève la question de la pertinence des études morphologiques pour la définition d'espèces chez les dicyémides et inversement, la pertinence du marqueur ADNr 18S pour un génotypage des différentes espèces de dicyémides.

Cette divergence pourrait être le résultat de mauvaises identifications de notre part mais ceci est peu probable. Nous nous sommes attachés lors de notre étude, à intégrer les caractères morphologiques considérés comme les plus pertinents à l'heure actuelle, comprenant une description morphologique complète de tous les stades de développement surtout des embryons infusiformes (Nouvel 1947; Furuya 1999; Furuya et Hochberg 1999; Furuya, Hochberg et al. 2004). Ceci nous a amené à re-décrire l'espèce *Dicyemenea eledones* de l'hôte *Eledone cirrhosa*, en particulier la caractérisation des embryons vermiformes et infusiformes dont la description était partielle ou manquante. Les morpho-espèces identifiées lors de cette étude, ne l'ont été qu'à partir de frottis dont les qualités de fixation et de coloration nous ont permis une détermination sans ambiguïté. Ainsi, des morpho-espèces ont pu être identifiées sans ambiguïté pour seulement 53 (30%) des 175 céphalopodes infestés. Il a été noté que 5 (9,4%) de ces 53 céphalopodes présentaient des cas de co-infections.

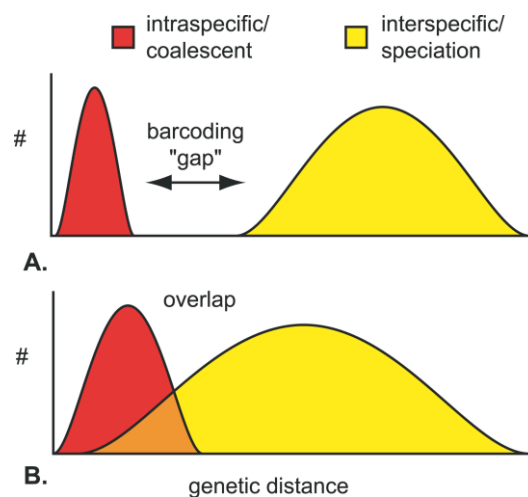
Ces cas de co-infections sont certainement sous-estimés et peuvent être un facteur important pouvant expliquer, au moins en partie, la divergence observée entre données morphologiques et moléculaires. Il est probable que le frottis d'un bout du rein ne reflète pas toute la faune de dicyémides présente dans un hôte. En effet, en cas de co-infection, les dicyémides occupent

différentes niches écologiques au sein des sacs rénaux pour éviter la compétition (Furuya, Hochberg et al. 2003). Nous avons été sélectifs dans le choix des séquences analysées par l'élimination des amplifications présentant des séquences ambiguës reflétant une co-infection, et pour certains cas en réalisant un clonage des produits d'amplification. Cependant, le prélèvement d'un échantillon de parasites pour l'étude moléculaire ne garantit pas que ceux-ci soient exactement ceux que nous observons sur les lames. Ce qui peut expliquer que pour une morpho-espèce observée, l'amplification de l'échantillon d'ADN peut permettre d'amplifier l'espèce majoritaire observée sur les lames comme il peut également amplifier une espèce non observée sur les lames. De même, le cas de *Pseudicyema truncatum* a montré que notre approche moléculaire est en partie biaisée par l'utilisation d'amorces inappropriées pour amplifier toutes les espèces de dicyémides (faible représentativité des séquences de *Pseudicyema truncatum* alors que 32% des 53 céphalopodes où des morpho-espèces ont été clairement identifiées, sont infestés par *Pseudicyema truncatum*). Cette difficulté peut être contournée par la conception d'amorces spécifiques de chaque espèce de dicyémide. La solution idéale serait de pouvoir extraire et amplifier l'ADN de dicyémides prélevés directement sur lames après identification morphologique. Si cette méthode est applicable pour des microorganismes fixés à l'éthanol, au méthanol ou au formaldéhyde neutralisé, aucune étude n'a encore démontré la faisabilité sur des spécimens fixés au Bouin puis colorés à l'hématoxyline et contre colorés à l'éosine comme pour les frottis de dicyémides que nous avons réalisés.

La confrontation des données morphologiques et moléculaires souligne également l'absence de corrélation entre les genres des dicyémides et les clades. Par exemple, nous trouvons souvent les genres *Dicyema* et *Dicyemenea* qui clustérisent ensemble au sein d'un même clade (I, III, X). Cette absence de polytomie selon le genre est confortée par des observations sur les phylogénies inférées des travaux d' Eshragh et Leander (2014) et de Catalano, Whittington et al. (2015) qui montrent des morpho-espèces de genres différents clustérisant ensemble. La notion du genre chez les dicyémides se base essentiellement sur la forme, l'organisation et la composition de la calotte polaire (voir section 1.4, systématique du chapitre I). Eshragh et Leander (2014) pensent que ces critères ne définissent pas des genres différents mais une plasticité morphologique de la forme de la calotte polaire, et Catalano, Whittington et al. (2015) indiquent la nécessité d'une révision des genres des dicyémides. Cependant, ces études ne prennent pas en compte l'incidence de co-infestations qui peut induire l'observation d'une

morpho-espèce donnée majoritaire sur les lames et l'amplification d'une autre espèce dans l'échantillon prélevé pour l'extraction de l'ADN. La partie Matériels et Méthodes de ces travaux indique que les extractions d'ADN de dicyémides ont été faites à partir d'un ensemble d'individus parasites prélevés sur les reins. Aucune de ces études n'a amplifié et séquencé de l'ADN à partir d'un seul individu parasite préalablement identifié morphologiquement.

Quelle est la pertinence du marqueur ADNr 18S pour un génotypage des différentes espèces de dicyémides ? Constitue-t-il un bon marqueur pour une approche de barcode ? L'objectif du barcoding moléculaire est de permettre de déterminer à quelle espèce appartient un échantillon d'origine à priori inconnue. Elle est basée sur l'analyse de marqueurs génomiques conservés qui présentent une faible variabilité intra-spécifique et une forte variabilité interspécifique permettant de définir un seuil limite de variabilité discriminante entre deux espèces (Fig. 38, « barcoding gap ») (Hebert, Cywinska et al. 2003; Meyer et Paulay 2005).



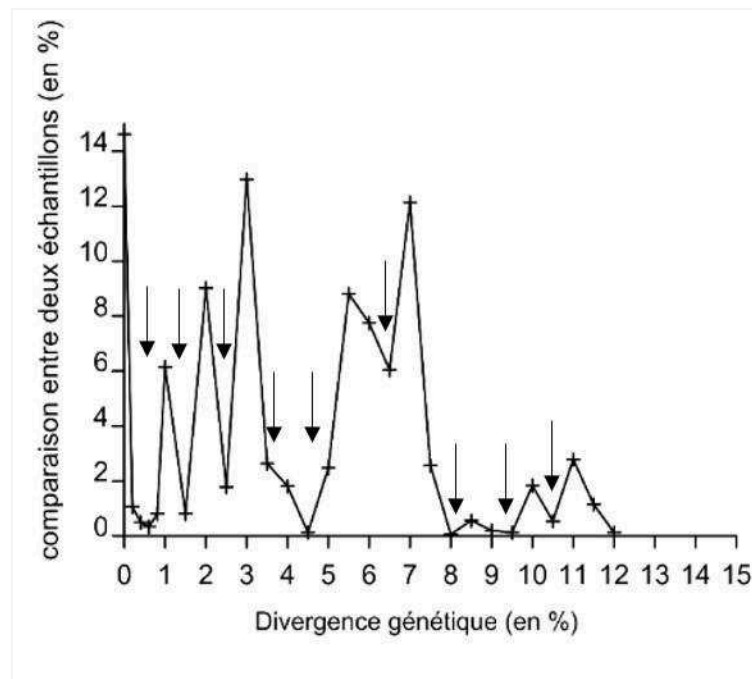
**Figure 38.** Représentation schématique du seuil limite.

La distribution de la variation intra-spécifique est en rouge alors que la divergence inter-spécifique est représentée en jaune. **(A)** est une représentation idéale pour une approche barcode dans un monde parfait avec une discrimination nette sans chevauchement des deux distributions. **(B)** est une version plus réelle représentant un chevauchement entre les deux types de variations plutôt qu'un « gap » (Meyer et Paulay 2005).

Le gène de la sous-unité de cytochrome oxidase (CoxI ou COI) a été initialement considéré comme le marqueur de prédilection pour une approche de barcoding (Hebert, Cywinska et al. 2003). Depuis, de nombreux travaux ont montré que celui-ci est inadéquat selon les taxons considérés et la nécessité d'associer plusieurs marqueurs génomiques est démontrée. Dans le

cas des microorganismes eucaryotes, le marqueur ADNr 18S reste encore le marqueur de référence, bien que l'association de plusieurs marqueurs soit nécessaire pour une identification au niveau de l'espèce pour certains taxons (ex : des parasites kinétoplastidés).

Dans notre étude, le marqueur ADNr 18S des dicyémides montre une divergence génétique moyenne intra-spécifique de 0,14 % (0,05% à 0,4%) au sein d'un même clade donc quasi nulle, mais une divergence génétique inter-spécifique moyenne importante de 6,14% (1,24% à 11,97%) entre clades. Cette dernière divergence montre une forte variabilité interspécifique au sein des dicyémides pour ce marqueur. L'analyse globale des divergences génétiques au sein des différentes séquences obtenues (Fig. 39) met clairement en évidence au moins 9 seuils de divergences génétiques qui reflètent les différents clades identifiés.



**Figure 39.** Analyse des divergences génétiques au sein des 76 séquences d'ADNr 18S de dicyémides obtenues au cours de notre étude. Flèches : seuils de divergences.

Ces résultats préliminaires tendent à montrer que l'ADNr 18S pourrait constituer un marqueur approprié pour le barcoding des dicyémides avec une valeur limite de variabilité de 0,5% à 1% pour différencier deux espèces. Ces observations nécessitent cependant d'être confortées par un échantillonnage plus important de spécimens des différents clades. Le marqueur moléculaire de l'ADNr 18S a été proposé comme marqueur pertinent pour le barcode de plusieurs espèces



de parasites (Hopkins, Meloni et al. 1997; Holterman, van der Wurff et al. 2006; Holterman, Holovachov et al. 2008; Leander 2008). Ce marqueur a été également suggéré comme marqueur suffisant pour définir la limite entre les espèces de dicyémides par Eshragh et Leander (2014).

La divergence observée entre morpho-espèces et séquences de l'ADNr 18S des dicyémides reste problématique. Comme proposé par Eshragh et Leander (2014), et Catalano, Whittington et al. (2015), est-ce qu'une plasticité phénotypique des espèces pourrait expliquer une telle divergence et nécessiterait une redéfinition profonde des genres des dicyémides? Quelle est la part de cette plasticité phénotypique ? Les travaux de nos prédécesseurs ont cependant montré des différences morphologiques importantes entre « espèces », autres que la forme de la calotte ou le nombre et le positionnement des cellules polaires, comme par exemple sur la structuration des infusiformes, qui nous semblent difficile à expliquer par une plasticité phénotypique et une adaptation à une niche écologique. Est-ce que l'ADNr 18S, bien qu'il présente des propriétés intéressantes comme marqueur de barcode, constitue un marqueur pertinent pour relier morpho-espèces et génotypes des dicyémides? Ces questions restent ouvertes. Nos tentatives d'amplifier parallèlement à l'ADNr 18S, le gène *CoxI* des dicyémides afin d'estimer la pertinence de ce marqueur pour une approche de barcoding et une convergence avec les morpho-espèces, se sont avérées hélas infructueuses pour l'instant.

### 5.2.2. Etude moléculaire des chromidinés : résultats et discussion.

#### 5.2.2.1. Résultats de l'étude moléculaire des chromidinés.

Les premières PCR réalisées sur les ADNs de chromidinés étaient infructueuses car nous n'avions aucune séquence de référence nous permettant de concevoir des amorces spécifiques. La première observation morphologique de chromidinés dans nos échantillons a été sur les lames de la seiche *Sepia officinalis* S50 qui présentait une co-infection avec le dicyémide *Pseudicyema truncatum*. L'échantillon d'ADN que nous avons isolé contenait donc en théorie de l'ADN de l'hôte, de *Chromidina* et du dicyémide *Pseudicyema truncatum*. Nous avons procédé alors à une amplification par des amorces universelles d'Eucaryotes (MDP3 / MDP4) puis avons réalisé un clonage. La séquence du dicyémide n'a pas été retrouvée dans les clones, en revanche, nous avons eu comme résultat de séquençage, une séquence de l'hôte et une séquence qui donnait par blast des séquences voisines appartenant aux Apostomes.

Dans un deuxième temps, des amorces conçues par le Professeur Furuya, qui ont montré leur fiabilité dans l'amplification de séquences d'ADNr 18S de chromidinés japonais, ont été testées

associées aux amorces universelles MDP3 et MDP4 sur les chromidinés de calmars méditerranéens C21, C22 et C23. Les jeux de couples d'amorces formés par ceux conçus au laboratoire (universels) et ceux conçus par le Professeur Furuya (MDP4/ FurChromR et FurChromF/MDP3) ont générés des PCRs positives.

Ces manipulations nous ont permis de générer les premières séquences d'ADNr 18S pour ces ciliés parasites, pour les hôtes *Loligo vulgaris* C21, C22 et C23 et pour la seiche *Sepia officinalis* S50 ; elles couvrent 1588bp de ce locus. Au début de notre étude, aucune séquence de chromidiné n'était disponible dans les bases de données. Récemment, le Professeur Hidetaka Furuya a obtenu une séquence de Chromidina prélevé sur *Todarodes pacificus*, non publiée pour le moment, et que nous avons intégrée dans nos analyses en plus de nos séquences issues des céphalopodes de Tunisie.

#### 5.2.2.1.1. Alignements

Nous avons réalisé des alignements à l'aide du logiciel MAFFT, puis les avons filtrés par Gblock qui rend les alignements plus appropriés pour une étude phylogénétique en supprimant les blocs alignés de façon ambiguë. Ainsi, nous avons choisi de prendre en compte un nombre maximum de positions non-conservées continues égal à 8 avec une taille minimale des blocs de 8 pb. De plus aucun trou (gap) n'est accepté.

-le premier alignement a regroupé des séquences d'ADNr 18S de nos chromidinés et d'Apostomes (les séquences utilisées sont issues de l'étude de Lynn, Gomez-Gutierrez et al. (2014) faisant une taille de 1581 pb.

-un deuxième alignement a été fait, avec les séquences d'ADNr 18S d'Apostomes et avec le groupe externe suggéré par Lynn, Gomez-Gutierrez et al. (2014): une espèce de cilié la plus proche des Apostomes, *Cyclidium glaucoma* (Z22879). Cet alignement fait 1557 pb.

-un troisième alignement a été réalisé, avec les séquences d'ADNr 18S de nos chromidinés et celles de nombreux ciliés, récupérées à partir de « NCBI nucleotide collection », avec un groupe externe qui est un dinoflagellé *Biecheleriopsis adriatica* (HG792067). Cet alignement qui fait 1607 pb a été nettoyé sur Gblock, ce qui a généré un alignement faisant 1309 pb.

#### 5.2.2.1.2. Divergence génétique

Le détail des variations intra et inter-spécifiques des chromidinés est résumé dans le tableau 13. Une très faible variabilité a été observée au sein des séquences de Chromidinés, même s'il y a une petite divergence entre :

-les chromidinés prélevés sur le calmar *Loligo vulgaris* C23 et les deux autres calmars C21 et C22 (0,07%).

-les chromidinés prélevés sur la seiche *Sepia officinalis* S50 et les chromidinés prélevés sur les calmars (0,2%).

Concernant les séquences publiées par Lynn, Gomez-Gutierrez et al. (2014), cette analyse nous a permis de constater que la divergence génétique au sein des spécimens *Pseudocollina similis* est nulle, ainsi qu'au sein des specimens *Pseudocollina beringensis*, et *Pseudocollina brintoni*. En revanche, nous avons noté une variabilité entre les différents spécimens de *Pseudocollina oregonensis* de 0,09% (Tab. 13).

#### 5.2.2.1.2. Phylogénie.

Nous avons testé pour nos différents alignements le meilleur modèle d'évolution pour les constructions phylogénétiques. Comme pour les dicyémides, le modèle d'évolution le mieux adapté sur la base du critère d'information d'Akaike (AIC) est le modèle GTR+G+I.

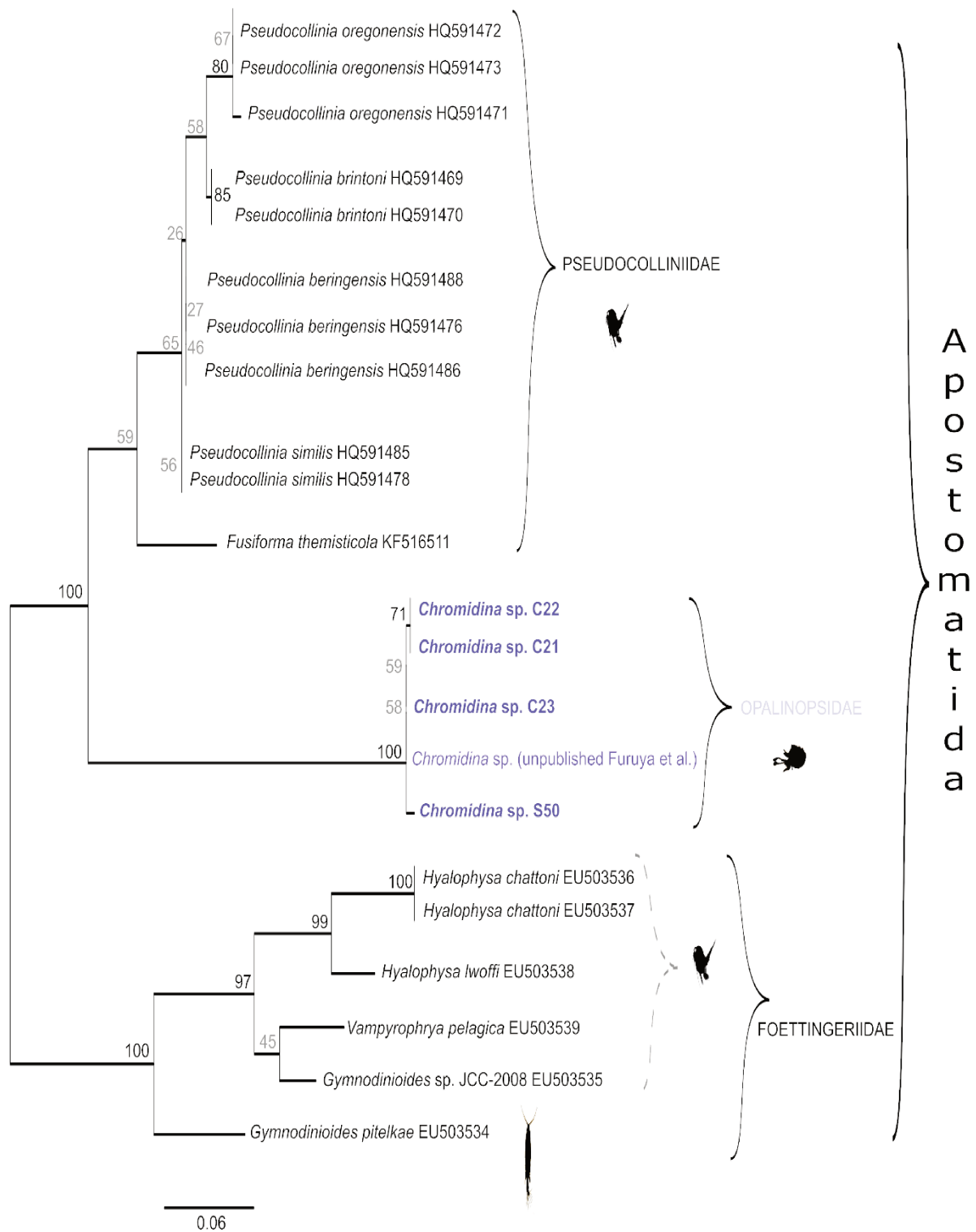
Nous avons essayé de construire un arbre phylogénétique des séquences de chromidinés alignées avec d'autre séquence d'ADNr 18S d'Apostomes afin de déterminer la fiabilité de leur attribution à ce groupe de ciliés. Un arbre enraciné par une autre espèce de cilié (*Cyclidium glaucoma* Z22879), suggérée comme proche des Apostomes dans la littérature par Lynn, Gomez-Gutierrez et al. (2014), conduit à un arbre avec un phénomène d'attraction de longues branches et on assiste à une saturation de substitution dans les alignements (données non montrées).

Nous avons donc construit un arbre non enraciné à partir de nos séquences de chromidinés et des séquences disponibles dans la base de données NCBI (Fig. 40). Cet arbre montre que les Apostomes s'organisent en deux grands groupes fortement soutenus par un bootstrap de 100 : le premier groupe est formé par les Foettingeriidae et le deuxième groupe est formé par les Opalinopsidae et les Pseudocolliniidae. Le nœud séparant les deux dernières familles a un

bootstrap égal à 100. La famille des Opalinopsidae est également fortement soutenue par un bootstrap égal à 100. Les Foettingeriidae divergent des Pseudocolliniidae de 4,58 % et des Opalinopsidae de 6,14 %. (Fig. 40, Tableau 13).

<b>divergence génétique (en %)</b>	<b>Chromidina sp. C21</b>	<b>Chromidina sp. C22</b>	<b>Chromidina sp. C23</b>	<b>Chromidina sp. S50</b>	<b>Chromidina sp. unpublished</b>	<b>tous pseudocolliniidae</b>	<b>tous Foettingeriidae</b>
<b>Chromidina sp. C21</b>	0	0	0,07	0,2	0,07	3,97	6,17
<b>Chromidina sp. C22</b>	0	0	0,07	0,2	0,07	3,97	6,17
<b>Chromidina sp. C23</b>	0,07	0,07	0	0,14	0	3,9	6,14
<b>Chromidina sp. S50</b>	0,2	0,2	0,14	0	0,14	4,02	6,23
<b>Chromidina sp. unpublished</b>	0,07	0,07	0	0,14	0	3,9	6,14
<b>tous pseudocolliniidae</b>	3,97	3,97	3,9	4,02	3,9	0,9	4,58
<b>tous Foettingeriidae</b>	6,17	6,17	6,14	6,23	6,14	4,58	2,64

**Tableau 13.** Variabilité génétique entre les séquences d'Apostomes générées dans cette étude et disponibles dans les bases de données, ainsi que la séquence non publiée du Pr. Furuya. Les distances génétiques ont été calculées à partir de l'alignement prenant en compte 1581 positions.



A  
p  
l  
o  
s  
t  
o  
m  
a  
t  
i  
d  
a

Ordre de l'hôte:




	Malacostraca
	Maxillopoda
	Cephalopoda

Figure 40. Arbre phylogénétique\* non enraciné des chromidinés prélevés sur 5 individus hôtes incluant 17 séquences d'ADNr 18S d'Apostomes disponibles dans les bases de données.

\*Le jeu de données fait 1581pb. L'analyse phylogénétique est réalisée par inférence du maximum de vraisemblance (ML) les bootstraps sont indiqués en face des nœuds. L'ordre des hôtes infestés par ces Apostomes ayant des séquences intégrées dans le jeu de données est indiqué par un dessin devant le groupe de séquences de parasites signalés sur cet hôte. La signification du dessin de l'hôte est indiquée en bas de l'arbre. La famille à laquelle appartiennent les séquences est indiqué devant l'accolade regroupant ces séquences. Les numéros d'accèsion des séquences récupérées dans les bases de données sont indiqués sur les séquences sur l'arbre.

Nous avons également construit un arbre phylogénétique à partir d'un alignement de séquences d'ADNr 18S de ciliés appartenant à différentes familles de ciliés (Fig. 41). Cet arbre a été enraciné par une espèce de dinoflagellé : *Biecheleriopsis adriatica* HG792067. Cet arbre contient des séquences de ciliés appartenant aux classes Oligohymenophorea, Colpodea, Phyllopharyngea, Plagiopylea, Litostomatea, Spirotrichea, Armophorea, Heterotrichae et Karyorelictea.

L'arbre montre que les ciliés s'organisent en deux grands groupes :

- Le premier groupe est formé par les classes Heterotrichae et Karyorelictea, soutenu par un bootstrap de 96.
- Le deuxième groupe est formé par les classes : Oligohymenophorea, Colpodea, Phyllopharyngea, Plagiopylea, Litostomatea, Spirotrichea et Armophorea. Ce deuxième groupe n'est cependant pas très bien soutenu (79).

Les nœuds au sein des ciliés ne sont pas fortement soutenus.

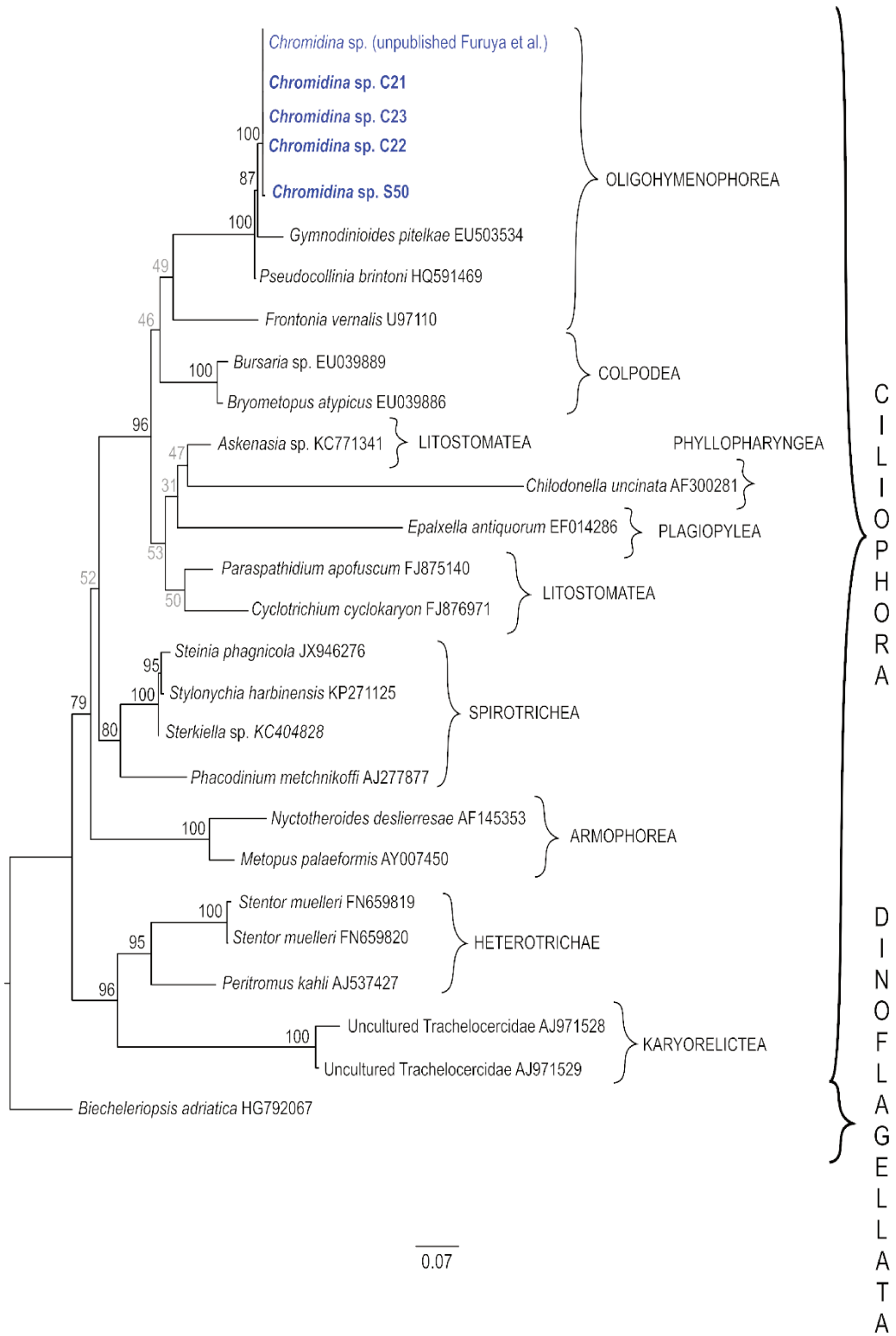


Figure 41. Arbre phylogénétique\* enraciné des chromidinés prélevés sur 5 individus hôtes incluant 21 séquences d'ADNr 18S de ciliés disponibles dans les bases de données.

\*Le jeu de données fait 1309pb. L'analyse phylogénétique est réalisée par inférence du maximum de vraisemblance (ML) les bootstraps sont indiqués en face des nœuds. La classe de ciliés ayant des séquences intégrées dans le jeu de données est indiquée devant le groupe de séquences composant cette classe. Les numéros d'accession des séquences récupérées dans les bases de données sont indiqués sur les séquences sur l'arbre.



#### 5.2.2.2. Discussion de l'étude moléculaire des chromidinés.

Notre étude sur la diversité moléculaire et le positionnement phylogénétique des ciliés Apostomes du genre Chromidina est précurseur puisqu'aucune séquence de ces parasites n'était disponible quand nous avons commencé ce travail. Les séquences du gène du ADNr 18S obtenues restent encore à ce jour, avec celle produite par l'équipe du Professeur Furuya, les seules données moléculaires représentatives de ce genre. Cette étude est bien sûr préliminaire. Les résultats et les conclusions que l'on peut en tirer sont limités par le faible nombre d'espèces de chromidinés décrites jusqu'à maintenant, avec une biodiversité qui est certainement très sous-estimée, et le faible nombre de séquences disponibles (4 séquences issues de notre étude et une communiquée par le Pr Furuya). Cette étude nécessite d'être poursuivie à la fois dans l'échantillonnage pour avoir des populations de parasites plus importantes afin d'évaluer les divergences intra- et inter-spécifique, et dans la description morphologique des parasites afin d'associer les morpho-espèces à des données génétiques. De même, l'analyse des liens de parentés entre ciliés apostomes nécessite que l'on s'intéresse à un genre totalement oublié jusqu'à maintenant, le genre *Opalinopsis*, pour lequel les données morphologiques sont très parcellaires et les données moléculaires totalement absentes, qui a été regroupé avec le genre *Chromidina* pour constituer la famille des *Opalinopsidae*. La validité de cette famille reste à démontrer.

Néanmoins, bien que préliminaire, cette étude a apporté des éléments nouveaux quant à la biodiversité et la phylogénie des Chromidinés par :

1-La description morphologique de deux nouvelles espèces de Chromidinés qui nous permet de prédire que la biodiversité des Chromidinés est certainement sous-estimée.

2-Les analyses phylogénétiques qui confortent l'affiliation des chromidinés au sein de la classe des ciliés *Oligohymenophorea* qui constitue avec les ciliés *Colpodea* un groupe monophylétique soutenu (bootstrap de 96). Au sein de ce groupe, les chromidinés s'apparient tous ensemble avec les autres séquences d'Apostomes.

3-Les analyses phylogénétiques entre apostomes qui montrent une polytomie soutenue au niveau des deux grands groupes : le premier est formé par la famille des *Foettingeridae* et le

deuxième par les Opalinopsidae et les Pseudocolliniidae. La topologie de cet arbre rejoint celle trouvée par Lynn, Gomez-Gutierrez et al. (2014) pour les apostomes incluant seulement les Pseudocolliniidae et les Foettingeriidae. Les chromidinés sont donc plus proches des Pseudocolliniidae (bootstrap de 100) que des Foettingeriidae, avec des taux de divergence de 3,95% et 6,17%, respectivement. Ces résultats vont à l'encontre des conclusions de Hochberg (1982, 1990) et Chatton et Lwoff (1931, 1935) qui suggèrent que les Foettingeriidae seraient proches des chromidinés. Selon ces auteurs les Foettingeriidae seraient des Apostomes primitifs et en partageant des caractères morphologiques synapomorphiques avec les Chromidinés suggèrent l'origine primitive de ces derniers.

4-Le fait que le marqueur utilisé, l'ADNr 18S, semble montrer une faible variabilité au sein des familles des apostomes, limite son usage comme marqueur de barcode. Ceci est illustré par les 4 espèces de pseudocollinidés qui présentent une divergence génétique de seulement 0,9% pour ce marqueur. Cette observation est confortée par les résultats obtenus avec nos séquences de chromidinés. Les séquences de Chromidina prélevés sur *Loligo vulgaris* C21 et C22 sont identiques. Elles divergent faiblement de celles du Chromidina prélevé sur le *Loligo vulgaris* C23 (0,07%) et du Chromidina de la seiche *Sepia officinalis* (0,2%). La séquence du Chromidina prélevé sur C23 est identique à celle du Chromidina prélevé au Japon sur *Todarodes pacificus*. Ce constat nécessite d'être validé sur un échantillonnage plus important, de même que d'évaluer la pertinence d'autres marqueurs génétiques, comme COI, pour une approche de barcoding.

Les résultats obtenus sur l'étude des chromidinés ont été résumés, discutés et publié dans un article intitulé : « **Ciliates apostome *Chromidina* sp. infecting two cephalopods of the Mediterranean Sea, *Loligo vulgaris* and *Sepia officinalis*, with description of a new species.** ». (Annexe 3)



## **CONCLUSION GENERALE**

Les dicyémides et les chromidinés sont des parasites des sacs rénaux de céphalopodes qui sont peu étudiés de façon générale, et plus particulièrement en Méditerranée et sur les côtes européennes.

### **I. Les chromidinés**

Chatton and Lwoff (1935) ont classé les Chromidina au sein des ciliés apostomes tout en notant que leur morphologie indiquait un genre atypique d'Apostomes.

Actuellement, seulement 4 espèces de Chromidina sont connues. Aucune étude récente ne s'est intéressée à décrire les espèces du genre Chromidina et nous ne disposons d'aucune donnée moléculaire. Au cours de notre étude, nous nous sommes fixés comme objectifs de prospecter les céphalopodes en Méditerranée et en Atlantique nord-est afin de :

- repérer d'autres espèces appartenant au genre Chromidina et de les caractériser du point de vue morphologique et moléculaire ;
- étudier leur position phylogénétique au sein des ciliés.

Au cours de notre étude, aucun céphalopode pêché en atlantique n'a été infesté par des chromidinés. Seuls les céphalopodes en provenance de la Tunisie étaient infestés par ces apostomes. En Tunisie, cinq espèces de céphalopodes ont été examinées mais seulement deux ont présenté des Chromidina dans leurs sacs rénaux : *Loligo vulgaris* et *Sepia officinalis*. Nous avons remarqué que les chromidinés sont plus prévalents chez les céphalopodes pélagiques que chez les démersaux. Ceci conforte les données de la littérature qui indiquent que les chromidinés sont essentiellement des parasites de céphalopodes océaniques et pélagiques et accidentellement des parasites de céphalopodes benthiques et épibenthiques au début de leur vie.

#### **1. Diversité des chromidinés**

Nous avons pu identifier une nouvelle espèce de chromidinés chez *Loligo vulgaris* que nous avons nommée *Chromidina chattoni*. Cette espèce a été ainsi nommée en l'honneur d'Edouard Chatton qui a réalisé avec André Lwoff en 1935 le travail de référence sur les chromidinés.

*Chromidina chattoni* se distingue des autres espèces de chromidinés par 13 cinéties partant de l'apex en hélice dextre continue sur tout le corps. Le macronoyau de cette espèce est étalé dans

tout le corps. On en conclut qu'il s'agit d'un noyau typique de chromidiné (Chatton et Lwoff, 1935, Hochberg, 1982, 1990). Le tropho-tomonte est long et présente une tête globuleuse portant des taches de chromatine que nous retrouvons systématiquement chez tous les individus observés. L'observation de la terminaison postérieure des adultes vermiformes a permis d'observer des terminaisons d'individus réalisant des monotomies produisant des segments primaires et des palintomies générant des chaînes de tomites. Nous avons noté la présence d'individus de petite taille ayant des traces de chromatine suggérant qu'il s'agit de formes dégénérées.

*Chromidina chattoni* a été caractérisé par sa séquence d'ADNr 18S.

En somme, *Chromidina chattoni* se distingue des autres espèces de chromidinés par :

- un nombre de cinéties égal à 13 (contrairement à *C. elegans*, *C. cortezi*, *C. sp* et *C. n.sp*)
- une forme globuleuse de la tête (contrairement à *C. elegans*, *C. cortezi*, *C. sp* et *C. n.sp*)
- la présence de segment primaire (contrairement à *C. cortezi* et *C. n.sp*)
- l'absence de couronne de cils (contrairement à *C. coronata*)
- l'absence d'hypertrophonte (contrairement à *C. elegans* et *C. cortezi*)
- son hôte: *Loligo vulgaris*
- Localité : La Goulette, Tunisie

Nous avons aussi identifié une nouvelle espèce de chromidinés sur *Sepia officinalis*. Cette espèce se caractérise principalement par :

- un apex de forme pointue (contrairement à *C. elegans*, *C. coronata*, *C. cortezi*, *C. sp*, *C. n.sp* et *C. chattoni*)
- la présence d'une papille apicale
- l'absence de couronne de cils (contrairement à *C. coronata*)
- l'absence d'hypertrophonte (contrairement à *C. elegans* et *C. cortezi*)
- son hôte: *Sepia officinalis*
- Localité : La Goulette, Tunisie.

D'autres observations de cette espèce de chromidiné prélevée sur S50 sont nécessaires afin de déterminer le nombre de cinéties et d'étudier ses différents stades de divisions (tomites et apotomites) qui sont nécessaires pour identifier et nommer ce parasite.

## 2. Position phylogénétique des chromidinés

L'étude de la diversité moléculaire à partir du marqueur d'ADNr 18S a permis de fournir, pour la première fois, des données moléculaires de la famille des opalinopsides et du genre *Chromidina*. Cette famille a été longtemps considérée comme énigmatique et Hochberg (1971) estime que les Opalinopsidés nécessitent une étude plus approfondie afin de prouver leurs affinités aux ciliés et détailler leur systématique. Dans notre étude, nous nous sommes proposés de réaliser une étude moléculaire afin d'évaluer la diversité génétique des chromidinés et leur position phylogénétique et celle de la famille et la classe dans lesquels ils étaient attribués sur la base des critères morphologiques, tout en précisant qu'il s'agit d'apostome atypique.

*Chromidina chattoni* et *Chromidina* n. sp. présentent des séquences d'ADNr 18S proches qui constituent un groupe monophylétique qui distingue les chromidinés des autres apostomes. Notre arbre phylogénétique des apostomes montre la répartition des apostomes en différents clades selon la famille étudiée : l'arbre soutient la classification des différentes espèces (intégrées dans le jeu de données) au sein des Foettingeriidae, Pseudocolliniidae et Opalinopsidae. Cet arbre montre également que ces clades suivent une logique d'appartenance à un hôte précis et nos séquences d'Opalinopsidés se distinguent par leur appartenance aux céphalopodes alors que les autres apostomes sont prélevés sur des Pancrustacés. La classe des apostomes est très peu étudiée et n'intègre généralement pas de données sur les opalinopsidés (McConnaughey 1960; Ohtsuka, Suzaki et al. 2015).

Les travaux de Lynn, Gómez-Gutiérrez et al. (2014) ont étudié la position phylogénétique des apostomes à travers l'espèce *Pseudocollinia similis* sans intégrer des données de la famille des Opalinopsidés. Notre travail a permis de confirmer la monophylie des apostomes au sein des ciliés. L'addition de séquences de chromidinés a consolidé la classification de ces opalinopsides au sein des ciliés apostomes établie par (Chatton et Lwoff 1935; Hochberg 1971; 1982; 1983; 1990; Furuya et Hochberg 1999; Landers 2010).

## 3. Fiabilité du marqueur d'ADNr 18S dans l'évaluation de la diversité génétique des chromidinés

En dépit de la divergence morphologique notable entre les deux espèces de chromidinés décrites dans notre étude, ces deux espèces ont des séquences très similaires. L'étude de la diversité génétique d'autres espèces d'apostomes a montré une très faible divergence génétique entre des espèces différentes au sein de cette classe (Lynn, Gomez-Gutierrez et al. 2014).

Chatton et Lwoff (1931); Chatton et Lwoff (1935); Hochberg (1982); Hochberg (1990) ont suggéré que les Foettingeriidés seraient un groupe frère de Opalinopsidés en raison de similitudes des stades tomites. L'étude de la position phylogénétique des chromidinés infestant les céphalopodes en Tunisie montre que ces parasites montrent un faible taux de divergence des pseudocolliniidés. Chatton et Lwoff (1931); Chatton et Lwoff (1935); Hochberg (1983); Hochberg (1990) estiment que les chromidinés et les opalinopsidés en général auraient une origine primitive vu leur proximité des Foettingeriidés. La résolution de la difficulté d'enracinement des arbres phylogénétiques des apostomes pourra nous permettre d'affiner leurs relations de parentés.

## **II. Les dicyémides**

Les dicyémides sont considérés comme des parasites énigmatiques dont on ignore la position phylogénétique au sein des métazoaires et le mode de transmission de l'infestation d'un hôte à un autre. Au cours de notre étude, nous nous sommes proposés de répondre à des questions préliminaires sur ce groupe :

- Quelle est la prévalence des dicyémides, des côtes méditerranéennes et Atlantique nord-est qui est une zone jusqu'à notre étude, où ces parasites n'avaient pas encore été étudiés ?
- quelle est la diversité morphologique et moléculaire des dicyémides?
- quelle est la spécificité d'hôte des dicyémides ?

### **1. Prévalence des dicyémides des côtes méditerranéennes et atlantique nord-est**

Les dicyémides ont une forte prévalence au sein des céphalopodes pêchés dans notre zone d'étude. Ils infestent les céphalopodes benthiques que nous avons échantillonnés et aucun céphalopode pélagique confortant ainsi la théorie de la spécificité des dicyémides à des hôtes habitant près des fonds marins (Nouvel 1947; McConnaughey 1960; Short et Hochberg 1969; Furuya 1999; Furuya et Tsuneki 2003). En effet, le stade de développement qui serait responsable du passage de l'infestation d'un hôte à un autre présente une faible flottabilité d'où

son incapacité d'atteindre les couches superficielles d'eau et infester les céphalopodes pélagiques (Lapan 1975).

## 2. Spécificité d'hôte versus infestations multiples

Dans la plupart des études qui ont porté sur les dicyémides, les chercheurs estiment que ces parasites ont une spécificité stricte (oïoxène à sténoxène) (Van Beneden 1876; Furuya 1999; Furuya et Hochberg 2002; Furuya, Hochberg et al. 2003; Furuya 2006). Dans notre étude morphologique, ce spectre étroit d'hôte a été vérifié dans la plupart des cas et nous avons signalé peu de cas de céphalopodes présentant des co-infestations et un seul cas d'infestation triple. Dans le cas de ces co-infections, la théorie de la divergence des formes de calotte polaire est vérifiée dans tous les cas (Furuya, Hochberg et al. 2003). Cependant, notre étude moléculaire a montré que le spectre d'hôte des dicyémides est sous-estimé et qu'un génotype donné est capable d'infester des hôtes de familles différentes et habitant des biotopes différents. Cette spécificité large a été signalée par peu d'études (Whitman, 1983, Nouvel, 1947) et est soutenue pour la première fois par des arguments génétiques. Les données morfo-moléculaires suggèrent que les dicyémides sortent de la règle des parasites qui se classent soit dans la catégorie de parasites à spécificité stricte (oïoxène à sténoxène) soit à spécificité large (euryxène). Notre étude met en évidence la notion d'hôte préférentiel chez les différentes espèces de dicyémides, qui infestent de préférence une espèce d'hôte spécifique mais peuvent accidentellement infester une autre espèce d'hôte sympatrique.

## 3. Diversité morfo-moléculaire : Notion d'espèce chez les dicyémides.

L'étude moléculaire a permis de recenser 8 morfo-espèces différentes de dicyémides. L'étude moléculaire a permis de signaler une diversité génétique inférieure à la diversité morphologique. Les dicyémides analysés sont répartis en 7 clades différents dont 5 correspondent à de nouveaux génotypes. Cependant, nous observons une paraphylie des genres. Les études moléculaires des dicyémides sont rares et généralement portent sur une seule espèce et un seul spécimen. Récemment, deux études ont exploré la diversité génétique des dicyémides en étudiant un nombre plus élevé d'espèces et ont relevé à leur tour la paraphylie des genres chez les dicyémides (Eshragh et Leander 2014; Catalano, Whittington et al. 2015). Les genres chez les dicyémides sont principalement définis selon le nombre et la disposition des cellules de la calotte polaire. Les résultats moléculaires suggèrent la nécessité de revoir les données morphologiques afin de définir des critères plus fiables pour la définition des genres.



La fiabilité des critères morphologiques est remise en question aussi à l'échelle de l'espèce (Eshragh et Leander 2014; Catalano, Whittington et al. 2015). Dans notre étude, nous avons révélé des cas de morpho-espèces différentes appartenant à un même clade, et vice versa, différentes morpho-espèces ont des séquences d'ADNr 18S très similaires. L'hypothèse d'Eshragh et Leander (2014); Catalano, Whittington et al. (2015) de la limite des critères morphologiques peut expliquer ces résultats et donc que la systématique basée sur les critères morphologique devraient être révisée. Dans cet objectif, nous avons entrepris de re-décrire *Dicyemnea eledones* afin de fournir de nouveau critères morphologiques permettant de caractériser cette espèce. D'autres hypothèses explicatives de la divergence des données moléculaires et morphologiques sont la pertinence du marqueur d'ADNr 18S. Cependant, (Catalano, Whittington et al. 2015) a rencontré des divergences entre les données moléculaires et morphologiques en utilisant le marqueur de la cytochrome oxydase I. Eshragh et Leander (2014) estiment que le marqueur d'ADNr 18S est fiable pour caractériser les espèces de dicyémides.

Dans notre étude, nous retenons toutes ces hypothèses et nous envisageons en plus l'hypothèse de l'impact du facteur de la co-infection ajouté à la limite de la technique utilisée dans la caractérisation des espèces chez les dicyémides :

- La technique d'identification morphologique ne garantit pas l'observation de toutes les espèces de dicyémides présentes chez un hôte.
- L'amplification d'un génotype particulier ne garantit pas sa correspondance à l'espèce majoritaire sur les lames.

### **Perspectives et travaux futurs.**

Notre étude nous a permis de fournir des informations permettant une évolution dans la compréhension de ces groupes de parasites et relevant les difficultés de ce type d'étude.

Dans notre étude, Nous avons pu décrire deux nouvelles espèces et étudier la position phylogénétique des chromidinés au sein des ciliés. Cependant, ces résultats ont mis en évidence que la biodiversité des chromidinés en Méditerranée et en Atlantique est sous-estimée. Nous nous proposons d'explorer plus d'espèces de céphalopodes pélagiques afin :

- d'évaluer la biodiversité des Chromidina afin de prélever des Opalinopsis. La caractérisation de ces espèces de chromidinés pourrait révéler des divergences génétiques spécifiques pour ces parasites.
- explorer d'autres foyers d'infestation dans un céphalopode, comme les intestins, pour prélever des spécimens d'Opalinopsis. L'obtention de séquences d'Opalinopsis permettra de réaliser une étude de la position phylogénétique de la famille des Opalinopsides avec des représentants de ses deux genres.

L'étude de la diversité morpho-génétique des dicyémides a montré des divergences entre la systématique basée sur des critères morphologiques et les données moléculaires. Parmi les hypothèses explicatives de ces résultats était la limite de la technique de l'étude morphologique et moléculaire utilisée jusqu'à présent. Afin de s'assurer que la morpho-espèce observée sur lame est bien celle amplifiée dans l'échantillon d'ADN, nous proposons d'utiliser des techniques de micro-dissection des parasites sur les lames et d'amplifier et séquencer chaque individu séparément après une identification morphologique. L'utilisation de la technique de micro-dissection laser (Espina, Milia et al. 2006) par exemple peut garantir la concordance entre les observations morphologiques et la séquence amplifiée.

Nos tentatives d'amplification du marqueur COI ont échoué. Chez les dicyémides, le génome mitochondrial présente une organisation atypique sous forme de molécules en mini-cercles. Ainsi, les gènes mitochondriaux COI, COII et COIII sont organisés en différentes molécules mini-cercles (Watanabe, Bessho et al. 1999; Catalano, Whittington et al. 2015). L'étude de ces marqueurs pourrait fournir des données supplémentaires qui pourraient clarifier la notion d'espèces chez les dicyémides. L'association de séquences de plusieurs marqueurs à partir de

différentes espèces de dicyémides représentatives de divers genres permettra à la fois de définir la notion du genre chez les dicyémides et d'évaluer la robustesse des critères morphologiques confrontés aux données moléculaires.

Plusieurs autres aspects de la biologie des dicyémides restent énigmatiques et mériteraient d'être explorés : nous ignorons toujours la forme de passage de l'infestation d'un hôte à un autre et l'âge du début d'infestation d'un hôte. Nous ignorons toujours également s'il s'agit de symbionte participant à l'excrétion de l'urine (Lapan et Morwitz, 1972) ou de véritable parasites causant la dégradation des tissus rénaux et le partage des nutriments de l'hôte (Ridley 1968; Finn, Hochberg et al. 2005).

## Annexe 1. Liste des échantillons issus de toutes les campagnes

*S.orbignyana* : *Sepia orbignyana*

*S.officinalis* : *Sepia officinalis*

φ = absence d'échantillon

### Annexe 1.1. Liste des échantillons issus de la mission à Concarneau en mai 2011.

Code hôte	Espèce hôte	Code ADN parasite
P1	<i>Eledone cirrhosa</i>	P1/ P1-1/ P1-2/ P1-3/ P1-4
P2	<i>Eledone cirrhosa</i>	P2
P3	<i>Eledone cirrhosa</i>	P3/ P3-1
P4	<i>Eledone cirrhosa</i>	P4/ P4-1/P4-2/P4-3
P6	<i>Eledone cirrhosa</i>	P6/P6-1/P6-2/P6-3
P7	<i>Eledone cirrhosa</i>	P7/ P7-1/ P7-2/ P7-3
S1	<i>Sepia orbignyana</i>	S1 /S1-1/ S1-2
S2	Pas d'identification	S2
S3	<i>Sepia officinalis</i>	S3/ S3-1/ S3-2
S4	<i>Sepia officinalis</i>	S4 /S4-1/ S4-4
S5	<i>Sepia orbignyana</i>	S5
S6	Pas d'identification	S6
S7	<i>Sepia orbignyana</i>	S7

**Annexe 1.2. Liste des échantillons issus de la mission à Concarneau en juillet 2012.**

Code hôte	Espèce hôte	Poids Total (g)	Longueur Manteau (cm)	Sexe : F/M	Code tube bec/os	Code tube morceau de tissu	Code tubes Parasites
P01	<i>Eledone cirrhosa</i>	415	13,6	F	MD01	-	-
P02	<i>Eledone cirrhosa</i>	338	12,4	F		PG04	PG01 : 15 parasites 70% Ethanol
							PG02: 17 parasites 70% Ethanol
							PG03 : 16 parasites 70% Ethanol
P 03	<i>Eledone cirrhosa</i>	497	15,2	F	DS03		Quelques dicyemides mais on n'a rien conservé
P04	<i>Eledone cirrhosa</i>	252	11,4	F		DS09	DS04 : Ethanol
							DS05 : Ethanol
							DS06 : Ethanol
							DS07 : Bouin
							DS08 : Bouin
P05	<i>Eledone cirrhosa</i>	690	15,5	F	PG06	PG05	-
S1	<i>S.orbignana</i>	845	10,3	F	30057S01D S	DSS01	DS01
P06	<i>Eledone cirrhosa</i>	489	13,5	F	PG08	PG07	-

S02	<i>S.orbignana</i>	90	10	M		PG09 :13 parasites libres + Ethanol 70%
						PG10 : 14 parasites libres + Ethanol 70%
						PG11 : 20 parasites libres + Ethanol 70 %
						PG12 :30 parasites libres + gluta SN
						PG13 : 30 parasites libres + gluta Caco
						PG14 : Bouin parasites libres
S03	<i>S.orbignana</i>	102,5	10,1	M	S03DS	-
S04	<i>S.orbignana</i>	85	10,3	M	S04DS	
S05	<i>S.orbignana</i>	90,5	9,8	M	S05DS	
C01	<i>Loligo vulgaris</i>	607	27,5	M		C01DS : vers
S06	<i>S.orbignana</i>	77,5	9,4	M	Os cassé	Quelques parasites
S07	<i>S.orbignana</i>	71,5	10,5	F	Os cassé	PG15 -
S08	<i>S.officinalis</i>	184	11,4	M	MD04	MD03 MD02
						MD05 : 0,4µl + 1ml Ethanol 70 %
						MD06 : 0,4µl + 1ml Ethanol 70 %
						MD07 0,4 + 0,8 µl gluta
						MD08 0,4 + 0,8µl gluta

						MD09 : 0,4 + 0,8µl Bouin
						MD10 : 0,4 + 0,8µl Bouin
						MD11 : 0,4 + 0,8 µl Bouin
S09	<i>S.officinalis</i>	128	9,4	M	31058S09D S	DS/S09 : Ethanol
						DS/S10: Ethanol
						DS/S11 : Ethanol
						DS/S12 : Bouin
						DS/S13 : Bouin
S10	<i>S.orbignana</i>	103	11,5	M	PG16	PG17 : gluta SN
						PG18 : Ethanol + 20 parasites libres
						Ethanol + 20 parasites libres
						PG20 : SN→fixation gluta
						PG21 : SN→fixation gluta

S11	<i>S.officinalis</i>	150	12	M	PG22		PG23 : Ethanol 40 parasites libres
S12	<i>S.orbignyana</i>	35,5	6,9	M			
C02		80,5	9,2	M			
S13	<i>S.orbignyana</i>	30,5	5,5	M		MD17	MD12
							MD13 : parasites libres + alcool 70%
							MD14 : parasites libres + alcool 70%
							MD15 : parasites libres + Bouin
							MD16 : parasites libres + Bouin
							MD18 : parasites libres + Bouin
S14	<i>S.officinalis</i>	211,5	12,8	F	41004S14D S		DS/S14 : Ethanol
							DS/S15 : Ethanol
							DS/S16 : Ethanol
S15	<i>S.officinalis</i>	183,5	11,9	F	41004S15D S		DS/S17 : Ethanol
							DS/S18 : Ethanol
S16	<i>S.officinalis</i>	360	16,5	F	PG25		PG26 : Ethanol 30 cell
							PG26 : Ethanol 30 cell



							PG27 : gluta SN
P07	<i>Eledone cirrhosa</i>	208	10,7	F	P07DS	P08DS	
S17	<i>S.officinalis</i>	320	15,5	M	PG30		PG29 : Ethanol, 30 parasites libres (billes noires et blanches)
S18	<i>S.officinalis</i>	195,5	11,3	F			
S19	<i>S.officinalis</i>	357	16,5	M	PG34		PG31 : gluta
							PG32 : Ethanol 70 % + 30 parasites libres
							PG33 : Ethanol 70% + 20 parasites libres
S20	<i>S.officinalis</i>	217	12,5	M	PG35		PG36 : Ethanol 70% + 40 parasites libres
S21	<i>S.officinalis</i>	219	11,6	F			
S22	<i>S.officinalis</i>	140	12,5	M			PG37 : Ethanol 70% + 30 parasites libres
S23	<i>S.officinalis</i>	399	16	M	PG38		PG39 : Ethanol 70%+ 30 parasites libres
	<i>S.officinalis</i>						PG40 : gluta
S24	<i>S.officinalis</i>	248	12,5	M	PG41		PG42 : Ethanol 70% + 30 parasites libres
S25	<i>S.officinalis</i>	69	8,2	M			
S26	<i>S.officinalis</i>	53	8,5	M	PG43		-
S27	<i>S.officinalis</i>	160	12	M	PG44		PG47 : Ethanol 70% + 30 parasites libres
S28	<i>S.orbignyana</i>	270	13,5	M	PG45		Pas de Dicyémides
S29	<i>S.officinalis</i>	335	14,5	M	PG46		PG48 : Ethanol 70% + 20 parasites libres (sale état)

**Annexe 1.3. Liste des lames issues de la mission à Concarneau en juillet 2012.**

Date	Code lame	Code Echantillon Parasite	Méthode de coloration
09/05/2012	L001	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70° => séchage
	2	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70° => séchage
	3	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70°
	4	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70°
	5	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70°
	6	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70°
	7	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70°
	8	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 70°
	9	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	10	PG03	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	11	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	12	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95° => séchage
	13	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°(2 fois)
	14	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	15	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	16	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	17	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95° => séchage
	18	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	19	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	20	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	21	DS04	Appendage en frottis => bouin => alcool 95°
	22	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95°
	23	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95°
	24	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95°
	25	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95°
	26	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95° => séchage
	27	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95° => séchage
	28	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95° => séchage
	29	PG14	Cellules libres => bouin => alcool 95° => séchage
10/05/2012	30	****	Cellules libres => bouin 24h=> lavage à l'eau => alcool 95°
	31	****	Cellules libres => bouin 24h => alcool 95° => séchage

11/05/2012	S20DS1	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS2	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec => premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS3	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS4	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS5	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS6	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS7	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage

	S20DS10	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS11	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS12	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS13	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS14	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS15	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame =>aspirer le max de milieu à l'aide d'une pipette pasteur étirée, sans aspirer les parasites avec =>premier bain d'alcool 95° => 2 <sup>ème</sup> bain d'alcool 70° => séchage
	S20DS16	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante

S20DS17	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante
S20DS18	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante
S20DS19	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante
S20DS20	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante
S20DS21	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante
S20DS22	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante
S20DS23	S20	Cellules libres => bouin 24h => eau distillée =>prélever le max de parasites sans cellules rénales => transfert dans une autre salière => prélever 25µl de parasites =>lame => on dépose 1µl d'albumine =>avec une pointe de pipette pasteur étirée inclinée on mélange sans racler le fond => sécher sur la plaque chauffante

**Annexe 1.4. Liste des échantillons issus de la mission en Concarneau en 2013.**

Code hôte	Espèce hôte	Poids (g)	Taille Manteau (cm)	Code lames	Code ADN
L16	<i>Eledone cirrhosa</i>	782	13,4	1 -> 30	1 -> 6
L17	<i>Eledone cirrhosa</i>	252	6	31->91	7 -> 13
L18	<i>Eledone cirrhosa</i>	245	6,5	92 -> 110	14 -> 20
S52	<i>S.orbignyana</i>	100	8,7	111 -> 133	21-22-23
C1	<i>Loligo vulgaris</i>	80	11,8	134-160	24-25-26
S53	<i>S.orbignyana</i>	87	8,9	161-180	27-28-29
S54	<i>S.orbignyana</i>	110	8,5	181 -> 199	30-31-32
S55		104	7,9	200 -> 215	33-34-35
L19	<i>Eledone cirrhosa</i>	187	9,2	216 -> 246	36-37-38-39-40-41
C2	<i>Loligo vulgaris</i>	208	10,2	247->253	43-44-45-46-47
C3	<i>Loligo vulgaris</i>	146	14,6	254->260	48-49-50
S55	<i>S.orbignyana</i>	120	7,8	261-262-263-264-265-266-267	51-52-53
C4	<i>Loligo vulgaris</i>	115	10,2	268-269-270-271-272	54
C5	<i>Loligo vulgaris</i>	90	7,4	273-274-275-276-277	55
C6	<i>Loligo vulgaris</i>	96	7,9	278-279-280-281-282	56
C7	<i>Loligo vulgaris</i>	146	14,2	283-284-285-286-287	57
S56	<i>S.orbignyana</i>	107	6,2	288-289-290-291-292	58
S57	<i>S.orbignyana</i>	123	6,6	293-294-295-296-297	59
S58	<i>S.orbignyana</i>	137	7,2	298-299-300-301-302	60
S59	<i>S.orbignyana</i>	135	7,3	303-304-305-306-307	61-62
C8	<i>Loligo vulgaris</i>	112	14,5	308->330	63-64
C9	<i>Loligo vulgaris</i>	117	14,2	331-345	65-66-67-68
C10	<i>Loligo vulgaris</i>	89	12,7	346->351	(pas de tube 69) 70
C11	<i>Loligo vulgaris</i>	120	15,6	352->356	71-72
S60	<i>S.orbignyana</i>	147	8,3	357->361	73
S61	<i>S.orbignyana</i>	117	6,2	362->366	74
S62	<i>S.orbignyana</i>	124	6,8	367->371	75
S63	<i>S.orbignyana</i>	131	7,2	372->376	76
L20	<i>Eledone cirrhosa</i>	223	11,8	377->400	77-78-79
S64	<i>S.orbignyana</i>	87	6,8	401->405	80-81
S65	<i>S.orbignyana</i>	137	7,4	406->410	82-83
S66	<i>S.orbignyana</i>	53	5,1	411->415	84
S67	<i>S.orbignyana</i>	50	4,8	416->420	85
S68	<i>S.orbignyana</i>	53	5,2	421->425	86

S69	<i>S.orbignyana</i>	55	5,3	426->430	87
S70	<i>S.orbignyana</i>	48	4,6	413->435	88
C12	<i>Loligo vulgaris</i>	117	10,7	436->440	89-90
C13	<i>Loligo vulgaris</i>	107	9,2	441->445	91
C14	<i>Loligo vulgaris</i>	111	9,7	446->450	92
C15	<i>Loligo vulgaris</i>	123	11,3	451->455	93
C16	<i>Loligo vulgaris</i>	130	12,6	456->460	94
C17	<i>Loligo vulgaris</i>	89	7,9	461->465	95
C18	<i>Loligo vulgaris</i>	92	8,6	466->470	96 (tube perdu)
L21	<i>Eledone cirrhosa</i>	100	9,3	471->475	97-98
L22	<i>Eledone cirrhosa</i>	98	8,5	476->480	99-100
L23	<i>Eledone cirrhosa</i>	72	6,3	510->529	101-102-103
L24	<i>Eledone cirrhosa</i>	98	10,2	530->534	104-105-106
L25	<i>Eledone cirrhosa</i>	76	7,2	535->544	107-108-109
L26	<i>Eledone cirrhosa</i>	78	7,7	545->549	110-111-112
L27	<i>Eledone cirrhosa</i>	81	7,9	550->554	113-114-115
L28	<i>Eledone cirrhosa</i>	73	7,4	555->559	116-117-118

**Annexe 1.5. Liste des échantillons issus de la mission en Tunisie en 2013.**

Code hôte	Espèce hôte	Localisation	Taille Manteau (cm)	Poids (g)	Sexe : F/M	Code ADN	Code lames
O1	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	7,5	128,8	M	ϕ	ϕ
E1	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette	9,8	160,7	F	ϕ	ϕ
E2	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette	8,2	130,6	F	1/2/3/4	1/2/3
E3	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette	8,7	157,7	F	ϕ	4-5
S30	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	16,7	340,5		5/6/7/8/	6/7/8/9/10/ 11/12/12b
						1d/2d	
S31	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	16,7	340,5	F	15/16/17/18/ 19	20/21//22/2 3/24/25
						5d	
O2	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	11,3	734,2	F	9/10/11/12/1 3/14	13/14/15/1 6/17/ /17b/ 18/19/19b
						3d/4d	
S 32	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	14,2	285,9	F	20/21/22/23/ 24/24	26/27/28/2 9/30/31
						6d	



S33	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	10,6	162,4	F	25/26/27/28/ 29/30/31	32/33/34/35/ 36/37
						7d	
S34	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	17,3	507,7	F	31/33	38/38b/39 / 39b/40/41/ 42
S37	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	12,6	183,3	F	34/35/36/37/ 38	43/44/45/46/ 47
S38	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	11,2	111,3	F	39/40/41/42/ 43/44/45	48/49/50/51
						8d /9d	
O3	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	12,6	802,4	F	46/47/48/49	52/53/54/55/ 56/57/58/ 58b
O4	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	8,9	485,5	F	50/51	59/60/61/62
O5	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	9,2	368,7	F	52/53	63/64/65/66
O6	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	7,9	263	F	54/55	67/68/69/70
O7	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	6,9	210,3	M	56/57	71/72
O8	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette	7,2	140,3	M	φ	φ
S39	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	13,4	258,5	F	58/59/60/61	73/74
						10d	

S40	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	10,2	133,5	F	62/63/64/65	75/76/77/78/79/80/81/82/83/91/92
						11d/12d	
S41	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	9,3	89,2	F	66/67/68/69	84/85/86/87/88/89/90
						13d/14d,/15d	
S42	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	10,2	128,2	F	∅	93/94/95/96
S43	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	9,4	83,9	F	∅	97/98/99/99b
S44	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	10,8	175,8	F	∅	∅
E4	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette	84	105	F	∅	∅
C1	<i>Loligo vulgaris</i>	La Goulette	11,2	122	F	∅	∅
C2	<i>vulgaris</i>	La Goulette	17,4	182,5	F	∅	∅
C3	<i>vulgaris</i>	La Goulette	17,9	147,7	F	∅	∅
S45	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	9,8	116,6	F	∅	∅
C4	<i>vulgaris</i>	La Goulette	122,1	10,4	F	∅	∅
C5	<i>vulgaris</i>	La Goulette	134,4	10,1	F	∅	∅
S46	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	11,2	205,9	F	∅	∅
S47	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	8,4	110,7	F	∅	∅
S48	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	18,7	212,7	F	∅	∅
S49	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette	14,6	306,8	F	77/78/79/80/81/82/	100/101/102/103//104/105/106/107/108
						16d/17d	

L1	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette	9,8	135	F	83/84/85/86, /87/88/89/90 /91/92/93	109/110/111 /112/113/ 114/115/116/ 117/118
L2	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	94/95/96/97/ 98/99	119/120/1/ 128/129/130 /21/122/123/ 124/125 /
L3	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			M	/100/101/102 /103/104	126/127/128/ 129/130/ 131
L4	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	105/106/107/ 108/109/	132/133/134/ 135/136/ 137/138/139/ /
L5	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			M	110/111/112/ 113/114/115/ 116	140/141/142/ 143/
L6	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/117/118/119 /120/121	144/145/146/ 147/
L7	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/122	148/149
L8	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/123/124/125 /126/127/128 /129/130	/150/151/152/ 153/154 /155
L9	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/131/132/133 /134/	/156/157/158/ 159/160 /161
L10	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	135/136/137/ 138/139/140	/162/163/164/ 165/166 /167/
L11	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/141/142/143 /144/145	168/169/170/ 171/172
L12	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	146/147/148/ 149/	/173/174/175/ 176/177 /178
L13	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/150/151/152 /153	/179/180/181/ 182/
L14	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/154/155/156 /157	183/184/185/ 186
L15	<i>Eledone cirrhosa</i>	La Goulette			F	/158/159/160	∅

S50	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette			F	161/162/163/	/187/188/189/190/191/192/193/194/195
S51	<i>Sepia officinalis</i>	La Goulette			F	164/165/	/196/197/198/199/200
O9	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette			F	166/167/168/169/170/	/201/202/203/204/205/206/207/208/209/210/211/212
O10	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette			M	∅	∅
O11	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette			F	171/172/173/174/175/176/	213/214/215/216/217/218/219/220/221/222/223/224
O12	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette			F	177/178/179/180	225/226/227/228/229/230/231/232/233
E5	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette			F	∅	∅
E6	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette			F	/181/182/183	234/235/236/237/238/239
E7	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette			F	/184/185/186/187/188/189	240/241/242/243/244
E8	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette			F	∅	∅
E9	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette			F	190/191/192/193/194/195/196	245/246/247/248/249/250/251/252/253/254/255/256
E10	<i>Eledone moschata</i>	La Goulette			F	∅	∅
O13	<i>Octopus vulgaris</i>	La Goulette			M	197/198/199/200/201/202/203/204/	257/258/259/260/261/262/263/264/265/266/267/268

**Annexe 1.6. Liste des échantillons issus de la mission en Tunisie en 2014.**

Code hôte	Espèce hôte	Poids (g)	Taille Manteau (cm)	Code ADN	Code lames (hématoxyline)
C19	<i>Loligo vulgaris</i>	414,3	25	φ	φ
C20	<i>Loligo vulgaris</i>	527	27,3	1-2	1->8
O14	<i>Octopus vulgaris</i>	985,7	14,7	3-4	9->18
S71	<i>Sepia officinalis</i>	225,8	11,2	5-6	19->23
E11	<i>Eledone moschata</i>	201,8	11,6	φ	25->27
E12	<i>Eledone moschata</i>	241,6	10,6	φ	28-29
E13	<i>Eledone moschata</i>	267,3	9,8	φ	30->32
E14	<i>Eledone moschata</i>	278,2	11,2	φ	33->35
O15	<i>Octopus vulgaris</i>	266,9	10,3	φ	36-37
S72	<i>Sepia officinalis</i>	302,6	9,8	φ	38->40
S73	<i>Sepia officinalis</i>	312,5	11,5	φ	41->43
S74	<i>Sepia officinalis</i>	376,3	13,1	7-8-9	44->50
S75	<i>Sepia officinalis</i>	391,6	13,4	10->12	51-55
S76	<i>Sepia officinalis</i>	211,3	9,4	13->15	56-60
S77	<i>Sepia officinalis</i>	206,2	9,5	16->18	61->68
S78	<i>Sepia officinalis</i>	285,3	12	19-20	69-70
S79	<i>Sepia officinalis</i>	286,5	12,9	21-22	71-72
S80	<i>Sepia officinalis</i>	208,9	13,2	23-24	73-74
S81	<i>Sepia officinalis</i>	243,4	11,5	25-26	75-76
S82	<i>Sepia officinalis</i>	284,8	14,2	27-30	77-86
S83	<i>Sepia officinalis</i>	125,6	9,7	31->34	87->91
S84	<i>Sepia officinalis</i>	112,9	9,5	35->38	92->96
S85	<i>Sepia officinalis</i>	128,5	9,8	39->40	97->101
S86	<i>Sepia officinalis</i>	134,7	10,2	41-42	102-106
O16	<i>Octopus vulgaris</i>	1164,7	14,3	43-44	107-111
O17	<i>Octopus vulgaris</i>	1278,9	15,6	45-46	112-116
O18	<i>Octopus vulgaris</i>	1297,3	16,2	47-48	117-121
O19	<i>Octopus vulgaris</i>	1509,8	17,5	49-50	122-127
E14	<i>Eledone moschata</i>	306,8	10,7	φ	φ
E15	<i>Eledone moschata</i>	281,6	11,4	51-52	128-135
L29	<i>Eledone cirrhosa</i>	190	9,7	φ	φ
E16	<i>Eledone moschata</i>	173	8,4	53-54	136-143
E17	<i>Eledone moschata</i>	105	9,2	φ	φ
E18	<i>Eledone moschata</i>	115,3	6,7	55-56	144-149
E19	<i>Eledone moschata</i>	166,8	8,7	φ	φ
L30	<i>Eledone cirrhosa</i>	156,2	9,9	57-58	150-156
L31	<i>Eledone cirrhosa</i>	211,4	9,4	59-60	157-160

C21	Loligo vulgaris	70,5	11,3	61-62	161->164
C22	Loligo vulgaris	68,4	10,8	63-64	165-169
C23	Loligo vulgaris	76,9	12,4	65-66	170-175
C24	Loligo vulgaris	82,7	14,1	67-68	176-178
C25	Loligo vulgaris			69-70- 71-72	179-180-181- 182



## **Annexe 2. Article 1**

Running head: SOUIDENNE ET AL–REDESCRIPTION OF DICYEMENNEA

### **REDESCRIPTION OF DICYEMENNEA ELEDONES (PHYLUM: DICYEMIDA) FROM ELEDONE CIRRHOSA (MOLLUSCA: CEPHALOPODA: OCTOPODA)**

DHIKRA SOUIDENNE<sup>1,2</sup>, ISABELLE FLORENT<sup>1</sup>, MARC DELLINGER<sup>1</sup>, MOHAMED SALAH ROMDHANE<sup>2</sup>, PHILIPPE GRELLIER<sup>1\*</sup>, and HIDETAKA FURUYA<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> UMR 7245 CNRS MCAM, Muséum National d’Histoire Naturelle, Sorbonne Université, CP 52, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> UR03AGRO1 Ecosystèmes et Ressources Aquatiques, Institut National Agronomique de Tunisie, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis, Tunisia.

<sup>3</sup> Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan.

\* Corresponding author:

Hidetaka Furuya : Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan, hfuruya@bio.sci.osaka-u.ac.jp; tel : +81668505817, fax : +81668505817.

**ABSTRACT:** Dicyemids are common parasites of cephalopod kidney. Species identification relies on old literature descriptions containing considerable confusions that cast doubt on taxonomic identification. Detailed morphological description of all dicyemid development stages associated to genotyping are critically required for their taxonomy. To this end, we undertook a redescription of a dicyemid species, *Dicyemenea eledones* (Wagener, 1857), infecting the cephalopod *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798). Samples were collected off Concarneau in bay of Biscay, France and La Goulette, Gulf of Tunis, Tunisia. *D. eledones* is a large species that reaches about 7,000  $\mu$ m in length. The vermiform stages are characterized as having 23 peripheral cells, a conical calotte, and an axial cell that extends to the base of the propolar cells. An anterior abortive axial cell is present in vermiform embryos. Infusoriform embryos consist of 37 cells; a single nucleus is present in each urn cell and the refringent bodies are possibly liquid. For the first time, an 18S rDNA sequence was assigned to *D. eledones*, which shows genetic differences with the other dicyemid 18S rDNA sequences available in databases useful for dicyemid barcoding.

**KEY WORDS:** *Dicyemenea eledones*, dicyemid, taxonomy, 18S rDNA, barcoding, *Eledone cirrhosa*.



## INTRODUCTION

In the Mediterranean Sea and the northeastern Atlantic Ocean, *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798) is one of the most encountered and commonly fished benthic cephalopod species (Guerra, 1992; Wurtz et al, 1992). This mollusc is also known as curled octopus, lesser octopus or horned octopus (Key et al., 2002) and has been the subject of numerous scientific investigations notably about its biology and distribution (Moriyasu, 1981, 1983, 1988; Wurtz, 1992; Boyle, 1983). In France as in Tunisia, *E. cirrhosa* has a high economic importance (Rjeibi et al., 2013; Belcari et al., 2002). It is the first substitution product for the overfished common octopus *Octopus vulgaris* (Espíñeira and Vieites, 2012). It is however difficult to assess the *E. cirrhosa* precise stock biomass since *O. vulgaris*, *E. cirrhosa* and *Eledone moschata* are often subsumed into the single generic term octopus, even in fishery statistics.

Dicyemid mesozoa (Phylum Dicyemida) are the commonest characteristic parasites of the renal sac of benthic cephalopod molluscs. The renal sac of cephalopods is a unique environment providing a living space for dicyemids, which are attached to the renal appendages by a distinct anterior calotte. Whether or not dicyemid infection is deleterious to the infected cephalopod is always a debated question (Furuya and Tsuneki, 2003). Dicyemids have an unusual and complex life cycle composed of two distinct types of vermiform stages (nematogen and rhombogen) producing two different types of larva (vermiform and infusoriform larva) (Furuya et al., 2003). Dicyemid species identification relies on old literature descriptions containing considerable confusions, especially for non-experienced observer that casts doubt on species identification (Hochberg, 1990). Accurate dicyemid species identification requires a comprehensive morphological description of all developmental stages, especially infusoriform embryos (Furuya et al. (2004). Dicyemid molecular taxonomy development needs thus to be combined to detailed morphological descriptions. To date, 18 species of dicyemids were reported in cephalopods from the eastern North Atlantic Ocean, Mediterranean, and English Channel (Nouvel, 1947; Hochberg, 1990; Furuya and Hochberg, 1990). However, most of them need deeper descriptions of cellular composition and morphology of infusoriform embryos. *Dicyemeneledones* (Wagener, 1875) illustrates such a problematic. Nouvel (1947) described briefly its nematogen stage and Furuya et al. (2004) described partially the infusoriform larvae cellular composition. No further detailed description of other development stages of *D. eledones* are available while the lack of adequate descriptions and figures of all development stages make it hard to identify the parasite species (Hochberg, 1990). Molecular data are also absent.

The aim of this study was to clarify identification features for *D. eledones* using detailed morphological criteria and a reference gene sequence. To do so, we collected *E. cirrhosa* specimens from North Atlantic Ocean (Concarneau, France) and Mediterranean Sea (La Goulette, Tunisia) to study their dicyemids. We identified a dicyemid, which presented the morphological characteristics of the *D. eledones* species described by Nouvel (1947). The present paper provides a detailed description of infusoriform embryos of *D. eledones* and a revised, comprehensive description of vermiform stages, with a reference sequence of 18S rDNA assigned for the first time to this species.

## MATERIALS AND METHODS

### Cephalopod sampling

Cephalopods were obtained from fishermen, who collected them off Concarneau in Bay of Biscay, Quimper, Brittany, France and in La Goulette, golf of Tunis, Tunisia. In Concarneau, they were fished using bottom trawl nets and in La Goulette using traditional earthenware jugs which are a fishing tool of 2.5 or 5 litres arranged like a rosary between 2 and 5 meter deep (Romdhane, 1998). In this study, 14 individuals of *E. cirrhosa* were examined for dicyemids in September 2013 in Concarneau (11 specimens) and in December 2013 in La Goulette (3 specimens). The cephalopod species identification was based on morphological features relying on criteria cited in identification keys (Jereb and Roper 2005, 2011) and species descriptions (Marine Species Identification portal <http://species-identification.org>).

#### Dicyemid sampling

Cephalopods renal appendages were withdrawn from dissected hosts. Small pieces of these kidneys with attached dicyemids were removed and smeared on glass microscope slides. The smears were fixed immediately in Bouin's fluid for 24 h and then stored in ethanol 70%. Most of them were stained in Ehrlich's hematoxylin and counterstained in eosin. Stained smears were mounted with Entellan (Merck, Rahway, New Jersey) (Furuya, 1999).

The renal appendages were also put in a petri dish with sterile sea water and observed with a stereomicroscope. Twenty to fifty dicyemids were transferred with a pipette to a new petri dish to be washed. This helped to eliminate host tissues that may be still attached to the parasite. Washed parasites were picked one by one and transferred to a sterile Eppendorf tube filled with ethanol 70% and stored at 4°C.

#### Morphological study

Dicyemid smears were observed with a light microscope at magnifications up to 2,000 x. Measurements and drawings were made with the aid of an ocular micrometer and a drawing tube, respectively. Target dicyemid species was observed in slides we prepared from all infested hosts from Concarneau and La Goulette. Figures and images presented in the paper were realized from preparations of two host specimens deposited in the Protist collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France ([www.mnhn.fr/fr/collections/ensembles-collections/invertebres-marins/protistes](http://www.mnhn.fr/fr/collections/ensembles-collections/invertebres-marins/protistes)) under the reference numbers: MNHN-IR-2016-1, MNHN-IR-2016-2.

Dicyemid morphology of our preparations was compared to the original smears of H. Nouvel describing *D. eledones* (Nouvel, 1947). The Nouvel's dicyemid slide collection was localized at the Santa Barbara Museum of Natural History, CA, USA, and was kindly provided by Dr. F. G. Hochberg. The Nouvel's collection is currently accessible at the invertebrate department of the Natural History Museum of Geneva, Switzerland.

The terminology for cell names used in the description of infusoriform larvae is based on Nouvel (1948), Short and Damian (1966), Furuya et al. (1992, 1997), and Furuya (1999). Abbreviations used in figures are as follows. A, apical cell; AA, anterior abortive axial cell; AG, agamete; AX, axial cell; C, couvercle cell; CA, capsule cell; CL, calotte; D, diapolar cell; DC, dorsal caudal cell; DI, dorsal internal cell; E, enveloping cell; G, germinal cell; GR, granule; L, lateral cell; LC, lateral caudal cell; M, metapolar cell; MD, median dorsal cell; O, oogonium; P, propolar cell; PA, parapolar cell; PD, paired

dorsal cell; PO, primary oocyte; PS, primary spermatocyte; PVL, posteroventral lateral cell; R, refringent body; RC, renal coelom; S, spermatogonium; SP, sperm; U, urn cell; UC, urn cavity; UP, uropolar cell; VC, ventral caudal cell; VI, ventral internal cell; V1, first ventral cell; V2, second ventral cell; V3, third ventral cell.

## Molecular study

DNA extraction was performed using the “chelex method” modified as indicated in Dellinger et al (2014). For PCR amplifications, we used the universal 18S rRNA gene forward primer P4 (5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3') (Sina M. Adl 2014) and the reverse primer P3 (5'-GACGGCGGTGTGTAC-3') (Lara et al., 2007), with minor modifications. PCR reactions were realized using the HOT FIREPol® DNA Polymerase enzyme consisted of an initial denaturation period of 12 min at 94°C and 35 cycles (denaturation of 30 s at 94°C, annealing 1 min at 50°C, elongation of 2 min at 72°C), and final elongation for 7 min at 72°C. PCR products were directly sequenced bidirectionally (Beckman Coulter Genomics) using P4/P3 primers after evaluation of amplicon appropriate size by electrophoresis on agarose gel. Chromatograms were analyzed using the software BioEdit. Multiple Sequence Alignment was performed with CLUSTALW and manually refined then truncated at both ends to equalize the sequences length. 18S rDNA sequences obtained from the *D. eledones* specimens used for the morphological identification (MNHN-IR-2016-1, MNHN-IR-2016-2) were deposited in EMBL database under the accession numbers LN878140 and LN878141, respectively. Pairwise distance analysis was performed using the Mega.6 software with all the *D. eledones* sequences obtained in this study aligned with other 18S rDNA sequences of dicyemids available in databases : *Dicyema* sp. (X97157), *Dicyema acuticephalum* (AB266027, D26530), *Dicyema apollyoni* (KJ786925), *Dicyema orientale* (D26529), *Dicyemennea abreida* (KJ786923), *Dicyemennea adminicula* (KJ786927), *Dicyemennea adscita* (KJ786926), *Dicyemennea brevicephala* (KJ786928, KJ786924), *Dicyemennea brevicephaloides* (KJ786920), *Dicyemennea rossiae* (KJ786921, KJ786919) and *Dicyemodeca deca* (KJ786922).

## RESULTS

Among the 14 specimens of *E. cirrhosa* examined (11 from Concarneau, France and 3 from La Goulette, Tunisia), the prevalence of infection by dicyemids was found of 92%. Only one specimen from Tunisia was not infected by dicyemids after examination of kidney appendages of freshly dissected hosts. Smears of kidneys of all infected hosts showed dicyemids with similar morphological characters corresponding to those defined by Nouvel (1947) for the *Dicyemennea eledones* nematogen: a very long body length, the characteristic peripheral cell number and the conical calotte shape. No co-infection by other dicyemid species was observed. Detailed description of infusoriform embryos of *D. eledones* and a revised comprehensive description of vermiform stages were performed from smears of kidney appendages of two *E. cirrhosa* specimens. Smears were deposited in the Protist Collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, under the number MNHN-IR-2016-1 and MNHN-IR-2016-2. *D. eledones* 18S rDNA analysis was performed on specimens from all the infected hosts.

## Description

## **Dicyemnea eledones (Wagener, 1857)**

(Figs. 1, 2; Table I)

Diagnosis: Large dicyemid; body lengths reaching 7,000  $\mu\text{m}$ . Calotte shape conical. Vermiform stages with 23 peripheral cells: 4 propolars + 5 metapolars + 2 parapolars + 12 trunk cells. Infusoriform embryos with 37 cells; refringent bodies possibly solid; and a single nucleus present in each urn cell.

Nematogens (Figs. 1a, b, 2a, c): Body length from 500-7,000  $\mu\text{m}$ , width from 50-70  $\mu\text{m}$ ; widest in region of metapolars; trunk width mostly uniform. Peripheral cell number 23: 4 propolars + 5 metapolars + 2 parapolars + 10 diapolars + 2 uropolars. Calotte conical, cilia on calotte about 6  $\mu\text{m}$  long, oriented anteriorly. Propolar cells and their nuclei smaller than metapolar cells and their nuclei (Fig. 1a, b). Cytoplasm of propolar cells more darkly stained by hematoxylin than cytoplasm of other peripheral cells. Small granules present in cytoplasm of parapolar cells and diapolar cells (Fig. 1a, b). Verruciform cells absent. Axial cell cylindrical, rounded anteriorly; cell extends forward to base of propolar cells. About 50 vermiform embryos present in an axial cell of large individuals. Agametes occasionally fusiform in shape. Several distinct large agametes present.

Vermiform embryos (Figs. 1c, 2f, g): Full-grown vermiform embryos range from 100-230  $\mu\text{m}$  in length, from 16-36  $\mu\text{m}$  in width. Peripheral cell number 23; trunk cells arranged in opposed pairs. Anterior end of calotte pointed. Axial cell pointed anteriorly; extends to base of propolar cells; nucleus usually located in the center or posterior half of axial cell. Anterior abortive axial cell present (Figs. 1c, 2f). Axial cell of full-grown embryos often with as many as 4-6 agametes.

Rhombogens (Figs. 2d, 3d, e): Body similar in length but slightly stockier than nematogens, length from 500-7,000  $\mu\text{m}$ , width from 50-75  $\mu\text{m}$ . Peripheral cell number typically 23. Calotte conical. Axial cell shape and anterior extent similar to nematogens. About 5 infusorigens present in the axial cell of each parent individual. About 125 infusoriform embryos present in an axial cell of large individuals.

Infusorigens (Fig. 1e; n = 20): Mature infusorigens large-sized; composed of 13-60 (mode 32) external cells (oogonia and primary oocytes) + 9-36 (mode 31) internal cells (spermatogonia, primary spermatocytes, and secondary spermatocytes) + 16-67 (mode 31) spermatozoa. Mean diameter of fertilized eggs, 12.8  $\mu\text{m}$ ; that of spermatozoa, 2.0  $\mu\text{m}$ . Axial cell round or ovoid, range in diameter from 15-44  $\mu\text{m}$ .

Infusoriform embryos (Figs. 1f, g, 2h-j; n = 25): Full-grown embryos large, average  $30.5 \pm 2.1$   $\mu\text{m}$  in length (excluding cilia; mean  $\pm$  SD); length-width-height ratio 1.0: 0.85: 0.84; shape ovoid, bluntly

rounded to pointed posteriorly; cilia at posterior end 6  $\mu$ m long. Refrangent bodies present, possibly solid; occupy anterior 30% of embryo length when viewed laterally (Fig. 1g). Cilia project from ventral internal cells into urn cavity (Fig. 2j). Capsule cells contain occasionally granules. Mature embryos with 37 cells: 33 somatic + 4 germinal cells. Somatic cells of several types present: external cells that cover large part of anterior and lateral surfaces of embryo (2 enveloping cells); external cells with cilia on external surfaces (2 paired dorsal cells +1 median dorsal cell +2 dorsal caudal cells +2 lateral caudal cells +1 ventral caudal cell +2 lateral cells +2 postero-ventral lateral cells), external cells with refrangent bodies (2 apical cells); external cells without cilia (1 couvercle cell + 2 first ventral cells +2 second ventral cells + 2 third ventral cells); internal cells with cilia (2 ventral internal cells); and internal cells without cilia (2 dorsal internal cells +2 capsule cells +4 urn cells). Each urn cell contains 1 germinal cell and 1 nucleus (Figs. 1g, 2j). All somatic nuclei appear pycnotic in mature infusoriform embryos.

### **18S rDNA analysis**

From the dicyemid specimens collected from the 13 infected *E. cirrhosa*, only 9 samples generated positive PCRs (7 specimens from Concarneau and 2 specimens from La Goulette). A single amplicon was observed and 9 unambiguous 18S rDNA sequences were obtained. Blast analysis revealed that the higher homology scores were obtained with known dicyemid 18S rDNA sequences indicating that the amplified PCR product is related to a dicyemid species. The nine 18S rDNA sequences were highly conserved with only one variable base over 1215 pb aligned. In order to evaluate the genetic distance between *D. eledones* and other dicyemid sequences for the 18S rDNA marker, we aligned a 1159 pb region and made a pairwise analysis with other 18S rDNA dicyemid sequences available in databases. Analysis revealed that *D. eledones* is divergent from the other dicyemid species with the lowest genetic distances with *D. rossiae* and *D. brevicephaloides* (2.95% of difference) and with the highest genetic distances (upper than 5%) with *D. abreida* (5.27%), *D. acutecephalum* (5.3%-6.35%), *D. adminicula* (5.18%), *D. adscita* (5.18%), *D. appollyoni* (5.18%), *D. brevicephala* (5.18%), *D. deca* (5%), *D. orientale* (5.3%) et *Dicyema* sp (6.72%). 18S rDNA sequences corresponding to the specimens used for the detailed morphological description were deposited in EMBL under the accession numbers LN878140 and LN878141.

### **Taxonomic summary**

Specimens examined: Specimens on a total of 5 slides from 2 hosts were deposited in the Muséum National d' Histoire Naturelle, Paris, France under the reference numbers MNHN-IR-2016-1 and MNHN-IR-2016-2, respectively.

Localities: France, Brittany, Quimper, Bay of Biscay, off Concarneau (47° 82' 50" N, 3° 94' 50" W). Tunisia, gulf of Tunis, La Goulette (36° 49' 9.11"N, 10° 18' 22.49"W)

Collection date: 24 and 25 September 2013 in Concarneau, 12 December 2013 in La Goulette.

Additional localities: Eastern North Atlantic Ocean, English Channel, Mediterranean.

Host: *Eledone cirrhosa* (Lamarck), 1798 (Mollusca: Cephalopoda: Octopoda).

Additional hosts: potentially *Eledone moschata*

Site of infection: Anterior ends (calottes) inserted into crypts of the renal appendages within the renal sacs.

Prevalence: In 13 of 14 hosts examined: 92.9%.

Main identification features:

-Gene sequence: two partial 18S rDNA sequences deposited to EMBL databases under the accession numbers: LN878140 and LN878141

-Morphological key features:

Body length: 7000  $\mu$ m.

Calotte shape: conical.

Vermiform stages: 23 peripheral cells (4 propolars + 5 metapolars + 2 parapolars + 12 trunk cells).

Infusoriform embryos: 37 cells; a unique nucleus in each urn cell, 3 ventral internal cells (V1, V2, V3) and 2 dorsal internal cells (DI).

#### Remarks

Two dicyemid species, *D. eledones* and *D. lameerei* (Nouvel, 1932), were reported in *E. cirrhosa* of the English Channel (Nouvel, 1932, 1933, 1938, 1947). These two species are similar in cell number of peripheral cells of vermiform stages and infusoriform embryos (Nouvel, 1932, 1947; Furuya et al., 2004). However, *D. eledones* is easily distinguishable from *D. lameerei* in the maximum body length (7,000  $\mu$ m vs. 1,000  $\mu$ m). The cellular composition of infusoriform embryos of *D. eledones* is of typical for dicyemids, while *D. lameerei* is the rare type, which has apical internal cells (Furuya, et al., 2004).

*D. eledones* is very similar to *D. kaikouriensis* (Short and Hochberg, 1990), *D. littlei* (Hochberg and Short, 1970), and *D. mastigoides* (Furuya, 1999) with regard to the calotte shape (Hochberg and Short, 1970; Short and Hochberg, 1990; Furuya, 1999). However, *D. eledones* differs clearly from *D. kaikouriensis* and *D. littlei* in the lack of an anterior abortive axial cell of vermiform embryos. *D. eledones* is easily distinguishable from *D. mastigoides* in the number of peripheral cells of the vermiform stages (23 vs. 21) and urn cell nucleus of infusoriform embryos (1 vs. 2).

The size and number of infusorigens are diagnostic characteristics of the dicyemid species (Furuya et al., 1993). There is a negative curvilinear relationship between the number of infusorigens per rhombogen and the number of gametes (egg-line and sperm-line cells) per infusorigen (Furuya et al., 2003; Furuya, 2005, 2006). Irrespective of genera, 4 distinct groups of reproductive strategy are classified within the dicyemid species: (1) rhombogens form a relatively small number of medium- to large-sized infusorigens (less than 5) and produce a relatively large number of gametes (more than 20) per infusorigen; (2) rhombogens produce a large number of infusorigens (more than 5), each of which has at most 20 gametes; (3) rhombogens produce large numbers of large-sized infusorigens with a large number of gametes; and (4) rhombogens form a relatively small number of small-sized infusorigens with a few gametes (at most 10). Rhombogens of *D. eledones* have a relatively large number of large-sized infusorigens, and thus this species belongs to the third type.

## DISCUSSION

In this study, the *E. cirrhosa* specimens were identified without ambiguity by using morphological characters (Jereb and Roper 2005, 2011; Marine Species Identification portal <http://species-identification.org>). Amongst them, *Eledone* spp. are characterized by having arms with a single longitudinal row of suckers. Recent studies combining morphology, COI and 18S rDNA sequences to identify *E. cirrhosa* proved the efficiency of the morphological criteria we used for the identification of this species (Gebhardt and Knebelberger, 2014).

Since *E. cirrhosa* was reported to be infected by two dicyemid species, *D. eledones* and *D. lameerei*, we ensured that the species we observed is *D. eledones* by comparing in a first time our samples with the type specimens of *D. eledones* deposited by Nouvel (1947). Dicyemids of all *E. cirrhosa* examined shared common morphological characters corresponding to those assigned by Nouvel for *D. eledones*. No co-infection with other dicyemid spp. was observed on the preparations. We excluded any doubt of mistaking *D. eledones* with *D. lameerei* especially by checking the maximum body length of our samples, which is a discrimination criterion. Distinction between both species is further supported by the fact they both have a conical calotte shape and a cephalopod host cannot be co-infected by two dicyemid species with the same calotte shape (Furuya and Tsuneki, 2003).

Blast analysis and phylogenetic relation of the 18S rDNA sequences assigned to *D. eledones* morphospecies firmly places the sequence within the other dicyemid 18S rDNA sequences available in databases (data not shown). *D. eledones* 18S rDNA sequence is significantly divergent from 18S rDNA makers of other dicyemid species with genetic distances ranging from 2,95 to 6.72 % of difference for the 1159 bp aligned region analyzed and could be used for barcoding of *D. eledones*. Notably, the 18S rDNA marker have been proposed as an efficient barcoding marker to specify many parasite species (Leander, 2008; Hoterman et al., 2006, 2008 ; Hopkins et al., 1997) and has been recently used to assess dicyemid species (Eshragh and Leander, 2014). However, exploring other molecular makers such as COI is required to reinforce the use of 18S rDNA as marker for dicyemid barcoding.

Host specificity of some dicyemid species is uncertain: some authors suggest that dicyemids can have a large host spectrum (Whitman, 1983, Nouvel, 1947) while most studies suggest that these parasites are narrowly host specific (van Beneden, 1976, Hochberg and Furuya, 2002, Furuya 1999, 2006). *D. eledones* was only reported in the cephalopod species, *E. moschata* and *E. cirrhosa*. Both host species are sympatric and share habitats and feeds. *E. moschata* inhabits on the soft sandy and muddy sediments of 10-400 m in depth, and is primarily distributed in the Mediterranean sea (Mangold, 1983), limited in the Atlantic Ocean to the southern coasts of Portugal and Gulf of Cadiz (Guerra, 1992). *E. cirrhosa* inhabits on the muddy sediments from the lower intertidal region down to 800 m in depth (usually 50-200 m) and has relatively wide distribution, i.e., the northeast Atlantic Ocean and the Mediterranean sea. They can thus encounter one another favoring parasite exchanges. *D. eledones* might have a stenoxenous behavior, capable of infesting hosts belonging to the same genera. Such infection of cephalopod species belonging to the same genera by the same species of dicyemid are documented (Furuya, 1999, Catalano et al., 2015).

This question of dicyemid host specificity is however restrained by the current problem of misidentification of parasite species or the lack of relevant diagnostic features available in literature. As an example, three dicyemid species, *D. acuticephalum* Nouvel, 1947, *D. japonicum* Furuya and Tsuneki, 1992, and *D. misakiense* Nouvel and Nakao, 1938, were reported to infect two host species in the genera *Octopus*, *O. vulgaris* Lamarck, 1798 and *O. fangsiao* D'Orbigny, 1840. However subsequent

morphological studies had revealed the 3 dicyemid species infecting *O. fangsiao* morphologically differed from those of *O. vulgaris* (Furuya 2006). Accurate identification remains for dicyemid species. Clarifying general patterns of host specificity between dicyemids and cephalopods, careful taxonomic studies on dicyemids, including morphological characteristics of all development stages associated to diagnostic molecular marker are critically required.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. F. G. Hochberg, the Santa Barbara Museum of Natural History, for providing an opportunity for examination of Nouvel's dicyemid collection in the museum and also to Ms. Fuko Onoda for her assistance in the course of this work. Our sincere thanks also go to the staff of the Concarneau's marine research station for technical assistance and access to the biological material. This study was supported by grants from several Interdisciplinary Programs of the MNHN (ATM- Barcode, ATM-Microorganismes, ATM-Génomique et Collections, ATM-Cycles Biologiques), the Program "Bibliothèque du Vivant" and Agence Universitaire de la Francophonie and grants from the Japan Society for the Promotion of Science (research grant no. 26440216).

## LITERATURE CITED

- Beneden, É. van. 1876. Recherches sur les Dicyémides, survivants actuels d'un embranchement des Mésozoaires. *Bulletins de l'Académie Royale de Belgique* 42: 3-111.
- Belcari, P., G. Tserpes, M. Gonzalez, E. Lefkaditou, B. Marceta, G. Piccinetti Manfrin and A. Souplet, 2002. Distribution and abundance of *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798) and *E. moschata* (Lamarck, 1798) (Cephalopoda: Octopoda) in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, **66**, Suppl. 2: 143–155.
- Boyle P. R. 1983. *Eledone cirrhosa*. In *Cephalopod Life Cycles*, 1. Species Accounts, P.R. Boyle (Ed.), Academic Press, London (1983), pp. 365–386.
- Catalano S. R., Whittington I D., Donnellan S. C., Bertozzi T and Gillanders B. M. 2015. First comparative insight into the architecture of COI mitochondrial minicircle molecules of dicyemids reveals marked inter-species variation. *Parasitology* (2015), 142, 1066–1079.
- Dellinger, M., Labat A., Perrouault L, and Grellier, P. 2014. *Haplomyxa saranae* gen. nov. et sp. nov., a New Naked Freshwater Foraminifer. *Protist*, Vol. 165, 317-329.
- Espiñeira, M., and Vieites, JM. 2012. Rapid method for controlling the correct labeling of products containing common octopus (*Octopus vulgaris*) and main substitute species (*Eledone cirrhosa* and *Dosidicus gigas*) by fast real-time PCR. *Food Chemistry* 135 : 2439–2444.
- Furuya, H. 1999. Fourteen new species of dicyemid mesozoans from six Japanese cephalopods, with comments on host specificity. *Species Diversity* **4**: 257-319.
- \_\_\_\_\_. 2005. Three new species of *Dicyema* (Phylum Dicyemida) from *Amphioctopus kagoshimensis* (Mollusca: Cephalopoda: Octopodidae). *Species Diversity* **10**: 231-147.



\_\_\_\_\_.2006. Three new species of dicyemid mesozoans (Phylum Dicyemida) from *Amphioctopus fangsiao* (Mollusca: Cephalopoda), with comments on the occurrence patterns of dicyemids. *Zoological Science* **23**:105-119.

\_\_\_\_\_, and F. G. Hochberg. 1999. Three new species of *Dicyema* (Phylum Dicyemida) from cephalopods in the Western Mediterranean. *Vie et Milieu* **49**: 117-128.

\_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_. 2002. New species of *Dicyemenea* (Phylum: Dicyemida) in deep-water *Graneledone* (Mollusca: Cephalopoda: Octopoda) from the Antarctic. *Journal of Parasitology* **88**: 119-123.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and K. Tsuneki. 2003. Reproductive traits of dicyemids. *Marine Biology* **142**: 693-706.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_. 2004. Cell number and cellular composition in infusoriform larvae of dicyemid mesozoans (Phylum Dicyemida). *Zoological Science* **21**: 877-889.

\_\_\_\_\_, K.Tsuneki, and Y. Koshida. 1992. Two new species of the genus *Dicyema* (Mesozoa) from octopuses of Japan with notes on *D. misakiense* and *D. acuticephalum*. *Zoological Science* **9**: 423-437.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and Y. Koshida. 1993. The development of the hermaphroditic gonad in four species of dicyemid mesozoans. *Zoological Science* **10**: 455-466.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_. 1997. Fine structure of a dicyemid mesozoan, *Dicyema acuticephalum*, with special reference to cell junctions. *Journal of Morphology* **231**: 297-305.

Guerra, A. 1992. Mollusca Cephalopoda. In *Fauna Iberica*. Vol. 1, M.A. Ramos et al. (eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales - CSIC, Madrid, p. 1- 327.

Hochberg, F. G. 1990. Diseases of Cephalopoda. Diseases caused by protistans and mesozoans. In *Diseases of marine animals*. Vol. III, O. Kinne (ed.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, p. 47-202.

\_\_\_\_\_, and Short, R. B. 1970. *Dicyemenealittlei* sp. n. and *Dicyema benthooctopi* sp. n.: dicyemid Mesozoa from *Benthooctopus megellanicus*. *Transactions of the American Microscopic Society* **89**: 216-224.

Mangold, K. 1983. *Eledonemoschata*. In *Cephalopod life cycles*. Vol 1, Boyle, P. R. (Ed.), Academic Press, London, p. 387-400.

Gebhardt, K.,and Knebelberger, T. 2014. Identification of cephalopod species from the North and Baltic Seas using morphology, COI and 18S rDNA sequences.

Jereb P. and Roper C.F.E. 2005. *Cephalopods of the world: chambered nautilus and sepioids* (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae, and Spirulidae). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Jereb P. and Roper C.F.E. 2011. *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date vol 2*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Key, L.N , Boyle, P.R, and Jaspars, M. 2002. Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). *Toxicon*, 40 (6): 677-683.

- Lara, E., Bemey, C., Ekelund F., Harms H. and Chatzinotas, A. 2007. Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology & Biochemistry*. 39 (2007) 139-148.
- Moriyasu, M. 1981. Biologie des pêches des céphalopodes benthiques. Application aux Eledones, *Eledone cirrhosa* (Lam., 1798) du Golfe du Lion. Thèse Doctorat, 3ème cycle Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France, p. 225.
- \_\_\_\_\_. 1983. Etude biométrique de la croissance d'*Eledone cirrhosa* (Lam. 1798) (Cephalopoda, Octopoda) du Golfe du Lion. *Oceanologica Acta*, 6, pp. 35–41.
- \_\_\_\_\_. 1988. Analyse de la maturation sexuelle d'*Eledone cirrhosa* (Cephalopoda: Octopoda) du golfe du Lion. *Aquatic Living Resources*, 1, pp. 59–65.
- Nesis, K. N. 1982. *Cephalopods of the World*. T. F. H. Publications, Inc, New Jersey, pp. 103-107.
- Nouvel, H. 1932. Un Dicyémide nouveau de poulpe *Dicyemenea lameere* in. sp. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **57**: 217-223.
- \_\_\_\_\_. 1933. Recherches sur la cytologie, la physiologie et la biologie des Dicyémides. *Annales de L'Institut Océanographique*, Monaco **13**: 165-255.
- \_\_\_\_\_. 1947. Les Dicyémides. 1<sup>re</sup> partie: systématique, générations, vermiformes, infusorigène et sexualité. *Archives de Biologie* **58**: 59-220.
- \_\_\_\_\_. 1948. Les Dicyémids. 2<sup>e</sup> partie: infusoriforme, tératologie, spécificité, du parasitisme, affinités. *Archives de Biologie* **59**: 147-223.
- \_\_\_\_\_, and Nakao, Y. 1938. Dicyémides du Japon. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **63**: 72-80.
- Rjeibi, M., Ezzedine-Najai, S., Chemmam, B., and Missaoui, H. 2013. Reproductive Biology of *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Northern and Eastern Tunisian Sea (Western and Central Mediterranean). *Malacologia* 56(2):69-84.
- Romdhane M. S. 1998. La pêche artisanale en Tunisie. Évolution des techniques ancestrales. In: *Mélanges de l'Ecole française de Rome. Antiquité T. 110(1)* : 61-80.
- Short, R. B., and R. T. Damian. 1966. Morphology of the infusoriform larva of *Dicyema aegira* (Mesozoa: Dicyemidae). *Journal of Parasitology* **52**: 746-751.
- \_\_\_\_\_, and Hochberg, F. G. 1969. Two new species of *Dicyema* (Mesozoa: Dicyemidae) from Kaikoura, New Zealand. *Journal of Parasitology* **55**: 583-596.
- Sina M. Adl, A. H., Yana Eglit. 2014. Amplification primers of SSU rDNA for soil protists. *Soil Biology & Biochemistry* (69): 328-342.
- Sweeney, M. J. and Roper, C. F. E. 1998. Classification, type localities and type repositories of recent Cephalopoda. *Systematics and Biogeography of Cephalopods*. Smithsonian Contributions to Zoology, Smithsonian Institution Press, 586 (I-II): 561-599.
- Wagener, G. R. 1857. Über *Dicyema Kölliker*. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie* **1857**: 354-364.

Whitmann, C. O. 1883. A contribution to the embryology, life history, and classification of the dicyemids. *Mitteilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel* **4**: 1-89.

Würtz, M., Poggi, R., Clarke, M. R. 1992. Cephalopods from the stomachs

of a Risso's dolphin (*Grampus griseus*) from the Mediterranean. *Journal of Marine Biological Association UK* **72**:861-867.

FIGURE 1. *Dicyemnea eledones*. (a, b) Anterior region of nematogen. (c) Vermiform embryo within axial cell. (d) Anterior region of rhombogen. (e) Infusorigen. (f, g) Infusoriform embryos within axial cell: (f) optical horizontal section; (g) optical sagittal section. Scale bars represent 20  $\mu$ m in a-d, 10  $\mu$ m in e-g. See Abbreviations in MATERIALS AND METHODS.

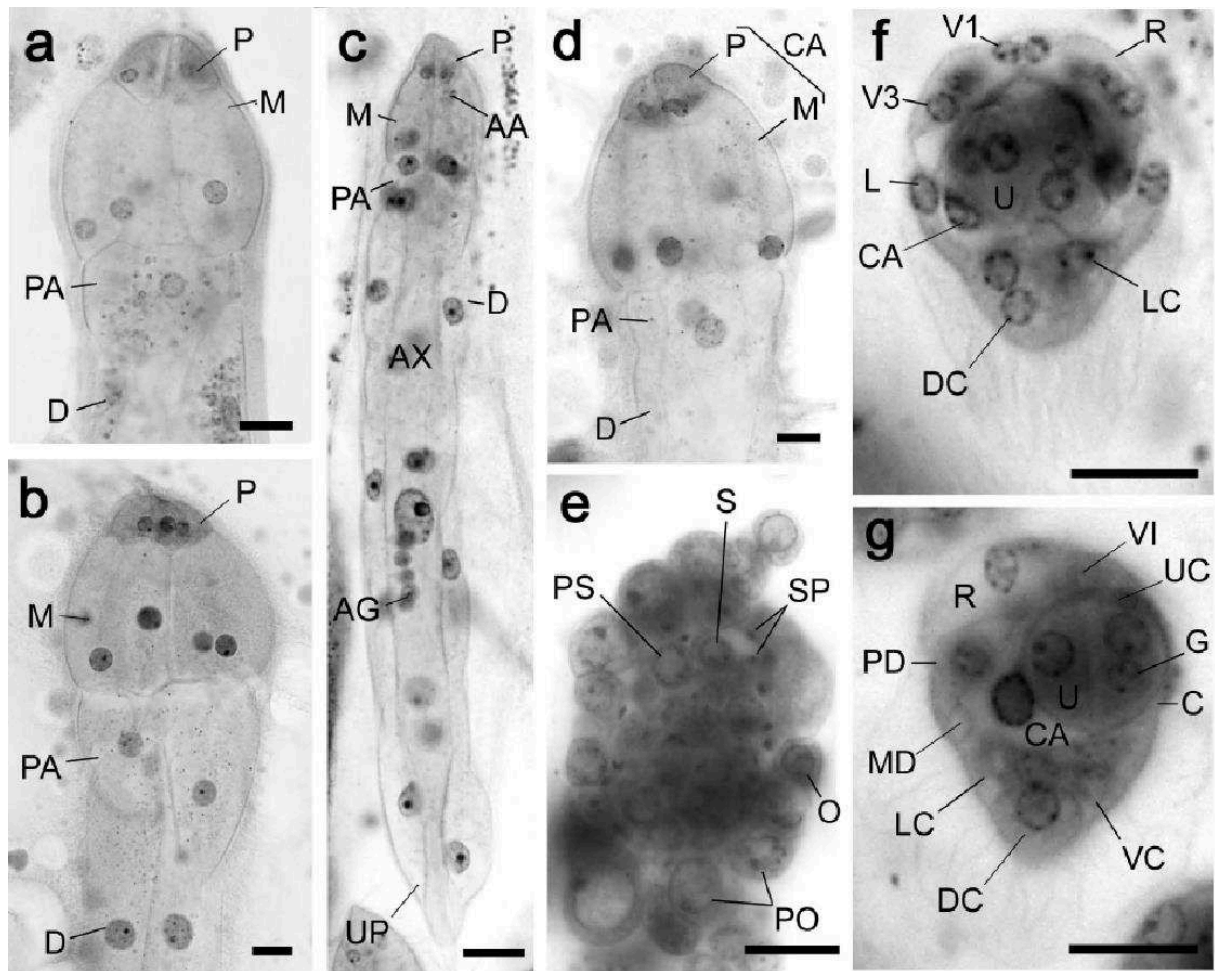


FIGURE 2. *Dicyemnea eledones*. (a, b) Vermiform stages, entire: (a) nematogen; (b) rhombogen. (c, d) Anterior region of nematogen. (e) Anterior region of rhombogen. (f, g) Vermiform embryos within the axial cell: (f) optical section; (g) cilia omitted. (h-j) Infusoriform embryos: (h) dorsal view (cilia omitted); (i) ventral view (cilia omitted); (j) sagittal section. See abbreviations in MATERIALS AND METHODS.

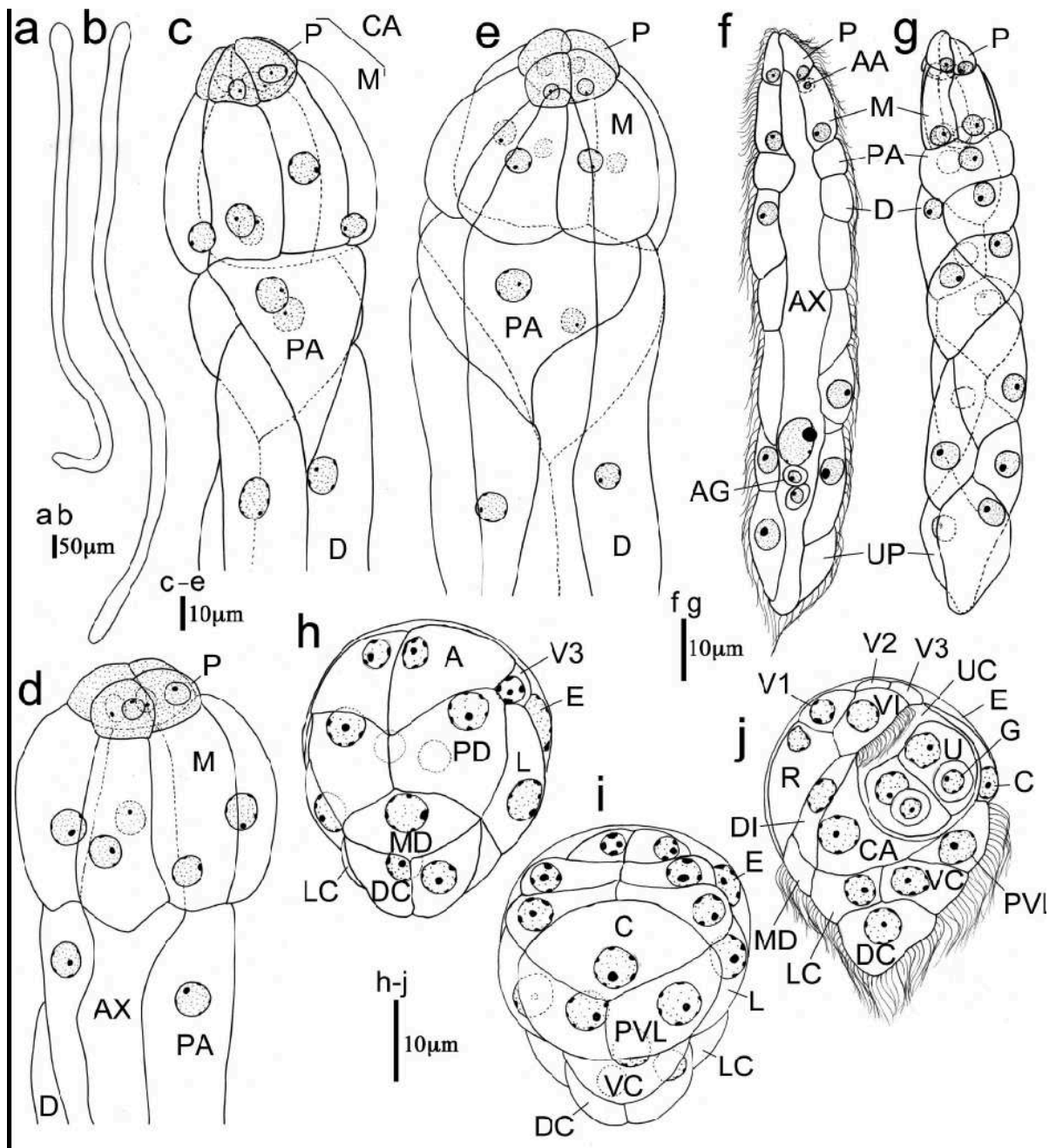


Table I Dicyemid species from *Eledone cirrhosa*

Octopus					Dicyemids
Host code	Mantle length (cm)	Weight (g)	Date of examination	Locality	
L16	13.4	782	24 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L17	6	252	24 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L19	9.2	187	24 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L20	11.8	223	24 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L21	9.3	100	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L22	8.5	98	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L23	6.3	72	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L25	7.2	76	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L26	7.7	78	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L27	7.9	81	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L28	7.4	73	25 Sep. 2013	Concarneau, France	<i>D. eledones</i>
L29	9.7	190	11 Dec. 2013	La Goulette, Tunisie	None
L30	9.9	156	12 Dec. 2013	La Goulette, Tunisie	<i>D. eledones</i>
L31	9.4	211	12 Dec. 2013	La Goulette, Tunisie	<i>D. eledones</i>

## **Annexes 3. Article 2**

Ciliates apostome Chromidina sp. infecting two cephalopods of the Mediterranean Sea, *Loligo vulgaris* and *Sepia officinalis*, with description of a new species.

Dhikra Souidenne<sup>1,2</sup>, Isabelle Florent<sup>1</sup>, Marc Dellinger<sup>1</sup>, Mohamed Salah Romdhane<sup>2</sup>, Hidetaka Furuya<sup>3</sup> and Philippe Grellier<sup>1\*</sup>.

1. UMR 7245 CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, CP 52, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France
2. UR03AGRO1 Ecosystèmes et Ressources Aquatiques, Institut National Agronomique de Tunisie, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis, Tunisie
3. Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

\*: Corresponding author: Pr Philippe Grellier, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7245 CNRS MCAM, BAMEE, CP52, 61 rue Buffon, 75005 Paris Cedex 05, France. Tel : +33(0)140793510 – Fax : +33(0)140793499 – Email : grellier@mnhn.fr.

### **English abstract**

Chromidina are enigmatic apostome ciliates that parasite the renal and pancreatic sacs of cephalopods. Only four species have been formally described and only three have been named. Furthermore, no DNA sequence has been reported so far. To investigate Chromidina diversity, we sampled cephalopods in the Mediterranean Sea, in the harbor of La Goulette, Tunisia, and identified two distinct Chromidina sp. in two different host species: *Loligo vulgaris* and *Sepia officinalis*. From hematoxylin-stained slides, we described morphological traits for these parasites species and compared them to previous descriptions. We provide evidences for a novel species that we named *Chromidina chattoni* n. sp., found in *L. vulgaris*, and evidences for a probable novel species, found in *S. officinalis*, although this latter one presents similarities to some morphological stages previously described for *Chromidina cortezi*. We also amplified, for the first time, rDNA 18S marker for these two Chromidina species. Phylogenetic analyses support the Chromidina association within the apostome ciliates, with the *Pseudocollinia* sp. group being the most closely related sister group, within the Oligohymenophorea ciliate class.

**Keywords :** Chromidinid; Apostome; Ciliate; Taxonomy; Parasite; Cephalopods

**French title:** Chromidinés apostomes infectant deux espèces de céphalopodes en mer Méditerranée, *Loligo vulgaris* et *Sepia officinalis* ; description d'une nouvelle espèce.

### **French abstract**

Les chromidinés sont des ciliés apostomes énigmatiques qui parasitent les sacs rénaux et pancréatiques des céphalopodes. Seulement 4 espèces sont décrites dont 3 formellement nommées. Aucune séquence d'ADN de ces parasites n'est disponible. Afin d'estimer la diversité des chromidinés, nous avons échantillonné des céphalopodes en mer Méditerranée, près du port de La Goulette en Tunisie. Nous avons identifié deux espèces distinctes de *Chromidina* chez le poulpe *Loligo vulgaris* et la seiche *Sepia officinalis*. Ces espèces sont morphologiquement différentes de celles décrites jusqu'alors. Pour l'espèce infectant *L. vulgaris*, les données nous permettent de la considérer sans ambiguïté comme une nouvelle espèce, que nous avons nommée *Chromidina chattoni* n. sp. Pour celle infectant *S. officinalis*, des similitudes sont observées avec un stade particulier de développement de *Chromidina cortezi* nécessitant des études plus approfondies. A partir de ces parasites, nous avons amplifié pour la première fois des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S de chromidinés. Les analyses phylogénétiques montrent qu'ils sont bien apparentés aux ciliés apostomes, avec un faible de de divergence par rapport aux *Pseudocollinia*, et sont associés aux ciliés de la Classe des Oligohymenophorea.

## Introduction

*Chromidina* Gonder 1905 are enigmatic apostome ciliates being, after Dicyemids, the most frequently encountered parasites inhabiting the reno-pancreatic sacs of cephalopods [18-20, 29]. Currently, 23 cephalopod species have been recorded as hosts of *Chromidina* species but only three species have been formally described : *Chromidina elegans* Foettinger, 1881, *C. coronata* Foettinger, 1881 and *C. cortezi* Hochberg, 1971. A fourth has been morphologically described but not named [24]. These ciliates infest mainly pelagic cephalopods such as epi-meso pelagic squids, cuttlefishes and octopuses. Occasionally, they may be found in kidneys of benthic hosts, if these hosts include a young nectonic stages during their development.

*Chromidina* carry out a polymorphic dixenous life cycle with two different budding processes which are monotomy and palintomy. The adult stage, the vermiform tropho-tomont, is uniformly ciliated and has no cytostome [4]. It is attached through its anterior end by an apical papillum to the kidney tissues with its body bathing in the renal fluids and feeds by nutriment absorption from host cells and fluids [24]. Division by monotomy produces a single long bud from the posterior end, the apotomite, which is morphologically similar to its parent and evolves into a second generation of tropho-tomonts after detachment and colonization of the host kidney. Division by palintomy produces smaller buds that form a typical chain of individuals attached to the tropho-tomont, which differentiate into tomites. Budding occurs only from the posterior end. The tomite is a small ciliate form with a unique ciliature and a cytostome [4]. When detached, it is believed that the tomite leaves the renal sacs to be released with passage of urine into the sea. This stage is presumed to encyst, as phoront, and to infest an intermediate host [17, 18]. However, no intermediate host has been confirmed so far.

Chatton and Lwoff [4] regrouped *Chromidina* within the apostome ciliate family even if their life-cycle and their morphology show important differences with typical apostomes. The main argument for such an association is that *Chromidina* tomite shares similar ciliature organization to that of apostome tomites. Besides the reference work of Chatton and Lwoff [4], reports by Hochberg [17, 18, 20] and the recent description of a novel *Chromidina* sp. by Landers [24], little is known about this enigmatic genera and notably, no DNA sequence has been reported so far. In the present study, we checked the Tunisian teuthofauna for infection by *Chromidina*. We report here the

description of two new Chromidina species which have distinct morphological traits to previously described parasites and provide for the first time Chromidina rDNA 18S sequences. Phylogenetic analysis supports the Chromidina association to apostomes within the Oligohymenophorea ciliate class.

## **Material and Methods**

### **Hosts sampling and isolation of parasites**

Cephalopods were obtained from fishermen from the harbor of La Goulette, who collected them off Tunis, in the Mediterranean Sea (36° 49'9.11''N, 10° 18'22.49''W), in January 2013 and January 2014, using traditional earthenware jugs as fishing tools [30]. In total, 5 individuals of the *Loligo vulgaris* species and 38 individuals of the *Sepia officinalis* species were collected. The cephalopod species identification was based on morphological features relying on cited identification keys [22] and species descriptions (Marine Species Identification portal <http://species-identification.org>). The hosts were rapidly dissected and their renal appendages collected. Small pieces of these renal appendages were smeared on glass microscope slides, which were immediately fixed in Bouin's fluid for 24 hours and stored in 70% ethanol. The smears were then stained in Ehrlich's hematoxylin and counterstained in eosin, then mounted with Entellan (Merck, Rahway, New Jersey) [12]. In parallel, additional renal appendage pieces from the same cephalopod host were put in individual petri dishes in sterile distilled water and observed with a stereomicroscope, to collect Chromidina with Pasteur pipettes. These parasites were then transferred to new petri dishes to be washed several times, in order to eliminate the host tissue remaining possibly attached to the parasites. Washed parasites were then transferred, one by one, to sterile Eppendorf tubes filled with 70% ethanol and were stored at 4°C until use for DNA isolation.

### **Morphological studies**

Smears were observed by light microscope. Images were recorded using a Nikon DXM 1200C camera and processed using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Measurements were made with the aid of a micrometric slide by using the ImageJ Set Scale module. Target Chromidina were observed in slides prepared from positive hosts, specifically, three infected *L. vulgaris* individuals (C21, C22 and C23) and one infected *S. officinalis* individual (S50). Smears of these specimens were deposited in the Protist collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France ([www.mnhn.fr/fr/collections/ensembles-collections/invertebres-marins/protistes](http://www.mnhn.fr/fr/collections/ensembles-collections/invertebres-marins/protistes)) under the reference numbers: MNHN-IR-2016-207/208/209 for *L. vulgaris* C21, C22 and C23, respectively, and MNHN-IR-2016-108 for *S. officinalis* S50. Chromidina morphologies from our preparations were compared to descriptions from the literature and to the original Chatton and Lwoff's smears describing *Chromidina elegans* [4], which are deposited in the Protist collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France under the reference number: MNHN-IR-1970-9.

### **Molecular studies**



DNA extractions were performed using Chelex™ (Biorad), following the methodology described in [9]. The rDNA 18S loci of Chromidina were amplified by using the universal primer pair MDP4 (forward, 5' CTGGTTGATCCTGCCAG 3', [1]) and MDP3 (reverse, 5' GACGGGCGGTGTGTAC 3', [25]), and two Chromidina specific primers designed in the course of this study: FurF (forward, 5' GCAGGCGCGTAAATTA 3') and FurR (reverse, 5' CACTCGAAATCGGTAGCA 3'). The HOT FIREPol<sup>R</sup> DNA Polymerase enzyme was used as recommended by the supplier. Briefly, following an initial denaturation period of 12 min at 94°C, 35 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 1 min at 50°C, elongation for 2 min at 72°C, were performed, and the PCR reaction was terminated by a final elongation for 7 min at 72°C. The quality of the yielded amplicons (single band, proper size) was validated after electrophoresis in 1% Agarose™ gels in 0.5x TAE buffer, in the presence of 0.5 µg/ml ethidium bromide and UV illumination. The positive amplicons were either sequenced directly or purified using Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, France) to be cloned into pGEM<sup>R</sup>-T Easy vector (Promega, France) using supplier's recommendations. Positive clones were selected by PCR using universal T7 (5' TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3') and Sp6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3') primers flanking the pGEM<sup>R</sup>-T Easy vector cloning site. DNA sequencing was performed by the Sanger method on PCR-amplified fragments, using appropriate primers (T7, Sp6, MDP4, MDP3, FurF, FurR) (Beckman Coulter Genomics, Takeley, UK). Raw chromatograms were analyzed using the Bioedit 7.1.3.0 program [16] and loci were assembled using MEGA 6 package [32]. The new rDNA 18S sequences, obtained from Chromidina used for the morphological identification (MNHN-IR-2016-207/208/209 and MNHN-IR-2016-108) were deposited in EMBL database (accession number attribution under process).

## **Phylogenetic analyses**

### **Unrooted Apostomatia Tree**

rDNA 18S sequences from the four Chromidina specimens and 17 rDNA 18S sequences representative of Apostomatia, retrieved from EMBL or GenBank databases, were aligned using the online version of MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> [23], using the secondary structure of RNA (Q-INS-I option). Non informative sites were filtered out by using the online version of GBlock ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html), [2] with stringent settings (Maximum number of contiguous non-conserved position: 8; minimum length of a block: 5; no gap position allowed), yielding a confident alignment of 1477 positions. A GTR substitution model with gamma-distributed rate variation across sites was suggested as the best-fit model by JModeltest V2.1.3 [8]. Accordingly, Maximum Likelihood analyses were performed using this GTR+G+I model, with MEGA 6.06 [32]. Bootstraps values were estimated from 1,000 replicates.

### **Maximum Likelihood and Bayesian rooted trees for Ciliophora**

rDNA 18S sequences from the four Chromidina specimens, 25 rDNA 18S sequences representative of Ciliophora and the rDNA 18S sequence of the Dinoflagellate *Biecheleriopsis adriatica* (HG792067) taken as outgroup, were

aligned using the online version of MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; [23], using the secondary structure of RNA (Q-INS-I option), and the alignment was filtered out using the online version of GBlock. For this study, GBlock settings were set to allow less strict flanking positions (Maximum number of contiguous non-conserved position: 8; minimum length of a block: 10; no gap position allowed), yielding a confident alignment of 1157 positions. A GTR substitution model with gamma-distributed rate variation across sites was suggested by JModeltest V2.1.3 as the best-fit model for this alignment [8]. Accordingly, a Bayesian phylogenetic tree was constructed with MrBayes v.3.2.3 [31] using lset nst=6 rates=Invgamma Ngammacat=4 parameters. Four simultaneous Monte Carlo Markov chains were run from random trees for a total of 5,000,000 generations in two parallel runs. A tree was sampled every 1000 generation and 25% of the trees were discarded as “burn-in”. A consensus tree was constructed from the post-burn-in trees using FigTree v1.3.1 and posterior probabilities were calculated in MrBayes. In parallel, Maximum Likelihood analyses were performed using the same alignment and the GTR+G+I model, with MEGA 6.06 [32]. Bootstraps were estimated from 1,000 replicates.

### **Genetic distances**

Evolutionary distances between sequences were computed by pairwise distances analyses in MEGA 6.06 [32], using the *Apostomatia* alignment described above (21 sequences, 1477 position).

## **Results and discussion**

### **Chromidina prevalence**

Among the 5 *Loligo vulgaris* specimens examined from La Goulette (Tunisia), three individuals (named: C21, C22 and C23) were infected with *Chromidina* sp., which corresponds to a prevalence of 60%. Among the 38 *Sepia officinalis* specimens examined from La Goulette (Tunisia), only one (S50) was infected with *Chromidina* sp., which corresponds to a prevalence of 2.6%. Smears of kidneys from the three positive *L. vulgaris* individuals clearly indicated that they were infected by *Chromidina* sp. highly similar to each other but different from all available descriptions in the literature. The *Chromidina* sp. isolated from *S. officinalis* was different from the *Chromidina* species observed in *L. vulgaris*. For morphological comparison, we also reexamined *Chromidina elegans* morphology from the original Chatton and Lwoff’s slide collection, which is deposited in the Protist collection of the Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris, France.

### **General morphology**

**Phylum:** Ciliophora Doflein, 1901

**Subphylum:** Intramacronucleata, Lynn 1996

**Class:** Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974

**Subclass:** *Apostomatia* Chatton & Lwoff, 1928

**Order:** Astomatophorida Jankowski, 1966

**Family:** Opalinopsidae Hartog, 1906

**Genus:** Chromidina Gonder, 1905

**Chromidina elegans (Foettinger, 1881) Gonder, 1905 (Figure 1)**

Materials examined: Smears were realized by Chatton and Lwoff from renal sacs of *Sepia elegans* collected in Banyuls-sur-Mer, France [4].

Host: Originally described in renal-pancreatic appendages and coela of *Sepia elegans* d'Orbigny, 1825 [11].

Other reported hosts: *Sepia orbignyana* Ferussac, 1826, *Illex coindetti* Vérany, 1837 in Mediterranean and English Channel, and in *Todarodes sagittatus* Lamarck, 1798 and *Octopus salutii* Vérany, 1839 in Mediterranean Sea [4, 17, 28]. Wermel [33] has observed *C. elegans*-like species in Russia on *Loligo* sp. and Jeps [21] and Clarke [6] in *Spirula spirula* Linnaeus 1758 in the Atlantic Ocean.

Locality: *Chromidina elegans* is known from the north-western Mediterranean. Initially described from Naples, Italy, by Foettinger [11], Chatton and Lwoff's descriptions were performed from *Sepia elegans* fished in Banyuls-sur-mer, France (42°29'01"N, 3°07'44"E) [4].

Type material: Original specimens are not localized. Hapantotypes are designated by a series of 48 slides annotated by Chatton and Lwoff and issued from their work on *Chromidina elegans* [4]. Chatton's slide collection was deposited by the French Centre National de la Recherche Scientifique in the Protist Collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, in the 1970s. *Chromidina elegans* hapantotypes were catalogued under the N°: MNHN-IR-1970-9.

Diagnosis: Species name were designated by the tropho-tomont stage attached to the renal and pancreatic excretory epithelium. *C. elegans* tropho-tomonts are thin and elongate vermiforms with a club-like and inflated anterior end (Figures 1 B, C, D) terminated by a distinguishable apical papillum (Figures 1 C, D), which attaches them to the renal tissues (Figure 1 A). Length extended from 30 up to 1400 µm with a body width average of 21.1 +/- 3.3 µm (N = 132) and an anterior end in its biggest width of 53.2 +/- 11.8 µm (N = 120). Tropho-tomonts are entirely recovered by cilia (Figure 1 D) with a ciliature constituted of 14 kineties (Figure 1E) that originates at the apex, is dextrally spiraled and directed antero-posteriorly, continuously with no break (Figure 1 G). Hematoxylin stain revealed the macronucleus, which appears as a subpellicular, open and reticulate network of chromatin through the whole body (Figure 1 B). Division occurs by palintomy (Figure 1 F) with chains of primary segments (Figure 1 H), which by fission generate up to 24 protomites (Figure 1 I). Protomites present a condensed chromatin network (Figure 1 F). Tomites have an ellipsoidal form (Figure 1 J) and a size of 27.2 +/-1.7 µm by 17.8 +/- 2.4 µm (N = 30). Presence of apotomites is not confirmed.

**Chromidina chattoni n. sp. Souidenne, Florent, and Grellier (Figure 2).**

Type host: Renal appendages of *Loligo vulgaris* Lamarck, 1798.

Type Locality: La Goulette harbor, Tunisia, Mediterranean Sea (36° 49'9.11''N, 10° 18'22.49''W).

Type material: Hapantotypes, hematoxylin-stained smears from the 3 infected *L. vulgaris* C21, C22 and C23, deposited in the Protist Collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, under the numbers: MNHN-IR-2016-207/208/209, respectively.

Etymology: The species name was chosen in memory of the French biologist Edouard Chatton for his extensive and remarkable studies on apostomes.

DNA sequence: The new species is established on the basis of the small subunit rRNA 18S gene sequence (EMBL accession number attribution under process).

Description: Species name designated by the tropho-tomont stage attached to the renal excretory epithelium. Tropho-tomonts have a characteristic elongate and thin vermiform shape with a globular anterior end (Figure 2 A) by which the parasite is attached to the renal tissues. No apical papillum was distinguishable on smears. Free swimming tropho-tomonts were observed in the renal fluids. Parasite morphology was identical on the smears made from the three infected *L. vulgaris* (C21, C22, C23). Although parasites showed their typical bulb-like anterior end (Figures 2 A, B, C, F), heterogeneous length was notified from 80 to up to 1890  $\mu\text{m}$  (mean = 657 +/- 486  $\mu\text{m}$ , N = 33). Body width was regular (average of 19.5 +/- 3.7  $\mu\text{m}$ , N = 60) as well as the globular anterior end width (average of 40.8 +/- 4.7  $\mu\text{m}$ , N = 52). Ciliature is constituted of 13 dextrally-spiraled kineties that originated at the apex (Figure 2 G) and continued uninterrupted on all the cell body. Hematoxylin stain revealed the typical reticulated macronucleus of Chromidina [4], which spreads out throughout the entire cell body (Figures 2 B, E). The cytoplasm is filled by darkly-stained islands of chromatin. One to two large and darkly-stained spots of chromatin were currently associated to the bulb-like anterior end of long tropho-tomonts (Figures 2 B, C, F). Small tropho-tomonts were weakly stained by hematoxylin and no clear network and spots of chromatin were observed (Figures 2 H, I) suggesting degenerative forms rather than apotomite forms. The posterior end shows typical Chromidina division segments that could generate either apotomites by monotony division or tomites by palintomy division (Figures 2 D, E).

Diagnosis: *C. chattoni* n. sp. tropho-tomont has a number of 13 kineties that distinguishes it from other reported Chromidina species : 12 kineties for *C. cortezi* and the species described by Landers [24], isolated from *Illex coindetti* in the Gulf of Mexico, and 14 for *C. elegans* [4] (Figure 1 E). *C. coronata* has an unreported number of kineties but significantly differs from the other species by the presence of an abundant crown of elongated cilia around the bulbous anterior end [11, 17]. *C. coronata* has been observed in *Octopus vulgaris*, *Sepiola rondeleti*, *Illex coindetti*, *Eledone cirrhosa* and *Scaevargus unicirrhus*, in Mediterranean and English Channel [4, 7, 10, 20]. In addition, *C. chattoni* differs from *C. elegans* by a bulb-like anterior end (Figures 2 B, C, F) versus an inflated club-like anterior end with a distinguishable apical papillum (Figures 1 C, D; [4]), and a less wide head (40.7 +/- 4.7  $\mu\text{m}$  versus 53.2 +/- 11.8  $\mu\text{m}$ , respectively). *C. cortezi* was described with a rounded anterior end with widths ranging from 22 to 48  $\mu\text{m}$  [17]. *C. cortezi* has been observed in *Pterygioteuthis giardi* in Gulfs of California and Mexico by Hochberg [17, 20].

### **Chromidina sp. from *Sepia officinalis* S50 (Figure 3)**

Host: Renal appendages of *Sepia officinalis* Linnaeus 1758.

Locality: La Goulette harbor, Tunisia, Mediterranean Sea (36° 49'9.11''N, 10° 18'22.49''W).

Material examined: Hematoxylin-stained smears from the infected *S. officinalis* S50, deposited in the Protist Collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, under the number MNHN-IR-2016-108.

DNA sequence: The new species is established on the basis of the small subunit rRNA gene sequence (EMBL accession number attribution under process).

Description: Tropho-tomonts were found on smears for only one *Sepia officinalis* amongst the 38 specimens examined. Furthermore, the infection was at a low level. This cuttlefish was also co-infected by the dicyemid *Pseudicyema truncatum* (data not shown). Tropho-tomonts are vermiforms (Figure 3 A) with a length of 99.6 to 481.1  $\mu\text{m}$  (mean 259.1  $\pm$  93.0  $\mu\text{m}$ , N= 38) and an average body width of 23.4  $\pm$  4.9  $\mu\text{m}$  (N = 117). In the great majority of parasites, the width of the anterior end is uniform with the body and has a conical shape terminated by a pronounced apical papillum by which the parasite is attached to the renal epithelium (Figures 3 A-E). In some cases, a slight inflation of the head is observed. The longest tropho-tomonts show a posterior end less wide than the anterior part (Figures 3 A, C). Smaller tropho-tomonts are more stocky and wider (Figure 3 E). Ciliature is constituted of dextrally-spiraled kineties that originate at the apex and continue on the cell body (Figure 3 D). Positioning of tropho-tomonts on smears did not allow however to determine the number of kineties. Hematoxylin stain reveals the typical reticulated macronucleus of *Chromidina* [4], which spreads out throughout the entire cell body. The cytoplasm is filled by darkly-stained islands of chromatin. No division (monotomy or palintomy) is however observed. Small and rounded forms are also observed suggesting either degenerative forms or an encystment process (Figures 3 F, G).

Remarks: The absence of dividing stages and the impossibility to determine the number of kineties limit the comparison with the other *Chromidina* species. The absence of crown of cilia differentiates it from *C. coronata* and such a tropho-tomont morphology (flat and conical head) was not described for *C. elegans*. Hochberg [17, 20] described apotomites of *C. cortezi* with similar morphology on the renal appendages of the squid *Pterigoteuthis giardi* fished in the in Gulfs of California and Mexico. Apotomites are large single buds produced by monotonic process from tropho-tomonts. When detached, they transform into a second generation of tropho-tomonts that colonize the renal sacs. It is suggested that stress conditions such as shortage of nutrients or required metabolites might result in the production of apotomites instead of tomites [17]. The presence of degenerative- or cyst-like forms (Figures 3 F, G) in our preparations supports such stress conditions. Furthermore, co-infection with dicyemids indicates that the infection by the *Chromidina* sp. in *S. officinalis* S50 reaches its end. *Chromidina* population is progressively replaced by dicyemids, competing for the same ecological habitat, the renal appendages, when the host evolves from a pelagic to a benthic life cycle [13]. *Pterigoteuthis giardi* was originally described from the Mediterranean Sea but is now known to be nearly cosmopolitan [17]. Whether or not, the *Chromidina* sp observed in our preparations corresponds to *C. cortezi* needs to be clarified and requires further investigations. In any case, this is the first description of a *Chromidina* sp. infecting *Sepia officinalis*.

## rDNA 18S analysis

Positive PCRs were obtained for all Chromidina samples collected from the four infected cephalopod hosts, using universal and specific primers designed to amplify a portion of the Chromidina rDNA 18S locus. Gene sequencing and assemblage allowed determining, for the first time, the partial rDNA 18S sequences for these parasite ciliates (C21, 1530bp; C22, 1529bp; C23, 1516bp; S50, 1541bp). Blast analyses revealed that the highest homology scores were obtained with known Apostomatia rDNA 18S sequences, in particular with species belonging to the genus *Pseudocollinia* [15, 26]. A multiple alignment was built using these four Chromidina sp. sequences and a representative selection of Apostomatia to compute evolutionary distances and to infer an unrooted phylogenetic tree by Maximum Likelihood method (Figure 4). Bayesian and Maximum Likelihood phylogenetic trees were also constructed using a selection of species belonging to several Ciliophora classes (Figure 5).

The three sequences obtained for Chromidina species infecting *L. vulgaris* hosts were highly similar to each other and very close to the sequence obtained for the Chromidina species infecting *S. officinalis*, with a genetic distance of less than 0.2% between the two Chromidina species. The closest relatives of these Chromidina sp sequences were those of *Pseudocollinia similis* (HQ591485.1, HQ591478.1) and *Pseudocollinia brintoni* (HQ591470.1, HQ591469.1, [14]) with a genetic divergence of 3.9-4.1%, then *Fusiforma themisticola* (KF516511.1, [3]) with a genetic divergence of 4.8%. *Vampyrophrya pelagica* (EU503539.1, [5]), *Gymnodinioides pitelkae* (EU503534.1, [5]), *Hyalophysa lwoffii* (EU503538.1, [5]) and *Hyalophysa chattoni* (EU503537.1, EU503536.1, [5]) were found at a genetic distance of 5.9-6.3% and *Gymnodinioides* sp. (EU503535.1, [5]) at a distance of ~6.5%. These values reveal the rather low divergence between these species, for this molecular marker, as previously observed by Lynn [26].

The unrooted Apostome tree clearly indicated that the Chromidina sp. sequences clustered at close proximity but were separated from both Foettingeridae and Pseudocolliniidae (Figure 4). From this it appears that Apostomatia sequences form two distinct groups: a first one comprising *Gymnodinioides*, *Vampyrophrya* and *Hyalophysa*, as previously observed [5] and a second one with Chromidina sp., *Fusiforma themisticola* [3] and all the *Pseudocollinia* sp. [15, 26] that would represent the most closely related sister group of Chromidina sp. (Figure 4). Within the Ciliophora phylum, these Chromidina sp. sequences remained grouped with the Apostomatia within the class Oligohymenophorea, in both phylogenetic analyses using the same alignment and a Dinoflagellate sequence as out-group. The bootstrap values (obtained from the Maximum Likelihood analysis) and the posterior probability values (obtained from the Bayesian analysis) (Figure 5) were very strong, within Oligohymenophorea, for the group represented by Apostomatia (*Chromidina*, *Gymnodinioides*, *Pseudocollinia*, *Fusiforma*).

In conclusion, in the present work, we identified two new Chromidina species infecting the cephalopods of the Mediterranean Sea, *Loligo vulgaris* and *Sepia officinalis*. For one of them, *Chromidina chattoni* n. sp., morphological data clearly distinguish it from the previously described Chromidina species. For the other one, morphological data are not informative enough to justify the erection of a new species and require further investigations. We also reexamined the morphology of *Chromidina elegans* Foettinger 1881 from the Chatton and Lwoff's original materials deposited in the collection of Protists of the Muséum National d'Histoire Naturelle.

From these new parasites, we provide for the first time rDNA 18S sequences for Chromidina. Phylogenetic analyses unambiguously positioned Chromidina within the Apostomatia, with Pseudocolliniidae as the most closely related sister group, and within the Oligohymenophorea class of ciliates.

### Conflict of Interest

We have no conflict of interest to declare.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from several Interdisciplinary Programs of the MNHN (ATM- Barcode, ATM-Microorganismes, ATM-Génomique et Collections, ATM-Cycles Biologiques), the Program "Bibliothèque du Vivant", Agence Universitaire de la Francophonie and grants from the Japan Society for the Promotion of Science (research grant no. 26440216).

### Figure Legends

**Figure 1.** Chromidina elegans morphology. (A) General view of infected renal sac. Parasites are attached to the renal tissues by their anterior end with their cell body hanging free in the renal coelom. (B) Tropho-tomont. (C, D) Club-like and inflated anterior ends of tropho-tomonts (\*: papillum). (E) Apical ciliature constituted of 14 kineties that extend continuously through the entire cell body. (F) Palintomy (arrow: protomites with condense chromatin). (G) Cell body ciliature. (H) First generation of protomites (arrow: fission plan). (I) Chain of second generation of protomites (arrows). (J) Free tomite (\*: micronucleus, arrow: macronucleus). Otherwise indicated, bar = 100  $\mu$ m. (A, B) Hematoxylin staining. (C, E, G-I) Chatton's silver impregnation. (D, F, J) Osmium staining.

**Figure 2.** Chromidina chattoni n. sp. morphology. (A, B) General views of tropho-tomonts. (C) Bulb-like head of tropho-tomont. (D, E) Palintomy with first generation of protomites (E) and second generation of protomites (D). Arrow: protomite. (F) Bulb-like head of tropho-tomont. Note the presence of large and darkly-stained spots of chromatin associated to the head. (G) Ciliature constituted 13 kineties (zoom of Figure 2 F). (H-I) Small forms of tropho-tomonts. Images were obtained from smears stained with hematoxylin.

**Figure 3.** Chromidina sp. of Sepia officinalis S50. (A, B, C, E) Tropho-tomonts; anterior end has a conical shape terminated by an apical papillum. (D) Enlargement of Figure 3 B showing the apical papillum and the ciliature constituted of spiraled kineties that originate at the apex (arrow). (F, G) Degenerative-like or cyst-like forms. \*: apical papillum.

**Figure 4.** Maximum Likelihood (ML) tree for Apostomatia. The evolutionary history was inferred by using the ML method based on the General Time Reversible model [27]. The tree with the highest log likelihood (-3315.3480) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach. A discrete Gamma

distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.1000)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 0.0000% sites). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 21 nucleotide sequences and there were a total of 1477 positions in the final dataset.

**Figure 5.** Phylogenetic position of *Chromidina* sp. within the Ciliophora. This phylogenetic tree, rooted on a Dinoflagellate rDNA sequences, was inferred from 30 small subunit (SSU) rDNA sequences corresponding to 4 *Chromidina* specimen identified in this study, 25 representatives of the major Classes of the Phylum Ciliophora and one Dinoflagellata sequence taken as outgroup. There were a total of 1157 positions in the final dataset. Both Maximum Likelihood (ML) method and Bayesian inferences, based on the General Time Reversible +G +I model [27]) were conducted and yielded similar topologies; the currently presented topology was obtained by the Bayesian inference. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Some branches were shortened by multiples of the length of substitutions/site scale bar (Plagyoophyrea, Phyllopharyngea). Numbers at the branches denote ML bootstrap percentage, from 1,000 resampling (first value) and Bayesian posterior probabilities (second value).

## References

1. Adl SM, Habura A, Eglit Y. 2014. Amplification primers of SSU rDNA for soil protists. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 328-342.
2. Castresana J. 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 540-552
3. Chantangsi C, Lynn DH, Rueckert S, Prokopowicz AJ, Panha S, Leander BS. 2013. *Fusiforma themisticola* n. gen., n. sp., a new genus and species of apostome ciliate infecting the hyperiid amphipod *Themisto libellula* in the Canadian Beaufort Sea (Arctic Ocean), and establishment of the Pseudocolliniidae (Ciliophora, Apostomatia). *Protist*, 164(6), 793-810.
4. Chatton E, Lwoff A. 1935. Les Ciliés Apostomes : Aperçu historique et général ; étude monographique des genres et des espèces. *Arch. Zool. Exp. Gén*, 77, 1-453.
5. Clamp JC, Bradbury PC, Strüder-Kypre MC, Lynn DH. 2008. Phylogenetic position of the apostome ciliates (Phylum Ciliophora, Subclass Apostomatia) tested using small subunit rRNA gene sequence. *Denisia*, 23, 395-402.
6. Clarke MR. 1970. Growth and Development of *Spirula Spirula*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 50(01), 53-64.
7. Collin B. 1915. A propos de *Chromidina elegans* (Foettinger). *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 160, 406-408.
8. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 9(8), 772.
9. Dellinger M, Labat A, Perrouault L, Grellier P. 2014. *Haplomyxa saranae* gen. nov. et sp. nov., a new naked freshwater foraminifer. *Protist*, 165(3), 317-29.



10. Dobell C. 1909. Some observations on the infusoria parasitic in Cephalopoda. *Q J Microsc Sci*, 53, 183-199.
11. Foettinger A. 1881. Recherches sur quelques Infusoires nouveaux parasites des Céphalopodes. *Archives de Biologie*, 2, 345-378.
12. Furuya H. 1999. Fourteen new species of dicyemid mesozoans from six Japanese cephalopods, with comments on host specificity. *Species Diversity*, 4, 257-319.
13. Furuya H, Ota M, Kimura R, Tsuneki K. 2004. Renal organs of cephalopods: a habitat for dicyemids and chromidinids. *J Morphol*, 262(2), 629-43.
14. Gomez-Gutierrez J, Struder-Kypke MC, Lynn DH, Shaw TC, Aguilar-Mendez MJ, Lopez-Cortes A, Martinez-Gomez S, Robinson CJ. 2012. *Pseudocollinia brintoni* gen. nov., sp. nov. (Apostomatida: Colliniidae), a parasitoid ciliate infecting the euphausiid *Nyctiphanes simplex*. *Dis Aquat Organ*, 99(1), 57-78.
15. Gómez-Gutiérrez J, Strüder-Kypke MC, Lynn DH, Shaw TC, Aguilar-Méndez MJ, López-Cortés A, Martínez-Gómez S, Robinson CJ. 2012. *Pseudocollinia brintoni* gen. nov., sp. nov. (Apostomatida: Colliniidae), a parasitoid ciliate infecting the euphausiid *Nyctiphanes simplex*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(1), 57-78.
16. Hall TA. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98.
17. Hochberg FG. 1971. Some aspects of the biology of cephalopod kidney parasites. University of California Santa Barbara.
18. Hochberg FG. 1982. The 'kidneys' of cephalopods: a unique habitat for parasites. *Malacologia*, 23, 121-134.
19. Hochberg FG. 1983. The parasite of cephalopods: a review. *Mem. Natl Mus. Vic.*, 44, 109-145.
20. Hochberg FG. 1990. Diseases caused by protistans and mesozoans. *Diseases of Marine Animals. Vol. III: Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland* pp.
21. Jepps MW. 1931. Appendix: On a parasitic ciliate from Spirula. *Danish Dana Expeditions*, 8, 35-36.
22. Jereb P, Roper CFE. 2005. *Cephalopods of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Cephalopod Species Known to Date*, Purposes FSCfF, Editor.
23. Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30(4), 772-80.
24. Landers SC. 2010. The fine structure of the hypertrophont of the parasitic apostome *Synophrya* (Ciliophora, Apostomatida). *Eur J Protistol*, 46(3), 171-179.
25. Lara E, Berney C, Ekelund F, Harms H, Chatzinotas A. 2007. Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 139-148.
26. Lynn DH, Gómez-Gutiérrez J, Strüder-Kypke MC, Shaw CT. 2014. Ciliate species diversity and host-parasitoid codiversification in *Pseudocollinia* infecting krill, with description of *Pseudocollinia similis* sp. nov. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(2), 89-102.
27. Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford University Press, New York pp.

28. Nouvel H. 1945. Les Dicyémides de quelque céphalopodes des côtes françaises avec indication de la présence de Chromidinidés. Bull. Insf. Oceanog. Monaco, 887.
29. Ohtsuka S, Suzaki T, Kanazawa A, Ando M. 2015. Biology of Symbiotic Apostome Ciliates: Their Diversity and Importance in the Aquatic Ecosystems. 441-463.
30. Romdhane MS. 1998. La pêche artisanale en Tunisie. Évolution des techniques ancestrales. Mélanges de l'Ecole française de Rome. Antiquité, 110(1), 61-80.
31. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol, 61(3), 539-42.
32. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol, 30(12), 2725-9.
33. Wermel EM. 1928. Untersuchungen liber Chromidina elegans (Foell.) Gond. Arch. Protistenk., 64, 419-445.

**Figure 1.**

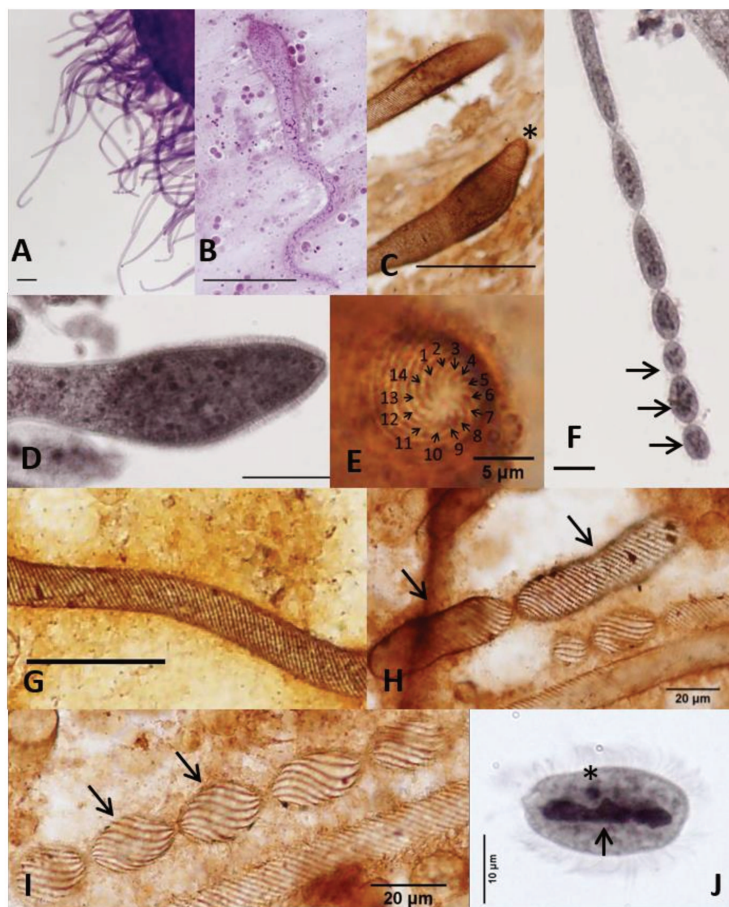


Figure 2.

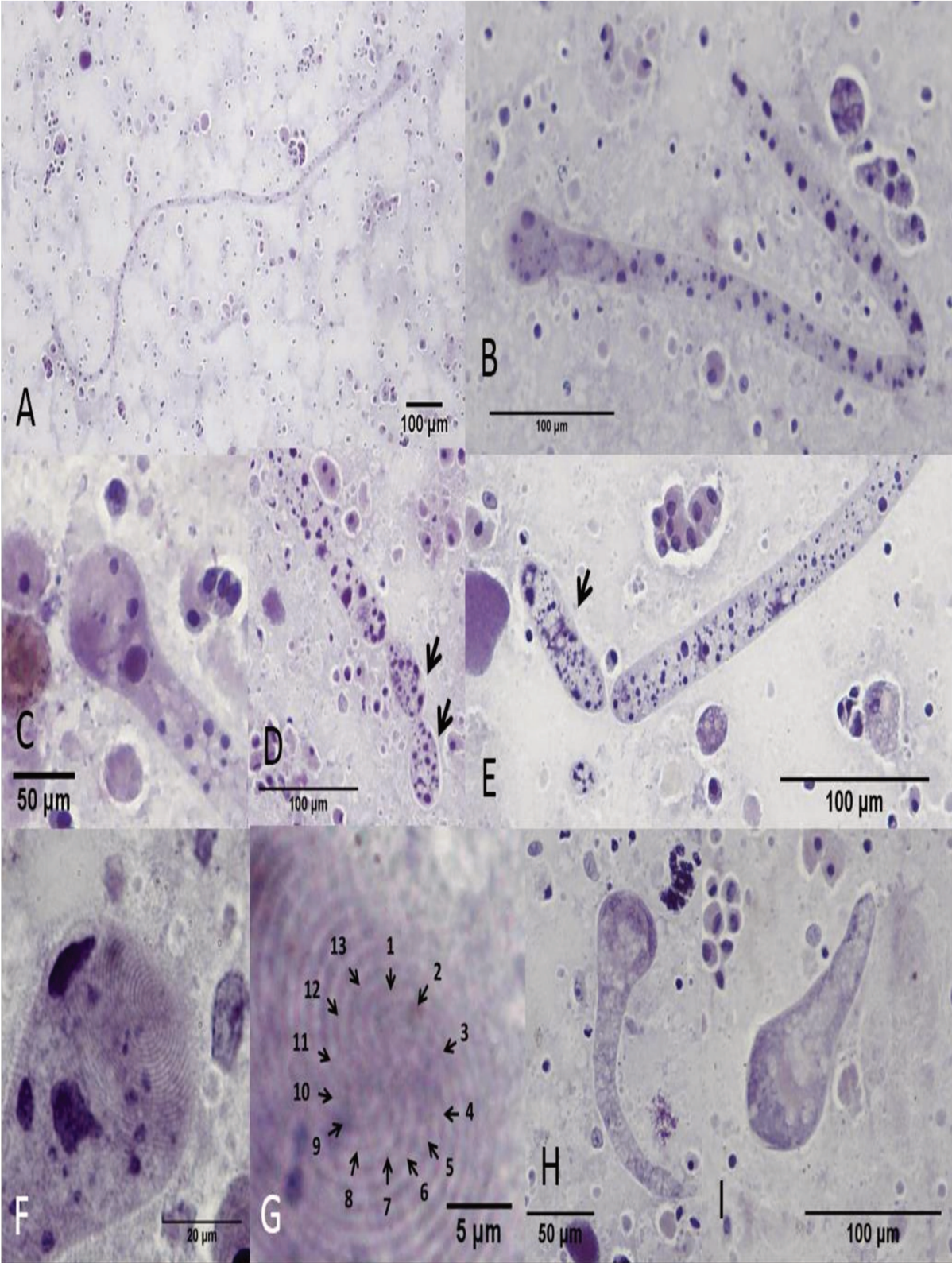




Figure 3.

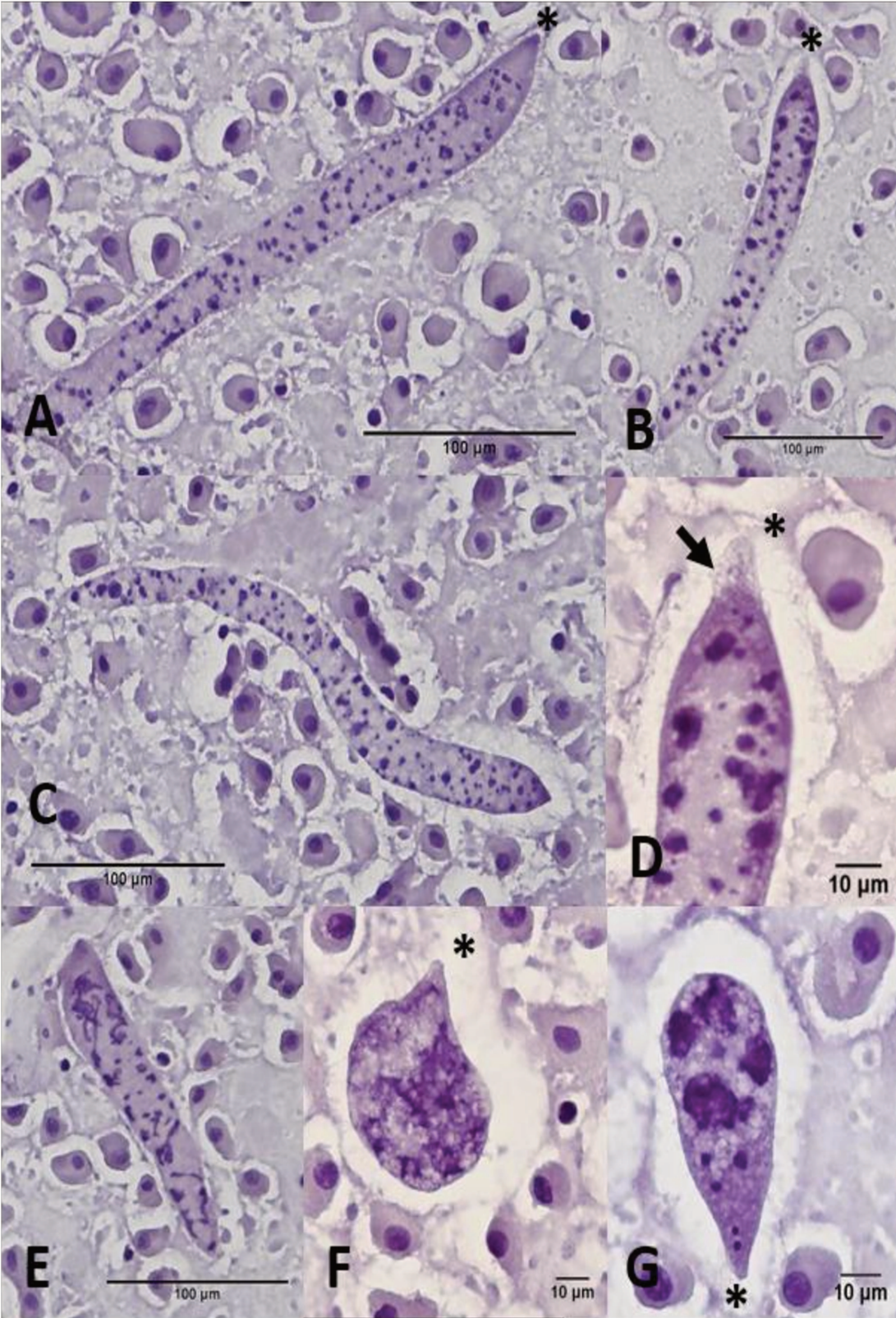


Figure 4.

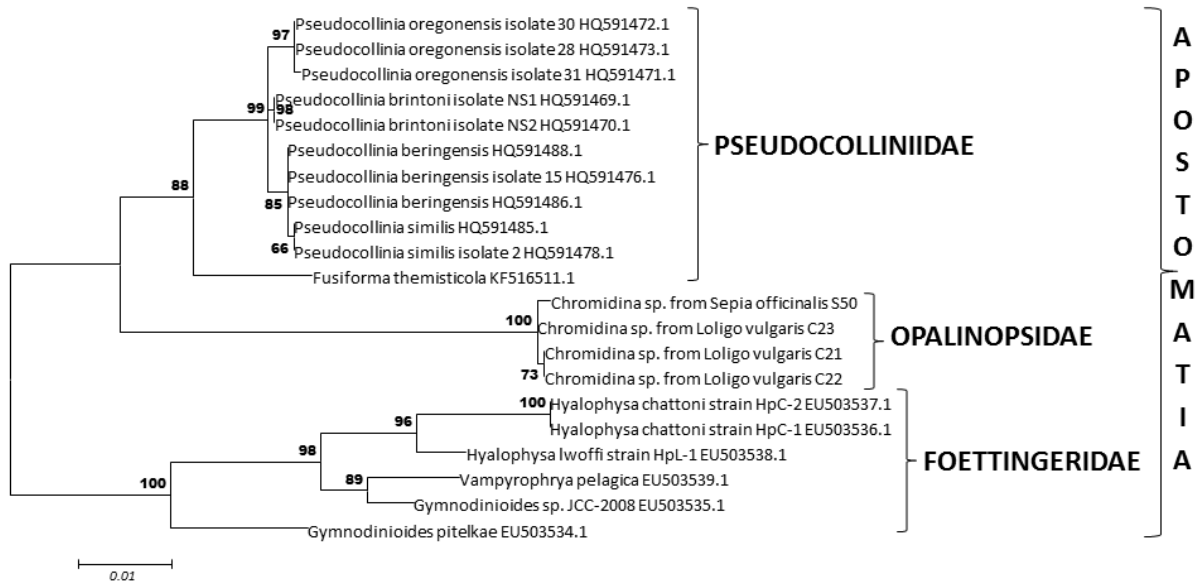
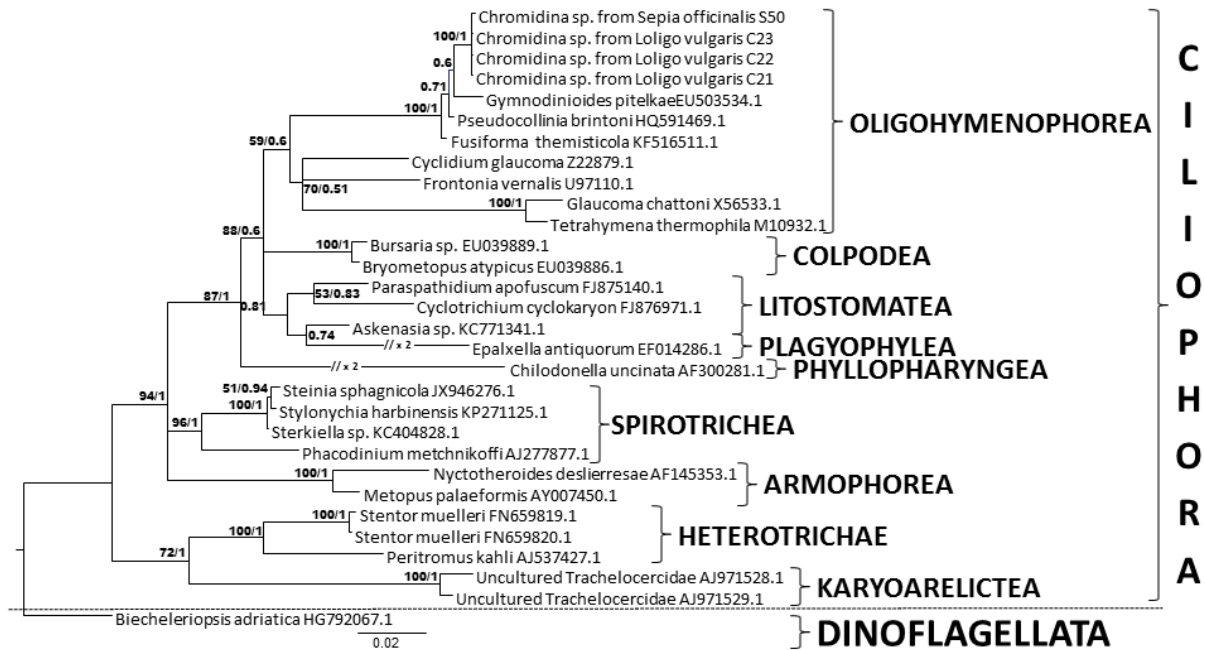


Figure 5.





## Références bibliographiques

- Aruga, J., Y. S. Odaka, et al. (2007). "Dicyema Pax6 and Zic: tool-kit genes in a highly simplified bilaterian." BMC Evol Biol **7**: 201.
- Awata, H., T. Noto, et al. (2005). "Differentiation of somatic mitochondria and the structural changes in mtDNA during development of the dicyemid *Dicyema japonicum* (Mesozoa)." Mol Genet Genomics **273**(6): 441-449.
- Beneden, C. v. (1882). "Contribution a l'histoire des Dicyemides. ." ArdIS Bioi., Bruxelles **3**(195-228).
- Beneden, E. v. (1876). "Recherches sur les Dicyemides, survivants actuels d'un embranchement des Mésozoaires." Bulletins de l'Academie Royale des Sciences de Belgique. **41**: 1160–1205.
- Benham, W. B. (1901). " Appendices to the Platyhelmsia. In E. R. Lankester (Ed.), A Treatise on zoology. IV. The Platyhelmsia, Mesozoa and Nemertini. ." Block, London.: 148-158.
- Bidder, A. M. (1966). Feeding and digestion in cephalopods., New York: Academic Press.
- Bonnaud, L. (1995). Phylogenie des céphalopodes décapodes, Muséum national d'histoire naturelle.
- Bonnaud, L., R. Boucher-Rodoni, et al. (1994). "Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16S rDNA nucleotide sequences." C R Acad Sci III **317**(6): 581-588.
- Bonnaud, L., R. Boucher-Rodoni, et al. (1997). "Phylogeny of Cephalopods Inferred from Mitochondrial DNA Sequences." Molecular Phylogenetics and Evolution **7**(1): 44-54.
- Bradbury, P., W. Song, et al. (1997). "Stomatogenesis during the formation of the tomite of *Hyalophysa chattoni* (Hymenostomatida: Ciliophora)." European Journal of Protistology **33**: 409–419.
- Bradbury, P., L. Zhang, et al. (1996). "A redescription of *Gymnodinioides Caridnae* (Miyashita, 1933) from *Palaemontetes sinensis* (Sollaud, 1911) in Songhua river." Journal of Eukaryotic Microbiology **43**: 404–408.
- Budelmann, B., R. Schipp, et al. (1997). Cephalopoda. In: Harrison FW, Kohn AJ, editors. Microscopic anatomy of invertebrates., New York: Wiley-Liss.
- Capriulo, G. and E. Small (1986). "Discovery of an apostomes ciliate ( *Collinia beringensis* sp.) endoparasitic in the Bering Sea euphausiid *Thysanoessa inermis*." Dis Aquat Org **1**: 141–146
- Carlini, D. B. and J. E. Graves (1999). "Phylogenetic analysis of cytochrome c oxidase I sequences to determine higher-level relationships within the coleoid cephalopods." BULLETIN OF MARINE SCIENCE **64**(1): 57-76.
- Carlini, D. B., K. S. Reece, et al. (2000). "Actin Gene Family Evolution and the Phylogeny of Coleoid Cephalopods (Mollusca: Cephalopoda)." Mol. Biol. Evol. **17**(9): 1353-1370.
- Carlini, D. B., R. E. Young, et al. (2001). "A Molecular Phylogeny of the Octopoda (Mollusca: Cephalopoda) Evaluated in Light of Morphological Evidence." Molecular Phylogenetics and Evolution **21**(3): 388-397.
- Castellanos-Martinez, S., M. C. Gomez, et al. (2011). "A new dicyemid from *Octopus hubbsorum* (Mollusca:Cephalopoda:Octopoda)." J Parasitol **97**(2): 265-269.
- Castellanos-Martínez, S., M. Pérez-Losada, et al. (2013). "Molecular phylogenetic analysis of the coccidian cephalopod parasites *Aggregata octopiana* and *Aggregata eberthi* (Apicomplexa: Aggregatidae) from the NE Atlantic coast using 18S rRNA sequences." European Journal of Protistology **49**(3): 373-380.
- Catalano, S. R., I. D. Whittington, et al. (2015). "First comparative insight into the architecture of COI mitochondrial minicircle molecules of dicyemids reveals marked inter-species variation." Parasitology **142**(8): 1066-1079.

- Catalano, S. R., I. D. Whittington, et al. (2013). "Using the giant Australian cuttlefish (*Sepia apama*) mass breeding aggregation to explore the life cycle of dicyemid parasites." Acta Parasitol **58**(4): 599-602.
- Catalano, S. R., I. D. Whittington, et al. (2014). "Dicyemid fauna composition and infection patterns in relation to cephalopod host biology and ecology." Folia Parasitol (Praha) **61**(4): 301-310.
- Caullery, M. and F. Mesnil (1903). "Sur la structure nucléaire d'un infusoire parasite des Actinies (*Foettingeria* (n. g.) *actiniaru* (*Plagiotoma actiniarum*))." C. r. Séanc. Soc. Biol. **55**: 806-809.
- Cavalier-Smith, T. (1993). "Kingdom protozoa and its 18 phyla." Microbiol Rev **57**(4): 953-994.
- Cavolini, F. (1787). "Memoria sulla Generazione dei Pesci et dei Granchi." Napoli.
- Chantangsi, C., D. H. Lynn, et al. (2013). "Fusiforma *themisticola* n. gen., n. sp., a new genus and species of apostome ciliate infecting the hyperiid amphipod *Themisto libellula* in the Canadian Beaufort Sea (Arctic Ocean), and establishment of the Pseudocolliniidae (Ciliophora, Apostomatia)." Protist **164**(6): 793-810.
- Chatton, E. and A. Lwoff (1926). "Sur des parasites branchiaux internes du *Portunus depurator* et sur leurs relations ontogenétiques probables avec les Infusoires (*Opalinopsidae*) des Céphalopodes." compte rendus de l'académie des sciences **94**: 282-285.
- Chatton, E. and A. Lwoff (1928). "Sur la structure, l'évolution et les affinités des *Opalinopsides* (Ciliés) des Céphalopodes." Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences, Paris **186**: 1382-1384.
- Chatton, E. and A. Lwoff (1931). "La conception des Ciliés Apostomes (*Foettingériidés* + *Opalinopsidés*). Preuve de sa validité." Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, Paris. **193**: 1483-1485.
- Chatton, E. and A. Lwoff (1935). "Les ciliés apostomes 1. Aperçu historique et général; étude monographique des genres et des espèces." Archives de zoologie expérimentale et générale. **77**: 1-453.
- Clamp, J. C., P. C. Bradbury, et al. (2008). "Phylogenetic position of the apostome ciliates (Phylum Ciliophora, Subclass Apostomatia) tested using small subunit rRNA gene sequences." Denisia **23**: 395-402.
- Claparede, E. (1857). "Zusatz zu: Wagener, Uber *Dicyema* Kbllicker." Arch. Anat. Physiol.: 364-368.
- Clarke, M. R. (1970). "Growth and development of *Spirula spirula*." J mar. bioi. Ass. U. K. **50**: 53-64.
- Clarke, M. R. (1996). "The Role of Cephalopods in the World's Oceans: An Introduction." Philosophical Transactions: Biological Sciences **351**(1343): 979-983.
- Collin, B. (1914). "Sur deux infusoires ciliés parasites d'hétéropodes. et sur un flagelle vivant chez même hôte. a. *Syringiopharynx plerotrachae* n. g.; n. sp. b. *Opalinopsis carinariae* n. sp. c. *CrYPIobia carinoriae* n. sp." Archs Zool. expo gen. (Notes and Rev.) **54**: 88-98.
- Collin, B. (1914b). "Sur les formes d'involution d'ull Infusoire cilié dans le rein d'un Céphalopode." c. r. hebd. Seanc. Acad. Sci, Paris **158**: 891-892.
- Collin, B. (1915). "A propos de *Chromidina elegans* (Foettinger)." C r. hebd. Seanc. Acad. Sci..Paris **160**: 406-408.
- Czaker, R. (2000). "Extracellular matrix (ECM) components in a very primitive multicellular animal, the dicyemid mesozoan *Kantharella antarctica*." Anat Rec **259**(1): 52-59.
- Czaker, R. (2011). "Dicyemid's dilemma: structure versus genes. The unorthodox structure of dicyemid reproduction." Cell Tissue Res **343**(3): 649-658.
- Darriba, D., G. L. Taboada, et al. (2012). "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing." Nat Methods **9**(8): 772.
- Delage, Y. and E. Hérouard (1899a). Mesogoniens: Dicyemides. Traité de Zoologie Concrète. Paris, Schleicher Frères: 14-26.
- Delage, Y. and E. Hérouard (1899b). "Mésozoaires.Spongiaires." Traité de zoologie concrète Tome II: 244.



- Dellinger, M., A. Labat, et al. (2014). "Haplomyxa saranae gen. nov. et sp. nov., a new naked freshwater foraminifer." Protist **165**(3): 317-329.
- Dobell, C. C. (1908). "The structure and life-history of Copromonas subtilis n. g., n. so.: a contribution to our knowledge of the Flagellata." Quart. J. Micr. Sci. **52**: 75-120.
- Dobell, C. C. (1909). "Some observations on the infusoria parasitic in Cephalopoda." Q. il microsc. Science **53**: 183-199.
- Erdl, P. (1843). "Ober die beweglichen Faden in den Venenanhangen der Cephalopoden. ." Arch. Nawrgesch **1**(162-167).
- Eshragh, R. and B. S. Leander (2014). "Molecular contributions to species boundaries in dicyemid parasites from eastern Pacific cephalopods." Marine Biology Research **11**(4): 414-422.
- Espina, V., J. Milia, et al. (2006). Laser Capture Microdissection. Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols. D. J. Taatjes and B. T. Mossman. Totowa, NJ, Humana Press: 213-229.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence Limits on phylogenies: An approach using bootstrap." Evolution **39**(4): 783-791.
- Finn, J. K., F. G. Hochberg, et al. (2005). "Phylum Dicyemida in Australian waters: first record and distribution across diverse cephalopod hosts. ." Phuket Mar. Biol. Cent. Res. Bull **66**: 83-96.
- Florent, I., E. Mouray, et al. (2000). "Cloning of Plasmodium falciparum protein disulfide isomerase homologue by affinity purification using the antiplasmodial inhibitor 1,4-bis{3-[N-(cyclohexyl methyl)amino]propyl}piperazine 1." FEBS Letters **484**(3): 246-252.
- Foettinger, A. (1881). " Recherches sur quelques infusoires nouveaux, parasites des céphalopodes." Archives de Biologie **2**: 345-378.
- Folmer, M. Black, et al. (1994). "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates." Molecular Marine Biology and Biotechnology **3**(5): 294-299.
- Furuya, H. (1999). "Fourteen new species of dicyemid mesozoans from six Japanese cephalopods, with comments on host specificity." Species Diversity **4**: 257-319.
- Furuya, H. (2002). "Zoological Society Young Investigator Award. The biology of dicyemid mesozoans." Zoolog Sci **19**(12): 1398-1399.
- Furuya, H. (2006a). "A new species of Dicyemenea Whitman, 1883 (Phylum Dicyemida) from Sepia latimanus (Mollusca: Cephalopoda: Decapodidae) off Okinawa, Japan." Syst Parasitol **65**(3): 205-213.
- Furuya, H. (2006b). "Three new species of dicyemid mesozoans (phylum Dicyemida) from Amphioctopus fangsiao (Mollusca: Cephalopoda), with comments on the occurrence patterns of dicyemids." Zoolog Sci **23**(1): 105-119.
- Furuya, H. (2007). "Redescription of two Dicyemenea (Phylum: Dicyemida) from Rossia pacifica (Mollusca: Cephalopoda: Decapoda)." J Parasitol **93**(4): 841-849.
- Furuya, H. (2008). "A new dicyemid from Sepiella japonica (Mollusca: Cephalopoda: Decapoda)." J Parasitol **94**(1): 223-229.
- Furuya, H. (2009). "A new dicyemid from Opisthoteuthis depressa (Mollusca: Cephalopoda: Octopoda)." J Parasitol **95**(4): 971-975.
- Furuya, H. (2010). "A new dicyemid from Benthoctopus sibiricus (Mollusca: Cephalopoda: Octopoda)." J Parasitol **96**(6): 1123-1127.
- Furuya, H. and F. G. Hochberg (1999). "Three new species of Dicyema (Phylum Dicyemida) from cephalopods in the Western Mediterranean." Vie Milieu **49**: 117-128.
- Furuya, H. and F. G. Hochberg (2002). "New species of Dicyemenea (phylum: Dicyemida) in deep-water Graneledone (Mollusca: Cephalopoda: Octopoda) from the Antarctic." J Parasitol **88**(2): 330-336.
- Furuya, H., F. G. Hochberg, et al. (2001). "Developmental patterns and cell lineages of vermiform embryos in dicyemid mesozoans." Biol Bull **201**(3): 405-416.

- Furuya, H., F. G. Hochberg, et al. (2003). "Calotte morphology in the phylum Dicyemida: niche separation and convergence." *Journal of Zoology* **259**(4): 361-373.
- Furuya, H., F. G. Hochberg, et al. (2004). "Cell number and cellular composition in infusoriform larvae of dicyemid mesozoans (Phylum Dicyemida)." *Zoolog Sci* **21**(8): 877-889.
- Furuya, H., M. Ota, et al. (2004). "Renal organs of cephalopods: a habitat for dicyemids and chromidinids." *J Morphol* **262**(2): 629-643.
- Furuya, H. and K. Tsuneki (2003). "Biology of dicyemid mesozoans." *Zoolog Sci* **20**(5): 519-532.
- Furuya, H., K. Tsuneki, et al. (1992). "Two new species of the genus *Dicyema* (Mesozoa) from octopuses of Japan with notes on *D. misakiense* and *D. acuticephalum*." *Zoological Science* **9**: 423-437.
- Garbowski, T. (1903). "Die Taxonomie der Mesozoen. ." *Morphogenetische Studien*. Fischer, Jena.
- Gebhardt, K. and T. Kneibelsberger (2015). "Identification of cephalopod species from the North and Baltic Seas using morphology, COI and 18S rDNA sequences." *Helgoland marine research* **69**(3): 259-271.
- Gersch, M. (1938). "Untersuchungen über die Fortpflanzung der Dicyemiden." *Zool. Anz* **11**: 64-71.
- Gestal, C., E. Abollo, et al. (2002). "Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*." *Dis. Aquat. Org.* **50**: 45-49.
- Gestal, C., S. Pascual, et al. (2010). "*Aggregata bathytherma* sp. nov. (Apicomplexa: Aggregatidae), a new coccidian parasite associated with a deep-sea hydrothermal vent octopus." *Dis Aquat Organ* **91**(3): 237-242.
- Gomez-Gutierrez, J., M. C. Struder-Kypke, et al. (2012). "*Pseudocollinia brintoni* gen. nov., sp. nov. (Apostomatida: Colliniidae), a parasitoid ciliate infecting the euphausiid *Nyctiphanes simplex*." *Dis Aquat Organ* **99**(1): 57-78.
- Gonder, R. (1905). "Beiträge zur Kenntnis der Kernverhältnisse bei den in Cephalopoden schmarotzenden Infusorien." *Arch. Protistenk.* **5**: 240-262.
- González, A. F., S. Pascual, et al. (2003). "What makes a cephalopod a suitable host for parasite? The case of Galician waters." *Fisheries Research* **60**(1): 177-183.
- Greenwood, S. J., M. L. Sogin, et al. (1991). "Phylogenetic relationships within the class Oligohymenophorea, phylum Ciliophora, inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Colpidium campylum*, *Glaucocystis chattoni*, and *Opisthonecta henneguyi*." *J Mol Evol* **33**(2): 163-174.
- Guerra, A. (1992). *Mollusca Cephalopoda*. Madrid, Museo Nacional de Ciencias Naturales - CSIC.
- Hall, T. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hanlon, R. T., J. W. Forsythe, et al. (1984). "Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses." *J Invertebr. Pathol.* **44**: 67-83.
- Hartog, M. (1906). "Protozoa." *The Cambridge Natural History* **1**: 1-162.
- Hebert, P. D., A. Cywinska, et al. (2003). "Biological identifications through DNA barcodes." *Proc Biol Sci* **270**(1512): 313-321.
- Hess, H. C. (1987). *Comparative morphology, variability, and systematic applications of cephalopod spermatophores (Teuthoidea and Vampyromorpha)*. The University of Miami, Coral Gables, FL.
- Hochberg, F. (1982). "The "kidneys" of cephalopods: a unique habitat for parasites." *Malacologia* **23**: 121-134.
- Hochberg, F. (1990). *Diseases caused by protistans and mesozoans*. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland.
- Hochberg, F. G. (1971). *Some aspects of the biology of cephalopod kidney parasites*, University of California Santa Barbara.
- Hochberg, F. G. (1983). "The parasites of cephalopods: a review." *Mem Natl Mus Vict* **44**: 109-145.
- Hoffman, E. (1965). "Mesozoa of the sepioid, *Rossia pacifica* (Berry)." *Journal of parasitology* **51**: 313-320.

- Holterman, M., O. Holovachov, et al. (2008). "Small subunit ribosomal DNA-based phylogeny of basal Chromadoria (Nematoda) suggests that transitions from marine to terrestrial habitats (and vice versa) require relatively simple adaptations." Molecular Phylogenetics and Evolution **48**(2): 758-763.
- Holterman, M., A. van der Wurff, et al. (2006). "Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades." Molecular Biology and Evolution **23**(9): 1792-1800.
- Hopkins, R., B. Meloni, et al. (1997). "Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality." J Parasitol. **83**: 44-51.
- Hori, H. and S. Osawa (1987). "Origin and evolution of organisms as deduced from 5s ribosomal RNA sequences." Mol. Biol. Evol. **4**: 445-472.
- Hyman, L. H. (1959). Retrospect. New York, McGraw-Hill.
- Ivanov, A. V. (1983). "On systematic position of Mesozoa." Evolution and Morphology of Invertebrates (In Russian). Dokl. Akad. Nauk USSR **109**: 76-89.
- Jepps, M. W. (1931). "Appendix: On a parasitic ciliate from Spirula." Danish Dana Expeditions **8**: 35-36.
- Jereb, P. and C. F. E. Roper (2005). Cephalopods of the world: chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae, and Spirulidae). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jereb, P. and C. F. E. Roper (2011). Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jones, D., W. Taylor, et al. (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." Comput Appl Biosci. **8**: 275-282.
- Jullien, N. (2013). "AmplifX." CNRS, Aix-Marseille Université.
- Katayama, T., H. Wada, et al. (1995). "Phylogenetic position of the dicyemid mesozoa inferred from 18S rDNA sequences." Biol Bull **189**(2): 81-90.
- Katoh, K. and H. Toh (2008). "Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program." Brief Bioinform **9**(4): 286-298.
- Kinne, O. E. (1980). "Diseases of Marine Animals : General Aspects, Protozoa to Gastropoda." Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. **1**.
- Kobayashi, M., H. Furuya, et al. (1999). "Dicyemids are higher animals." Nature **401**(6755): 762.
- Kobayashi, M., H. Furuya, et al. (2009). "Molecular markers comparing the extremely simple body plan of dicyemids to that of lophotrochozoans: insight from the expression patterns of Hox, Otx, and brachyury." Evol Dev **11**(5): 582-589.
- Kolliker, A. v. (1849). "Ober Dicyema paradoxum, den Schmarotzer der Venenanhänge der Cephalopoden." Ber. Konig. Zool. Anst. Würzburg **2**: 59-66.
- Krohn, A. (1830). "Froriep's Notizen." (235).
- Kudo, T., N. Yoshii, et al. (1966). "Effects of stereotaxic thalamotomy on intractable pain and numbness. Preliminary report." Keio J Med **15**(4): 191-195.
- Landers, S., A. Confusione, et al. (1996). "Hyalophysa bradburyae sp. n., a new species of apistome ciliate from the grass shrimp *Palaemonetes kadiakensis*." Eur J Protistol **32**: 372-379.
- Landers, S. C. (1991). "The fine structure of secretion in *Hyalophysa chattoni*: formation of the attachment peduncle and the chitinous phoretic cyst wall." J Protozool **38**(2): 148-157.
- Landers, S. C. (2010). "The fine structure of the hypertrophont of the parasitic apistome *Synophrya* (Ciliophora, Apistomatida)." Eur J Protistol **46**(3): 171-179.
- Landers, S. C. (2010). "The fine structure of the tropho-tomont of the parasitic apistome *Chromidina* (Ciliophora, Apistomatida)." Protistology **6**(4): 271-279.

- Lankester, E. R. (1873). "The parasite of the renal organ of Cephalopoda. In Summary of zoological observations made at Naples in the winter of 1871-1872." Ann. Mag. nat. Hist. **11**: 81-97.
- Lapan, E. A. (1975). "Studies on the chemistry of the octopus renal system and an observation on the symbiotic relationship of the dicyemid Mesozoa." Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **52**(4): 651-657.
- Lapan, E. A. and H. Morowitz (1972). "The mesozoa." Scientific American **227**: 94 - 101.
- Lara, E., C. Berney, et al. (2007). "Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site." Soil Biology and Biochemistry **39**(1): 139-148.
- Leach, W. E. (1817). "Synopsis of the Orders, Families, and Genera of the Class Cephalopoda." The Zoological Miscellany; being Descriptions of New or Interesting Animals **3**(30): 137-141.
- Leander, B. S. (2008). "Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation?" Trends in Parasitology **24**(2): 60-67.
- Lincoln, R. J., G. A. Boxshall, et al. (1982). "A dictionary of ecology, evolution and systematics." New York: Cambridge University Press.
- Lindgren, A. R., G. Giribet, et al. (2004). "A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca)." Cladistics **20**: 454-486.
- Lindgren, A. R., M. S. Pankey, et al. (2012). "A multi-gene phylogeny of Cephalopoda supports convergent morphological evolution in association with multiple habitat shifts in the marine environment." BMC Evol Biol **12**: 129.
- Lynn, D. H. (2008). The Ciliated Protozoa Characterization, Classification, and Guide to the Literature, Springer Science.
- Lynn, D. H., J. Gómez-Gutiérrez, et al. (2014). "Ciliate species diversity and host-parasitoid codiversification in Pseudocollinia infecting krill, with description of Pseudocollinia similis sp. nov." Diseases of Aquatic Organisms **112**(2): 89-102.
- Mangold-Wirz, K. (1963). "Biologie des Céphalopodes benthiques et nectoniques de la Mer catalane." Vie Milieu **13 (Suppl.)**: 1-285.
- Mangold, K. (1983). Octopus vulgaris. In: P.R. Boyle (ed.), Cephalopod Life Cycles London, Academic Press
- Martin, A. W. (1975). "Physiology of the excretory organs of cephalopods. ." Fortschritte der Zoologie **23**: 112-123.
- Mattiucci, S., V. Farina, et al. (2008). "Anisakis spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization." Fisheries Research **89**(2): 146-151.
- Mayr, E. (1969). "Principles of systematic zoology. ." New York: McGraw-Hill.
- Mayr, E. (1982). "The growth of biological thought. Diversity, evolution, and inheritance. ." Cambridge, MA: Harvard University Press.
- McConnaughey, B. (1951). "The life cycle of the dicyemid Mesozoa." Univ Calif Publ Zool **55**: 295-336.
- McConnaughey, B. H. (1941). "Two new mesozoa from California, Dicyemenea californica and Dicyemenea hrevicephala (Dicyemidae)." Parasir. **27**: 63-69.
- McConnaughey, B. H. (1960). "The rhombogen phase of Dicyema sullivanii McConnaughey (Mesozoa: Dicyemidae)." J Parasitol **46**: 608-610.
- McConnaughey, B. H. (1963). The Mesozoa. In E. C. Dougherty (Ed.). The Lower Metazoa. Los Angeles, University of California Press.
- McConnaughey, B. H. and . (1951). "The life cycle of the dicyemid Mesozoa." Univ. Calif. Pubis. Zool. **55**: 295-336.
- Mendes, E. G. (1940). "Sabre os Mesozoários." Filosofia, Cienc, Letr **7**: 82-93.
- Meyer, C. P. and G. Paulay (2005). "DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling." PLoS Biol **3**(12).

- Mladineo, I. and I. Bočina (2007). "Extraintestinal gamogony of *Aggregata octopiana* in the reared common octopus (*Octopus vulgaris*) (Cephalopoda: Octopodidae)." Journal of Invertebrate Pathology **96**(3): 261-264.
- Naef, A. (1912). "Teuthologische Notizen. 7. Zur Morphologie und Systematik der Sepiola- und Sepietta-Arten." Zoologischer Anzeiger **40**(2): 78-85.
- Neresheimer, E. (1908). "Die Mesozoen. Zool. Zentralbl." **15**: 257-312.
- Nesis, K. N. (1987). "Cephalopods of the World." Neptune City, NJ: T.F.H. Publications.
- Noto, T. and H. Endoh (2004). "A "chimera" theory on the origin of dicyemid mesozoans: evolution driven by frequent lateral gene transfer from host to parasite." Biosystems **73**(1): 73-83.
- Nouvel, H. (1933). "Recherches sur la cytologie, la physiologie et la biologie des Dicyemides." Anl. nsr. odal. og. Monaco, new ser. **13**: 165-255.
- Nouvel, H. (1937). "Les Dicyémides. I. Systématique, générations, vermiformes, infusorigène et sexualité." Archive de Biologie de Paris **58**: 59-220.
- Nouvel, H. (1945). "Les Dicyemides de quelques céphalopodes des côtes françaises avec indication de la présence de Chromidinides." Bull. Insf. oceanog. Monaco **887**: 1-8.
- Nouvel, H. (1947). Les Dicyémides. 1re partie: systématique, générations, vermiformes, infusorigène et sexualité. Arch Biol Paris. **58**: 59-220.
- Ohama, T., T. Kumazaki, et al. (1984). "Evolution of multicellular animals as deduced from SS rRNA sequences: a possible early emergence of the Mesozoa." Nucleic Acids Research **12**(12).
- Ohtsuka, S., T. Suzuki, et al. (2015). "Biology of Symbiotic Apicomplexan Ciliates: Their Diversity and Importance in the Aquatic Ecosystems." 441-463.
- Pascual, S., A. González, et al. (2007). "Parasites and cephalopod fisheries uncertainty: towards a waterfall understanding." Reviews in Fish Biology and Fisheries **17**(2-3): 139-144.
- Pascual, S. and F. G. Hochberg (1996). "Marine parasites as biological tags of cephalopod hosts." Parasitol Today **12**(8): 324-327.
- Pawlowski, J., J.-I. Montoya-Burgos, et al. (1996). "Origin of the Mesozoa Inferred from 18s rRNA Gene Sequences." Mol. Biol. Ed. **13**(8): 1128-1132.
- Philippe, H. and P. Forterre (1999). "The rooting of the universal tree of life is not reliable." J Mol Evol **49**(4): 509-523.
- Potts, W. T. W. and M. Todd (1965). "Kidney function in the octopus." Comparative Biochemistry and Physiology **16**(4): 479-489.
- Poynton, S. L., R. Reimschuessel, et al. (1992). "*Aggregata dobelli* n. sp. and *Aggregata millerorum* n. sp. (Apicomplexa, Aggregatidae) from two species of octopus (Mollusca, Octopodidae) from the Eastern North Pacific-Ocean." J. Protozool. **39**: 248-256.
- Ridley, R. (1968). "Electron microscopic studies on dicyemid mesozoa in vermiform stages." J Parasitol Res **54**: 975-998.
- Romdhane, M. S. (1998). "La pêche artisanale en Tunisie. Évolution des techniques ancestrales." Mélanges de l'École française de Rome. Antiquité **110**(1): 61-80.
- Roper, C. F. E. (1969). "Systematics and zoogeography of the worldwide bathypelagic squid *Bathyteuthis* (Cephalopoda: Oegopsida)." Bulletin of the United States National Museum **291**: 1-210.
- Schipp, R. and S. Boletzky (1975). Morphology and function of the excretory organs in dibranchiate cephalopods. International symposium of the "Academie der Wissenschaften und Literatur" Mainz 1974. In Forstschr Zool. **23**.
- Short, R. (1971). "Three new species of *Dicyema* (Mesozoa: Dicyemidae) from New Zealand." Ant Res Ser **17**: 231-249.
- Short, R. B. and R. T. Damian (1966). "Morphology of the infusoriform larva of *Dicyema aegira* (Mesozoa: Dicyemidae)." J Parasitol **52**(4): 746-751.

- Short, R. B. and F. G. Hochberg, Jr. (1969). "Two new species of Dicyemenea (Mesozoa: dicyemidae) from Kaikoura, New Zealand." J Parasitol **55**(3): 583-596.
- Siebold, V. (1845). "Bericht über die Leistungen im Gebiete der Helminthologie während des jahres." Ibid **1**.
- Sina M. Adl, A. H., Yana Eglit (2014). "Amplification primers of SSU rDNA for soil protists." Soil Biology & Biochemistry (69): 328-342.
- Small, E. B. and D. H. Lynn (1985). Phylum Ciliophora DOFLEIN, 1901., Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas.
- Stamatakis, A. (2014). "RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies." Bioinformatics **30**(9): 1312-1313.
- Stunkard, H. W. (1954). "The life-history and systematic relations of the Mesozoa." Q. Rev. Biol. **20**: 230-244.
- Stunkard, H. W. (1972). "Clarification of taxonomy in the Mesozoa." Syst. Zool. **21**: 210-214.
- Stunkard, H. W. (1982). "Mesozoa." In S. P. Parker (Ed.), Synopsis and Classification of Living Organisms. **1**: 853-855.
- Suzuki, T. G., K. Ogino, et al. (2010). "Phylogenetic analysis of dicyemid mesozoans (phylum Dicyemida) from innexin amino acid sequences: dicyemids are not related to Platyhelminthes." J Parasitol **96**(3): 614-625.
- Tamura, K., D. Peterson, et al. (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Mol Biol Evol **28**(10): 2731-2739.
- Tamura, K., G. Stecher, et al. (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." Mol Biol Evol **30**(12): 2725-2729.
- Teichert, C. (1967). "Major features of cephalopod evolution. In Essays of Paleontology and Stratigraphy." Lawrence: University of Kansas Press: 162-210.
- Telford, M. J., E. A. Herniou, et al. (2000). "Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: Two examples from the flatworms." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(21): 11359-11364.
- Toll, R. B. (1982). The comparative morphology of the gladius in the order Teuthoidea (Mollusca: Cephalopoda) in relation to systematics and phylogeny., University of Miami, Coral Gables, FL.
- Vidal, E. A. G. and M. Haimovici (1999). "Digestive tract parasites in rhynchoteuthion squid paralarvae, particularly in *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae)." Fish. Bull. **97**: 402-405
- Voss, G. L. (1977). "Appendix II: Classification of recent cephalopods." Symposium Zoological Society of London **38**: 575-579.
- Wagener, G. R. (1854). "Die Entwicklung der Cestoden nach eigenen Untersuchungen." Nova Acta Acad. Caesar, Leop. Carol. **24**: 1-91.
- Watanabe, K. I., Y. Bessho, et al. (1999). "Mitochondrial genes are found on minicircle DNA molecules in the mesozoan animal Dicyema." J Mol Biol **286**(3): 645-650.
- Wermel, E. M. (1928). "Untersuchungen liber Chromidina elegans (Foell.) Gond." Arch. Protistenk. **64**: 419-445.
- Whitman, C. O. (1883). "A contribution to the embryology, life history and classification of the dicyemids." Miu. Zool. Sin Neapel **4**: 1-89.
- Xia, X., Z. Xie, et al. (2003). "An index of substitution saturation and its application." Mol Phylogenet Evol **26**(1): 1-7.

