

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

Thèse de doctorat

Spécialité : Océanologie Biologique et Environnement Marin

Présentée par

Eric DURIEUX

Ecologie du système hôte – parasite, juvéniles G0
de sole (*Solea solea*) – métacercaires de Digènes :
dynamique et effets de l’infestation.

Soutenue à La Rochelle le 14 juin 2007

Jury composé de :

Rachid Amara, Professeur, Univ. du Littoral Côte d’Opale	Rapporteur
Marie-Laure Bégout, Cadre de Recherche, IFREMER l’Houmeau	Directrice de thèse
Gérard Blanchard, Professeur, Univ. de La Rochelle	Examineur
Eric Feunteun, Professeur, MNHN Station Marine de Dinard	Examineur
Philippe Gouletquer, Assimilé Professeur, IFREMER La Tremblade	Examineur
Xavier de Montaudouin, Maître de Conférence HDR, Univ. Bordeaux 1	Rapporteur
Pierre Sasal, Chargé de Recherche, CNRS CBETM Univ. de Perpignan	Tuteur scientifique

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

Thèse de doctorat

Spécialité : Océanologie Biologique et Environnement Marin

Présentée par

Eric DURIEUX

Ecologie du système hôte – parasite, juvéniles G0
de sole (*Solea solea*) – métacercaires de Digènes :
dynamique et effets de l'infestation.

Soutenue à La Rochelle le 14 juin 2007

Jury composé de :

Rachid Amara, Professeur, Univ. du Littoral Côte d'Opale	Rapporteur
Marie-Laure Bégout, Cadre de Recherche, IFREMER l'Houmeau	Directrice de thèse
Gérard Blanchard, Professeur, Univ. de La Rochelle	Examineur
Eric Feunteun, Professeur, MNHN Station Marine de Dinard	Examineur
Philippe Gouletquer, Assimilé Professeur, IFREMER La Tremblade	Examineur
Xavier de Montaudouin, Maître de Conférence HDR, Univ. Bordeaux 1	Rapporteur
Pierre Sasal, Chargé de Recherche, CNRS CBETM Univ. de Perpignan	Tuteur scientifique

Avant-propos

Ma candidature à ce sujet proposé en 2003 par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a été retenue par la commission scientifique chargée de l'attribution des bourses doctorales. J'ai ainsi pu réaliser cette thèse en tant que boursier IFREMER en cofinancement avec la Région Poitou Charentes à partir de Décembre 2003 et ce pour une durée de 3 ans. J'ai ensuite achevé mes travaux de recherche en 2007 en tant qu'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université de La Rochelle, où j'ai participé aux enseignements de Licence d'Ecologie générale et de Biologie animale.

J'ai réalisé ma thèse sous la direction de Marie-Laure Bégout au CRELA (Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés) L'Houmeau UMR 6217 (IFREMER – CNRS – Université de La Rochelle), au sein de l'équipe AMARE « Adaptation des Animaux Marins en Réponse à l'Environnement ». J'ai par ailleurs bénéficié du co-encadrement étroit de Pierre Sasal du CBETM (Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne de l'Université de Perpignan) UMR 5244 (CNRS – EPHE – Université de Perpignan Via Domitia) de l'équipe « Parasitologie fonctionnelle et évolutive », où j'ai aussi réalisé en collaboration une partie de mes travaux.

Cette thèse a fait l'objet de différentes collaborations scientifiques aussi bien au niveau national qu'international. J'ai notamment collaboré activement avec Robert Galois du CRELA L'Houmeau mais aussi avec Joana F. Marques et Henrique Cabral de l'Institut d'Océanographie de l'Université de Lisbonne (Portugal).

Cette thèse a été intégrée dans différents programmes de recherche français. Tout d'abord elle s'inscrivait dans le cadre des actions de recherche IFREMER à travers le « défi Golfe de Gascogne » (2001-2005) et le programme « Dynamique et Santé des Ecosystèmes Côtiers Estuariens ». Au niveau régional, les travaux de la thèse faisait partie de l'ORE-REPER (Observatoire de Recherche en Environnement – Recherche sur les Ecosystèmes des Pertuis Charentais) pour la fiche sole et du Contrat de Plan Etat Région Poitou Charentes. Enfin, cette thèse était inscrite dans le cadre du PNEC (Programme National sur l'Environnement Côtier) et de son action transversale « Impact des parasites sur les organismes et populations marines, modulation par les facteurs environnementaux ».

Ces travaux de thèse ont été présentés à l'occasion de différents congrès scientifiques nationaux et internationaux :

- ICOPA XI, 11th International Congress of Parasitology, 6-11 août 2006, Glasgow, Ecosse, Royaume Uni
- Colloque "Développements récents de la recherche en environnement côtier", Programme National Environnement Côtier, 26-28 juin 2006, Nantes, France
- Troisièmes Rencontres de l'Ichtyologie en France, 28-31 mars 2006, Paris, France
- Sixth International Symposium on Flatfish Ecology: Habitats in relation to recruitment variability - Generation of future direction, 20-25 octobre 2005, Maizuru, Kyoto, Japon
- Colloque « Défi golfe de Gascogne », 22-24 mars 2005, Brest, France
- European Workshop (AT-PNEC): Impact of parasites on marine organisms, modulation by environmental factors: status of art and project. 4-5 novembre 2004, Brest, France

Remerciements

Je remercie tout d'abord la commission scientifique chargée de la sélection des bourses doctorales IFREMER pour avoir retenu ma candidature et ainsi permis de réaliser cette thèse.

Je remercie également les directeurs des laboratoires qui m'ont accueilli dans le cadre de cette thèse, à savoir successivement Patrick Gentien (CREMA) et Gérard Blanchard (CRELA) sur le site de L'Houmeau, ainsi que André Théron (CBETM) à Perpignan.

Je tiens à remercier très sincèrement mes deux encadrants :

- Marie-Laure Bégout qui a su tout au long de ces trois ans et demi guider mon travail de manière avisée tout en me laissant l'autonomie nécessaire à la réalisation de ce projet. De plus, je la remercie pour m'avoir initié à l'éco-éthologie chez les poissons, une discipline vraiment passionnante.
- Pierre Sasal qui m'a tout d'abord fait découvrir le monde merveilleux des parasites chez les poissons dès le début de mes études universitaires (en 2000) dans le cadre d'un stage volontaire : expérience qui m'a, sans aucun doute, donné le goût sujet de thèse. Dans le cadre de cette thèse, Pierre, même souvent à distance, a aussi su me co-guider efficacement et je l'en remercie amicalement.

Je tiens à remercier les différents membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Pour ceux que je n'ai pas encore cité, je remercie Eric Feunteun et Philippe Gouletquer, qui vont en tant qu'examineurs apporter leur grande expérience dans ce jury ; et tout particulièrement Rachid Amara et Xavier de Montaudouin, tous deux rapporteurs de cette thèse et qui chacun dans leurs domaines respectifs, l'Ecologie des poissons pour Rachid et l'Ecologie parasitaire pour Xavier, m'ont fourni des commentaires constructifs de spécialistes qui me seront très utiles par la suite.

Je remercie vivement Françoise Lagardère pour avoir initié la proposition de ce sujet de thèse, et surtout car j'ai énormément appris à ses côtés sur l'écologie des juvéniles de sole. Enfin, je la remercie sincèrement pour avoir, depuis sa retraite Landaise, participé activement aux corrections du manuscrit. J'ai, bien entendu, aussi une pensée chaleureuse pour Jean-Paul.

J'en profite pour remercier amicalement Pascal Laffargue qui, dans le cadre de sa thèse (2004) sur les juvéniles de sole, réalisée sous la direction de Françoise, a mis par hasard en évidence l'infestation parasitaire des juvéniles de sole par des métacercaires dans les pertuis : sans cette découverte ma thèse n'aurait tout simplement pas eu lieu. Par ailleurs, nous avons partagé le même bureau pendant plus d'un an dès le début de ma thèse et il a ainsi su me transmettre le flambeau du « tout et n'importe quoi sur la sole ».

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai collaboré dans le cadre de cette thèse. Je remercie, entre autres, Robert Galois du CRELA pour une collaboration fructueuse sur les lipides. Je remercie aussi tout particulièrement Joana Marques et Henrique Cabral de l'Institut d'Océanographie de l'Université de Lisbonne (Portugal), pour une collaboration tout aussi fructueuse sur les parasites de sole, qui nous a permis d'élargir considérablement nos aires géographiques d'investigation.

Je remercie sincèrement l'équipe administrative du CRELA L'Houmeau, Bénédicte Charrier, Annick Guilpain et Evelyne Travers, pour les nombreuses commandes et autres missions à préparer.

Je remercie grandement l'équipe technique du CRELA L'Houmeau, à savoir : tout d'abord James Grizon, pilote de la défunte Salicorne (coulée en février 2006 lors d'une tempête), avec qui l'échantillonnage dans les pertuis était un vrai régal ; Christophe Arnaud et Lucette Joassard pour leur travail analytique de qualité ; Philippe Pineau pour sa mise en place de structures aquacoles expérimentales, Michel Prineau et Nicolas Lachaussée pour leur constructions et autres réparations géniales ; Yves pour son travail précieux d'infographie et Gaël pour sa maintenance informatique sans faille ; Martine Breret et Françoise Mornet pour leurs fournitures en tout genres ; les plongeurs Hugues Evano et Stéphane Robert, Didier pour ses blagues notamment lors des biométries. Je remercie aussi Monique Bordes du CCA de l'Université de La Rochelle pour le beau travail en microscopie électronique à balayage.

Enfin, je remercie particulièrement Jean-François Alienne pour m'avoir initié à la biologie moléculaire et pour ses nombreux travaux analytiques, qui me furent d'une grande aide.

Je remercie très sincèrement mes stagiaires, Graziella, Patrick, Mélanie et Mathieu, pour avoir contribué plus qu'efficacement à cette thèse.

« Pace e salute » à tous mes amis et autres compagnons de thèse qui se reconnaîtront : Vinsco, Elise, Yan, Ben, Chris, Stéph, P-Y, Sandy, François, Delphine, Selma, la Loule, Mat, Arno, Jordi, Marie, Sonny, Yves et Carole.

Enfin je remercie très affectueusement mes parents, ma sœur et mes grands parents, pour m'avoir toujours accompagné tout au long de mes études.

Amoureusement à Nathalie simplement pour tout.

Sommaire

Chapitre I. Introduction générale.....	1
1. <i>Nourriceries côtières (baies et estuaires) : cas des Pleuronectiformes.....</i>	<i>1</i>
2. <i>Parasitisme en milieu marin</i>	<i>3</i>
3. <i>Problématique et contexte de l'étude.....</i>	<i>6</i>
3.1. <i>Infestation des juvéniles G0 de sole par des métacercaires de Digènes.....</i>	<i>6</i>
3.2. <i>Modèle biologique.....</i>	<i>7</i>
3.3. <i>Site d'étude : pertuis Charentais.....</i>	<i>10</i>
4. <i>Objectifs et plan du manuscrit</i>	<i>12</i>
Chapitre II. Cycle de vie de <i>Proisorhynchus</i> spp. (Digènes, Bucéphalidés) dans les pertuis Charentais : identification morpho-anatomique et moléculaire.....	15
1. <i>Introduction.....</i>	<i>16</i>
2. <i>Matériel et méthodes</i>	<i>18</i>
2.1. <i>Echantillonnage et dissection.....</i>	<i>18</i>
2.2. <i>Analyse morpho-anatomique</i>	<i>19</i>
2.3. <i>Analyse moléculaire.....</i>	<i>20</i>
2.4. <i>Analyse des données</i>	<i>21</i>
3. <i>Résultats</i>	<i>22</i>
3.1. <i>Cercaires.....</i>	<i>22</i>
3.2. <i>Métacercaires</i>	<i>24</i>
3.3. <i>Adultes</i>	<i>24</i>
3.4. <i>Comparaison morpho-anatomique métacercaires / adultes.....</i>	<i>30</i>
3.5. <i>Comparaison moléculaire des différents stades de <i>Proisorhynchus</i></i>	<i>31</i>
4. <i>Discussion</i>	<i>32</i>
Chapitre III. Spatial variability in digenean metacercariae infection of 0-group common sole, <i>Solea solea</i>, among different nurseries along the French Atlantic coast	39
2. <i>Material and methods.....</i>	<i>41</i>
2.1. <i>Fish sampling and parasite collection</i>	<i>41</i>
2.2. <i>Data analysis</i>	<i>43</i>
3. <i>Results</i>	<i>43</i>
4. <i>Discussion</i>	<i>48</i>
Chapitre IV. Temporal changes in lipid condition and parasitic infection by digenean metacercariae of young-of-year common sole <i>Solea solea</i> (L.) in an Atlantic nursery ground (Bay of Biscay, France).....	53
1. <i>Introduction.....</i>	<i>54</i>
2. <i>Materials and methods.....</i>	<i>55</i>
2.1. <i>Field sampling</i>	<i>55</i>
2.2. <i>Laboratory analysis</i>	<i>57</i>
2.3. <i>Data analysis</i>	<i>58</i>

3. <i>Results</i>	59
3.1. Parasitic infection	59
3.2. Growth, condition and effect of parasitic infection	60
4. <i>Discussion</i>	63
4.1. Seasonal infection dynamics	63
4.2. Temporal changes in YOY growth, nutritional status versus parasitic infection.....	65

Chapitre V. Variabilité spatiotemporelle du système hôte - parasite, G0 de sole – métacercaires de Digènes, dans les pertuis Charentais : utilisation des parasites comme marqueurs biologiques de l'utilisation de l'habitat par l'hôte..... 69

1. <i>Introduction</i>	70
2. <i>Matériel et méthodes</i>	73
2.1. Echantillonnage	73
2.2. Mesures effectuées	73
2.3. Analyse des données	75
3. <i>Résultats</i>	76
3.1. Distribution spatiotemporelle de l'abondance des G0 de sole dans les pertuis Charentais.....	76
3.2. Variabilité spatiotemporelle de l'infestation	77
3.3. Utilisation des parasites comme marqueurs biologiques	81
3.4. Evolution de la taille et de la condition des G0 de sole	84
4. <i>Discussion</i>	86
4.1. Distribution spatiotemporelle des G0 de sole dans les pertuis Charentais.....	86
4.2. Variabilité spatiotemporelle de l'infestation	87
4.3. Utilisation des métacercaires comme marqueurs biologiques	88
4.4. Performances de croissance des G0: qualité de l'habitat des pertuis Charentais.....	89
4.5. Conclusion.....	92

Chapitre VI. Infestation *in situ* de juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, par des métacercaires de *Proisorhynchus crucibulum* (Digènes, Bucéphalidés) : effets sur la croissance et la condition 95

1. <i>Introduction</i>	96
2. <i>Matériel et méthodes</i>	98
2.1. Matériel biologique	98
2.2. Infestation <i>in situ</i> par des métacercaires de <i>Proisorhynchus crucibulum</i>	98
2.3. Conditions expérimentales	99
2.4. Suivi biométrique et analyse épidémiologique	101
2.5. Analyse des données	101
3. <i>Résultats</i>	102
3.1. Infestation <i>in situ</i>	102
3.2. Croissance et condition	104
4. <i>Discussion</i>	108

Chapitre VII. Expression du gène du composant C3 du complément chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés par des métacercaires de Digènes. 113

1. <i>Introduction</i>	114
------------------------------	-----

2. <i>Matériel et méthodes</i>	117
2.1. Matériel biologique	117
2.2. Analyse moléculaire	118
2.3. Analyse des données	120
3. <i>Résultats</i>	121
3.1 Objectif méthodologique	121
3.2 Application de la méthode analytique	124
4. <i>Discussion</i>	127
Chapitre VIII. Swimming activity of 0-group common sole <i>Solea solea</i>: a laboratory study on the effects of digenean metacercariae.	133
1. <i>Introduction</i>	134
2. <i>Material and methods</i>	135
2.1. Origin, maintenance and parasitic status of fish	135
2.2. Video tracking set-up and protocol	138
2.3. Data analyses and statistics	139
3. <i>Results</i>	140
3.1. Wild-Caught Fish	140
3.3. <i>In situ</i> -infected Fish Experiment	144
4. <i>Discussion</i>	147
4.1. Swimming activity of 0-group sole: ecological perspective in nursery grounds	147
4.2. Effects of the parasitic infection on 0-group common sole behaviour	148
Chapitre IX. Conclusion générale et Perspectives	153
1. <i>Conclusion générale</i>	153
1.1. Dynamique de l'infestation	153
1.2. Effets de l'infestation	154
1.3. Performances des juvéniles G0 de sole dans les pertuis Charentais : évaluation de la fonction de nourricerie	156
2. <i>Perspectives de recherche</i>	157
2.1. Système G0 de sole – métacercaires : développement d'un outil expérimental	157
2.2. Dynamique de l'infestation : apport de l'outil expérimental	158
2.3. Effets de l'infestation sur les G0 de sole : apport de l'outil expérimental	158
2.4. Variabilité intra- et inter-spécifique	159
2.5. Observatoire des nourriceries de sole dans les pertuis Charentais	160
2.6. Communauté de macroparasites : marqueurs biologiques de sole	161
2.7. Développement d'un outil multi-traceurs de structure de population chez la sole .	161
Chapitre Annexe : Comparison of <i>Solea solea</i> macroparasites between two nursery continental shelf systems in the Bay of Biscay and the Portuguese coast	163
1. <i>Introduction</i>	164
2. <i>Material and methods</i>	164
3. <i>Results and discussion</i>	167
Références bibliographiques	173

Chapitre I. Introduction générale

1. Nourriceries côtières (baies et estuaires) : cas des Pleuronectiformes

En milieu marin, les écosystèmes côtiers, et en particulier les baies et les estuaires, sont parmi les plus productifs au monde et jouent un rôle essentiel dans le cycle des nutriments (Mathieson & Nienhuis, 1991; McLusky & Elliot, 2004). Ces écosystèmes remplissent ainsi de nombreux services pour l'homme et à l'échelle de la planète ce sont les écosystèmes qui ont la plus grande valeur économique par rapport à leur surface (Costanza et al., 1997). Ces écosystèmes ont en effet une très forte capacité d'exportation d'organismes, de biomasse et de nutriments. Le cycle biologique des espèces de Téléostéens marins comporte de manière générale cinq grandes périodes ontogéniques : embryonnaire (œuf), larvaire, juvénile, adulte et sénescence (Balon, 1984). Ainsi, après une période larvaire pélagique dispersive, de nombreuses espèces marines mobiles ont des juvéniles qui colonisent les habitats relativement restreints que sont les baies et les estuaires. Dans ces habitats particuliers, les juvéniles trouvent des conditions de croissance et de survie plus favorables (Gibson, 1994; Beck et al., 2001). Ensuite, les individus migrent dans des zones situées en général plus au large où ils sont recrutés dans la population adulte (Gibson, 1997). C'est notamment le cas de la plupart des espèces de Téléostéens démersaux commercialement exploitées au niveau du plateau continental. Ces zones côtières sont qualifiées d'**habitats essentiels** pour ces espèces, étant donné qu'une partie de leur cycle biologique s'y effectue obligatoirement.

Au sein de ces habitats, les conditions environnementales influencent la croissance, la survie et *in fine* le potentiel reproducteur (*i.e.* fitness) des juvéniles. La **qualité de l'habitat** pour une espèce donnée dépend ainsi d'une multitude de facteurs interdépendants et ne peut être mesuré que sur une base comparative (Gibson, 1994). Cela a conduit à focaliser le concept de **nourricerie** pour une espèce donnée à l'identification d'un habitat où la contribution par unité de surface à la production de recrues est plus grande, en moyenne, que la production d'autres habitats juvéniles, en considérant les parts relatives des 4 variables suivantes : densité, croissance, survie et mouvements vers les habitats d'adultes (Beck et al., 2001). Alternativement, le concept synthétique d'habitat de juvénile effectif a été développé

se référant aux habitats qui ont une contribution totale à la population adulte supérieure à la moyenne (Dahlgren et al., 2006). Par conséquent, le renouvellement de ces ressources marines dépend non seulement de la biomasse féconde et de la survie des stades pélagiques (embryonnaire et larvaire) mais aussi de la qualité et de la contribution des nourriceries où se développent les juvéniles (Gibson, 1994; van der Veer et al., 2000; Beck et al., 2001; Stoner, 2003; Le Pape, 2005; Dahlgren et al., 2006). Or, ces zones côtières présentent de fortes variations des facteurs environnementaux naturels, auxquelles se surajoutent souvent de fortes pressions anthropiques (*e.g.* pollution et réduction d'habitat), toutes ces conditions environnementales locales modulant fortement leur fonction de nourricerie (Beck et al., 2001).

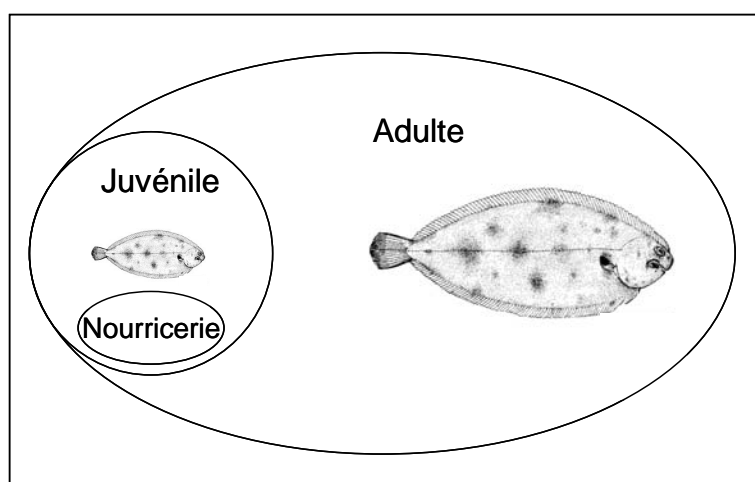


Figure 1. Relation conceptuelle entre habitats nourricerie, juvénile et adulte. Le rectangle représente tous les habitats. Les ellipses représentent les portions de l'habitat utilisées pendant les périodes juvéniles et adultes. L'habitat nourricerie est une sous-partie de l'habitat juvénile. Il peut y avoir un chevauchement des habitats des juvéniles et des adultes, mais il doit y avoir au moins une certaine proportion de mouvements vers des habitats de non-juvéniles pour que l'on considère qu'une espèce a un habitat nourricerie. Ces mouvements sont souvent associés à la reproduction ou à un changement ontogénique. Adapté d'après Beck et al. (2001).

Dans une synthèse récente, Gibson (2005) présente les Téléostéens Pleuronectiformes comme formant un groupe relativement diversifié avec plus de 700 espèces largement distribuées dans la plupart des mers et des océans. L'intérêt économique des pleuronectiformes tient à ce qu'ils représentent une part importante des espèces démersales exploitées sur le plateau continental. L'habitat de leurs juvéniles est en général très localisé, restreint aux zones côtières de faible profondeur, essentiellement les baies et les estuaires, où ils y sont relativement sédentaires. Les juvéniles de Pleuronectiformes constituent ainsi de très bons **modèles biologiques** pour étudier les processus qui conditionnent les performances

des Téléostéens marins dans les écosystèmes côtiers, car leurs nourriceries, très localisées dans l'espace et le temps, sont en général distinctes de l'habitat des adultes (Fig. 1).

De nombreuses études ont mis en évidence l'influence de différents facteurs environnementaux sur l'**abondance** et la **répartition** des juvéniles de Pleuronectiformes. Parmi les facteurs abiotiques, on trouve la température, la salinité, la profondeur, la nature du substrat (Rogers, 1992; Jager *et al.*, 1993; Norcross *et al.*, 1999; Le Pape *et al.*, 2003b; Amara *et al.*, 2004; Amaral & Cabral, 2004) et parmi les facteurs biotiques, la disponibilité en nourriture et/ou la présence/absence de prédateurs (Gibson *et al.*, 1998; Wennhage, 2002; Manderson *et al.*, 2004; Le Pape *et al.*, 2007). Considérant la grande variabilité environnementale des nourriceries côtières, d'autres travaux se sont attachés à analyser l'influence de cette variabilité sur les **performances écophysiologiques** des individus au sein de ces habitats (Yamashita *et al.*, 2001). Ces travaux ont mis en évidence i) l'importance de facteurs tels que la température, la salinité, la concentration en oxygène, la nature du substrat ou la disponibilité en nourriture (Sogard, 1992; Malloy *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 2000; Phelan *et al.*, 2000; Necaïse *et al.*, 2005) et ii) l'impact négatif d'infrastructure d'origine anthropique (Able *et al.*, 1999), comme déterminants majeurs de la qualité de l'habitat des juvéniles à une échelle locale. De même des différences à méso-échelle de la qualité de l'habitat sont apparues et des auteurs signalent des conséquences potentielles au niveau du stock exploité (Le Pape *et al.*, 2003c; Gilliers *et al.*, 2006b; Wennhage *et al.*, 2007). De plus, il existe une variabilité interannuelle aussi bien de l'abondance que des performances des juvéniles en lien avec les conditions environnementales dans ces habitats côtiers (Rogers, 1994; van der Veer *et al.*, 2001). Enfin, quelques études ont montré la contribution de différents habitats juvéniles à une même population adulte (Gillanders *et al.*, 2003; Brown, 2006).

2. Parasitisme en milieu marin

Le parasitisme est une association intime entre deux organismes, dans laquelle le parasite vit au dépend (en terme d'énergie) de son hôte. C'est un mode de vie très répandu sur la terre et la plupart des organismes libres n'échappent pas au fait d'être parasité. Toutefois, le parasitisme a reçu relativement peu d'attention en écologie générale et encore moins en écologie marine. En effet, au contraire des systèmes largement étudiés proie – prédateur (souvent visibles) qui représentent un transfert d'énergie important de courte durée, dans les

systèmes **hôte – parasite** (souvent discrets) le transfert d'énergie est souvent faible et s'inscrit sur la durée : c'est une association qui est particulièrement subtile. Cette interaction durable entre ces organismes est le produit de l'expression de leurs génomes respectifs, à tel point qu'un système hôte – parasite peut ainsi être considéré comme un « **superorganisme** » (Combes, 2001). D'un point de vue évolutif, c'est le fruit de la coévolution entre l'hôte et le parasite, qui rend ainsi les parasites théoriquement indissociables de leurs hôtes. Le parasite reçoit l'habitat, la mobilité et l'énergie de son hôte. Il représente toujours un coût énergétique (même le plus infime) pour son hôte à la fois pour le développement et le maintien du parasite, mais aussi à travers la réaction immunitaire qu'il entraîne au niveau de son hôte (Combes, 2001). De plus, certains parasites peuvent manipuler la morphologie et/ou le comportement de leurs hôtes de manière à favoriser leur transmission à l'hôte suivant (Barber *et al.*, 2000; Combes, 2001; Moore, 2002; Thomas *et al.*, 2005a; Barber & Wright, 2006) et quelques uns de ces systèmes hôte-parasite sont connus en milieu marin (Sasal & Thomas, 2005). De manière générale, les parasites peuvent avoir un rôle important et très significatif dans la régulation de la dynamique des populations d'hôte (Anderson & May, 1978; 1979; May & Anderson, 1979). Ils représentent un compartiment essentiel des écosystèmes côtiers (Thomas *et al.*, 1997; Zander *et al.*, 1999; Zander *et al.*, 2000; Zander *et al.*, 2002). En outre, l'importance du parasitisme dans le fonctionnement des écosystèmes est de plus en plus pris en compte (Thomas *et al.*, 2005b), et le rôle clé des parasites dans le fonctionnement des réseaux trophiques marins a d'ailleurs récemment été mis en évidence (Lafferty *et al.*, 2006).

Le parasitisme est un mode de vie qui est apparu à plusieurs reprises au cours de l'évolution. Il existe ainsi des parasites dans la plupart des groupes taxonomiques du monde vivant depuis les Virus jusqu'aux Vertébrés. Parmi les parasites Métazoaires (**macroparasites**), les principaux embranchements sont les Plathelminthes, les Acanthocéphales, les Nématodes et les Crustacés. L'embranchement des Plathelminthes, qui comprend presque uniquement des formes parasites, est de loin le plus diversifié parmi les Métazoaires, en particulier en milieu marin. Etant donné que seulement une petite partie des espèces ont été décrites, on estime que cet embranchement comprend plusieurs dizaines de milliers d'espèces organisées en 3 Classes : Monogènes, Digènes et Cestodes. Les parasites peuvent ensuite se distinguer par rapport à leur habitat au niveau de l'hôte, soit externe (ectoparasite), soit dans une cavité de l'hôte communiquant avec l'extérieur (mésoparasite), soit strictement interne (endoparasite). Ils peuvent aussi se différencier par rapport à leur cycle de vie qui peut être i) holoxène (ou direct), c'est à dire qu'il y a seulement un hôte et

une phase de dissémination de propagules ; ou ii) hétéroxène (ou indirect), c'est à dire qu'il y a plusieurs hôtes successifs et généralement plusieurs phases de dissémination de propagules.

Parmi les taxons à cycle de vie indirect, les **Digènes** (Trématodes, Plathelminthes) forment le groupe strictement parasite le plus diversifié (avec une majorité d'espèces marines). Le mot Digènes vient du grec « *di genos* », qui signifie deux naissances. En milieu marin, le cycle de vie de ces parasites comporte trois hôtes successifs : le premier hôte intermédiaire qui est généralement un mollusque, le deuxième hôte intermédiaire le plus souvent un Téléostéen (mais des invertébrés, mollusques ou crustacés par exemple peuvent être deuxième hôte intermédiaire) et l'hôte définitif, un Vertébré piscivore en général un Téléostéen ou un oiseau (Figure 2, Combes, 2001; Cribb et al., 2001; Cribb, 2005). Les formes adultes du parasite vivent dans le tube digestif de l'hôte définitif où ils se reproduisent de manière sexuée et produisent une grande quantité d'œufs qui sont expulsés dans le milieu avec les fèces. Chaque œuf donne une larve ciliée, miracidium, qui va infester le premier hôte intermédiaire dans lequel le parasite se développe en sporocyste et/ou en rédies, en se reproduit de manière asexuée pour produire une grande quantité de cercaires qui sont expulsées dans le milieu. La cercaire va ensuite infester activement le deuxième hôte intermédiaire par pénétration à travers la peau, et s'enkyster dans le corps sous forme de métacercare. Le passage à l'hôte définitif se fait alors par voie trophique, c'est-à-dire prédation et consommation du deuxième hôte intermédiaire par l'hôte définitif.

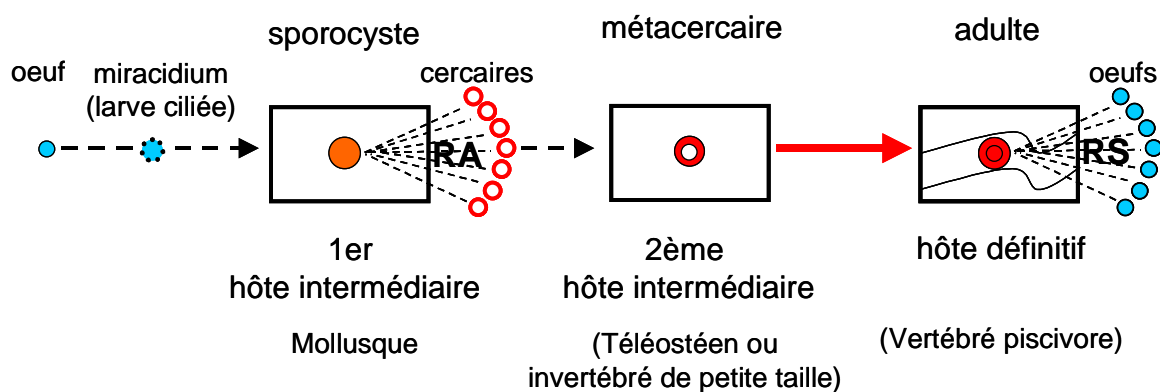


Figure 2. Schéma du cycle de vie « typique » des Digènes (Combes, 2001) en milieu marin. R.A. : reproduction asexuée, R.S. reproduction sexuée.

Les métacercaires induisent par définition un coût pour leur hôte. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la réaction immunitaire des Téléostéens face à ce type

d'infestation (Sommerville, 1981; Wood & Matthews, 1987; Faliex, 1991b; Woo, 1992; Huizinga & Nadakavukaren, 1997; Skouras *et al.*, 2003a; Skouras *et al.*, 2003b). Il a ainsi été montré que ce coût énergétique pouvait induire une réduction des performances des deuxièmes hôtes intermédiaires Téléostéens en terme de croissance et de condition, aboutissant parfois à une augmentation de la mortalité (Lemly & Esch, 1984; Coleman & Travis, 1998; Johnson & Dick, 2001; Malek, 2001; Collyer & Stockwell, 2004). Par ailleurs, de par la nécessité pour le parasite d'être consommé par son hôte définitif, il a aussi été montré dans différents systèmes Téléostéens - métacercaires une manipulation du comportement du deuxième hôte intermédiaire par le parasite de manière à favoriser le passage à l'hôte définitif (Maillard, 1976; Lafferty & Morris, 1996; Shirakashi & Goater, 2002; Seppala *et al.*, 2004; Osset *et al.*, 2005; Seppala *et al.*, 2005a; b; Shirakashi & Goater, 2005).

3. Problématique et contexte de l'étude

3.1. Infestation des juvéniles G0 de sole par des métacercaires de Digènes

Une infestation parasitaire par des métacercaires du genre *Proisorhynchus* (Digènes, Bucéphalidés) a été constatée récemment chez des juvéniles G0 [Groupe 0, c'est à dire les individus qui sont nés dans l'année (aussi appelés jeunes de l'année)] de sole commune *Solea solea* (Laffargue *et al.*, 2004). Le premier hôte intermédiaire de *Proisorhynchus* spp. (notamment, *P. crucibulum* et *P. squamatus*) est la moule (Matthews, 1973), qui est cultivée de manière soutenue dans les pertuis Charentais, essentiellement par la technique de culture sur bouchots (Gouletquer & Le Moine, 2002). Il a été montré que ce parasite entraînait la castration de la moule afin de se développer et produire les cercaires (Coustau *et al.*, 1990; Coustau *et al.*, 1991a). Ces parasites, signalés chez différentes espèces de Téléostéens, deuxièmes hôtes intermédiaires (Liston *et al.*, 1960; Rebecq & Leray, 1961; Matthews, 1973), ont déjà causé d'importantes pertes dans une pêcherie de sébastes aux USA, car la présence de kystes dans la chair les rendait non commercialisables (Liston *et al.*, 1960). Enfin, l'hôte définitif de *Proisorhynchus* spp. est relativement spécifique : il s'agit du congre, *Conger conger* (Matthews, 1973; Santos & Gibson, 2002). Ce parasitisme par *Proisorhynchus* spp. constitue ainsi une interaction par transmission de pathogènes entre une espèce cultivée (moule) et une espèce sauvage (sole) exploitée. Ce parasitisme apparaît ainsi *a priori* comme

un facteur biotique susceptible d'influencer les performances biologiques et écologiques de la sole dans les nourriceries sous influence mytilicole en particulier. Cependant, aucune étude n'avait à ce jour été menée sur l'effet de ces parasites sur leur deuxième hôte Téléostéen, et sur les juvéniles de sole en particulier.

3.2. Modèle biologique

Sole : intérêt économique, stocks en danger

La sole commune *Solea solea* (Linnaeus, 1758) est une espèce largement distribuée en Atlantique Nord Est depuis le Sud de la Norvège jusqu'au Nord du Sénégal et dans toute la Méditerranée. Elle vit sur des fonds sableux à vaseux sur tout le plateau continental jusqu'à 200 m de profondeur. C'est une espèce qui présente un intérêt halieutique majeur avec un débarquement annuel mondial qui a dépassé les 40 000 tonnes ces dernières années (FAO) et un prix de vente constamment élevé du fait de sa qualité gustative. L'évaluation des stocks de sole réalisée chaque année par le CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la Mer) montre que l'espèce est généralement surexploitée. En France, dans le golfe de Gascogne (division VIIIa, b), la sole est la première espèce sur le plan économique (48 M€ en 2004) où elle est essentiellement pêchée au filet maillant ou trémail par une flottille côtière. Cependant, depuis le début des années 90, la biomasse féconde et le recrutement annuel de ce stock sont en nette diminution. Ce dernier est ainsi considéré comme surexploité avec un risque de réduction de la capacité reproductrice. Le TAC (total admissible des captures) du golfe de Gascogne a ainsi été régulièrement réduit, il était de 4060 tonnes en 2006 avec pour objectif de rétablir la quantité de reproducteurs au-dessus du seuil de précaution (13 000 tonnes) en 2008 dans l'optique d'une exploitation durable du stock (ICES, 2007).

Biologie et écologie de la sole

La sole, comme la plupart des Téléostéens démersaux côtiers, a un cycle de vie complexe qui comporte une période larvaire pélagique dispersive puis des périodes juvénile et adulte benthiques (Figure 3). Dans le golfe de Gascogne, les soles se reproduisent de janvier à mars sur des frayères situées sur des fonds de 30 à 100 m, sur 3 zones principales : 1) en face de la Loire ; 2) en face des pertuis Charentais ; 3) en face de la Gironde et sur les côtes des Landes (Arbault *et al.*, 1986; Koutsikopoulos & Lacroix, 1992; Koutsikopoulos *et al.*, 1995) (Figure 4). Les larves, après éclosion des œufs, ont une vie pélagique d'environ 25 à 40 jours en fonction de la température (Amara & Lagardère, 1995). Durant cette période, elles opèrent

des migrations verticales nyctémérales et elles sont dispersées autour de la frayère selon un processus stochastique (Koutsikopoulos et al., 1991). Toutefois, Amara et al. (1993) ont démontré que la distance à la côte des distributions de larves diminue au cours des changements ontogéniques liés au développement larvaire, ce qui reflète l'amorce du processus d'immigration. Ce processus s'accroît pour les larves en début de métamorphose : encore pélagiques, elles tendent à réduire l'ampleur de leurs migrations verticales, ce qui tend à les accumuler plus près du fond (Lagardère et al., 1999). Les déplacements des masses d'eau dans la zone côtière (panaches estuariens en surface et pénétration des eaux marines par la couche de fond) facilitent alors leur installation au niveau d'habitats côtiers peu profonds où la recherche de proies benthiques contribue à les sédentariser (Amara et al., 2000).

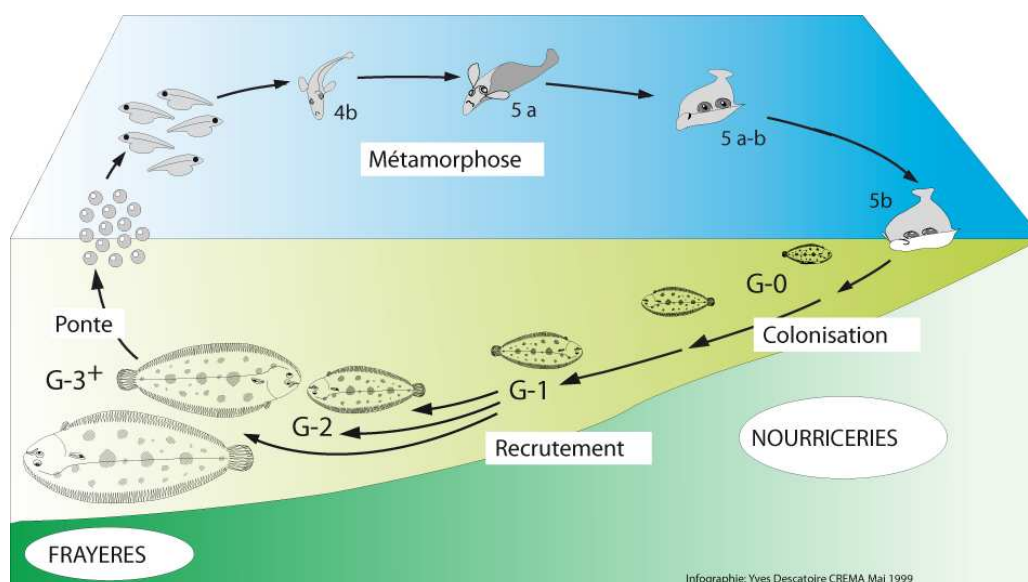


Figure 3. Schéma du cycle de vie de la sole commune, *Solea solea*

Dans le golfe de Gascogne, les densités de juvéniles G0 de sole relevées dans l'estuaire de la Vilaine, l'estuaire de la Loire, la baie de Bourgneuf, le pertuis Breton, le pertuis d'Antioche et l'estuaire de la Gironde, montrent que ces zones de faible profondeur à substrat essentiellement vaseux servent de nourriceries (Figure 4) (Le Pape et al., 2003b). Par la suite, la maturité sexuelle se produit de manière générale à trois ans (au plus tôt, à deux ans) et s'accompagne pour les individus matures d'une migration vers les frayères pour participer à la reproduction.

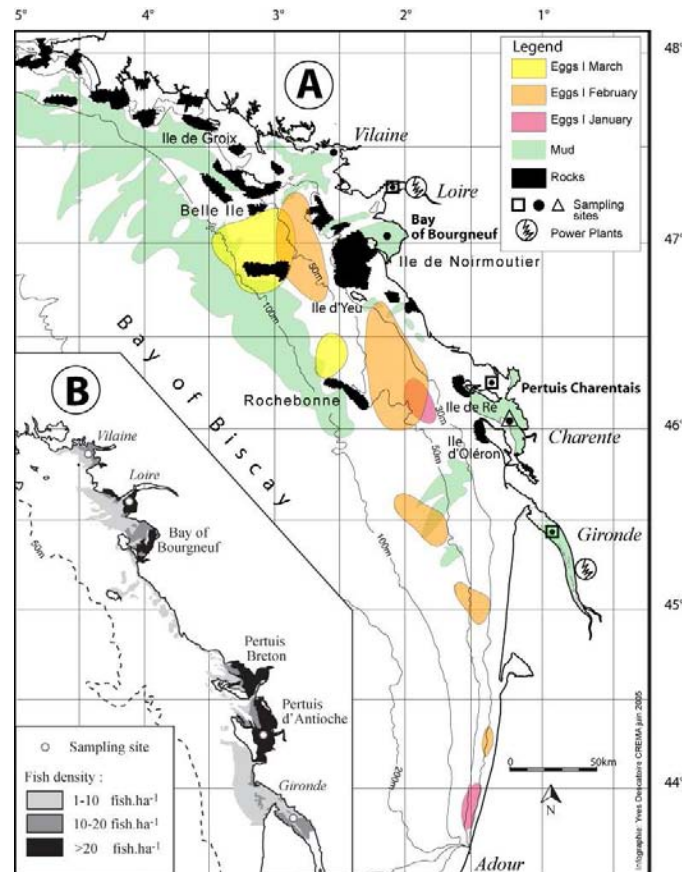


Figure 4. Localisation des principales frayères (distribution des œufs en janvier, février et mars) (Arbault *et al.*, 1986; Koutsikopoulos & Lacroix, 1992) (A) et nourriceries (densité des juvéniles G0 à l'automne) (Le Pape *et al.*, 2003b) (B) de la sole commune, *Solea solea*, dans le golfe de Gascogne.

Les conditions environnementales rencontrées par les juvéniles dans ces habitats côtiers vont influencer leurs performances biologiques et *in fine* leur fitness, ce qui va ainsi conditionner le recrutement à la population adulte, c'est à dire le renouvellement de cette ressource (van der Veer *et al.*, 2000). Au sein d'une même nourricerie estuarienne, il a été démontré que l'extension du panache fluvial détermine des variations interannuelles de l'étendue des habitats (Le Pape *et al.*, 2003a). A l'échelle du golfe de Gascogne, les facteurs abiotiques, profondeur, salinité et granulométrie du substrat (Le Pape *et al.*, 2003b) et les facteurs biotiques, comme la disponibilité en proies (Le Pape *et al.*, 2007), influencent la distribution des juvéniles G0 de sole. De plus, plusieurs études ont montré une certaine variabilité de la qualité de l'habitat en utilisant différents indicateurs en terme d'abondance tel que la densité, et de performances des individus tels que la taille à l'âge, la croissance récente et différents indices de condition (Le Pape *et al.*, 2003c; Gilliers *et al.*, 2006a; Gilliers *et al.*, 2006b). Cependant, la hiérarchie d'action de ces différents facteurs environnementaux sur les performances des juvéniles G0 de sole au sein des nourriceries reste encore mal connue.

Parmi ces zones, les pertuis Charentais (pertuis Breton et pertuis d'Antioche) constituent des nourriceries importantes pour les juvéniles de sole du stock du golfe de Gascogne, caractérisées par de grandes surfaces d'habitats disponibles et des densités élevées de G0 (Le Pape et al., 2003b). Cependant, la taille moyenne atteinte en automne par les juvéniles G1 semble être parmi les plus faibles valeurs mesurées dans les nourriceries du golfe de Gascogne (Le Pape et al., 2003). De même, Laffargue (2004) signale dans les pertuis Charentais des performances de croissance suboptimales et même un arrêt de croissance automnal. Ces résultats semblent ainsi suggérer une limitation environnementale des performances des juvéniles dans les pertuis Charentais et une qualité d'habitat potentiellement plus faible.

3.3. Site d'étude : pertuis Charentais

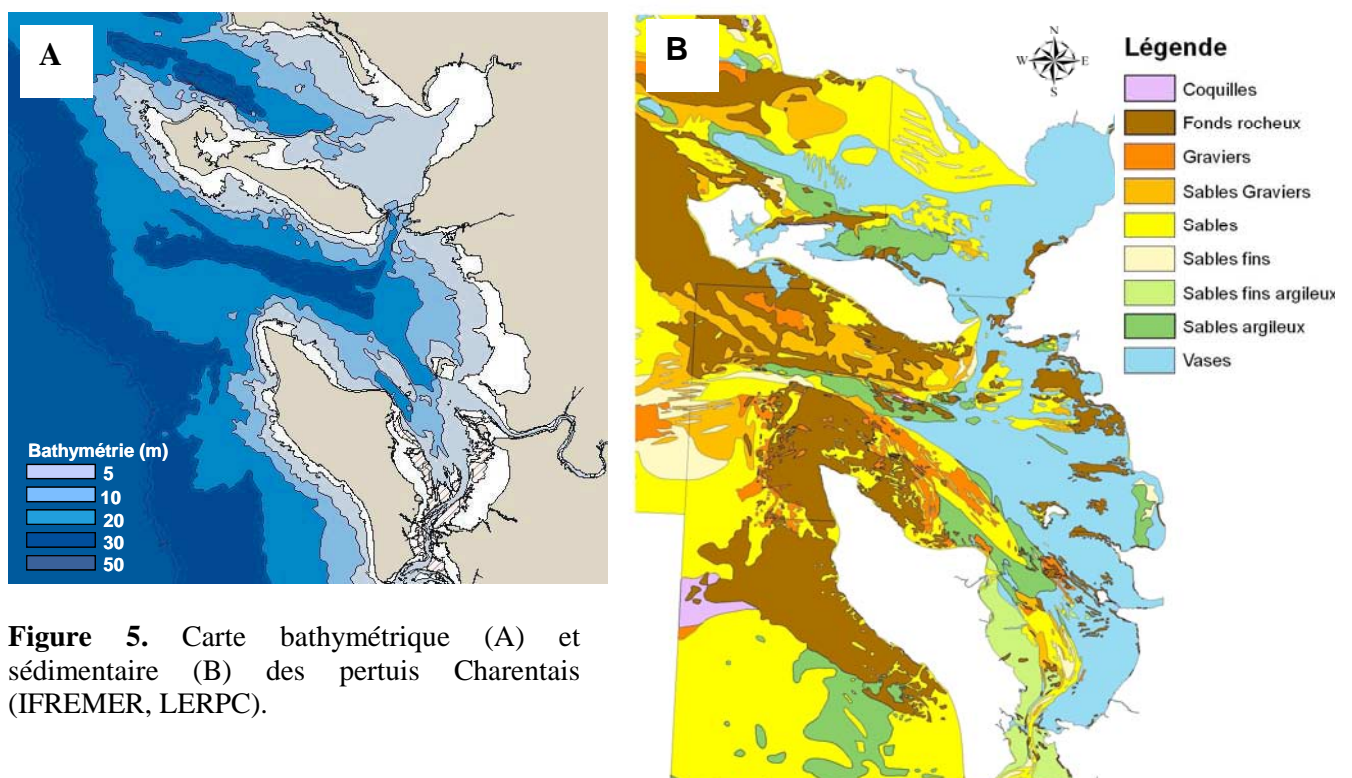


Figure 5. Carte bathymétrique (A) et sédimentaire (B) des pertuis Charentais (IFREMER, LERPC).

Les pertuis Charentais sont situés au nord de l'estuaire de la Gironde sur les côtes de Charente maritime et de Vendée. Ils sont constitués de trois pertuis (du nord au sud) : le pertuis Breton (entre la Vendée et l'Île de Ré), le pertuis d'Antioche (entre l'Île de Ré et l'Île d'Oléron) et le pertuis de Maumusson (entre l'Île d'Oléron et l'embouchure de la Seudre). Ce sont des baies macrotidales avec un courant de marée de l'ordre de $0,5 \text{ m s}^{-1}$ en condition

moyenne de vives-eaux (Le Hir et al., 2000). Les apports en eau douce des différentes rivières (le Lay, la Sèvre Niortaise, la Charente et la Seudre) sont relativement faibles de l'ordre de $10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ dans le pertuis Breton et $50 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ dans le pertuis d'Antioche. Les pertuis Charentais ont une superficie de 1300 km^2 , dont 343 km^2 avec une profondeur de moins de 5 m et un substrat vaseux (Figure 5). Les pertuis Charentais sont soumis à de fortes pressions anthropiques d'origines diverses. Tout d'abord, toute la zone est soumise à une pêche artisanale avec un chalutage régulier sur la quasi totalité de sa surface exploitable. Ensuite, la principale activité locale est la conchyliculture qui est au premier rang au niveau Européen avec une production annuelle de 40 000 t d'huîtres et 15 000 t de moules, une biomasse stockée estimée à 125 000 t et 20 000 t respectivement et représentant respectivement des surfaces occupées de 54 et 20 km^2 en zone intertidale (Figure 6). Cette activité conchylicole entraîne des modifications structurelles de l'habitat, un dépôt important de matière organique (sous forme de pseudo fèces et fèces) et elle fait partie intégrante du fonctionnement de l'écosystème local (Leguerrier et al., 2004). A ces deux activités professionnelles de pêche et de conchyliculture s'ajoutent des activités récréatives de pêche et de plaisance nautique ainsi que les effets associés aux effluents du bassin versant des pertuis Charentais (agriculture, pollution urbaine et industrielle).

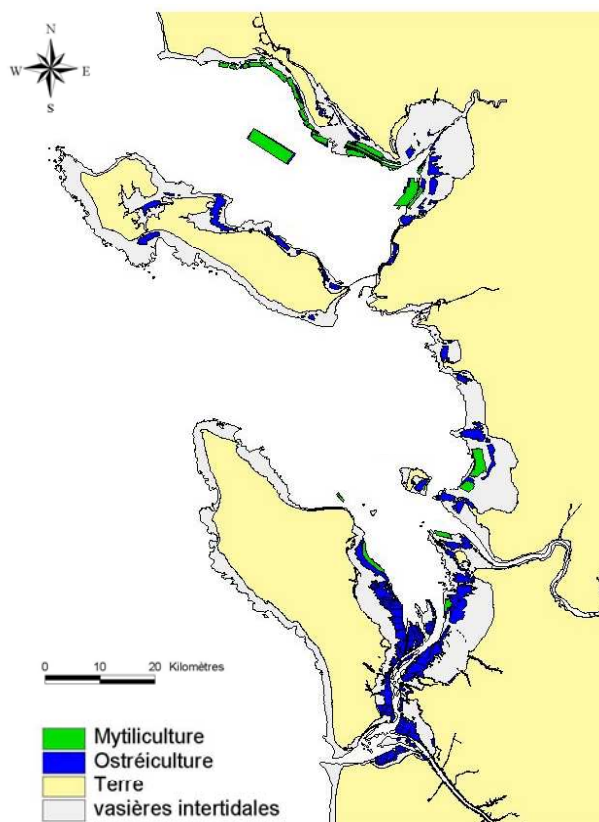


Figure 6. Localisation des zones de mytiliculture et ostréiculture dans les pertuis Charentais (IFREMER, LERPC).

4. Objectifs et plan du manuscrit

Les deux objectifs principaux de cette thèse étaient :

- 1- Déterminer la dynamique spatiotemporelle de l'infestation des juvéniles G0 de sole par des métacercaires de *Digènes*
- 2- Evaluer les effets de ce parasitisme sur les performances biologiques et écologiques des juvéniles G0 de sole

L'approche scientifique de cette thèse a été à la fois descriptive et expérimentale. La dynamique spatiotemporelle de ce système a été étudiée à différentes échelles en milieu naturel, essentiellement à partir d'échantillonnage sur le terrain, mais aussi d'une expérience d'infestation *in situ* réalisée en cages. Les effets du parasitisme ont été étudiés à l'échelle de l'individu à différents niveaux d'intégration biologique : moléculaire (immunité), physiologique (condition et croissance) et comportementale (activité natatoire).

Le travail a avant tout consisté en l'identification des différents taxons du genre *Prosohynchus* infestant les juvéniles G0 de sole afin de déterminer les différentes espèces présentes dans les pertuis Charentais ainsi que leur cycle de vie dans cette zone géographique (**Chapitre II**). L'étude proprement dite de la dynamique de l'infestation en milieu naturel a débuté par l'évaluation de la variabilité spatiale de l'infestation des juvéniles G0 de sole à méso-échelle entre nourriceries (**Chapitre III**). Ensuite, la dynamique temporelle de l'infestation des juvéniles G0 de sole a été étudiée sur une station des pertuis Charentais située dans une zone mytilicole depuis la colonisation jusqu'à la fin de l'automne. En parallèle, un suivi de la condition lipidique des individus a été réalisé afin d'évaluer *a posteriori* l'effet de ce parasitisme sur l'état nutritionnel des juvéniles G0 de sole en milieu naturel (**Chapitre IV**). La variabilité spatiotemporelle du système juvénile G0 de sole – métacercaire de *Digènes* a ensuite été étudiée à l'échelle des pertuis Charentais (**Chapitre V**). Grâce aux connaissances obtenues dans le cadre des deux chapitres précédents, des infestations de G0 issus d'aquaculture ont été réalisées *in situ*, en cages, afin de préciser la dynamique spatiotemporelle de l'infestation de *Prosohynchus crucibulum* en rapport avec les zones mytilicoles (moule : premier hôte intermédiaire). En effet, l'étude spécifique du système juvéniles G0 de sole – métacercaires de *P. crucibulum* a été privilégiée sur la base

des résultats obtenus en milieu naturel (Chapitre IV) et au regard des implications de la mytiliculture dans cette infestation. L'effet de *P. crucibulum* sur la croissance et la condition des juvéniles G0 de sole a ainsi été analysé de manière expérimentale (**Chapitre VI**). La réaction immunitaire développée par les juvéniles G0 de sole face aux métacercaires de Digènes a été abordée en analysant l'expression du gène C3 du système du complément (**Chapitre VII**). L'effet des métacercaires de Digènes sur le comportement individuel d'activité natatoire des juvéniles G0 de sole a été testé en laboratoire afin d'aborder la question de la manipulation de l'hôte par le parasite (**Chapitre VIII**). Pour les chapitres 7 et 8, les analyses ont porté d'une part *a posteriori* sur des individus infestés naturellement et d'autre part sur des individus infestés *in situ* de manière semi-controlée. Enfin, l'ensemble de ces résultats est discuté dans le cadre d'une conclusion générale et des perspectives de recherche inscrites dans la continuité de ces travaux de thèse sont proposées (**Chapitre IX**).

Chapitre II. Cycle de vie de *Proisorhynchus* spp. (Digènes, Bucéphalidés) dans les pertuis Charentais : identification morpho-anatomique et moléculaire.

Résumé

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'identifier les différentes espèces de métacercaires du genre *Proisorhynchus* infestant les juvéniles G0 de sole (deuxième hôte intermédiaire) dans les pertuis Charentais et (ii) d'établir leur cycle de vie. Les cercaires et les adultes ont été recherchés chez la moule (premier hôte intermédiaire) et les congres (hôte définitif), respectivement. Une analyse morpho-anatomique a été réalisée en microscopie optique (pour les cercaires, métacercaires et adultes) et en microscopie électronique à balayage (MEB) (uniquement pour les adultes). Une analyse moléculaire par séquençage d'une partie de l'ADN ribosomal correspondant à l'ITS 1 a été faite sur les différentes formes distinguées morphologiquement pour les différents stades de développement. Les résultats montrent que les moules cultivées sur bouchots présentaient de faibles prévalences d'infestation par *P. crucibulum* avec au maximum 0,02 % (en juillet 2004). Les congres étaient infestés par *P. crucibulum* et *P. aculeatus* avec (en 2005) des prévalences de 84 % et 100 %, respectivement, et des abondances moyennes de $28,2 \pm 6,6$ et $161,1 \pm 40,1$, respectivement, ces niveaux d'infestation ayant augmenté de 2003 à 2005. L'analyse en MEB, précise la structure en peigne rectangulaire des écailles de tout le corps de *P. crucibulum*, et, la structure en épines acérées des écailles au niveau du rhynchus et en peigne arrondi sur le reste du corps chez *P. aculeatus*. Les juvéniles G0 de sole sont infestés par deux espèces de métacercaires de *Proisorhynchus* : *P. crucibulum* et *Proisorhynchus* sp. A. Cette dernière espèce présente 95,71 % d'identité sur les séquences d'ITS 1 avec *P. aculeatus* (adulte), mais cependant n'a pas pu être distinguée morphologiquement de celle-ci. L'analyse morphologique et moléculaire confirme le cycle de vie de *Proisorhynchus crucibulum* dans les pertuis Charentais à travers les différents hôtes successifs suivants : moule (premier hôte intermédiaire), juvénile G0 de sole (deuxième hôte intermédiaire) et congre (hôte définitif).

Mots clés : Trématodes – stade de développement – ADN ribosomal – ITS – MEB

1. Introduction

La sole commune est une espèce de Téléostéens de l'ordre des Pleuronectiformes, largement distribuée dans l'Atlantique Nord Est et qui représente un très fort intérêt économique pour les pêcheries de cette région. Les nourriceries côtières, localisées dans les baies et les estuaires, constituent un habitat essentiel où les juvéniles de sole trouvent des conditions favorables à leur croissance et une pression de prédation supposée réduite (Gibson, 1994). La zone des pertuis Charentais a été identifiée comme une nourricerie importante pour le stock de sole du golfe de Gascogne de par la surface potentiellement disponible ainsi que les fortes densités observées (Le Pape et al., 2003b).

Laffargue *et al.* (2004) ont rapporté l'infestation des juvéniles d'âge 0 (G0) de sole par des métacercaires de *Prosorhynchus* spp. (Digènes, Bucéphalidés) dans les pertuis Charentais. Les Digènes sont des parasites qui ont un cycle de vie complexe passant par plusieurs hôtes successifs et dont le schéma général en milieu marin est le suivant : les parasites adultes se trouvent dans le tube digestif de l'hôte définitif (Téléostéen ichtyophage) où ils se reproduisent de manière sexuée et produisent un grand nombre d'œufs qui sont expulsés avec les fèces de l'hôte. Ensuite les œufs se transforment en larves ciliées libres, *miracidia*, qui vont infester le premier hôte intermédiaire (mollusque). Le parasite se développe alors sous forme de sporocyste dans le mollusque, et produit de manière asexuée un grand nombre de larves cercaires libres, qui sont émises dans le milieu. Ces cercaires douées de capacités locomotrices variables suivant leur anatomie vont localiser le deuxième hôte intermédiaire (un Téléostéen de petite taille) grâce à des récepteurs sensoriels, puis adhérer à la surface de son tégument et ensuite pénétrer activement en lysant les tissus grâce à des enzymes contenues dans les glandes de pénétration. Le parasite s'enkyste alors sous forme de métacercaire dans le deuxième hôte intermédiaire. Enfin, le passage à l'hôte définitif se fait par voie trophique, ce dernier s'infeste en consommant le deuxième hôte intermédiaire.

Trois espèces du genre *Prosorhynchus* sont potentiellement présentes dans les pertuis Charentais, car signalées dans la région de l'Atlantique Nord Est : *Prosorhynchus crucibulum*, *Prosorhynchus squamatus* et *Prosorhynchus aculeatus*. Dans cette région, les cycles de vie de *P. crucibulum* et *P. squamatus* sont relativement bien connus (Matthews, 1973) : le premier hôte est la moule du genre *Mytilus* ; plusieurs espèces de Téléostéens benthiques de petite

taille peuvent servir de deuxième hôte intermédiaire, enfin l'hôte définitif est essentiellement le congre, *Conger conger* pour *P. crucibulum* alors que *P. squamatus* a une faible spécificité pour l'hôte définitif et donc un spectre très large, qui correspond à un grand nombre d'espèces de Téléostéens ichtyophages, dont une trentaine ont été répertoriées (McArthur & McGladdery, 2000). En revanche le cycle de *P. aculeatus* n'est pas aussi bien connu : le premier hôte intermédiaire est inconnu à notre connaissance et l'hôte définitif est spécifiquement le congre (Jones, 1943; Santos & Gibson, 2002).

Les métacercaires correspondent à un stade de développement intermédiaire, souvent difficile à déterminer au niveau spécifique sur la base des critères morpho-anatomiques des adultes (Jousson *et al.*, 1999; Jousson & Bartoli, 2000; 2001). De plus, les métacercaires dans un même hôte à un moment donné sont à des stades de développement plus ou moins avancés suivant la date de l'infestation, ce qui induit une certaine variabilité morphologique. L'utilisation de l'analyse moléculaire s'est largement développée en systématique des parasites notamment dans la détermination des différents stades larvaires afin d'élucider les cycles de vie. L'ITS (« Internal Transcribed Spacer »), est une région non-codante de l'ADN ribosomal (ADNr), localisée à deux endroits (ITS 1 et ITS 2) entre les régions codantes et hautement conservées que sont les gènes 18 S, 5,8 S et 28 S (codant pour les sous-unités constitutives des ribosomes). L'ITS accumule des mutations spontanées à un taux plus important que les régions codantes et évolue donc plus rapidement (Hillis & Dixon, 1991). L'ITS est ainsi très utilisé en taxonomie et en phylogénie moléculaire, cette région est considérée comme fortement conservée au sein d'une espèce et est particulièrement adaptée pour discriminer les espèces con-génériques chez les Digènes (Jousson *et al.*, 1999; Jousson & Bartoli, 2000; 2001).

Le but de cette étude était donc de déterminer précisément les différentes espèces de *Prosorhynchus* infestant les juvéniles G0 de sole ainsi que leur cycle de vie, afin de mieux comprendre la dynamique de l'infestation dans les pertuis Charentais. En plus de l'identification des métacercaires dans les juvéniles G0 de sole, les cercaires ont été recherchées dans les moules et les adultes dans les congres, ce dernier étant potentiellement hôte définitif des 3 espèces présentes dans la région. Les différentes formes présentes dans les différents hôtes ont été distinguées par analyse morpho-anatomique. Pour préciser la détermination des formes adultes, l'analyse de la morphologie externe a été complétée par

microscopie électronique à balayage (MEB). Enfin, le but était d'obtenir les séquences de l'ITS 1 de ces différentes formes afin de les comparer entre elles.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage et dissection

Premier hôte intermédiaire : moule, complexe Mytilus edulis - Mytilus galloprovincialis

Les moules ($N_{\text{tot}} = 6811$) ont été collectées en 2004, en Février ($n = 1161$), Mars ($n = 451$), Avril ($n = 233$), Mai ($n = 4466$) et Juillet ($n = 500$) directement sur les bouchots (à différentes hauteurs) dans le pertuis Breton sur la station de l'Eperon ($46^{\circ} 15' 80$ N, $1^{\circ} 13' 40$ W). Les moules ont été ouvertes à l'aide d'un couteau et inspectées à l'œil nu afin de repérer les individus infestés (Coustau, pers. com.), puis la vérification a été faite en stéréoscopie, où après incision au niveau de quelques tubules du sporocyste, les cercaires ont été prélevées à l'aide d'une micropipette.

Deuxième hôte intermédiaire : juvénile G0 de sole, Solea solea

Les juvéniles G0 de sole ont été prélevés dans diverses stations des pertuis Charentais (voir chapitre 4 et 8 pour les sites et la méthode d'échantillonnage). Les soles ont tout d'abord été pelées, puis disséquées sous loupe binoculaire, afin de repérer les métacercaires enkystées. Les kystes ont été brisés mécaniquement à l'aide d'une pointe très fine afin de prélever les métacercaires.

Hôte définitif : congre, Conger conger

Pour l'analyse épidémiologique, les congres ($N_{\text{tot}} = 31$) ont été capturés en mai 2003 ($n = 12$) et 2005 ($n = 19$) dans le pertuis d'Antioche par pêche à la ligne dans le cadre du concours de pêche aux congres organisé annuellement par l'Amicale Rochelaise de Pêche Sportive en Mer, et l'analyse s'est faite sur des tubes digestifs stockés à -20°C .

Pour les analyses morpho-anatomiques et moléculaires, des congres ont été prélevés ponctuellement en 2004, 2005 et 2006 par pêche à la ligne ou chalutage dans le pertuis d'Antioche et l'analyse a été réalisée sur des tubes digestifs frais, ce qui a permis d'utiliser des parasites vivants.

Le tube digestif des congères a été séparé en 3 parties (estomac, intestin antérieur et intestin postérieur). Les parasites ont été isolés suivant la technique du « gut wash » : chaque partie a été ouverte longitudinalement puis placée dans un flacon contenant du liquide physiologique (NaCl 8%), ce dernier est vigoureusement agité, le contenu du flacon est ensuite filtré sur un tamis à sédiment de 200 µm, puis les parasites alors retenus sur la grille sont délicatement prélevés.

Pour l'analyse épidémiologique, les parasites ont été prélevés et comptés sous loupe binoculaire puis identifiés en microscopie optique.

2.2. Analyse morpho-anatomique

Les individus des différents stades (cercaires, métacercaires et adultes) ont tout d'abord été observés entre lame et lamelle en microscopie optique, sans préparation préalable.

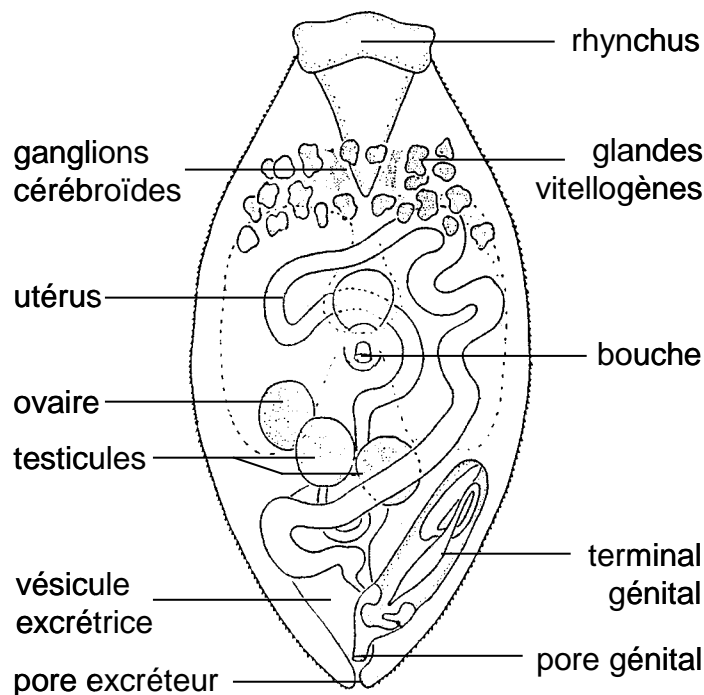


Figure 1. Morphologie générale de *Prosorhynchus crucibulum* en vue ventrale (modifié d'après Matthews, 1973).

L'identification des parasites s'est faite en partie d'après les critères distinctifs de la morphologie externe établi par Matthews (1973) (Figure 1. ; Tableau 1.)

Tableau 1. Principaux critères distinctifs de la morphologie externe pour le stade adulte des différentes espèces du genre *Prosorhynchus* considérées (modifié d'après Matthews, 1973).

	<i>P. crucibulum</i>	<i>P. squamatus</i>	<i>P. aculeatus</i>
Rhynchus	large, forme lobée	petit, arrondi	petit, arrondi
Position de la bouche	médio-ventrale	médio-ventrale	médiane, dans la moitié postérieure du corps
Epines	en cupule	en cupule	en écaille

L'anatomie interne de quelques spécimens adultes a été observée en microscopie optique : les individus ont été préalablement fixés au Bouin, colorés au Carmin Boracique (10 gouttes pour 3 ml) pendant 20 heures, différenciés à l'HCl 37% (3 gouttes pour 10 ml) durant 10 min, déshydratés par bains successifs de 10 min d'éthanol (70%, 95%), puis de buthanol, éclaircis à l'Eugénol (10 min) et enfin montés entre lame et lamelle dans du DePex (BDH).

La morphologie externe de quelques spécimens adultes a été observée en microscopie électronique à balayage (MEB) : les individus ont été fixés une première fois dans une solution de glutaraldéhyde à 3%. Ensuite les individus ont subi une deuxième fixation à l'acide osmique à 2% pendant une heure. Les parasites ont été déshydratés par des bains successifs de 5 minutes dans de l'acétone à 50%, à 70 % puis à 100%. Les individus ont été passés au point critique dans une solution à 50% acétone, 50% hexaméthylidislazane. Ils ont enfin été métallisés à l'or ; les observations ont été réalisées sur un appareil Quanta 200 FEG (FEI).

2.3. Analyse moléculaire

Les parasites destinés aux analyses moléculaires ont été préalablement conservés dans de l'éthanol 95%.

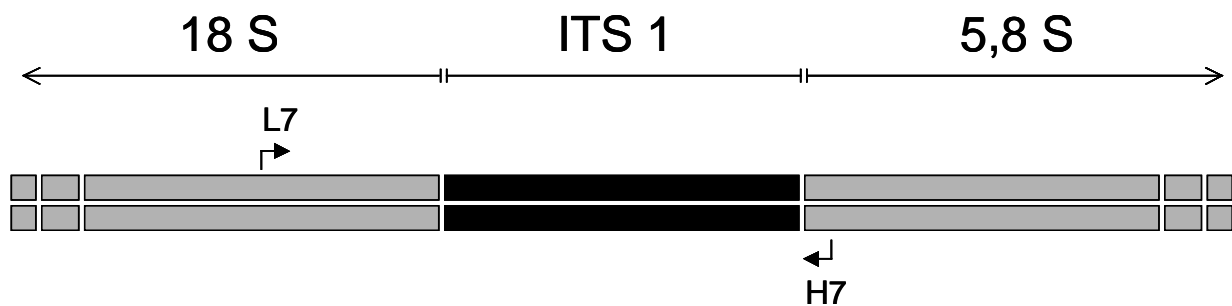


Figure 2. Représentation schématique des amorces utilisées (L7 – H7) pour l'amplification du fragment correspondant à la partie terminale de l'ADN 18 S et de l'intégralité de l'ITS 1.

L'ADN a été extrait grâce au kit QIAamp DNA Micro Kit (Quiagen). L'amorce forward L7 (5' –TGATTTGTCTGGTTTATTCCGAT- 3') qui s'hybride dans la région 18 S de l'ADNr et l'amorce reverse H7 (5' – GCTGCGTTCTTCATCGATACTCG- 3') qui s'hybride dans la région 5,8 S de l'ADNr (Figure 2.) (Verneau et al., 1997), ont été utilisées pour l'amplification PCR (« Polymerase Chain Reaction »). Les PCRs ont été réalisées en utilisant le kit GoTaq DNA polymerase (Promega) et un thermocycleur (MasterCycleur, Eppendorf) (dénaturation 3 min à 96°C, puis 40 cycles de 30 s à 96°C, 25 s à 52°C, 45 s à 72 °C, suivi de 5 min à 72°C pour l'extension finale). Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose à 1,5%. La concentration d'ADN a été estimée grâce au marqueur de taille 100pb DNA ladder (Promega). Les produits de PCR ont alors été purifiés en utilisant le kit Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega). Les réactions de séquences ont été réalisées en utilisant les mêmes amorces avec le kit Genome Lab DTCS-Quick Start (Beckmann Coulter) puis les séquences ont été obtenues à l'aide d'un séquenceur automatique Ceq 8000 (Beckman Coulter).

2.4. Analyse des données

Les indices épidémiologiques : prévalence (P% : pourcentage d'individus infestés), abondance moyenne (Ab : nombre moyen de parasites par individu) et intensité (I : nombre moyen de parasites par individu infesté) ont été calculés d'après Bush *et al.* (1997) chez les moules et les congrès. Pour les congrès, les fréquences d'occurrence (en %) des parasites situés dans les différentes parties du tube digestif ont été calculées. L'épidémiologie des G0 de sole, notamment dans les pertuis Charentais, fait l'objet de chapitres spécifiques (Chapitres 3, 4, 5 et 6) et n'est donc pas traitée dans ce chapitre.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences existantes sur la banque de séquence nucléotidique en ligne Genbank par Blastn (Altschul et al., 1997). Les parties respectives des fragments d'ADN ribosomal séquencés (ADN 18 S et ITS 1) ont été déterminées par alignement avec les séquences d'ADN 18 S et de l'ITS 1 de *Isthmiophora hortensis* (AB189982) (Digènes, Echinostomidés) qui après analyse sous Blastn (Altschul et al., 1997) présentait le plus d'identité sur l'ensemble de la partie de l'ADN ribosomal séquencée. Les séquences ont ensuite été alignées en utilisant le logiciel Bioedit. Le pourcentage de similarité entre séquences deux à deux a été calculé par Clustal W (Thompson

et al., 1994), puis le nombre d'insertions et de substitutions a été calculé pour chaque alignement.

3. Résultats

3.1. Cercaires

Au total, seulement deux moules infestées par *P. crucibulum* ont été détectées : une dans l'échantillon de mai (P% = 0,02 %) et une autre dans celui de juillet (P% = 0,20 %).

Les moules infestées par *P. crucibulum* présentent peu ou pas de réserves de glycogène au niveau du manteau (Figure 3A), cependant on remarquera que cette caractéristique anatomique n'est pas un critère exclusif de l'infestation. L'observation à la loupe binoculaire révèle que le sporocyste de *P. crucibulum* est branchu : il est constitué d'un réseau de tubules qui envahissent tout le manteau (Figure 3B). L'observation en microscopie optique montre la présence de cercaires à différents stades de développement depuis les balles germinales jusqu'aux cercaires matures qui sont expulsées dans le milieu (Figure 3C), comme décrit par Matthews (1973). Les cercaires matures présentent une bouche située en position médio ventrale et, en position postérieure, un pédoncule caudal qui porte latéralement deux fourchons caudaux (Figure 3C). De plus, on note au niveau du pédoncule caudal l'absence d'un troisième lobe médian dorsal caractéristique de *P. squamatus*. Les caractéristiques anatomiques des cercaires observées correspondent exactement à celles de *P. crucibulum* (Matthews, 1973).

Anatomie et comportement des cercaires de *Prosorhynchus crucibulum* d'après Matthews (1973)

Les cercaires de *P. crucibulum* sont typiques des cercaires de Bucéphalidés, avec une queue qui est composée d'un pédoncule caudal bilobé qui porte deux fourchons caudaux. Les fourchons et le pédoncule caudal sont recouverts d'un grand nombre de récepteurs sensoriels tactiles qui doivent servir à la reconnaissance du deuxième hôte intermédiaire lors du contact, et sécrètent une substance gluante à leur surface qui permet l'adhésion. Les cercaires une fois expulsées du sporocyste se posent sur le fond, les fourchons caudaux, extrêmement contractiles pouvant atteindre environ neuf fois la longueur du corps, flottent au dessus du

fond et offrent une relative résistance au flux d'eau permettant aux cercaires d'être transportées par les courants. Les fourchons étendus augmentent largement la chance de rentrer en contact avec le deuxième hôte intermédiaire qui est en général un Téléostéen benthique de petite taille. Les fourchons sont généralement les premiers à entrer en contact avec l'hôte, et par contraction de ceux-ci la cercaire vient plaquer son pédoncule caudal à la surface de la peau de l'hôte afin d'adhérer solidement. Le corps de la cercaire se tord sur lui-même de manière à ce que l'organe de pénétration lobé vienne se plaquer à la surface de l'hôte, l'organe de pénétration s'évagine alors et libère les substances histolytiques préalablement sécrétée par les glandes de pénétration. La cercaire pénètre ainsi dans l'hôte par lyse et en se mouvant à travers les tissus. Les épines que porte déjà la cercaire doivent aider à ce qu'elle ne reparte pas en arrière. Le pédoncule caudal et les fourchons se détachent du corps et sont abandonnés à l'extérieur de l'hôte ou bien dans ses tissus. Enfin, la cercaire s'enkyste en sécrétant un kyste hyalin et devient alors métacercaire en 3 à 4 heures après la pénétration.

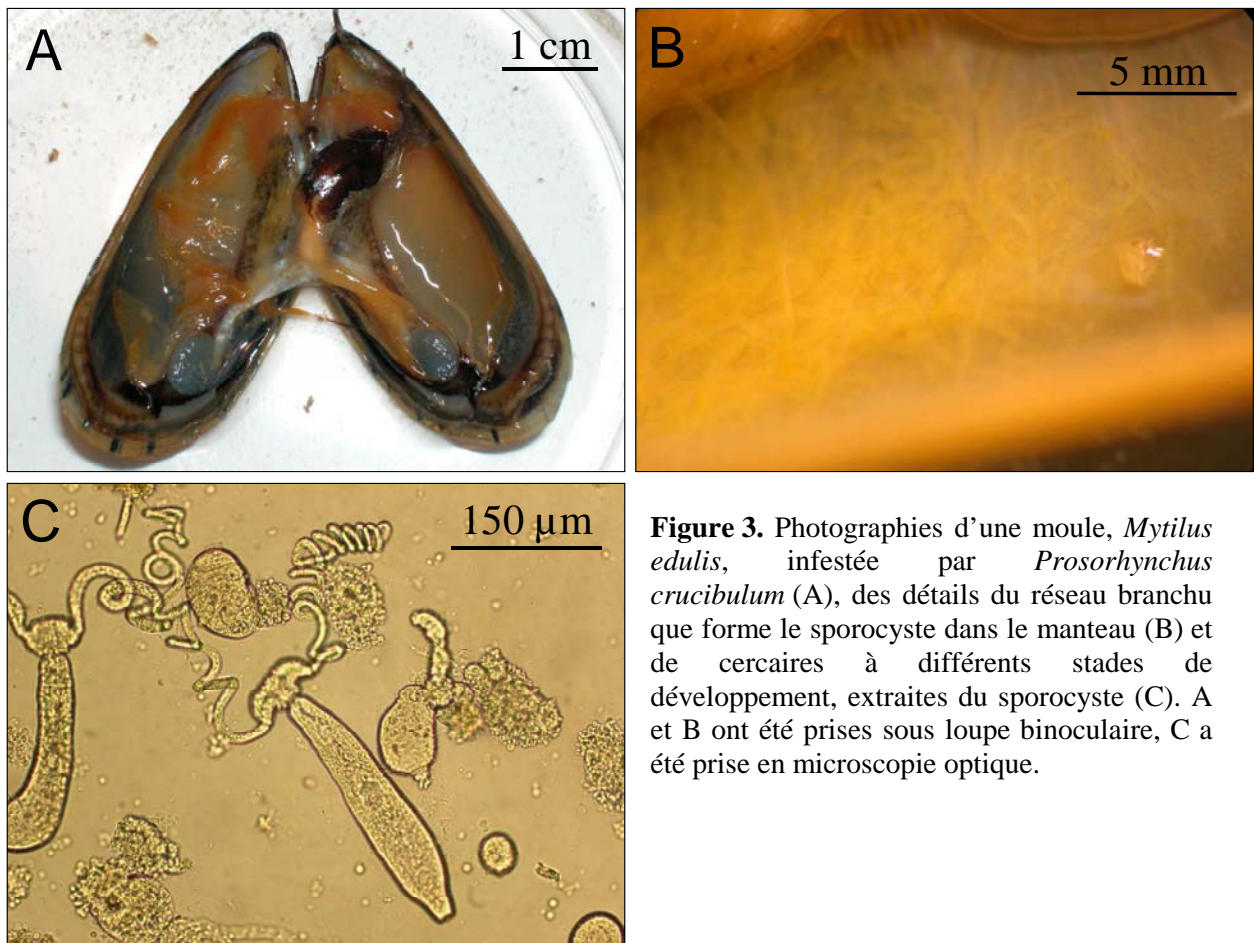


Figure 3. Photographies d'une moule, *Mytilus edulis*, infestée par *Prosorhynchus crucibulum* (A), des détails du réseau branchu que forme le sporocyste dans le manteau (B) et de cercaires à différents stades de développement, extraites du sporocyste (C). A et B ont été prises sous loupe binoculaire, C a été prise en microscopie optique.

3.2. Métacercaires

D'après les critères morpho-anatomiques développés sur des spécimens adultes de *Prosorhynchus* (Matthews, 1973) (Tableau 1), deux formes de métacercaires ont pu être distinguées chez les G0 de sole : (i) une forme caractéristique de *P. crucibulum* (Figure 4A), c'est-à-dire : rhynchus large, bouche en position médio-ventrale et (ii) une forme caractéristique de *P. aculeatus* (Figure 4B), c'est-à-dire : rhynchus petit, bouche en position médiane dans la moitié postérieure du corps, notée *Prosorhynchus* sp. A.

Des spécimens de *P. crucibulum* et *Prosorhynchus* sp. A ont été déposés au Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France), sous les numéros d'accession 531 HG et 532 HG, respectivement.

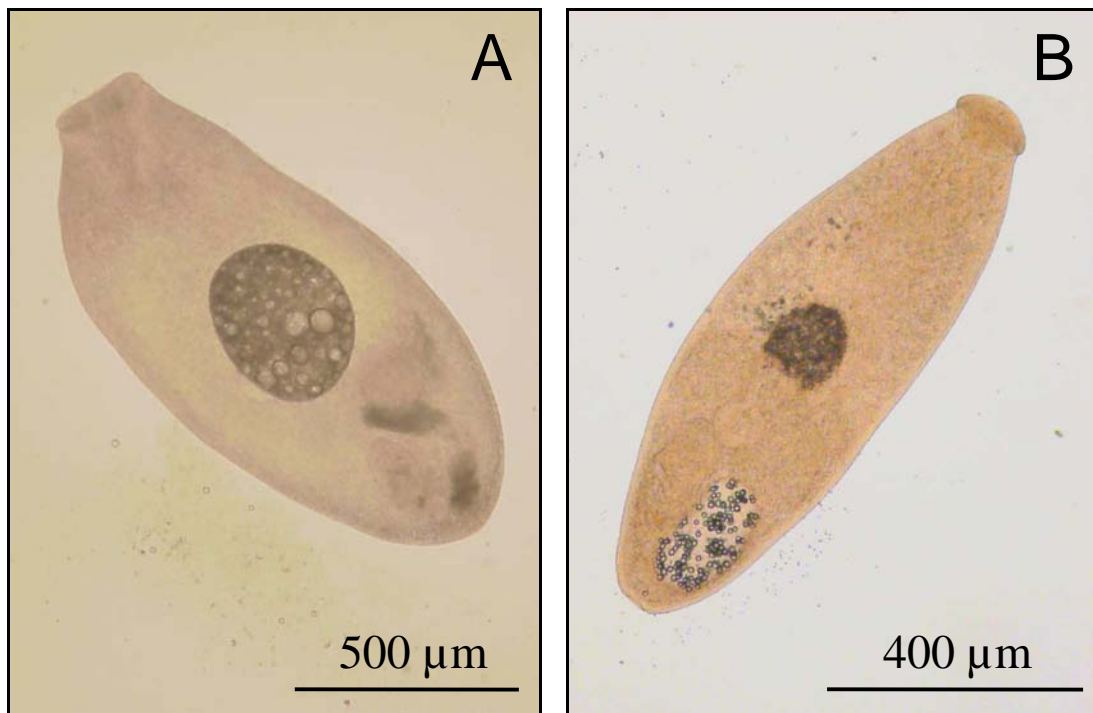


Figure 4. Photographies en microscopie optique de métacercaires du genre *Prosorhynchus* prélevées chez des juvéniles G0 de sole, *Solea solea* : *Prosorhynchus crucibulum* (A) ; *Prosorhynchus* sp. A (B)

3.3. Adultes

D'après les critères morpho-anatomiques (Tableau 1), deux espèces de *Prosorhynchus* ont été détectées dans les tubes digestifs des congres : (i) *Prosorhynchus crucibulum* (Figure 5A) ; (ii) *Prosorhynchus aculeatus* (Figure 5B).

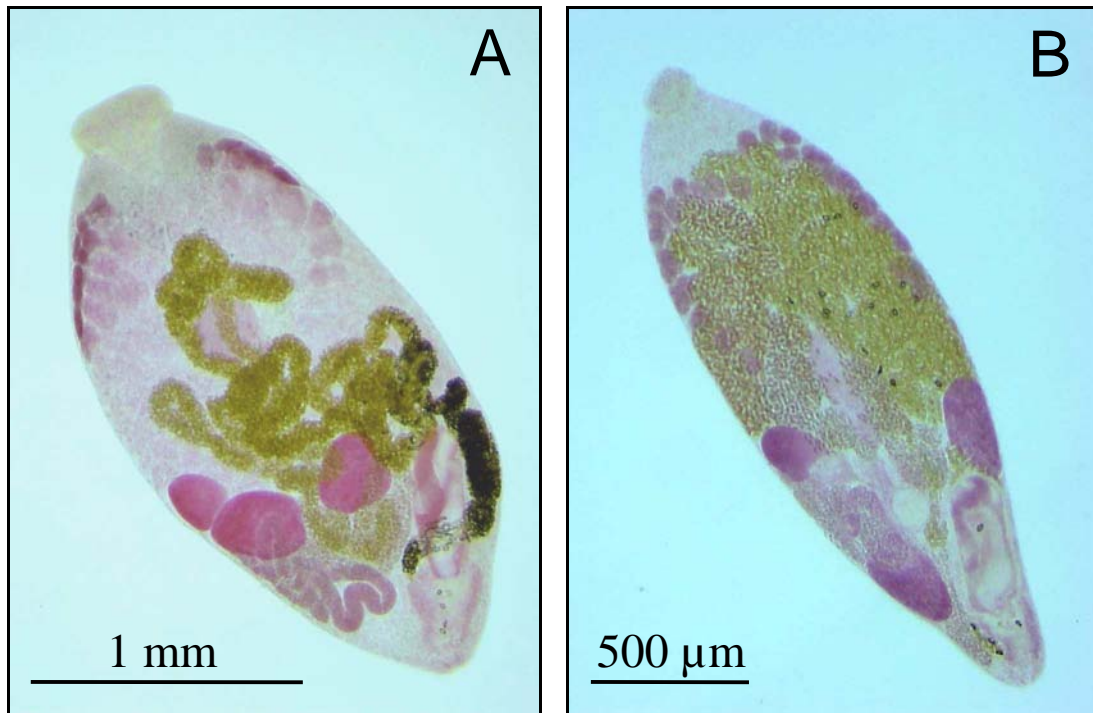


Figure 5. Photographies en microscopie optique d'adulte du genre *Prosorhynchus* prélevés dans le congre, *Conger conger* : *Prosorhynchus crucibulum* (A) ; *Prosorhynchus aculeatus* (B).

P. crucibulum et *P. aculeatus* ont été trouvés chez les congres échantillonnés à des niveaux d'infestation relativement élevés (Tableau 2). Pour les deux années d'échantillonnage, l'abondance moyenne de *P. aculeatus* est supérieure à celle de *P. crucibulum*, dans une proportion qui reste similaire de 4 fois plus en 2003 à 3,3 fois en 2005. En revanche, on observe une forte variation interannuelle avec des abondances moyennes nettement supérieures en 2005 comparées à celles de 2003 : 6,7 fois plus pour *P. crucibulum* et 5,7 fois plus pour *P. aculeatus*. *P. crucibulum* était principalement localisé au niveau de l'intestin antérieur alors que *P. aculeatus* était présent essentiellement au niveau de l'intestin postérieur précisément au niveau du rectum.

Tableau 2. Prévalence (P %), abondance moyenne (Ab \pm SD), intensité moyenne (I \pm SD (min – max)) et proportion (%) dans les différentes parties du tube digestif (1 : l'estomac ; 2 : l'intestin antérieur ; 3 : l'intestin postérieur) de *Prosorhynchus crucibulum* et *Prosorhynchus aculeatus* prélevés chez des congres, *Conger conger*, dans les pertuis Charentais en 2003 et 2005.

Espèces	Année	P %	Ab	I \pm SD	(min -max)	(1) %	(2) %	(3) %
<i>Prosorhynchus crucibulum</i>	2003	53,3	7,2 \pm 3,5	13,5 \pm 3,9	1 - 40	9	78	13
	2005	84,0	28,2 \pm 6,6	23,7 \pm 6,5	3 - 107	3	91	6
<i>Prosorhynchus aculeatus</i>	2003	86,6	48,5 \pm 19,7	60,6 \pm 20,6	1 - 317	1	9	90
	2005	100,0	161,1 \pm 40,1	161,1 \pm 40,1	1 - 671	1	2	97

Les observations réalisées en MEB, confirment et permettent de préciser les détails de morphologie externe observés en microscopie optique sur le rhynchus, la bouche et la forme des écailles.

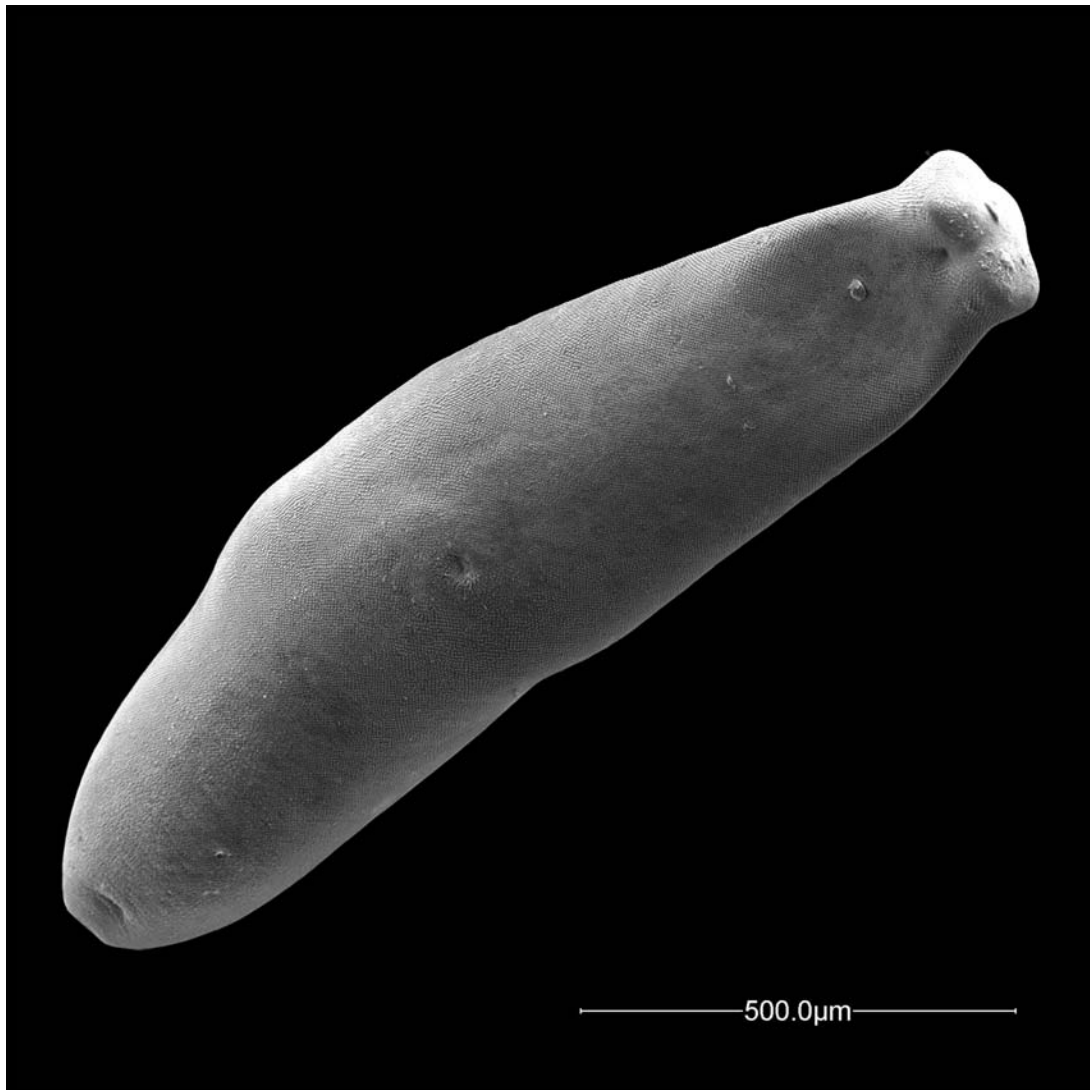


Figure 6. Photographie en microscopie électronique à balayage d'un adulte de *Prosorhynchus crucibulum* prélevé chez un congre.

***Prosorhynchus crucibulum* (Figures 6 et 7)**

Le corps est allongé, d'allure générale massive et entièrement recouvert d'écailles. Le rhynchus est large et comporte 5 lobes (2 en position ventrale et 3 en position dorsale). Le rhynchus porte des épines identiques à celles du reste du corps. Les écailles sont disposées en quinconce, elles ont une forme externe quasi rectangulaire, plus large que longue, et une structure en peigne. On note que la taille des écailles diminue de la partie antérieure à la partie postérieure, cette dernière étant quasiment nue à son extrémité. Un grand nombre de micro-orifices est présent autour de la bouche dans la moitié postérieure. La région du pore génital et du pore excréteur ne présente pas d'épines particulières.

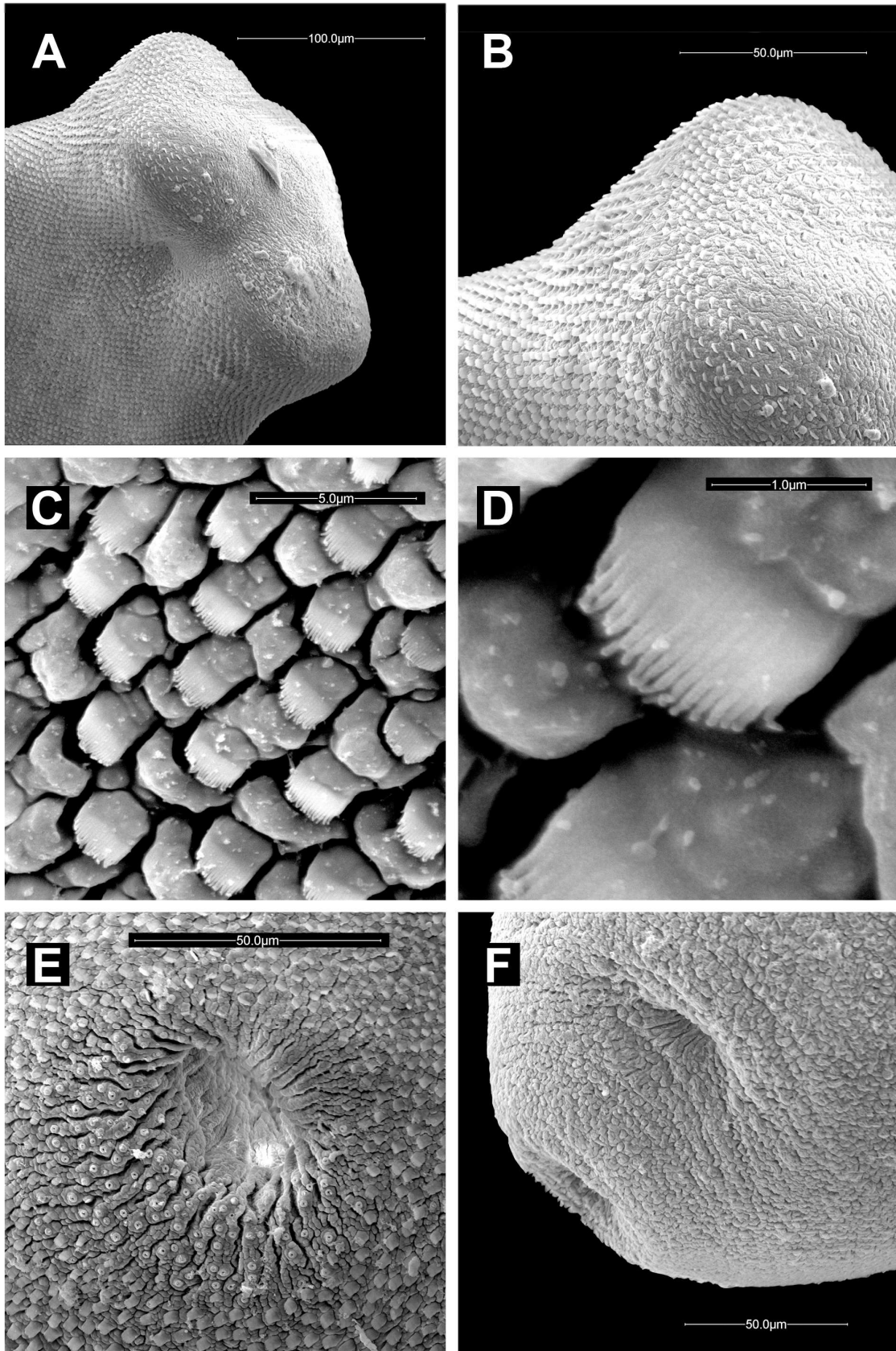


Figure 7. Photographies en microscopie électronique à balayage d'un adulte de *Prosorhynchus crucibulum* prélevé chez un congre : rhynchus (A), détails du rhynchus (B), écailles de la région médioventrale antérieure (C), détails d'une écaille (D), bouche (E), orifice génital en position ventrale et pore excréteur à l'extrémité postérieure (F).



Figure 8. Photographie en microscopie électronique à balayage d'un adulte de *Prosorhynchus aculeatus* prélevé chez un congre.

Prosorhynchus aculeatus (Figures 8, 9 et 10)

Le corps est elliptique et entièrement recouvert d'écailles. Le dessus du rhynchus est arrondi et porte des épines différentes de celle du reste du corps. Les épines du rhynchus sont pointues, ne présentent pas une structure en peigne et sont plus grandes que les écailles du corps. Les écailles du reste du corps sont disposées en quinconce, elles ont une forme externe arrondie, plus longue que large dans la partie antérieure et une structure en peigne. On note que la taille des écailles diminue de la partie antérieure à la partie postérieure, les écailles devenant de plus en plus arrondie. On ne note pas la présence de micro-orifices autour de la bouche. La région du pore excréteur présente des épines allongées et pointues en structure en peigne. De plus, on note la présence de deux micro-orifices en position ventrale près du pore excréteur (Figure 10 A).

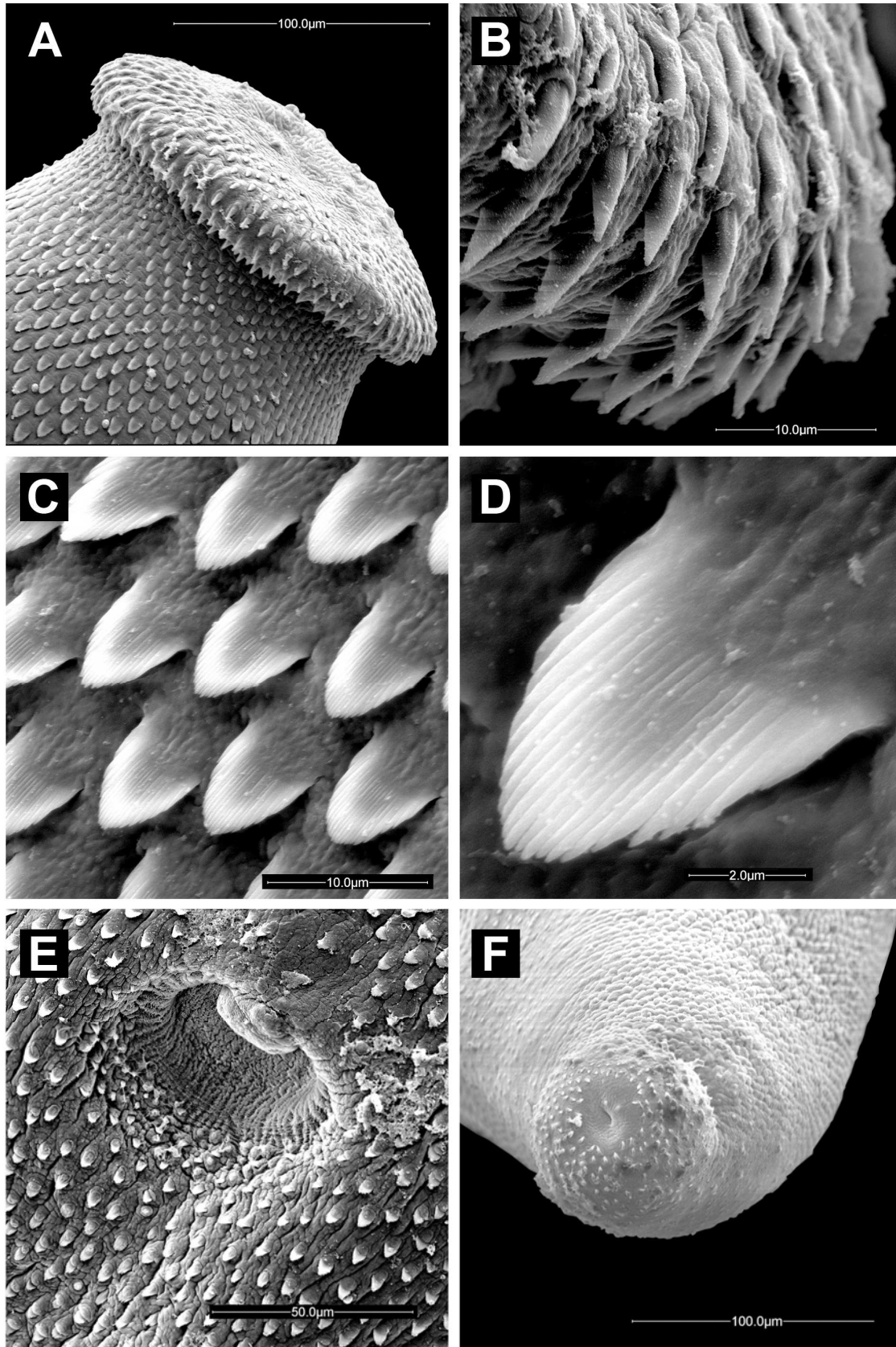


Figure 9. Photographies en microscopie électronique à balayage d'un adulte de *Prosorhynchus aculeatus* prélevé chez un congre : rhyncus (A), détails du rhyncus (B), écailles de la région médioventrale antérieure (C), détails d'une écaille (D), bouche (E), orifice génital en position ventrale et pore excréteur à l'extrémité postérieure (F).

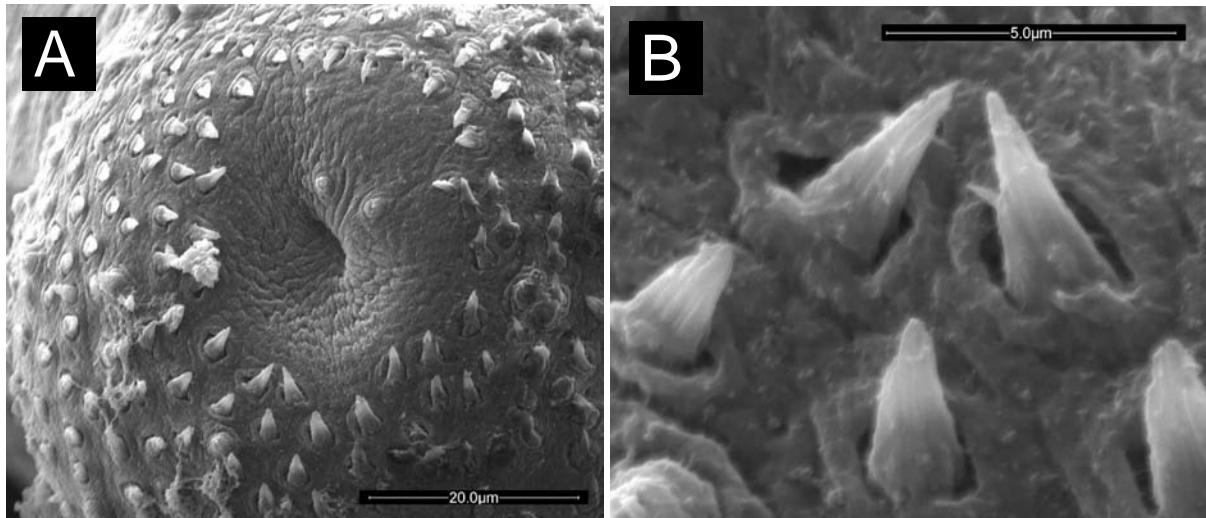


Figure 10. Photographies prises en microscopie électronique à balayage : détails de la région du pore excréteur (A) et des épines qui y sont présentes (B) chez *Prosorhynchus aculeatus*.

3.4. Comparaison morpho-anatomique métacercaires / adultes

D'après les critères morpho-anatomiques développés sur des spécimens adultes de *Prosorhynchus* (Matthews, 1973) (Tableau 1), les métacercaires de *P. crucibulum* et de *Prosorhynchus* sp A. ont les mêmes caractéristiques que les adultes *P. crucibulum* et *P. aculeatus*, respectivement.

De plus, l'observation en microscopie optique montre que les métacercaires de *Prosorhynchus* sp A. présentent des épines pointues au niveau du rhynchus tout comme les adultes de *P. aculeatus* (Figure 11).

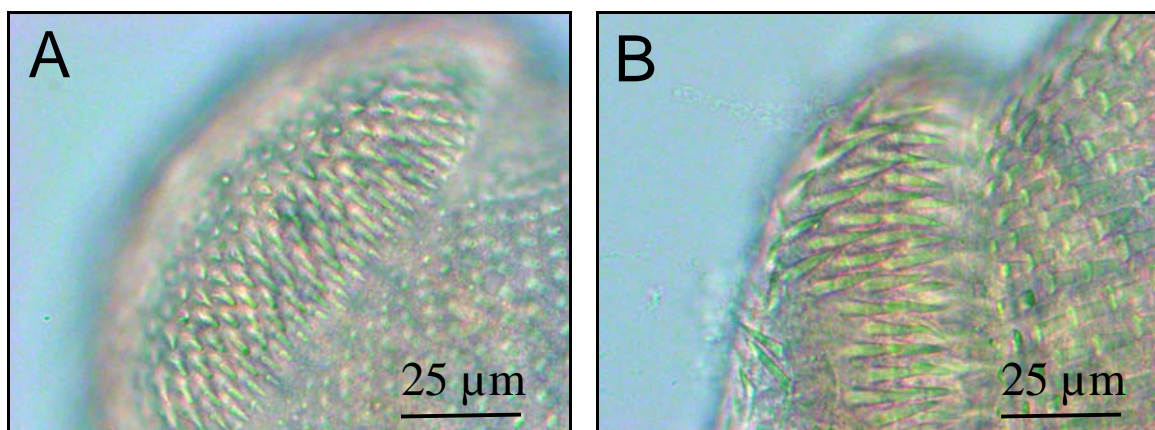


Figure 11. Photographies en microscopie optique du rhynchus présentant des épines acérées chez une métécercaire de *Prosorhynchus* sp. A (A) et chez un adulte de *Prosorhynchus aculeatus*.

3.5. Comparaison moléculaire des différents stades de *Prosorhynchus*

L'analyse moléculaire des différents stades des différentes formes déterminées sur base morpho-anatomique a révélé trois séquences différentes de la partie terminale de l'ADN 18 S et de l'ITS 1 (Figure 12 ; Tableau 3). Les trois différents stades de développement (cercaires (n = 2), métacercaires (n = 10) et adultes (n = 10)) déterminés comme *P. crucibulum* présentaient exactement la même séquence, c'est-à-dire 100 % d'identité sur 1052 bases. En revanche, les adultes *P. aculeatus* (n = 23) et les métacercaires *Prosorhynchus* sp. A (n = 11), présentaient des séquences différentes sur les 1081 bases alignées (comprenant une partie de l'ADN 18 S et l'intégralité de l'ITS 1) avec 97,41 % d'identité. Sur les 522 bases alignées de l'ADN 18 S, les identités étaient de 99,23 % alors que sur 559 bases alignées de l'ITS 1 les identités étaient de 95,71 %. La comparaison des séquences de *P. crucibulum* et des adultes de *P. aculeatus* présentaient des différences plus importantes avec 93,43 % sur les 1080 bases alignées de l'ADN 18 S et de l'ITS 1 : 99,43% d'identité sur les 522 bases alignées de l'ADN 18 S et 87,81% sur les 558 bases alignées de l'ITS 1. On remarque que les identités entre *P. crucibulum* et les métacercaires *Prosorhynchus* sp. A étaient légèrement inférieures, tout en restant du même ordre de grandeur que celles observées avec *P. aculeatus*. Les résultats des alignements avec les séquences répertoriées dans Genbank (Blastn) (Altschul et al., 1997) réalisés sur l'ITS 1 pour *P. crucibulum*, *P. aculeatus* et des métacercaires de *Prosorhynchus* sp. A présentaient le plus d'identité avec l'espèce *Bucephalus polymorphus* (AY289238, AY289239, AY289240, AY289241) (Digènes, Bucéphalidés) avec 93% (sur 76 bases), 92% (sur 88 bases) et 91% (sur 67 bases), respectivement.

Tableau 3. Résultats des alignements deux à deux, taille de l'alignement (Ali), nombre de substitutions (Sub), nombre d'insertions (Ins), nombre de différences totales (Dif tot = Sub + Ins) et % d'identité.

ADN r	Comparaison taxa	Ali	Sub	Ins	Dif tot	Identités (%)
18S + ITS 1	<i>P. crucibulum</i> / <i>P. aculeatus</i>	1080	43	28	71	93,43
	<i>P. crucibulum</i> / <i>P. sp. A</i>	1082	45	30	75	93,07
	<i>P. aculeatus</i> / <i>P. sp. A</i>	1081	25	3	28	97,41
18S	<i>P. crucibulum</i> / <i>P. aculeatus</i>	522	3	0	3	99,43
	<i>P. crucibulum</i> / <i>P. sp. A</i>	522	5	0	5	99,04
	<i>P. aculeatus</i> / <i>P. sp. A</i>	522	4	0	4	99,23
ITS 1	<i>P. crucibulum</i> / <i>P. aculeatus</i>	558	40	28	68	87,81
	<i>P. crucibulum</i> / <i>P. sp. A</i>	560	40	30	70	87,50
	<i>P. aculeatus</i> / <i>P. sp. A</i>	559	21	3	24	95,71

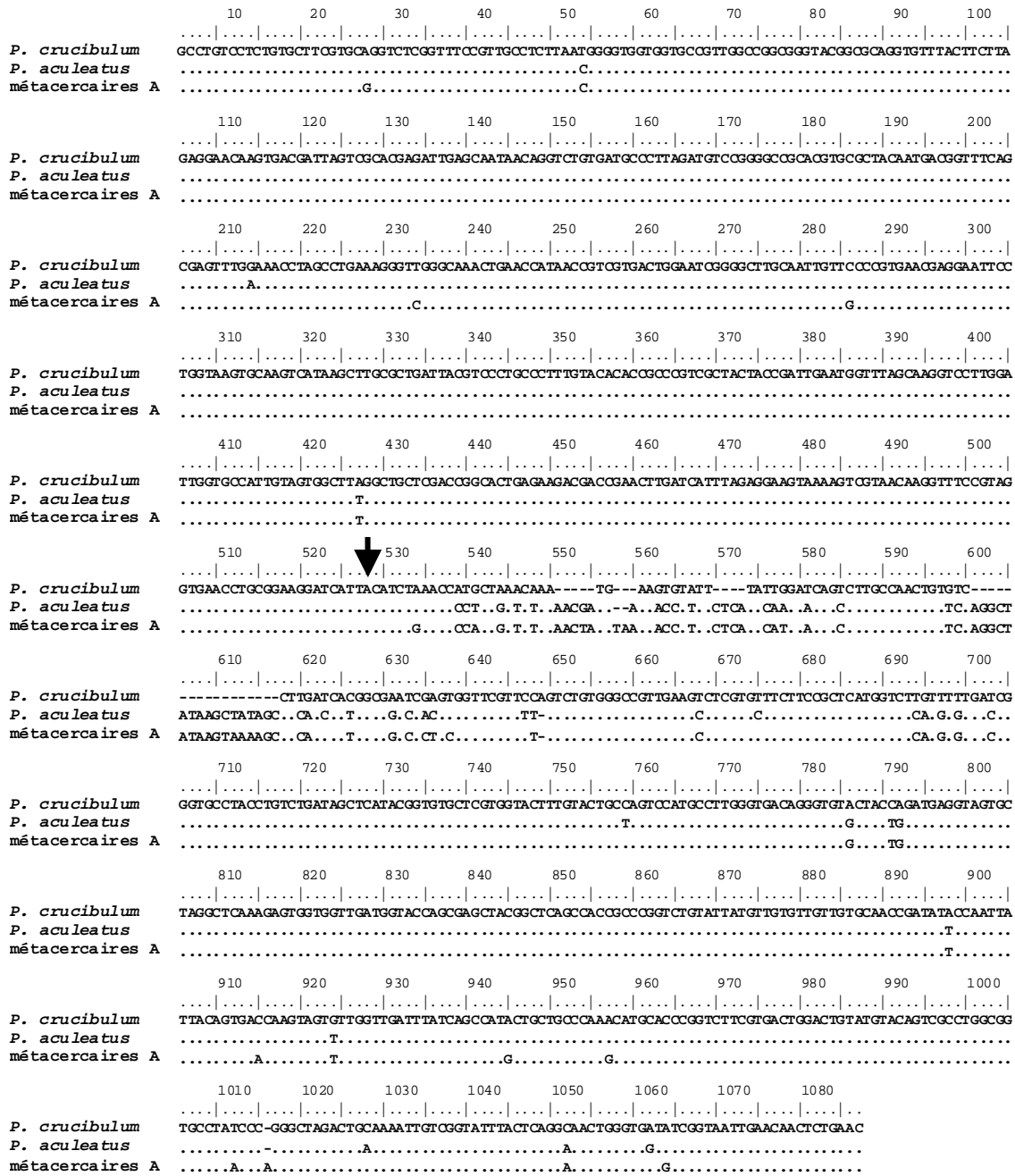


Figure 12. Alignement complet dans le sens 5'-3' des séquences d'une partie de l'ADN 18 S et de l'intégralité de l'ITS 1 de *Prosorhynchus crucibulum*, *Prosorhynchus aculeatus* et *Prosorhynchus* sp. A (métacercaire) ; la flèche signale le début de l'ITS 1.

4. Discussion

Les moules prélevées dans les pertuis Charentais présentaient en 2004 de faibles niveaux d'infestation par *P. crucibulum* avec une prévalence de seulement de 0,02 % et 0,20 % en mai et en juillet respectivement. Ces niveaux d'infestation par *P. crucibulum* sont

semblables ou inférieurs à ceux déjà rencontrés en Angleterre (Matthews, 1973) et sur la côte portugaise (Santos & Coimbra, 1995). Par ailleurs, Coustau et al (1990) avaient mis en évidence l'augmentation saisonnière de l'infestation des moules par *P. squamatus* au printemps et en été, avec des prévalences largement supérieures à celles de notre étude (jusqu'à 40 % de moules infestées dans le nord du golfe de Gascogne). Ce parasite utilise une grande partie de l'énergie alouée à la reproduction par la moule pour son propre développement et notamment la production de cercaires par reproduction asexuée, ce qui entraîne la castration des moules infestées (Coustau et al., 1990; Coustau et al., 1991a). Coustau et al (1990) ont montré que la prévalence de *P. squamatus* était largement plus élevée dans les populations de *M. edulis* que dans celles d'hybrides *M. edulis* – *M. galloprovincialis*. De plus, au sein d'une population d'hybrides, les individus ayant un génotype proche de *M. edulis* sont infestés préférentiellement (Coustau et al., 1991b). La population de moule des pertuis Charentais comporte une faible proportion d'hybrides par rapport à la Bretagne et l'Angleterre (Bierne et al., 2003), ce qui probablement explique une plus forte prévalence de *P. squamatus* dans cette zone. Or, au contraire *P. squamatus* n'a pas été détecté dans les moules disséquées dans les pertuis Charentais. L'absence de *P. squamatus* est confirmée chez le deuxième hôte intermédiaire potentiel que constituaient les juvéniles G0 de sole, et même chez l'hôte définitif potentiel que représentaient les congres, étant donné le large spectre d'hôte de cette espèce (McArthur & McGladdery, 2000). *P. squamatus* a une répartition boréale (Matthews, 1973) alors que *P. aculeatus* et *P. crucibulum* ont une répartition plus tempérée, argument qui corrobore nos conclusions sur l'absence de cette espèce dans les pertuis Charentais.

Deux formes de *Prosorhynchus* ont été distinguées sur critères morpho-anatomiques chez les G0 de sole des pertuis Charentais. Ces deux formes correspondaient aux critères morpho-anatomiques des adultes de *P. crucibulum* et *P. aculeatus*, respectivement. On remarque aussi que d'autres Téléostéens benthiques de petite taille, tels que les gobies *Pomatoshistus* spp. (Pinet, 2005) et le callyonyme *Calionymus lyra* sont aussi deuxième hôte intermédiaire de ces deux *Prosorhynchus* dans les pertuis Charentais. Ces parasites ont aussi été signalés en Méditerranée chez des Gobiesocidae, *Gouania wildenowii* et *Lepadogaster gouani* (Rebecq & Leray, 1961). Par ailleurs, Matthews (1973) avait montré, par des infestations expérimentales par *P. crucibulum*, que certaines espèces pouvaient être infestées (*Scophthalmus maximus*, *Limanda limanda*, *Onus mustelus* et *Pomatoshistus minutus*), et d'autres pas (*Scophthalmus rhombus*, *Pleuronectes platessa*, *Cottus bubalis* et *Blennius*

pholis), mettant ainsi en évidence une certaine spécificité de ce parasite au niveau du deuxième hôte intermédiaire.

Notre étude montre que les congres, hôtes définitifs, présentent de forts taux d'infestation par deux espèces de *Prosorhynchus* à savoir *P. crucibulum* et *P. aculeatus* dans les pertuis Charentais. Ces deux espèces sont communes chez le congre et avaient déjà été signalées récemment en Atlantique Nord-Est sur les côtes Portugaises (Santos & Gibson, 2002) et en Méditerranée sur les côtes de la Corse (Bartoli et al., 2005) [on remarque qu'en dehors de notre zone géographique d'étude, *P. crucibulum* avait déjà été rapporté chez *Liparis* spp. (Munson, 1974)]. Ces deux espèces se distinguent aisément au stade adulte de part la taille et la forme du corps, la forme du rhynchus et la position de la bouche. Les résultats obtenus confirment que leurs niches écologiques au sein du tube digestif de l'hôte définitif sont très distinctes, à savoir l'intestin antérieur pour *P. crucibulum* et l'intestin postérieur, précisément au niveau du rectum, pour *P. aculeatus* (Jones, 1943; Matthews, 1973; Santos & Gibson, 2002). Selon Matthews (1973), cette ségrégation reflète la taille des deux espèces et plus particulièrement celle de leur rhynchus, en relation avec la taille des villosités des parois de l'intestin de l'hôte qui décroît vers la partie postérieure : *P. crucibulum* est en effet plus grand et a un plus grand rhynchus que *P. aculeatus*. L'analyse morpho-anatomique effectuée en MEB a permis de préciser la description des structures externes de ces deux espèces. Nos observations ont mis en évidence la structure des épines qui recouvrent le corps de ces deux espèces. De manière générale, pour les deux espèces la taille des épines diminue le long du corps de la partie antérieure à la partie postérieure (Santos & Gibson, 2002). Chez *P. crucibulum*, la forme et la structure des épines est homogène sur tout le corps : elles ont une structure en peigne et sont de forme rectangulaire à carrée. Cependant, chez *P. aculeatus*, les épines du rhynchus, diffèrent de celles du reste du corps : (i) au niveau du rhynchus, les épines sont pointues, n'ont pas une structure en peigne et sont de taille supérieure à celles du reste du corps ; (ii) au niveau du reste du corps, les épines ont toutes une structure en peigne, elles ont une forme en écaille (plus allongée dans la partie antérieure) et une forme en pointe à l'extrémité postérieure autour du pore excréteur. Cette différence de taille est conforme à la description antérieure de cette espèce, alors nommée *Skrijabiniella aculeatus*, réalisée par Jones (1943) et elle est en accord avec les observations faites par Bartoli (pers com). Par ailleurs, la structure en peigne des épines a déjà été montrée chez différentes espèces d'autres familles de Digènes (Han et al., 2003; Sohn et al., 2003). Santos et Gibson (2002), qui ont aussi observé ces espèces en MEB, décrivent au contraire que *P. aculeatus* porte des épines

arrondies de taille inférieure aux plus grandes du corps et ne signalent pas la structure en peigne des épines chez les deux espèces. Ainsi, plus qu'une réelle différence de la structure du tégument de *P. aculeatus* entre nos spécimens et ceux étudiés par Santos et Gibson, on suppose une différence de préparation des échantillons et plus particulièrement de la fixation. En effet, ces auteurs ont fixé leurs échantillons au fluide de Berland, qui est un fixateur plutôt utilisé en microscopie optique et à l'observation de la structure interne, ce qui a pu altérer le tégument des Helminthes (Gibson, pers com).

L'analyse moléculaire confirme l'identification morpho-anatomique des métacercaires et des cercaires pour *P. crucibulum* avec 100% d'homologie sur la partie séquencée de l'ADN ribosomal à savoir l'ADN 18 S et l'ITS 1. Ceci confirme de manière moléculaire le cycle de vie *P. crucibulum* dans les pertuis Charentais. En revanche, les métacercaires identifiées comme *P. aculeatus* présentent une séquence différente en particulier au niveau de l'ITS 1. Néanmoins, nous avons observé pour *Prosorhynchus* sp. A les critères morpho-anatomiques correspondant à *P. aculeatus* (Jones, 1943; Matthews, 1973). De plus, *Prosorhynchus* sp. A ne pourrait pas correspondre à *Prosorhynchus squamatus* étant donné que la bouche est en position médio-ventrale chez cette espèce, alors qu'elle est clairement dans la moitié postérieure chez *Prosorhynchus* sp. A. Les identités sont supérieures (95,71%) à celles observées entre *P. aculeatus* adulte de congé et *P. crucibulum* (87,41%). Au niveau interspécifique, les différences sur la séquence de l'ITS (1 et 2) sont en général supérieures à 1% au sein d'un même genre (Nolan, 2005). Nolan (2005), qui a effectué un travail de synthèse sur l'utilisation de l'ITS en taxonomie des Digènes, précise qu'il n'y a aucune preuve de variations intraspécifiques significatives au niveau de l'ITS, particulièrement quand les séquences sont issues d'échantillons sympatriques. Dans notre étude, aucune variabilité intra-stade des séquences de l'ITS 1 n'a été observée au niveau métacercaire et adulte. Or, pour une même espèce, il n'existe normalement pas de variation significative inter-stade, ce qui permet d'utiliser cette technique pour établir ou confirmer le cycle de vie des espèces de parasites (Jousson *et al.*, 1999; Jousson & Bartoli, 2000; 2001). Ainsi, la différence inter-stade entre la forme adulte de *P. aculeatus* et la forme métacercaire *Prosorhynchus* sp. A observée dans notre étude correspondrait à une **différence interspécifique et *Prosorhynchus* sp. A serait alors une nouvelle espèce**. Dans cette hypothèse, *Prosorhynchus* sp. A pourrait être une forme cryptique, c'est-à-dire morphologiquement indifférentiable de *P. aculeatus*. En ce cas, ces deux espèces auraient des cycles de vie distincts passant par des hôtes successifs différents tout du moins au niveau du deuxième hôte intermédiaire et de l'hôte définitif. Etant

donné les fortes abondances respectives de congres et de juvéniles G0 de sole, cette hypothèse apparaît cependant difficilement envisageable. Malheureusement en l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas statuer sur l'espèce *Prosorhynchus* sp. A.

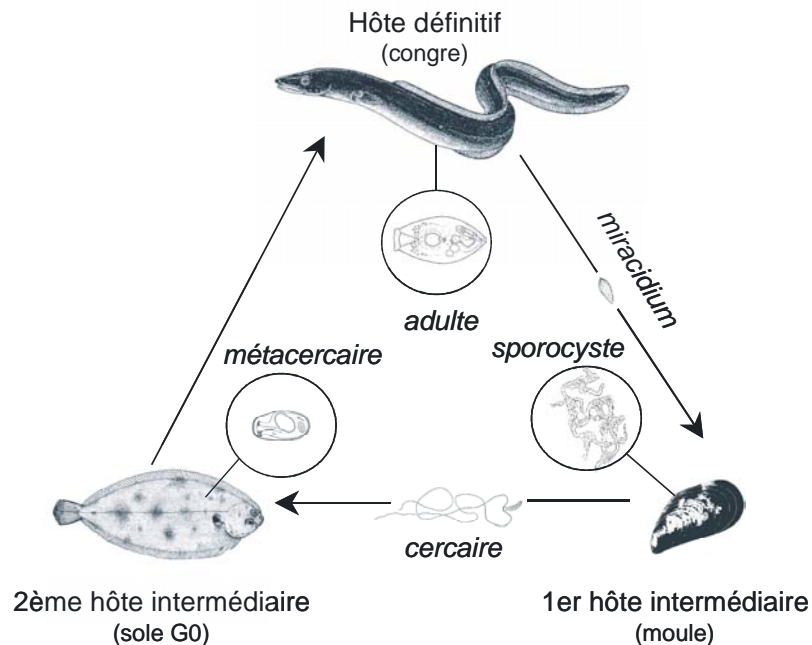


Figure 13. Schéma du cycle de *Prosorhynchus crucibulum* dans les pertuis Charentais. NB : d'autres espèces de Téléostéens benthiques de petite taille, tels que les gobies et les callionymes, sont aussi deuxième hôte intermédiaire de ce parasite

En conclusion, par combinaison de l'analyse morpho-anatomique externe et de l'analyse moléculaire des séquences de l'ITS 1, cette étude confirme le cycle de vie de *P. crucibulum* dans les pertuis Charentais. L'étude épidémiologique montre que les moules sont infestées avec une faible prévalence, malgré tout suffisante pour entraîner de fort taux d'infestation chez les juvéniles G0 de sole, deuxième hôte intermédiaire (cf Chapitre 3 et 5). Par ailleurs, l'étude au MEB complète la connaissance de la structure du tégument de *P. crucibulum* et *P. aculeatus* (Santos & Gibson, 2002). Les résultats de cette étude semblent exclure la présence de *P. squamatus* dans les pertuis Charentais. Les juvéniles de sole sont aussi deuxièmes hôtes intermédiaires de *Prosorhynchus* sp. A, une espèce potentiellement nouvelle ayant les mêmes caractéristiques morpho-anatomiques externes que *P. aculeatus* mais présentant une séquence de l'ITS1 différente. De manière générale, on observe que la taille des parasites augmente de stade en stade, depuis la cercaire à la métacercaire et à l'adulte. Ainsi, les parasites acquièrent de l'énergie au sein de chaque hôte successif, à savoir les juvéniles G0 de sole puis les congres pour leur propre développement.

Perspectives :

Afin de préciser le statut taxonomique existant entre les adultes *P. aculeatus* et les métacercaires *Proisorhynchus* sp. A, l'infestation expérimentale de congres avec des métacercaires de *Proisorhynchus* sp. A a été entreprise en décembre 2006. Des congres ont tout d'abord subi un traitement anti-helminthique au Praziquantel afin d'éliminer tous les parasites et plus particulièrement les Digènes présents. Ensuite, des juvéniles de sole G0 infestés par des métacercaires de *Proisorhynchus* sp. A ont été sacrifiés et administrés par intubation sous anesthésie à deux congres. A l'issue de cette expérience, une étude morpho-anatomique et moléculaire sur l'ITS 1 sera réalisée sur la forme adulte *Proisorhynchus* sp. A si elle est obtenue, afin de la comparer à la forme *P. aculeatus* et de déterminer s'il s'agit d'une nouvelle espèce ou non et si celle-ci est cryptique. En parallèle, l'analyse morpho-anatomique des métacercaires de *Proisorhynchus* sp. A sera faite au MEB et comparée à celle de *P. aculeatus*.

Chapitre III. Spatial variability in digenean metacercariae infection of 0-group common sole, *Solea solea*, among different nurseries along the French Atlantic coast

E. D. H. Durieux, M-L. Bégout and P. Sasal

Article publié en mai 2007 dans *Diseases of Aquatic Organisms* (Vol. 75, pp. 221-228)

Abstract

We examined 0-group sole juveniles (N=174), sampled in September-October 2003 in 9 major nurseries located along the French Atlantic coast (English Channel and Bay of Biscay). 0-group sole were infected by three identified genera of digenean metacercariae, *Timoniella* spp. (Acanthostomidae), *Proisorhynchus crucibulum* and *Proisorhynchus* sp. A (Bucephalidae), *Podocotyle* sp. (Opecoelidae), and by an unidentified Digenea species. Parasites infection levels in the English Channel nurseries were lower and displayed a different community compared to the Bay of Biscay nurseries. We hypothesize that this difference between the two geographic areas was due a different first intermediate host communities and to a lower extent to lower temperature in the English Channel compared to the Bay of Biscay nurseries. For the Bay of Biscay nurseries, mean total parasite abundance was strongly negatively correlated with mean annual river flow. This relationship may be the result of the more upstream location of 0-group sole nurseries in estuaries that allow fish to be further away from local points of parasite transmission than in embayed nurseries. Digenean metacercariae load may be influenced by three major local factors, *i.e.* abundance and proximity of the first intermediate hosts and cercariae dispersion capacities.

Keywords: Flatfish – Juveniles – Parasitism – Trematodes – Habitat quality – River flow

1. Introduction

Coastal areas, such as estuaries and shallow water bays, serve as nurseries for many juveniles of commercially important marine fishes, especially flatfishes (Gibson, 1994; Beck et al., 2001). In these essential habitats, highly variable environmental conditions influence growth and survival of juveniles and thus recruitment into the adult population (Gibson, 1994). Flatfish juveniles are relatively sedentary in nursery grounds and are thus especially affected by local conditions (Able et al., 1999). Habitat quality depends on a number of interdependent environmental and anthropogenic factors and may influence the fitness of the considered species (Gibson, 1994). Numerous factors have been taken into account to estimate flatfishes nursery quality (Beck et al., 2001; Yamashita et al., 2001), but few papers dealt with the potential effect of parasitism.

Parasites can affect the physiology and ecology of their hosts (growth, condition, survival, fecundity, behavior), and thus their fitness (Combes, 2001). They are a natural part of all ecosystems and can be considered as dominating regulators in food web links (Lafferty et al., 2006), giving parasitism a well recognized place as a factor that could impact coastal organisms (Thomas et al., 1997). In nursery grounds, 0-group flatfish juveniles are frequently infected by digenean metacercariae (Trematoda), for which they serve as second intermediate host. 0-group juveniles of common sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758), from the Pertuis Breton nursery ground of the French Atlantic coast are known to be infected by digenean metacercariae, including *Proisorhynchus* spp. (Bucephalidae) (Laffargue et al., 2004; Durieux et al., 2007b). Durieux et al. (2007b) suggested that heavy infections levels in addition to the low nutritional status of these fish could lower overwinter survival. Parasitism therefore appears as a factor that could potentially affect habitat quality of flatfish and of sole in particular.

In the Northeastern Atlantic region, sole has a constantly high commercial value and relatively high landings. Most sole stocks are reported to be over-exploited (ICES, 2005). Different nurseries contribute to recruitment within each single adult stock (Rijnsdorp et al., 1992; Le Pape et al., 2003b). Evaluation of habitat quality for juveniles in the different nurseries is thus essential for stocks management (Beck et al., 2001). For the Bay of Biscay stock, Le Pape et al. (2003b; 2003c) highlighted the difference between sole nurseries in terms of both quantity and quality based on growth performances of juveniles. Spatial

variation in parasitism is commonly observed in host populations, and therefore may add an additional differential impact that varies among sites (Thomas et al., 2005b).

In order to take into account parasitism in habitat quality of sole juveniles, the goal of the present study was to evaluate the spatial variability of the infection by digenean metacercariae of 0-group sole between different nurseries for two different stocks. Therefore, we analysed 0-group sole from 9 nursery grounds of the French Atlantic coast located in the English Channel and the Bay of Biscay, areas that correspond to two distinct sole stocks (ICES division VII d,e and VIII a,b, respectively). We compared this parasitic infection first, between the above mentioned two distinct stocks, and secondly, at within each single stock. As sampled nurseries comprised both embayed and estuarine nurseries, we tested the influence of river flow on the infection levels of 0-group sole by digenean metacercariae.

2. Material and methods

2.1. Fish sampling and parasite collection

0-group sole were sampled in September-October 2003 in 9 sites located along the French Atlantic coast (English Channel and Bay of Biscay) (Fig. 1), using a beam trawl (2.9 m wide and 0.5 m high, mounted with a 20 mm stretched mesh net in the codend) at depths between 5 and 20 m maximum, at 2.5 knots for 20 min, as part of a IFREMER sole juveniles survey. Fish were immediately frozen and individually stored at -20°C . A total sample of 174 were individually weighed (to 0.01 g, wet mass M_w) and measured (to 1 mm, standard length SL) (Table 1). The sole were thawed and their whole body (including all organs) dissected under binocular microscope to check for digenean metacercariae parasites, which were, after being mechanically excysted, identified under light microscope on the basis of their morphological features to the lowest taxonomical level possible and finally counted.

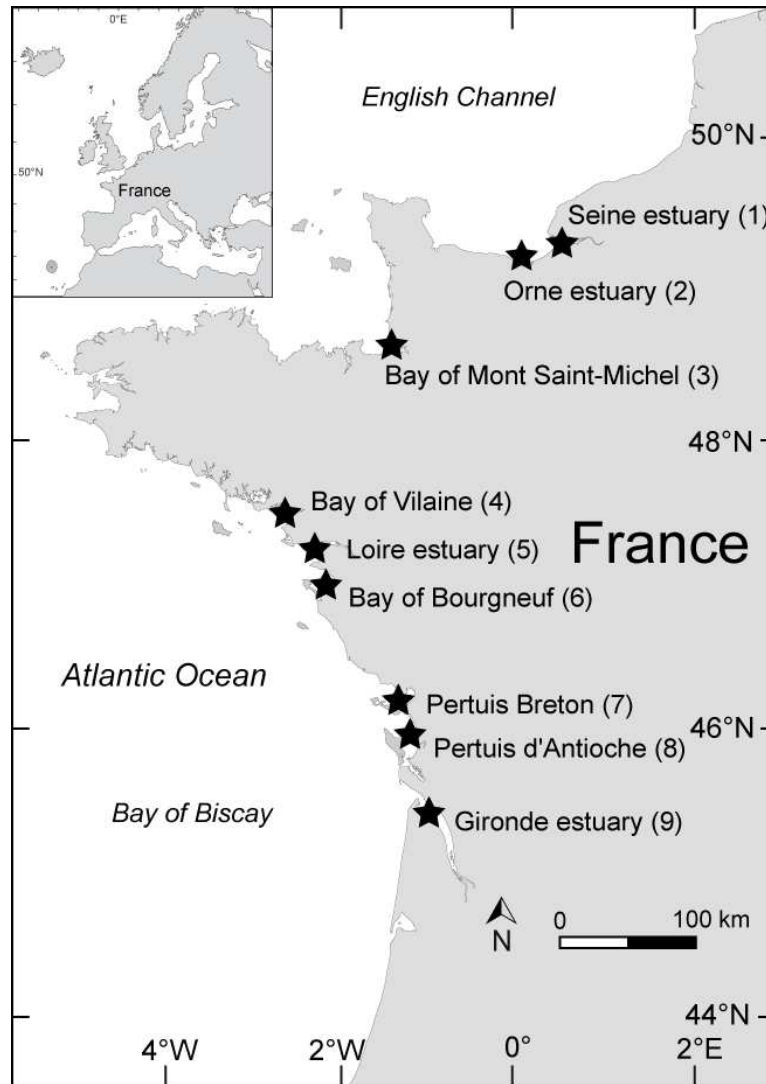


Figure 1. Location of the 9 nurseries sampled along the French Atlantic coast within both the English Channel and the Bay of Biscay

Table 1. Code, mean annual river flow ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) in 2003, sample size (N), mean standard length ($\text{SL} \pm \text{SD}$, in mm), mean mass ($M_w \pm \text{SD}$, in g) and mean Fulton's K condition factor ($K \pm \text{SD}$, in g cm^{-3}) for the 9 nurseries sampled along French Atlantic coast

Station	Code	River flow ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)	N	SL \pm SD (size range) (mm)	$M_w \pm \text{SD}$ (g)	$K \pm \text{SD}$ (g cm^{-3})
Seine estuary	1	500	15	92.9 ± 8.6 (58-109)	9.2 ± 2.6	1.14 ± 0.18
Orne estuary	2	18	15	90.7 ± 10.6 (58-105)	9.1 ± 3.3	1.18 ± 0.09
Bay of Mont-Saint-Michel	3	15	24	76.3 ± 12.9 (58-107)	5.9 ± 3.7	1.19 ± 0.10
Vilaine estuary	4	72	20	105.6 ± 12.0 (77-120)	13.2 ± 4.4	1.08 ± 0.09
Loire estuary	5	855	20	107.5 ± 11.8 (88-132)	14.5 ± 5.4	1.11 ± 0.08
Bay of Bourgneuf	6	5	21	109.1 ± 10.5 (90-129)	14.7 ± 4.7	1.10 ± 0.10
Pertuis Breton	7	10	10	105.4 ± 9.0 (91-118)	13.6 ± 3.7	1.15 ± 0.12
Pertuis d'Antioche	8	58	20	94.7 ± 6.6 (81-118)	9.3 ± 2.2	1.08 ± 0.08
Gironde estuary	9	1000	29	89.1 ± 8.5 (76-112)	8.1 ± 2.6	1.11 ± 0.06

2.2. Data analysis

The parasitological indices prevalence (the percentage of infected fish), mean abundance (the mean number of parasites per fish) and intensity (mean number of parasites per infected fish) were calculated in each sample according to Bush et al. (1997).

Values are given as mean \pm SE (standard error) for parasite mean abundance, mean (maximum) for parasite intensity and mean \pm SD (standard deviation) for SL. Fulton's condition index was calculated as $K = (M_W \times 100) / SL^3$, with M_W in g and SL in cm. Mean 2003 annual river flow data were obtained from the national hydrologic databank of the French Ministry of the Environment (www.hydro.eaufrance.fr) (Table 1).

Differences in parasites' abundance between areas were analysed using the non-parametric Kruskal Wallis test (KW) because individuals in macroparasite populations tend to be aggregated leading to non-normal distributions. Relationship between mean annual river flow and mean total parasites abundance (each parasite taxa and total) was analysed through the non-parametric Spearman rank order correlation (SC). Relationships between parasites abundance (each parasite taxa and total) and SL and K, respectively, were analysed through SC.

3. Results

Standard length (SL), wet mass (M_W) and Fulton's condition factor (K) were significantly different between the 9 sites (KW_{SL} , $Chi^2 = 91.82$, $p < 0.001$; KW_{M_W} , $Chi^2 = 75.38$, $p < 0.001$; KW_K , $Chi^2 = 23.74$, $p = 0.003$, with $N = 174$ and $df = 8$ for each test). Random sub-sampling could not be verified and thus differences in SL, M_W and K could not be taken as a direct reflection of the population parameters. However, the size range of fish overlapped substantially among the 9 samples (Table 1), which allowed us to compare parasite assemblages.

Five taxa of digenean metacercariae were identified: *Timoniella* spp. (two species) (Acanthostomidae), *Proisorhynchus crucibulum* and *Proisorhynchus* sp. A (Bucephalidae), *Podocotyle* sp. (Opecoelidae), and an unidentified taxa noted Digenea sp (Fig 2.).

Metacercariae were encysted in all 0-group sole body parts, especially in muscle tissue or just underneath the skin, but were not present in organs.

Timoniella spp. metacercariae are filiform and characterized by a oral sucker surrounded by big spines (Maillard, 1973; 1974) (Fig. 2A and 2B). The two species *T. imbutiforme* and *T. praeterita* are present in our study area and could be distinguished on counting the number of oral spines (18 and 22, respectively) on few specimens (Maillard, 1973; 1974). However due to their high abundance and the small size of these metacercariae, they were only identified at the genus level following El-Darsh & Whitfield (1999a) and Durieux et al. (2007b). *Proisorhynchus crucibulum* metacercariae are large (around 2 mm) characterized by a wide V shape rhynchus with the mouth located in midventral position (Matthews, 1973) (Fig. 2C). *Proisorhynchus* sp. A is smaller (around 1 mm), characterized by a small and round rhynchus with the mouth located midventrally in the posterior half of the body (Fig. 2D), which are all the typical morphological features of *Proisorhynchus aculeatus* (Jones, 1943; Matthews, 1973; Santos & Gibson, 2002).

However, based on current molecular data (Durieux, unpublished), we prefer to restrict the identification to *Proisorhynchus* sp. A. *Podocotyle* sp. metacercariae are characterized by a well developed ventral sucker (Koie, 1981) (Fig. 2E). Digenea sp. metacercariae presented no particular morphological features that would have enabled us to go deeper into the identification (Fig. 2F); all look the same and are believed to belong to a single species.

Voucher specimens have been deposited at Museum National d'Histoire Naturelle (Paris, France) for *Proisorhynchus crucibulum*, *Proisorhynchus* sp. A, *Timoniella* spp. and *Podocotyle* sp. under accession numbers: 531 HG, 532 HG, 533 HG and 534 HG, respectively. Due to storing problems, this couldn't be done for Digenea sp..

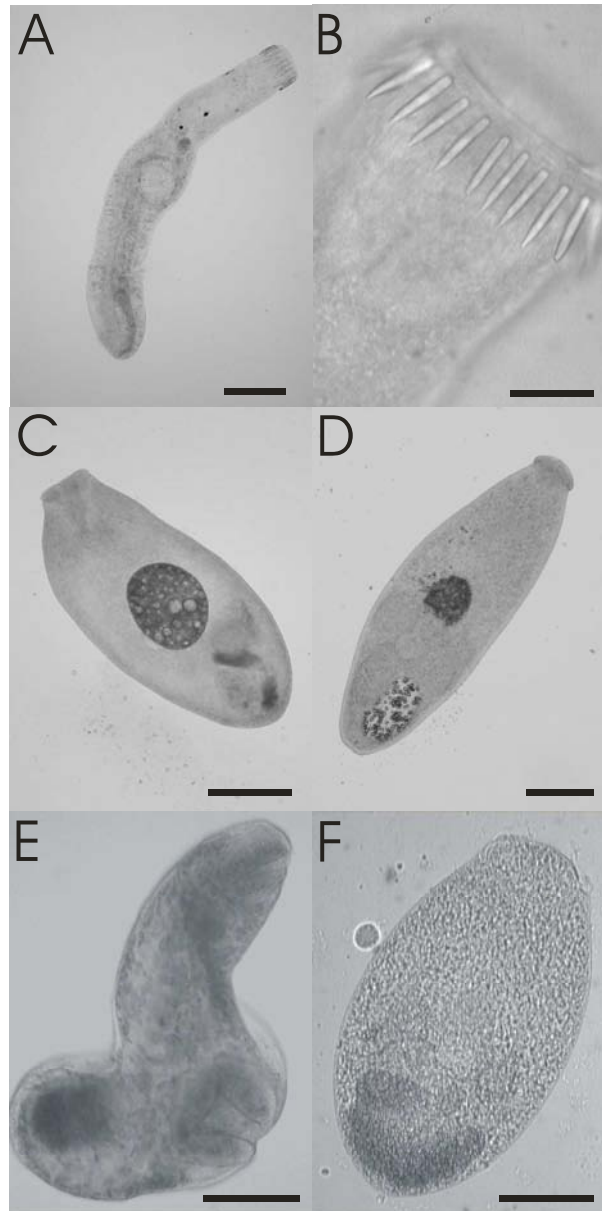


Figure 2. Microphotographs of the different taxa of digenean metacercariae found in 0-group sole juveniles: A: *Timoniella* spp., B: detail of the oral sucker surrounded with spines in *Timoniella* spp., C: *Proisorhynchus crucibulum*, D: *Proisorhynchus* sp. A, E: *Podocotyle* sp., F: Digenea sp. (unidentified metacercariae). Scale bars = 500 μ m (C), 200 μ m (A and D), 100 μ m (E and F), and 50 μ m (B).

Significant differences in parasites abundances were detected between the 9 sites for each parasite taxon and for total parasites abundance (Table 2) ($KW_{Timoniella\ spp.}$, $Chi^2 = 27.09$, $p = 0.001$; $KW_{Proisorhynchus\ crucibulum}$, $Chi^2 = 18.97$, $p = 0.015$; $KW_{Proisorhynchus\ sp.\ A}$, $Chi^2 = 33.30$, $p < 0.001$, $KW_{Podocotyle\ sp.}$, $Chi^2 = 16.86$, $p = 0.032$; $KW_{Digenea\ sp.}$, $Chi^2 = 95.63$, $p < 0.001$; KW_{total} , $Chi^2 = 44.77$, $p < 0.001$, with $N = 174$ and $df = 8$ for all tests). *Timoniella* spp. infection was highest for sites 4, 5, 6, 7 and 8, with prevalence between 33.3 - 65 % and mean abundance comprised between 10.25 ± 5.72 - 42.50 ± 35.92 . *Proisorhynchus crucibulum*

III. Spatial variability in metacercariae infection of sole

infection was also highest for stations 4, 5, 6, 7 and 8, but with much lower values, prevalences were between 20 - 30 % and mean abundances ranged from 0.30 ± 0.13 to 1.05 ± 0.32 . *Proserhynchus* sp. A was only found in stations 5, 7 and 8 with prevalence between 10 - 30 % and mean abundance 0.10 ± 0.07 and 1.05 ± 0.6 . *Podocotyle* sp. infection was highest for stations 3, 6, 7, and 8, with prevalence between 16.7 - 30 % and mean abundance between 1.67 ± 1.35 - 4.43 ± 2.73 . The unidentified metacercariae was only present in stations 1 and 2, with prevalence between 13.3 - 66.7 % and mean abundance between 0.20 ± 0.13 - 4.00 ± 1.08 .

Table 2. Prevalence (P (%)), mean abundance (Ab \pm standard error) and Intensity (I (max)) of the different taxa of digenean metacercariae infecting 0-group sole, *Solea solea*, in the 9 nurseries sampled along the French Atlantic coast

Code station	<i>Timoniella</i> spp.			<i>Prosorhynchus crucibulum</i>			<i>Prosorhynchus</i> sp. A			<i>Podocotyle</i> sp.			Digenea sp.		
	P%	Ab (\pm SE)	I (max)	P%	Ab (\pm SE)	I (max)	P%	Ab (\pm SE)	I (max)	P%	Ab (\pm SE)	I (max)	P%	Ab (\pm SE)	I (max)
1	-	-	-	13.3	0.13 \pm 0.09	1.0 (1)	-	-	-	-	-	-	13.3	0.20 \pm 0.13	1.5 (2)
2	40.0	1.40 \pm 0.62	3.5 (9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.7	4.00 \pm 1.08	6.0 (12)
3	29.2	0.42 \pm 0.16	1.4 (3)	4.2	0.04 \pm 0.04	1.0 (1)	-	-	-	16.7	1.67 \pm 1.35	10.0 (33)	-	-	-
4	45.0	24.80 \pm 8.25	55.1 (121)	20.0	0.30 \pm 0.14	1.5 (2)	-	-	-	5.0	0.05 \pm 0.04	1.0 (1)	-	-	-
5	35.0	10.25 \pm 5.72	29.3 (102)	35.0	0.75 \pm 0.44	2.1 (9)	10.0	0.10 \pm 0.07	1 (1)	10.0	0.10 \pm 0.07	1.0 (1)	-	-	-
6	33.3	29.62 \pm 17.06	88.9 (282)	28.6	0.57 \pm 0.26	2 (5)	-	-	-	23.8	4.43 \pm 2.73	18.6 (46)	-	-	-
7	40.0	42.50 \pm 35.92	106.3 (382)	20.0	0.50 \pm 0.32	2.5 (3)	10.0	0.30 \pm 0.28	3 (3)	20.0	2.10 \pm 1.33	10.5 (11)	-	-	-
8	65.0	22.80 \pm 10.08	35.1 (149)	30.0	1.00 \pm 0.47	3.3 (7)	30.0	1.05 \pm 0.60	3.5 (12)	30.0	3.00 \pm 2.41	10.0 (50)	-	-	-
9	10.3	3.24 \pm 2.41	31.3 (67)	3.4	0.07 \pm 0.07	2.0 (2)	-	-	-	3.4	4.52 \pm 4.44	131.0 (131)	-	-	-

We found a significant negative relationship between mean annual river flow and *Timoniella* spp. abundance (SC, N = 6, R = -0.886, p = 0.019). An even more significant negative relationship between mean annual river flow and mean total parasite abundance was detected for Bay of Biscay sites (SC, N = 6, R = -0.943, p = 0.005) but not for English Channel sites, partly due to the low sample size (SC, N = 3, R = -0.500, p > 0.05) (Fig. 3).

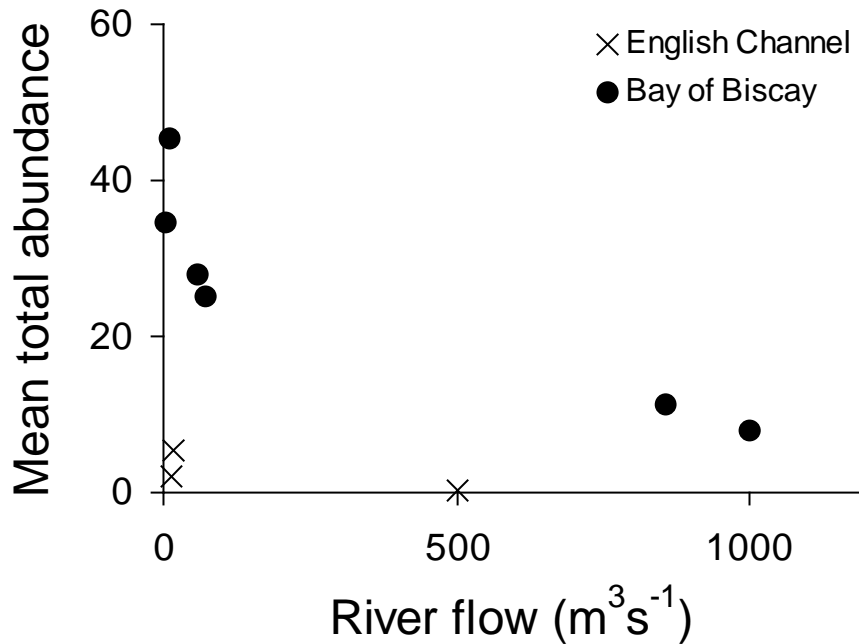


Figure 3. Relationship between mean total abundance of digenean metacercariae in 0-group sole, *Solea solea*, and mean annual river flow (m³ s⁻¹) in nursery grounds of the English Channel (N = 3) and the Bay of Biscay (N = 6) respectively.

We found significant positive correlations between *Timoniella* spp. and SL (SC, N = 20, R = 0.63, p = 0.003) only in site 5, and between SL and total parasite abundance in sites 5, 6 and 7 (SC₅, N = 20, R = 0.660, p = 0.002; SC₆, N = 21, R = 0.536, p = 0.012; SC₇, N = 10, R = 0.648, p = 0.043). No significant negative relationship was detected between parasite abundance and condition factor K at any site (SC, p > 0.05).

4. Discussion

In our study area, 0-group sole colonize bays and estuaries in spring (Amara et al., 2000). They remain in soft bottom shallow water areas until the onset of winter, when they leave to deeper waters (Dorel et al., 1991). In the present study, sampling occurred similarly

for all 9 studied sites, *i.e.* in relatively deep parts of the nurseries (between 5 and 20 m depth), in September-October, when infection is stabilized (Durieux et al., 2007b). Thus, at this time of the year and at this depth of sampling, the high inter-individual variability that we observed within each site may be due to the earlier dispersion of the 0-group sole individuals that have spent spring and summer accumulating metacercariae in different parts of nursery grounds. Although our generally small sample size per nursery area combined with the aggregated parasite distributions may have hide the spatial variability at the observed scale, clear trends in the infection of 0-group sole by digenean metacercariae could still be distinguished. Therefore, the sampling within each nursery ground is thought to reflect the diversity of the parasite community of each nursery, which allows the comparison of the parasitic infection at a wide spatial scale between nurseries and stock units.

0-group sole were infected by three identified genera of digenean metacercariae, *Timoniella* spp. (Acanthostomidae), *Proisorhynchus crucibulum* and *Proisorhynchus* sp. A (Bucephalidae), *Podocotyle* sp. (Opecoelidae) and by one unidentified species of Digenea. *Timoniella* spp. in the studied geographic area include both *T. imbutiforme* and *T. praeterita*, both species having exactly the same life cycle. The laver spire shell, *Hydrobia* spp. is first intermediate host. Second intermediate hosts are various small sized fishes, both benthic and pelagic, whereas the definitive host is the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Maillard, 1973; 1974). The first intermediate host of *Proisorhynchus crucibulum* is the blue mussel *Mytilus edulis*, the second intermediate host are various small benthic fishes, and the definitive host is the conger eel, *Conger conger* (Matthews, 1973). *Proisorhynchus* sp. A is apparently morphologically similar but not molecularly to *Proisorhynchus aculeatus* (Durieux, unpublished). The first intermediate host of this last parasite remains unknown to our knowledge, and the definitive host is also *Conger conger*. Although we could not identify *Podocotyle* sp. metacercariae to the species level, they were likely to be *Podocotyle atomon* because this species dominates in fishes living in the littoral zone (like 0-group sole) whereas *Podocotyle reflexa* mostly occurs in fishes which live into sublittoral zone (Koie, 1981). The first intermediate host of *Podocotyle atomon* is the periwinkle *Littorina* spp. (*L. littorea* and *L. saxatilis*), the second intermediate host could be various fishes but also crustaceans, and the definitive host belongs to different marine piscivorous fishes (Koie, 1981). The present study confirms 0-group common sole, *Solea solea*, among other small size coastal fishes, as the second intermediate host of *Timoniella* spp. and *Proisorhynchus crucibulum*, and constitutes, to our knowledge, the first report for *Podocotyle* sp..

Comparing infection of 0-group sole at large spatial scales between nurseries of the two different studied stock areas, the English Channel and the Bay of Biscay, we generally found different parasite communities and lower infection levels (prevalence and mean abundance) in the nurseries from the English Channel compared to those from the Bay of Biscay. Various large scale factors concerning both hosts and parasites may explain this latitudinal discrepancies between the two areas (Rohde, 2005). Sole population in the Northeastern Atlantic region being genetically homogeneous (Exadactylos et al., 2003; Rolland et al., 2007), the hypothesis of a differential host genetic resistance (Combes, 2001) could be rejected here. Mean sea surface water temperature is generally lower in the English Channel than in the Bay of Biscay (Maillard, 1986). As, increase in water temperature lead to increased cercarial production (Marcogliese, 2001; Poulin, 2006), this large scale factor may contribute to a lower accumulation of metacercariae in 0-group soles of the English Channel nurseries.

Marine coastal molluscs (*i.e.* first intermediate hosts) communities exhibit particularly high spatial heterogeneity at small scale (Blanchard & Bourget, 1999). Poulin & Mouritsen (2003) demonstrated that small-scale, local factors generally overrides that of larger-scale factors, rendering difficult the detection of large-scale patterns in species richness or prevalence of digenean infections in molluscs. In fact, first intermediate known hosts of the identified marine digeneans infecting 0-group sole are common inhabitants of the intertidal areas but have their own specific local distribution within nursery grounds. Large populations of *Hydrobia ulvae* inhabit the large mudflats located at the bottom of bays and at the mouth of the estuaries (Sauriau et al., 1989; Sola, 1996; Haubois et al., 2004). Large populations of mussel are cultivated in restricted zones on pole in soft bottom shallow areas of different small estuaries but especially bays, such as Mont Saint Michel Bay, Bay of Bourgneuf, the Pertuis Breton and Pertuis d'Antioche, in our study area (Gouletquer & Le Moine, 2002). Small *Littorina* spp. populations occur very patchily on rocky shores or man made hard substrata that are also found in soft bottom dominated shallow areas (Sauriau et al., 1989). In nursery grounds, due to the spatial heterogeneity of the first intermediate hosts, 0-group sole may be differentially exposed to digeneans depending on their distribution and movements within the nursery.

The most significant difference in parasite load between the two stock areas was for *Timoniella* spp., which was absent in the Seine estuary and was much less abundant in Orne

estuary and Mont Saint Michel than in all other nurseries of the Bay of Biscay, especially the embayed ones. Bocher et al. (2007) compared spatial patterns of different mudflat molluscs in Northwestern Europe in the same year of our study and within three of our sampling sites, they reported the scarcity of *Hydrobia ulvae* in the Mont Saint Michel Bay (2.5 ind m⁻²) compared to the very high densities reached in Aiguillon Bay and Marennes Oleron Bay (from 1,664 to 3,324 ind m⁻²), mudflats that are located in the Pertuis Breton and the Pertuis d'Antioche, respectively. Thus, *Hydrobia ulvae*, may largely contribute to abundance of the metacercariae of *Timoniella* spp. in 0-group sole juveniles, which is in accordance with the positive relationship established for different model organisms between abundance of first intermediate hosts and abundance of metazoan parasites in second aquatic intermediate hosts within the same site (Marcogliese *et al.*, 2001; Latham & Poulin, 2003; Thieltges & Karsten, 2007).

Infection levels of *Timoniella* spp. and especially *Proisorhynchus crucibulum* are much lower for all sites than previously reported for the Pertuis Breton in a site under direct influence of the first intermediate hosts (Durieux et al., 2007b). *Timoniella* spp. cercaria has a flagellum-like tail, which give it swimming and bearing capacities in the water column (Maillard, 1973; 1974) and thus the ability to infest hosts further away than the cercariae shedding area, especially when strong currents occur (Durieux et al., 2007b). Like all other Bucephalids, *Proisorhynchus crucibulum* cercaria has a tail with two long furcae, so that they lie on the bottom (Matthews, 1973) and have limited dispersion capacities (Durieux, unpublished data). Concerning, *Podocotyle* sp., the cercaria has a short tail, so that it crawl with the aid of their two suckers on the substratum (Koie, 1981). Thus, the proximity of the first intermediate hosts and dispersion capacities of the cercariae may be the other major local factors driving metacercariae load in 0-group sole.

In the Bay of Biscay nurseries, we found a strong significant relationship between mean river flow and mean total parasite abundance. River flow intensity is one of the main factors driving colonisation of nurseries by 0-group sole (Amara et al., 2000; Le Pape et al., 2003c). In estuaries, 0-group sole tend to concentrate and settle upstream in brackish waters (Coggan & Dando, 1988; Dorel *et al.*, 1991; Cabral, 2000), whereas in embayed areas with low freshwater input, they cannot undertake such migration and remain in marine waters (Rogers, 1992; Le Pape et al., 2003b). In other words, with increasing river flow, 0-group sole nurseries are located more upstream and in less saline waters. In parallel, first intermediate

host populations of the marine digeneans are located in bays or at the mouth of the estuaries and their abundance decreases steadily moving upstream with decreasing salinity. In addition, production and / or infectivity of these marine parasite cercariae may decrease with decreasing salinity as already shown for other marine digeneans (Pietroock & Marcogliese, 2003). Therefore, within nurseries, river flow by controlling settlement zones of 0-group sole may also control their distance to the most infective zone, and thus their parasite load, as already suggested for 0-group juvenile European flounder, *Platichthys flesus* in the Tames estuary (El-Darsh & Whitfield, 1999a).

In conclusion, this study highlights the spatial variability in the infection of 0-group sole by digenean metacercariae between nurseries at different spatial scales. Between the two different stock-systems, the English Channel and the Bay of Biscay, differences in parasites abundance and community, was thought to be due essentially to the local differential distribution of molluscan first intermediate hosts, and to a lower extent due to temperature. At the scale of a single stock and comparing between nurseries, the most relevant factor influencing parasitism of 0-group sole appeared to be river flow, which acts by controlling the distance to the most infective area. Digenean metacercariae load in 0-group sole may be influenced by three major local factors, *i.e.* abundance and proximity of the first intermediate hosts and cercariae dispersion capacities. In terms of sole juveniles parasitism, special attention should be paid to embayed nurseries at small spatial scale with regard to both natural and cultivated first intermediate host populations. Spatio-temporal variability of the infection within nurseries, and the impact of parasitism on sole performances (growth, immunity and behaviour) is the purpose of other current work in order to accurately define the influence of parasitism on habitat quality. Studies on the relative contribution of different environmental factors (*e.g.* temperature, salinity, oxygen, water current and pollutants) to infection levels in sole nurseries remain to be conducted in the future.

Acknowledgements

Ph.D. grant attributed to E.D.H. Durieux was funded by IFREMER and the Conseil Régional Poitou Charentes. We thank Y. Désaunay and O. Le Pape for providing sole samples from IFREMER survey of the different nurseries. We are grateful to Y. Descatoires for drawing Figure 1. We thank C. Arnaud for help in parasite collection. We would like to thank Michael Blouin from Oregon State University, the three anonymous reviewers and David J. Marcogliese for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

Chapitre IV. Temporal changes in lipid condition and parasitic infection by digenean metacercariae of young-of-year common sole *Solea solea* (L.) in an Atlantic nursery ground (Bay of Biscay, France)

E. D. H. Durieux, R. Galois, M-L. Bégout, P. Sasal and F. Lagardère

Article publié en février 2007 dans *Journal of Sea Research* (Vol. 57, pp. 162-170)

Abstract

Little attention has been paid to flatfish parasitism as a potential factor of variation in year-class strength. The aim of this study was to evaluate the relationship between parasitic infection and nutritional condition of young-of-year (YOY) common sole. Sole were collected monthly from May (early settlement) to November 2004 in a mussel pole culture area, using a push-net or a trawl, and dissected for parasite identification and counts. Total lipids were extracted from the whole body and lipid classes quantified. Triacylglycerols to sterols (free form) ratio (TAG / ST) was used as an index of nutritional status. Digenean metacercariae infection, characterized by two dominant genera, displayed clear seasonal dynamics and the highest records yet reported for sole. Prevalence (P%) and mean abundance (Ab \pm SE) increased for *Timoniella* spp. (Acanthostomidae) from May (P% = 22%; Ab = 1.9 \pm 1.1) to August (P% = 100%; Ab = 51.2 \pm 10.4), and for *Proisorhynchus* spp.¹ (Bucephalidae) from June (P% = 8%; Ab = 0.1 \pm 0.0) to August (P% = 100%; Ab = 19.5 \pm 1.7). Epidemiological values reached a plateau after August. In this shellfish-dominated nursery area, YOY sole accumulated metacercariae in the presence of the first intermediate hosts which live in the same habitat. Total lipids decreased significantly from May to June and then remained constant until autumn, indicating a change in the proximate composition of YOY during this high growth period. Mean (\pm SD) TAG / ST ratio increased from very low values in May-July (0.10 on average) to a peak in September (0.57 \pm 0.31) and then fell back to values as low as before. YOY sole only stored energy as TAG prior to autumn. No relationship was found between YOY parasitic infection levels and lipid condition indices. However, the poor nutritional status and heavy infection level observed in November could dramatically lower over-winter survival of the YOY remaining in this shallow part of the nursery.

Keywords: Sole; YOY; Lipid condition; Parasitism; Metacercariae; Nursery

¹ Lors de la rédaction de cet article, l'identification était réduite à *Proisorhynchus* spp. car les différentes espèces de métacercaires de *Proisorhynchus* n'avaient pas encore été distinguées. Cependant, grâce aux résultats obtenus par la suite (Chapitre 1), nous pouvons rétrospectivement dire que, pour l'échantillon total (N = 338) il s'agissait d'une majorité de *P. crucibulum*, et, pour l'échantillon analyse de la condition morphométrique et biochimique (N = 121) uniquement *P. crucibulum* avait été pris en compte.

1. Introduction

Coastal areas, such as estuaries and shallow water bays, serve as nurseries for juveniles of many marine fish species and especially flatfishes. Growth and survival of juvenile flatfish in these essential habitats is generally good, due to abundant food, low predation risks and higher temperatures than in offshore areas (Bergman *et al.*, 1988; Gibson, 1994). Nevertheless, nursery grounds are subject to highly variable environmental and anthropogenic factors (Yamashita *et al.*, 2001). Conditions encountered by juveniles in coastal nurseries are therefore thought to greatly influence their growth and survival, via physiological mechanisms, and thus influence recruitment in the adult population (Gibson, 1994; van der Veer *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 2001). Fundamental factors – such as temperature, oxygen, salinity, food availability, density, predation, river plume extension and pollutants – are known to affect growth, condition and survival, and are therefore taken into account when estimating nursery quality (Gibson, 1994; van der Veer *et al.*, 1994; Nash & Geffen, 2000; van der Veer *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2001; Le Pape *et al.*, 2003a).

Parasites have been shown to be able to regulate host populations (Anderson & May, 1978; May & Anderson, 1978). They can affect both physiology and ecology of their hosts (growth, condition, survival, fecundity, behaviour) and thus their fitness (Combes, 2001). However, despite the importance of parasitism in ecology, this factor is rarely taken into account in fish ecology and even less in flatfish ecology. Like other small fishes, young flatfishes are subjected to parasitism in nursery grounds, especially from digenean trematodes for which they can act as second intermediate hosts. Digeneans have a complex life cycle, which in marine environment follows the general scheme of having molluscs as first intermediate hosts, small fishes as second intermediate hosts and piscivorous fishes as definitive hosts (Cribb *et al.*, 2001). Cercariae actively penetrate the skin of their second intermediate host and encyst as metacercariae in the body. Transmission to the definitive host then occurs through predation. Metacercariae, like all parasitic stages, are metabolically dependent on their host and use some of their host's energy for their own development and maintenance. Although studies on the effects of digenean metacercariae on fish are scarce, some have shown a clearly negative impact of these parasites on growth, condition and survival of freshwater fishes (Lemly & Esch, 1984; Coleman & Travis, 1998; Johnson & Dick, 2001; Collyer & Stockwell, 2004). Parasitism is thus a factor that could potentially influence habitat quality of juvenile flatfishes.

Common sole is a commercially important and widely distributed flatfish of the North-East Atlantic. Parasitic infection of juvenile sole by *Proserhynchus* spp. (Digenea, Bucephalidae) metacercariae has recently been reported in the Pertuis Charentais (Laffargue et al., 2004). This area represents an important nursery ground for the common sole stock of the Bay of Biscay, both in terms of density and potential surface area (Le Pape et al., 2003b). However, Le Pape et al. (2003c) also showed that juveniles in this nursery ground had a lower mean size during winter, which indicates the poor quality of the area.

Changes in nutritional status and growth of juveniles may reflect their probability of survival in the nursery grounds. Lipid depletion has been identified as a general metabolic response to stress and potentially a response to parasites also (Lemly & Esch, 1984; Lemly, 1997). Total lipid content of a fish is an easy estimation of its physiological condition, but fractionation into individual lipid classes provides a more sensitive measurement of metabolically available lipids and energy allocation (Norton et al., 2001). Lipid class composition has therefore been used to measure the nutritional status of fish at early life stages (Fraser, 1989; Håkanson, 1989; Lochmann et al., 1995; Norton et al., 2001). A nutritional index based on the ratio between quantities of triacylglycerols (TAG: lipid reserves) and free sterols (ST: structural lipids) (TAG / ST) has been used to investigate the nutritional status of sole larvae (Galois *et al.*, 1990; Amara *et al.*, 2000; Amara & Galois, 2004).

In this study, we used both morphometric (Fulton's K) and biochemical condition indices (total lipid content and TAG / ST) to investigate the effect of parasitism on young-of-year (YOY) sole condition in the Pertuis Charentais. Our aims were to simultaneously analyze changes in infection by digenean metacercariae and the condition of YOY sole from the early settlement period until the onset of winter in the nursery.

2. Materials and methods

2.1. Field sampling

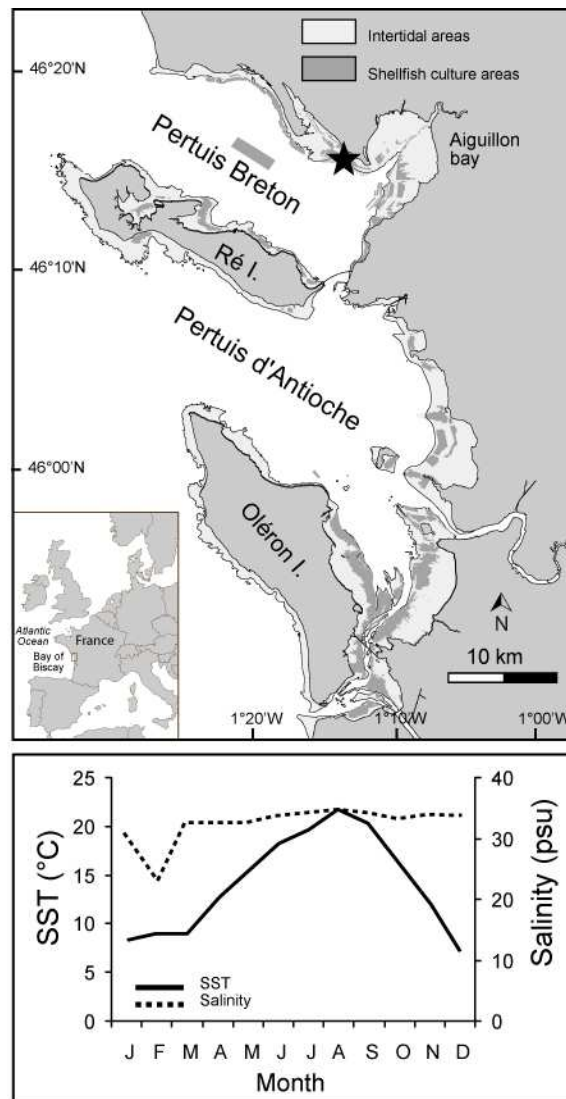


Figure. 1. The Pertuis Charentais area (Bay of Biscay, France, Atlantic Ocean) with the location of the sampling site (black star) for YOY sole, *Solea solea*, and seasonal variation of mean sea surface temperature (°C) (solid line) and salinity (psu) (dotted line) during the sampling year (2004)

YOY sole were sampled monthly from May to November 2004 (except October) at one site (46° 15' 80"N, 1° 13' 40"W) located in a mussel pole culture area in the Pertuis Breton, Bay of Biscay (Fig. 1). Fishing was done at low tide during spring tides. From May to July a push-net (1 m wide mounted with a 5 mm stretched mesh net) was used in the intertidal area. From August to November, a standard beam trawl (2 m wide and 0.40 m high, mounted with a 5 mm stretched mesh net in the cod end) was used at around 2 m depth and at 2.5 knots for 15 min. Sea surface temperature and salinity were recorded several times each day over the whole sampling period, using an automatic recorder situated close to the sampling site. These data were used to calculate mean monthly temperature and salinity (Fig. 1). Average water temperature increased from May (15.3°C) to a maximum of 21.7°C in August, then

decreased to 12.1°C in November and to 7.3°C in winter. Average salinity ranged between 32.5 and 34.5 psu during the sampling period.

The sole were brought to the laboratory alive in an aerated tank with a sandy bottom, in order to reduce capture stress. Fish for lipid analyses were immediately frozen and individually stored at -80°C. Other fish, sampled to enlarge the dataset for parasite analysis, were kept at -20°C.

2.2. Laboratory analysis

A total sample of 338 fish (Table 1) were individually weighed (to 0.01 g, wet mass M_W) and measured (to 1 mm, standard length SL) without correction for shrinkage during preservation. The sole were thawed and dissected to check for digenean metacercariae parasites, which were identified on the basis of morphological features (Matthews, 1973; Maillard, 1974) and then counted.

Table 1. Date of capture, sample size (N) and standard length (SL) range (mm) for the total sample (individuals on which parasite analysis was carried out) and the subsample (individuals on which lipid composition analysis was carried out after parasite analysis).

Month	Date of capture	Total sample		Subsample	
		N	SL range (mm)	N	SL range (mm)
May	04/05/04	54	13 - 38	15	13 - 25
June	01/06/04	86	20 - 60	34	20 - 54
July	01/07/04	54	29 - 75	20	29 - 75
August	05/08/04	34	54 - 75	14	54 - 71
September	16/09/04	77	62 - 89	20	62 - 87
November	18/11/04	33	59 - 119	18	59 - 119
		Total = 338		Total = 121	

Lipid analysis was done individually on a subsample of 121 fish (Table 1) after the dissection for parasites was completed. The digestive tracts of fish were first emptied so as to eliminate any lipids other than those from the fish. The extraction procedure followed those of Folch et al. (1957) and Häkanson (1989). Individuals were lyophilized, dry weighed (M_D) to the nearest mg, then ground until a thin homogeneous powder was obtained. Approximately 100 mg of this powder was extracted twice with a mixture of chloroform:methanol (1:2 then 2:1, v/v). A volume of 1% NaCl solution was then added and the mixture separated into 2 phases. The lower phase containing the lipids was then collected. An aliquot of this extract was evaporated under a nitrogen flux and re-dissolved in a volume of chloroform : methanol

(9:1, v/v) calculated to obtain a concentration of approx. $20 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, the optimal value for measuring total lipids (TL) using a Chromarods SIII - Iatroscan TH-10 system (TLC-FID). $1 \mu\text{L}$ of each concentrated aliquot was deposited four times onto a Chromarod, which was dried and directly read by the Iatroscan without any development. Lipid classes (LC) were separated from a single deposit onto a Chromarod, followed by a development in a mixture of hexane, diethylether and formic acid (85:15:0.05, v/v) for 30 min. Separated LC were then quantified by the Iatroscan using calibration curves obtained from pure lipid standards (Sigma) (Parrish & Ackman, 1985).

Levels of parasitic infection were assessed using classic epidemiological parameters: prevalence (P%), the percentage of infected fish in fish sample; and mean abundance (Ab), the mean number of parasites per fish, as recommended by Bush et al. (1997). Fulton's condition index was calculated as $K = (M_W \times 100) / SL^3$, with M_W in g and SL in cm. Average growth rate was calculated as $AGR = (\text{mean } SL_{t2} - \text{mean } SL_{t1}) / (t2 - t1)$. Percentage TL in the M_D and the triacylglycerols to free sterols ratio (TAG / ST) were also calculated as condition indices. The main lipid classes (phospholipids, free sterols, triacylglycerols, free fatty acids, hydrocarbons) were expressed as percentage of M_D (% M_D) and percentage of TL (%TL).

2.3. Data analysis

Results were considered significant at $\alpha = 5\%$. Values are given as the mean \pm SE (standard error) for parasite Ab, and mean \pm SD (standard deviation) for SL, K, TL and TAG / ST. In order to investigate temporal changes in Ab, SL, K, TL and TAG / ST, differences between two consecutive sampled months were analyzed using non-parametric Mann Whitney U tests (MW).

Parasite abundances were log transformed ($\log + 1$ for number of parasites) to normalize the data for the correlation analyses. Relationships of SL and both condition indices (TL and TAG / ST) with parasite abundances were first tested within each sampled month using Pearson correlations. For variables demonstrating significant correlations with SL within a sampled month, residuals of the linear regression between the variable (dependent variable) and SL (independent variable) for this sampled month were used to study the correlations in order to avoid a confounding effect of fish size. Finally the relationships between the lipid indices (TL and TAG / ST) and K, and between parasite abundances and the different condition indices, were analyzed within each sampled month using Pearson correlation.

3. Results

3.1. Parasitic infection

YOY sole were infected by two genera of digenean metacercariae: *Timoniella* spp. (Acanthostomidae) and *Proisorhynchus* spp. (Bucephalidae). Due to the high abundance of *Timoniella* spp. metacercariae and their small size, these were only identified at the genus level through the cyst. A dozen individuals were taken as a subsample, removed from their cysts and identified under a microscope. These belonged to the species *T. praeterita*, based on the number of spines on the oral sucker and the anatomy of the digestive caeca (Maillard, 1974). For *Proisorhynchus* spp., because species identification is often unfeasible from adult morphological features, metacercariae were determined at the genus level only. However, when species identification was possible, a majority of the metacercariae appeared to be *P. crucibulum*.

Timoniella spp. infection started first, with prevalence and mean abundance increasing significantly from May (P% = 22%; Ab = 1.9 ± 1.1 ; min - max: 0 - 57) to reach P% = 100% and Ab = 51.2 ± 10.4 (7 - 337) in August (MW_{May - June}, $U_{54, 86} = 778$, $P < 0.001$; MW_{June - July}, $U_{86, 54} = 1530$, $P = 0.001$; MW_{July - August}, $U_{54, 35} = 489$, $P < 0.001$). Although there was no further significant change in mean abundance of *Timoniella* spp., the final sample taken in November had the highest values (Ab = 54.6 ± 15.6 , 0 - 471) (MW_{August - September}, MW_{September - November}, $P > 0.05$ for all comparisons) (Fig. 2).

Proisorhynchus spp. infection appeared to start later, with prevalence and mean abundance both increasing significantly from June (P% = 8%; Ab = 0.1 ± 0.0 ; 0 - 2) to August (P% = 100%; Ab = 19.5 ± 1.7 ; 3 - 42) (MW_{June - July}, $U_{86, 54} = 675.5$, $P < 0.001$; MW_{July - August}, $U_{54, 35} = 155.5$, $P < 0.001$), mean abundance then stabilized until November, which showed the highest abundance values (Ab = 24.8 ± 3.8 , 0 - 87) (MW_{August - September}, MW_{September - November}, $P > 0.05$ for all comparisons).

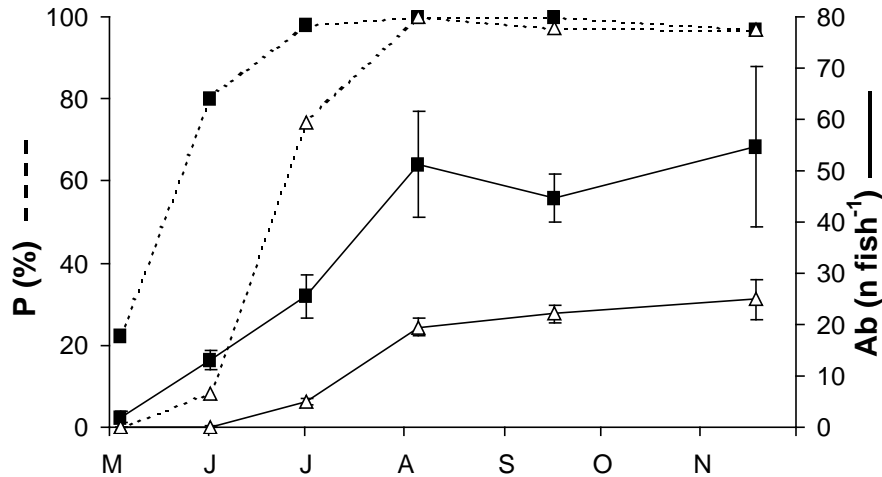


Figure. 2. Temporal changes in prevalence (dotted line) and mean abundance (solid line) of *Timoniella* spp. (black squares) and *Prosorhynchus* spp. (white triangles) in YOY sole, *Solea solea*, from the Pertuis Breton (N = 338). Error bars are standard errors

3.2. Growth, condition and effect of parasitic infection

Fulton's K condition index showed weak monthly variations of around 1 on average, with the maximum monthly mean at 1.10 ± 0.13 ($0.90 - 1.48$) g cm^{-3} in May and the minimum, 0.98 ± 0.08 ($0.90 - 1.10$) g cm^{-3} in August (Fig. 3). A significant difference between consecutive sampled months only appeared between August and September (MW, $U_{14, 20} = 79$, $P = 0.033$). YOY growth curve, based on mean SL between sampled months, revealed a significant size increase from May (19.07 ± 2.97 mm) to November (85.22 ± 13.53 mm) (MW_{May - June}, $U_{15, 34} = 6$, $P < 0.001$; MW_{June - July}, $U_{34, 20} = 145.5$, $P < 0.001$; MW_{July - August}, $U_{20, 14} = 25.5$, $P < 0.001$; MW_{August - September}, $U_{14, 20} = 6$, $P < 0.001$; MW_{September - November}, $U_{20, 18} = 91.5$, $P = 0.01$) (Fig. 3). Average growth rate (AGR) was highest in late spring: 0.69 mm d^{-1} between May and June. It remained between 0.31 and 0.41 mm d^{-1} during summer and declined from early autumn onwards, to 0.14 mm d^{-1} between September and November.

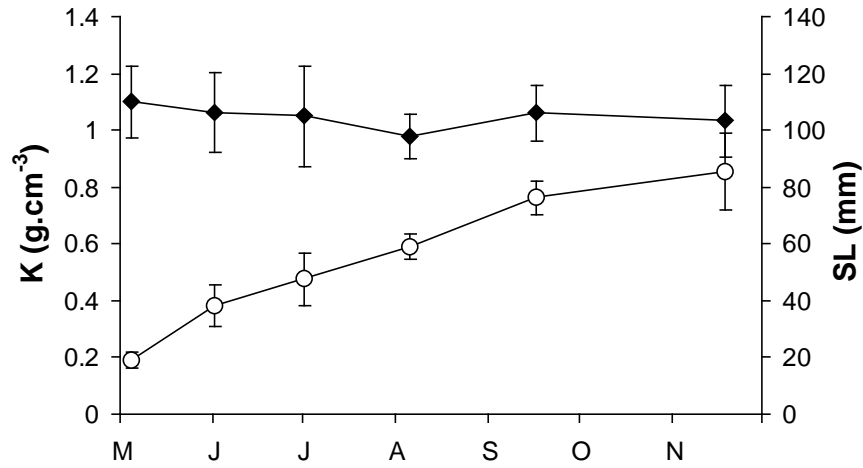


Figure. 3. Temporal changes of mean standard length (SL) (mm) (white circles) and mean Fulton's K condition factor ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) (black diamonds) of YOY sole, *Solea solea*, from the Pertuis Breton (N = 121). Error bars are standard deviations

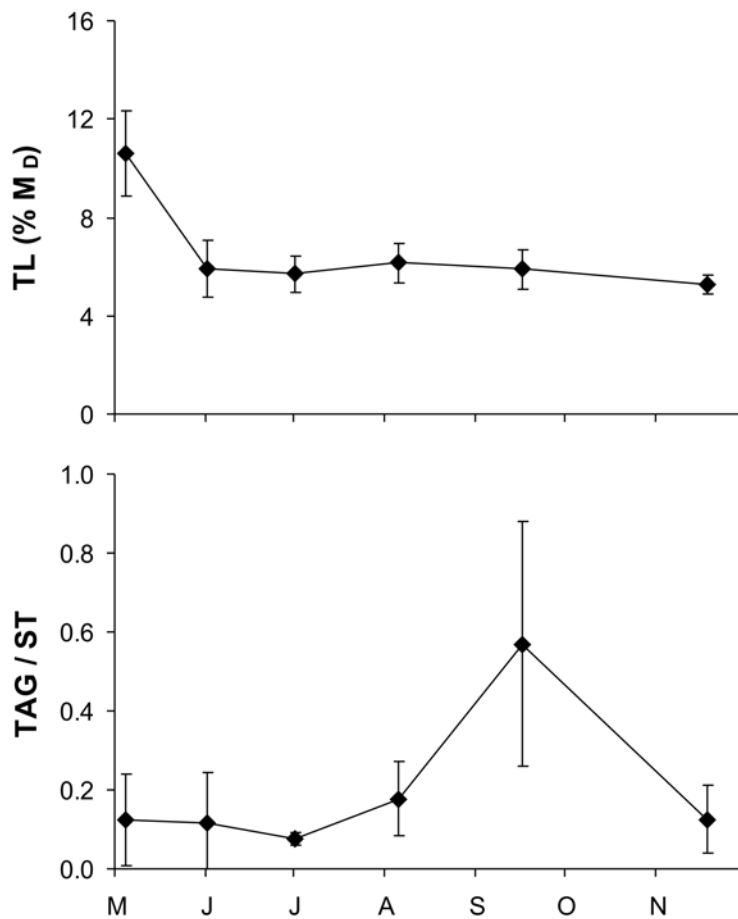


Figure. 4. Temporal changes in total lipids (TL) (% of dry mass M_D) (a) and triacylglycerols / sterols ratio (TAG / ST) (b) in YOY sole, *Solea solea*, from the Pertuis Breton (N = 121). Error bars are standard deviations

IV. Temporal changes in lipid condition and metacercariae infection of sole

Total lipids (%M_D) decreased steadily following the early settlement period, from May (12.62 ± 1.75%) to June (5.93 ± 1.15%) (MW, U_{15, 34} = 504, P < 0.001) (Fig. 4). It then reached a plateau with 5.69 ± 0.73% in July and 5.89 ± 0.79% in September (MW_{June – July}, MW_{July – August}, MW_{August – September}, P > 0.05 for both comparisons), and decreased slightly but significantly to 5.29 ± 0.40 in November (MW, U_{20, 18} = 266, P = 0.012).

All lipid classes (%M_D) decreased by approximately the same proportion (about half), from May to June. However, the proportion of TL that they represented (%TL) remained constant during this time. TAG increased in both %M_D and %TL from August onwards, with maximum values in September and a return to former values in November (Table 2).

Table 2. Temporal changes in the main lipid classes (PL: phospholipids; ST: free sterols; TAG: triacylglycerols; FFA: free fatty acids; HC: hydrocarbons) of total lipids from YOY sole, *Solea solea*, as percentages of dry mass (%M_D) and of total lipids (%TL) (± standard deviation).

	Month	PL	ST	TAG	FFA	HC
% M _D	May	8.25 ± 1.32	1.55 ± 0.33	0.20 ± 0.18	0.40 ± 0.10	0.16 ± 0.04
	June	4.66 ± 0.93	0.83 ± 0.14	0.10 ± 0.13	0.21 ± 0.04	0.09 ± 0.04
	July	4.49 ± 0.58	0.82 ± 0.12	0.06 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.08 ± 0.02
	August	4.74 ± 0.58	0.82 ± 0.14	0.16 ± 0.09	0.21 ± 0.04	0.09 ± 0.03
	September	4.45 ± 0.72	0.73 ± 0.11	0.40 ± 0.21	0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.02
	November	4.23 ± 0.32	0.69 ± 0.06	0.09 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.02
	% TL	May	77.81 ± 2.84	14.62 ± 2.17	1.72 ± 1.37	3.71 ± 0.69
June		78.59 ± 2.73	14.17 ± 1.58	1.58 ± 1.75	3.55 ± 0.49	1.47 ± 0.52
July		78.97 ± 1.70	14.33 ± 1.17	1.08 ± 0.27	3.62 ± 0.44	1.34 ± 0.23
August		78.46 ± 2.15	13.55 ± 1.23	2.45 ± 1.25	3.41 ± 0.48	1.48 ± 0.30
September		75.42 ± 4.11	12.42 ± 0.99	7.03 ± 3.74	3.14 ± 0.36	1.34 ± 0.31
November		80.09 ± 1.40	13.03 ± 0.93	1.60 ± 1.04	3.29 ± 0.37	1.35 ± 0.34

TAG / ST did not vary significantly from May (0.12 ± 0.12; 0.05 – 0.41) to July (0.08 ± 0.02; 0.06 – 0.12) (MW_{May - June}, MW_{June - July}, P > 0.05 for both comparisons) (Fig. 4). However, significant variations were observed between the following months (MW_{July – August}, U_{20, 14} = 24, P < 0.001; MW_{August – September}, U_{14, 20} = 24, P < 0.001; MW_{September – November}, U_{20, 18} = 342, P < 0.001). A steady increase in TAG / ST started from August (0.18 ± 0.09; range: 0.07 – 0.65), reaching a maximum in September (0.57 ± 0.31; 0.16 – 1.22), and followed by a return to the former condition level in November (0.13 ± 0.09; 0.06 – 0.37).

TAG / ST and SL were positively correlated in May (n = 15, R = 0.582, P = 0.023) and negatively in August (n = 14, R = -0.601, P = 0.023). *Timoniella* spp. abundance and SL showed positive correlations in June (n = 34, R = 0.385, P = 0.025) and July (n = 20, R = 0.578, P = 0.008). *Proisorhynchus* spp. abundance and SL were negatively correlated in September (n = 20, R = -0.461, P = 0.041). There were positive correlations between total

abundance and SL in July ($n = 20$, $R = 0.543$, $P = 0.013$) and November ($n = 18$, $R = 0.580$, $P = 0.012$).

No significant correlations were detected between K and TL or TAG / ST for any sampled month ($P > 0.05$ for all correlations). A significant negative correlation was detected between K and *Proisorhynchus* spp. abundance in November only ($n = 18$, $R = -0.552$, $P = 0.018$). No other effects of the parasites on host condition were detected through correlation analyses ($P > 0.05$ for all other correlations).

4. Discussion

In the Bay of Biscay, sole life cycle involves a planktonic larval period lasting around one month, followed by a complex metamorphosis requiring another ten days on average (Amara et al., 2000). When early settling fish colonize coastal nurseries from April to June, they are presumed to experience high stress and mortality. Furthermore, stressors encountered by YOY during the first growth period may influence their over-winter survival. However, the phase from settlement to the first winter remains poorly documented in this geographic area.

4.1. Seasonal infection dynamics

This paper shows that YOY sole in the Pertuis Breton nursery ground are heavily infected by digenean metacercariae belonging to two genera: *Timoniella* (Acanthostomidae) and *Proisorhynchus* (Bucephalidae). For *Timoniella* spp., the mudflat gastropod *Hydrobia* spp. is the first intermediate host and the sea bass *Dicentrarchus labrax* the main definitive host (Maillard, 1974). Based on a subsample of *Timoniella* spp., it appears that *T. praeterita* could be the species found in YOY sole. These data corroborate Deblock's (1978) inventory of the cercariae of *Hydrobia* spp. along the French coasts, where only that species was reported in the Pertuis Charentais area. Referring to El-Darsh and Whitfield (1999a), our study is therefore the first report of the common sole, *Solea solea*, as a second intermediate host of *T. praeterita*. The present work also confirms the previous report of infection by *Proisorhynchus* spp. metacercariae in YOY sole in the Pertuis Breton (Laffargue et al., 2004) and specifies that a majority of the metacercariae appeared to be *P. crucibulum*. The first intermediate host

for *Proisorhynchus* spp. is known to be the blue mussel *Mytilus edulis* and the main definitive host is the conger eel, *Conger conger* (Matthews, 1973).

YOY sole infection was characterized by a clear seasonal pattern. *Timoniella* spp. infection increased from May to reach a plateau from August until November with 100% prevalence and a mean abundance of 50 parasites per fish. We hypothesize that both water conditions and first intermediate host availability may explain our findings. Even if *Hydrobia* spp. were not found in the site where fish were sampled, a large population of *Hydrobia ulvae* is present on the mudflats of the Aiguillon Bay (Degré pers. comm., 2005), close to our sampling site and subject to strong tidal streams. *Timoniella* spp. cercariae have flagellum-like tails, which gives them a high swimming capacity in the water column (Maillard, 1974; El-Darsh & Whitfield, 1999a) and thus the ability to infest hosts further away than the cercariae shedding area, especially when strong currents occur. Finally, compared to our results, a lower infection level was found for *Platichthys flesus* juveniles of the tidal Thames with a prevalence of around 20% and mean abundance around 2 (El-Darsh and Whitfield, 1999). This was assumed to be a result of their migration along the estuary to less saline waters where the first intermediate host, *Hydrobia* spp., was less abundant or absent. Such up-river migrations are not possible for YOY sole in our study area.

Proisorhynchus spp. infection started one month later (June) than *Timoniella* spp. infection and 100% of YOY sole were infected in August, with more than 20 parasites per fish. Thereafter, infection intensity stabilized until November. This result agrees with the timing of infection reported by Coustau et al. (1990): sporocysts release well-developed cercariae from mussels in June and July. However, Laffargue et al. (2004) recorded much lower infection levels in YOY sole in the same nursery. Based on 65% prevalence and mean abundance of around 3 and 8 parasites per fish sampled in August and December respectively, but at a different site in each case, they concluded that there was an autumnal change. Rather than an inter-annual variability in infection, we propose a spatial explanation of the differences with our own study. *Proisorhynchus* spp. cercariae have low swimming ability, lie on the bottom or close to it and mostly infest benthic fishes as second intermediate hosts (Matthews, 1973). Thus, the proximity of the first intermediate host, *i.e.* a mussel pole culture area, should be the major factor explaining the higher infection in our study, whereas Laffargue et al. (2004) sampled fish with an otter trawl on soft bottoms in stations further away from mussel culture areas.

4.2. Temporal changes in YOY growth, nutritional status versus parasitic infection

Following their arrival in the shallower part of the Pertuis Breton nursery, YOY exhibited high growth rates between May and June followed by a decline, and a lower K than indicated by recent reports comparing sole condition in different nurseries (Gilliers et al., 2004). However, this morphological index is known to have low sensitivity and biochemical indices have been recommended to accurately assess condition and growth potential of wild fish juveniles (Weber et al., 2003). Although TAG / ST ratio has been widely used as a nutritional index for early life stages of sole larvae (Galois *et al.*, 1990; Amara *et al.*, 2000; Amara & Galois, 2004), the temporal dynamics of this index in YOY had been little documented.

Metamorphosis has been shown to be critical in terms of effects on growth and condition for a number of flatfishes (Yamashita et al., 2001; Hossain et al., 2003). This is not the case for the common sole however, as metamorphosing sole larvae did not show a halt in growth and were judged to be in good condition as their TAG / ST ratios ranged between 1-2.5 (Amara *et al.*, 2000; Amara & Galois, 2004). In contrast, our data showed extremely low TAG / ST ratios from May to July, which means that TAG reserves had almost been exhausted during YOY adaptation to the bottom-dwelling habitat. In fact, adaptation to the benthic life style can involve learning, which has been shown for sole (Lagardère et al., 1999). This adaptation period may even lead to starvation, as demonstrated by the empty stomachs found in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Tanaka et al., 1996). Settlement in nursery grounds is therefore a crucial transition for sole in terms of their energetic status. A dramatic change in TL was observed in May when it fell from 12 to 6% of dry body mass. However, initial content conformed with previous reports on post-metamorphic Japanese flounder (Hossain et al., 2003) and sole (Galois, unpubl. data). The plateau stabilized around 6%, which is similar to contents measured in autumn for YOY sole in several different nursery grounds on the French Atlantic and Channel coasts (Galois, unpubl. data). As all lipid classes decreased at the same rate relative to dry mass between May and June, the observed decrease in TL indicates changes in the proximate composition instead of a use of these reserves at this point.

Fish generally ingest more food during this period of fast growth early in the first year, with extra energy being allocated to storage as lipid reserves. Despite a TAG / ST index at the level of starvation in larvae (Galois et al., 1990), our YOY had full digestive tracts and did not stop growing until autumn. Additionally, condition factor K, TL, and TAG / ST were not

significantly related, whereas a positive correlation would be expected when lipid reserves are used as the main supply of energy (Lemly & Esch, 1984; Fraser, 1989; Pangle & Sutton, 2005). Lipid storage is not the only way for fish to store energy: a dramatic increase in glycogen content was observed during compensatory growth in young roach *Rutilus rutilus* (Mendez & Wieser, 1993). Hence, although energy allocation in YOY sole remains poorly understood, our findings could indicate suboptimal feeding conditions and/or a preferential use of glycogen as an energetic reserve offering more rapid storage and mobilization early during the first summer, when growth appears to have priority.

TAG / ST peaked in September, when the highest variability also appeared (0.57 ± 0.31). This indicates that at least some of the YOY stored energy supplies in the form of TAG during late summer. Although these levels were higher than in August they were below those found in other nursery grounds in the French Atlantic and Channel coastal areas but corresponded to values already measured in autumn 2003 in the Pertuis Breton nursery area (Galois, unpubl. data). Lipid storage is generally observed prior to winter and allows fish to survive periods of starvation, which are more frequent in winter. The steep decrease in TAG / ST in November could indicate a period of starvation between September and November. It could also mean that fish with higher TAG / ST ratios could have moved to deeper waters, which is the generally observed migration pattern (Dorel et al., 1991; van der Veer et al., 2001).

Parasites are known to be major stressors for aquatic organisms (Lemly, 1997). Metacercariae feed directly on host tissue to develop and induce host immune responses (Jones, 2001). Thus parasitism involves an energetic cost due to both parasite nutrition and host reaction. Studies on cases of heavy infection have demonstrated negative effects of metacercariae on fish host growth and stored lipid supplies, which impact over-winter survival (Lemly & Esch, 1984; Coleman & Travis, 1998; Johnson & Dick, 2001; Collyer & Stockwell, 2004). In contrast, other studies reported a lack of effects of metacercariae on fish condition and survival (Ballabeni, 1994; Ondrackova et al., 2004). In the present study, we only detected a negative relationship between *Proisorhynchus* spp. abundance and the condition factor K in November, which differs from previously published results (Laffargue et al., 2004). However, we did not find any relationship between parasite abundance and the other more sensitive biochemical condition indices (TL and TAG/ST). From settlement to early fall, YOY sole were increasingly infected by both parasites, *Proisorhynchus* spp. and *Timoniella* spp. and although they had a poor nutritional status, they appeared to have had the capacity to compensate for such an infection. In November when temperature lowered, the

decreased condition linked to parasitism may corroborate the ‘winter stress syndrome’ (Lemly, 1997).

In conclusion, this study clearly demonstrates that (1) settlement in the nursery is a critical transition period for sole in terms of nutritional status, and (2) YOY infection results from local accumulation of digenean metacercariae. In this shellfish-dominated bay, the presence of the first intermediate hosts in the same habitat favours YOY sole infection by *Timoniella* spp. and *Proisorhynchus* spp. metacercariae. However, we did not detect any negative effects of these parasites until November. We described seasonal changes in energy storage from summer to winter. During the first summer of growth, we assume that YOY preferentially use glycogen to allocate energy between growth and storage, only resuming their use of lipid reserves in late summer. In autumn, YOY sole that remained in this shallow part of the nursery exhibit poor nutritional status, heavy infection levels and an effect of parasites on their condition which may decrease their over-winter survival. This area of the Pertuis Breton thus appears to be of very low quality for sole.

Acknowledgments

We are very grateful to J. Grizon, G. Pinaudeau and M. Paillet for their valuable help with field sampling and laboratory analyses. A PhD grant to E.D.H. Durieux was funded by IFREMER and the Conseil Régional de Poitou-Charentes. Financial support for the research project was provided by the Contrat Plan Etat Région Poitou-Charentes and by IFREMER Défi Golfe de Gascogne. We would like to thank H. Boudry for English improvement of the manuscript.

Chapitre V. Variabilité spatiotemporelle du système hôte - parasite, G0 de sole – métacercaires de Digènes, dans les pertuis Charentais : utilisation des parasites comme marqueurs biologiques de l'utilisation de l'habitat par l'hôte.

Résumé :

Des juvéniles G0 de sole (n = 1732) ont été capturés en avril, mai, juin, août et octobre 2005 sur 9 stations des pertuis Charentais à l'aide d'un chalut à perche standard, ce qui a permis le calcul de leurs densités. Des individus sous-échantillonnés (n = 498) ont été disséqués afin d'identifier et compter les métacercaires de Digènes. Les individus se concentrent dans les zones peu profondes (0 – 5 m) de l'habitat des pertuis Charentais à partir de mai avec une variabilité spatiotemporelle des densités (entre 0,3 et 189 individus 1000 m⁻² suivant les stations échantillonnées). Les individus sont infestés par des métacercaires de Digènes [*Proisorhynchus crucibulum*, *Proisorhynchus* sp. A (Bucéphalidés), *Timoniella* spp. (Acanthostomidés) et *Podocotyle* sp. (Opécoelidés)]. L'infestation présente une très forte variabilité spatiotemporelle qui apparaît fortement liée à la présence locale des premiers hôtes intermédiaires (moule cultivée, hydrobies et littorines). Les métacercaires de Digènes peuvent ainsi être utilisées comme marqueurs biologiques et permettent d'inférer sur les mouvements des juvéniles G0 de sole à petite échelle. Les analyses factorielles discriminantes réalisées présentent des taux élevés de reclassements corrects des individus dans les stations (de 74 % à 84 % en moyenne) de juin à octobre, ce qui montre la forte sédentarité des individus dans les différentes sous-parties de l'habitat des pertuis Charentais. En octobre, l'augmentation de la densité sur les stations plus profondes (5 – 10m) et la forte variabilité de l'infestation sur ces stations reflètent vraisemblablement l'initiation de la migration pré-hivernale. La station de la baie de l'Aiguillon présente les plus fortes densités d'août à octobre et les performances de croissance (suivi de la longueur standard) les plus élevées par rapport aux autres stations. Il existe ainsi une variabilité spatiale de la qualité de l'habitat à petite échelle dans les pertuis Charentais, qui pourrait être reliée à la disponibilité en nourriture.

Mots clés : Pleuronectiformes – infestation – utilisation de l'habitat – nourricerie

1. Introduction

La compréhension des facteurs qui gouvernent les variations spatiotemporelles de la distribution et des performances des organismes au sein de leur habitat est une des questions clés en écologie. Les zones peu profondes côtières que sont les baies et les estuaires, sont des habitats essentiels pour les juvéniles de nombreuses espèces de Téléostéens d'intérêt économique majeur, comme les Pleuronectiformes (Gibson, 1994; Beck et al., 2001). Pour une espèce donnée, la quantité mais aussi la qualité des habitats essentiels conditionnent fortement le recrutement dans la population adulte (Gibson, 1994; Beck et al., 2001). La qualité de l'habitat des juvéniles est considérée comme élevée quand la survie, la croissance et *in fine* le potentiel reproducteur (*i.e.* fitness) sont optimisés (Gibson, 1994); ces zones particulières de l'habitat juvénile sont appelées nourriceries (Beck et al., 2001). Les zones humides, dont font partie les baies et les estuaires, abritent des communautés particulièrement abondantes et diversifiées de parasites qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de ces écosystèmes (Thomas et al., 1997; Lafferty et al., 2006). Dans les systèmes hôte - parasite, chaque organisme a sa propre dynamique à travers son cycle de vie. L'intégration des facteurs qui caractérisent l'habitat se fait à la fois au niveau de l'hôte ciblé et au niveau du parasite à travers, pour celui-ci, d'un cycle de vie souvent complexe et modulé par les interactions hôte – parasite (Combes, 2001). C'est pourquoi, la composante spatiotemporelle est de plus en plus prise en compte en épidémiologie afin de mieux prédire le rôle des parasites dans le fonctionnement des écosystèmes (Holt & Boulinier, 2005). L'hétérogénéité spatiotemporelle de l'infestation des hôtes en milieu aquatique à petite échelle a en effet souvent été observée et elle est liée en grande partie à la répartition des différents hôtes successifs (Marcogliese *et al.*, 2001; Poulin & Rate, 2001; Smith, 2001; Latham & Poulin, 2003; Fredensborg *et al.*, 2006; Thieltges & Karsten, 2007). Cependant, encore peu d'études se sont réellement intéressées à cette variabilité de l'infestation à petite échelle chez les Téléostéens marins, en particulier chez les Pleuronectiformes.

L'évaluation à petite échelle de la qualité de l'habitat des juvéniles des Pleuronectiformes, et notamment des G0, a été abordée avec différentes méthodes à travers de nombreuses études (Beck et al., 2001). Certaines études ont tout d'abord décrit la distribution spatiotemporelle, l'abondance et la structure en taille directement à partir d'un échantillonnage (e.g. Pihl *et al.*, 2000; Hjørleifsson & Palsson, 2001). D'autres études ont

utilisé des indices de croissance (corrélés à la croissance somatique), comme la croissance journalière des otolithes ou le rapport ARN / ADN (Malloy et al., 1996; Yamashita et al., 2003). Un grand nombre d'auteurs ont utilisé des expériences de croissance en cages (Able et al., 1999; Phelan et al., 2000; Necaïse et al., 2005). Stunz et al. (2002) ont couplé l'estimation de la croissance des otolithes en milieu naturel à la croissance obtenue en cages. Enfin, la croissance réalisée en milieu naturel peut être comparée aux croissances potentielles obtenues en laboratoire (Hurst & Abookire, 2006). Cependant, aucune de ces études n'a réellement estimé la croissance des individus dans leur habitat naturel en prenant en compte les mouvements des individus au sein de cet habitat et donc la réelle utilisation qu'ils en font. L'utilisation de marques artificielles ou naturelles se révèle particulièrement importante pour étudier les mouvements des individus et la connectivité des habitats (Gillanders et al., 2003). Quelques auteurs ont utilisé des marquages artificiels, par identification des individus avec des marques individuelles, cependant cette technique se révèle particulièrement lourde et onéreuse et n'a été employée que peu de fois. En ce qui concerne les marques naturelles (*e.g.* parasites, empreintes microchimiques des otolithes, isotopes stables), elles se révèlent particulièrement adaptées pour les études à échelle spatiale relativement grande, mais ont peu été employées à petite échelle.

Parmi ces marques naturelles, les parasites ont été utilisés afin d'inférer sur les mouvements de leur Téléostéen hôte en milieu marin (MacKenzie & Abaunza, 1998; MacKenzie, 2002; 2005). L'utilisation des parasites comme marqueurs biologiques repose sur la variabilité spatiale de l'infestation des hôtes (MacKenzie, 2005). Les parasites permettent notamment de discriminer des stocks écologiquement distincts bien que n'exhibant pas forcément de différence au niveau génétique (MacKenzie, 2002). Ainsi, de plus en plus d'études ont recours aux parasites dans l'objectif de discriminer des stocks, c'est dire à une grande échelle spatiale (de l'ordre de plusieurs dizaines à centaines de kilomètres entre stations consécutives) (Oliva, 2001; Blaylock et al., 2003; Timi, 2003; Marques et al., 2005; McClelland et al., 2005; Marques et al., 2006b). Quelques études ont utilisés les parasites pour étudier la connectivité entre habitats chez des espèces de Téléostéens marins (Olson & Pratt, 1973; Sujatha & Madhavi, 1990) mais, à notre connaissance, aucune étude n'a jamais utilisé les parasites comme marqueurs biologiques de mouvements de Pleuronectiformes à petite échelle au sein d'un habitat de juvéniles.

Dans cette étude nous avons ainsi choisi d'analyser la variation spatiotemporelle du système Téléostéen – parasite, juvéniles G0 de sole (*Solea solea*) – métacercaires de Digènes, au sein d'un même habitat délimité pour les juvéniles à savoir les pertuis Charentais. En effet, au cours de leur première année de vie dans les habitats côtiers, les juvéniles de Pleuronectiformes accumulent des métacercaires de Digènes (Laffargue et al., 2004; Durieux et al., 2007b). Les parasites Digènes utilisent en effet les juvéniles G0 comme deuxième hôte intermédiaire. Produites et émises à partir d'un mollusque (premier hôte intermédiaire), les larves cercaires vont infester activement les juvéniles G0 (deuxièmes hôtes intermédiaires) en pénétrant à travers la peau et s'enkystent sous forme de métacercaires. Le passage aux hôtes définitifs qui sont des Téléostéens piscivores se fait par voie trophique.

Quelques études ont porté sur l'évolution temporelle de la répartition des juvéniles G0 de sole et leur croissance globale dans les nourriceries (Rogers, 1992; Jager et al., 1993; Rogers, 1993; Rogers, 1994; van der Veer et al., 2001). Une seule étude a abordé les mouvements des juvéniles G0 de sole en estuaire par capture - marquage - recapture (Coggan & Dando, 1988). Un certain nombre d'études sur les habitats de juvéniles de sole ont été réalisées à méso-échelle, c'est à dire en considérant les différents habitats des juvéniles de sole, baies et estuaires, d'un même stock à la fois, en terme de convenance et de quantité (Le Pape et al., 2003b) et de qualité de l'habitat en utilisant la taille comme indicateur de performance de croissance (Le Pape et al., 2003c). Par ailleurs, d'autres études ont focalisé sur la qualité de l'habitat à méso-échelle en utilisant plusieurs indicateurs (indices de croissance, densité, pollution, indices de condition) (Gilliers et al., 2004; Gilliers et al., 2006a; Gilliers et al., 2006b). Gilliers et al (2006b) ont notamment évoqué la difficulté d'évaluer la qualité de l'habitat à cette méso-échelle et ont mis en avant la nécessité de se placer à une plus petite échelle. Le Pape et al. (2003a) ont montré qu'au sein d'un même habitat estuarien, l'apport en eau douce du fleuve était un facteur important qui conditionnait la surface d'habitat disponible. Désormais, la compréhension du fonctionnement des nourriceries de sole à petite échelle reste à développer (Le Pape, 2005). Ainsi, l'étude de la dynamique spatiotemporelle de la distribution des juvéniles au sein de l'habitat est particulièrement importante en terme de gestion environnementale et de conservation (Beck et al., 2001; Rice, 2005).

Les pertuis Charentais constituent une nourricerie majeure pour les juvéniles G0 de sole du golfe de Gascogne (Le Pape et al., 2003b). Notre étude se propose donc de mettre en

évidence la variabilité spatiotemporelle intra-nourricerie du système juvéniles G0 de sole – métacercaires de Digènes, avec pour objectifs : (i) d'étudier l'évolution de la répartition spatiale des juvéniles G0 de sole au cours de la phase de croissance (mai à octobre) ; (ii) d'analyser la dynamique spatiotemporelle d'infestation des métacercaires chez les juvéniles G0 en fonction de la distribution spatiale des populations de premiers hôtes intermédiaires ; (iii) de tester l'utilisation des métacercaires de digènes comme marqueurs biologiques de l'utilisation de l'habitat par les juvéniles G0 de sole ; (iv) de mesurer les performances de croissance des juvéniles afin d'évaluer à petite échelle la qualité de l'habitat pour les juvéniles G0 de sole dans les pertuis Charentais.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

Les juvéniles G0 de sole ont été échantillonnés en avril (21-28), mai (23-24), juin (27-28), août (9-10) et octobre (4-5) 2005 à l'aide d'un chalut à perche de 2 m de large et 40 cm de hauteur, monté avec une maille de 5 mm dans la partie terminale, et tiré pendant 20 minutes à 2,5 nœuds. Ce chalut est le matériel standard utilisé pour les évaluations d'abondance des juvéniles de Pleuronectiformes dans les nourriceries (Kuipers et al., 1992). L'échantillonnage a été mené dans les pertuis Charentais sur 7 stations localisées dans la zone de 0 à 5 m (PB1, PB 2 , PB 3, PB 4, PA 1, PA 2 et PA 3) et 2 stations localisées dans la zone de 5 à 10 m (PB5 et PA4) (Figure 1). Un à deux traits de chalut ont été réalisé (s) par station afin d'obtenir si possible un échantillon de 20 individus par station pour les analyses de parasites. Cependant, sur certaines stations à certaines dates, la densité des individus ne permettait pas d'obtenir un tel effectif.

2.2. Mesures effectuées

Toutes les soles capturées ont été comptées et, étant donné le grand nombre de juvéniles G0 de sole capturés sur certaines stations, un sous-échantillon d'un maximum de 120 individus a été mesuré pour la longueur standard (L_S en mm) [directement après la pêche]. Parmi ceux-ci, 30 individus au maximum ont été pesés (M_w en g), dont 20 au maximum ont été stockés individuellement à -20°C pour l'analyse ultérieure des parasites.

Cela représente un total de 498 individus disséqués afin d'identifier et de compter les métacercaires de Digènes (Tableau 1).

La distribution des principaux premiers hôtes intermédiaires des Digènes (déjà identifiés chez les juvéniles G0 de sole) a été obtenue pour la zone d'étude (Figure 1) : les concessions en activité de culture de moules (premier hôte intermédiaire de *Proserhynchus crucibulum*) (IFREMER, LERPC) ; et les populations naturelles d'hydrobies (premier hôte intermédiaire de *Timoniella* spp.) (Sauriau et al., 1989; Degré, 2006; Bocher et al., 2007, Sauriau, comm. pers.).

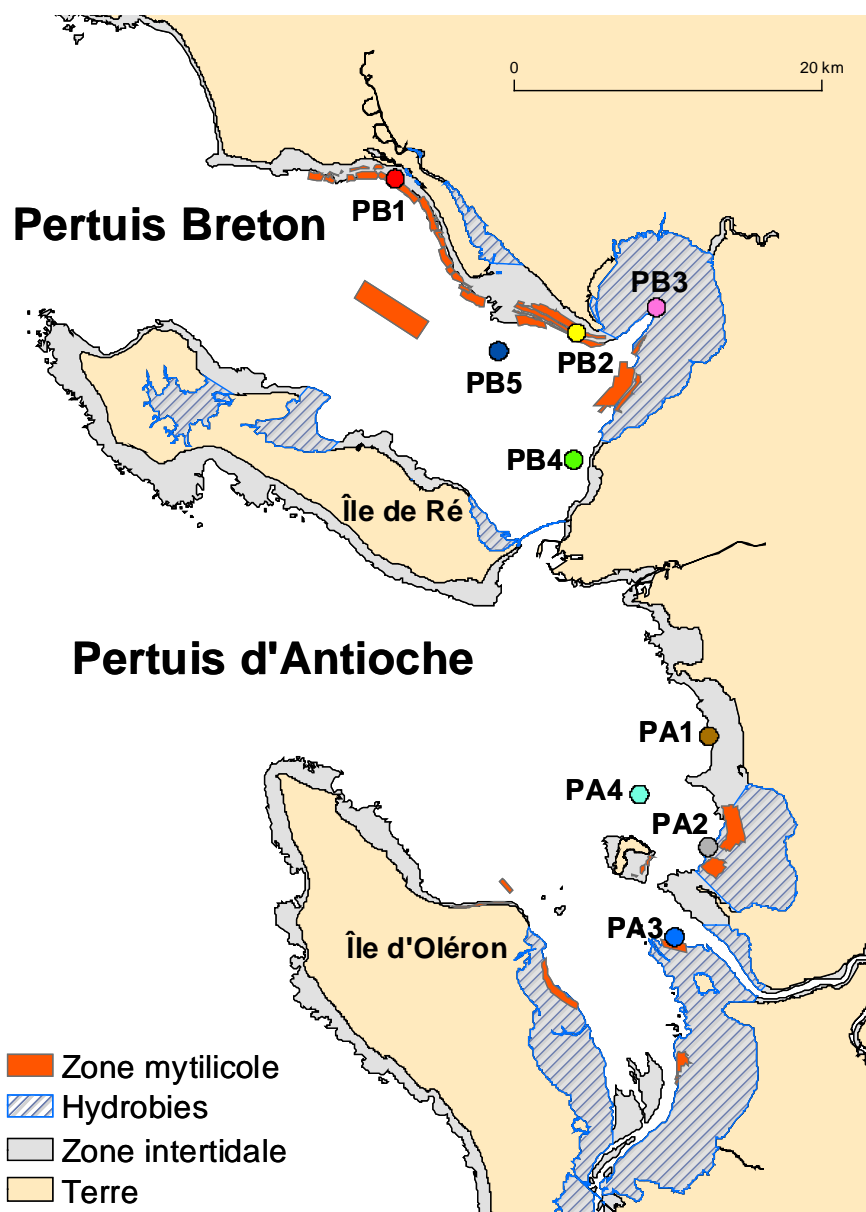


Figure 1. Localisation des stations d'échantillonnage des juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, dans la zone des pertuis Charentais ; répartition des zones mytilicoles exploitées (IFREMER, LERPC) et des populations naturelles d'hydrobies signalées par différents auteurs (Sauriau et al., 1989; Degré, 2006; Bocher et al., 2007, Sauriau, comm. pers.).

2.3. Analyse des données

La densité des juvéniles G0 de sole (D en nb d'individus 1000 m⁻²) a été calculée comme $D = N * 1000 / S$, avec N = nombre d'individus capturés et S = surface d'échantillonnage (m²).

Les indices épidémiologiques prévalence (P% : pourcentage de d'individus infestés), abondance moyenne (Ab : nombre moyen de parasites par Téléostéens) et intensité (I : nombre moyen de parasites par individu infesté) ont été calculés d'après Bush *et al.* (1997) sur l'ensemble des individus disséqués. Les abondances de parasites de chaque taxon ont été comparées entre stations pour une même date d'échantillonnage par le test non paramétrique de Kruskal Wallis (KW) et entre dates d'échantillonnage consécutives pour chaque station par le test non paramétrique de Mann Whitney (MW).

L'assemblage des parasites des juvéniles G0 de sole des 7 stations côtières a été étudié par analyse factorielle discriminante (AFD) pour chaque mois d'échantillonnage en distinguant les deux pertuis. Les abondances de parasites ont été préalablement log (n + 1) transformées afin de rapprocher les valeurs de la normalité. Etant donné, les trop faibles effectifs obtenus sur les stations PB5 et PA4, ces individus n'ont pas été intégrés dans les AFDs des mois de mai, juin et août.

L'indice de condition de Fulton a été calculé comme $K = (M_w \times 100) / L_s^3$, avec M_w en g et L_s en cm. Les valeurs sont données comme moyenne \pm SD (écart type) pour les tailles (L_s) et pour l'indice de Fulton (K). Les valeurs L_s , K et M_w ont été comparées entre stations pour une même date (mois) d'échantillonnage par ANOVA à un facteur. La relation entre l'abondance de parasites (pour chacun des taxons et l'ensemble des taxons) a été analysée par corrélation non paramétrique en ordre de rang de Spearman (SC).

Tableau 1. Effectifs des individus de juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, sous échantillonnés pour analyse des métacercaires de Digènes, prélevés sur 9 stations des pertuis Charentais en avril, mai, juin, août et octobre 2005.

Date	PB 1	PB 2	PB 3	PB 4	PA 1	PA 2	PA 3	PB 5	PA 4
avril				16		11			
mai	20	5	11	20	20	20	20	1	2
juin	11	4	20	20	20	20	20		6
août	19	5	20	20	2	13	20		
oct	14	6	20	8	20	20	20	13	11

3. Résultats

3.1. Distribution spatiotemporelle de l'abondance des G0 de sole dans les pertuis Charentais

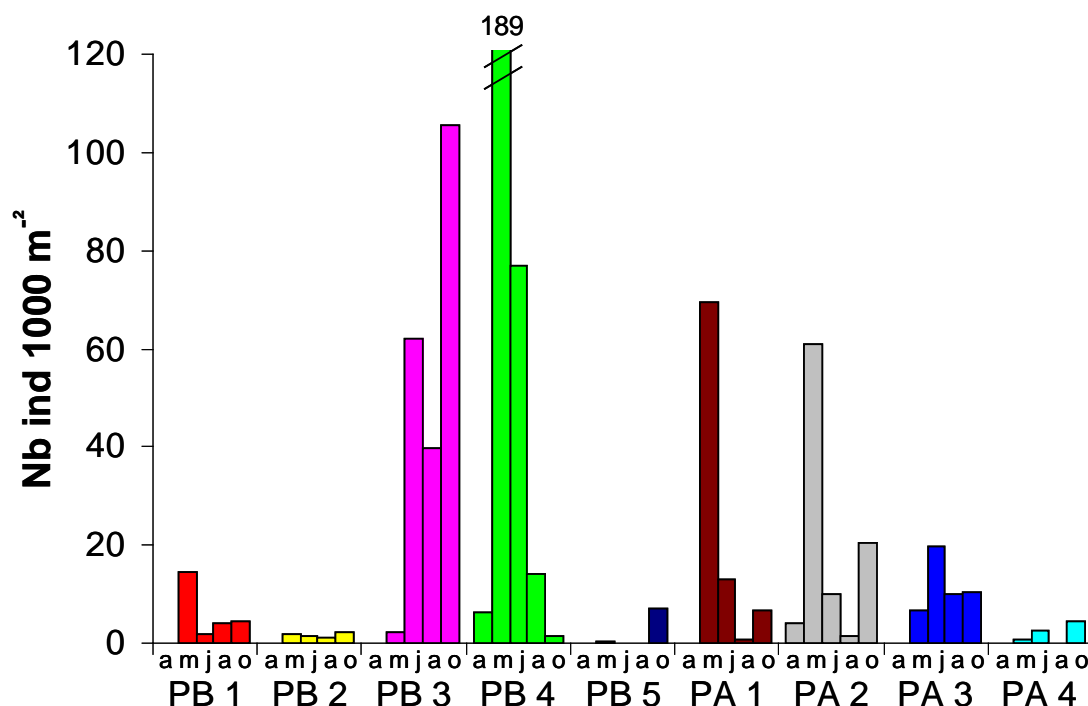


Figure 2. Densité (nombre d'individus 1000 m⁻²) de juvéniles G0 de sole prélevés sur 9 stations des pertuis Charentais en avril, mai, juin, août et octobre 2005.

Un total de 1732 juvéniles G0 de sole a été capturé. Les densités présentent d'importantes différences entre stations et en fonction du temps. En avril, des juvéniles G0 de sole sont uniquement présents sur les stations PB 4 et PA 2 à une densité de 6,2 et 4,0 ind 1000 m⁻², respectivement. En mai, des juvéniles G0 sont présents sur toutes les stations avec des densités inférieures pour les stations situées entre 5 et 10 m (PB 5 et PA 4), avec 0,3 et 0,7 ind 1000 m⁻², respectivement, par rapport à celles qui sont les moins profondes (0 et 5 m : PB 1, PB 2, PB 3, PB 4, PA 1, PA 2 et PA 3). Dans le pertuis Breton, PB4 est la zone qui présente de loin la plus forte densité avec 188,9 ind 1000 m⁻² par rapport aux autres (PB 1, PB 2 et PB 3) qui ont 14,5, 1,9 et 2,2 ind 1000 m⁻², respectivement ; dans le pertuis d'Antioche, PA 1 et PA 2, avec 69,6 et 61,0 ind 1000 m⁻² respectivement, ont des densités nettement supérieures à PA 3 avec 6,8 ind 1000 m⁻². De juin à octobre, les densités sur PB 1 et PB 2 restent faibles passant de 2 à 4,5 et 1,7 et 2,2 ind 1000 m⁻², respectivement ; sur PB 3 la densité est forte passant de 62,0 à 105,6 ind 1000 m⁻², sur PB 4 elles diminuent fortement de 76,8 à seulement 1,4 en octobre. Sur PA 1 et PA 2 les densités passent de 12,9 à 6,7

ind 1000 m⁻² et de 10,2 à 20,3 ind 1000 m⁻² de juin à octobre, avec des minima au mois d'août avec des densités de 0,6 et 1,6 ind 1000 m⁻² respectivement. Sur PA 3, les densités passent de 19,9 à 10,6 ind 1000 m⁻² de juin à octobre. Sur PB 5 et PA 4 les densités sont nulles en juin et août (PB 5 juin et août, PA 4 août) ou faible (PA 4 juin), alors qu'elles sont égales en octobre à 7 et 4,3 ind 1000 m⁻², respectivement.

3.2. Variabilité spatiotemporelle de l'infestation

L'infestation des juvéniles G0 disséqués (n = 498) varie nettement, tant au niveau spatial que temporel. En avril, les individus capturés sur PB 4 et PA 2 ne présentaient aucun parasite (Tableau 2). En mai, les abondances sont significativement différentes entre stations pour *Proisorhynchus* sp. A (KW, H = 12,83, p = 0,046) et *Timoniella* spp. (KW, H = 38,73, p < 0,001) (Figure 3). *Proisorhynchus crucibulum* est présent uniquement sur PB 1 et *Proisorhynchus* sp. A sur PB 2 et PB 4, avec des niveaux d'infestation (prévalence, abondance moyenne et intensité) très faibles. En revanche, *Timoniella* spp. est présent sur toutes les stations sauf les plus éloignées de la côte (PB 5 et PA 4). On remarque que, de mai à octobre, les abondances de *Timoniella* spp. sont nettement plus élevées sur PB 3 (Tableau 1) (KS, p < 0,05 pour tous les tests). En juin, août et octobre, les abondances de *Proisorhynchus crucibulum* et *Proisorhynchus* sp. A sont significativement différentes entre stations (KW, p < 0,001 pour tous les tests). En juin, août et octobre, les abondances de *P. crucibulum* sont nettement plus élevées sur les stations situées dans les zones mytilicoles sur bouchots (PB 1 et PB 2 dans le pertuis Breton et PA 2 et PA 3 dans le pertuis d'Antioche). En octobre, en comparant ces 4 stations ensemble, on remarque que les abondances moyennes de *P. crucibulum* sont plus élevées sur PB 1 et PB 2 que sur PA 2 et PA 3. Les abondances de *Proisorhynchus* sp. A sont nettement plus élevées sur PB 4, PA 1, PA 2 et PA 4. En octobre, l'abondance de *Timoniella* spp. est élevée sur PB 5, avec cependant une très forte variabilité interindividuelle. *Podocotyle* sp. n'est présent qu'en août et octobre avec des différences significatives entre stations (KW, p < 0,05 pour tous les tests). En octobre, les individus de PB 5 présentent l'abondance moyenne maximale de *Podocotyle* sp. avec là encore une très forte variabilité interindividuelle (56,38 ± 53,77) et une prévalence relativement faible (30%). Quant aux individus de PA 1, ils ont la prévalence maximale pour *Podocotyle* sp. (90 %) et une abondance moyenne nettement plus élevée (5,8 ± 1,97) que les autres stations (à l'exception de PB 5).

Pour les individus capturés en mai et juin dans les stations les plus à la côte, on observe une augmentation significative entre mai et juin de l'abondance de *Proisorhynchus crucibulum* et *Proisorhynchus* sp. A sur PB 1, PB 4 et PA 1, PA 2 et PA 3, et de *Timoniella* spp. sur PB 1, PA 4 et PA 2 et PA 3 (MW, $p < 0,05$ pour tous les test). De la même manière, entre juin et août, on note une augmentation significative de l'infestation par *Proisorhynchus crucibulum* sur PB 1 et PB 3 et PA 3, de celle de *Proisorhynchus* sp. A sur PB 1 et PB 4 et PA 1, PA 2 et PA 3, de *Timoniella* spp. PB 3 et PA 3, et enfin de *Podocotyle* sp. sur PA 1 (MW, $p < 0,05$ pour tous les tests). Finalement, entre août et octobre, l'abondance augmente de manière significative pour *Proisorhynchus* sp. A sur PB 4 et on note une augmentation uniquement pour, *Timoniella* spp. sur PA 2 et *Podocotyle* sp. sur PB 4 (MW, $p < 0,05$ pour tous les tests).

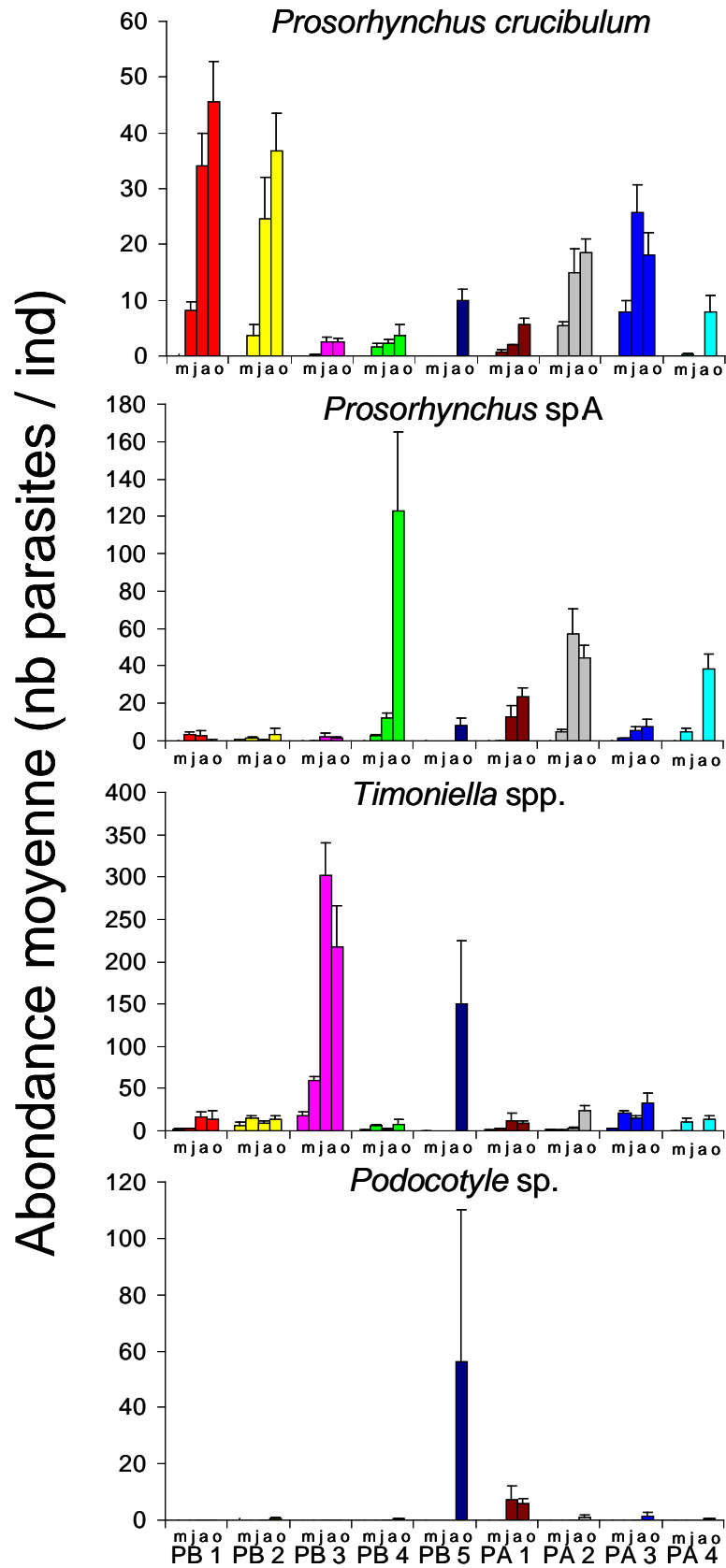


Figure 3. Abondance moyenne (\pm SD) des 4 taxons de métacercaires de Digènes de juvéniles G0 de sole, prélevés sur 9 stations des pertuis Charentais en avril, mai, juin, août et octobre 2005.

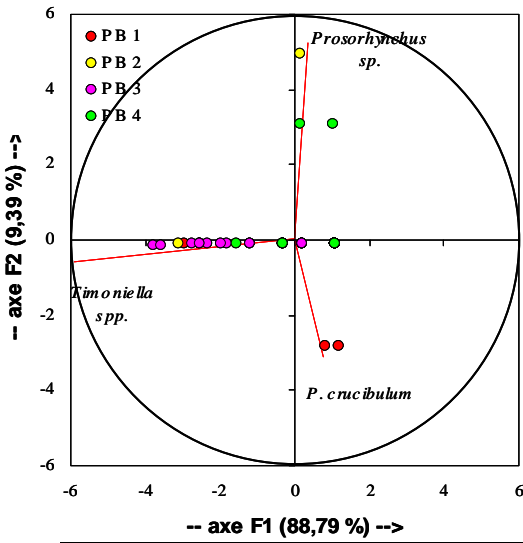
3.3. Utilisation des parasites comme marqueurs biologiques

Les 8 AFDs montrent que, selon la date d'échantillonnage et le pertuis d'origine, les taxons de métacercaires de Digènes permettent de discriminer les individus de juvéniles G0 *Solea solea* des différentes stations, car les barycentres des groupes formés présentent une différence significative (Tableau 3 ; Figure 4 ; Figure 5). En mai, les taux de reclassement corrects sont relativement faibles : 55% sur le pertuis Breton avec cependant les individus de la station PB 3 et PB 4 généralement correctement reclassés ; 39 % sur le pertuis d'Antioche, aucune station ne présentant un taux de reclassement assez élevé pour être pris en compte (Figure 4 [1A-B]). En juin, les taux de reclassement corrects sont nettement plus élevés qu'en mai avec 78 % et 82 % du total des individus bien reclassés pour le pertuis Breton et le pertuis d'Antioche respectivement (Figure 4 [2A-B]). En août, les taux de reclassement corrects sont maximaux pour chaque pertuis. Ils atteignent 84 % sur le pertuis Breton, avec des taux élevés sur PB 1 et 4 et même 100% d'exactitude sur PB 3. En revanche, les individus de PB 2 sont mal-reclassés et ce, essentiellement dans PB 1 étant donné que ces deux stations présentent exactement les mêmes patrons d'infestation et que PB 1 a un effectif beaucoup plus faible. Les taux sont de 83 % dans le pertuis d'Antioche, avec de bons taux de reclassement pour PA 2 et 3 et seulement 50 % sur PA 1, ce qui peut être attribué à l'effectif réduit à deux individus et donc à sa faible représentativité (Figure 5 [3A-B]). En octobre, les taux de reclassement corrects diminuent par rapport à août mais restent cependant élevés : 74 % pour le pertuis Breton, avec de très forts taux sur PB 1, PB 3 et PB 4 et seulement de 33 % pour PB 2 pour les raisons invoquées précédemment, et les individus prélevés sur PB 5 sont correctement reclassés à 54 %, avec une majorité d'erreurs de reclassement avec PB 3 ; 76 % pour le pertuis d'Antioche, avec des taux de reclassement corrects élevés sur PA1, PA 2 et PA 3, et les individus prélevés sur PA 4 sont correctement reclassés à 45 % seulement avec des erreurs de reclassement réparties également entre les autres stations (Figure 5 [4A-B]).

Tableau 3. Résultats du test du lambda (λ) de Wilks par date d'échantillonnage et par pertuis (pertuis Breton : PB ; pertuis d'Antioche : PA)

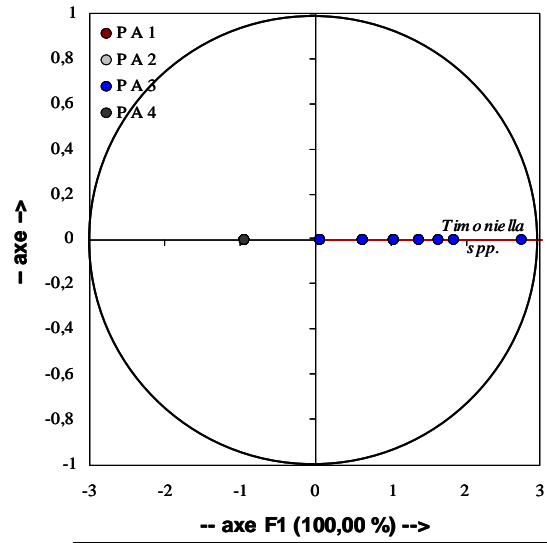
date	pertuis	λ de Wilks	F	dll1 -dll2	p
23-24 mai	PB	0,344	7,47	9-122	< 0,0001
	PA	0,871	2,86	3-58	0,045
27-28 juin	PB	0,13	17,32	9-119	< 0,0001
	PA	0,125	21,84	9-146	< 0,0001
9-10 août	PB	0,056	24,85	12-151	< 0,0001
	PA	0,214	8,43	8-58	< 0,0001
4-5 octobre	PB	0,05	17,04	16-163	< 0,0001
	PA	0,241	10,08	12-170	< 0,0001

1A Individus (axes F1 et F2 : 98,18 %)



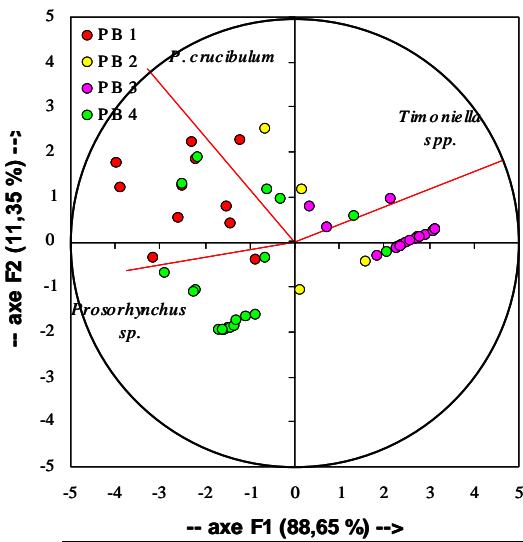
1A Station	PB 1	PB 2	PB 3	PB 4	% correct
PB 1	5	0	2	13	25
PB 2	2	1	1	1	20
PB 3	1	0	10	0	91
PB 4	2	2	1	15	75
Total	10	3	14	29	55

1B Individus (axe F1 : 100,00 %)



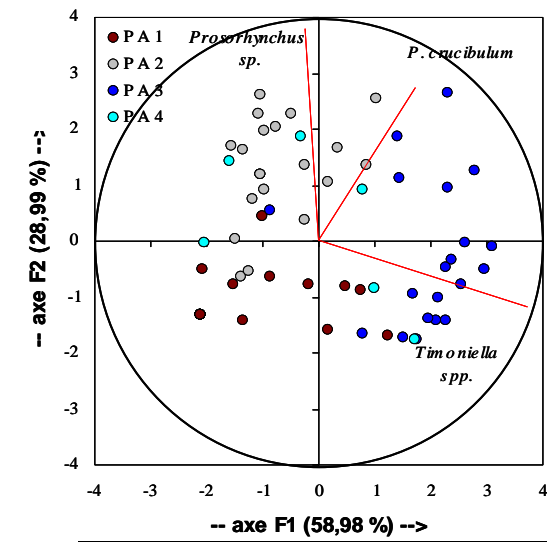
1B Station	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	% correct
PA 1	13	3	4	0	65
PA 2	7	2	11	0	10
PA 3	9	2	9	0	45
PA 4	2	0	0	0	0
Total	31	7	24	0	39

2A Individus (axes F1 et F2 : 100,00 %)



2A Station	PB 1	PB 2	PB 3	PB 4	% correct
PB 1	9	0	0	2	82
PB 2	1	1	1	1	25
PB 3	0	1	19	0	95
PB 4	3	1	2	14	70
Total	13	3	22	17	78

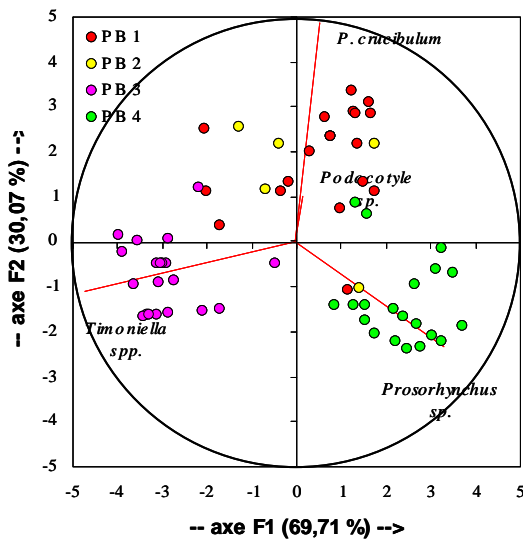
2B Individus (axes F1 et F2 : 87,97 %)



2B Station	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	% correct
PA 1	16	1	2	1	80
PA 2	3	17	0	0	85
PA 3	0	2	18	0	90
PA 4	1	1	1	3	50
Total	20	21	21	4	82

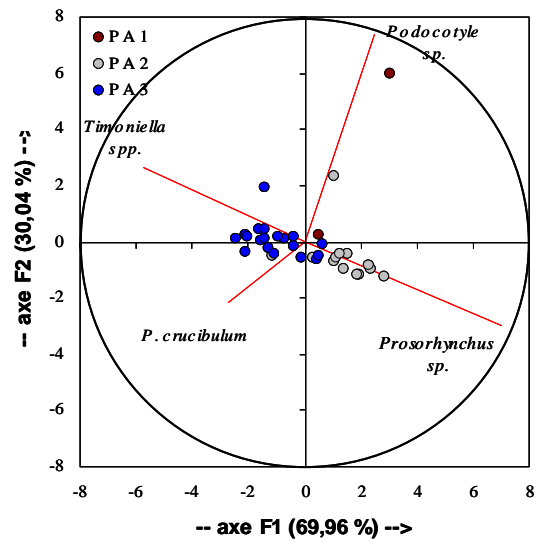
Figure 4. Cercle de corrélation (échelle orthonormée de -1 à 1) des variables explicatives (différents taxa de métacercaires de Digènes) et projection des individus sur le principal plan factoriel des AFD réalisées sur des juvéniles G0 de *Solea solea* capturés en mai (1) et juin (2) sur 8 stations du pertuis Breton (A) et du pertuis d'Antioche (B). Résultats de reclassement des individus pour chaque AFD.

3A Individus (axes F1 et F2 : 99,77 %)



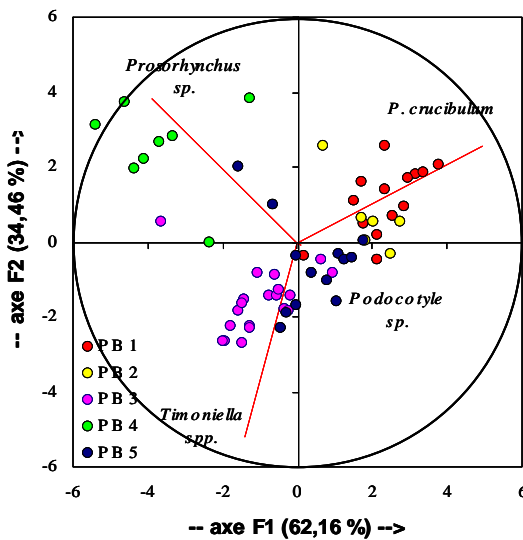
3A Station	PB 1	PB 2	PB 3	PB 4	% correct
PB 1	16	0	2	1	84
PB 2	4	0	0	1	0
PB 3	0	0	20	0	100
PB 4	2	0	0	18	90
Total	22	0	22	20	84

3B Individus (axes F1 et F2 : 100,00 %)



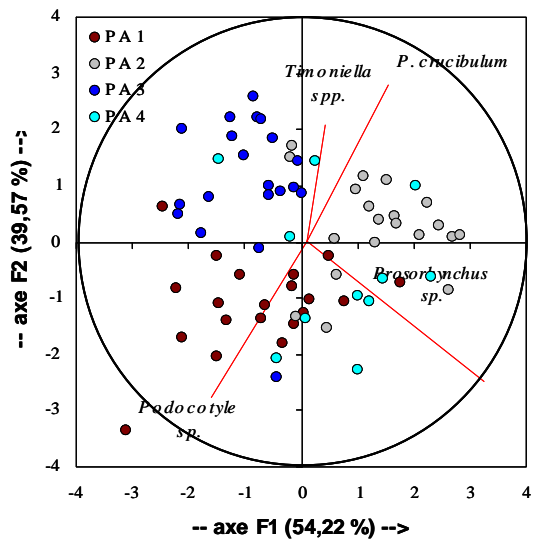
3B Station	PA 1	PA 2	PA 3	% correct
PA 1	1	1	0	50
PA 2	1	11	1	85
PA 3	0	3	17	85
Total	2	15	18	83

4A Individus (axes F1 et F2 : 96,62 %)



4A Station	PB 1	PB 2	PB 3	PB 4	PB 5	% correct
PB 1	12	1	1	0	0	86
PB 2	4	2	0	0	0	33
PB 3	0	0	17	1	2	85
PB 4	0	0	1	7	0	88
PB 5	1	0	4	1	7	54
Total	17	3	23	9	9	74

4B Individus (axes F1 et F2 : 93,79 %)



4B Station	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	% correct
PA 1	15	3	1	1	75
PA 2	2	16	2	0	80
PA 3	2	0	18	0	90
PA 4	2	2	2	5	45
Total	21	21	23	6	76

Figure 5. Cercle de corrélation (échelle orthonormée de -1 à 1) des variables explicatives (différents taxa de métacercaires de Digènes) et projection des individus sur le principal plan factoriel des AFD réalisées sur des juvéniles G0 de *Solea solea* capturés en août (3) et octobre (4) sur respectivement 7 et 9 stations du pertuis Breton (A) et du pertuis d'Antioche (B). Résultats de reclassement des individus pour chaque AFD.

3.4. Evolution de la taille et de la condition des G0 de sole

Aucune différence significative entre stations n'est détectée en avril pour (L_S) (ANOVA, dll 1 – 25, $p > 0,05$), alors qu'en mai, juin, août et octobre des différences significatives sont détectées (ANOVA mai, dll 8 – 449, $F = 22,15$, $p < 0,001$; ANOVA juin, dll 7 – 295, $F = 30,92$, $p < 0,001$; ANOVA août, dll 6 – 218, $F = 22,26$, $p < 0,001$; ANOVA octobre, dll 8 – 287, $F = 21,96$, $p < 0,001$). En mai, L_S est significativement plus faible sur PB 1 que sur PB 2, 3 et 4 et PA 1, 2 et 3 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests) et L_S est significativement plus élevée sur PB 4 que sur PA 1 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$). En juin, L_S est significativement plus élevée sur PB 2 que sur PA 2 et 4 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests) ; L_S est significativement plus élevée sur PB 3 et PB 4 que sur PB 1, PA 1, 2, 3 et 4 (test post hoc de Tukey, $p < 0,001$ pour tous les tests). En août, L_S est significativement plus élevée sur PB 3 que sur toutes les autres stations (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests). Il en est de même en octobre (test post hoc de Tukey, $p < 0,01$ pour tous les tests) et L_S est significativement plus faible sur PA 1 que sur PA 2 (test post hoc de Tukey, $p = 0,019$).

En ce qui concerne l'indice de condition de Fulton (K), aucune différence significative n'est détectée entre pertuis au mois d'avril (ANOVA, dll 1 – 25, $p > 0,05$), alors qu'en mai, juin, août et octobre des différences significatives apparaissent (ANOVA mai, dll 8 – 144, $F = 7,15$, $p < 0,001$; ANOVA juin, dll 7 – 163, $F = 2,83$, $p = 0,008$; ANOVA août, dll 6 – 122, $F = 2,56$, $p = 0,023$; ANOVA octobre, dll 8 – 157, $F = 3,73$, $p = 0,001$). En mai, K est plus élevé sur PB 1 que sur PB 2, PB 3 et PB 5 et PA 1, PA 2 et PA 3 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests) ; de même K est plus élevé sur PB 4 que sur PB 5 et PA 3 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$). En juin, K est significativement plus faible sur PB 1 que sur PA 1 et 3 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests). En août, K est significativement plus élevé sur PA 2 que sur PB 3 et PB 4 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests). En octobre, K est significativement plus élevé sur PB 3 que sur PA1, PA 2, PA 3 et PA 4 (test post hoc de Tukey, $p < 0,05$ pour tous les tests).

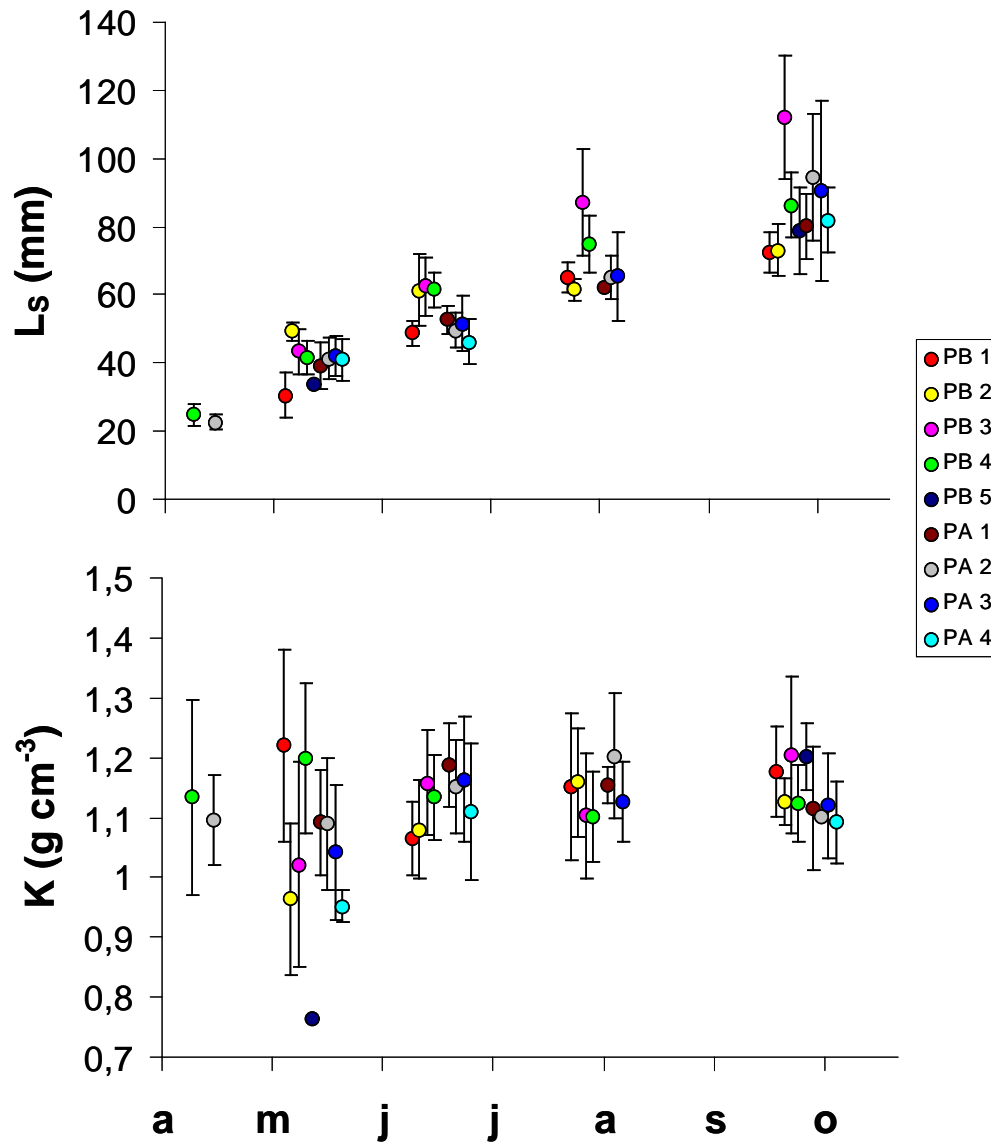


Figure 6. Evolution temporelle de la longueur standard moyenne ($L_s \pm SD$) (mm) et de l'indice de condition de Fulton moyen ($K \pm SD$) ($g \cdot cm^{-3}$) des juvéniles G0 de sole prélevés sur 9 stations des pertuis Charentais.

Pour ce qui est des relations entre abondance de parasite et indice de condition de Fulton K, on note seulement : en mai, une relation négative significative entre l'abondance de *Proisorhynchus crucibulum* et K sur PB 1 (SC, $n = 20$, $R = -0,463$, $p = 0,04$) ; en juin, une relation négative significative entre *Proisorhynchus crucibulum* et K sur PB 4 (SC, $n = 20$, $R = -0,488$, $p = 0,029$) ; une relation négative significative entre *Proisorhynchus* sp. et K sur PA 1 (SC, $n = 20$, $R = -0,473$, $p = 0,035$) et une relation négative significative entre *Podocotyle* sp. et K sur PA 2 (SC, $n = 20$, $R = -0,616$, $p = 0,004$).

4. Discussion

4.1. Distribution spatiotemporelle des G0 de sole dans les pertuis Charentais

Dans les pertuis Charentais, les densités des juvéniles G0 de sole présentent une variation spatiotemporelle. Pour l'année 2005, les juvéniles G0 de sole sont apparus dans différents secteurs des pertuis Charentais en avril mais ils colonisent les zones de nourriceries potentielles pendant le mois de mai. Cela correspond à la période couramment décrite pour le golfe de Gascogne (Dorel et al., 1991; Marchand, 1991; Amara et al., 2000). Les G0 se concentrent dans les zones peu profondes (< 5 m) à substrat fin (sableux à vaseux) avec une préférence pour les substrat vaseux (voir figure 5B Chapitre 1), ce qui correspond aux préférences de substrat et de profondeur connues pour les juvéniles de cette espèce (Rogers, 1989; Jager et al., 1993; Le Pape et al., 2003b). On remarque que le pic de densité n'est pas observé en mai mais qu'il est plus tardif sur les stations situées au niveau des embouchures de fleuve, à savoir la Sèvre Niortaise et la Charente (PB 3 et PA 3 : en octobre et juin, respectivement). Un des facteurs majeurs pouvant contrôler la colonisation des juvéniles G0 de sole dans les estuaires est le gradient de salinité (Marchand & Masson, 1989; Marchand, 1991; Champalbert *et al.*, 1994; Amara *et al.*, 2000). Ainsi, il est envisageable que les apports en eau douce favorisent la colonisation de zones situées plus en amont que ces stations.

Entre mai et juin, on note une nette diminution de la densité dans les stations les plus côtières (à l'exception de PB 3 et PA 3). Chez la plie, *Pleuronectes platessa*, la phase de fixation benthique est généralement associée à de fortes mortalités reliées à la densité des nouveaux colons et à la prédation (Nash & Geffen, 2000; Pihl *et al.*, 2000; Wennhage, 2002). Cependant, à notre connaissance, ce type de mortalité massive n'a pas été décrit chez la sole et la baisse des densités qui fait suite à la colonisation est plutôt associée à une dispersion des individus (Dorel et al., 1991; Amara et al., 2000; van der Veer et al., 2001). Dans le pertuis Breton, la baie de l'Aiguillon semble correspondre à la population la plus stable, avec de fortes densités comprises entre 40 et 100 ind 1000 m² de juin à octobre. Enfin, des variations interannuelles sont apparues pour la station PB 2, déjà suivie en 2004 : les densités y sont particulièrement faibles en 2005, différence qui pourrait être due à la présence en grande quantité de coquilles de moules recouvrant le substrat (Durieux, données non publiées). Ces observations évoquent les travaux de Le Pape et al. (2004) démontrant l'effet négatif de

l'espèce de mollusque invasive, *Crepidula fornicata*, sur les densités de juvéniles G0 de sole du fait de la réduction de la disponibilité en substrat meuble.

4.2. Variabilité spatiotemporelle de l'infestation

Au cours de leur installation dans les différentes zones échantillonnées des pertuis Charentais, les juvéniles G0 de sole subissent une accumulation de métacercaires de 4 taxons de Digènes, *Proisorhynchus crucibulum*, *Proisorhynchus* sp. A, *Timoniella* spp. et *Podocotyle* sp.. En terme de diversité de taxons, ceci est en accord avec ce qui a été précédemment rapporté chez les juvéniles G0 de sole dans différentes nurseries du golfe de Gascogne (Durieux et al., 2007a). En terme de dynamique temporelle de l'infestation, les résultats confirment ce qui avait déjà été mis en évidence sur PB 2 en 2004 pour *P. crucibulum* et *Timoniella* spp., avec une stabilisation des niveaux d'infestation à partir d'août (Durieux et al., 2007b). Toutefois, cette même station a permis de mettre en évidence une variabilité interannuelle de l'infestation, avec une augmentation des abondances moyennes entre 2004 et 2005. Un suivi sur un plus long terme permettrait de confirmer cette observation. En ce qui concerne *Podocotyle* sp., l'infestation est plus tardive et elle est observée uniquement à partir d'août avec un maximum en octobre.

L'hétérogénéité spatiotemporelle de l'infestation parasitaire des hôtes intermédiaires au sein de leur habitat a déjà été observée dans de nombreux systèmes hôte – parasite (Marcogliese *et al.*, 2001; Smith, 2001; Latham & Poulin, 2003; Fredensborg *et al.*, 2006; Thieltges & Karsten, 2007). Cependant peu d'études se sont intéressées aux patrons d'infestation de Digènes chez les deuxièmes hôtes intermédiaires Téléostéens, en particulier en milieu marin. Marcogliese *et al.* (2001) ont montré en milieu fluvial que l'abondance des métacercaires de *Diplosotomum* spp. chez les deuxièmes hôtes intermédiaires (des G0 de perches, *Perca flavescens*, et des menés, *Notemigonus crysoleucas*) était liée aux populations de goélands, hôtes définitifs de ces parasites. Dans notre cas, les hôtes définitifs des Digènes qui infestent les juvéniles G0 de sole sont des Téléostéens piscivores (*i.e.* essentiellement bars et congres). Bien que l'on n'ait pas étudié la répartition spatiotemporelle des hôtes définitifs, leur présence semble relativement homogène dans les pertuis Charentais. Ceci nous permet de supposer que l'hétérogénéité spatiale de l'infestation chez les G0 de sole est essentiellement liée à la distribution des premiers hôtes intermédiaires.

Ainsi, pour les taxons dont les premiers hôtes intermédiaires sont connus, la variabilité spatiale de l'infestation apparaît liée à la distribution de leur population : à savoir *Mytilus* sp., *Hydrobia ulvae* et *Littorea* sp. pour *P. crucibulum*, *Timoniella* spp. et *Podocotyle* sp., respectivement. En effet, l'abondance, la proximité du premier hôte intermédiaire et la capacité de dispersion des cercaires sont considérées comme les facteurs locaux majeurs gouvernant l'accumulation de métacercaires de Digènes chez les G0 de sole (Durieux et al., 2007a). Au niveau des zones de culture de moules sur bouchots (stations PB 1, PB 2, PA 2 et PA 3) (Gouilletquer & Le Moine, 2002), les soles présentent des niveaux d'infestation élevés par *P. crucibulum* alors que les individus capturés hors des zones mytilicoles présentent de très faibles niveaux d'infestation. Ces résultats confirment que l'accumulation de métacercaires de *P. crucibulum* chez les G0 de sole est restreinte aux zones de bouchots, ce qui, par ailleurs, a été mis en évidence grâce à des infestations expérimentales *in situ* (Chapitre 6). De même, les individus capturés dans ou à proximité de vasières intertidales hébergeant de fortes densités d'*Hydrobia ulvae* (Sauriau et al., 1989; Hauboïs et al., 2004; Degré, 2006; Bocher et al., 2007), présentent des niveaux d'infestation élevés par *Timoniella* spp., en particulier au niveau de la baie de l'Aiguillon, site qui héberge une importante population d'hydrobies (Degré, 2006). Certains sites (stations PB 4 et PA 1) localisés dans des zones où les moules sont absentes sont caractérisés par l'infestation des G0 par *Prosorhynchus* sp. A. Cela semble exclure les moules comme premiers hôtes intermédiaires, on suppose donc qu'un autre bivalve, en l'occurrence sauvage, est supposé jouer ce rôle. Enfin, dans les sites proches de substrats durs, les soles présentent des infestations par *Podocotyle* sp., ce qui reflète la présence de *Littorina* sp. (Sauriau et al., 1989).

4.3. Utilisation des métacercaires comme marqueurs biologiques

Les résultats des analyses factorielles discriminantes montrent que les taux de re-classification augmentent au cours du temps et sont maximaux en août. En mai, les faibles niveaux d'infestation ou l'absence d'infestation par certains taxons permettent de discriminer uniquement les individus de la baie de l'Aiguillon (PB 3). En revanche, dès l'échantillonnage de juin, les individus de stations distantes de seulement quelques kilomètres présentent des assemblages de parasites significativement différents qui permettent un taux de reclassement correct des individus, généralement élevé, compris en moyenne entre 74 et 84 % par pertuis. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus à de larges échelles spatiales entre stocks de Téléostéens marins distincts (Blaylock et al., 2003; Moore et al., 2003; McClelland et al.,

2005). Mais surtout ils sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus sur la même espèce sur des individus du même âge en système estuarien par marquage – capture – recapture (Coggan & Dando, 1988). Ces auteurs ont montré sur une période d'environ 50 jours, que 87 % des individus restaient sur la station où ils avaient été capturés, les autres étant recapturés sur des stations adjacentes, ce qui semblait démontrer la forte sédentarité des juvéniles G0 de sole en estuaire. Par ailleurs, cette forte sédentarité des juvéniles G0 de sole avait aussi été suggérée à travers des mesures de contaminants bioaccumulés par des individus échantillonnés dans différentes sous parties de l'estuaire de la Seine qui présentaient les mêmes variations spatiales des teneurs de contaminants que celles observées dans le milieu (Loizeau, comm. pers). Ces résultats déjà obtenus en milieu naturel en estuaire, d'une part, confortent l'utilisation des parasites comme marqueurs naturels afin d'inférer sur les mouvements des juvéniles G0 de sole et, d'autre part, valident les résultats obtenus dans un système de baie. Nos résultats montrent ainsi de manière générale une forte sédentarisation des juvéniles G0 de sole de juin jusqu'à l'automne dans les zones peu profondes des pertuis Charentais. En conditions expérimentales de laboratoire, une nette diminution de l'activité natatoire des juvéniles G0 de sole entre juin et juillet avait été observée par vidéo-tracking, avec des niveaux d'activité restant très bas jusqu'à l'automne (Chapitre VIII). Cette sédentarité s'observe particulièrement bien dans les zones de bouchots et au niveau de la baie de l'Aiguillon. En revanche, en milieu plus ouvert, potentiellement plus exposé à la houle, la forte diminution de la densité observée sur la station PB4, et ce malgré une forte colonisation, pourrait s'expliquer soit par une mortalité différentielle localement (liée à une prédation plus importante) ; soit parce que les individus ont progressivement quitté la zone pour migrer dans une autre sous partie de l'habitat ce qui semble l'hypothèse la plus envisageable. En octobre, la nette augmentation de la densité sur les stations plus profondes (PB 5, PA 4) couplée à une forte variabilité interindividuelle de l'infestation sur ces stations, indiquerait la dispersion et le mélange des individus vers les zones plus profondes à cette période. La migration pré-hivernale des juvéniles de sole vers des zones plus profondes est en général reliée à l'augmentation de taille des individus et à la baisse des températures (Dorel et al., 1991; van der Veer et al., 2001). Cependant, la sédentarité demeure forte encore à cette période, ce qui semble indiquer que seulement une partie des individus a initié cette migration.

4.4. Performances de croissance des G0: qualité de l'habitat des pertuis Charentais

Dans notre étude, on observe une forte variabilité de l'indice de condition de Fulton chez les juvéniles G0, et aucune tendance nette entre station ne peut être dégagée. La teneur en eau des individus ainsi que le taux de réplétion du tube digestif, induisent effectivement une importante variabilité de cet indice morphométrique relatif à l'embompoint des individus. Gilliers et al. (2004; 2006a; 2006b) ont notamment montré que cet indice était un indicateur peu sensible de la qualité de l'habitat des juvéniles G0 de sole. La croissance, quant à elle, se révèle un indicateur particulièrement pertinent, car beaucoup plus intégrateur des conditions environnementales rencontrées (Le Pape et al., 2003c; Gilliers et al., 2006b). Comme l'analyse parasitaire montre une sédentarité à petite échelle dans les pertuis Charentais, il est possible d'en déduire que l'évolution de la taille des individus sur une station reflète l'ensemble des conditions environnementales rencontrées sur cette zone. C'est ce que démontrent nos résultats, avec une croissance nettement différentielle entre zones de la nourricerie et ce quasiment à partir de la colonisation. On remarque que Le Pape (2005) avait mis en évidence une variation de la taille des juvéniles G0 de sole dans l'estuaire de la Seine, variation qu'il attribuait à un gradient de contamination chimique. De manière générale, cette variabilité spatiale de croissance au sein de l'habitat juvénile a déjà été observée chez différentes espèces de Pleuronectiformes grâce à des expériences en cages (Able et al., 1999; Phelan et al., 2000; Nécaise et al., 2005), au suivi de l'indice ARN / ADN (corrélé à la croissance somatique) (Malloy et al., 1996; Yamashita et al., 2003) et à la comparaison entre croissance potentielle et croissance réalisée (Hurst & Abookire, 2006). Ces auteurs évoquent différents facteurs (tels que la structure de l'habitat, la température, la concentration en oxygène, la granulométrie et les abondances de proies) pour expliquer ces variations de croissance.

L'idée que le parasitisme intervient comme l'un des facteurs pouvant expliquer les différences de croissance observées n'est pas cohérente avec les résultats de notre étude. En effet, les individus de PB 3, qui ont les performances de croissance les plus grandes, présentent aussi de très forts taux d'infestation par *Timoniella* spp.. De même, les individus de PA 2, ont des performances de croissance similaires à ceux de PA 1, alors qu'ils ont des taux d'infestation par *P. crucibulum* beaucoup plus élevés. Nous avons montré de manière expérimentale (Chapitre VI) que les juvéniles de sole peuvent compenser la perte énergétique engendrée par les infestations de *P. crucibulum* en terme de croissance et de condition. Ainsi, dans cette étude, même si le parasitisme peut effectivement être considéré comme un facteur de stress additionnel, celui-ci ne peut pas expliquer les différences de croissance et de

condition observées. Dans les zones échantillonnées des pertuis Charentais, les conditions hydrologiques étaient relativement homogènes durant la période de l'étude (Fillon, com pers), en particulier la température, variable physique la plus forçante pour la croissance de la sole (Howell, 1997). Le type de substrat est vaseux pour toutes les stations sauf pour les stations du nord du pertuis Breton (PB 1, 2 et 5) qui présentent un substrat sableux (voir Figure 5, Chapitre I). Le Pape et al. (2007) ont récemment montré la relation entre la capacité d'accueil de l'habitat pour les G0 de sole et la présence de proies (macrofaune benthique) à l'échelle des différentes nourriceries du golfe de Gascogne. Ainsi on peut supposer qu'à l'échelle des pertuis Charentais la variabilité de la disponibilité en nourriture peut engendrer une variabilité des performances de croissance des juvéniles G0 de sole. La baie de l'Aiguillon héberge en effet un peuplement de macrofaune benthique divers et abondant, qui soutient une production importante (Degré, 2006), dont se nourrissent les juvéniles de sole leur permettant de maintenir des performances de croissance supérieures à celles des autres zones du pertuis Breton. Concernant le pertuis d'Antioche, aucune zone préférentielle ne se distingue sur les stations échantillonnées, on pourrait cependant envisager la présence d'un habitat plus favorable plus en amont de l'estuaire de la Charente ou plus au sud de la zone étudiée.

Notre étude montre que les juvéniles G0 de sole sont distribués assez largement dans les zones peu profondes à substrat meuble des pertuis Charentais. Toutefois, la qualité de l'habitat apparaît fortement hétérogène au niveau spatial. Ainsi, les densités et les performances de croissance atteintes à l'automne dans la baie de l'Aiguillon montrent clairement que cette zone peut être qualifiée de nourricerie *stricto sensu* pour les G0 de sole du pertuis Breton. Par rapport à la totalité de la surface de l'habitat utilisée par les juvéniles, seulement des zones très limitées dans l'espace présentent une qualité d'habitat élevée et peuvent être réellement qualifiée de nourricerie. Cette différence de qualité d'habitat à petite échelle est d'autant plus marquée du fait de la sédentarité des G0 dans les différentes zones de l'habitat. Cela apparaît particulièrement vrai au niveau des zones de bouchots puisque les individus s'y maintiennent, bien que les conditions de croissance soient largement sub-optimales. Cette sédentarité dans des zones de faible qualité avait notamment déjà été observée chez le flet pierre, *Kareius bicoloratus*, au Japon (Malloy et al., 1996). La forte sédentarité des juvéniles G0 de sole constitue sûrement un trait adaptatif de cette espèce de manière à limiter la dépense énergétique liée à l'activité natatoire, au même titre que l'enfouissement (Howell & Canario, 1987). Bien que cette stratégie métabolique rende les

juvéniles G0 de sole fortement tributaires des conditions environnementales locales de l'habitat, elle leur permet probablement aussi de limiter l'exposition aux prédateurs.

4.5. Conclusion

Cette étude apporte des informations nouvelles sur l'évolution saisonnière du système hôte – parasite, juvéniles G0 de sole – métacercaires de Digènes, dans les différents secteurs des pertuis Charentais. Les juvéniles G0 de sole se concentrent dans les zones peu profondes (0 – 5 m) de l'habitat à partir de mai. Les individus y accumulent localement des métacercaires de Digènes selon des assemblages qui dépendent fortement de la présence des premiers hôtes intermédiaires. Les métacercaires de Digènes peuvent ainsi être utilisées comme marqueurs biologiques afin d'inférer sur les mouvements des juvéniles G0 de sole dans l'habitat au cours de leur première période de croissance et ceci, à échelle spatiale fine. L'utilisation de ces marqueurs se révèle très performante et a permis de mettre en évidence la forte sédentarité des G0 de sole dans les différentes zones des pertuis Charentais. Par ailleurs, dans ces différentes sous-parties de l'habitat, les performances de croissance des individus se révèlent différentielles ce qui montre la variabilité de la qualité de l'habitat à petite échelle spatiale. Cela conduit (i) à souligner le rôle de nourricerie *stricto sensu* pour les juvéniles G0 de sole que joue la baie de l'Aiguillon dans le pertuis Breton et (ii) à suggérer que le facteur primordial influençant la qualité de l'habitat pour les G0 dans les pertuis Charentais est la disponibilité en nourriture.

L'identification de zones d'habitats préférentiels pour cette espèce d'intérêt économique majeur constitue une information essentielle pour la gestion de l'environnement marin côtier des pertuis Charentais. Cette étude renforce ainsi le besoin de protection, au sein du pertuis Breton, de la baie de l'Aiguillon, qui a le statut de réserve naturelle dans son intégralité depuis 1999. Cependant, la zone de la baie de l'Aiguillon située entre 0 et 5 m de profondeur fait partie de la zone de chalutage pour la flottille locale (Léauté, pers. comm.). Il apparaît donc essentiel de mettre en place des mesures de conservation plus ciblées dans cette zone afin de renforcer la fonction de nourricerie de cette zone. De plus, étant donné la présence d'une activité ancestrale de culture de moules sur bouchots dans une partie de la baie, une évaluation écologique de la qualité de l'habitat pour les juvéniles G0 de sole à une échelle fine au sein de la baie de l'Aiguillon devrait être entreprise dans un avenir proche afin d'évaluer l'impact de cette activité sur la fonction de nourricerie pour la sole. De même, dans

le pertuis d'Antioche, une évaluation de la qualité de l'habitat à plus petite échelle, en particulier au niveau de l'estuaire de la Charente et dans le sud du pertuis, s'avère nécessaire de manière à identifier s'il existe des sous-parties d'habitat qui pourraient être préférentielles dans cette zone. En outre, il existe une forte variabilité interannuelle en terme d'abondance et de croissance dans les habitats des juvéniles de Pleuronectiformes et notamment de la sole (van der Veer et al., 2001). Aussi, il serait important de compléter cette étude par un suivi à plus long terme afin d'analyser les sources de variabilité interannuelle de la qualité de l'habitat à petite échelle. Enfin, il faudrait déterminer les différents facteurs environnementaux qui modulent la qualité de l'habitat des juvéniles G0 de sole et l'influence relative de ces derniers sur les performances de croissance en milieu naturel. Il s'agirait de tester l'hypothèse selon laquelle la disponibilité en nourriture, à savoir la macrofaune benthique constituant les proies des juvéniles G0 de sole, est bien le facteur primordial discriminant de la qualité de l'habitat au niveau spatial.

Chapitre VI. Infestation *in situ* de juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, par des métacercaires de *Proisorhynchus crucibulum* (Digènes, Bucéphalidés) : effets sur la croissance et la condition

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer, de manière expérimentale : i) la dynamique spatiotemporelle de *Proisorhynchus crucibulum* entre le premier hôte intermédiaire, la moule, et un des deuxièmes hôtes intermédiaires, les juvéniles G0 de sole, *Solea solea* ; ii) l'effet des métacercaires de ce parasite sur la croissance et la condition de cet hôte. Des soles issues d'aquaculture ont subi des infestations *in situ* en cages dans le pertuis Breton en juillet 2005 sur deux stations A (dans une zone mytilicole de bouchots) et B (éloignée de 500 m vers le large) avec deux durées d'exposition par station (4 et 11 jours). Ensuite ces individus et des individus témoins (n'ayant pas subi d'infestations *in situ*), ont été élevés en conditions contrôlées pendant 3 mois et un suivi biométrique (longueur standard : L_S ; masse fraîche : M_W) a été effectué tous les 14 jours : l'indice de condition de Fulton (K) et le taux d'accroissement journalier (AGR L_S) en taille et en masse (AGR M_W) ont été calculés. Les individus des stations A4j et A11j présentaient une prévalence de 100 % et des abondances moyennes (\pm Erreur Standard, (minimum – maximum)) significativement différentes de $8,20 \pm 1,02$ (1 - 20) et $25,55 \pm 2,34$ (8 – 55) respectivement. Les soles des stations B4j et B11j ne présentaient pas de différence significative, avec une prévalence de 80 % et de 50 % et une abondance moyenne de $2,08 \pm 0,30$ et $1,36 \pm 0,47$ respectivement. Pour une même durée d'exposition les abondances moyennes de *P. crucibulum* était significativement supérieures sur la station A par rapport à la station B. Une relation positive significative entre la taille des individus pendant l'infestation et le nombre de métacercaires de *P. crucibulum* a été détectée. Sur l'ensemble de l'expérience de croissance aucun effet des métacercaires de *P. crucibulum* sur les différentes variables étudiées sur les juvéniles G0 de sole n'a été détecté (ANOVA à mesures répétées). L'indice de condition de Fulton (K) et l'AGR L_S obtenus au cours de l'expérience sont respectivement de $1,27 \text{ g cm}^{-3}$ et $0,40 \text{ mm j}^{-1}$. Ces résultats précisent que les infestations par *P. crucibulum* sont localisées aux zones de mytiliculture sur bouchots (avec un taux d'accumulation d'environ 2 métacercaires par jour). Cependant, malgré cette infestation les performances biologiques des juvéniles G0 de sole ne semblent pas modifiées, ce qui dénote leur capacité de compensation face au coût énergétique de ce parasitisme dans nos conditions expérimentales.

Mots clés : Pleuronectiformes – métacercaires – parasitisme – mytiliculture – performances biologiques

1. Introduction

Les parasites peuvent influencer la physiologie, la biologie, le comportement et l'écologie de leurs hôtes (Combes, 2001). Au niveau de l'organisme, le parasitisme représente toujours un surcoût énergétique aussi infime soit-il (Combes, 2001). Ce coût pour l'hôte peut être entraîné, d'une part, directement par prélèvement d'une partie de l'énergie de l'hôte pour le développement et le maintien des parasites et, d'autre part, indirectement par les réactions immunitaires associées qu'ils engendrent. Par ailleurs, pour le cas des parasites dits « manipulateurs », la manipulation en soi constitue aussi un coût certain pour l'hôte manipulé (Thomas et al., 2005a). Par conséquent, les parasites peuvent intervenir de manière significative dans la régulation de la dynamique des populations hôte (Anderson & May, 1979; May & Anderson, 1979).

Pour une espèce donnée, les mécanismes de régulation influençant les stades larvaires et juvéniles conditionnent la dynamique de la population adulte. Ainsi, en milieu marin les facteurs environnementaux influencent la croissance, la condition et la survie des jeunes stades, déterminant le niveau du recrutement à la population adulte (Leggett & Deblois, 1994). Les Pleuronectiformes constituent de très bons modèles biologiques pour étudier ce genre de mécanismes (van der Veer et al., 1994). En effet, les juvéniles se concentrent dans des nurseries côtières très localisées dans l'espace et le temps (Gibson, 1997). Dans ce type d'habitat essentiel, en général distinct de celui des adultes, les juvéniles sont très sédentaires et fortement soumis à la grande variabilité des facteurs environnementaux qui caractérise ces zones (Gibson, 1994). Les facteurs environnementaux habituellement pris en compte sont la température, la nourriture, l'oxygène, la salinité et les polluants (Yamashita et al., 2001). En revanche, le rôle du parasitisme dans la dynamique des populations marines demeure encore trop rarement pris en compte.

La sole est une espèce de Pleuronectiformes, largement distribuée dans la région de l'Atlantique Nord-Est, et elle est d'une importance notable sur le plan économique. Bien que sa biologie ait été largement étudiée, le parasitisme est un aspect de sa biologie jusqu'ici ignoré. Une infestation parasitaire importante des juvéniles G0 de sole par des métacercaires de *Proisorhynchus spp.* (Digènes, Bucéphalidés) a été montrée par Laffargue et al. (2004), puis Durieux et al. (2007b) ont ensuite précisé la dynamique temporelle de l'infestation par *P.*

crucibulum des juvéniles G0 dans les zones de culture de moules sur bouchots. En effet, le premier hôte intermédiaire de *P. crucibulum* est la moule *Mytilus* spp.. Coustau et al. (1990) ont montré qu'une espèce très proche, *P. squamatus*, entraînait la castration des moules *Mytilus edulis*. Différentes espèces de Téléostéens benthiques de petite taille, dont en l'occurrence les juvéniles de sole, servent de deuxième hôte intermédiaire et sont infestés activement par pénétration, directement à travers la peau, des cercaires qui s'enkystent dans le corps en métacercaire (Matthews, 1973). Enfin, l'hôte définitif est principalement le congre, *Conger conger*, infesté par voie trophique en consommant le deuxième hôte intermédiaire (Matthews, 1973). Différents travaux ont mis en évidence les effets négatifs qu'engendrait le coût énergétique de l'infestation par les métacercaires de certaines espèces de Digènes, sur la condition et même la mortalité de certains Téléostéens d'eau douce par des études de terrains (Coleman & Travis, 1998; Johnson & Dick, 2001) et expérimentaux (Lemly & Esch, 1984; Collyer & Stockwell, 2004).

La première hypothèse de travail de cette étude est que les juvéniles d'âge 0 (G0) de sole sont infestés et accumulent les métacercaires de Digènes dans les zones d'élevage du premier hôte intermédiaire (la moule). La deuxième hypothèse est que le coût énergétique entraîné par ce parasite altère les performances biologiques de son hôte. Les objectifs de la présente étude étaient donc de vérifier de manière expérimentale, d'une part, la dynamique spatiotemporelle de l'infestation par *Proisorhynchus crucibulum* chez les G0 de sole par rapport aux zones mytilicoles et, d'autre part, les effets de ce parasite sur la croissance et la condition de son hôte. En effet, la croissance, de même que la condition, sont des paramètres intégrateurs des capacités intrinsèques d'adaptation d'un organisme face aux variations de facteurs environnementaux, ce qui en fait de bons indicateurs des performances biologiques d'une espèce. Le but était donc tout d'abord d'obtenir des infestations *in situ* en cages en contrôlant à la fois la position par rapport au premier hôte intermédiaire et la durée d'exposition. Ceci permet de montrer de manière expérimentale la dynamique spatiotemporelle de l'infestation et d'obtenir des juvéniles G0 de sole présentant différents niveaux d'infestation. Ensuite, les individus infestés ainsi que des individus témoins ont été élevés en conditions expérimentales contrôlées de manière à détecter une éventuelle altération des performances de croissance ou de condition due au parasitisme.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Des juvéniles G0 de sole (éclos le 13/02/2005), ont été obtenus en mai 2005 (20/05/2005) dans une ferme aquacole (Solea BV, Ijmuiden, Pays Bas) afin de s'assurer que les individus utilisés dans l'expérience aient la même origine génétique et n'étaient au départ pas infestés par des métacercaires de Digènes. Après une période de deux semaines d'acclimatation (03/06/2005), toutes les soles ont été individuellement marquées grâce à des marques souples VI alpha (Northwest Marine Technology, Inc.), étiquetées avec un code alphanumérique. Chaque individu a reçu un implant sous-cutané, sous anesthésie (Eugénol, 0,025 ml l⁻¹), dans la région médiane de la face aveugle, juste sous la nageoire dorsale. Les soles ont été maintenues en conditions expérimentales de mai à juin (voir section conditions expérimentales).

2.2. Infestation *in situ* par des métacercaires de *Proisorhynchus crucibulum*

En juillet (08/07/2005), période d'émission maximale des cercaires de *P. crucibulum* (Durieux et al., 2007b), des infestations *in situ* par *P. crucibulum* ont été réalisées en utilisant des cages parallélépipédiques (L x l x h: 80 x 40 x 15 cm) construites à partir d'un grillage plastique d'un maillage de 1 cm. Les cages ont été placées sur le fond (environ 2,5 m de profondeur) en plongée subaquatique par des plongeurs professionnels. Chaque cage était fixée au substrat par deux U en métal de 40 cm disposés aux deux extrémités, reliées par une chaîne en fer de 1,5 m à une ancre de 10 kg elle-même reliée par un filin en polyuréthane de 15 m à une bouée de signalisation en surface. Quatre cages (n = 35 par cage) ont été placées sur deux stations localisées dans une zone éloignée des populations d'hydrobies afin d'éviter des co-infestations par *Timoniella* spp. : station A (46°20'100", 1°21'000") située au cœur d'une zone de culture de moules sur bouchot, station B (46°19'900", 1°21'200"), située 500 m plus au large perpendiculairement à la côte (Figure 1.). Deux durées d'exposition par station ont été faites correspondant à chaque cage (4 et 11 jours). Le coefficient de marée était de 72 le 08/07/2005 et a diminué jusqu'à 45 le 15-17/07/2005 puis a re-augmenté pour atteindre 62 le 19/07/2005, jour de retrait des dernières cages. Un lot d'individus témoins a été maintenu en conditions contrôlées au laboratoire (n = 35). A l'issu de la phase

d'infestation *in situ*, les soles ont été ramenées au laboratoire et remis en condition expérimentale d'élevage pour le suivi de croissance et de condition sur une période de 12 semaines.

Remarque : une troisième station avait été disposée dans le même axe à 1000 m de la zone de bouchots (46°20'100", 1°21'000"), malheureusement celle-ci n'a pu être récupérée car elle n'était plus présente sur zone au bout des 4 premiers jours d'exposition.

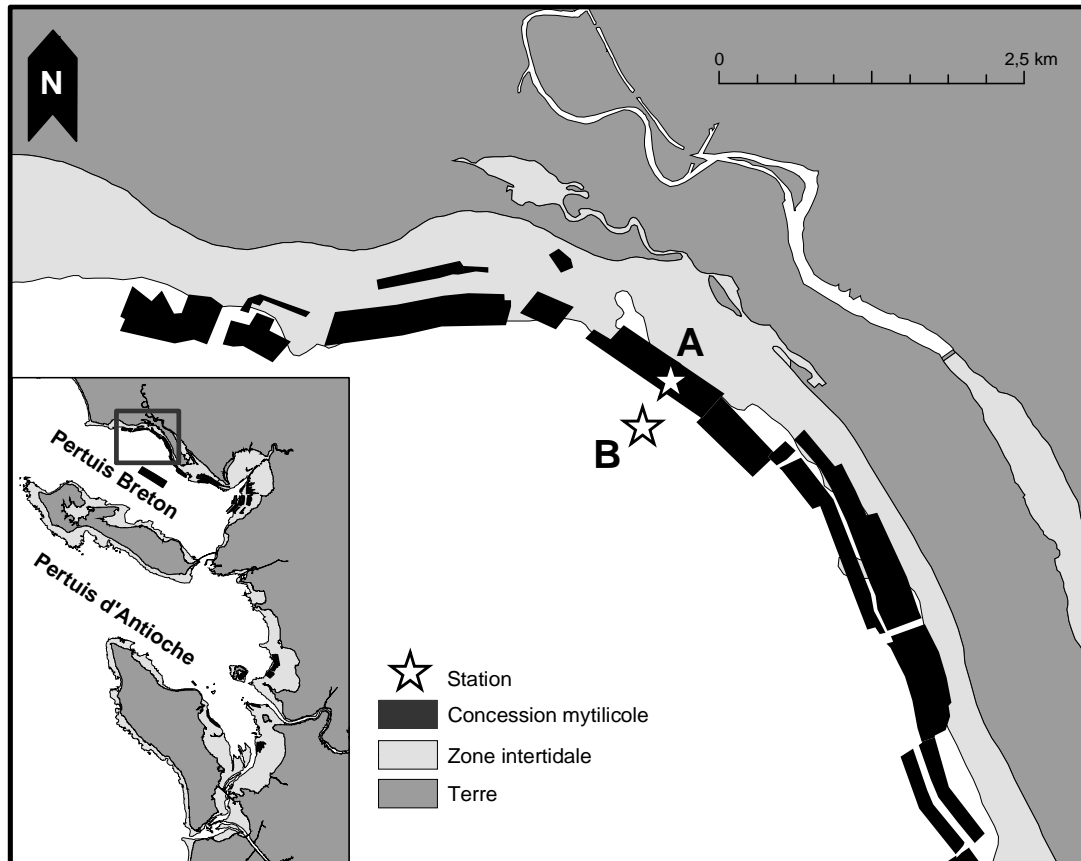


Figure 1. Localisation de la station A, dans une zone mytilicole sur bouchots, et B, éloignée de 500 m. Sur chacune des deux stations, deux cages, correspondant chacune à une durée d'exposition (4 et 11 jours, respectivement), contenant des juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, (n = 35 par cage) ont été placées en plongée subaquatique sur le fond en juillet 2005, afin de réaliser des infestations *in situ* par *Prosorhynchus crucibulum*.

2.3. Conditions expérimentales

L'élevage expérimental a été réalisé dans deux bacs de 400 litres (surface du fond : 1 m²) situés à l'intérieur du laboratoire de terrain du marais expérimental du CRELA à L'Houmeau. Les bacs étaient alimentés en continu par un circuit ouvert en eau de mer pompée directement dans le bassin de réserve du marais expérimental du laboratoire, lui-même alimenté en eau de mer lors des marais de vives eaux (Laffargue, 2004). Chaque bac

était équipé d'un aérateur afin de maintenir une concentration en O₂ proche de la saturation (100%), la croissance de la sole étant limitée à partir de 40 % de saturation (Couturier, pers com). L'eau de mer était préalablement filtrée sur 5 µm afin d'éviter une éventuelle pénétration de cercaires dans notre système d'élevage. Le fond des bacs expérimentaux était recouvert de sable fin pour permettre l'enfouissement des soles, car l'enfouissement permet aux juvéniles de sole de réduire leur métabolisme basal (Howell & Canario, 1987). Les soles étaient nourries *ad libitum* par distributeur automatique (de 20:00 à 02:00) avec des granulés commerciaux spécifiques à l'élevage de la sole commune (Dana 2848 : 48 % de protéines et 28 % de lipides). Les soles étaient soumises à la photopériode naturelle [la durée du jour est passée de 15 h en juillet (22/07/2005), début d'expérience, à 11 h en octobre (13/10/2005), fin d'expérience) et aux variations naturelles de température et de salinité du marais expérimental. La température et la salinité ont été enregistrées en continu directement dans les bacs d'élevage sur toute la durée de l'expérience grâce à une sonde. Au cours de la durée de l'expérience, la température moyenne de l'eau était comprise entre 13,6 et 26,5 °C (Figure 2) avec des variations jour / nuit relativement importantes de l'ordre de 5°C. En effet, la température de l'eau du marais est étroitement liée à celle de l'air du fait de la faible profondeur et du renouvellement discontinu de l'eau des bassins du marais expérimental. La salinité était relativement élevée, comprise entre 36,3 et 40,1, sur la période où les mesures ont pu être obtenues. Tous les individus appartenant aux différents groupes ont été mélangés aléatoirement dans les deux bacs afin d'éviter tout « effet bassin ». La densité était d'environ 63 individus m⁻² pour chaque bac au cours de l'expérience.

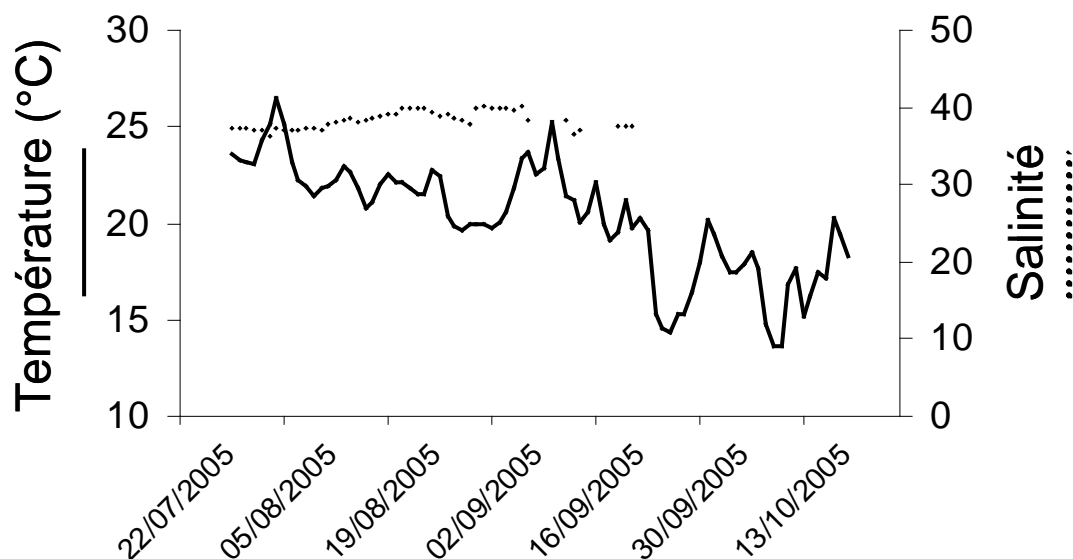


Figure 2. Variations de la température de l'eau, de la salinité et de la durée du jour au cours de l'expérience après infestation *in situ*. Remarque : du fait d'un problème technique, les données de salinité n'ont plus été disponibles à partir du 14/09/05.

2.4. Suivi biométrique et analyse épidémiologique

Les individus ont été mesurés en longueur standard (L_S) (au mm près) et pesés en masse fraîche (M_W) (au 0.01 g près) individuellement tous les 14 jours à partir du 22/07/05, c'est à dire 3 jours après le retour des individus des cages A11j et B11j, ce qui a constitué un total de 7 biométries (notée de 1 à 7). Avant chaque biométrie, les individus étaient anesthésiés (Eugénol à 0,025 ml l⁻¹). A la fin de l'expérience, les individus ont été sacrifiés par une overdose d'anesthésique. Les individus ont été pelés, puis disséqués sous loupe binoculaire, afin de localiser, identifier et compter les parasites. Sur les 175 individus au départ de l'expérience, 126 ont terminé l'expérience [25 sont morts lors du séjour des cages en mer ; 24 ont été sous échantillonnés au hasard à deux semaines après les infestations *in situ* afin de vérifier en cours d'expérience le succès de ces infestations (données non présentées ici)].

2.5. Analyse des données

Les indices épidémiologiques : prévalence (P% : pourcentage d'individus infestés), abondance moyenne (Ab : nombre moyen de parasites par individu) et intensité (I : nombre moyen de parasites par individu infesté) ont été calculés d'après Bush *et al.* (1997) sur l'ensemble des soles disséquées (Tableau 1). Un taux moyen d'accumulation de parasites a pu être calculé en nombre de parasites par jour en divisant l'abondance moyenne par le nombre de jours d'exposition : $T_a = Ab / n_j \text{ expo}$. Les valeurs sont données comme moyenne \pm SE (erreur standard) pour l'abondance moyenne et l'intensité moyenne (maximum). L'indice de condition de Fulton a été calculé comme $K = (M_W \times 100) / L_S^3$, avec M_W en g et L_S en cm. Le taux de croissance journalier en taille (mm j⁻¹) et en masse fraîche (g j⁻¹) a été calculé comme $AGR L_S = L_{St2} - L_{St1}$ et $AGR M_W = M_{Wt2} - M_{Wt1}$. Les valeurs sont données comme moyenne \pm SD (écart type) pour la taille (L_S), masse fraîche (M_W), K, $AGR L_S$ et $AGR M_W$.

Les abondances de parasites n'étant pas distribuées de manière normale, les abondances de parasites entre cages (durée d'exposition et station) ont été comparées deux à deux à l'aide du test non paramétrique de Mann Whitney (MW). La relation entre la taille de l'hôte à l'issue des infestations *in situ* et l'abondance de parasites a été analysé par corrélation non paramétrique de Spearman (SC). Etant donné la variabilité de l'infestation au sein de chaque groupe d'infestation *in situ*, les individus ont été reclassés par niveaux d'infestation de

10 en 10 jusqu'à 20 puis supérieur à 20 (0, 1-10, 11-20, 21-55). Ces niveaux d'infestation ont été définis par rapport à l'intensité moyenne de *P. crucibulum*, d'environ 20 métacercaires par juvéniles G0 de sole, telle qu'elle est atteinte en zone de bouchots (Durieux et al., 2007b).

Les tailles, masses, indice de Fulton, taux de croissance en taille et en poids ont été comparés entre groupes (cages et classes d'infestation) pour une biométrie donnée (1 à 7) par analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivi de test post hoc de Tukey, puis uniquement entre classes d'infestation pour toutes les mesures effectuées dans l'expérience par analyse de variance à mesures répétées (RM MANOVA). Les tests statistiques sont considérés significatifs pour $\alpha = 0,05$.

3. Résultats

3.1. Infestation *in situ*

Les individus témoins ne présentaient aucun parasite. En revanche, les individus placés dans des cages ont été infestés *in situ* presque uniquement par des métacercaires de *P. crucibulum*. En effet, seulement 4 individus (un par groupe ayant été soumis aux infestations *in situ*), présentaient un spécimen de *Proisorhynchus aculeatus*. Etant donné la très faible abondance de ce parasite, ainsi que sa relativement petite taille en comparaison à *P. crucibulum*, l'effet de cette infestation n'est pas pris en compte dans cette étude. Sur la station A, la prévalence pour les groupes A4j et A11j était de 100 %, alors que celle de la station B était de 80 % et 50 % pour les groupes B4j et B11j respectivement (Tableau 1). Pour une même durée d'exposition, les abondances moyennes de *P. crucibulum* étaient significativement supérieures sur la station A que sur la station B (4j : MW, $U_{25, 25} = 563,5$, $p < 0,0001$; 11j : $U_{31, 14} = 434$, $p < 0,0001$) (Tableau 1, Figure 2). Pour la station A, les individus ayant été exposés 11 jours, présentent une abondance moyenne de $25,55 \pm 2,34$, significativement supérieure à ceux ayant été exposés 4 jours ($8,20 \pm 1,02$) (MW, $U_{25, 31} = 46,5$, $p < 0,0001$) (Tableau 1, Figure 2). En revanche pour la station B, aucune différence significative n'a été détectée en abondance de *P. crucibulum* entre les deux durées d'exposition 4 jours et 11 jours, avec respectivement $2,08 \pm 0,30$ et $1,36 \pm 0,47$ (MW, $U_{25, 14} = 228,5$, $p > 0,05$) (Tableau 1, Figure 2).

Tableau 1. Paramètres épidémiologiques : prévalence (P%), abondance moyenne (Ab ± SE), intensité moyenne (I (min – max)) et taux d'accumulation moyen (nombre de métacercaires par jour) des différents groupes de juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, ayant été soumis aux infestations *in situ* en cages par *Proisorhynchus crucibulum*

	N	P%	Ab	I (min - max)	taux d'accumulation moyen
A4j	25	100	8,20 ± 1,02	8,20 (1 - 20)	2,05
A11j	31	100	25,55 ± 2,34	25,55 (8 - 55)	2,32
B4j	25	80	2,08 ± 0,30	2,60 (0 - 5)	0,52
B11j	14	50	1,36 ± 0,47	2,71 (0 - 6)	0,12

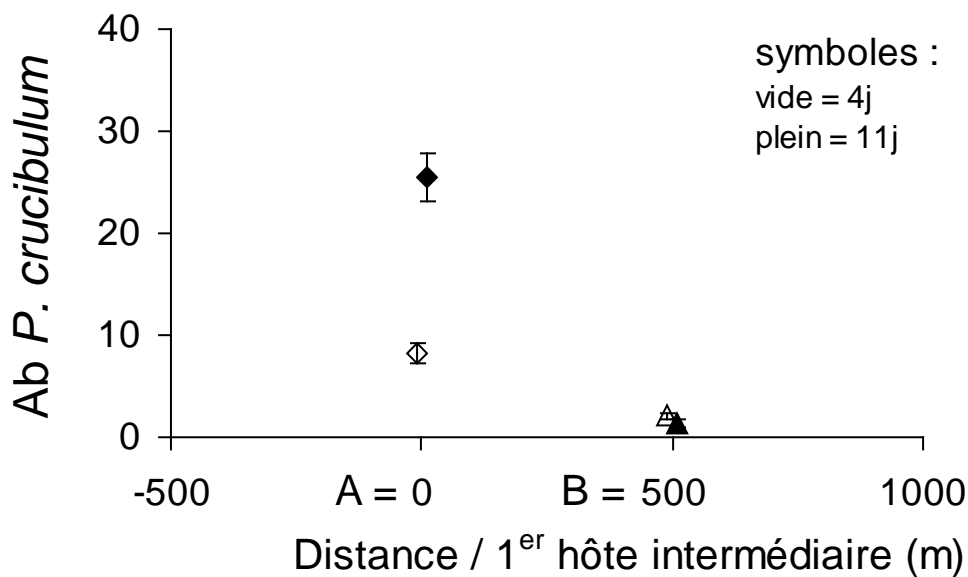


Figure 2. Relation entre l'abondance moyenne (Ab ± SD) des métacercaires de *Proisorhynchus crucibulum* et la distance par rapport au premier hôte intermédiaire (moules cultivées sur bouchots), chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés *in situ* en cages (station A : 4j et 11j ; station B 4j et 11j).

Une relation positive significative entre la taille de l'hôte (à l'issue de l'exposition en cage) et l'abondance de *P. crucibulum* a été détectée uniquement pour les individus du groupe A11j (SC : R = 0,523 ; p = 0,003) (Figure 3).

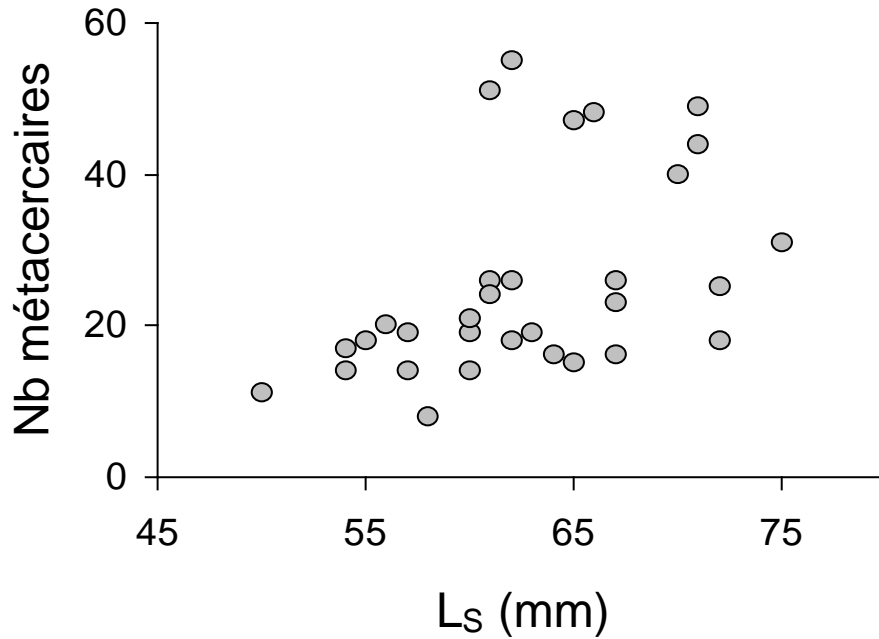


Figure 3. Relation entre la taille des juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, et le nombre de métacercaires de *Proisorhynchus crucibulum* pour le groupe A11j, à l'issue de l'exposition en cage.

3.2. Croissance et condition

Remarque : Au cours de l'expérience, aucune mortalité liée au parasitisme n'a eu lieu.

Aucune différence significative n'a été détectée pour L_{S1} ni entre cages ni entre classes (Tableau 2 et 3). Il existe une différence significative entre cages pour M_{W1} (Tableau 2 et 3), entre A11j, B11j et Témoin (test post hoc, $p = 0,003$ et $p = 0,004$, respectivement), et K1 (Tableau 2 et 3), entre A11j, B11j et Témoin (test post hoc, $p > 0,001$ et $p = 0,003$ respectivement). Il existe une différence significative entre cages pour M_{W2} (Tableau 3) entre A11j et Témoin (test post hoc, $p = 0,042$). Indépendamment du parasitisme, on note ainsi l'effet négatif de l'exposition en cages sur la masse et l'indice de condition dû au jeun forcé. Il n'existe pas de différence significative pour L_{S1} entre classes. Il existe une différence significative entre classes d'infestation uniquement pour K1, entre classe 0 et classe 21 à 55 (test post hoc, $p = 0,04$) (Tableau 3). K1 a donc été exclu de l'analyse RM MANOVA portant sur K afin d'éliminer le biais initial induit par le traitement.

Tableau 2. Longueur standard (L_S) en mm, masse fraîche (M_W) en g indice de condition de Fulton (K) en $g\ cm^{-3}$ des différents groupes (4 groupes ayant subi l'infestation *in situ* ainsi que le lot témoin) de juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, pour la première biométrie (1).

	N	L_S1	M_W1	K1
A4j	25	$62,56 \pm 6,87$	$3,12 \pm 1,22$	$1,22 \pm 0,21$
A11j	31	$62,75 \pm 6,04$	$2,82 \pm 0,9$	$1,11 \pm 0,15$
B4j	25	$63,56 \pm 5,69$	$3,13 \pm 0,89$	$1,19 \pm 0,11$
B11j	14	$61,08 \pm 8,94$	$2,6 \pm 1,16$	$1,1 \pm 0,20$
Témoin	31	$66,23 \pm 5,92$	$3,8 \pm 1,09$	$1,29 \pm 0,18$

Tableau 3. Résumés des résultats d'ANOVA à un facteur pour les comparaisons de longueur standard (L_S), masse fraîche (M_W), indice de condition de Fulton (K) des juvéniles G0 de sole *Solea solea* entre (i) groupes d'infestation *in situ* et entre (ii) classes d'infestation, par des métacercaires de *Prosorhynchus crucibulum*, pour la première biométrie (1). dll : degrés de libertés ; F : valeur de la statistique F ; p : probabilité associée

	variables	dll	erreur dll	F	p
entre groupes d'infestation <i>in situ</i> (avec témoin)	L_S1	4	121	2,006	0,098
	M_W1	4	121	4,597	0,002
	K1	4	121	5,702	< 0,001
entre classes (avec témoin)	L_S1	3	122	1,656	0,18
	M_W1	3	122	1,723	0,166
	K1	3	122	2,967	0,035

Les individus sont passés (i) en taille de $63,54 \pm 6,71$ mm à $96,49 \pm 9,65$ mm en 83 jours, ce qui représente un taux de croissance moyen sur la durée de l'expérience de $0,40\ mm\ j^{-1}$, et (ii) en masse de $3,15 \pm 1,12$ g à $11,73 \pm 3,70$ g, ce qui représente un taux de croissance moyen sur la durée de l'expérience de $0,10\ g\ j^{-1}$ (Figure 4). L'indice de condition de Fulton moyen sur la durée de l'expérience était de $1,27 \pm 0,19\ g\ cm^{-3}$, il était minimal au début de l'expérience de $1,19 \pm 0,18\ g\ cm^{-3}$ et maximal fin septembre avec $1,40 \pm 0,19$ pour revenir à une valeur moyenne de $1,27 \pm 0,19\ g\ cm^{-3}$ à la fin de l'expérience (Figure 4). Sur la durée de l'expérience AGR L_S a varié entre 0,35 et $0,44\ mm\ j^{-1}$ avec le minimum observé fin septembre, AGR M_W a varié entre 0,07 et $0,16\ g\ j^{-1}$ avec le maximum observé fin septembre (Figure 5). Ainsi au cours de l'expérience la période de fin septembre semble correspondre à une période de stockage de réserve pour les individus G0.

Aucune différence significative n'a été détectée entre classes d'infestation pour L_S , M_W , K, AGR L_S et AGR M_W sur la durée de l'expérience (Tableau 4, Figure 4 et 5).

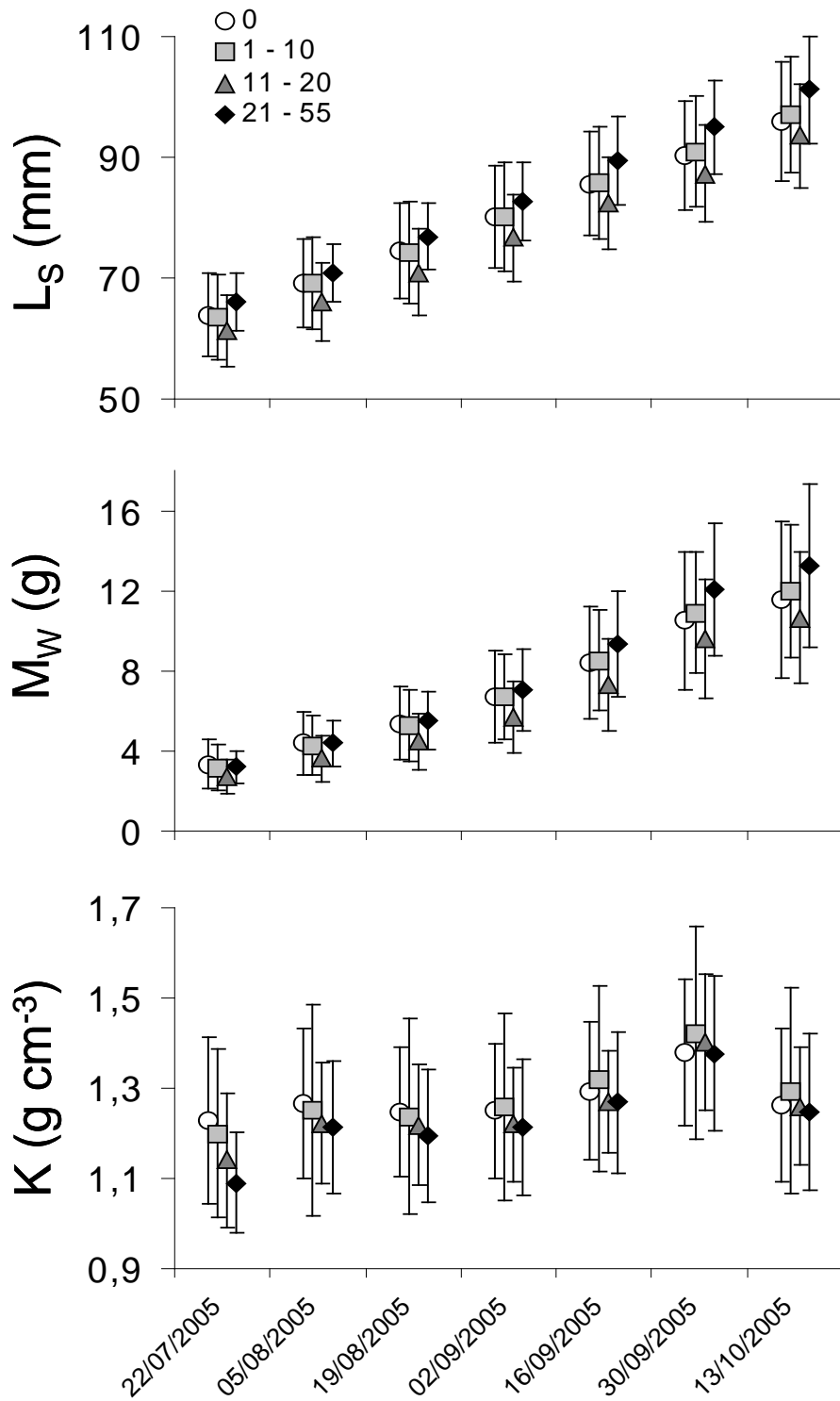


Figure 4. Longueur standard L_s (mm), Masse fraîche M_w (g) et indice de condition de Fulton K ($g\ cm^{-3}$) des juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, des quatre classes de différents niveaux d'infestation (0 : $n = 43$; 1-10 : $n = 45$; 11-20 : $n = 23$; 21-55 : $n = 15$) par *Prosorhynchus crucibulum*.

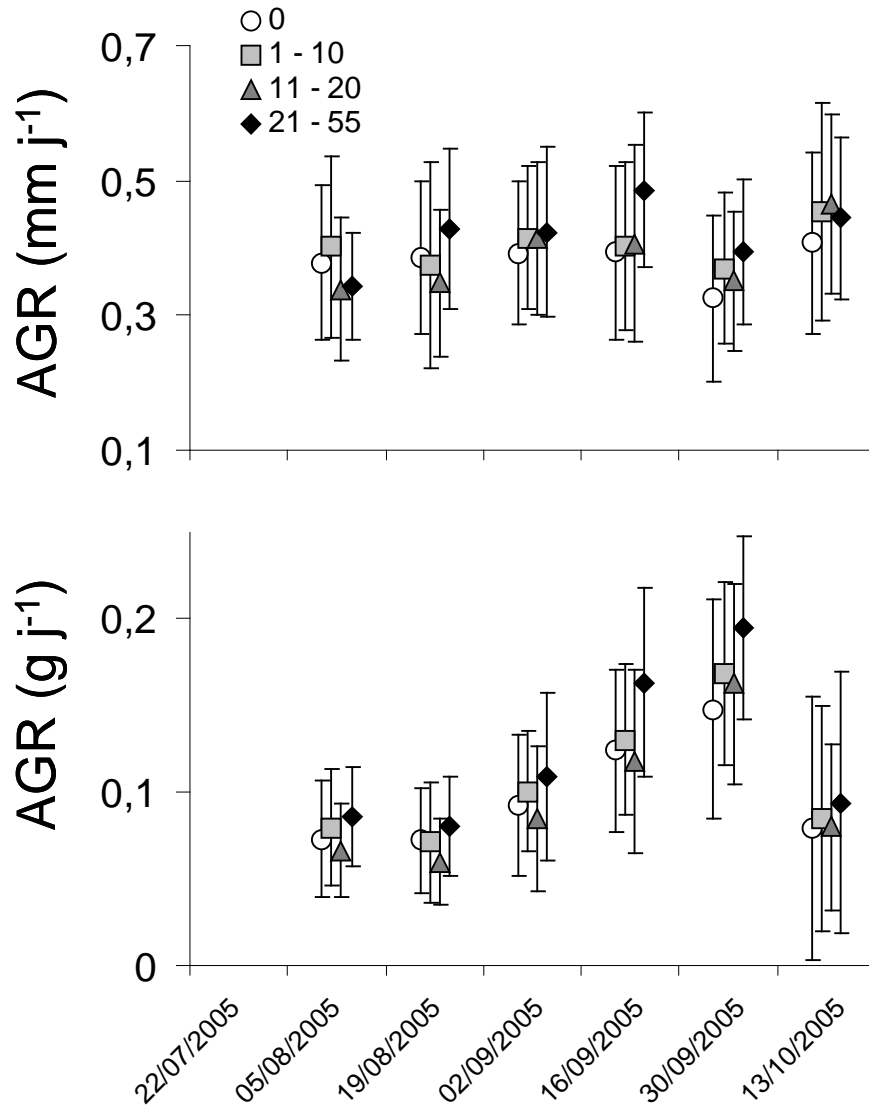


Figure 5. Taux d'accroissement journalier moyen (AGR) (en mm j^{-1} et en g j^{-1}) des juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, des quatre classes de différents niveaux d'infestation (0 : $n = 43$; 1-10 : $n = 45$; 11-20 : $n = 23$; 21-55 : $n = 15$) par *Prosorhynchus crucibulum*.

Tableau 4. Résumé des résultats de RM MANOVA pour les comparaisons de longueur standard (L_S), masse fraîche (M_W), indice de condition de Fulton (K), taux de croissance journalier (AGR) en taille (mm j^{-1}) et en masse (g j^{-1}) entre les 4 classes d'infestation (0 : $n = 43$; 1-10 : $n = 45$; 11-20 : $n = 23$; 21-55 : $n = 15$). dll : degrés de liberté ; F : valeur de la statistique F ; p : probabilité associée au test de Wilk.

	dll	erreur dll	Wilk's λ	F	p
L_S	18	331	0,825	1,298	0,186
M_W	18	331	0,841	1,16	0,293
K	15	326	0,863	1,193	0,276
AGR L_S	15	326	0,837	1,445	0,124
AGR M_W	15	326	0,864	1,184	0,282

Remarque : K1 a été exclus de l'analyse car une différence significative initiale due à l'exposition en cage a été constatée.

4. Discussion

Les infestations *in situ* réalisées permettent de confirmer de manière expérimentale la dynamique spatiotemporelle de *Proisorhynchus crucibulum* vis à vis de son premier hôte intermédiaire, la moule, et d'un de ces deuxièmes hôtes intermédiaires, en l'occurrence des juvéniles G0 de sole. On note une infestation très localisée dans l'espace, fortement liée à la présence du premier hôte intermédiaire : elle explique un taux d'accumulation moyen quasi-constant, de l'ordre de deux métacercaires par jour et par individu sur la période d'exposition, le mois de juillet correspondant à la période d'infestation maximale par ce parasite (Durieux et al., 2007b). Coustau et al. (1990) ont décrit pour *P. squamatus*, dont les moules sont aussi premier hôte intermédiaire, une saisonnalité similaire avec des sporocystes contenant des cercaires développées en juin-juillet, le parasite s'appropriant les ressources de l'hôte normalement allouées à la reproduction, ce qui entraîne sa castration. A 500 m de la zone de bouchots, nos résultats ne montrent pas de différence d'infestation des G0 pour les deux durées d'exposition. La courantologie générale de cette zone est caractérisée par un courant entrant dans le pertuis qui longe la côte du nord-ouest au sud-est, et par des courants de marées plus ou moins perpendiculaires à la côte. Etant donné la répartition côtière homogène de la zone de bouchots sur le site de l'étude, on peut considérer que la dispersion des cercaires de *P. crucibulum* s'est faite dans une direction assez homogène de la côte vers le large. En effet, il semble que l'infestation se soit faite sur cette station dès les 4 premiers jours d'exposition, ce qui expliquerait qu'on ne trouve pas de différence sur la durée. Cette situation est cohérente avec les coefficients de marée, qui plus importants pendant les 4 premiers jours d'exposition, ont vraisemblablement favorisé une dispersion vers le large. Les cercaires de *P. crucibulum* sont de type furcocerques, c'est-à-dire qu'elles portent deux fourchons caudaux contractiles qui ne leur permettent pas de se maintenir dans la colonne d'eau (cf Chapitre 2), les obligeant à se poser sur le fond où elles infestent essentiellement des Téléostéens benthiques de petite taille (Matthews, 1973). Nos résultats démontrent ainsi de manière expérimentale *in situ* que leur capacité de dispersion est en effet très limitée.

Par ailleurs, on observe une grande variabilité d'abondance des métacercaires entre individus. Une partie de la variabilité peut s'expliquer par la taille de l'hôte puisqu'il existe une relation positive significative entre la taille de l'hôte et l'abondance de *P. crucibulum* dans les G0 exposés 11 jours. En milieu naturel, cette relation est souvent observée.

Cependant, elle peut s'expliquer autant par l'âge de l'hôte (plus l'hôte est âgé plus il a été en contact avec les parasites) que par sa taille (plus l'hôte est grand plus il peut porter de parasites), mais ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et leur contribution relative sont particulièrement débattues concernant les Téléostéens (Combes, 2001). A partir d'une exposition suffisante aux parasites (11 jours), pour une même durée d'exposition, la taille de l'hôte semble limiter en partie l'abondance du parasite, ce qui est en accord avec les résultats d'études précédentes sur les métacercaires de Digènes chez les Téléostéens (Poulin, 2000). Notre étude constitue un des rares exemples en condition expérimentale. Elle étayent les concepts énoncés ci-dessus. En effet, la surface de l'hôte étant plus grande, la probabilité de rencontre de l'hôte par les cercaires est plus grande. De même, la quantité de molécules émises par l'hôte est plus importante, donc la probabilité de détection par les cercaires est plus grande. Ainsi, la taille de l'hôte expliquerait 27% de la variabilité de l'abondance des métacercaires de *P. crucibulum*. En outre, il faut préciser que nos résultats correspondent aux nombres de métacercaires enkystées et non pas aux nombres de cercaires ayant réellement pénétrées. En effet, les cercaires peuvent être éliminées dans une certaine proportion par la réaction immunitaire de l'hôte. L'immunité de l'hôte constitue un des principaux facteurs de l'agrégation des parasites, les parasites s'accumulant chez les hôtes plus sensibles ou moins résistants (Combes, 2001). Cette variation individuelle de la susceptibilité des hôtes aux parasites est sûrement due au polymorphisme des hôtes et à leur résistance différentielle aux parasites (Combes, 2001). Ainsi, Rauch et al. (2006) ont montré que le génome d'hôtes, des épinoches, soumis à des infestations en cages par des Digènes, peut significativement influencer leur charge parasitaire. On peut donc faire l'hypothèse d'une réaction immunitaire différentielle face aux cercaires, dans le système hôte-parasite étudié ici.

Dans nos conditions expérimentales, les individus étaient nourris *ad libitum* une fois transférés dans les bacs du laboratoire de terrain. L'indice de condition de Fulton (K) était très élevé de l'ordre de 1,27 sur la durée de l'expérience, ce qui démontre le bon état nutritionnel des individus. Laffargue (2004) a réalisé en 2001 une expérience de croissance en mésocosme dans le même marais expérimental que celui que nous avons utilisé, à la différence que les juvéniles G0 étaient issus de captures faites en milieu naturel, placés dans des bassins extérieurs de 250 m² à une densité de 0,66 individus m⁻² (salinité entre 30 et 35), et se nourrissaient de proies naturelles vivantes. Laffargue (2004) avait obtenu des valeurs de K inférieures aux nôtres, et des performances de croissance en taille supérieures à celles obtenues dans notre étude. Il a déjà été montré chez différentes espèces, et notamment chez un

Téléostéen plat, le turbot *Scophthalmus maximus*, que les individus issus d'aquaculture avaient une masse à une taille donnée plus élevée que chez des individus sauvages (Ellis et al., 1997). Ainsi, on suppose qu'une différence de morphologie entre individus issus d'aquaculture et individus sauvages pourrait expliquer en grande partie les différences en terme de croissance et de condition observées entre notre étude et celle Laffargue (2004). Par ailleurs, la densité est un facteur important limitant la croissance des juvéniles de sole (Howell, 1997; Schram et al., 2005). Dans nos bacs expérimentaux, la densité était d'environ 60 individus m⁻², ce qui d'après le modèle « densité-dépendant » de Howell (1997) équivaldrait à environ 0,6 mm j⁻¹ (avec des individus sauvages). De plus, la salinité élevée, ce qui était le cas dans notre expérience, conduit à un coût d'osmorégulation élevé et peut réduire la croissance (Boeuf & Payan, 2001). De même, les fortes variations de température peuvent aussi représenter un coût métabolique pour les juvéniles de sole (Lefrançois & Claireaux, 2003). Enfin, en dehors de la quantité, la qualité de la nourriture peut influencer les performances de croissance (Jobling, 1981; Smith et al., 1991). En effet, les granulés utilisés en aquaculture contiennent des proportions importantes de lipides, qui peuvent favoriser les voies métaboliques de mise en réserve (croissance en masse), au détriment de la croissance en taille.

Avec de telles conditions expérimentales, aucun effet des métacercaires de *P. crucibulum* n'a été détecté, ni sur la croissance ni sur la condition des juvéniles G0 de sole. Les individus infestés ont montré une certaine capacité à compenser le surcoût énergétique engendré par ce parasitisme. En effet, les cercaires de *P. crucibulum* en pénétrant dans le deuxième hôte intermédiaire lèse et ingère une partie de ses tissus (Matthews, 1973). Au bout d'environ un mois, les métacercaires ne sont plus entourées du kyste sécrété par le parasite, ce qui entraîne une forte réaction de l'hôte, faisant notamment intervenir le système du complément (Chapitre 7) et aboutissant à l'encapsulation de la métacercaire dans un kyste sécrété par l'hôte (Matthews, 1973). Tout cela représente un coût énergétique certain pour les juvéniles de sole, mais, quand la quantité de nourriture n'est pas limitante, ce surcoût énergétique apparaît comme suffisamment faible pour être compensé par l'hôte. D'autres études ne montrent aucun effet, voir même une meilleure croissance (dans le cas de faibles infestations), des Téléostéens infestés par des métacercaires de Digènes (Ballabeni & Ward, 1993; Ondrackova *et al.*, 2004), ce qui va dans le sens de la présente étude.

Ces conclusions doivent être examinées dans le cadre des relations existant dans les systèmes hôte – parasite. D’autres travaux portant sur l’effet de métacercaires sur leur hôte Téléostéen, faits dans des conditions analogues, notamment une alimentation *ad libitum*, ont détecté des effets négatifs sur la croissance et la condition, engendrant même des mortalités dans certains systèmes Téléostéens d’eau douce – métacercaires (Lemly & Esch, 1984; Coleman & Travis, 1998; Johnson & Dick, 2001; Collyer & Stockwell, 2004). Collyer et Stockwell (2004) ont montré chez *Cyprinodon tularosa* infestés par des diplostomatidae, *Posthodiplostomum minimum*, (métacercaires enkystées dans les yeux, les cavités viscérales et pariétales ainsi que le mésentère et les viscères), une augmentation de la mortalité, et une diminution de la croissance et des réserves lipidiques. Lemly et Esch (1984) ont montré chez le crapet arlequin, *Lepomis macrochirus*, infesté par *Uvulifer ambloplitis* (métacercaires enkystées dans le muscle sous la peau, maladie des points noirs) la diminution de l’indice de condition et des réserves lipidiques des juvéniles et quand les températures diminuent, la mortalité des individus infestés au dessus d’un certain seuil. De fait, les impacts de l’infestation sont modulés par les facteurs environnementaux influençant l’hôte, et notamment leur statut nutritionnel (Anderson & May, 1979; May & Anderson, 1979). Dans notre système hôte - parasite, une relation négative entre l’abondance de *P. crucibulum* et l’indice de condition de Fulton a été détecté sur des G0 sauvages en novembre quand les températures de l’eau diminuent. A cette période, les individus avaient une très faible condition, marquée en particulier par des réserves lipidiques quasi nulles, ce qui limite potentiellement leur chance de survie hivernale (cf Chapitre 4). Ces résultats obtenus en milieu naturel étaient en accord avec la théorie du « Winter Stress Syndrome» (Lemly, 1997) et suggéraient un effet négatif de l’infestation par *P. crucibulum* en condition trophique et thermique limitante à l’entrée de l’hiver.

En conclusion, cette étude démontre de manière expérimentale i) les modalités de la dynamique spatiotemporelle de *P. crucibulum* entre premier et deuxième hôte intermédiaire. Au niveau spatial, une infestation très localisée à la zone des bouchots et au niveau temporel, une accumulation de métacercaires à un taux d’environ 2 par jour et par individu dans cette même zone. La taille de l’hôte peut expliquer 27 % de la variabilité de l’intensité de l’infestation pour les individus exposés le plus longtemps et au plus près de la source de cercaires. ii) Le suivi de croissance n’a pas pu mettre en évidence un effet des parasites sur la croissance et la condition des juvéniles G0 de sole dans les conditions de l’expérimentation.

Cela signifie que les individus ont la capacité de compenser le coût énergétique associé à cette infestation quand la température et la quantité de nourriture ne sont pas des facteurs limitants.

Désormais, il faudrait compléter ces résultats par une expérience visant à tester l'effet croisé de facteurs limitants à savoir principalement température et nourriture, en mesurant en plus de la croissance et de la condition, le métabolisme basal (par respirométrie). Il serait important de pouvoir procéder à des infestations expérimentales en laboratoire, pour i) quantifier précisément le succès d'infestation et les réactions immunitaires ayant lieu suite à la pénétration des cercaires, et ii) éviter les effets négatifs de la mise en cages sur la condition et la croissance à l'étape initiale de l'expérience.

Chapitre VII. Expression du gène du composant C3 du complément chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés par des métacercaires de Digènes.

Résumé

Le système du complément joue un rôle clé dans la réponse immunitaire des Téléostéens et C3 est le composant central dans ses voies d'activation. Dans cette étude l'objectif était : (i) de développer un dosage de l'expression du gène C3 spécifique chez *Solea solea* ; (ii) d'évaluer, , la réponse immunitaire au niveau transcriptomique à travers le dosage de l'expression du C3 chez des juvéniles G0 de sole soumis à des infestations par des métacercaires de Digènes. Les séquences d'un fragment du gène d'intérêt C3 (213 bases) et du gène de ménage actine β (293 bases) ont respectivement été obtenues chez la sole *Solea solea*. Un couple d'amorces spécifiques à chacun de ces gènes a pu être défini et testé pour la quantification relative de l'expression de C3 (RC3) par RT PCR quantitative en temps réel. L'analyse a porté sur deux types d'échantillons de G0 de sole : 1- des individus sauvages échantillonnés dans les pertuis Charentais à différentes périodes (Juin, Juillet, Août, Septembre et Novembre) infestés naturellement par des métacercaires de Digènes *Proserhynchus crucibulum* (Bucephalidés) et *Timoniella* spp. (Acanthostomatidés) montrant une nette dynamique saisonnière (n = 60) ; 2- des individus issus d'aquaculture infestés expérimentalement *in situ* en cages par *P. crucibulum* pour lesquels le dosage a été fait à trois mois post-infestation avec un lot témoin (n = 98). Nous avons pu mettre en évidence une augmentation de RC3 entre juin et juillet puis une légère diminution de septembre à octobre qui pourrait être liées aux variations saisonnières de température et (en partie) à la dynamique de l'infestation. Une relation positive significative entre l'abondance de *P. crucibulum* et RC3 a été détecté à environ un mois post-infestation (mois d'août). Les métacercaires de ce parasite étant à cette période libres dans les tissus de l'hôte, entraîneraient une réponse immunitaire aigue généralisée via le système du complément. Cette intervention du complément apparaît cependant limitée dans le temps et n'interviendrait pas dans le cadre d'une réponse chronique suite à l'infestation par *P. crucibulum*. L'utilisation du dosage de l'expression du gène C3 en RT PCR quantitative en temps réel apparaît être l'outil permettant de détecter la réponse immunitaire nécessitant la mobilisation du complément chez les juvéniles G0 de sole.

Mots clés : Immunité – parasite – système du complément – RT-PCR quantitative

1. Introduction

Le parasitisme représente toujours un coût énergétique pour son hôte, à la fois de par le prélèvement direct d'une partie de l'énergie pour son maintien et son développement direct mais aussi par la réaction immunitaire que celui-ci peut entraîner chez l'hôte (Combes, 2001). Le système immunitaire permet en effet une réaction directe de l'hôte face aux parasites. Chez les Téléostéens, le système du complément joue un rôle essentiel dans l'immunité (Woo, 1992; Jones, 2001). En effet, chez ces vertébrés inférieurs, le système du complément est un acteur essentiel de la réponse immunitaire innée (non spécifique) et est aussi impliqué dans l'initiation et l'orchestration de la réponse immunitaire acquise (spécifique) (Boshra et al., 2006). Le système du complément joue différents rôles dans une variété de fonctions immunitaires : la cytolyse, l'opsonisation, la réaction inflammatoire et la dégradation des complexes immunitaires (Boshra et al., 2006). Il peut être initié à travers trois voies d'activation (Figure 1) : la voie classique (association antigène / anticorps), la voie alterne (association C3 / diverses surfaces de pathogènes) et la voie lectine (association lectine / sucres microbiens) (Boshra et al., 2006). Dans le système du complément, qui est constitué d'un complexe de plus de 35 protéines, le composant C3, en plus d'être impliqué dans l'initiation de la voie d'activation alterne, est le composant central, car il est activé par chacune des trois voies (Holland & Lambris, 2002; Boshra *et al.*, 2006) (Figure 1).

En immunologie, comme dans d'autres domaines de la physiologie, l'approche moléculaire au niveau transcriptomique, c'est-à-dire au niveau de l'expression même des gènes impliqués dans les fonctions immunitaires, s'est développée depuis la fin des années 90, en parallèle aux progrès technologiques de la PCR quantitative en temps réel (Giulietti et al., 2001). En effet, cette approche a l'avantage d'étudier le processus de mobilisation d'une protéine faisant intervenir sa synthèse, tout en s'affranchissant des différentes régulations post-transcriptomiques qui ont lieu en aval. Le niveau de l'expression du gène constitue le premier niveau d'intégration moléculaire d'un organisme face à un facteur. Chez les Téléostéens, différentes études ont ainsi récemment mis en évidence la modulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les fonctions immunitaires face à des contaminations liées à des bactéries (Ewart et al., 2005) et des Protozoaires (Saeij et al., 2003; Sigh et al., 2004; Bridle et al., 2006). Cependant, en ce qui concerne les infestations par des parasites métazoaires très peu d'informations existent à l'heure actuelle. Or, les Téléostéens

sont pourtant largement infestés par nombre de métazoaires aussi bien ectoparasites qu'endoparasites. Ces parasites entraînent ainsi différents mécanismes de réaction immunitaire de l'hôte, qui sont souvent plus difficiles à évaluer du fait de la complexité de leur cycle de vie et du développement de certains mécanismes d'évasion ou d'éradication du système immunitaire de l'hôte (Combes, 2001).

L'infestation des juvéniles G0 de sole par des métacercaires de Digènes a été récemment rapportée (Laffargue et al., 2004; Durieux et al., 2007b). Cependant, la réponse immunitaire que ces métacercaires entraîne n'a jamais été étudiée. Le but de la présente étude était tout d'abord, d'un point de vue méthodologique, la mise au point du dosage de l'expression du gène C3 par RT-PCR quantitative spécifique à *Solea solea*. Une fois cet objectif méthodologique atteint, le but suivant était d'évaluer chez des juvéniles G0 de sole les effets des métacercaires de Digènes sur l'expression du gène du composant C3 du complément en tant que marqueur de la réponse immunitaire faisant intervenir le complément. L'expression du gène C3 a été analysée mensuellement sur des individus sauvages à différents moments de la dynamique temporelle de l'infestation par *Proisorhynchus crucibulum* et *Timoniella* spp. afin d'évaluer l'aspect temporel de la réaction immunitaire (Durieux et al., 2007b). D'autre part, l'expression du gène C3 a été analysée sur des individus issus d'aquaculture ayant subi une infestation expérimentale *in situ* par *Proisorhynchus crucibulum* (Chapitre 6), à trois mois post-infestation, afin de déterminer de manière expérimentale si, une fois les métacercaires totalement enkystées mais encore viables (Matthews, 1973), l'hôte peut encore développer de manière chronique une réaction immunitaire faisant intervenir le complément.

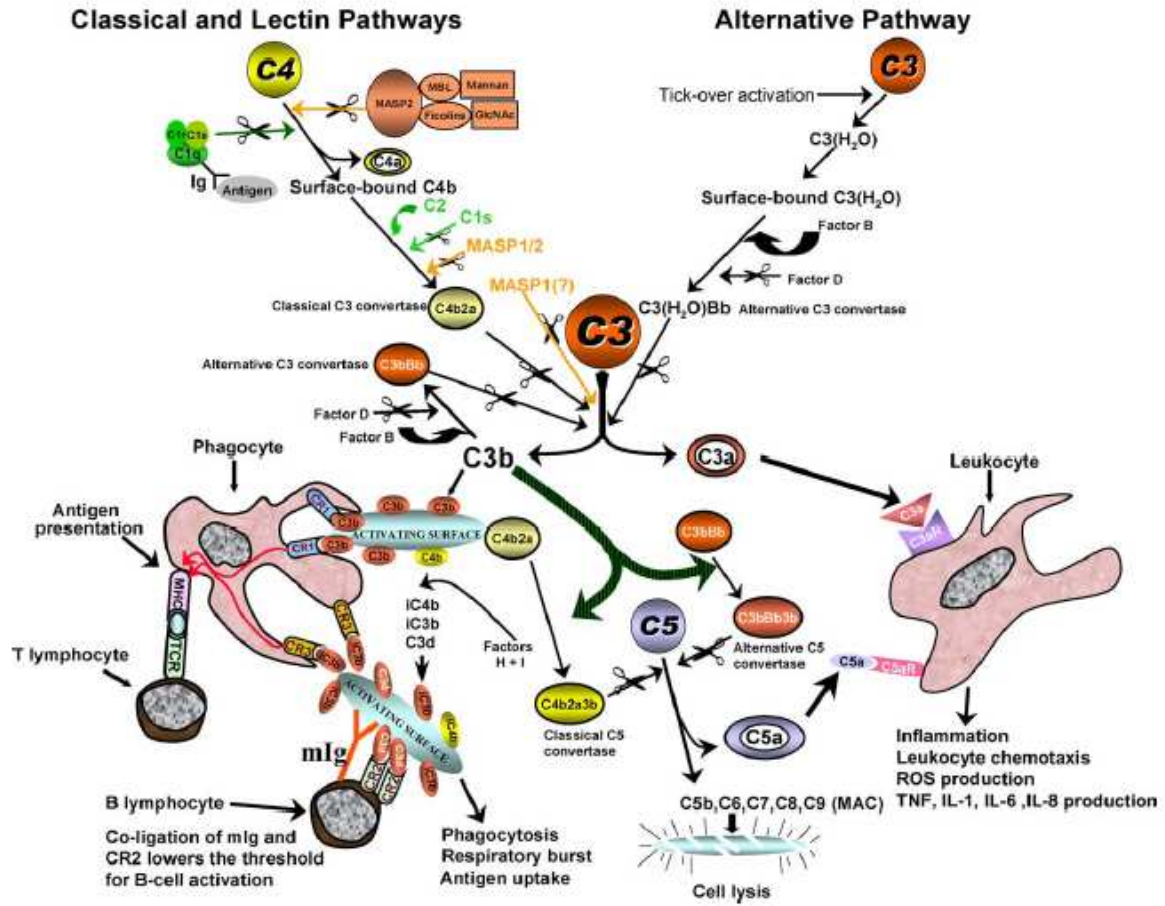


Figure 1. Voies d'activation du complément et fonctions. L'activation du système du complément à travers chacune des trois voies d'activation existantes (classique, alterne ou lectine) mène à l'activation de C3 en C3b et C3a. C3b se lie de manière covalente aux surfaces d'activation du complément (*i.e.* parasites, bactéries, champignons, virus). C3b lié peut être dégradé en iC3b par le facteur I en présence du facteur H. C3b et iC3b se lient aux récepteurs du complément (CR1, CR3) et promeuvent la phagocytose, l'explosion respiratoire et le processus d'incorporation de l'antigène. C4 activé à travers la voie classique ou lectine peut aussi se lier à une surface d'activation et promouvoir son intégration, cependant le nombre de molécules C4 qui se lie à une surface est toujours de très loin inférieur à celui des molécules C3. L'antigène contenant une liaison covalente avec les molécules C3b ou C4b (ou leur fragment de dégradation) peut être intégré et présenté à des lymphocytes T. L'antigène contenant une liaison avec l'immunoglobuline (Ig) et C3d mène à une colligation des récepteurs des lymphocytes B (BCR ou mIg) et les récepteurs du complément de type 2 (CR2/CD21) sur les lymphocytes B, qui en retour diminue le seuil d'activation des lymphocytes B. En plus, les liaisons C3b/C4b à un pathogène peuvent conduire à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) qui conduit à la cytolysse. Les anaphylotoxines de C5a et C3a générées pendant l'activation du complément jouent un rôle clé dans les processus d'inflammation. D'après Boshra et al. (2006).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Sous échantillons issus d'infestations naturelles : (Chapitre IV)

Des juvéniles G0 (N = 60) de sole ont été collectés mensuellement de Juin à Novembre 2004, excepté le mois d'octobre, sur une station localisée dans le pertuis Breton dans une zone de culture de moules sur bouchots [la moule *Mytilus edulis* étant le premier hôte intermédiaire de *Proisorhynchus crucibulum*] et près de la vasière intertidale de la baie de l'Aiguillon qui abrite l'hydrobie *Hydrobia* spp. [premier hôte intermédiaire, de *Timoniella* spp.] (voir Figure 1, Chapitre IV).

Sous échantillons issus d'une infestation expérimentale : (Chapitre VI)

Des juvéniles G0 (N = 98) de sole issus d'aquaculture, ont été infestés expérimentalement *in situ* par *P. crucibulum*. En juillet, période d'émission maximale de cercaires de *P. crucibulum*, 4 cages ont été placées sur deux stations éloignées de la baie de l'Aiguillon et de sa population d'hydrobies afin d'éviter la co-infestation par *Timoniella* spp. (voir Figure 1, Chapitre VI) : station A exactement localisée dans une zone de culture sur bouchots et station B localisée 500 m au large avec deux durées d'exposition par station, 4 et 11 jours. Un groupe d'individus contrôle a été gardé en conditions contrôlées au laboratoire pendant la durée des infestations *in situ*. Ensuite, tous les individus ont été élevés pendant trois mois dans le cadre d'une expérience de croissance. A 3 mois post-infestation, les individus ont été sacrifiés (voir Matériel et Méthodes, Chapitre VI).

Statut parasitaire des individus

Les indices épidémiologiques prévalence (P% : pourcentage d'individus infestés) et abondance moyenne (Ab : nombre moyen de parasites par individu) ont été calculés d'après Bush *et al.* (1997) sur l'ensemble des soles disséquées (Tableau 1).

Tous les individus ont été disséqués sous loupe binoculaire, les parasites ont été identifiés et comptés. Le foie, organe où le gène C3 est le plus exprimé, a été prélevé sur chaque individu, directement inséré dans un cryotube, mis dans l'azote liquide puis stocké à -80°C jusqu'à la réalisation de l'analyse moléculaire.

Tableau 1. Prévalence (P(%)), abondance moyenne \pm SE et nombre minimal – maximal de parasites des différents taxons chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, pour chaque échantillon mensuel sur lesquels l'expression du gène C3 a été analysée

Parasites	Mois	P (%)	Ab \pm S.E.	min - max
<i>Timoniella</i> spp.	Juin	100	27.56 \pm 10.92	3 - 110
	Juillet	100	51.55 \pm 13.16	10 - 141
	Août	100	30.71 \pm 3.53	2 - 56
	Sept	100	53.77 \pm 8.54	22 - 148
	Nov	100	39.73 \pm 8.11	2 - 120
<i>P. crucibulum</i>	Juin	11,11	0.22 \pm 0.21	0 - 2
	Juillet	88,89	7.44 \pm 1.56	0 - 16
	Août	100	20.79 \pm 2.82	2 - 36
	Sept	92,31	22.31 \pm 4.21	0 - 48
	Nov	100	24.33 \pm 4.90	1 - 61

2.2. Analyse moléculaire

Principe du dosage de l'expression de gènes en RT-PCR quantitative en temps réel

Lorsqu'un gène est exprimé, il est tout d'abord transcrit en ARN messager (ARNm). Ainsi le principe du dosage d'expression de gènes en RT-PCR quantitative en temps réel vise à quantifier les ARNm du gène ciblé (Ginzinger, 2002). La transcription inverse (RT : reverse transcription) permet d'obtenir un ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN. La PCR (Polymérase Chain Reaction) est une technique puissante qui permet d'amplifier exponentiellement l'ADN par répétition de trois réactions : dénaturation, hybridation et synthèse, l'ensemble de ces trois étapes constituant un cycle. La PCR quantitative en temps réel est une technique sensible et spécifique qui permet de quantifier des produits PCR. La PCR quantitative en temps réel utilise un marqueur fluorescent qui se fixe au niveau de l'ADN double brin, ainsi la mesure de la fluorescence à l'issue de chaque phase d'élongation de chaque cycle permet de suivre en temps réel l'amplification (Figure 2). De plus, à la fin de la phase d'amplification, les produits PCR sont portés progressivement en fusion, cette dernière étant caractéristique de leur composition nucléotidique, la spécificité de l'amplification peut ainsi être vérifiée (Figure 2).

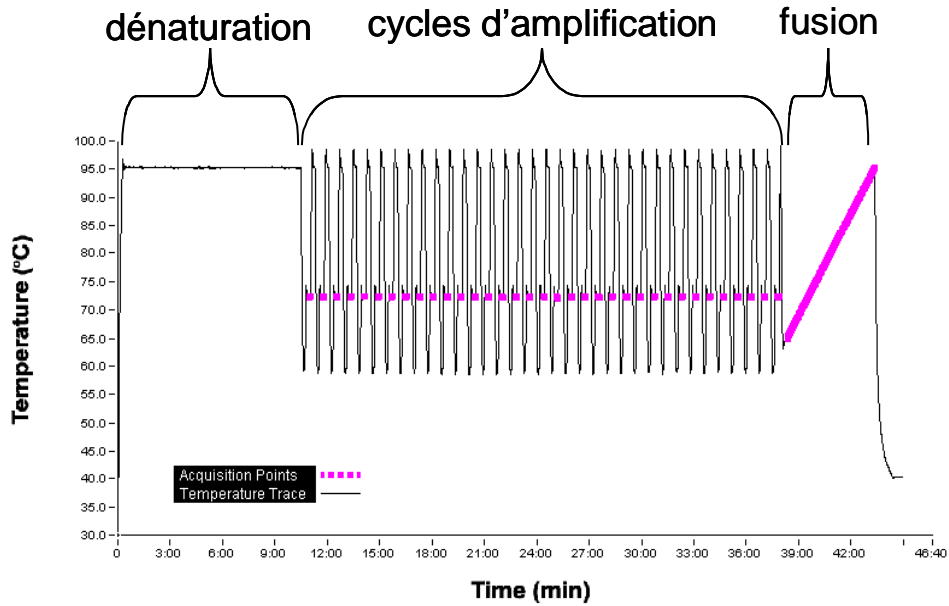


Figure 2. Protocole de PCR quantitative en temps réel avec représentation de l'évolution de la température en fonction du temps et des points d'acquisition de fluorescence.

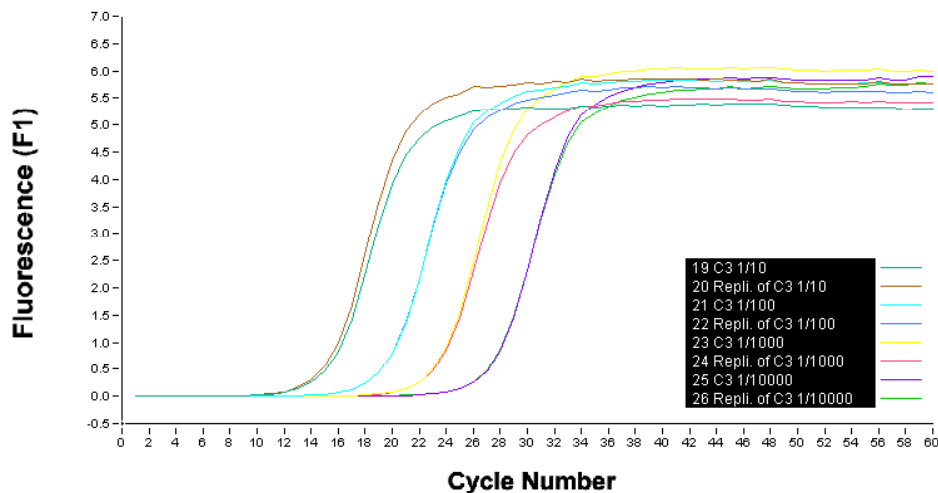


Figure 3. Représentation graphique de l'amplification exponentielle du gène C3 à 4 concentrations différentes en PCR quantitative en temps réel à partir de l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Etant donné que le cycle au cours duquel la PCR entre dans la phase exponentielle d'amplification est directement proportionnel à la quantité d'ADN ciblé au départ (Figure 3), on peut quantifier celui-ci. Il existe deux types de quantification : la quantification absolue et la quantification relative. La quantification absolue détermine le nombre de copies du gène cible par rapport à une courbe standard. La quantification relative décrit le changement d'expression du gène cible par rapport à un gène référence de structure, dit « de ménage »,

dont l'expression est stable et du moins non influencée par le facteur testé. Cette dernière méthode se révélant la plus adaptée aux objectifs de la présente étude a été retenue.

Démarche de mise au point du dosage

Chez *Solea solea*, aucune séquence du gène C3 ni d'aucun gène de ménage n'était disponible sur la banque de séquences internationale Genbank (National Center for Biotechnology and Information). L'Actine β a été choisi comme gène de ménage, car son expression est peu variable (Olsvik et al., 2005). L'amplification en PCR quantitative se faisant en général sur un fragment de gène de taille comprise entre 150 et 300 bases, il s'agissait ainsi de connaître la séquence d'un fragment du gène cible et du gène de ménage d'au moins 200 bases chez l'espèce étudiée afin de pouvoir définir les amorces spécifiques permettant l'amplification en PCR quantitative en temps réel.

Dosage des échantillons

L'extraction des ARNs totaux de chaque foie de chaque individu a été réalisée en suivant le protocole « Trizol Reagent » (Invitrogen). Les concentrations en ARN de chaque échantillon ont été obtenues à l'aide d'un spectro-photomètre (Eppendorf) à partir de l'absorbance 260/280 nm. Les échantillons ont été standardisés à une concentration d'ARN de $2\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. La transcription inverse a été réalisée en suivant le protocole « M-MLV RT » (Promega) afin d'obtenir un pool d'ADNc à partir de l'ARN pour chaque échantillon. Chaque échantillon a été dilué au 1/100ème et un pool d'individu a été utilisé comme calibrateur pour chaque PCR en temps réel. Le kit d'amplification « Light Cycler Fast Start SYBR green I » (Roche Applied Science) a été utilisé en suivant le protocole indiqué avec les amorces spécifiques préalablement définies dans un volume réactionnel final de 10 μl par réaction. Chaque gène (C3 et Actine β) de chaque individu a été amplifié en duplicat à l'aide de l'appareil de PCR quantitative en temps réel « LightCycler » (Roche Applied Science).

2.3. Analyse des données

Les « crossing point » (CP) qui correspondent en réalité au nombre de cycles pour une fluorescence donnée, ont été déterminés pour une valeur constante de fluorescence située en phase d'amplification exponentielle log-linéaire. Les CP ont été obtenus grâce au logiciel d'analyse de données fourni avec le « Light Cycler ». La moyenne des CP des réplicats de

chaque individu a été calculée et uniquement les réplicats dont la différence était inférieure à 0,4 cycles ont été intégrés dans l'analyse. La moyenne de la différence entre CP obtenue pour tous les individus tous gènes confondus a été de $0,12 \pm 0,09$ ($n = 316$).

L'efficacité PCR (E) a été établie pour chaque gène à partir de la pente de sa gamme étalon (obtenue dans le cadre de la mise au point du dosage) :

$$E = 10^{-(1/s)} \text{ avec } s = \text{pente.}$$

Le ratio d'expression relative (R) du gène C3 a été calculé d'après Paffl (2001), tel que :

$$R_{C3} = (EC3)^{\Delta C_{PC3}(\text{calibrator} - \text{sample})} / (E_{Act \beta})^{\Delta C_{PAct \beta}(\text{calibrator} - \text{sample})}$$

Pour l'échantillon « infestation naturelle », les niveaux d'expression R_{C3} ont été comparés entre mois consécutifs par le test non paramétrique U de Mann Withney (MW) unilatéral. Au sein de chaque échantillon mensuel, la relation entre l'abondance de parasites et le R_{C3} a été analysée par corrélation non-paramétrique de Spearman (SC).

Pour chaque échantillon « infestation expérimentale », les individus ont été répartis en 4 classes correspondant à des niveaux d'infestation différents (0 : $n = 32$, 1 – 10 : $n = 36$, 11 – 20 : $n = 17$, 21 – 55 : $n = 13$) étant donné la variabilité inter-individuelle pour l'abondance de *P. crucibulum* au sein de chaque classe d'infestation *in situ* (voir Chapitre VI). Les R_{C3} ont été comparés entre classes par le test non paramétrique de Kruskal Wallis.

3. Résultats

3.1 Objectif méthodologique

Séquençage de fragment des gènes C3 et Actine β de Solea solea

Des séquences connues du gène cible, C3, et du gène de ménage, Actine β , d'autres espèces de Téléostéens (avec en priorité des espèces de l'ordre des Pleuronectiformes lorsqu'elles étaient disponibles) ont été obtenues sur Genbank pour les espèces suivantes : *Paralichthys olivaceus* (AB021653), *Platichthys flesus*² (AJ565929 et AJ292040) et

² pour cette espèce, 2 isoformes du gène C3 étaient disponibles et ont été intégrées dans l'alignement

Pseudopleuronectes americanus (AY225099) (Pleuronectiformes), *Oncorhynchus mykiss* (L24433) (Salmoniformes), *Anarhichas minor* (AJ309570) et *Gillichthys mirabilis* (AF266184) (Perciformes) pour C3 ; *Platichthys flesus* (AF171095), *Pseudopleuronectes americanus* (AF043384) et *Scophthalmus maximus* (AY008305) (Pleuronectiformes), *Danio rerio* (AF025305) et *Megalobrama amblycephala* (AY170122) (Cypriniformes), *Oncorhynchus mikiss* (AF157514) et *Salmo salar* (AF012125) (Salmoniformes), *Oreochromis mossambicus* (AB037865) (Perciformes) pour Actine β . Pour chaque gène, ces séquences ont été alignées avec le logiciel Bioedit par Clustal W (Thompson et al., 1994) afin de localiser les zones conservées au sein de ces séquences et d'y définir plusieurs couples d'amorces pour chaque gène. Ces couples d'amorces ont été testés afin de réaliser des amplifications sur un pool d'ADNc issus d'une dizaine d'individus, directement en PCR quantitative en temps réel, du fait de la performance et de la sensibilité des amplifications par rapport à une PCR simple. Pour le C3, un de ces couples d'amorces (sens : 5' GGTTTGCTGACTGGCTTC 3', anti-sens 5' GCTGGCTGTAAGACGCC 3') a permis une amplification non spécifique, c'est-à-dire que les amorces ne s'hybrident pas spécifiquement dans les zones ciblées et d'autres fragments localisés à d'autres endroits dans le génome sont amplifiés. Pour l'Actine β , le couple d'amorces (sens 5' GCCAACAGGGAGAAGATG 3', anti-sens 5' GTGCCCATCTCCTGCTC 3') a permis une amplification spécifique, cependant cette amplification obtenue n'était pas suffisante pour une utilisation en PCR quantitative en temps réel (expression trop tardive).

Les produits d'amplification ont été séparés par migration sur gel d'agarose (1,5%), puis les bandes correspondant à la taille des amplicons attendus (C3 : environ 210 bases ; Actine β environ 300 bases) ont été repérées grâce à un marqueur de taille 100pb DNA ladder (Promega), isolées et purifiées en utilisant le kit Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega), puis séquencées. Les réactions de séquences ont été réalisées en utilisant les mêmes amorces avec le kit Genome Lab DTCS-Quick Start (Beckmann Coulter) puis les séquences ont été obtenues à l'aide d'un séquenceur automatique Ceq 8000 (Beckman Coulter).

On a ainsi pu obtenir chez *Solea solea* la séquence d'un fragment du gène C3 de 213 bases et la séquence d'un fragment du gène Actine β de 293 bases. L'identité des gènes a été vérifiée par comparaison aux séquences existantes dans Genbank en utilisant le logiciel BLASTn (Altschul et al., 1997) : C3 *Solea solea*, présentait 89% d'identités (sur 210 bases)

avec la séquence ARNm du composant C3 du complément de *Pseudopleuronectes americanus* (Pleuronectiformes, Pleuronectidés) ; Actine β *Solea solea*, présentait 97 % d'identités (sur 289 bases) avec la séquence ARNm de l'Actine β de *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes, Soleidés) (séquence publiée en 2005 alors que les travaux ont débuté en 2004).

Mise au point du dosage :

A partir des séquences de C3 et d'Actine β de *Solea solea*, plusieurs couples d'amorces ont été définis manuellement et testés avec le logiciel « Oligoplayer » (Bioplayer corporation) afin de retenir ce qui présentaient le minimum d'auto hybridation. Ces couples d'amorces ont été testés en PCR quantitative en temps réel, afin de sélectionner ce qui permettent une amplification spécifique, c'est-à-dire uniquement le fragment ciblé ; ainsi un couple pour chaque gène a pu être défini (Tableau 2). La spécificité des produits d'amplification a été vérifiée grâce à la courbe de fusion qui est réalisée automatiquement à la fin de chaque PCR quantitative en temps réel étant donné que la fusion dépend de la composition nucléotidique de l'ADN (Figure 4). Une gamme étalon (1/10, 1/100, 1/1000) a été réalisée pour chaque gène afin de déterminer l'efficacité PCR (E). La dilution des échantillons pour réaliser les dosages en routine, à savoir 1/100 a été déterminée d'après ces mêmes gammes étalons (Figure 4).

Tableau 2. Caractéristiques des couples d'amorces pour l'amplification des gènes d'intérêt en PCR quantitative en temps réel

Gène	Sens	Anti-sens	Taille	Tps d'élongation	T° d'hybridation
Actine β	5'-GTATCGTCATGGACTCCG-3'	5'-CTCCTTGATGTCACGCA-3'	196 pbs	10 s	60°C
C 3	5'-GTGATCTCCTCTGATCG-3'	5'-CACTGTCAACAAAAATGAC-3'	147 pbs	10 s	60°C

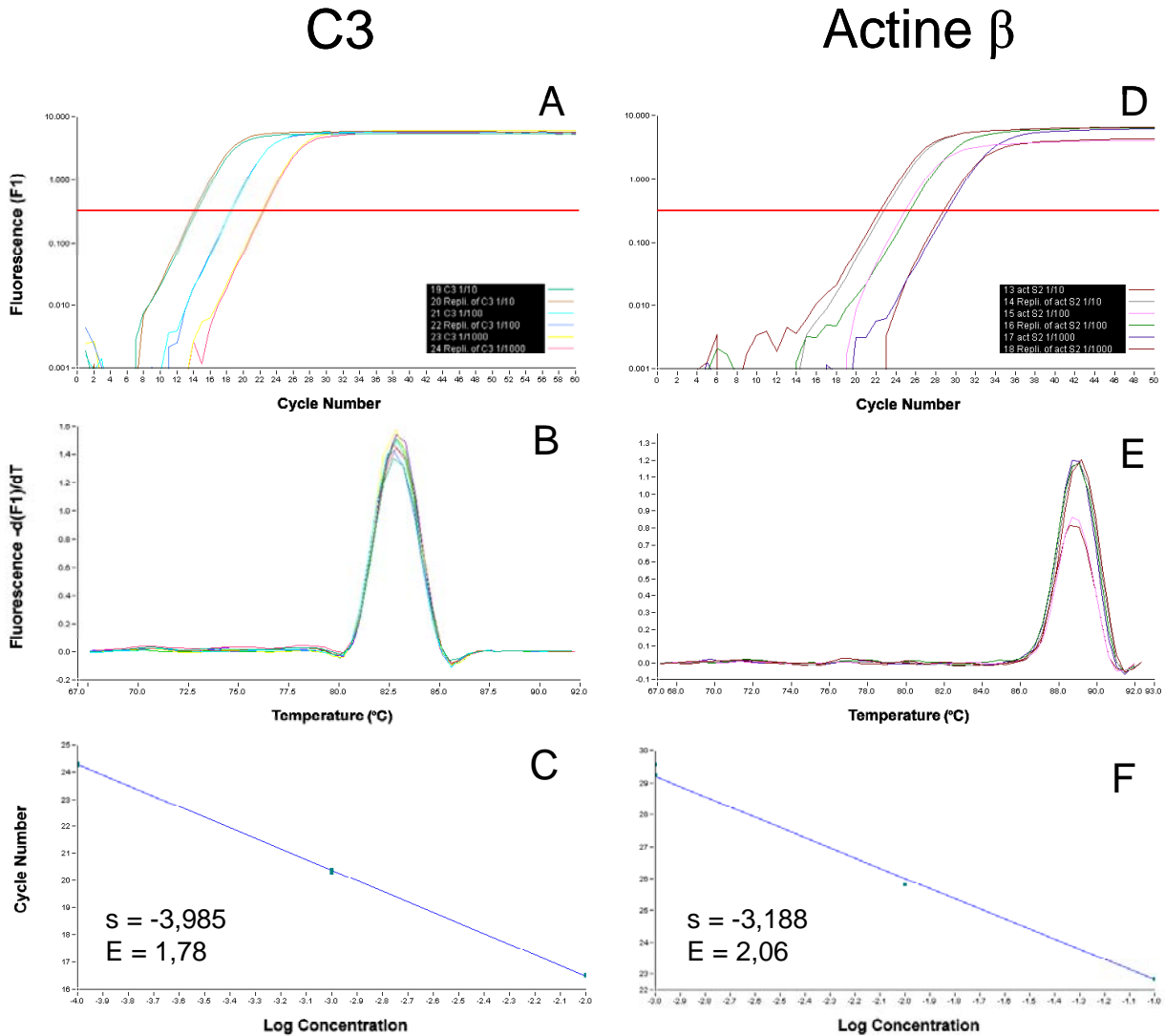


Figure 4. Représentation graphique de la gamme étalon obtenue en PCR quantitative en temps réel pour le gène C3 et pour le gène Actine β , respectivement, chez la sole commune *Solea solea* : courbe d'amplification (fluorescence en fonction du nombre de cycle) (A, D), la courbe de fusion (dérivée de la fluorescence sur le temps en fonction de la température) (B, E) et relation entre le nombre de cycles et la concentration en ADNc (Log transformée) (C, F) permettant à partir de la pente (s) de calculer l'efficacité PCR (E).

3.2 Application de la méthode analytique

Echantillon infestation naturelle :

R C3 était significativement inférieur en juin par rapport à juillet (MW, $U = 0$, $p < 0,001$) et en octobre par rapport à septembre (MW, $U = 139$, $p < 0,01$) (Figure 5). Une seule relation positive significative a été détectée entre l'abondance de *P. crucibulum* et R C3 au mois d'août (Tableau 3, Figure 6).

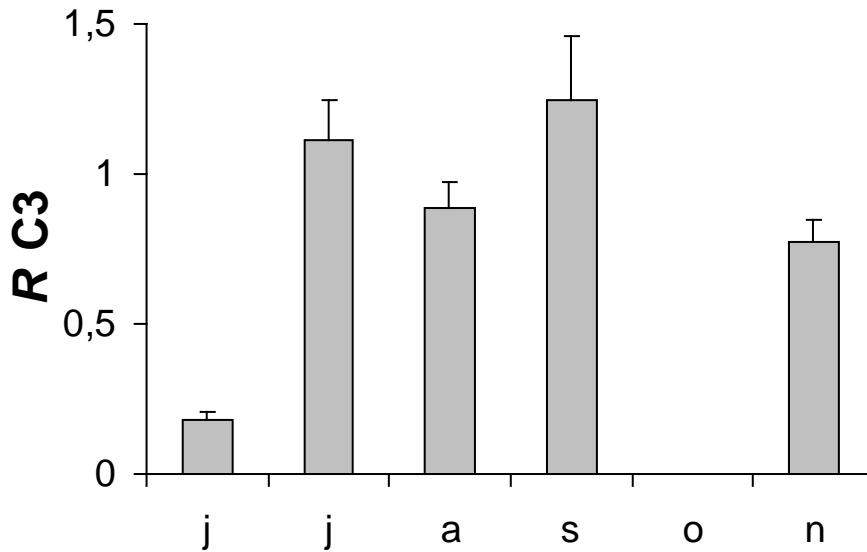


Figure 5. Changement temporel du ratio de l'expression relative du gène du composant du complément C3 (*RC3*) chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés naturellement par des métacercaires de Digènes (*P. crucibulum* et *Timoniella* spp.). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

Tableau 3. Coefficient de corrélation non-paramétrique de Spearman et probabilité associée des relations entre l'abondance des parasites (*P. crucibulum*, *Timoniella* spp. et Total) et le ratio de l'expression relative du gène du composant du complément C3 (*RC3*) chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés naturellement au sein de chaque échantillon mensuel. La relation significative est inscrite en gras.

Parasites	juin (N = 9)		juillet (N = 9)		août (N = 14)		septembre (N = 13)		novembre (N = 15)	
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
<i>P. crucibulum</i>	-0,41	0,27	-0,02	0,97	0,58	0,03	0,04	0,90	-0,22	0,44
<i>Timoniella</i> spp.	0,18	0,64	-0,47	0,21	0,13	0,66	-0,19	0,53	0,28	0,32
Total	0,18	0,64	-0,50	0,17	0,42	0,14	-0,23	0,45	0,15	0,59

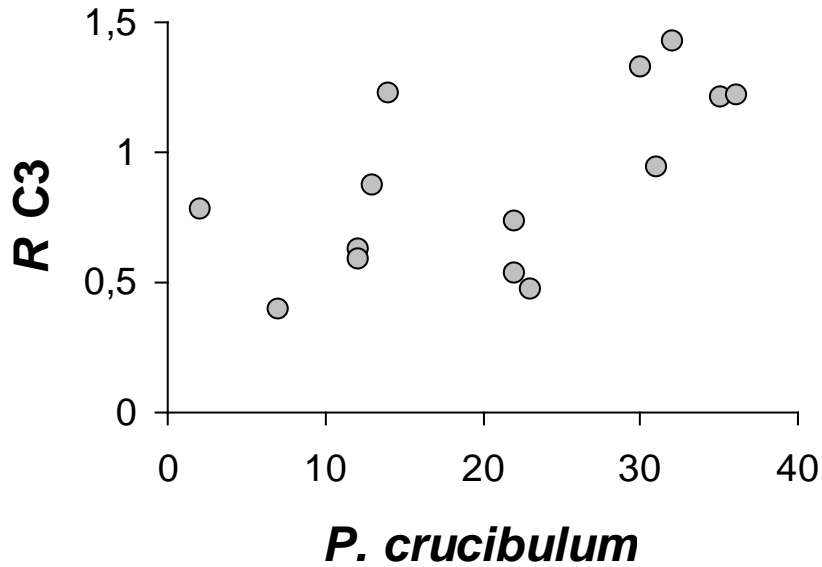


Figure 6. Représentation graphique de la relation entre l'abondance de *P. crucibulum* et le ratio de l'expression relative du gène du composant du complément C3 (*RC3*) chez les juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés naturellement par des métacercaires de Digènes (*P. crucibulum* et *Timoniella* spp.) pour l'échantillon d'août

Echantillon infestation expérimentale :

Aucune différence n'a été détectée pour *RC3* entre les 4 classes d'infestation (KW, dII = 3, H = 2,619, $p > 0,05$) (Figure 7)

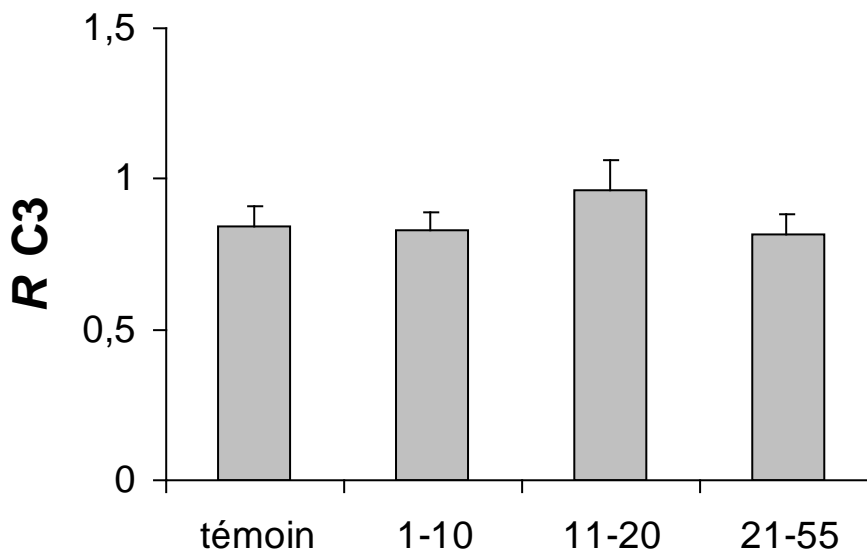


Figure 7. Ratio de l'expression relative du gène du composant du complément C3 (*RC3*) pour 4 classes d'infestation (0 = témoin, 1 – 10, 11 – 20, 21 – 55) chez des juvéniles G0 de sole, *Solea solea*, infestés expérimentalement *in situ* et dosés à 3 mois post-infestation. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

4. Discussion

Dans un premier temps, notre étude a permis de caractériser partiellement les séquences de C3 et d'actine chez la sole *Solea solea*, ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Cela constitue un enrichissement des banques de gènes et est un préalable indispensable au dosage du gène C3 par RT-PCR quantitative en temps réel. Le système du complément des Téléostéens se démarque de celui des Mammifères par le fait que bon nombre de ses composants, dont principalement le C3, peuvent exister sous plusieurs isoformes codés par des gènes différents. Cette propriété inhabituelle leur procure une plus grande capacité de reconnaissance dans l'immunité innée (Watts et al., 2001; Nakao et al., 2003; Boshra et al., 2006). Bien qu'une seule isoforme ait été isolée chez quelques espèces, plus nombreuses sont les études qui montrent l'existence de plusieurs isoformes chez les Téléostéens (Boshra et al., 2006). Dans notre étude, nous ne pouvons pas distinguer si C3 est présent sous une ou plusieurs isoformes chez *Solea solea*. Cependant, étant donné le protocole employé la même forme a été dosée de manière homogène chez tous les individus ce qui garantit la comparaison de l'expression relative de ce gène entre eux. Par ailleurs, le gène C3 est exprimé dans une grande variété d'organes comme la peau, le foie, la rate ou les reins et même localement au niveau des tissus infectés (Boshra et al., 2006). Mais le foie [organe dans lequel les gènes ont été dosés dans cette étude] demeure la source de production majoritaire du C3 circulant qui va être acheminé par voie sanguine au niveau des zones infectées pour y agir (Figure 1) (Boshra et al., 2006).

Dans un deuxième temps, notre étude a permis de mettre au point un dosage spécifique de l'expression du gène C3 du complément chez *Solea solea*, travail qui a permis la mise en évidence des résultats suivants :

1- un changement temporel de l'expression relative de C3 chez les juvéniles G0 en milieu naturel : une nette augmentation de juin à juillet (environ 4 fois plus) puis une diminution de septembre à octobre a été mise en évidence. Le développement ontogénique du complément, et du C3 en particulier, a essentiellement été étudié pendant la phase embryonnaire et larvaire et présente des changements importants en terme d'organes dans lesquels il est exprimé (Lange et al., 2003; Magnadottir et al., 2005). Bien que son développement ontogénique soit inconnu chez les juvéniles G0, il semble peu probable que le système du complément ne soit

pas totalement développé chez les plus jeunes G0. Ainsi, nous n'envisageons pas l'hypothèse d'un changement ontogénique de l'expression du C3 au cours de la période étudiée en milieu naturel. Par contre, Boshra et al. (2006) évoquent la température comme facteur influençant l'activité du complément chez les Téléostéens. L'augmentation du niveau d'expression du gène C3 chez les juvéniles de sole G0 en juillet pourrait être reliée effectivement à l'augmentation de la température du milieu à cette période et inversement de septembre à octobre (Figure 1, Chapitre IV). En effet, des niveaux élevés d'activité du complément ont déjà été corrélés à des températures élevées par exemple chez la truite et la daurade (Boshra et al., 2006; Magnadottir, 2006). Dans notre cas, au mois d'août quand les températures sont maximales, le niveau d'expression relatif du C3 n'est cependant pas maximal, ce qui laisse supposer que d'autres facteurs ont aussi pu contribuer en parallèle à ces changements temporels d'expression de gènes. Etant donné les travaux de la littérature qui montrent l'implication du système du complément, en particulier par la voie alterne, face à des infestations par des Digènes parasites (Woo, 1992; Jones, 2001), ce premier résultat pourrait aussi être mis en relation avec la dynamique de l'infestation naturelle des juvéniles de sole par des métacercaires de Digènes. L'infestation des juvéniles de sole par *Timoniella* s'effectuant dès le mois de mai, avec une nette augmentation de juin à août (non observé dans ce sous échantillonnage), alors que l'infestation par *P. crucibulum* commence en juin avec une forte augmentation en juillet ; enfin les paramètres épidémiologiques se stabilisent en août pour ces deux espèces (Durieux et al., 2007b). Ainsi, la forte augmentation de l'infestation en juillet, en particulier par *P. crucibulum*, pourrait engendrer en partie, en plus de la température, l'augmentation du niveau d'expression du C3 à cette période notamment du fait des multiples stimulations induites par la pénétration trans-tégumentaire des nombreuses cercaires. En effet, uniquement une petite partie des cercaires qui ont pénétré s'enkystent effectivement (Combes, 2001). Wood et Matthews (1987) ont montré *in vitro* que le sérum de muets, *Chelon labrosus*, non infestés était cytotoxique pour les cercaires de *Cryptocotyle lingua*, concluant ainsi que l'effet cytotoxique était causé par l'activation du complément par la voie alterne. Néanmoins, étant donné que l'enkystement des cercaires est de l'ordre de quelques heures, et que le sérum nécessite une période de 6 à 12 heures pour infliger des dommages conséquents aux cercaires, ces mêmes auteurs suggèrent que ces facteurs cytotoxiques (en l'occurrence le système du complément) ne jouent pas un rôle de défense efficace dans le cadre des infestations primaires (Wood & Matthews 1987). En effet, la pénétration des cercaires de *Timoniella* spp. et de *P. crucibulum* dans le deuxième hôte intermédiaire est très rapide, de l'ordre de quelques minutes, et la sécrétion d'un kyste hyalin se fait en seulement quelques

heures (Matthews 1973, Maillard 1976). On peut penser en effet que le kyste hyalin joue un rôle protecteur (car non ou peu immunogène) vis-à-vis des métacercaires. Cela a d'ailleurs déjà été évoqué par Faliex (1991a) dans un autre modèle qui dit que le kyste sécrété par le parasite protège la métacercaire peu après son enkystement, mais cela pendant une courte période.

2- En août, une relation significative positive entre l'abondance des métacercaires de *P. crucibulum* et l'expression relative de C3 a été détectée. L'existence de cette relation peut être imputée au développement des métacercaires de ce parasite. En effet, Matthews (1973) a montré qu'un mois après l'infestation, le kyste hyalin sécrété par la cercaire de *P. crucibulum* peu après sa pénétration dans les tissus (muscles) de l'hôte se rompt, libérant ainsi les métacercaires (observation confirmée par la présente étude) qui ont considérablement grandi et peuvent alors se nourrir directement des tissus de l'hôte. Par ailleurs, le mois d'août correspond à une période d'un mois après le maximum d'infestation qui a lieu au cours du mois de juillet dans les conditions naturelles (Durieux et al., 2007b). Par la suite, au mois d'août, de nombreuses métacercaires, issues d'une infestation massive ayant eu lieu en juillet, se trouvent libérées de leur kyste et donc en contact direct et prolongé avec les tissus de l'hôte, ce qui conduit très certainement, à la stimulation d'une réponse immunitaire innée impliquant le complément. Cependant, étant donné qu'en milieu naturel les métacercaires s'accumulent progressivement dans l'hôte, celles-ci présentent une variabilité d'âge et de développement, ce qui tendrait à affaiblir la relation directe entre abondance de métacercaires et expression de C3. Or, le fait que nous arrivons malgré tout à détecter cette relation, traduit ainsi l'occurrence d'une réaction immunitaire aigüe généralisée faisant intervenir le système du complément face à ce parasite. Cette idée peut être confortée par les observations de Matthews (1973) qui mettent en évidence une forte réaction tissulaire locale de l'hôte consécutive au dékystement des métacercaires et la présence, à 3 mois post-infestation, d'une véritable capsule fibreuse d'origine hôte qui enferme complètement la métacercaire (observation confirmée par la présente étude). Il est ainsi logique de penser que l'initiation de cette réaction de l'hôte est dépendante du complément, et du nombre de métacercaires dékystées présentes dans les tissus de l'hôte. Bien que la littérature sur le sujet (expression du gène C3 suite à une infestation parasitaire) soit très peu fournie à l'heure actuelle, cette hypothèse est en accord avec les quelques données existantes qui montrent une augmentation de l'expression du C3 chez la truite ou la carpe infestée par des parasites tels que ciliés (Sigh et al., 2004; Gonzalez et al., 2007) ou protozoaires (Saeij et al., 2003).

En ce qui concerne *Timoniella* spp., aucun effet sur le système du complément n'a pu être mis en évidence au cours de ce travail. Par ailleurs, on remarque que le kyste de ce parasite est tout à fait sphérique et de forme régulière et ne présente pas de forte encapsulation par l'hôte. Ainsi, on suppose que chez *Solea solea*, ce parasite est capable d'éviter la mise en place d'une forte réaction immunitaire généralisée de l'hôte.

3- **L'absence de réaction chronique faisant intervenir le complément** est soulignée. En effet, aucune autre relation entre abondance de *P. crucibulum* et expression de C3 n'est apparue sur les individus infestés naturellement de Septembre à Novembre, c'est-à-dire 2 à 4 mois post infestation. De même, aucun effet n'a été détecté sur les individus infestés expérimentalement *in situ* à 3 mois post-infestation (N = 98). Ces résultats montrent ainsi que la réponse immunitaire faisant intervenir le système du complément est limitée dans le temps à la seule période pendant laquelle les métacercaires de *P. crucibulum* sont libres dans les tissus de l'hôte, c'est-à-dire à environ un mois post-infestation. Le complément peut tout d'abord engendrer une réponse humorale par une action cytolytique, directement au niveau du tégument du parasite (Wood & Matthews, 1987; Harris *et al.*, 1998). Ensuite, comme le complément est aussi impliqué dans plusieurs autres fonctions immunitaires, il peut notamment initier et participer à la mise en place de la réponse cellulaire (Boshra *et al.*, 2006). Le C3 peut ainsi se fixer au tégument du parasite et par opsonisation augmenter la capacité des macrophages activés à se fixer à celui-ci pour le phagocyter (Jones, 2001). Cette réaction chronique inflammatoire de type granulomateux localisée conduit à l'encapsulation de la métacercare par une réaction immunitaire de type cellulaire (Sommerville, 1981; Huizinga & Nadakavukaren, 1997). Cependant, Faliex (1991a), dans le système Téléostéens-métacercaires, *Liza ramada* – *Labratrema minimus*, montre que le kyste sécrété par l'hôte est essentiellement constitué de cellules non-immunitaires qui peuvent aussi protéger le parasite d'une reconnaissance non-soi. Matthews (1973) décrit un kyste fibreux sécrété par l'hôte. Ainsi, on suppose que suite à l'activation et l'action du système du complément face aux métacercaires de *P. crucibulum* libres dans les tissus de l'hôte, une réaction de type cellulaire (vraisemblablement non-immunitaire) prend le relais localement de manière à encapsuler les métacercaires.

En conclusion, cette étude a tout d'abord permis d'obtenir des séquences de C3 et d'actine β chez la sole commune, *Solea solea*, et de mettre au point un dosage de l'expression du gène C3 par RT PCR quantitative en temps réel spécifique. Ce gène ayant un rôle essentiel

dans l'immunité des Téléostéens (Boshra et al., 2006), cet outil moléculaire constitue un indicateur de l'immunité sollicitant le système du complément. Au delà de notre cas d'étude, il pourra notamment se révéler particulièrement utile pour tester l'effet de différents pathogènes et de polluants immunostimulants. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation du niveau d'expression de C3 entre juin et juillet et une légère diminution de septembre à octobre qui pourraient être liées aux variations saisonnières de température dans le milieu et (en partie) à la dynamique de l'infestation. Les métacercaires de *P. crucibulum* à environ un mois post-infestation (mois d'août), étant alors libres dans les tissus de l'hôte, entraînent une augmentation de l'expression de C3, c'est à dire une réponse immunitaire aigue généralisée via le système du complément. Cette intervention du complément apparaît cependant limitée dans le temps et n'interviendrait pas dans le cadre d'une réponse chronique. Par la suite, il serait particulièrement intéressant d'étudier le développement du système immunitaire chez les juvéniles G0 de sole. Il s'agirait aussi de préciser la cinétique d'expression différentielle du C3 sur des individus ayant été infestés expérimentalement en laboratoire, de manière à éviter la variabilité d'âge et de stade de développement du parasite induite par les infestations en milieu naturel. Par ailleurs, une approche d'expression différentielle multi-gènes, par obtention d'une banque de gènes chez *Solea solea*, permettrait d'aborder la réponse immunitaire mise en place face à ce parasitisme de manière globale.

Chapitre VIII. Swimming activity of 0-group common sole *Solea solea*: a laboratory study on the effects of digenean metacercariae.

E. D. H. Durieux, M. Le Duigou, P. Sasal and M-L. Bégout

Article soumis (le 08/03/2007) à *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*

Abstract

Effects of digenean metacercariae on the swimming activity of 0-group common sole were evaluated under laboratory conditions using a video-tracking system. Experiments were conducted in two sessions: (i) on wild-caught individuals ($n = 31$) sampled in June, July, September and November (2004) in a nursery ground (Pertuis Charentais, Bay of Biscay, France) where they were naturally infected by *Timoniella* spp. (Acanthostomatidae) and *Proisorhynchus crucibulum* (Bucephalidae); (ii) on *P. crucibulum in situ*-infected individuals ($n = 18$) comprising three groups classified according to their infection levels and a control group (2005). The measured behavioural variables were: distance travelled and frequency of occurrence of burying, swimming and immobility. Swimming activity of wild-caught 0-group sole decreased significantly from June (43.80 ± 21.22 m h⁻¹) to July (5.46 ± 1.29 m h⁻¹), thereafter remaining at a very low level in September and November (less than 3 m h⁻¹). Independently of infection, such strong reduction in swimming activity may reflect the late settlement processes that make 0-group sole sedentary in nursery grounds. Focusing on the infected groups alone, a significant positive relationship between *P. crucibulum* abundance and swimming activity of 0-group sole was detected. The potential behavioural alteration of 0-group sole by this parasite is discussed.

Key words: Behaviour – flatfish – parasitism – nursery ground – video-tracking

1. Introduction

Fish habitat utilization reflects a trade-off between spatial distribution of essential resources, the internal state of the organism, and its responses to ambient conditions (Huntingford, 1993). Investigating this trade-off can be achieved through behavioural analyses that provide a unique perspective between the organism and its environment, or between its physiology and ecology (Little, 2002). Coastal areas, such as estuaries and shallow water bays, serve as nurseries for juveniles of many marine fishes and especially flatfishes. In these essential habitats, flatfish juveniles have to face highly variable environmental conditions and superimposed human activities that may jeopardize survival and influence recruitment into the adult population (Beck *et al.*, 2001).

Among the sources of variation of environmental conditions, parasitism is now a factor taken into account in flatfish juvenile ecology. On nursery grounds, 0-group flatfish juveniles become infected by digenean metacercariae parasites (El-Darsh & Whitfield, 1999b; Laffargue *et al.*, 2004; Durieux *et al.*, 2007a; Durieux *et al.*, 2007b). Like many internal parasites, digeneans have a complex life cycle. In marine environment, molluscs are usually first intermediate hosts, with small fishes as second intermediate hosts and various piscivorous vertebrates such as fishes, birds or mammals as definitive hosts. Cercariae actively penetrate the skin of the second intermediate host, encyst as metacercariae in the body and transmission to the definitive host occurs through predation.

Parasites are known to modify a wide range of physiological, morphological and behavioural traits of their hosts (Combes, 2001). Many examples of host manipulation by parasites have been described (Moore, 2002; Thomas *et al.*, 2005a). By interacting with host behaviour, in such a way that vulnerability to predation by the target definitive host may increased, could be highly beneficial for these trophically transmitted parasites. Behavioural alterations of fish intermediate host by digenean metacercariae have been demonstrated in several studies (Poulin, 1993; Lafferty & Morris, 1996; Barber *et al.*, 2000; Shirakashi & Goater, 2002; Seppala *et al.*, 2004). However, most of the studies took place in freshwater systems, and knowledge of marine fish-parasite relationships is still rare (Sasal & Thomas, 2005).

Previous studies of the widely distributed and most economically important flatfish species of the North East Atlantic region, common sole, *Solea solea* (L.), have focussed on the behavioural processes occurring in 0-group juveniles during nursery colonisation using both field and laboratory studies (Champalbert & Koutsikopoulos, 1995; Amara *et al.*, 2000). However, very little information is available concerning 0-group sole movement capacities within the nursery grounds apart from field studies concerning their spatio-temporal distribution (Coggan & Dando, 1988; Dorel *et al.*, 1991; Rogers, 1992; Jager *et al.*, 1993). In nursery grounds co-occurring with mussel farms, the 0-group sole are highly infected by *Proserhynchus crucibulum* (Bucephalidae) (Laffargue *et al.*, 2004; Durieux *et al.*, 2007b), for which the first intermediate host is the cultured blue mussel, *Mytilus edulis*, and conger eel, *Conger conger*, is the definitive host (Matthews, 1973). Parasitic infection of 0-group sole by *P. crucibulum* in the nursery grounds is closely linked to mussel farming, therefore specific evaluation on the effects of this parasite requires attention.

In this ecological context, where the spatial utilization of the habitat by fishes is dependent on swimming activity and capacity, we addressed the question of the effects of infection by digenean metacercariae on the swimming activities of 0-group sole. First, we aimed to quantify the swimming activity of juveniles and, second, we tested the potential effects of digenean metacercariae on swimming behaviour. We conducted the study under laboratory conditions using a video-tracking system. The work was accomplished in two phases: first, we analysed the temporal evolution, from late colonisation until the onset of winter (*i.e.* June to November) of the swimming activity of wild-caught 0-group juveniles naturally infected by digenean metacercariae; in a second experiment, in order to focus on the effects of *P. crucibulum*, we compared the swimming activity of 0-group juveniles (experimentally *in situ*-infected) displaying different infection levels of metacercariae of this parasite *vs.* a control group.

2. Material and methods

2.1. Origin, maintenance and parasitic status of fish

Thirty-one wild 0-group juveniles were caught in the Pertuis Charentais, a main sole nursery for the Bay of Biscay (Le Pape *et al.*, 2003b) in June, July, September and November 2004 in a mussel pole-culture area using a push net, to avoid harm to the fish (Durieux *et al.*, 2007b). At the video tracking laboratory, fish were maintained in aerated tanks (45x30x35 cm) with filtered sea water (temperature: 20°C; salinity: 35 psu; oxygen concentration: 100% air saturation) and a sand substratum (light colour). Fish were fed daily with frozen *Tubifex*. They were maintained under these conditions for at least 10 days acclimation prior to experimentation in order to avoid tidal rhythm effects that could prevent group comparisons. An artificial photoperiod was applied: daylight (8:00 – 21:00), a twilight transition period (7:00 – 8:00 and 21:00 – 22:00) and a night period (22:00 – 06:00).

In 2005, a second experiment on aquaculture reared 0-group juveniles exclusively infected by *P. crucibulum* was undertaken. These fish were purchased in May 2005 from a commercial fish farm (Solea BV, The Netherlands), to ensure that the animals were free from parasites, had the same age and consequently, homogeneous length. The juveniles were individually marked with subcutaneous VI alpha marks (NMT, Ltd) and held in 400 l aerated indoor tanks with a sand substratum, maintained at 20°C under natural light in a field laboratory. Fish were fed daily on aquaculture pellets. During July, the month of maximal infection by *P. crucibulum* (Durieux *et al.*, 2007b), individuals were divided between two separate cages (80x40x15 cm with a 5 mm mesh), each set in a mussel pole culture area located in the Pertuis Charentais. The first was exposed for 4 days (4d) and the second for 11 days (11d), both at 3 meters depth. The purpose of this *in situ* exposure was to obtain individuals with two different levels of infection, but comparable to natural intensities observed in wild-caught fish (Durieux *et al.*, 2007b). A control group was maintained under laboratory conditions during the *in situ* exposure of the caged fish at sea. After *in situ* exposure, fish were brought back to the field laboratory and maintained together with the control group for a 3 month, long enough for the metacercariae to develop (Matthews, 1973). A sub-sample of the fish were transferred to the video tracking laboratory and maintained under the same conditions as those fish used in the wild-caught experiment for a minimum period of 10 days before recordings started.

In both experiments the fish were sacrificed by an overdose of clove oil after video recordings, individually measured (to 1 mm, standard length SL) (Table 1) and then stored at -20°C. For parasite analysis, individual fish were thawed and dissected under a binocular microscope to check for digenean metacercariae, which were identified on the basis of

morphological features (Matthews, 1973; Maillard, 1976). Parasites were counted and their locations noted in four defined body zones: (1) cephalic region (in muscle), (2) lateral muscles, (3) muscles of the pterygia and (4) fins. Prevalence (%: percentage of infected fish), mean abundance (Ab: mean number of parasites per fish) according to Bush et al (1997) and percentage occurrence in the different body locations were calculated for each parasite taxa (Table 2). Wild-caught fish gradually accumulated digenean metacercariae of *P. crucibulum* and *Timoniella* spp. (Durieux et al., 2007b). *Timoniella* spp. has the laver spear shell, *Hydrobia* spp., as first intermediate host and the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, as the definitive host (Maillard, 1976). Therefore, the experimental site for *in situ* infection was chosen far away (several kilometres) from the muddy area where laver spear shell is abundant so that *in situ* infected fish were only parasitized by *P. crucibulum* with 100% prevalence but differential mean abundance (\pm SE) according to the two exposure cages, with 7.33 ± 1.66 (4d) and 18.33 ± 2.39 (11d) respectively. The inter-individual variability of the infection within each cages (4d and 11d) led us to classify individuals into 3 groups displaying different infection levels vs. the control group (n = 6; N = 0): group 1 (n = 4; $4 < N < 5$; 4d), group 2 (n = 4; $8 < N < 16$; 4d and 11d) and group 3 (n = 4; $17 < N < 26$; 11d); with n the number of fish individuals and N the actual number of metacercariae per fish.

Table 1. Sample size (n), mean standard length (SL \pm SE (mm)), and size range for the two set of experiments on 0-group common sole, *Solea solea*: different sampled months of wild-caught individuals from the Pertuis Charentais nursery ground (France) naturally infected by digenean metacercariae; experimentally *in situ*-infected individuals by *Proserhynchus crucibulum* (Digenea, Bucephalidae)

Experiment	Sample	n	SL \pm SE (mm)	range
Wild-caught	June	7	46.00 \pm 1.23	41 - 50
	July	9	51.22 \pm 1.97	44 - 63
	September	5	72.20 \pm 1.43	69 - 76
	November	10	108.80 \pm 3.21	96 - 125
<i>In situ</i> -infected	Control	6	104.83 \pm 2.5	97 - 113
	Group 1	4	104.50 \pm 2.8	98 - 111
	Group 2	4	99.75 \pm 1.67	96 - 104
	Group 3	4	97.50 \pm 5.53	86 - 114

Table 2. Prevalence (P (%)), mean abundance (Ab \pm SE), range (min – max), and percentage occurrence in different locations within the host ((1): cephalic region; (2): lateral muscles; (3): pterygian muscles; (4): fins) for the different parasite taxa for the two set of experiments on wild caught 0-group common sole, *Solea solea*: different sampled month of wild-caught individuals captured in 2004 in the Pertuis Charentais nursery ground (France) and infected by digenean metacercariae; 2005 individuals experimentally *in situ*-infected by *Proisorhynchus crucibulum* (Digenea, Bucephalidae)

Parasite taxa	Experiment	Sample	P (%)	Ab \pm SE	min - max	location (%)			
						(1)	(2)	(3)	(4)
<i>Timoniella</i> spp.	Wild caught	June	100	28.29 \pm 5.22	3 - 46	19.2	55.6	25.2	0
		July	100	63.44 \pm 14.39	16 - 153	14.5	64.1	21.4	0
		Sept	100	33.20 \pm 6.61	19 - 71	17.5	51.2	30.7	0.6
		Nov	100	139.20 \pm 28.66	11 - 265	12.4	28.3	54.1	5.2
<i>P. crucibulum</i>	Wild caught	June	14.3	0.14 \pm 0.13	0 - 1	100	0	0	0
		July	100	18.78 \pm 6.58	4 - 71	25.4	62.1	12.4	0
		Sept	100	33.00 \pm 9.89	5 - 58	26.1	33.9	40	0
		Nov	90.9	2.60 \pm 0.79	0 - 9	41.4	44.9	13.7	0
	<i>In situ</i> -infected	Control	-	-	-	-	-	-	-
		Group 1	100	4.5 \pm 0.25	4 - 5	11.1	77.8	11.1	0
		Group 2	100	12.5 \pm 1.48	8 - 16	26	50	24	0
		Group 3	100	21.5 \pm 1.82	17 - 26	17.4	57	25.6	0

2.2. Video tracking set-up and protocol

In the video tracking laboratory (isolated from external disturbances): three black circular arenas of 60 cm diameter, with walls drilled regularly with 5 mm diameter holes to allow water circulation, were placed individually in a 400 l tank with aeration and water filters that maintained a continuous water flow around the arena. A 5 cm deep layer of black sand (100 to 300 μ m) was placed on the bottom of the arena in order to allow sole to bury and to provide an adequate colour contrast to allow fish detection by the image analysis system. Water was maintained at temperature around 20°C (by an air conditioning system in the laboratory); salinity at around 35 psu; and oxygen concentration at around 100% air saturation. The arenas were illuminated laterally by artificial light on the following photoperiod basis: daylight (8:00 – 21:00; white light: 0.3×10^{15} Q.cm⁻².s⁻¹), a twilight transition period (7:00 – 8:00 and 21:00 – 22:00; white light: 0.3×10^{14} Q.cm⁻².s⁻¹) and a night period (22:00 – 06:00; infrared light (PAR38 IR 175): 0.14×10^{14} Q.cm⁻².s⁻¹). Since fish are not sensitive to infrared light (Douglas & Hawryshyn, 1990), nocturnal behaviour was

considered un-altered by the artificial lighting used to assess nocturnal swimming. Fish were not fed the day before the experiment nor during the subsequent video recordings.

Above each arena, a digital black and white high sensitivity camera (Sony XCD-X700, XGA) linked to a computer equipped with Visilog 6.2 software (NOESIS, France) was mounted. Image acquisition proceeded with cyclic sub-sampling of each arena with 33 s duration sequences of 1 image s⁻¹ and each image was saved in .jpeg format. Successive sequences relative to a same arena were separated by a time lag of 2 min because of a 7 s delay between each sequence acquisition. One fish selected randomly was introduced per arena at 11:00 and video recordings began for a 48 hrs duration.

Fish detection was based on the colour contrast between the fish (appearing in white) and the black sandy bottom using image analysis (Visilog 6.2). The XY coordinates (mm) of the barycentre of the detected fish shape were extracted for each image / time. Automation of the acquisition and image treatment process was achieved by an integrated VBA module to Visilog 6.2, developed by NOESIS for this experiment. When the fish was not detected, XY coordinates equalled 0, and the fish was considered buried.

2.3. Data analyses and statistics

For wild-caught fish, 5 to 10 individuals per month (June, July, September, November) *i.e.* 1488 hrs (> 1, 473, 000 images) of video-tracking were analysed. For *in situ* infected fish, 18 fish were analysed *i.e.* 864 hrs (> 850, 000 images).

Based on XY coordinates, four behavioural variables could be calculated: the distance travelled between consecutive images (D, m) and the frequency of occurrence of three different activities: burying (%B), swimming (%S) and immobility (%I), expressed in percentages.

For each individual fish (48 hrs), hourly values of the four variables were calculated: Dh (m h⁻¹), %Bh, %Sh and %Ih. These values were then compared between groups for each experiment (months for wild-caught fish and infection level groups for *in situ* infected fish) using repeated measures one way ANOVA on rank transformed data.

Averages for the four variables were calculated over the total 48 hrs per fish: Dtot (m h⁻¹), %Btot, %Stot and %Itot; and for light conditions, day: Dd (m h⁻¹), %Bd, %Sd and %Id; twilight: Dt (m h⁻¹), %Bt, %St and %It; night: Dn (m h⁻¹), %Bn, %Sn and %In.

Pairwise differences between groups were analysed by non-parametric unilateral Mann Whitney U tests on the second step calculated values (averages per total and per light period respectively). For wild-caught fish, in order to take into account the temporal aspect of fish sampling, only differences between the two consecutive months were screened for.

Relationships between parasite abundance (*Timoniella* spp., *Proisorhynchus crucibulum* and total) and the four behavioural variables (per total and per light period) were analysed using non-parametric Spearman rank order correlation (SC): (i) for wild-caught fish within each sampled month; (ii) for *in situ* infected fish, both using a simultaneous analysis of the four groups and in also using only the 3 groups of infected fish. In order to avoid size effect on distance travelled, values were corrected for size prior correlation analysis.

For derived instantaneous swimming speeds, only values $> 5 \text{ mm s}^{-1}$ (video tacking resolution level) were considered for analysis. Swimming speed frequencies were calculated for swimming speed classes of 2 cm s^{-1} for the different groups and for each experiment.

Results are given as averages \pm SE (Standard Error). Statistical tests were performed using SYSTAT 11.0 and were considered significant at $\alpha = 5\%$.

3. Results

3.1. Wild-Caught Fish

Significant differences were found in average distance travelled D_h (m h^{-1}) and %Bh, %Sh and %Ih between the sampled months (repeated measures one way ANOVA, $df_{(3,27)}$: $F = 11.264$, $p < 0.001$; $F = 11.255$, $p < 0.001$; $F = 13.831$, $p < 0.001$; $F = 7.602$, $p = 0.001$). Between June and July, D_{tot} and D_n decreased significantly (MW, $p = 0.05$, $p = 0.025$); %Stot, %St and %Sn decreased significantly (MW, $p = 0.011$, $p = 0.05$, $p = 0.003$) (Fig. 1). Between July and September, %Btot, %Bd, %Bt and %Bn increased significantly (MW, $p \leq 0.01$ for all tests), and %Itot, %Id, %It and %In decreased significantly (MW, $p < 0.01$ for all tests). %Stot and %Sd decreased significantly (MW, $p = 0.02$, $p = 0.014$, respectively) (Fig. 1). No significant difference was detected between September and November.

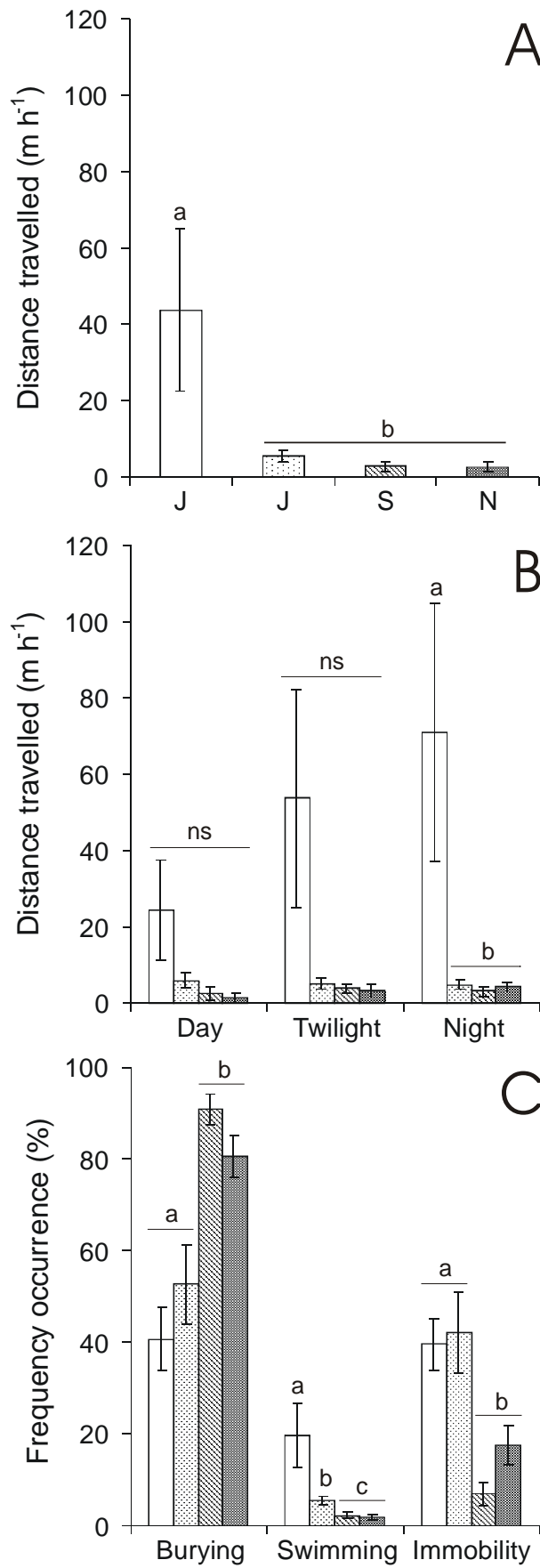


Figure 1. Average distance travelled (m h⁻¹) calculated on the total 48 hours observation period for each sampled month (A), for each light time period (B) (artificial light time period was set as Day:

8:00 – 21:00; Twilight: 6:00 – 7:00 and 21:00 – 22:00; Night: 22:00 – 6:00) and frequency occurrence (%) for the three different type of activity (burying, swimming and immobility) (C), in wild-caught 0-group common sole, *Solea solea*, captured in 2004 in the Pertuis Charentais nursery ground (France) and naturally infected by digenean metacercariae. According to unilateral Mann Withney U test same letter indicate that the data are not significantly different.

Table 3. Presentation of the significant results of non parametric Spearman rank order correlation analysis (SC) between parasite abundance and the four behavioural variables for the two set of experiments on 0-group common sole, *Solea solea*: (i) different sampled months of wild-caught individuals captured in the Pertuis Charentais nursery ground (France) and infected by digenean metacercariae; (ii) individuals experimentally *in situ*-infected by *Proisorhynchus crucibulum* (Digenea, Bucephalidae).

Experiment	Sample (n)	Var 1	Var 2	R	P	
Wild-caught	June (7)	Timo *	Dt	0.815	0.025	
		Para *	%St	0.667	0.050	
	July (9)	Timo *	%Bn	-0.703	0.035	
		Timo *	Dt	0.975	0.005	
	September (5)	Proso *	%Bt	0.900	0.037	
		Para *	Dn	0.900	0.037	
		Para *	%Sn	0.900	0.037	
		Proso *	Dtot	0.670	0.017	
	<i>In situ</i> -infected	Group 1, 2, 3 (12)	Proso *	%Stot	0.660	0.020
			Proso *	Dd	0.596	0.041
Proso *			%Sd	0.614	0.034	

NB: *Timoniella* spp. (Timo), *Proisorhynchus crucibulum* (Proso) and total parasites (both taxa) (Para) abundance were considered independently as variable 1 (Var 1) in the analysis; the four considered variables were Dtot (m h⁻¹) (corrected for size) and the frequency of occurrence of three different activities: burying (%B), swimming (%S) and immobility (%I) (expressed in %) over the total 48 hrs experiment (tot) and per period of the day (day, twilight, night) were considered independently as variable 2 (Var 2) in the analysis.

For *in situ*-infected experiment no significant correlation was found when including the control group.

Significant correlations were found between parasite abundance (*Timoniella* spp., *Proisorhynchus crucibulum* and total) and the four behavioural variables (per total and per light period) within each sampled month (Table 3). *Timoniella* spp. abundance was positively correlated with Dt at twilight in June and negatively with %Bn at night in July. *Proisorhynchus crucibulum* abundance was positively correlated with %Bt at twilight in September. Total parasite abundance was positively correlated with Dt and %St at twilight in July and Dn and %Sn at night in September.

For fish sampled in June, swimming speed frequencies displayed a bimodal distribution (Fig. 2). The first mode for speed comprised between 0-2 cm s⁻¹ and a second for

speed of 8-10 cm s^{-1} , each representing 25% of the overall swimming speeds. For fish sampled in July, September and November, swimming speed frequencies displayed an unimodal distribution with 50-60 % of swimming speeds between 0-2 cm s^{-1} .

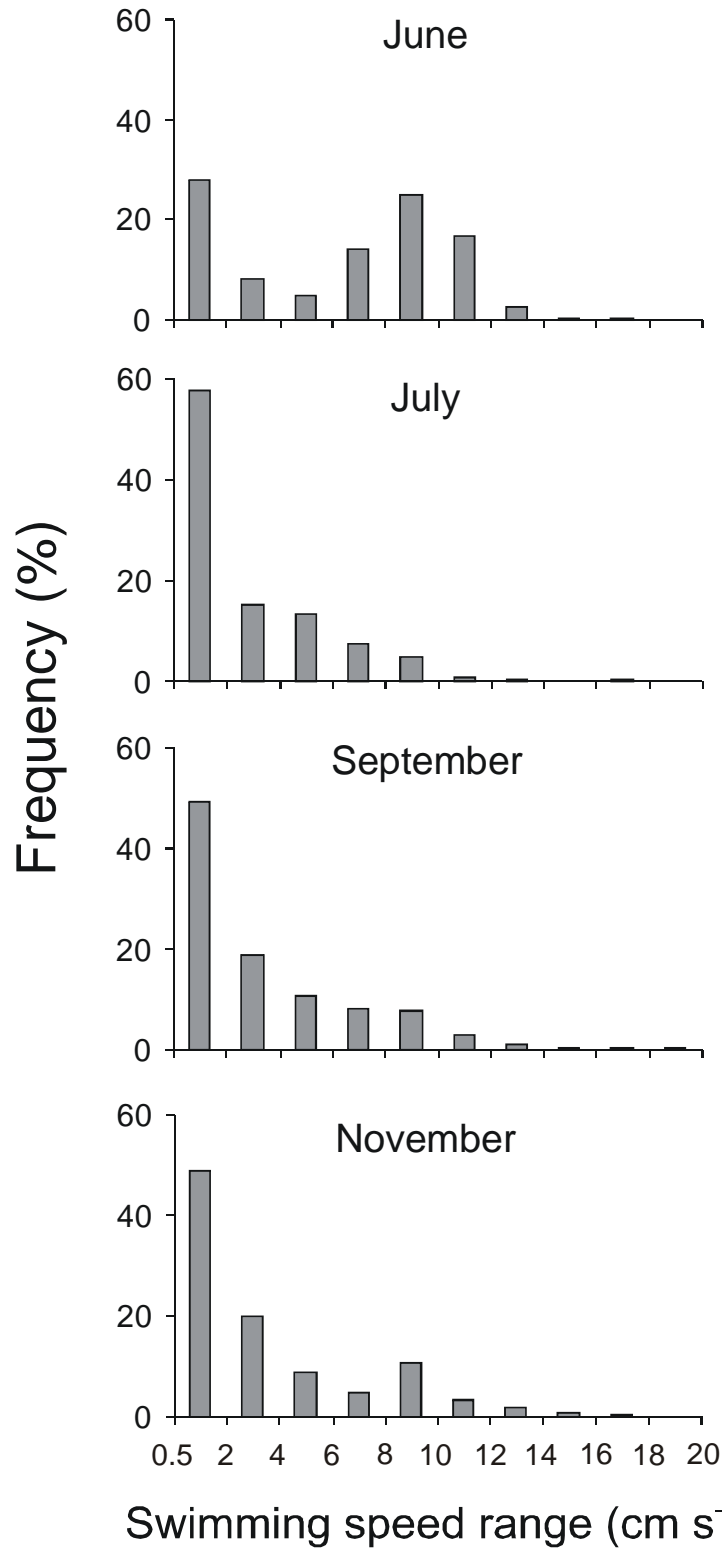


Figure 2. Swimming speed (cm s^{-1}) frequency distribution calculated on the total 48 hours observation period for each sampled month of wild-caught individuals captured in the Pertuis Charentais nursery ground (France).

3.3. In situ-infected Fish Experiment

No significant difference in Dh, %Bh, %Sh and %Ih was found between the groups (repeated measures one way ANOVA, $df_{(3, 14)}$, $p > 0.05$ for all tests). However, %Bn was significantly lower in the control than in group 1 (MW, $p = 0.028$), %In and %Itot was significantly higher in the control than in group 1 (MW, $p = 0.028$, for both tests) (Fig. 3). Dt was significantly lower in the control than in group 3 (MW, $p = 0.044$) and %Itot was significantly higher in the control than group 3 (MW, $p = 0.044$). %It was significantly lower in group 1 than in group 2 (MW, $p = 0.042$). Dd and %Sd were significantly higher in group 3 than in group 2 (MW, $p = 0.022$, for both tests). Dtot, Dd, Dn, %Stot, %Sd and %Sn were significantly higher in group 3 than in group 1 (MW, $p < 0.05$ for all tests) (Fig. 3).

Through the simultaneous analysis of all the four groups (including the control), no significant relationships between *P. crucibulum* abundance and behavioural variables were detected. However, when using only the three infected groups, *P. crucibulum* abundance was positively correlated with Dtot and %Stot (for the 48 hrs tracking period), and Dd and S%d (for the day light period) (Table 3).

Swimming speed frequencies were more widely distributed and varied among groups (Fig. 4): for the control, group 1 and group 2, around 20% of the observations were in the speed classes 0.5-2; the second mode was 4-6 for the control, 8-10 for group 1 and 10-12 for group 2. For group 3, speed class 0.5-2 represented only around 7% of the observations, the speed frequency distribution being unimodally centred on 6-8 cm s^{-1} .

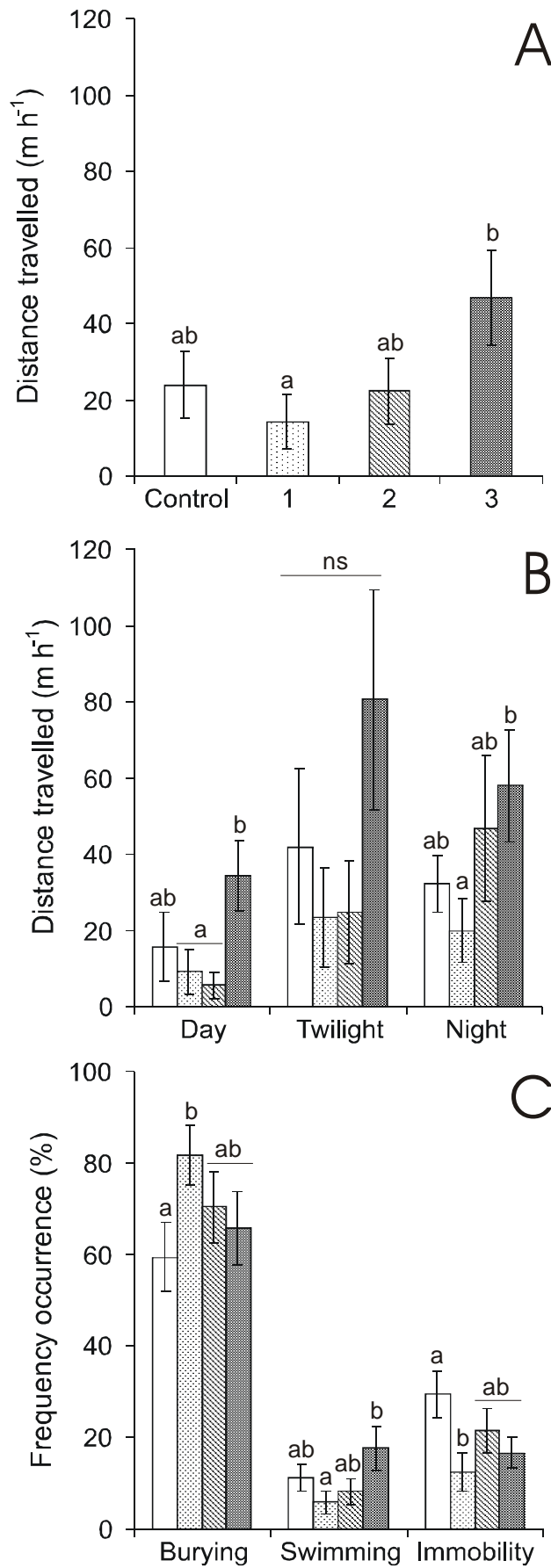


Figure 3. Average distance travelled (m h⁻¹) calculated on the total 48 hours observation period for each sampled month (A), for each light time period (B) (artificial light time period was set as Day:

8:00 – 21:00; Twilight: 6:00 – 7:00 and 21:00 – 22:00; Night: 22:00 – 6:00) and frequency occurrence (%) for the three different type of activity (burying, swimming and immobility) (C), in reared 0-group common sole, *Solea solea*, experimentally *in situ*-infected by *Proisorhynchus crucibulum* (Digenea, Bucephalidae). The number of metacercariae for each infected group was comprised between 4 – 5, 8 – 16 and 17 – 26 for Group 1, 2 and 3, respectively.

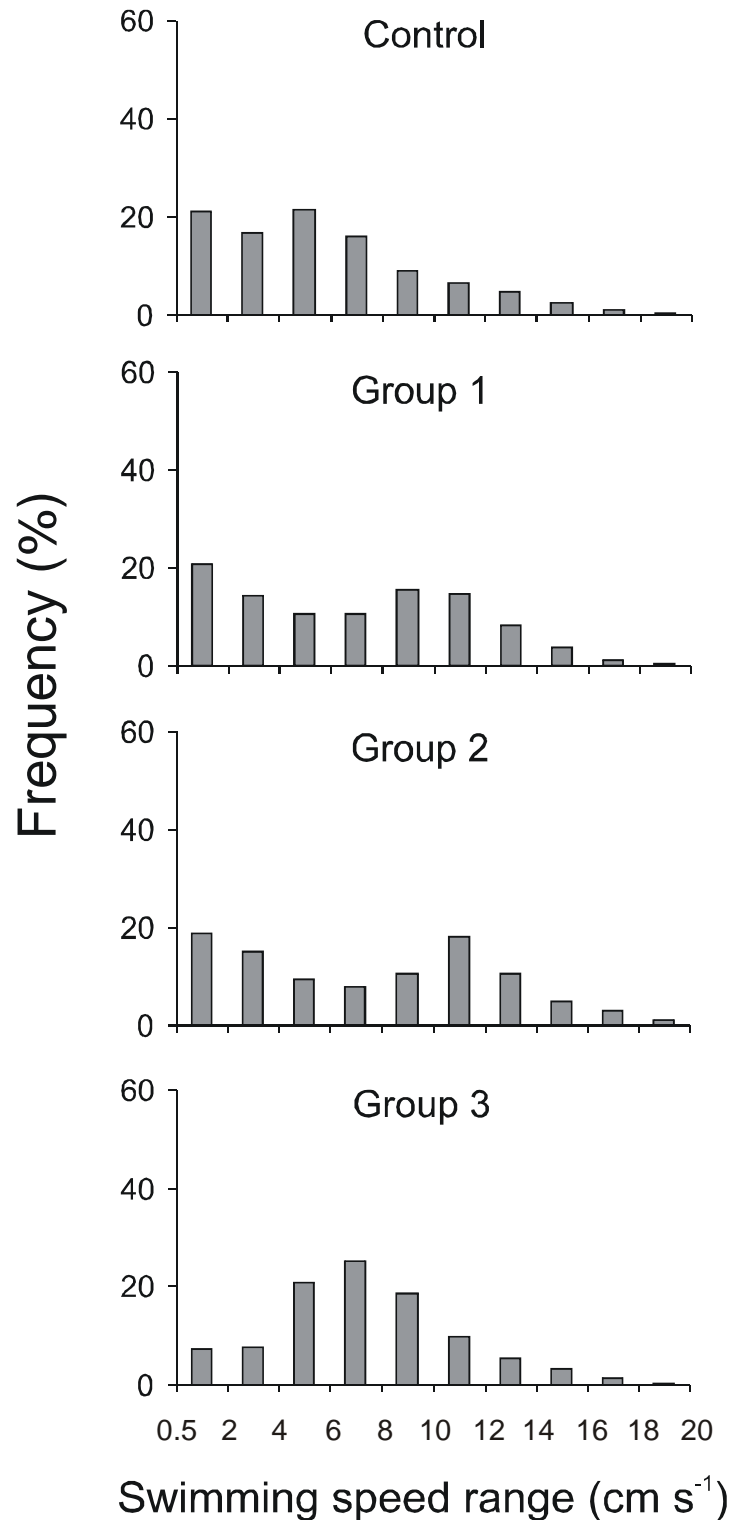


Figure 4. Swimming speed (cm s⁻¹) frequency distribution calculated on the total 48 hours observation period for each group (Group 1, 2, 3 and control) of reared 0-group common sole, *Solea solea*, experimentally *in situ*-infected by *Proisorhynchus crucibulum* (Digenea, Bucephalidae).

4. Discussion

Our data were obtained under experimental conditions using a video tracking system at a scale of observation enabling the assessment of daily swimming (levels, rhythms) and burying activities. This method appears to be one of the only non-harmful methods of quantifying free activity of 0-group sole. Caution should be applied in extrapolating these data to field observations and ecological interpretation of the results are in relation to experimental conditions. Swimming activity over 2 days showed relatively high inter individual variability as often observed for fish (Bourke *et al.*, 1997; Salvanes & Hart, 1998; Mehner, 2006). Nevertheless, some clear trends in the evolution of the behavioural activities over the course of the settlement period and in relation to digenean metacercariae infection were observed.

4.1. Swimming activity of 0-group sole: ecological perspective in nursery grounds

0-group juveniles showed clear circadian swimming activity in line with the artificial light conditions of the experiment, with higher activity at twilight and night. This is consistent with previous studies on young 0-group sole (Macquart-Moulin *et al.*, 1991; Champalbert & Marchand, 1994; Champalbert & Koutsikopoulos, 1995) and older 2-group (Lagardère *et al.*, 1988). Champalbert *et al.* (1991) demonstrated that sole > 30 mm were photonegative at most light intensities except at twilight. Considering all samples except June and July, burying behaviour represented 80% of activity. This behaviour is linked to a strategy for energy saving, with lower basal metabolism while buried (Howell & Canario, 1987). Wild-caught fish from June and July buried less than fish from September and November. The latter were often immobile at the surface of the substratum, especially at night. As burying capacity of juvenile flatfish is a strong logistic function of their size (Gibson & Robb, 1992), June and July fish, due to their relatively small size, may have been limited by the size of the sand grains used in the experiment (100-300 µm).

The wild-caught 0-group sole showed a strong decline (around 8 times less) in swimming activity from June to July, with relatively low activity until November. The parasite loads of both *Timoniella* spp. and *P. crucibulum* also increased from May to June, however, further differences in parasite loads in the following sampled months was observed without seeing any discrepancy in swimming activity. Thus, instead of parasite induced

behaviour, an ontogenetic change in host behaviour is predicted. Both environmental factors (i.e. current, salinity, light, and food availability) and endogenous rhythms are considered to play a determinant role in nursery colonisation (Champalbert & Koutsikopoulos, 1995). 0-group sole juveniles in the Bay of Biscay colonize nursery grounds from around May (Amara et al., 2000). The results suggest that around one month after colonisation, 0-group sole juveniles of around 46 mm SL still demonstrate a relatively high average swimming activity. This behaviour may be a relic of an exploratory behaviour associated with colonisation of new habitat. Low activity from July onwards may reflect transition to a well established sedentary behaviour. This change was also reflected by swimming speed frequency distributions with more than 50 % of the values comprised $0.5-2 \text{ cm s}^{-1}$ from July onwards. This typically corresponds with the foraging behaviour of juvenile flatfish searching benthic prey (Lagardère et al., 1994; Hill et al., 2000; 2002). From an ecological point of view, the low swimming activity may be interpreted as a sedentary behaviour giving a relatively high resiliency of 0-group sole in confined areas of the nursery. This is consistent with field observations of potential 0-group sole movements in various nursery grounds based on density distributions (Dorel et al., 1991; Rogers, 1992; Jager et al., 1993) and recapture of tagged individuals (Coggan & Dando, 1988).

4.2. Effects of the parasitic infection on 0-group common sole behaviour

In experiments with wild-caught fish, we detected some significant relationships between parasite abundances (i.e. *Timoniella* spp., *Proisorhynchus crucibulum* and total) and the measured behavioural variables (i.e. average distance travelled and percentage burying). However, these relationships were not consistent for each parasite taxa within each month and light conditions. In the wild, parasitic infection is influenced primarily by the host behaviour independently of the effects of parasitism (Combes, 2001). Theoretically the more active fish should therefore have higher encounter rates with cercariae than more sedentary individuals, resulting in higher parasite load. In addition, host-parasite relationship vary according to both host age and parasite infectivity and/or developmental stage (Poulin, 1993; Barber et al., 2000; Thomas et al., 2005a). Different parasite species may have different manipulative strategies within a single host (Outreman et al., 2002). For all these reasons, the effects of the different digenean metacercariae taxa appear difficult to distinguish on naturally infected individuals.

The second experiment was set up with the aim of determining the specific effects of *P. crucibulum* on the swimming activity of 0-group sole in relation to mussel farming activities, mussel being first intermediate host of this parasite. Although no difference between the control and each infected group was detected for the swimming activity variables (D and S%), a significant difference was observed between least and most infected fish. Furthermore, when excluding the control from the analysis, a significant positive relationship between *P. crucibulum* abundance and distance travelled and percentage swimming, was detected from the 48 hours observation period. Because these fish were *in situ*-infected in two cages with different exposure periods (4d and 11d), the observed relationship can not be attributed to the behaviour of the fish prior to the infection.

Parasite-induced behavioural alteration of the host is always a complex phenomenon, reflecting the balance between host physiological state, parasite infectivity and environmental conditions (Combes, 2001). Host behaviour can even be altered directly by the parasite through secretion of neuro-active substance or by taking up a specific location (*e.g.* brain or eyes) that enables them to manipulate the host's behavioural control system, or indirectly through a physiological constraint imposed to the host to modulate its behaviour (*e.g.* altered foraging behaviour due to energetically demanding parasites) (Barber & Wright, 2006).

Several examples of behavioural alteration of fish (as second intermediate host) by digenean metacercariae to facilitate transmission to the definitive host have been reported (Lafferty & Morris, 1996; Barber *et al.*, 2000; Shirakashi & Goater, 2002; Seppala *et al.*, 2004). The majority of these studies have dealt with parasites with specific locations in their fish hosts, that directly affect their behaviour. In the present study digenean metacercariae of *P. crucibulum* encysted preferentially in muscle tissue of 0-group sole and did not demonstrate any particular preference for a specific location in the body of their intermediate host, as has previously been reported by Matthews (1973).

Parasites always induce an energetic cost for their host because they utilize host-derived resources for their own development and maintenance. They can also induce a host immune reaction which involves an additional energy expenditure for the host. Detailed studies have demonstrated the increased foraging behaviour of fish infected with nutritionally demanding large plerocercoid larvae of cestodes (Barber & Wright, 2006). Although much smaller than the latter, *P. crucibulum* metacercariae are relatively large digenean

metacercariae (to about 2mm) and at 3-months post-infection are totally encapsulated within a cyst of host origin as a consequence of a previous strong host reaction (Matthews, 1973). During our laboratory experiment and the day before, fish were deprived of food. Fish can display various strategy to save energy. For example, Dalla Via et al. (1998) highlighted the metabolic advantage of lowering swimming activity under hypoxic conditions for sole. By contrast, under food restriction, juvenile sole and other flatfish can increase their swimming activity in the water column (Macquart-Moulin et al., 1991; Miyazaki et al., 2000). Thus, the positive relationship between *P. crucibulum* metacercariae abundance and the swimming activity of 0-group sole might represent a host behavioural adaptation to the infection, where swimming activity (as a measure of the time spent searching for food) increases with parasite load in order to compensate for energetic cost of the infection.

This parasite-induced behavioural change may also increase exposure to predators. Different studies have highlighted the reduced anti-predator responses of fish infected by digenean metacercariae (Poulin, 1993; Seppala *et al.*, 2004; Ondrackova *et al.*, 2006). However, behaviour changes are adaptative to the parasites when transmission to the definitive hosts is increased. In our study, *P. crucibulum* infected individuals are potentially more vulnerable to the opportunistic benthic feeding definitive host (conger eel), but further work is needed to test this potentiality. Experimental tests of the “manipulation hypothesis”, conducting higher predation rate of infected fish by the definitive host, and thus are relatively rare in the literature. But Lafferty and Morris (1996) demonstrated through a field experiment that fish parasitized by *Euhaplorchis californiensis* were more susceptible to the definitive host birds than non-parasitized conspecifics. Bearing in mind that small behavioural modifications may lead to large increases in predation, the present results may require further attention.

In conclusion, the swimming activity of 0-group common sole has been quantified in relation to how digenean metacercariae may affect it. 0-group sole showed a clear ontogenetic change in swimming activity between June and July, demonstrating the transition between the exploratory behaviour of late colonisation and the sedentary behaviour characterizing nursery grounds behaviour. Slight effects of *P. crucibulum* on the measured behavioural variables could be detected, through a positive relationship between parasite load and swimming activity levels. This may represent a compensation strategy of the host for the energetic cost of parasitism, potentially conducting to a higher exposure to predators. It appears essential

therefore, to evaluate the energetic cost of this parasitic infection on 0-group sole in order to further validate these results. In addition, the effects of infection on other behavioural variables (e. g. escape capacities) should be measured. At last the higher predation rate of parasitized individuals by the definitive host should be also tested to document the potentiality of host manipulation.

Acknowledgements

Ph.D. grant to E.D.H. Durieux was funded by IFREMER and the Conseil Régional Poitou Charentes. D. Péral (NOESIS) developed the VBA module for image acquisition and treatment automation. J. Grizon was the boat pilot for fish sampling in the field. S. Robert and H. Evano were scientific scuba divers for *in situ*-infection experiment. P. Pineau, M. Prineau and N. Lachaussée helped in the set-up and maintenance the experimental infrastructures. We are grateful to E. Hunter from the CEFAS Lowestoft laboratory and the 4 anonymous reviewers for valuable comments and corrections.

Chapitre IX. Conclusion générale et Perspectives

1. Conclusion générale

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de caractériser le système hôte-parasite, juvéniles G0 de sole - métacercaires de Digènes, dans les zones marines côtières tant au niveau de la dynamique spatiotemporelle que des effets de cette infestation sur l'hôte.

1.1. Dynamique de l'infestation

Tout d'abord, au niveau taxonomique, nous avons pu mettre en évidence que les G0 de sole étaient infestés par des métacercaires appartenant à plusieurs taxons de Digènes. Ainsi, dans le golfe de Gascogne, en plus du complexe *Prosorhynchus* spp. (Bucéphalidés) déjà mis en évidence par Laffargue et al. (2004), nous avons montré que *Timoniella* spp. (*T. imbutiforme* et *T. praeterita*) (Acanthostomidés) et *Podocotyle* sp. (Opécoelidae) utilisent aussi les juvéniles G0 de sole en tant que deuxième hôte intermédiaire (Durieux et al., 2007a). En ce qui concerne le complexe métacercaires de *Prosorhynchus* spp. chez les juvéniles G0 de sole dans les pertuis Charentais, le couplage de l'analyse morpho-anatomique et de l'analyse moléculaire (séquençage de l'ITS 1) a permis de distinguer les espèces de *P. crucibulum* et *Prosorhynchus* sp. A. Une forte analogie morpho-anatomique entre *Prosorhynchus* sp. A (métacercaires) et *P. aculeatus* (adultes) a été mise en évidence alors que des différences moléculaires ont été détectées. Ceci soulève une certaine ambiguïté taxonomique qui pourra être levée à l'aide d'analyses complémentaires. Concernant le cycle de *P. crucibulum*, nous avons démontré que ce parasite utilise effectivement les moules cultivées sur bouchots comme premier hôte intermédiaire, puis, entre autres petits Téléostéens benthiques, les juvéniles G0 de sole (deuxième hôte intermédiaire) et enfin les congres (hôte définitif) dans les pertuis Charentais.

Pour la dynamique de l'infestation proprement dite, nous avons mis en évidence la variabilité spatiotemporelle de l'infestation chez les juvéniles G0 de soles à différentes échelles de manière descriptive d'une part, et expérimentale *in situ* d'autre part. Les juvéniles G0 de sole accumulent les métacercaires de Digènes localement, dès le premier mois suivant

la colonisation des nourriceries côtières (Durieux et al., 2007b). A méso-échelle des différences apparaissent : i) entre stocks, les G0 des nourriceries de Manche ont des niveaux d'infestation plus faibles que ceux du golfe de Gascogne et ii) au sein d'un même stock, les G0 des nourriceries de baie ont des niveaux d'infestation plus élevés que ceux des estuaires (Durieux et al., 2007a; Durieux et al., 2007c). Les travaux réalisés à l'échelle des pertuis Charentais ont montré qu'en considérant la distribution spatiale des G0 de sole dans l'habitat, leur infestation était essentiellement contrôlée par les facteurs locaux que sont la présence (probablement aussi l'abondance) des premiers hôtes intermédiaires et la capacité de dispersion des cercaires.

L'ensemble de nos travaux dans les pertuis Charentais montre que les infestations des juvéniles G0 de sole par les métacercaires de *P. crucibulum* sont intrinsèquement liées à l'activité de mytiliculture sur bouchots. A travers son cycle de vie, ce parasite est ainsi directement transmis d'une espèce cultivée à une espèce sauvage qui, représentant toutes deux un intérêt économique majeur, constitue un conflit d'usage potentiel. Cette infestation est cependant très limitée dans l'espace, avec les niveaux d'infestation élevés essentiellement restreints aux zones mytilicoles de bouchots et cela malgré de très faibles prévalences d'infestation détectées dans les moules.

De manière générale, les niveaux d'infestation relativement élevés rencontrés chez les juvéniles G0 de sole pour les différents taxons en particulier dans les baies, montrent le succès des cycles de vie de ces parasites dans ce type d'habitats. Ceci est révélateur de la présence en abondance des différents hôtes successifs de ces parasites et de l'ajustement des fenêtres temporelles de rencontre entre hôte – parasite, ce qui traduit un certain équilibre de l'écosystème.

1.2. Effets de l'infestation

Nous avons pu aborder l'évaluation des effets de l'infestation des juvéniles G0 de sole par des métacercaires de Digènes à différents niveaux d'intégration biologique (immunité moléculaire, condition, croissance et comportement) de manière descriptive (*a posteriori* chez des juvéniles prélevés en mer) et de manière expérimentale (infestations *in situ* en cages en mer).

En ce qui concerne, *Timoniella* spp., nous n'avons détecté aucun effet sur la fonction immunitaire (expression du gène C3), ni de changement *a posteriori* des différents paramètres de condition (K, Lipides totaux, TAG/ST) sur des individus issus du milieu naturel. D'après nos résultats, nous supposons que malgré des taux d'infestation pouvant être extrêmement élevés (jusqu'à 984 métacercaires comptées dans un individu), ce parasite semble présenter une pathogénicité particulièrement faible, ce qui pourrait être le signe d'une adaptation élevée de ce parasite à cet hôte.

Parmi les différents taxons de métacercaires infestant les juvéniles de sole, *P. crucibulum* apparaît comme le plus pathogène. Au cours de son développement dans le deuxième hôte intermédiaire, la métacercaire brise le kyste hyalin qu'elle a préalablement sécrété, pour se nourrir directement des muscles de l'hôte (Matthews, 1973). Grâce au suivi de l'expression du gène C3, nous avons pu montrer que pendant cette période de quelques semaines où les métacercaires sont libres dans l'hôte, les juvéniles G0 de sole semblent développer une réponse immunitaire généralisée faisant intervenir le système du complément. Cette réponse immunitaire constitue forcément un coût énergétique pour les juvéniles G0 de sole. Cependant, ils arrivent à le compenser en condition trophique non-limitante, de telle sorte que les performances de croissance et la condition ne soient pas affectées. Nous avons pu mettre en évidence une relation positive entre l'abondance des métacercaires de *P. crucibulum* et les niveaux d'activité natatoire. Ce résultat pourrait constituer une stratégie comportementale de compensation énergétique. En contre-partie, cette activité accrue pourrait exposer de façon plus importante les individus fortement infestés aux prédateurs (Barber et al., 2000; Moore, 2002; Thomas et al., 2005a). En milieu naturel, seule une relation négative entre l'abondance des métacercaires de *P. crucibulum* et l'indice de condition morphométrique K a été détectée en Novembre, c'est-à-dire quand les températures diminuent fortement. En ce cas, il s'agit d'individus qui présentent un statut nutritionnel de très faible niveau et des taux d'infestation particulièrement élevés (Durieux et al., 2007b). Ce résultat pourrait ainsi correspondre au « winter stress syndrome » développé par Lemly (1997). En effet, ce concept stipule que l'effet négatif d'un facteur stressant (comme en l'occurrence ce parasitisme), sur un organisme aquatique de région tempérée, s'exprime principalement en hiver, c'est-à-dire quand les capacités de compensation sont fortement réduites.

Le système hôte – parasite, *P. crucibulum* – G0 de sole (avec ces niveaux d'infestation) semble relativement récent. En effet, la mytiliculture a commencé au 13^{ème}

siècle, localement, au niveau du pertuis Breton mais elle s'est réellement développée sur le littoral français dans des zones sableuses à vaseuses (correspondant bien souvent aux nourriceries de sole) à partir du 19^{ème} siècle (Marteil, 1976). Au contraire les populations naturelles de moules sont plutôt présentes dans des zones de substrat rocheux, c'est à dire assez éloignés des zones de nourricerie de sole. On peut donc supposer que ce système (avec ces niveaux d'infestation), qui a une existence relativement récente (à l'échelle évolutive), est encore assez instable. Par conséquent, la pathogénicité de ce parasite pourrait être plus importante que pour d'autres systèmes plus anciens. Il faut cependant remarquer que, même si *P. crucibulum* semble entraîner une réaction immunitaire aiguë via le complément quand la métacercaire est libre, la pathogénicité de ce parasite demeure relativement faible dans l'absolu étant donné qu'aucune mortalité liée à ce parasitisme n'a directement été observée dans nos différents travaux.

1.3. Performances des juvéniles G0 de sole dans les pertuis Charentais : évaluation de la fonction de nourricerie

L'ensemble des résultats obtenus met en évidence que le parasitisme est un facteur biotique susceptible d'agir en synergie avec les autres facteurs environnementaux. C'est donc un facteur qu'il faut désormais prendre en compte dans la qualification de l'habitat des juvéniles G0 de sole.

Les métacercaires de Digènes ont pu être utilisées de manière efficace comme marqueurs biologiques de l'utilisation de l'habitat par les juvéniles G0 de sole à petite échelle dans la nourricerie des pertuis Charentais. Les parasites sont en effet de très bons marqueurs biologiques des mouvements de leur hôte en milieu marin (MacKenzie & Abaunza, 1998; MacKenzie, 2002; 2005), mais cela n'avait encore jamais été mis en évidence à une telle échelle spatiale. On a ainsi pu démontrer que les juvéniles G0 de sole présentent une forte sédentarité dans les différentes sous-parties de l'habitat des pertuis Charentais jusqu'à l'automne. Par ailleurs, l'habitat des pertuis Charentais apparaît comme fortement hétérogène en terme de qualité pour les juvéniles G0 de sole au niveau spatial, étant donné que ces derniers présentent des performances différentielles de croissance suivant les sous-parties de cet habitat. On a ainsi pu mettre en évidence que la baie de l'Aiguillon était une zone de qualité nettement plus élevée : les juvéniles G0 de sole étaient plus nombreux et présentaient des performances de croissance très supérieures. L'hypothèse selon laquelle les performances

de croissance obtenues dans cette zone sont soutenues par une production particulièrement importante de nourriture (proies benthiques) a été émise. Ces résultats nous ont permis de qualifier cette zone préférentielle de nourricerie *stricto sensu* pour les juvéniles G0 de sole dans le pertuis Breton d'après les critères définis par Beck et al. (2001). Cette meilleure connaissance de l'écologie des juvéniles G0 de sole dans leur habitat est un pré-requis à la mise en place de mesures de gestion de l'environnement côtier (Rice, 2005).

2. Perspectives de recherche

2.1. Système G0 de sole – métacercaires : développement d'un outil expérimental

La poursuite des travaux sur la dynamique mais aussi sur les effets de l'infestation devrait préalablement passer par la mise au point de l'infestation expérimentale en laboratoire du deuxième hôte intermédiaire. Pour cela, il s'agirait de disposer pour l'espèce de parasite ciblée, du premier hôte intermédiaire infesté afin de produire des cercaires. En milieu naturel, les prévalences d'infestation des premiers hôtes intermédiaires sont très faibles, comme on a pu l'observer notamment pour *P. crucibulum* (Chapitre 2), ce qui ne permet pas de disposer d'assez d'individus infestés pour mettre en place des infestations expérimentales au niveau du deuxième hôte intermédiaire. Une solution pourrait être d'infester expérimentalement les premiers hôtes intermédiaires. Cela a notamment été tenté pour *P. crucibulum* au cours de cette thèse, en mettant en présence pendant plusieurs mois (avril à juillet 2005) des congrus naturellement infestés (infestation vérifiée *a posteriori*) et des moules dans des bacs expérimentaux. Malheureusement, cette tentative s'est avérée infructueuse, aucune moule infestée n'ayant été obtenue. J'ai fait l'hypothèse que la période de mise en contact n'était pas propice à la production d'œufs et/ou à la transmission des miracidia et/ou au développement du sporocyste. Il serait intéressant de renouveler ce protocole sur une durée plus longue à compter de la période de la fin d'été ou du début de l'automne (période à partir de laquelle les congrus sont sensés s'infester par *P. crucibulum*). Alternativement, i) l'obtention de miracidia en laboratoire à partir d'œufs prélevés sur des parasites adultes ou même ii) la transplantation de sporocystes d'individus infestés à des individus sains pourrait aussi être envisagée. L'infestation expérimentale des hôtes définitifs de *Prosorhynchus* sp. A, le congru, *Timoniella* spp. et de *Podocotyle* sp., le bar, à partir de métacercaires de ces parasites a été réussie au cours de cette thèse (données non publiées). Il serait ainsi possible de reproduire l'intégralité d'un cycle de vie d'un parasite de manière expérimentale, ce qui constituerait un outil de

choix pour étudier les processus de transmission et des effets du parasite pour les différents hôtes successifs afin de mieux aborder son rôle dans l'écosystème.

2.2. Dynamique de l'infestation : apport de l'outil expérimental

Afin de poursuivre les travaux engagés dans le cadre de cette thèse sur la dynamique de l'infestation, il conviendrait de tester de manière expérimentale l'influence des facteurs environnementaux abiotiques (*i.e.* température, salinité, pH, courant, lumière, polluants) sur la production de cercaires, leur capacité de dispersion, leur infectivité, leur survie et leur succès d'infestation. Dans le cadre du contexte actuel du changement climatique, la priorité devrait être mise sur l'impact de l'augmentation de température sur la production de cercaires et les conséquences que cela aurait sur les populations d'hôte et sur l'écosystème (Marcogliese, 2001; Mouritsen & Poulin, 2002; Poulin, 2006; Poulin & Mouritsen, 2006).

2.3. Effets de l'infestation sur les G0 de sole : apport de l'outil expérimental

Aux vues des premiers résultats obtenus dans cette thèse, il apparaît essentiel de poursuivre les efforts de recherche sur l'évaluation au niveau de l'individu des effets de l'infestation, en particulier ceux liés à *P. crucibulum*, sur les juvéniles G0 de sole. Cela devrait être mené dans le cadre d'infestations expérimentales réalisées en laboratoire de manière à limiter au maximum la variabilité des facteurs autres que les parasites.

En terme d'immunité, il s'agirait d'étudier finement la cinétique d'expression du gène C3 pendant les deux à trois premiers mois après infestation. L'expression d'autres gènes pourrait aussi être analysée. Notamment, le moyen d'étudier les différents gènes impliqués dans la réaction immunitaire causée par ce parasitisme serait de réaliser une banque de gènes (Neumann & Galvez, 2002; Williams *et al.*, 2003; Akopyants *et al.*, 2004; Ewart *et al.*, 2005). Il serait fondamental de coupler l'étude de l'expression de gènes à l'analyse de l'activité des composants exprimés et à l'étude de la réponse immunitaire au niveau cellulaire, notamment par histologie, afin de comprendre précisément le processus d'encapsulation des métacercaires mise en place (Sommerville, 1981; Faliex, 1991b; Huizinga & Nadakavukaren, 1997).

En terme de métabolisme et de performances écophysiologicals, il apparaît essentiel d'évaluer le coût de l'infestation tout au long du développement du parasite sur le métabolisme basal des juvéniles G0 de sole par respirométrie (Lefrançois & Claireaux, 2003). Cependant, une infestation parasitaire peut altérer les performances d'une espèce hôte même à des périodes où plus aucun effet sur le métabolisme n'est détecté (Lemly & Esch, 1984). Ainsi, l'évaluation en parallèle des performances de croissance et de condition apparaît nécessaire. Etant donné les résultats déjà obtenus, il est important de mieux cerner les capacités de compensation des juvéniles G0 de sole face aux infestations par *P. crucibulum*. Aussi, il faudrait désormais évaluer les performances de croissance et l'évolution de l'indice de condition sous contraintes limitantes de température et de nourriture. Ceci permettrait notamment de vérifier l'hypothèse émise sur le « winter stress syndrom » (Lemly, 1997) concernant les infestations par *P. crucibulum*. Dans le contexte actuel d'évaluation des effets de certains polluants sur les juvéniles G0 de sole dans les nourriceries (projet ANR SoleBÉMol), une évaluation de la synergie de facteurs polluants – parasite pourrait aussi être testée.

En terme de comportement, aux vues de la relation positive entre l'infestation par *P. crucibulum* et les niveaux d'activité natatoire (Chapitre VIII), il apparaît important de vérifier l'hypothèse émise sur la stratégie de compensation d'une perte d'énergie ou bien de déterminer s'il s'agit d'un effet direct du parasitisme et donc de manipulation de l'hôte par le parasite. Ainsi, on pourrait imaginer reconduire ce type d'expérience en offrant un accès à de la nourriture afin de tester cette hypothèse. Par ailleurs, il serait intéressant de compléter cette évaluation de l'effet du parasite sur les capacités d'enfouissement de l'hôte (Gibson & Robb, 2000) et sur sa réponse de fuite comme cela a déjà été fait dans un autre système Téléostéen – parasite (Blake et al., 2006). Enfin, il s'agirait d'évaluer s'il existe une prédation préférentielle des juvéniles G0 de sole infestés par les Téléostéens piscivores, hôtes définitifs des différentes espèces de Digènes rencontrées, comme cela a déjà été montré dans un autre système (Lafferty & Morris, 1996).

Dans une deuxième étape, l'ensemble des études sur l'effet de l'infestation réalisées à l'échelle individuelle pourrait être transposées à l'échelle de la population.

2.4. Variabilité intra- et inter-spécifique

Au niveau intra-spécifique, il serait aussi important d'analyser les facteurs intrinsèques des hôtes, tels que leur génotype et/ou leur système immunitaire, comme déterminants de la variabilité interindividuelle de l'infestation aussi bien en terme quantitatif que qualitatif (Combes, 2001; Kalbe & Kurtz, 2006).

Au niveau interspécifique, en plus du succès d'infestation, l'étude du développement des métacercaires de *P. crucibulum* chez les juvéniles G0 de sole par histologie en comparaison avec différentes espèces hôtes serait particulièrement pertinente. En effet, Matthews (1973) a montré qu'il existait une certaine spécificité au niveau du deuxième hôte intermédiaire, certaines espèces ne permettant pas le développement des métacercaires. Une première comparaison des métacercaires de *P. crucibulum* entre des juvéniles G0 de sole et des gobies, *Pomatoschistus minutus*, a montré un développement différentiel des métacercaires entre espèces hôte. En effet, les métacercaires enkystées étaient plus grandes chez les gobies, et certaines métacercaires étaient progénétiques, c'est-à-dire qu'elles présentaient un développement avancé du système reproducteur avec une production d'œufs par autofécondation (Pinet, 2005). De tels phénomènes de progénèse présentent un intérêt particulier en terme de dynamique de population des parasites.

2.5. Observatoire des nourriceries de sole dans les pertuis Charentais

L'enregistrement à petite échelle spatiale des performances de croissance des juvéniles G0 de sole dans les pertuis Charentais doit être mené sur plusieurs années afin de mieux évaluer la qualité de l'habitat et leur fonction de nourricerie. Ce travail est actuellement mené par le laboratoire IFREMER Ressources Halieutiques de l'Houmeau, il a commencé en 2005 et devrait durer au moins 5 ans (ORE-REPER, programme FONSOLE). Ainsi, les variations interannuelles de densité mais aussi de taille et / ou de croissance des juvéniles G0 de sole des pertuis Charentais pourront être évaluées. D'importantes variations interannuelles de taille ont déjà été mises en évidence entre 2005 et 2006 (Léauté, comm. pers.). Dans cette perspective d'observatoire à long terme, il apparaît essentiel de mesurer un maximum de facteurs biotiques et abiotiques en continu au cours de la phase de croissance des G0 afin de hiérarchiser les facteurs contrôlant les performances de croissance dans cette zone. Un accent particulier devrait être porté sur la disponibilité de la nourriture (en évaluant la biomasse de proies de macrofaune benthique accessible aux juvéniles G0) afin de vérifier l'hypothèse

émise dans cette thèse selon laquelle la disponibilité en nourriture dans la baie de l'Aiguillon soutient des performances de croissance plus élevées.

2.6. Communauté de macroparasites : marqueurs biologiques de sole

A plus long terme, il serait intéressant de déterminer la dynamique d'infestation en milieu naturel à l'échelle de la période juvénile, c'est à dire des individus G0 à G3, idéalement sur une même cohorte en milieu naturel. En effet, les adultes (G3 et plus) du golfe de Gascogne sont infestés par des nématodes au niveau du tube digestif (Chapitre Annexe : Durieux et al., 2007c). On pourrait ainsi mettre en évidence la dynamique d'acquisition de ces parasites chez les soles et ainsi définir si certains parasites sont acquis dans les nurseries et d'autres sur le plateau continental. Les connaissances ainsi apportées augmenteraient considérablement la puissance d'utilisation des parasites comme marqueurs biologiques des mouvements de la sole à l'échelle du stock (Chapitre Annexe : Durieux et al., 2007c).

2.7. Développement d'un outil multi-traceurs de structure de population chez la sole

L'évaluation finale de la fonction de nurserie des pertuis Charentais pour les juvéniles de sole passe nécessairement par l'estimation de la connectivité entre habitats juvéniles et habitats adultes, puis par la mesure de la contribution relative des individus issus de ces habitats au renouvellement de la population adulte (recrutement).

Tout d'abord, à l'échelle du stock exploité du golfe de Gascogne, il s'agirait d'évaluer la contribution des différentes nurseries aux différentes frayères. Il a été établi que les juvéniles de sole pouvaient être discriminés entre les différentes nurseries estuariennes grâce à l'analyse microchimique (par ICP-MS) de leurs otolithes (De Pontual et al., 2000). Ainsi, en comparant la signature chimique de juvéniles prélevés dans les principales nurseries du golfe de Gascogne avec celles d'adultes issus de la même cohorte (même âge), il sera possible d'évaluer la connectivité entre nurseries et frayères pour cette population de sole commune. L'ensemble des échantillons a déjà été collecté et ce travail ainsi initié constitue une partie intégrante de mon projet postdoctoral (Collaboration avec H. De Pontual). Celui-ci s'inscrit dans la continuité d'un projet antérieur initié par Françoise Lagardère et Hélène de Pontual. Une étude de la communauté parasitaire des adultes au niveau des branchies et du tube digestif sera aussi menée afin de déterminer, par l'utilisation des parasites comme marqueurs biologiques, si le stock du golfe de Gascogne est homogène ou

non (Chapitre Annexe : Durieux et al., 2007c). Enfin, une approche génétique par génotypage microsatellite sera menée en collaboration avec F. Volckaert (Belgique).

A l'échelle de la population, il apparaît essentiel de délimiter précisément les stocks écologiques de manière à optimiser la gestion de cette ressource. Une approche multi-marqueurs (parasites – microchimie des otolithes – génétique) sera ainsi entreprise afin de définir la structure de population de la sole commune en Atlantique Nord Est avec E. Hunter du CEFAS à Lowestoft, UK (Marie Curie Intra-European Fellowships : projet CONSOLE).

Chapitre Annexe : Comparison of *Solea solea* macroparasites between two nursery continental shelf systems in the Bay of Biscay and the Portuguese coast

E. D. H. Durieux, J. F. Marques, P. Sasal, M-L. Bégout, and H. N. Cabral

Article publié en juin 2007 dans *Journal of Fish Biology* (Vol. 70, pp. 1921-1930)

Abstract

Digenean metacercariae of 0-group sole ($n = 70$) were more abundant in the embayed nursery of the Pertuis Charentais than in the Tagus estuary nursery. Macroparasite assemblages of adult sole ($n = 119$) displayed only one species in common between the Bay of Biscay and the Portuguese coast continental shelves. These data highlighted the potential use of macroparasites as biological tags in various aspects of sole ecology.

Keywords: Sole – juvenile – adult – parasites - ecological stock - biological tag

1. Introduction

The common sole, *Solea solea* (L.), is a widely distributed flatfish of the northeast Atlantic region, occupying muddy and sandy bottoms from the shore to 200 m depth (Whitehead et al., 1986). During the breeding period adults congregate in spawning grounds generally located at 50-100 m depth. After a planktonic larval stage, juveniles remain in shallow nursery grounds such as bays and estuaries until sexual maturity is reached at 2-3 years old (Rogers, 1989). This species is economically important, with a consistently high market price and a total annual average landing of 40,000 tonnes in recent years (FAO), with most sole stocks being reported as over-exploited (ICES, 2005). Therefore, understanding target species' population structure is an essential issue for stock assessment and fisheries management.

Parasites reflect many aspects of their fish hosts' biology and ecology, including diet, migration and recruitment (Williams et al., 1992) and can, therefore, be used as biological tags to distinguish fish ecological stocks (MacKenzie, 2002). The term 'ecological stock' is used to describe subpopulations which are distinguished by behavioural differences, but between which there is still a considerable amount of gene flow (MacKenzie, 2002). In fact, studies conducted in the North Atlantic and North Pacific have demonstrated the usefulness of macroparasites as tags for the discrimination of flatfish ecological stocks (Boje et al., 1997; Blaylock et al., 2003; McClelland et al., 2005; Marques et al., 2006b).

Despite their extensive distribution and low genetic population differentiation along the continental shelf (Exadactylos et al., 2003), *S. solea* habitats are discrete along the Atlantic coast which might result in differences in *S. solea* macroparasite fauna along its distribution range. In this study, macroparasite infection patterns of juvenile and adult sole have been compared between two different nursery-continental shelf systems belonging to two different management stocks: the Pertuis Charentais-mid Bay of Biscay (France, ICES VIIIa,b) and the Tagus estuary-central Portuguese coast (Portugal, ICES IXa), in order to investigate their potential use as biological tags.

2. Material and methods

The two coastal areas considered (Fig. 1) are recognized as important nursery grounds for their respective sole stock (Cabral & Costa, 1999; Le Pape *et al.*, 2003b). The Pertuis Charentais is an embayed nursery, with a low annual average of freshwater inputs from rivers ($10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in the Pertuis Breton and $50 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in the Pertuis d'Antioche) and is thus essentially under sea water influence. On the other hand, the Tagus estuary is a partially mixed estuary, with an annual average river flow of $400 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, the nursery ground of *S. solea* being located in brackish waters (Table I). The two continental shelves under consideration also display strong differences in terms of their topography. The Bay of Biscay is characterized by a wide continental shelf that narrows from 200 km wide in the north to 30 km in the south, whereas the central Portuguese coast is characterized by a narrow continental shelf (15 - 70 km) cut by deep submarine canyons with the widest area being located north of the Tagus estuary (Fig. 1).

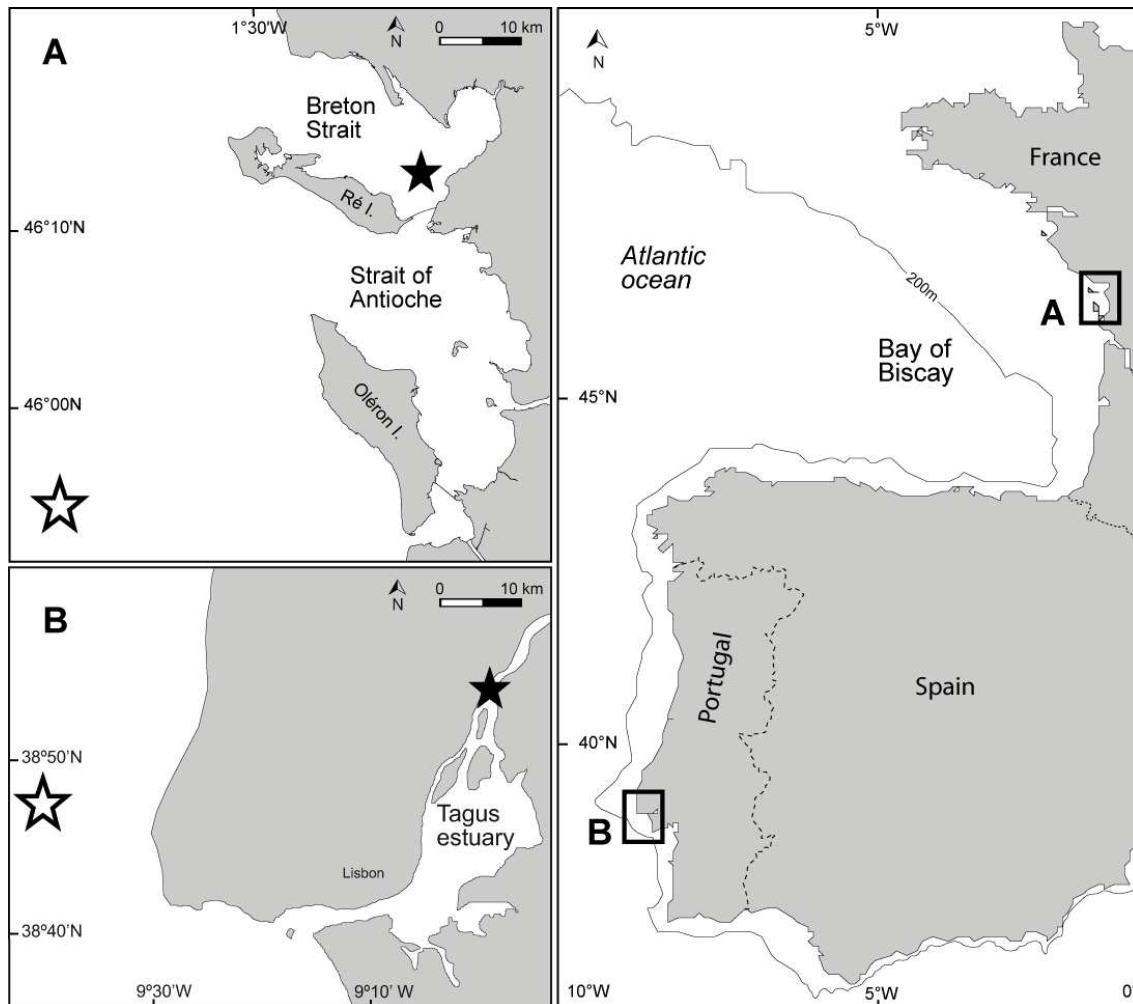


Figure 1. Location of the sampling stations for juvenile (black stars) and adult (white stars) common sole, *Solea solea*, in the two nursery-continental shelf systems: Pertuis Charentais-Bay of Biscay (France) (A); Tagus estuary-central Portuguese coast (Portugal) (B)

Table I. Water parameters (salinity and temperature) during the sampling period of 0-group juveniles and adults of *Solea solea* in the two different nursery-continental shelf systems (Pertuis Charentais-Bay of Biscay; Tagus estuary-Portuguese coast); number of individuals (n), mean total length \pm standard deviation (mean $L_T \pm$ S.D.), size range in L_T (min - max) for total, male and female samples of each life stage collected in each location.

	0-group juveniles Summer 2005		Adults Winter 2005	
	Pertuis Charentais	Tagus estuary	Bay of Biscay	Portuguese coast
Water parameters				
Temperature (°C)	19	25	11	13
Salinity	30	14	35	35
Total sample				
n	40	30	77	42
Mean $L_T \pm$ S.D. (mm)	84.7 \pm 7.9	93.3 \pm 17.2	318.7 \pm 60.9	324.7 \pm 31.1
Size range (mm)	(70 - 100)	(61 - 129)	(250 - 510)	(238 - 415)
Male sample				
n	34	13	41	37
Mean $L_T \pm$ S.D. (mm)	85.6 \pm 7.6	92.1 \pm 18.7	280 \pm 22.4	323.3 \pm 32.3
Size range (mm)	(72 - 100)	(61 - 128)	(250 - 350)	(238 - 415)
Female sample				
n	6	13	36	5
Mean $L_T \pm$ S.D. (mm)	79.8 \pm 9.5	95.3 \pm 18.6	362.8 \pm 62.0	336.0 \pm 24.2
Size range (mm)	(70 - 91)	(70 - 129)	(260 - 510)	(318 - 371)

NB: four 0-group individuals from the Tagus estuary could not be sexed and five adults from the Portuguese coast could not be sized.

S. solea 0-group juveniles ($n = 70$) were collected by beam trawl during summer (July-August 2005), when they were concentrated in the nursery grounds (Fig. 1). Adults ($n = 119$) were collected from commercial fishing vessels during winter (February 2005), the spawning period for the two studied areas, using bottom trawl (Bay of Biscay) and gill nets (Portuguese coast). Total length (L_T) was measured (1 mm precision) for each sampled individual (Table I). No significant difference in L_T was detected between the two 0-group samples nor between sexes within each sample (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$) (Table I). Although the size range was wider for adults sampled in the Bay of Biscay, those from the Portuguese coast were significantly larger (Mann-Whitney U -test, $n_1 = 77$, $n_2 = 37$, $P < 0.05$) (Table I). In the Bay of Biscay, L_T was significantly higher for females than for males (Mann-Whitney U -test, $n_1 = 41$, $n_2 = 36$, $P < 0.001$) whereas on the Portuguese coast no significant difference between sexes was detected for L_T (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$) (Table I). However, we note the high proportion of males in the Portuguese coast sample with only 5 females on the 43 sampled individuals. Based on their size range, all sampled adults were believed to be at least 3 years old.

0-group sole were thawed and their entire body dissected to check for macroparasites, especially digenean metacercariae (in muscle tissue), which were identified and counted. It is known that in summer digenean metacercariae infection is stabilized (Durieux et al., 2007b). For adults, the whole Portuguese sample and a subsample of 10 individuals from the Bay of Biscay were checked for metacercariae in muscle tissue but none was found. Gills and digestive tract of adult sole were dissected and checked for macroparasites, which were counted and identified. Sole acquire macroparasites progressively in their digestive tracts while feeding on the intermediate hosts of these parasites (Papoutsoglou & Papaparaskeva-Papoutsoglou, 1977). The parasitological indices of prevalence (the percentage of infected fish), mean abundance (the mean number of parasites per fish) and mean intensity (mean number of parasites per infected fish) were calculated in each sample according to Bush *et al.* (1997). As juveniles and adults were respectively sampled during the same season, temporal dynamics of the infection could not interfere in our comparison within each stage.

3. Results and discussion

Cercariae, shed from molluscan first intermediate hosts, penetrate through the skin of the second intermediate host, encysting as metacercariae especially in muscle tissue for the species found in this study. 0-group sole from the two nurseries presented the same digenean metacercariae species in their assemblage: *Timoniella* spp. (Acanthostomidae), *Proisorhynchus* sp. A and *P. crucibulum* (Bucephalidae) (Table II). *Timoniella* spp. complex comprise *T. praeterita* and *T. imbutiforme* in the study area. These data suggested that the two nurseries were within the same host-parasite biogeographic area. No relationship was detected between L_T and abundance for these species (Spearman rank order correlation, $P > 0.05$). No significant differences were found in parasite abundances between sexes within the Pertuis Charentais and the Tagus estuary (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$). However, values of macroparasite mean abundances were significantly higher in the Pertuis Charentais (Mann-Whitney U -test, $n_1 = 40$, $n_2 = 30$: *Timoniella* spp., $P < 0.001$; *Proisorhynchus* sp. A, $P < 0.001$; *P. crucibulum*, $P < 0.01$) (Table II).

Such discrepancy found between infection levels denoted the role played by environmental differences between embayed and estuarine nursery grounds, and thus the behaviour of sole juveniles. Infection by digenean metacercariae is mainly influenced by the

availability of the molluscan first intermediate hosts (Durieux et al., 2007b). For the species found in the present study, the mussel *Mytilus spp.* is the first intermediate host of *Proisorhynchus crucibulum* (Matthews, 1973) and the laver spire shell *Hydrobia spp.* the first intermediate host of *Timoniella spp.* (Maillard, 1973; 1974); the first intermediate host of *Proisorhynchus sp. A* remains unknown. In the Tagus estuary these molluscs are generally found at the mouth of the estuary, whereas 0-group juveniles concentrate in the uppermost part where salinity is lower (Cabral & Costa, 1999). Even if some *Hydrobia spp.* are found in less saline waters of the uppermost part of estuaries, marine digenean parasites should not be able to tolerate these low levels of salinity (Pietroock & Marcogliese, 2003).

Table II. Prevalence (P (%)), mean abundance (Ab \pm S.E.) and mean intensity (I \pm S.E. (max)) of the digenean metacercariae of 0-group juveniles *Solea solea* from the two nursery grounds (Pertuis Charentais and Tagus estuary).

Parasite taxa	Pertuis Charentais			Tagus estuary		
	P (%)	Ab \pm S.E.	I \pm S.E. (max)	P (%)	Ab \pm S.E.	I \pm S.E. (max)
Digenea						
<i>Proisorhynchus crucibulum</i>	57.5	1.93 \pm 0.49	3.35 \pm 1.71 (13)	16.7	0.70 \pm 0.47	4.20 \pm 0.35 (14)
<i>Proisorhynchus sp. A</i>	97.5	14.18 \pm 1.70	14.54 \pm 0.72 (40)	6.7	0.10 \pm 0.07	1.50 \pm 2.22 (2)
<i>Timoniella spp.</i>	62.5	8.85 \pm 3.61	14.16 \pm 5.34 (102)	20.0	0.5 \pm 0.21	2.50 \pm 0.57 (5)

In the Pertuis Charentais, because the small rivers do not allow upstream migration, *S. solea* 0-group juveniles remain in marine waters (Le Pape et al., 2003b). The abundance of the first intermediate hosts in this marine system provides, therefore, an explanation for the local accumulation of digenean metacercariae in this nursery ground (Durieux et al., 2007b). Similar results were obtained by El-Darsh & Whitfield (1999a) for the European flounder, *Platichthys flesus* (L.), juveniles in the Thames estuary where the most infected area with digenean metacercariae was the lower estuary, due to the presence of the first intermediate hosts.

The absence of metacercariae in late stage juveniles (Durieux, unpub) and adults (here) suggested that these parasites are eliminated through the host's immune response or natural death of the metacercariae before they reach their final host. In the Bay of Biscay, adults were infected with four species of Nematoda belonging to two families: the Cuccullanidae *Dichelyne minutus* and *Cucullanus campanae*; and the Anisakidae *Anisakis sp.* and *Hysterothylacium sp.* (Table III). *C. campanae* is a widely distributed and specific parasite of *S. solea* that uses the polychaete *Nereis spp.* as an intermediate host (Koie, 2000). According to this author, *Nereis spp.* are also the first intermediate hosts for *D. minutus*,

which despite being specific to *P. flesus*, has been detected in other hosts, especially in areas where its prevalence and intensity are low (Álvarez et al., 2002).

Table III. Prevalence (P (%)), mean abundance (Ab \pm S.E.) and mean intensity (I \pm S.E. (max)) of the macroparasite species of adult *Solea solea* from the two continental shelves (Bay of Biscay and Portuguese coast).

Parasite taxa	Bay of Biscay			Portuguese coast		
	P (%)	Ab \pm S.E.	I (max)	P (%)	Ab \pm S.E.	I \pm S.E. (max)
Nematoda						
<i>Anisakis</i> sp.	9.1	0.14 \pm 0.06	1.57 \pm 0.28 (3)	-	-	-
<i>Hysterothylacium</i> sp.	11.7	0.23 \pm 0.10	2.00 \pm 0.52 (6)	-	-	-
<i>Dichelyne minutus</i>	5.2	0.06 \pm 0.03	1.25 \pm 0.22 (2)	-	-	-
<i>Cullanus campanae</i>	26.0	0.51 \pm 0.12	1.95 \pm 0.24 (5)	28.6	0.43 \pm 0.13	1.50 \pm 0.25 (4)
Digenea						
<i>Macvicaria soleae</i>	-	-	-	4.8	0.24 \pm 0.21	5.00 \pm 2.83 (9)
Cestoda						
<i>Nybelinia lingualis</i>	-	-	-	7.1	0.09 \pm 0.06	1.33 \pm 0.27 (2)
<i>Scolex pleuronectis</i>	-	-	-	2.4	0.05 \pm 0.05	2.00 \pm 0.00 (2)
Acanthocephala						
<i>Acanthocephaloides propinquus</i>	-	-	-	2.4	0.05 \pm 0.05	2.00 \pm 0.00 (2)
Copepoda						
<i>Bomolochus soleae</i>	-	-	-	59.5	1.12 \pm 0.19	1.88 \pm 0.20 (4)

The Anisakidae, *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp., are characteristic of cold and/or deep waters and use planktonic euphausiid crustaceans and benthic invertebrates, respectively, as first intermediate hosts. *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. were only found in females and significant positive relationship was detected between these species abundance and L_T (Spearman rank order correlation with $n = 36$, $R = 0.356$, $P < 0.01$; $R = 0.438$, $P < 0.001$; respectively). The finding of these macroparasites only in females from the Bay of Biscay, where the water temperature is lower than in Portuguese waters, may thus be related to the parasite's ecology but also to that of the host. Given that Anisakidae are found in other fishes off the Portuguese coast (Marques et al., 2006a), the differences detected between the two areas and sexes might be due to differences in common sole ecological patterns in spatial partitioning and feeding habits between areas. Females being much bigger than males in the Bay of Biscay is consistent with increase in abundance of anisakidae parasites with host age and length (Tolonen & Karlsbakk, 2003). But the fact that they were only found in females may also reflect differences in diet between males and females, as already reported for Mediterranean soles by Molinero & Flos (1991). The much wider continental shelf in the Bay of Biscay, with depth increasing progressively, may allow adults to go deeper on this shelf and prey on a less diverse prey assemblage that might be mostly infected by nematodes.

On the Portuguese coast, adult sole exhibited a more diverse macroparasite fauna: one digenean, *Macvicaria soleae* (Opecoelidae), two cestodes, *Nybelinia lingualis* (Tentaculariidae) and *Scolex pleuronectis* (Tetraphyllidea *incertae sedis*), one acanthocephalan, *Acanthocephaloides propinquus* (Arhythmacanthidae), one nematode, *C. campanae*, and one copepod, *Bomolochus soleae* (Bomolochidae) (Table III). No significant differences in macroparasite mean abundances were detected between sexes (Mann-Whitney *U*-test, $P > 0.05$). A significant positive relationship was detected between L_T and *C. campanae* abundance (Spearman rank order correlation, $n = 37$, $R = 0.346$, $P < 0.05$). Prevalence and mean abundance of parasites were generally low in both sites, with values below 30.0 % and 0.6, respectively, except for the copepod *B. soleae* in the Portuguese coast which reached 59.5 % and 1.1 (Table III). There was no significant difference in mean abundance of *C. campanae* for the two samples, (Mann-Whitney *U*-test, $P > 0.05$) (Table III). A higher level of consumption of molluscs and crustaceans in coastal waters, probably explains the presence of the macroparasites *M. soleae* (Trematoda), *N. lingualis*, *S. pleuronectis* (Cestoda) and *A. propinquus* (Acanthocephala) in the Portuguese coast sample only. Whilst *M. soleae* and *S. pleuronectis* life-cycles include molluscs and crustaceans as intermediate hosts (Álvarez et al., 2002), *N. lingualis* and *A. propinquus* have been found to require amphipods as intermediate hosts (Dollfus, 1976). The finding of ectoparasites (Copepoda) in the Portuguese coast might be related to environmental conditions, especially water temperature, given that for parasites with direct life cycles these are the main factors controlling for infection success (MacKenzie & Abaunza, 1998). Also, as this ectoparasite is essentially found in coastal environments, it could be related to the more coastal distribution of sole in the Portuguese coast due to its narrow continental shelf. In contrast to the Bay of Biscay, the depth of the Portuguese coast continental shelf increases rapidly, which may limit the distribution of adult sole to shallower areas.

In the Muros estuary (Galicia, northwest Spain) which is located more or less half way between the two considered areas in the present study, Álvarez *et al.* (2002) found a diverse assemblage of abdominal macroparasites characterized by six species of Digenea and two species of Cestoda, with only two species in common with adults from the Portuguese coast and none with those from the Bay of Biscay. Although, Álvarez *et al.* (2002) did not report size range for the fish they examined, most of these individuals were likely to be juveniles

(between 1 and 3 years old at most), since they were sampled in the inner third of the Muros estuary. Thus, the differences found in macroparasites assemblage between Álvarez et al. (2002) study and the present might be related to differences in prey availability and feeding habits of sole between the three areas but also between estuaries and the continental shelf as pointed out by Molinero & Flos (1991) in the Mediterranean sea. These results suggest the acquisition of different abdominal macroparasites through the lifespan of the host, reflecting the different inhabited habitats. It also highlights the fact that within the same stock management area of the Portuguese coast (ICES IXa) different ecological stocks of sole may exist which is in agreement with what has been shown for other flatfishes off the Portuguese coast (Marques et al., 2006b).

In conclusion, this study demonstrated that macroparasites may reflect the habitat in which their sole hosts live and have lived through their life-span. They are therefore good indicators of the biology and ecology of both stages (juvenile and adult) of the common sole. Digenean metacercariae revealed the difference in the behaviour of 0-group juveniles between estuarine and embayed nursery areas and can be used as tags to infer migrations and habitat use of 0-group juveniles. Macroparasites infecting the gills and the digestive tracts of adults can also be used as tags to discriminate ecological stocks as they reflect differences in habitat and feeding habits of their hosts. A more detailed study including other sampling areas along the European Atlantic coast and focusing on the dynamics of the acquisition of macroparasites through the life cycle of sole is needed to assess stock boundaries and the relative contribution of the different nurseries to a specific stock.

Acknowledgements

This study was partly financed by the Ph.D. grants to J.F. Marques (Grant SFRH/BD/ 8983/2002), by Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, and to E.D.H. Durieux, by IFREMER and the Conseil Régional Poitou Charentes. This study was co-funded by the European Union through the FEDER - Fisheries Programme (MARE) and France through the PNEC (Programme National Environnement Côtier). We thank Y. Descatoire for Fig. 1. We are grateful to N. Campbell from the FRS Marine Laboratory, Aberdeen, UK, and the two anonymous reviewers for comments on and corrections to the manuscript.

Références bibliographiques

- Able, K.W., Manderson, J.P., Studholme, A.L., 1999. Habitat quality for shallow water fishes in urban estuary: the effect of man-made structures on growth. *Marine Ecology*, 187, 227-235.
- Akopyants, N.S., Matlib, R.S., Bukanova, E.N., Smeds, M.R., Brownstein, B.H., Stormo, G.D., Beverley, S.M., 2004. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136, 71-86.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Álvarez, F., Iglesias, R., Parama, A.I., Leiro, J., Sanmartin, M., 2002. Abdominal macroparasites of commercially important flatfishes (Teleostei: Scophthalmidae, Pleuronectidae, Soleidae) in northwest Spain (ICES IXa). *Aquaculture*, 213, 31-53.
- Amara, R., Galois, R., 2004. Nutritional condition of metamorphosing sole: spatial and temporal analyses. *Journal of Fish Biology*, 64, 72-88.
- Amara, R., Lagardère, F., 1995. Taille et âge au début de la métamorphose chez la sole, *Solea solea* (L.) du golfe de Gascogne. *ICES Journal of Marine Science*, 52, 247-256.
- Amara, R., Lagardere, F., Desaunay, Y., 1993. Seasonal distribution and duration of the planktonic stage of Dover sole, *Solea solea*, larvae in the Bay of Biscay: an hypothesis. *Journal of Fish Biology*, 43, 17-30.
- Amara, R., Lagardère, F., Désaunay, Y., Marchand, J., 2000. Metamorphosis and estuarine colonisation in the common sole, *Solea solea* (L.): implications for recruitment regulation. *Oceanologica Acta*, 23, 469-484.
- Amara, R., Mahe, K., LePape, O., Desroy, N., 2004. Growth, feeding and distribution of the solenette *Buglossidium luteum* with particular reference to its habitat preference. *Journal of Sea Research*, 51, 211-217.
- Amaral, V., Cabral, H.N., 2004. Ecology of the whiskered sole in the Sado Estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology*, 64, 460-474.
- Anderson, R., May, R., 1979. Population biology of infectious diseases: I. *Nature*, 280, 361-367.
- Anderson, R.M., May, R.M., 1978. Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology*, 47, 219-247.
- Arbault, S., Camus, P., Le Bec, C., 1986. Estimation du stock de sole (*Solea vulgaris*, Quensel 1806) dans le Golfe de Gascogne à partir de la production d'oeufs. *Journal of Applied Ichthyology*, 4, 145-156.
- Ballabeni, P., 1994. Experimental differences in mortality patterns between European minnows, *Phoxinus phoxinus*, infected with sympatric or allopatric trematodes, *Diplostomum phoxini*. *Journal of Fish Biology*, 45, 257-567.
- Ballabeni, P., Ward, P.I., 1993. Local adaptation of the trematode *Diplostomum phoxini* to the European minnow *Phoxinus phoxinus*, its second intermediate host. *Functional Ecology*, 7, 84-90.
- Balon, E.K., 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113, 178-185.
- Barber, I., Hoare, R., Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10, 131-165.

- Barber, I., Wright, H.A. 2006. Effects of parasites on fish behaviour: interactions with host physiology. In Sloman, K., S. Balshine R. Wilson (Ed), Fish and physiology of fish. ACADEMIC PRESS, pp.
- Bartoli, P., Gibson, D.I., Bray, R.A., 2005. Digenean species diversity in teleost fish from a nature reserve off Corsica, France (Western Mediterranean), and a comparison with other Mediterranean regions. *Journal of Natural History*, 39, 47-70.
- Beck, M.W., Heck, K.L., Able, K.W., Childers, D.L., Eggleston, D.B., Gillanders, B.M., Halpern, B., Hays, C.G., Hoshino, K., Minello, T.J. et al., 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience*, 51, 633-641.
- Bergman, M., Van der Veer, H.W., Zijistra, J., 1988. Plaice nurseries: effects on recruitment. *Journal of Fish Biology*, 33, 201-218.
- Blake, R.W., Kwok, P.Y.L., Chan, K.H.S., 2006. Effects of two parasites, *Schistocephalus solidus* (Cestoda) and *Bunodera* spp. (Trematoda), on the escape fast-start performance of three-spined sticklebacks. *Journal of Fish Biology*, 69, 1345-1355.
- Blanchard, D., Bourget, E., 1999. Scales of coastal heterogeneity: influence on intertidal community structure. *Marine Ecology Progress Series*, 179, 163-173.
- Blaylock, R.B., Margolis, L., Holmes, J.C., 2003. The use of parasites in discriminating stocks of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) in the northeast Pacific. *Fishery Bulletin*, 101, 1-9.
- Bocher, P., Piersma, T., Dekinga, A., Kraan, C., Yates, M.G., Guyot, T., Folmer, E.O., Radenac, G., 2007. Site- and species-specific distribution patterns of molluscs at five intertidal soft-sediment areas in northwest Europe during a single winter. *Marine Biology*, 151, 577-594.
- Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 411-423.
- Boje, J., Riget, F., Koie, M., 1997. Helminth parasites as biological tags in population studies of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)), in the north-west Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, 54, 886-895.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 239-262.
- Bourke, P., Magnan, P., Rodriguez, M.A., 1997. Individual variations in habitat use and morphology in brook charr. *Journal of Fish Biology*, 51, 783-794.
- Bridle, A.R., Morrison, R.N., Nowak, B.F., 2006. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD). *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 346-364.
- Brown, J.A., 2006. Using the chemical composition of otoliths to evaluate the nursery role of estuaries for English sole *Pleuronectes vetulus* populations. *Marine Ecology Progress Series*, 306, 269-281.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575-583.
- Cabral, H.N., 2000. Distribution and abundance patterns of flatfishes in the Sado Estuary, Portugal. *Estuaries*, 23, 351-358.
- Cabral, H.N., Costa, M.J., 1999. Differential use of nursery areas within the Tagus estuary by sympatric soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environmental Biology of Fishes*, 56, 389-397.
- Champalbert, G., Koutsikopoulos, C., 1995. Behaviour, transport and recruitment of Bay of Biscay sole (*Solea solea*): laboratory and field studies. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75, 93-108.

- Champalbert, G., Macquart-Moulin, C., Patrìti, G., Chiki, D., 1991. Ontogenic variations in the phototaxis of larval and juvenile sole *Solea solea* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 149, 207-225.
- Champalbert, G., Marchand, J., 1994. Rheotaxis in larvae and juvenile sole (*Solea solea* L.): Influence of light conditions and sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 177, 235-249.
- Champalbert, G., Marchand, J., Le Campion, J., 1994. Rheotaxis in juvenile sole *Solea solea* (L.): influence of salinity and light conditions. *Netherlands Journal of Sea Research*, 32, 309-319.
- Coggan, R.A., Dando, P.R., 1988. Movements of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), in the Tamar estuary, south western England. *Journal of Fish Biology*, 33, 177-184.
- Coleman, F.C., Travis, J., 1998. Phenology of recruitment infection patterns of *Ascocotyle pachycyctis*, a digenean parasite in the sheephead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Environmental Biology of Fishes*, 51, 87-96.
- Collyer, M.L., Stockwell, C.A., 2004. Experimental evidence for costs of parasitism for a threatened species, White Sands pupfish (*Cyprinodon tularosa*). *Journal of Animal Ecology*, 73, 821-830.
- Combes, C. 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. Chicago University Press, Chicago.
- Costanza, R., Darge, R., Degroot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., Oneill, R., Paruelo, J. et al., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260.
- Coustau, C., Combes, C., Maillard, C., Renaud, F., Delay, B. 1990. *Proisorhynchus squamatus* (Trematoda) parasitosis in the *Mytilus edulis-Mytilus galloprovincialis* complex: specificity and host-parasite relationship. In Perkins, F. T. Cheng (Ed), Pathology in Marine Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 291-298.
- Coustau, C., Renaud, F., Delay, B., Robbins, I., Mathieu, M., 1991a. Mechanisms involved in parasitic castration: *in vitro* effects of the Trematode *Proisorhynchus sqamatus* on the gametogenesis and the nutrient storage metabolism of the marine bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Experimental Parasitology*, 73, 36-43.
- Coustau, C., Renaud, F., Maillard, C., Pasteur, N., Delay, B., 1991b. Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of *Mytilus edulis/galloprovincialis* complex. *Genetical Research*, 57, 207-212.
- Cribb, T.H. 2005. Digenea (endoparasitic flukes). In Rhode, K. (Ed), Marine Parasitology. CSIRO Publishing, Melbourne, pp.
- Cribb, T.H., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., 2001. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *International Journal for Parasitology*, 31, 997-1011.
- Dahlgren, C.P., Kellison, G.T., Adams, A.J., Gillanders, B.M., Kendall, M.S., Layman, C.A., Ley, J.A., Nagelkerken, I., Serafy, J.E., 2006. Marine nurseries and effective juvenile habitats: concepts and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 312, 291-295.
- Dalla Via, J., Van den Thillart, G., Cattani, O., Cortesi, P., 1998. Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 2108-2113.
- De Pontual, H., Lagardère, F., Troadec, H., Batel, A., Désaunay, Y., Koutsikopoulos, C., 2000. Otoliths imprinting of sole (*Solea solea*) from the Bay of Biscay: a tool to discriminate individuals from nursery origins? *Oceanologica Acta*, 23, 497-513.
- Deblock, S., 1978. Distribution géographique des cercaires parasites des Mollusques du genre *Hydrobia* Hartman des côtes de France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53, 577-593.

- Degré, D. 2006. Réseau trophique de l'anse de l'Aiguillon : Dynamique et structure spatiale de la macrofaune et des limicoles hivernants. PhD thesis, Université de La Rochelle,
- Dollfus, R., 1976. Enumération des Cestodes du plancton et des invertébrés marins. 9e contribution. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 51, 207-230.
- Dorel, D., Koutsikopoulos, C., Désaunay, Y., Marchand, J., 1991. Seasonal distribution of young sole (*Solea solea* (L.)) in the nursery ground of the Bay of Vilaine (Northern Bay of Biscay). *Netherlands Journal of Sea Research*, 27, 297-306.
- Douglas, R.H., Hawryshyn, C.W. 1990. Behavioural studies of fish vision: an analysis of visual capabilities. In Douglas, R.H. M.B.A. Djamgoz (Ed), *The visual system of fish*. Chapman and Hall, London, pp.
- Durieux, E.D.H., Bégout, M.-L., Sasal, P., 2007a. Spatial variability in digenean metacercariae infection of 0-group common sole, *Solea solea*, among different nurseries along the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75, 221-228.
- Durieux, E.D.H., Galois, R., Bégout, M.-L., Sasal, P., Lagardère, F., 2007b. Temporal changes in lipid condition and parasitic infection by digenean metacercariae of young-of-year common sole *Solea solea* (L.) in an Atlantic nursery ground (Bay of Biscay, France). *Journal of Sea Research*, 57, 162-170.
- Durieux, E.D.H., Marques, J.F., Sasal, P., Bégout, M., Cabral, H.N., 2007c. Comparison of *Solea solea* macroparasites between two nursery-continental shelf systems in the Bay of Biscay and the Portuguese coast. *Journal of Fish Biology*, 70, 1921-1930.
- El-Darsh, H.E.M., Whitfield, P.J., 1999a. Digenean metacercariae (*Timoniella* spp., *Labratrema minimus* and *Cryptocotyle concava*) from flounder, *Platichthys flesus*, in the tidal Thames. *Journal of Helminthology*, 73, 103-113.
- El-Darsh, H.E.M., Whitfield, P.J., 1999b. The parasite community infecting flounders, *Platichthys flesus*, in the tidal Thames. *Journal of Helminthology*, 73, 203-214.
- Ellis, T., Howell, B.R., Hayes, J., 1997. Morphological differences between wild and hatchery-reared turbot. *Journal of Fish Biology*, 50, 1124-1128.
- Ewart, K.V., Belanger, J.C., Williams, J., Karakach, T., Penny, S., Tsoi, S.C.M., Richards, R.C., Douglas, S.E., 2005. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology. *Developmental & Comparative Immunology*, 29, 333-347.
- Exadactylos, A., Geffen, A.J., Panagiotaki, P., Thorpe, J.P., 2003. Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data divergence in European stocks. *Marine Ecology Progress Series*, 246, 253-264.
- Faliex, E. 1991a. Les relations hôtes-parasites dans le modèle Téléostéens-métacercaires de *Labratrema minimus* (Trematoda, Bucephalidae). PhD thesis, Université de Perpignan, Perpignan
- Faliex, E., 1991b. Ultrastructural study of the host-parasite interface after infection of two species of teleosts by *Labratrema minimus* metacercariae (Trematoda, Bucephalidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 10, 93-101.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fraser, A., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, crustacean larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, 1868-1873.
- Fredensborg, B.L., Mouritsen, K., Poulin, R., 2006. Relating bird host distribution and spatial heterogeneity in trematode infections in an intertidal snail-from small to large scale. *Marine Biology*, 149, 275-283.

- Galois, R., Lagardère, F., Richard, P., 1990. Changes in biochemical composition and otolith microstructure of larval common soleas, *Solea solea* (L.) under experimental starvation. *La mer*, 28, 273-285.
- Gibson, R.N., 1994. Impact of habitat quality and quantity on the recruitment of juvenile flatfishes. *Netherlands Journal of Sea Research*, 32, 191-206.
- Gibson, R.N., 1997. Behaviour and the distribution of flatfishes. *Journal of Sea Research*, 37, 241-256.
- Gibson, R.N., Phil, L., Burrows, M.T., Modin, J., Wennhage, H., Nickell, L.A., 1998. Diel movements of juvenile plaice *Pleuronectes platessa* in relation to predators, competitors, food availability and abiotic factors on a microtidal nursery ground. *Marine Ecology Progress Series*, 165, 145-159.
- Gibson, R.N., Robb, L., 1992. The relationship between body size, sediment grain size and the burying ability of juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. 40, 771-778.
- Gillanders, B.M., Able, K.W., Brown, J.A., Eggleston, D.B., Sheridan, P.F., 2003. Evidence of connectivity between juvenile and adult habitats for mobile marine fauna: an important component of nurseries. *Marine Ecology Progress Series*, 247, 281-295.
- Gilliers, C., Amara, R., Bergeron, J.-P., Le Pape, O., 2004. Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds. *Environmental Biology of Fishes*, 71, 189-198.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Bergeron, J.-P., Schreiber, N., Guérault, D., Amara, R., 2006a. Growth and condition of juvenile sole (*Solea solea* L.) as indicators of habitat quality in coastal and estuarine nurseries in the Bay of Biscay. *Scientia Marina*, 70, 183-192.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Desaunay, Y., Morin, J., Guérault, D., Amara, R., 2006b. Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? An application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69, 96-106.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 503-512.
- Giulietti, A., Overbergh, I., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386-401.
- Gonzalez, S.F., Buchmann, K., Nielsen, M.E., 2007. Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31, 576-586.
- Gouletquer, P., Le Moine, O., 2002. Shellfish farming and coastal zone management (CZM) development in the Marennes-Oléron Bay and Charentais Sounds (Charente Maritime, France): a review of recent development. *Aquaculture International*, 10, 507-525.
- Häkanson, J., 1989. Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Marine Biology*, 102, 143-151.
- Han, E.-T., Han, K.-Y., Chai, J.-Y., 2003. Tegumental ultrastructure of the juvenile and adult *Himasthla alincia* (Digenea: Echinostomatidae). *The Korean Journal of Parasitology*, 41, 17-25.
- Harris, P.D., Soleng, A., Bakke, T.A., 1998. Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. *Parasitology*, 117, 137-143.
- Haubois, A.-G., Guarini, J.-M., Richard, P., Hemon, A., Arotcharen, E., Blanchard, G.F., 2004. Differences in spatial structures between juveniles and adults of the gastropod *Hydrobia ulvae* on an intertidal mudflat (Marennes-Oleron Bay, France) potentially affect estimates of local demographic processes. *Journal of Sea Research*, 51, 63-68.

- Hill, S., Burrows, M.T., Hughes, R.N., 2000. Increased turning per unit distance as an area-restricted search mechanism in a pause-travel predator, juvenile plaice, foraging for buried bivalves. *Journal of Fish Biology*, 56, 1497-1508.
- Hill, S., Burrows, M.T., Hughes, R.N., 2002. Adaptive search in juvenile plaice foraging for aggregated and dispersed prey. *Journal of Fish Biology*, 61, 1255-1267.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66, 411-453.
- Hjorleifsson, E., Pálsson, J., 2001. Settlement, growth and mortality of 0-group plaice (*Pleuronectes platessa*) in Icelandic waters. *Journal of Sea Research*, 45, 321-324.
- Holland, M.C.H., Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 399-420.
- Holt, R., Boulinier, T. 2005. Ecosystems and parasitism: the spatial dimension. In Thomas, F., F. Renaud J.-F. Guégan (Ed), Parasitism and ecosystems. Oxford University Press, New York, pp.
- Hossain, M.A.R., Tagawa, M., Masuda, R., Tanaka, M., 2003. Changes in growth performance and proximate composition in Japanese flounder during metamorphosis. *Journal of Fish Biology*, 63, 1283-1294.
- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture*, 155, 355-365.
- Howell, B.R., Canario, A.V.M., 1987. The influence of sand on the estimation of resting metabolic rate of juvenile sole, *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Biology*, 31, 277-280.
- Huizinga, H., Nadakavukaren, 1997. Cellular responses of goldfish, *Carassius auratus* (L.), to metacercariae of *Ribeiroia marini* (Faust & Hoffman, 1934). *Journal of Fish Diseases*, 20, 401-408.
- Huntingford, F.A., 1993. Can cost-benefit analysis explain fish distribution patterns? *Journal of Fish Biology*, 43, 289-308.
- Hurst, T.P., Abookire, A.A., 2006. Temporal and spatial variation in potential and realized growth rates of age-0 year northern rock sole. *Journal of Fish Biology*, 68, 905-919.
- Jager, Z., Kleef, H.L., Tydeman, P., 1993. The distribution of 0-group flatfish in relation to abiotic factors on the tidal flats in the brackish Dollard (Ems Estuary, Wadden Sea). *Journal of Fish Biology*, 43, 31-43.
- Johnson, M., Dick, T., 2001. Parasite effects on the survival, growth, and reproductive potential of yellow perch (*Perca flavescens* Mitchill) in canadian Shield lakes. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 1980-1992.
- Jones, D.O., 1943. The anatomy of three digenetic trematodes, *Skrjabiniella aculeatus* (Odhner), *Lecithochirium rufoviride* (Rud.) and *Sterrhus fusiformis* (Lühe) from Conger conger (Linn.). *Parasitology*, 35, 40-57.
- Jones, S.R.M., 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25, 841-852.
- Jousson, O., Bartoli, P., 2000. The life cycle of *Opecoeloides columbellae* (Pagenstecher, 1863) n. comb. (Digenea, Opecoelidae): Evidence from molecules and morphology. *International Journal for Parasitology*, 30, 747-760.
- Jousson, O., Bartoli, P., 2001. Molecules, morphology and morphometrics of *Cainocreadium labracis* and *Cainocreadium dentecis* n. sp. (Digenea: Opecoelidae) parasitic in marine fishes. *International Journal for Parasitology*, 31, 706-714.
- Jousson, O., Bartoli, P., Pawlowski, J., 1999. Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). *International Journal for Parasitology*, 29, 1853-1858.

- Kalbe, M., Kurtz, J., 2006. Local differences in immunocompetence reflect resistance of sticklebacks against the eye fluke *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasitology*, 132, 105-116.
- Koie, M., 1981. On the morphology and life-history of *Podocotyle reflexa* (Creplin, 1825) Odhner, 1905, and a comparison of its developmental stages with those of *P. atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905 (Trematoda, Opecoelidae). *Ophelia*, 20, 17-43.
- Koie, M., 2000. Life cycle of the flatfish nematode *Cucullanus heterochrous*. *Journal of Helminthology*, 74, 323-328.
- Koutsikopoulos, C., Dorel, D., Désaunay, Y., 1995. Movement of sole (*Solea solea*) in the Bay of Biscay: coastal environment and spawning migration. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75, 109-126.
- Koutsikopoulos, C., Fortier, L., Gagne, J.A., 1991. Cross-shelf dispersion of Dover sole (*Solea solea*) eggs and larvae in Bay of Biscay and recruitment to inshore nurseries. *Journal of Plankton Research*, 13, 923-945.
- Koutsikopoulos, C., Lacroix, N., 1992. Distribution and abundance of sole (*Solea solea* L.) eggs and larvae in Bay of Biscay between 1986 and 1989. *Netherlands Journal of Sea Research*, 29, 81-91.
- Kuipers, B.R., Maccurin, B., Miller, J.M., van der Veer, H.W., W, J.I.J., 1992. Small trawls in juvenile flatfish research: their development and efficiency. *Netherlands Journal of Sea Research*, 29, 109-117.
- Laffargue, P. 2004. Interactions entre comportement et variations de la croissance des juvéniles de la sole (*Solea solea*) dans les nourriceries des pertuis Charentaïsthesis, Université de La Rochelle,
- Laffargue, P., Baudoin, G., Sasal, P., Arnaud, C., Bégout Anras, M.-L., Lagardère, F., 2004. Parasitic infection of sole *Solea solea* by *Proserhynchus* spp. metacercariae (Digenea, Bucephalidae) in Atlantic nurseries under mussel cultivation influence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 179-184.
- Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Kuris, A., 2006. Parasites dominate food web links. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 103, 11211-11216.
- Lafferty, K.D., Morris, A.K., 1996. Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final hosts. *Ecology*, 77, 1390-1397.
- Lagardère, F., Amara, R., Joassard, L., 1999. Vertical distribution and feeding activity of metamorphosing sole, *Solea solea*, before immigration to the Bay of Vilaine nursery (northern Bay of Biscay, France). *Environmental Biology of Fishes*, 56, 213-228.
- Lagardère, J.-P., Bégout, M.-L., Lafaye, J.-Y., Villotte, J.-P., 1994. Influence of wind-produced noise on orientation in the sole (*Solea solea*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1258-1264.
- Lagardère, J.-P., Ducamp, J.-J., Frkha, L., Sperandio, M., 1988. Ultrasonic tracking of common sole juveniles (*Solea vulgaris* Quensel, 1806) in a saltmarsh: methods and fish response to some environmental factors. *Journal of Applied Ichthyology*, 4, 87-96.
- Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W., Magnadottir, B., 2003. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)--an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology*, In Press, Corrected Proof, 1-9.
- Latham, A., Poulin, R., 2003. Spatiotemporal heterogeneity in recruitment of larval parasites to shore crab intermediate hosts: the influence of shorebird definitive hosts. *Canadian Journal of Zoology*, 81, 1282-1291.
- Le Hir, P., Roberts, W., Cazaillet, O., Christie, M., Bassoullet, P., Bacher, C., 2000. Characterization of intertidal flat hydrodynamics. *Continental Shelf Research*, 20, 1433-1459.

- Le Pape, O. 2005. Les habitats halieutiques essentiels en milieu côtier, les identifier, comprendre leur fonctionnement et suivre leur qualité pour mieux gérer et pérenniser les ressources marines exploitées : L'exemple des nurseries de poissons plats. HDR thesis,
- Le Pape, O., Baulier, L., Cloarec, A., Martin, J., Le Loc'h, F., Desaunay, Y., 2007. Habitat suitability for juvenile common sole (*Solea solea*, L.) in the Bay of Biscay (France): A quantitative description using indicators based on epibenthic fauna. *Journal of Sea Research*, 57, 126-136.
- Le Pape, O., Chauvet, F., Desaunay, Y., Guérault, D., 2003a. Relationship between interannual variations of the river plume and the extent of nursery grounds for the common sole (*Solea solea*, L.) in Vilaine Bay. Effects on recruitment variability. *Journal of Sea Research*, 50, 177-185.
- Le Pape, O., Chauvet, F., Mahevas, S., Lazure, P., Guérault, D., Desaunay, Y., 2003b. Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea*, L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *Journal of Sea Research*, 50, 139-149.
- Le Pape, O., Guérault, D., Desaunay, Y., 2004. Effect of an invasive mollusc, American slipper limpet *Crepidula fornicata*, on habitat suitability for juvenile common sole *Solea solea* in the Bay of Biscay. *Marine Ecology Progress Series*, 277, 107-115.
- Le Pape, O., Holley, J., Guérault, D., Desaunay, Y., 2003c. Quality of coastal and estuarine essential fish habitats: estimations based on the size of juvenile common sole (*Solea solea* L.). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58, 793-803.
- Lefrançois, C., Claireaux, G., 2003. Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope for heart rate in the common sole *Solea solea*. *Marine Ecology Progress Series*, 259, 273-284.
- Leggett, W.C., DeBlois, E., 1994. Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stage? *Netherlands Journal of Sea Research*, 32, 119-134.
- Leguerrier, D., Niquil, N., Petiau, A., Bodoy, A., 2004. Modeling the impact of oyster culture on a mudflat food web in Marennes-Oléron Bay (France). *Marine Ecology Progress Series*, 273, 147-162.
- Lemly, A., Esch, G., 1984. Effects of the trematode *Uvulifer ambloplitis* on juvenile bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*: ecological implications. *Journal of Parasitology*, 70, 475-492.
- Lemly, A.D., 1997. Role of season in aquatic hazard assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 45, 89-98.
- Little, E.E. 2002. Behavioral measures of environmental stressors in fish. In Adams, S.M. (Ed), Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 431-472.
- Lochmann, S.E., Maillet, G.L., Frank, K.T., Taggart, C.T., 1995. Lipid class composition as a measure of nutritional condition in individual larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 1294-1306.
- MacKenzie, K., 2002. Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*, 124, 153-163.
- MacKenzie, K. 2005. Parasites as biological tags. In Rhode, K. (Ed), Marine parasitology. CABI Publishing, Oxon, pp. 351-355.
- MacKenzie, K., Abaunza, P., 1998. Parasites as biological tags for stock discrimination of marine fish: a guide to procedures and methods. *Fisheries Research*, 38, 45-56.
- Macquart-Moulin, C., Champalbert, G., Howell, B.R., Patrity, G., Ravaivoson, C., 1991. La relation alimentation-fixation benthique chez les jeunes soles *Solea solea* L.

- metamorphosées. Evidences expérimentales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 153, 195-205.
- Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 429-439.
- Maillard, C., 1973. Etude du cycle évolutif du Trématode *Acanthostomum imbutiforme* (Molin, 1859) Gohar, 1934, parasite of *Morone labrax* (Linne, 1758). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 48, 33-46.
- Maillard, C., 1974. Cycle évolutif de *Timoniella praeteritum* (Loss 1901) (Trematoda, Acanthostomidae) parasite de *Morone labrax* (teleostei, Serranidae). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 99, 245-257.
- Maillard, C. 1976. Distomatoses de poissons en milieu lagunaire. PhD thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France
- Maillard, C. 1986. Atlas hydrologique de l'Atlantique Nord-Est. IFREMER, Brest.
- Malek, M., 2001. Effects of the digenean parasites *Labratrema minimus* and *Cryptocotyle concavum* on the growth parameters of *Pomatoschistus microps* and *P. minutus* from Southwest Wales. *Parasitology Research*, 87, 349-355.
- Malloy, K.D., Yamashita, Y., Yamada, H., Targett, T.E., 1996. Spatial and temporal patterns of juvenile stone flounder *Kareius bicoloratus* growth rates during and after settlement. *Marine Ecology Progress Series*, 131, 49-59.
- Manderson, J.P., Pessutti, J., Hilbert, J.G., Juanes, F., 2004. Shallow water predation risk for a juvenile flatfish (winter flounder; *Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum) in a northwest Atlantic estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 304, 137-157.
- Marchand, J., 1991. The influence of environmental conditions on settlement, distribution and growth of 0-group sole (*Solea solea* (L.)) in a macrotidal estuary (Vilaine, France). *Netherlands Journal of Sea Research*, 27, 307-316.
- Marchand, J., Masson, G., 1989. Process of estuarine colonization by 0-group sole (*Solea solea*): hydrological conditions, behaviour, and feeding activity in the Vilaine Estuary. *Rapp. P.-v Réun. Cons. int. Explor. Mer*, 191, 287-295.
- Marcogliese, D.J., 2001. Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environments. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 1331-1352.
- Marcogliese, D.J., Compagna, S., Bergeron, E., McLaughlin, J.D., 2001. Population biology of eyeflukes in fish from a marge fluvial ecosystem: the importance of gulls and habitat characteristics. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 1102-1113.
- Marques, J.F., Cabral, H.N., Busi, M., D'Amelio, S., 2006a. Molecular identification of Anisakis species from Pleuronectiformes off Portuguese coast. *Journal of Helminthology*, 80, 47-51.
- Marques, J.F., Santos, M.J., Costa, J.L., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2005. Metazoan parasites as biological indicators of population structure of *Halobatrachus didactylus* on the Portuguese coast. *Journal of Applied Ichthyology*, 21, 220-224.
- Marques, J.F., Teixeira, C.M., Cabral, H.N., 2006b. Differentiation of economically important flatfish populations along the Portuguese coast: evidence from morphology and parasitology. *Fisheries Research*, 81, 293-305.
- Mathieson, A.C., Nienhuis, P.H. 1991. Intertidal and littoral ecosystems. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Matthews, R.A., 1973. The life-cycle of *Proisorhynchus crucibulum* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1905, and a comparison of its cercaria with that of *Proisorhynchus squamatus* Odhner, 1905. *Parasitology*, 66, 133-164.

- May, R.M., Anderson, R.M., 1978. Regulation and stability of host-parasite population interactions: II. Destabilizing processes. *Journal of Animal Ecology*, 47, 249-267.
- May, R.M., Anderson, R.M., 1979. Population biology of infection diseases: part II. *Nature*, 280, 455-461.
- McArthur, F., McGladdery, S., 2000. *Proisorhynchus squamatus* (Digenea: Platyhelminthes) infection of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Atlantic Canada. *Final report for DFO-Science and Technology Internship program 1997/98.*, 13.
- McClelland, G., Melendy, J., Osborne, J., Reid, D., Douglas, S., 2005. Use of parasite and genetic markers in delineating populations of winter flounder from the central and south-west Scotian Shelf and north-east Gulf of Maine. *Journal of Fish Biology*, 66, 1082-1100.
- McLusky, D.S., Elliot, M. 2004. The estuarine ecosystem: ecology, threats and management. Oxford University Press, Oxford.
- Mehner, T., 2006. Individual variability of diel migrations in European vendace (*Coregonus albula*) explored by stationary vertical hydroacoustics. *Ecology of Freshwater Fish*, 15, 146-153.
- Mendez, G., Wieser, W., 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes*, 36, 73-81.
- Meng, L., Gray, C., Taplin, B., Kupcha, E., 2000. Using winter flounder growth rates to assess habitat quality in Rhode Island's coastal lagoons. *Marine Ecology Progress Series*, 201, 287-299.
- Miyazaki, T., Masuda, R., Furuta, S., Tsukamoto, K., 2000. Feeding behaviour of hatchery-reared juveniles of the Japanese flounder following a period of starvation. *Aquaculture*, 190, 129-138.
- Moliner, A., Flos, R., 1991. Influence of sex and age on the feeding habits of the common sole *Solea solea*. *Marine Biology*, 111, 493-501.
- Moore, B.R., Buckworth, R.C., Moss, H., Lester, R.J.G., 2003. Stock discrimination and movements of narrow-barred Spanish mackerel across northern Australia as indicated by parasites. *Journal of Fish Biology*, 63, 765-779.
- Moore, J. 2002. Parasites and the behavior of animals. Oxford University Press, Inc., New York.
- Mouritsen, K.N., Poulin, R., 2002. Parasitism, climate oscillations and the structure of natural communities. *Oikos*, 97, 462-468.
- Munson, D.A., 1974. Parasites of the tide pool fish *Liparis atlanticus* (Osteichthyes: Liparidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 10, 256-262.
- Nakao, M., Mutsuro, J., Nakahara, M., Kato, Y., Yano, T., 2003. Expansion of genes encoding complement components in bony fish: biological implications of the complement diversity. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 749-762.
- Nash, R.D.M., Geffen, A.J., 2000. The influence of nursery ground processes in the determination of year-class strength in juvenile plaice *Pleuronectes platessa* L. in Port Erin Bay, Irish Sea. *Journal of Sea Research*, 44, 101-110.
- Necaise, A.M.D., Ross, S.W., Miller, J.M., 2005. Estuarine habitat evaluation measured by growth of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus* in a North Carolina estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 285, 157-168.
- Neumann, N.F., Galvez, F., 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances*, 20, 391-419.
- Nolan, M.J. 2005. Sanguinicolidae von Graff, 1907 (Platyhelminthes: Gigenea) of Indo-West Pacific fish, University of Queensland, St Lucia

- Norcross, B.L., Holladay, B.A., Müter, F.-J., 1999. Nursery area characteristics of pleuronectids in coastal Alaska, USA. *Netherlands Journal of Sea Research*, 34.
- Norton, E.C., MacFarlane, R.B., Mohr, M.S., 2001. Lipid class dynamics during development in early life stages of shortbelly rockfish and their application to condition assessment. *Journal of Fish Biology*, 58, 1010-1024.
- Oliva, M.E., 2001. Metazoan parasites of *Macruronus magellanicus* from southern Chile as biological tags. *Journal of Fish Biology*, 58, 1617-1622.
- Olson, R.E., Pratt, I., 1973. Parasites indicators of English sole (*Parophrys vetulus*) nursery grounds. . *Transactions of the American Fisheries Society*, 102, 405-411.
- Olsvik, P.A., Lie, K.K., Jordal, A.-E.O., Nilsen, T.O., Hordvik, I., 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6, 21.
- Ondrackova, M., Dávidov, M., Gelnar, M., Jurajda, P., 2006. Susceptibility of Prussian carp infected by metacercariae of *Posthodiplostomum cuticola* (v. Nordmann, 1832) to fish predation. *Ecological Research*, V21, 526-529.
- Ondrackova, M., Reichard, M., Jurajda, P., Gelnar, M., 2004. Seasonal dynamics of *Posthodiplostomum cuticola* (Digenea, Diplostomatidae) metacercariae and parasite-enhanced growth of juvenile host fish. *Parasitology Research*, 93, 131-136.
- Osset, E.A., Fernandez, M., Raga, J.A., Kostadinova, A., 2005. Mediterranean *Diplodus annularis* (Teleostei: Sparidae) and its brain parasite: Unforeseen outcome. *Parasitology International*, 54, 201-206.
- Outreman, Y., Bollache, L., Plaistow, S., Cézilly, F., 2002. Patterns of intermediate host use and levels of association between two conflicting manipulative parasites. *International Journal for Parasitology*, 32, 15-20.
- Paffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.
- Pangle, K.L., Sutton, T.M., 2005. Temporal changes in the relationship between condition indices and proximate composition of juvenile *Coregonus artedii*. *Journal of Fish Biology*, 66, 1060-1072.
- Papoutsoglou, S.E., Papaparaskeva-Papoutsoglou, E.G., 1977. Metazoan parasites of *Solea solea* (L.) from Porto-Lago, North Aegean sea, Greece. *Memorie di Biologia Marina e di Oceanografia*, 7, 21-33.
- Parrish, C.C., Ackman, R.G., 1985. Calibration of Iatroscan chromarod system for marine lipid classes. *Lipids*, 20, 521-530.
- Phelan, B.A., Goldberg, R., Bejda, A.J., Pereira, J., Hagan, S., Clark, P., Studholme, A.L., Calabrese, A., Able, K.W., 2000. Estuarine and habitat-related differences in growth rates of young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and tautog (*Tautoga onitis*) in three northeastern US estuaries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247, 1-28.
- Pietroock, M., Marcogliese, D.J., 2003. Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. *Trends in Parasitology*, 19, 293-299.
- Pihl, L., Modin, J., Wennhage, H., 2000. Spatial distribution patterns of newly settled plaice (*Pleuronectes platessa* L.) along the Swedish Skagerrak archipelago. *Journal of Sea Research*, 44, 65-80.
- Poulin, R., 1993. Age-dependent effects of parasites on anti-predator responses in two New Zealand freshwater fish. *Oecologia*, 96, 431-438.
- Poulin, R., 2000. Variation in the intraspecific relationship between fish length and intensity of parasitic infection: biological and statistical causes. *Journal of Fish Biology*, 56, 123-137.

- Poulin, R., 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132, 143-151.
- Poulin, R., Mouritsen, K., 2006. Climate change, parasitism and the structure of intertidal ecosystems. *Journal of Helminthology*, 80, 183-191.
- Poulin, R., Mouritsen, K.N., 2003. Large-scale determinants of trematode infections in intertidal gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 187-198.
- Poulin, R., Rate, S.R., 2001. Small-scale spatial heterogeneity in infection levels by symbionts of the amphipod *Talorchestia quoyana* (Talitridae). *Marine Ecology Progress Series*, 211-216.
- Rauch, G., Kalbe, M., Reusch, T.B.H., 2006. Relative importance of MHC and genetic background for parasite load in a field experiment. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 373-386.
- Rebecq, J., Leray, C., 1961. Métacercaires de *Prosorhynchus cf crucibulum* (Rudolphi 1819) (Trematoda, Bucephalidae) chez deux Gobiesocidae (Téléostéens). *Vie et Milieu*, 12, 378-380.
- Rice, J.C., 2005. Understanding fish habitat ecology to achieve conservation. *Journal of Fish Biology*, 67, 1-22.
- Rijnsdorp, A.D., Van Beek, F.A., Flatman, S., Millner, R.M., Riley, J.D., Giret, M., de Clerck, R., 1992. Recruitment of sole stocks, *Solea solea* (L.), in the Northeast Atlantic. *Netherlands Journal of Sea Research*, 29, 173-192.
- Rogers, S., 1994. Population density and growth of juvenile sole *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research*, 32, 353-360.
- Rogers, S.I., 1989. The ecology of juvenile dover sole *Solea solea* L.: a review of literature. *Progress in Underwater Science*, 14, 53-66.
- Rogers, S.I., 1992. Environmental factors affecting the distribution of sole (*Solea solea* (L.)) within a nursery area. *Netherlands Journal of Sea Research*, 29, 153-161.
- Rogers, S.I., 1993. The dispersion of sole, *Solea solea* and plaice, *Pleuronectes platessa* within and away from a nursery ground in the Irish Sea. *Journal of Fish Biology*, 43, 275-288.
- Rohde, K. 2005. Zoogeography. In Rohde, K. (Ed), Marine parasitology. CSIRO Publishing, Melbourne, pp. 592.
- Rolland, J.L., Bonhomme, F., Lagardère, F., Hassan, M., Guinand, B., 2007. Population structure of the common sole (*Solea solea*) in the Northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea: revisiting the divide with EPIC markers. *Marine Biology*, 151, 327-341.
- Saeij, J.P.J., De Vries, B.J., Wiegertjes, G.F., 2003. The immune response of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 859-874.
- Salvanes, A.G.V., Hart, P.J.B., 1998. Individual variability in state-dependent feeding behaviour in three-spined sticklebacks. *Animal Behaviour*, 55, 1349-1359.
- Santos, A.M.T.d., Coimbra, J., 1995. Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. *Aquaculture*, 132, 195-211.
- Santos, M.J., Gibson, D.I., 2002. Morphological features of *Prosorhynchus crucibulum* and *P. aculeatus* (Digenea: Bucephalidea), intestinal parasites of *Conger conger* (Pisces: Congridae), elucidated by scanning electron microscopy. *Folia Parasitologica*, 49, 96-102.
- Sasal, P., Thomas, F. 2005. Parasite induced changes in host behaviour and morphology. In Rhode, K. (Ed), Marine parasitology. CABI Publishing, Oxon, pp. 259-263.

- Sauriau, P.G., Mouret, V., Rincé, J.-P., 1989. Organisation trophique de la malacofaune benthique non cultivée du bassin ostréicole de Marennes-Oléron. *Oceanologica Acta*, 12, 193-204.
- Schram, E., Van der Heul, J.W., Kamstra, A., Verdegem, M.C.J., 2005. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture*, In Press, Corrected Proof.
- Seppala, O., Karvonen, A., Valtonen, E.T., 2004. Parasite-induced change in host behaviour and susceptibility to predation in an eye fluke-fish interaction. *Animal Behaviour*, 68, 257-263.
- Seppala, O., Karvonen, A., Valtonen, E.T., 2005a. Impaired crypsis of fish infected with a trophically transmitted parasite. *Animal Behaviour*, 70, 895-900.
- Seppala, O., Karvonen, A., Valtonen, E.T., 2005b. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Animal Behaviour*, 70, 889-894.
- Shirakashi, S., Goater, C., 2002. Intensity-dependent alteration of minnow (*Pimephales promelas*) behavior by a brain-encysting trematode. *Journal of Parasitology*, 88, 1071-1074.
- Shirakashi, S., Goater, C., 2005. Chronology of parasite-induced alteration of fish behaviour: effects of parasite maturation and host experience. *Parasitology*, 130, 177-183.
- Sigh, J., Lindenstrom, T., Buchmann, K., 2004. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17, 75-86.
- Skouras, A., Lang, T., Vobach, M., Danischewski, D., Wosniok, W., Scharsack, J.r., Steinhagen, D., 2003a. Assessment of some innate immune responses in dab (*Limanda limanda* L.) from the North Sea as part of an integrated biological effects monitoring. *Helgoland Marine Research*, 57, 181-189.
- Skouras, A., Schmidt, V., Körting, W., Steinhagen, D., 2003b. Note: the effect of parasite infection on the innate immune response of European flounder (*Platichthys flesus* L.) in the southern North Sea. *Helgoland Marine Research*, 57, 176-180.
- Smith, N.F., 2001. Spatial heterogeneity in recruitment of larval trematodes to snail intermediate hosts. *Oecologia*, 127, 115-122.
- Sogard, S., 1992. Variability in growth rates of juvenile fishes in different estuarine habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 85, 35-53.
- Sohn, W.-M., Seo, M., Chai, J.-Y., 2003. Surface ultrastructure of the adult stage of *Acanthotrema felis* (Trematoda: Heterophyidae). *The Korean Journal of Parasitology*, 41, 107-111.
- Sola, J.C., 1996. Population dynamics, reproduction, growth, and secondary production of the mud-snails *Hydrobia ulvae* (Pennant). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 205, 49-62.
- Sommerville, C., 1981. A comparative study of the tissue response to invasion and encystment by *Stephanochasmus baccatus* (Nicoll, 1907) (Digenea: Acanthocolphidae) in four species of flatfish. *Journal of Fish Diseases*, 4, 53-68.
- Stoner, A.W., 2003. What constitutes essential nursery habitat for a marine species? a case study of habitat form and function for queen conch. *Marine Ecology Progress Series*, 257, 275-289.
- Stunz, G.W., Minello, T.J., Levin, P.S., 2002. Growth of newly settled red drum *Sciaenops ocellatus* in different estuarine habitat types. *Marine Ecology Progress Series*, 238, 227-236.
- Sujatha, K., Madhavi, R., 1990. Comparison of digenean faunas of sillaginid fishes from inshore and offshore waters of Visakhapatnam Coast, Bay of Bengal. *Journal of Fish Biology*, 36, 693-699.

- Tanaka, M., Kawai, S., Seikai, T., Burke, J.S., 1996. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 28, 19-31.
- Thieltges, D.W., Karsten, R., 2007. Spatial heterogeneity in parasite infections at different spatial scales in an intertidal bivalve. *Oecologia*, 150, 569-581.
- Thomas, F., Adamo, S., Moore, J., 2005a. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural processes*, 68, 185-199.
- Thomas, F., Cezilly, F., de Meeus, T., Crivelli, A.J., Renaud, F., 1997. Parasitism and ecology of wetlands: a review. *Estuaries*, 20, 646-654.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Timi, J.T., 2003. Parasites of Argentine anchovy in the south-west Atlantic: latitudinal patterns and their use for discrimination of hosts populations. *Journal of Fish Biology*, 63, 90-107.
- Tolonen, A., Karlsbakk, E., 2003. The parasite fauna of the Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 60, 77-84.
- van der Veer, H.W., Berghahn, R., Miller, J.M., Rijnsdorp, A.D., 2000. Recruitment in flatfish, with special emphasis on North Atlantic species: Progress made by the Flatfish Symposia. *ICES Journal of Marine Science*, 57, 202-215.
- van der Veer, H.W., Dapper, R., Witte, J.I.J., 2001. The nursery function of the intertidal areas in the western Wadden Sea for 0-group sole *Solea solea* (L.). *Journal of Sea Research*, 45, 271-279.
- van der Veer, H.W., R, B., Rijnsdorp, A.D., 1994. Impact of juvenile growth on recruitment in flatfish. *Netherlands Journal of Sea Research*, 32, 153-173.
- Verneau, O., Renaud, F., Catzeflis, F., 1997. Evolutionary Relationships of Sibling Tapeworm Species (Cestoda) Parasitizing Teleost Fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 630-636.
- Watts, M., Munday, B., Burke, C., 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinarian Journal*, 79, 570-574.
- Weber, L.P., Higgins, P.S., Carlson, R.I., Janz, D.M., 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. *Journal of Fish Biology*, 63, 637-658.
- Wennhage, H., 2002. Vulnerability of newly settled plaice (*Pleuronectes platessa* L.) to predation: effects of habitat structure and predator functional response. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269, 129-145.
- Wennhage, H., Pihl, L., Stal, J., 2007. Distribution and quality of plaice (*Pleuronectes platessa*) nursery grounds on the Swedish west coast. *Journal of Sea Research*, 57, 218-229.
- Williams, H., MacKenzie, K., McCarthy, A., 1992. Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet and phylogenetics of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2, 144-176.
- Williams, T.D., Gensberg, K., Minchin, S.D., Chipman, J.K., 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichys flesus*). *Aquatic Toxicology*, 65, 141-157.
- Woo, P.T.K., 1992. Immunological responses of fish to parasitic organisms. *Annual review of Fish Diseases*, 2, 339-366.

- Wood, B.P., Matthews, R.A., 1987. The immune response of thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus* (Risso, 1826), to metacercarial infections of *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825). *Journal of Fish Biology*, 31 (Supplement A), 175-183.
- Yamashita, Y., Tanaka, M., Miller, J.M., 2001. Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds. *Journal of Sea Research*, 45, 205-218.
- Yamashita, Y., Tominaga, O., Takami, H., Yamada, H., 2003. Comparison of growth, feeding and cortisol level in *Platichthys bicoloratus* juveniles between estuarine and nearshore nursery grounds. *Journal of Fish Biology*, 63, 617-630.
- Zander, C.D., Koçoglu, Ö., M, S., U, S., 2002. Parasite populations and communities from the shallow littoral of the Orther Bight (Fehmarn, SW Baltic Sea). *Parasitology Research*, 88, 734-744.
- Zander, C.D., Reimer, L.W., Barz, K., 1999. Parasite communities of the Salzhaff (Northwest Mecklenburg, Baltic Sea) I. Structure and dynamics of communities of littoral fish, especially small-sized fish. *Parasitology Research*, 85, 356-372.
- Zander, C.D., Reimer, L.W., Barz, K., Dietel, G., Strhbach, U., 2000. Parasite communities of the Salzhaff (Northwest Mecklenburg, Baltic Sea) II. Guild communities, with special regard to snails, benthic crustaceans, and small-sized fish. *Parasitology Research*, 86, 359-372.

Abstract

Coastal areas, such as shallow water bays and estuaries, serve as nurseries for juveniles of many marine fishes and especially flatfishes. Parasites play an important role in these marine ecosystems, but it remains poorly studied. Little attention has been paid to parasitism as a potential factor of variation in flatfish juveniles biological performances in these habitats. Sole juveniles, *Solea solea* (Pleuronectiformes, Soleidae), that is a species of primary importance for fisheries, are infected by digenean metacercariae. Thus, the aims of this PhD thesis were: i) to determine the spatio-temporal dynamics of the digenean metacercariae infection of 0-group sole juveniles at different scales; ii) to estimate the effects of this infection at different biological integrative levels (molecular immunity, condition, growth, behaviour). Both descriptive and experimental approaches were used.

In coastal nursery grounds, 0-group sole locally accumulate different taxa of digenean metacercariae: *Proisorhynchus* spp. (Bucephalidae), *Timoniella* spp. (Acanthostomidae) and *Podocotyle* sp. (Opécoelidae). Spatial dynamics of the infection was studied through field sampling at meso-scale between nurseries (several tens of km) and at small scale (few km) in the Pertuis Charentais area; an *in situ* caging experiment allowed to analyse the dynamics at fine scale (hundreds of m). These studies showed that digenean metacercariae load in 0-group sole is controlled by the major local factors, *i.e.* proximity (probably also abundance) of the first intermediate hosts and cercariae dispersal capacities. Higher infection levels in bays (compared to large estuaries) highlight the success of the parasites life cycles in this habitats. Infection is characterized by a high heterogeneity at small spatial scale. Thus, digenean metacercariae have been used as biological tags of habitat use by 0-group sole juveniles in the Pertuis Charentais. 0-group sole juveniles show a high residency and a high variability of their growth performances at small spatial scale. The quality of the habitat is highest for 0-group sole in the Aiguillon Bay (compared to other part of the Pertuis Charentais): it is a typical nursery.

Species of the genus *Proisorhynchus* (that infest 0-group sole), namely *P. crucibulum* and *Proisorhynchus* sp. A (similar to *P. aculeatus*) were distinguished combining morpho-anatomical and molecular analysis (ITS 1 sequencing). Life cycle of *P. crucibulum* was confirmed and the impact of mussel farming (mussel = first intermediate host) in the transmission of this parasite was highlighted. At around 1 month post-infection (when metacercariae lie free in host tissues), a positive relationship between the abundance of *P. crucibulum* and the expression of C3 gene (measured by RT-real time qPCR) of 0-group sole was shown. This might indicate a generalized immune response where the complement system is involved. A 3 months growth experiment was realized in semi-natural conditions on experimentally *in situ* infected individuals (with a control group). The growth and condition of 0-group sole are not affected which show the compensation capacities of sole for the cost of parasitism in non-restricted trophic and thermal conditions. A positive relationship between the abundance of *P. crucibulum* and the swimming activity (quantified by video-tracking) was detected. This result might indicate a behavioural strategy of energetic compensation of the host for the cost of parasitism, leading also to a potentially higher exposure of highly infected individuals to predators. In the field, only a negative correlation between the abundance of *P. crucibulum* metacercariae and the Fulton's condition index (K) of 0-group sole was detected at the onset of winter. The strong water temperature decrease during this time and the very low nutritional status (lipid index TAG / ST) of the individuals in this part of the habitat, likely conduct to diminish their compensation capacities against high *P. crucibulum* infection levels, which might lower their first winter survival.

Parasitism (*i.e.* digenean metacercariae) is a factor that has effects on immunity, condition and behaviour of 0-group sole juveniles. These impacts are modulated by the development of the parasite, the physiological status of the host and the environmental factors. Furthermore, these parasites are particularly efficient biological indicators to study habitat use of their host. From now, parasitism appears essential in the study of the functioning of flatfish coastal nurseries.

Key words : nurseries – flatfish – parasitism – immunity – growth – condition indices – behaviour – biological tags – mussel farming – North-East Atlantic

Résumé

Les zones côtières, que sont les baies peu profondes et les estuaires, servent de nourriceries pour les juvéniles de nombreuses espèces de Téléostéens marins et notamment pour les Pleuronectiformes. Dans ces écosystèmes marins, le parasitisme joue un rôle particulièrement important, mais reste encore souvent trop peu étudié. Peu d'attention a ainsi été portée sur le parasitisme en tant que facteur pouvant potentiellement affecter les performances biologiques des juvéniles de Pleuronectiformes dans ces habitats. Les juvéniles de sole, *Solea solea* (Pleuronectiformes, Soleidés), espèce d'intérêt halieutique majeur, sont infestés par des métacercaires de Digènes. Ainsi, les objectifs de cette thèse étaient : i) déterminer la dynamique spatio-temporelle de l'infestation des juvéniles du groupe 0 (G0) de sole par des métacercaires de Digènes à différentes échelles ; ii) évaluer les effets de cette infestation au niveau individuel à différents niveaux d'intégration biologique (immunité moléculaire, condition, croissance, comportement). Afin de répondre à ces objectifs, des approches descriptives et expérimentales ont été utilisées.

Les G0 de sole, en tant que deuxième hôte intermédiaire accumulent, localement dans les nourriceries côtières, différents taxons de métacercaires de Digènes : *Proisorhynchus* spp. (Bucéphalidés), *Timoniella* spp. (Acanthostomidés) et *Podocotyle* sp. (Opécoelidés). La dynamique spatiale de l'infestation a été étudiée grâce à un échantillonnage de terrain à méso-échelle (plusieurs dizaines de km) entre différentes nourriceries de la côte ouest française et à petite échelle (quelques km) dans les pertuis Charentais ; une expérience d'infestation *in situ* en cages a permis d'analyser la dynamique à très petite échelle (quelques centaines de m). L'ensemble de ces travaux montrent que l'infestation des G0 de sole est essentiellement contrôlée par les facteurs locaux que sont la présence (probablement aussi l'abondance) des premiers hôtes intermédiaires et la capacité de dispersion des cercaires. Les niveaux d'infestation, sont particulièrement élevés dans les baies (par rapport aux grands estuaires), ce qui montre le succès des cycles de vie de ces parasites dans ce type d'habitat. Par ailleurs, l'infestation est caractérisée par une très forte hétérogénéité spatiale à petite échelle. Les métacercaires de Digènes ont ainsi pu être utilisées comme marqueurs biologiques de l'utilisation de l'habitat par les juvéniles G0 de sole dans les pertuis Charentais. Les G0 de sole présentent une forte sédentarité ainsi qu'une forte variabilité de leur densité et de leur croissance à petite échelle spatiale. La baie de l'Aiguillon apparaît ainsi comme une zone où la qualité de l'habitat est nettement supérieure pour les G0 de sole par rapport au reste des pertuis Charentais : c'est une nourricerie *stricto sensu*.

Grâce au couplage de l'analyse morpho-anatomique et de l'analyse moléculaire (séquençage de l'ITS 1), les espèces de métacercaires du genre *Proisorhynchus* infestant les G0 de sole, à savoir *P. crucibulum* et *Proisorhynchus* sp. A (proche de *P. aculeatus*) ont été distinguées. Le cycle de *P. crucibulum* dans les pertuis Charentais a été confirmé et l'implication de la mytiliculture sur bouchots (moule = premier hôte intermédiaire) dans la transmission de ce parasite mise en évidence. A environ 1 mois post-infestation (période où les métacercaires sont libres dans l'hôte), une relation positive entre *P. crucibulum* et l'expression du gène C3 (mesuré en RT-PCR quantitative en temps réel) des G0 de sole a été montrée. Cela pourrait être le signe d'une réponse immunitaire généralisée faisant intervenir le système du complément. Une expérience de croissance de 3 mois a été réalisée en conditions semi-naturelles sur des individus infestés expérimentalement *in situ* (avec un lot témoin). La croissance et la condition des G0 ne sont pas affectées, ce qui met en évidence la capacité de compensation de la sole face au coût du parasitisme en condition trophique et thermique non-limitante. Une relation positive entre l'abondance des métacercaires de *P. crucibulum* et les niveaux d'activité natatoire (quantifié par vidéo-analyse) a été détectée. Ce résultat pourrait ainsi constituer une stratégie comportementale de compensation énergétique, ce qui mènerait aussi potentiellement à une exposition plus importante des individus fortement infestés à la prédation. En milieu naturel, seule une relation négative entre l'abondance des métacercaires de *P. crucibulum* et l'indice de condition morphométrique K des G0 a été détectée en Novembre. La forte diminution de température à cette période ajoutée au très faible statut nutritionnel (indice lipidique TAG / ST) des individus de cette partie de l'habitat, conduit à diminuer leurs capacités de compensation face à des taux d'infestation élevés de *P. crucibulum*, ce qui pourrait limiter leur capacité de survie au premier hiver.

Les résultats montrent donc que le parasitisme (i.e. métacercaires de Digènes) est un facteur qui est susceptible d'affecter l'immunité, la condition et le comportement des juvéniles G0 de sole. Ces impacts peuvent être modulés par le développement du parasite, le statut physiologique de l'hôte et les facteurs environnementaux. Par ailleurs, ces parasites se révèlent des marqueurs biologiques particulièrement puissants dans l'étude de l'utilisation de l'habitat par son hôte. La prise en compte des parasites semble donc être incontournable dans l'étude du fonctionnement des nourriceries côtières pour les juvéniles de Pleuronectiformes.

Mots clés : nourriceries – Pleuronectiformes – parasitisme – immunité – croissance – indices de condition – comportement – marqueurs biologiques – mytiliculture – Atlantique Nord-Est