

THÈSE
Présentée devant
L'Université des Antilles et de la Guyane

Pour l'obtention du
Diplôme de DOCTORAT

Par
Jean-Marie VOLLAND

**INTERACTION DURABLE STROMBIDAE – SPOROZOAIRES ET
FONCTIONNEMENT DE L'ORGANE HÔTE DE LA RELATION : LA
GLANDE DIGESTIVE**

Soutenue le 12 novembre 2010



Composition du jury :

Mme ALDANA ARANDA Dalila, Docteur, H.D.R. - CINVESTAV Mérida
M BUSTAMANTE Paco, Professeur - Université de La Rochelle
M GROS Olivier, Professeur - Université des Antilles et de la Guyane
M MANSOT Jean-Louis, Professeur - Université des Antilles et de la Guyane
M MATHIEU Michel, Professeur - Université de Caen Basse-Normandie

Co-directrice
Rapporteur
Directeur
Examineur
Rapporteur

TEXTE

THÈSE
Présentée devant
L'Université des Antilles et de la Guyane

Pour l'obtention du
Diplôme de DOCTORAT
(Spécialité Biologie des Organismes)

Par
Jean-Marie VOLLAND

**INTERACTION DURABLE STROMBIDAE – SPOROZOAIRES ET
FONCTIONNEMENT DE L'ORGANE HÔTE DE LA RELATION : LA
GLANDE DIGESTIVE**

Soutenue le 12 novembre 2010

Composition du jury :

Mme ALDANA ARANDA Dalila, Docteur, H.D.R. - CINVESTAV Mérida	Co-directrice
M BUSTAMANTE Paco, Professeur – Université de La Rochelle	Rapporteur
M GROS Olivier, Professeur - Université des Antilles et de la Guyane	Directeur
M MANSOT Jean-Louis, Professeur - Université des Antilles et de la Guyane	Examineur
M MATHIEU Michel, Professeur – Université de Caen Basse-Normandie	Rapporteur

TEXTE

Résumé :

Le lambi *Strombus gigas* (Strombidae) est une espèce de Mollusque Gastéropode particulièrement importante dans toute la région Caraïbe. En 2007, il a été rapporté la présence de structures étrangères en grand nombre dans les cellules de la glande digestive des animaux analysés. Ces structures, apparemment des protistes, sont alors décrites comme des parasites appartenant au groupe des Apicomplexa (Sporozoaires). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous proposons de poser les bases de l'étude d'une thématique nouvelle : l'association Strombidae-Sporozoaires.

Dans un premier temps, une analyse structurale et ultrastructurale de la glande digestive et de ses micro-organismes associés a été réalisée sur neuf espèces de Gastéropodes. Il ressort de ces analyses que les Sporozoaires sont des endosymbiotes intracellulaires présentant une prévalence de 100 % dans toutes les espèces analysées. Ils sont très largement répartis et la transmission se fait verticalement. Rien ne semble indiquer qu'ils soient virulents. Nous souhaitons donc proposer qu'ils entretiennent, avec leurs hôtes, une relation peu, voire pas virulente de type commensalisme ou mutualisme.

Dans un deuxième temps, la glande digestive a été étudiée d'un point vue structural et fonctionnel. Nous nous sommes intéressés aux fonctions associées aux trois types cellulaires rencontrés dans les tubules digestifs de la glande : les cellules digestives, les cellules vacuolaires et les cellules cryptiques. La digestion intracellulaire a été mise en évidence par une analyse cytochimique dans les cellules digestives. Les cellules vacuolaires, qui hébergent les symbiotes, sont dédiées au stockage de lipides. Enfin, l'osmorégulation de certains minéraux, ainsi que la détoxification de certains métaux essentiels sont des fonctions attribuées aux sphérocristaux rencontrés dans les cellules cryptiques.

Mots clés : Ampullariidae, Apicomplexa, détoxification, histologie, physiologie, sphérocrystal structure, symbiose.

Abstract :

The Queen Conch, *Strombus gigas* (Strombidae) is a Gastropod Mollusc particularly important in the Caribbean. In 2007, a huge number of foreigner structures have been detected in the digestive gland cells. These structures have been defined as parasites belonging to the Apicomplexa (Sporozoa) group. Thus, this thesis proposes a new research topic: the Strombidae-Sporozoa relationship.

First, a structural and ultrastructural analysis of the digestive gland and its symbionts was performed on nine Gastropods species. These analyses revealed that Sporozoa are intracellular endosymbionts with a 100 % prevalence in every species analyzed. Symbionts are widely distributed and vertically transmitted. No evidences have been found suggesting that they are virulent. Accordingly, we propose that they are involved in a weakly, or not, virulent relationship such as commensalism or mutualism.

Secondly, functional and structural studies of the digestive gland have been done. We have focused on functions associated to the three cell types which compose the digestive tubules of the gland: the digestive cells, the vacuolated cells and the cryptic cells. Intracellular digestion has been highlighted by cytochemistry in digestive cells. Vacuolated cells harbor symbionts and store lipid reserves. Mineral osmoregulation and detoxification of trace elements seems to be mostly attributed to spherocrystals in crypt cells.

Key words: Ampullariidae, Apicomplexa, detoxification, histology, physiology, spherocrystal, structure, symbiosis.

**Cette thèse à été préparée au sein de l'équipe
"Biologie de la Mangrove" de l'U.M.R. 7138
Systématique Adaptation et Évolution.**

Université des Antilles et de la Guyane
U.F.R. des Science Exactes et Naturelles
Département de Biologie
B.P. 592
97159 Pointe-à-Pitre cedex
Guadeloupe
France

REMERCIEMENTS

Il y a quatre ans, alors que je revenais en Guadeloupe pour mon Master 2, j'allais dans un magasin à Pointe-à-Pitre et rencontrais par hasard Olivier Gros que j'avais eu comme enseignant en DEUG, quatre ans plus tôt. Olivier se souvient de moi comme ancien étudiant, on discute, et il me dit de passer le voir pour parler d'un éventuel sujet de stage de Master 2 qu'il pense proposer sur le lambi... Je suis effectivement passé le voir et le stage en question a débouché sur la thèse que je termine aujourd'hui. J'ai complètement oublié les raisons qui m'ont poussé à aller dans ce magasin, dans lequel je n'ai d'ailleurs rien acheté, mais je voudrais commencer par remercier l'improbable concordance d'événements qui m'a amené là où je suis.

Ce manuscrit est le fruit de trois années de recherche qui se sont déroulées dans des conditions extrêmement favorables. Je me dois donc de remercier un certain nombre de personnes avec qui je tiens à partager le mérite de ce travail.

Évidemment, en tout premier lieu, je souhaite remercier Olivier Gros de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir formé au travail de chercheur. Malgré mes débuts laborieux pour ce qui est du respect des horaires (matinaux essentiellement), je ne peux que reconnaître ses grandes qualités pédagogiques d'encadrant et son entière disponibilité.

Un grand merci également à ma co-directrice Dalila Aldana Aranda pour m'avoir suivi de loin (3000 Km), et surtout pour m'avoir si bien accueilli dans son laboratoire à Mérida où j'ai rencontré des gens formidables (Merci Franko, Martha, Lalu, Joséfina et les autres d'avoir été aussi patients et accueillants).

Je réserve une partie de ma gratitude à Liliane Frenkiel qui est à l'origine de la thématique Strombidae-Sporozoaires en Guadeloupe et sans qui ce sujet de thèse n'aurait pas vu le jour. Merci Liliane pour ton soutien et tes conseils.

Je remercie les rapporteurs, M. Michel Mathieu et M. Paco Bustamante qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. Merci également à Jean-Louis Mansot qui a accepté d'être examinateur.

Merci à Jean-Pierre Lechaire et Ghislaine Frébourg du service de Microscopie Électronique de l'IFR 83 à Paris VI.

Merci à Félix Muller pour s'être « cassé les dents » avec moi sur les extractions et les PCR. Merci aussi à Gaëlle pour sa patience lors des « dimanches catalase ».

Parmi le personnel de l'Université, je tiens à remercier Mme Geoffroy et Chantal que je connais depuis le tout début de mon cursus.

Du coté de la famille et des amis maintenant :

Merci à Nico, Fabian, Benoit, Lory, Doumia, Ornella, Noémie, Mélissa, Pauline, Céline et les autres. Bien qu'exilés dans des terres lointaines où il fait froid l'hiver, vous êtes tous pour un peu dans mon équilibre vital ! Je regrette juste de n'avoir pas eu plus de temps à vous consacrer durant ces années.

Merci aux amis de la fac déjà partis ou encore là, qui ont participé à la bonne ambiance : Yann, Ney, Mélina, Boris, Malik, Maiténa, Gaëlle, Charlotte, Léa, Jean-Loup, Audrey, Nadège, Sébastien, Sylvina, Loïc, Amandine, Basile, Terry, les moniteurs, et bien sûr la joyeuse coloc des amis gais : Félix, Sandrine, Pédro et Luna !

Merci aux techniciens Robert Hamparian et Sébastien Cordonnier (« t'as vu t'es dans le paragraphe d'avant aussi »). Merci aussi à Julien Chalifour pour le bon tuyau de l'Anse Champagne.

Merci infiniment à mes parents avec une mention spéciale pour ma mère à qui je dois l'absence quasi-totale de fautes dans ce manuscrit. Merci à ma mère de m'avoir soutenu, rassuré et encouragé, et surtout d'avoir eu la patience de me supporter pendant les périodes de stress et de grande fatigue ! Tu t'es largement investie dans cette aventure avec moi. Merci à ma sœur Cécile et mon frère Sébastien de m'avoir supporté (dans les deux sens du terme), et un clin d'œil spécial à mon formidable grand-père Guy Ferré. J'espère que je saurai, comme lui, garder une curiosité insatiable.

Je termine par Nathalie qui m'a accompagné au quotidien pendant ces trois ans. Je ne compte pas les fois où elle m'a rassuré, ni le nombre de coups de mains techniques ou logistiques. Merci pour ton aide pendant la rédaction et la préparation de l'oral. À charge de revanche...

**À Nathalie, avec qui je partage
ma vie et ma passion depuis
plusieurs années.**

**À ma famille et mes amis qui
m'ont supporté dans tous les
sens du terme pendant ces
trois années.**

Table des matières

Chapitre I : Introduction.....	1
1 Présentation des Strombidae.....	3
2 L'association Apicomplexa / <i>Strombus gigas</i>	7
3 Problématique et choix de l'approche analytique	9
3.1 Caractérisation des organismes associés à <i>Strombus gigas</i> et nature de l'interaction.....	9
3.2 Fonctionnement de la glande digestive.....	10
3.3 Organisation du manuscrit.....	10
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	11
1 Collecte des individus.....	13
2 Conditions de maintien au laboratoire.....	16
2.1 Maintien des individus en stress alimentaire.....	16
2.2 Nourrissage aux granulés d'élevage.....	17
3 Isolation des symbiotes, extractions d'A.D.N. et amplifications.....	18
3.1 Isolation des symbiotes par centrifugations différentielles.....	18
3.2 Extractions d'A.D.N. des symbiotes à partir de la fraction symbiote.....	19
3.3 Amplification par P.C.R. et séquençage.....	22
4 Obtention et élevage de larves de Strombidae.....	24
5 Analyses structurales et ultrastructurales.....	25
5.1 Microscopie photonique.....	25
5.2 Microscopie électronique à balayage.....	27
5.3 Microscopie électronique à transmission.....	28
6 Techniques d'analyse écotoxicologique.....	32
6.1 Contaminations expérimentales.....	32
6.2 Dosage de l'activité de la catalase.....	33
Chapitre III : L'association avec les Sporozoaires.....	35
1 Introduction.....	37
1.1 Les interactions durables.....	37
1.2 Apicomplexa ou Sporozoaires.....	40
1.3 Le state oocyste des Sporozoaires.....	43
2 Résultats.....	45
2.1 Analyse de la glande digestive des strombes caribéens et du Pacifique	45
2.2 Analyse de la glande digestive des Gastéropodes d'eau douce.....	49
2.3 Caractérisation des Sporozoaires.....	50

2.4 Mode de transmission des Sporozoaires.....	54
3 Discussion.....	57
3.1 La glande digestive et ses symbiotes.....	57
3.2 Nature de la relation entre les Sporozoaires et les Gastéropodes.....	64
Chapitre IV : Structure et fonctionnement de la glande digestive des Strombidae.....	75
1 Introduction.....	77
2 Résultats.....	79
2.1 Structure et ultrastructure de la glande digestive.....	79
2.2 Physiologie de la glande digestive.....	85
3 Discussion.....	93
3.1 Structure générale de la glande digestive.....	93
3.2 Les cellules digestives.....	95
3.3 Les cellules vacuolaires.....	99
3.4 Les cellules cryptiques.....	100
3.5 Le cycle de la glande digestive.....	108
Chapitre V : Conclusion générale et perspectives.....	111
Références.....	117
Annexes.....	141

LISTE DES FIGURES

1 : Utilisations diverses de la coquille du lambi, <i>Strombus gigas</i> , dans la Caraïbe.....	3
2 : Photographies de coquilles de Strombidae témoignant de la pression de pêche exercée sur cette famille.....	5
3 : Cartes des sites de prélèvement des Strombidae.....	14
4 : Carte des sites de prélèvement des Gastéropodes d'eau douce.....	15
5 : Photographie des granulés de nourriture artificielle.....	17
6 : Représentation schématique du principe de la microanalyse par spectrométrie en perte d'énergie des électrons.....	30
7 : Représentation schématique de deux arbres phylogénétiques.....	37
8 : Aperçu de la diversité de forme et de taille chez les Sporozoaires.....	41
9 : Schéma général du cycle vital des Sporozoaires.....	42
10 : Activité de la catalase dans la glande digestive de <i>S. pugilis</i> contaminés au cadmium.....	91
11 : Schéma du fonctionnement cyclique de la glande digestive des Strombidae.....	109

LISTE DES TABLEAUX

1 : Formulation des granulés d'élevage utilisés pour le nourrissage des Strombidae.....	17
2 : Caractéristiques de la P.C.R. effectuée sur les extractions d'A.D.N. des symbiotes.....	23
3 : Détail des concentrations et des durées de contamination.....	33
4 : Contenus des surnageants à l'issue des centrifugations.....	51
5 : Éléments détectés par analyse E.D.X. dans la coque des symbiotes.....	54
6 : Prévalence de parasites Sporozoaires chez des hôtes invertébrés et vertébrés.....	71
7 : Éléments détectés lors de l'analyse EDX des sphérocristaux.....	89

LISTE DES ABREVIATIONS

% : pour cent
° : degré
°C : degré Celsius
A : Adénine / Ampère
A.D.N. : Acide Désoxyribonucléique
A.D.N.r. : Acide Désoxyribonucléique ribosomal
A.R.N.r. : Acide Ribonucléique ribosomal
C : Cytosine
CdBP : Cadmium Binding Protein
DAPI : 4',6'-diamino-2-phényllindol dihydrochloride
DnTP : Desoxy n Tri-Phosphate
E.D.T.A. : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
E.D.X. : Energy Dispersive X
EELS : Electron Energy Loss Spectroscopy
E.F.T.E.M. : Energy Filtered Transmission Electron Microscopy
E.S.I. : Electron Spectroscopic Imaging
FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization
g : gramme
G : Guanosine
l : litre
m : mètre
M : Molaire
min : minute
mol : mole
M.E.T. : Microscope Électronique à Transmission
M.E.B. : Microscope Électronique à Balayage
mOsm : milliosmole
mRad : milliradian
P.B.S. : Phosphate Buffured Saline
P.C.R. : Polymerase Chain Reaction
P.F.A. : Paraformaldéhyde
pH : potentiel Hydrogène
s : seconde
S : Svedberg
S.D.S. : Sodium Dodecyl Sulfate
T : Thymidine / Température
T.A.E. : Tampon tris Acétate E.D.T.A.
T.E. : Tampon tris E.D.T.A.
V : Volt
μ : micro

N.B. : Conformément à la règle en vigueur, les sigles seront écrits avec autant de points qu'il y a de mots abrégés (E.D.X), sauf quand le sigle se prononce comme un nom commun (FISH).

*« Le fait qu'on ait pris conscience dans les vingt dernières années du XXème siècle, que les associations du vivant, sous leur forme parasitaire ou mutualiste, avaient joué et jouaient toujours des rôles clés dans l'évolution et le fonctionnement de la biosphère, a contraint les chercheurs à se poser une nouvelle question: **qu'est-ce qui est vraiment parasite ou mutualiste et qu'est-ce qui ne l'est pas ?** »*

L'art d'être parasite (les associations du vivant). Claude Combes, 2001.

Chapitre I : Introduction

1 Présentation des Strombidae

Plus connu localement sous le nom de « lambi », *Strombus gigas*, Linnaeus, 1758, est une espèce endémique importante de la Caraïbe. Il s'agit, tout d'abord, d'une espèce commerciale, pêchée dans l'ensemble de la Caraïbe, qui représente le deuxième produit de pêche à plus forte valeur ajoutée juste derrière la langouste. 79 % des exportations de lambis sont à destination des Antilles françaises, 19 % à destination de la Floride et 2 % pour le reste de la Caraïbe (Frenkiel communication personnelle).



Figure 1 : Utilisations diverses de la coquille du lambi, *Strombus gigas*, dans la Caraïbe. **A**, utilisation en tant qu'instrument de musique au carnaval. Martinique (Photo : www.zananas-martinique.com). **B**, utilisation en artisanat comme boucles d'oreilles. Campeche, Mexique. **C**, coquille de lambi sculptée datant de l'époque précolombienne. Villahermosa, Mexique (photo : Frenkiel, L.). **D**, utilisation des coquilles de lambis comme ornementation d'une sépulture. Les Saintes, Guadeloupe (photo : Laurent, M.).

En 2001, 3 132 tonnes de chair ont été pêchées, ce qui représente une valeur de 31 millions de dollars U.S. (Aldana Aranda 2003). Au-delà de l'importance économique de l'espèce, le lambi est largement intégré dans la culture caribéenne. Sa coquille est utilisée comme instrument de musique, notamment lors du carnaval. Elle sert également d'ornementation autour des tombes et elle est utilisée dans l'artisanat d'art pour la fabrication de lampes ou de bijoux (Fig. 1). Cette espèce représente donc un enjeu économique, social et culturel important pour les pays de la zone caribéenne. Depuis quelques années, nous assistons à une inquiétante diminution des stocks de lambis dans les zones de pêche côtière. Notons, par exemple, qu'au Yucatan (Mexique) l'espèce a presque complètement disparu. Cette diminution, sans doute imputable à l'importante pression de pêche qui s'exerce sur l'espèce, a amené les autorités compétentes à prendre des mesures de protection (Adams 1970 ; Aldana Aranda 2003 ; Aldana Aranda *et al.* 1997 ; Aldana Aranda et Suárez 1998 ; Appeldoorn 1987). En Guadeloupe, par exemple, l'arrêté préfectoral de 2002 portant réglementation de l'exercice de la pêche maritime côtière stipule que la pêche aux lambis est réservée aux professionnels. Elle ne peut se faire en plongée avec bouteille et elle n'est ouverte que du 1er octobre au 31 décembre avec une prolongation jusqu'au 31 janvier pour la pêche à plus de 25 mètres de profondeur. Malheureusement ces mesures de protection sont difficilement appliquées et des quantités supposément importantes de lambis sont braconnées (Fig. 2). En effet, le kilogramme de chair se vend en moyenne 10 USD dans les pays de la Caraïbe et jusqu'à trois fois plus cher (23 EUR) en Guadeloupe et en Martinique. Pour l'ensemble de ces raisons, *S. gigas* a été inclus en 1992 dans l'annexe II de la Convention Internationale des Espèces de Faune et de Flore en Danger (CITES) et en 1994 dans la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN).

Le lambi, *Strombus gigas*, est un Mollusque Gastéropode appartenant à La famille des Strombidae. Ceux-ci font partie des Caenogastropoda introduits par Cox en 1960 et qui reprennent la plupart des caractéristiques des Gastéropodes anciennement appelés Prosobranches (Cox 1960). Notons que le taxon « Prosobranchie » n'a plus vraiment lieu d'être puisque il s'agit d'un groupe paraphylétique. Cependant, lorsque cela est inévitable, nous utiliserons le terme « Prosobranchie » dans ce manuscrit, notamment lorsque nous citerons des études qui y font référence. Il s'agit du plus grand groupe de Gastéropodes marins en termes de nombre d'espèces, de diversité des habitats et d'importance écologique (Colgan *et al.* 2007).



Figure 2 : Photographies de coquilles de Strombidae témoignant de la pression de pêche exercée sur cette famille. **A**, amas de coquilles de *Strombus gigas* sur une plage de la côte Caraïbe du Mexique (Photo : José Francisco Chávez Villegas). **B**, coquilles de *S. gigas* recouvrant une plage sur l'île Kahouanne en Guadeloupe (Photo : Maes, M). **C**, caisse et sacs remplis de Gastéropodes au retour d'une pêche au Mexique. La pêche est essentiellement constituée de *S. pugilis* (Photo : Aldana Aranda, D). **D**, détail des *S. pugilis* encore vivants au retour d'une pêche (Photo : Frenkiel, L).

Les Strombidae sont caractérisés par leur mode de déplacement : à la différence de la plupart des Gastéropodes, qui se déplacent en glissant, les Strombidae se déplacent par des « sauts » qu'ils effectuent grâce à leur opercule (Alyakrinskaya 2003 ; Berg 1975). Cette famille compte entre cinq et huit genres suivant les auteurs et plus de 120 espèces. Les deux genres les plus représentés sont *Strombus* et *Lambis*. Dans la Caraïbe on rencontre communément cinq espèces : *Strombus (Aliger) costatus*, Gmelin, 1791 ; *Strombus (Aliger) gallus*, Linnaeus, 1758 ; *Strombus (Eustrombus) gigas*, Linnaeus, 1758 ; *Strombus pugilis*, Linnaeus, 1758 et *Strombus raninus*, Gmelin, 1791. Bien que *S. gigas* soit de loin l'espèce la plus convoitée, trois autres sont pêchées pour être consommées : *S. costatus*, *S. gallus* et *S. pugilis*.

Chapitre I : Introduction

Les Strombidae ont fait l'objet de nombreux travaux sur la reproduction (Aldana Aranda 2003 ; Avila Poveda et Baqueiro Cárdenas 2009 ; Baqueiro Cárdenas *et al.* 2005 ; Cob *et al.* 2008 ; Gascoigne et Lipcius 2004), la gestion des stocks naturels, la protection (Aldana Aranda 2003 ; Aldana Aranda et Perez Perez 2007 ; Appeldoorn 1987 ; Cipriani *et al.* 2008 ; Gascoigne et Lipcius 2004 ; Schapira *et al.* 2009 ; Schweizer et Posada 2006) et l'aquaculture (Adams 1970 ; Aldana Aranda *et al.* 1997 ; Aldana Aranda et Suárez 1998 ; Boettcher 2005 ; Brito-Manzano et Aranda 2004 ; Cob *et al.* 2009 ; De Jesus-Navarrete *et al.* 2007 ; Gomez *et al.* 2007 ; Wiedemeyer 1998).

2 L'association Apicomplexa / *Strombus gigas*

En 2007, lors d'une étude sur la reproduction d'une population de *S. gigas* de l'île de San Andrés (Colombie) il a été rapporté la présence de structures étrangères en grand nombre dans les cellules de la glande digestive des animaux analysés (Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007a; Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007b). Ces structures, apparemment des protistes, sont alors décrites comme appartenant au groupe des Apicomplexa. L'étude en question rapporte également un taux d'individus matures anormalement bas. Ces deux informations corrélées ont amené les auteurs à décrire les micro-organismes Apicomplexa comme des parasites intracellulaires.

Plus récemment, Gros *et al.* (2009) ont publié une étude sur la structure de la glande digestive de *S. gigas* échantillonnés en Guadeloupe, dans laquelle ils annoncent avoir également détecté des parasites similaires à ceux décrits par Baqueiro Cárdenas *et al.* (2007) dans la population de l'île de San Andrés. Les deux études rapportent que tous les individus échantillonnés présentent un nombre important de parasites. Ces deux premières descriptions de l'association Apicomplexa - *S. gigas* sont à la base de ce travail de thèse. En effet, les parasites semblent infecter l'ensemble des individus de deux populations éloignées de plusieurs milliers de kilomètres. Le lambi étant une espèce endémique d'intérêt commercial, social et culturel important, la découverte d'une telle parasitose soulève de nombreuses interrogations, en voici quelques unes :

- ✓ Quelle est la virulence de ce parasite ?
- ✓ Les populations de *S. gigas* sont-elles en danger ?
- ✓ S'agit-il d'une parasitose récente ou ancienne ?
- ✓ Ce parasite est-il pathogène pour l'Homme ?
- ✓ Toutes les populations de *S. gigas* sont-elles infectées ?
- ✓ D'autres Strombidae sont-ils infectés ?
- ✓ *S. gigas* est-il l'hôte définitif du parasite ?

Chapitre I : Introduction

Ce travail ne prétend évidemment pas répondre à l'ensemble de ces questions. En revanche, un travail d'investigation scientifique semble devoir être réalisé afin de poser les bases d'une thématique nouvelle : **l'association Strombidae – Apicomplexa**. Plusieurs approches sont possibles pour aborder cette thématique et nous allons maintenant justifier celles que nous avons retenues.

3 Problématique et choix de l'approche analytique

3.1 Caractérisation des organismes associés à *Strombus gigas* et nature de l'interaction

L'identification des protistes associés à la glande digestive de *S. gigas* n'a été réalisée qu'à partir d'observations histologiques de la glande digestive. Deux publications ont déjà proposé de les classer parmi les Apicomplexa (Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007b; Gros *et al.* 2009). Cette identification a été réalisée par des parasitologues interrogés indépendamment. Cependant, la seule observation histologique ne permet pas d'identifier avec certitude un organisme de ce type. Le groupe des protistes contient plus de 300 000 espèces de tailles et de formes variées. Nombreux sont les taxons qui présentent des formes kystiques ou sporulantes (Foissner 2008 ; Perkins 1991). L'observation à l'échelle de l'ultrastructure offre souvent de bien meilleurs éléments pour l'identification des protistes et la seule technique qui permet de classer un organisme avec certitude reste l'analyse phylogénétique. Dans cette optique, nous avons réalisé une série d'observations aux microscopes électroniques à balayage et à transmission en plus des observations au microscope photonique. Nous avons également entrepris de caractériser d'un point de vue moléculaire les structures associées à *S. gigas*. D'autre part, nous avons effectué un échantillonnage sur six autres espèces de la famille des Strombidae afin de répondre à la question : « D'autres Strombidae sont-ils infectés par les Apicomplexa ? ». Pour *S. costatus*, *S. gigas* et *S. pugilis* des individus provenant de différentes populations ont été collectés et analysés afin d'avoir un idée de l'importance de l'infection. D'une façon générale, nous avons tenté de savoir quelle est la prévalence des Apicomplexa chez les Strombidae. Nous nous sommes également intéressés au mode de transmission de ces organismes entre individus hôtes. Enfin, nous avons choisi d'analyser la glande digestive de deux Ampullariidae (Gastéropodes d'eau douce), qui sont génétiquement très éloignés

des Strombidae. Ces observations qui vont de l'échelle de la microscopie électronique jusqu'à celle des populations de Strombidae nous apporteront des éléments de réflexion pour discuter de la nature de la relation Apicomplexa-Strombidae.

3.2 Fonctionnement de la glande digestive

Aborder la problématique posée par un micro-organisme hébergé par *S. gigas* dans la glande digestive passe aussi par une meilleure compréhension du fonctionnement de cet organe. Nous nous proposons donc d'étudier d'un point de vue structural et fonctionnel le lieu de l'association : la glande digestive. Il s'agit d'un organe présent chez les Mollusques, les Arthropodes et les poissons qui accomplit des fonctions diverses allant de la plus étudiée, la digestion (Merdsoy et Farley 1973 ; Nelson et Morton 1979 ; Owen 1966 ; Taïeb et Vicente 1999 ; Voltzow 1994), à d'autres moins bien connues telles que la détoxification, l'osmorégulation ou encore le stockage de réserves énergétiques (Owen 1966). Il s'agit d'une glande tubulaire. Les tubules digestifs sont formés par un épithélium composé de un à quatre types cellulaires suivant les groupes de Mollusques (Boghen et Farley 1974 ; Lutfy et Demain 1967 ; Merdsoy et Farley 1973 ; Nelson et Morton 1979 ; Sumner 1969 ; Swift *et al.* 2005 ; Taïeb 2001 ; Voltzow 1994). Chez les Strombidae, les tubules digestifs sont constitués de trois types cellulaires que nous nous proposons de décrire et de caractériser grâce à l'observation en microscopie photonique et électronique. Une attention particulière sera portée aux fonctions de digestion intracellulaire, de stockage de lipides, de détoxification et d'osmorégulation.

3.3 Organisation du manuscrit

Ce manuscrit s'organise en quatre chapitres. Le premier, que nous sommes en train de clore, correspond à une introduction générale. Dans un deuxième, nous décrirons l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés tout au long des trois années de recherche. Les chapitres III et IV contiennent l'ensemble des résultats obtenus. Dans le chapitre III, nous nous intéresserons à l'association symbiotique : Strombidae-Sporozoaire. Le chapitre IV sera consacré à l'étude de la glande digestive des Strombidae. Ces deux chapitres s'organisent comme suit : une introduction suivie de la présentation des résultats et enfin, la discussion dans laquelle les résultats sont analysés et confrontés à la bibliographie. Nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1 Collecte des individus

Au total, neuf espèces de Gastéropodes ont été collectées :

- *Lambis lambis*
 - *Strombus costatus*
 - *Strombus galeatus*
 - *Strombus gallus*
 - *Strombus gigas*
 - *Strombus pugilis*
 - *Strombus raninus*
 - *Marisa cornuarietis*
 - *Pomacea glauca*
- 7 Strombidae (Gastéropodes marins)
- 2 Ampullariidae (Gastéropodes d'eau douce)

Les Strombidae ont été collectés manuellement en apnée dans des zones d'herbier et sur fond sablo-vaseux en Guadeloupe, au Mexique et dans l'archipel du Vanuatu. La figure 3 présente les sites d'échantillonnage des différentes espèces. Sur les neuf espèces étudiées, seul *Strombus gigas* fait l'objet d'une restriction de pêche en Guadeloupe. Pour cette espèce, les individus ont été collectés conformément à la réglementation en vigueur, par des pêcheurs professionnels pendant la période d'ouverture de la pêche. Une fois les individus pêchés, ils sont rapidement transportés au laboratoire. Pendant le transport les Gastéropodes sont conservés hors de l'eau. Les deux espèces d'eau douce ont été collectées manuellement dans des mares ou cours d'eau en Guadeloupe. La figure 4 présente les sites d'échantillonnage pour les deux Ampullariidae.

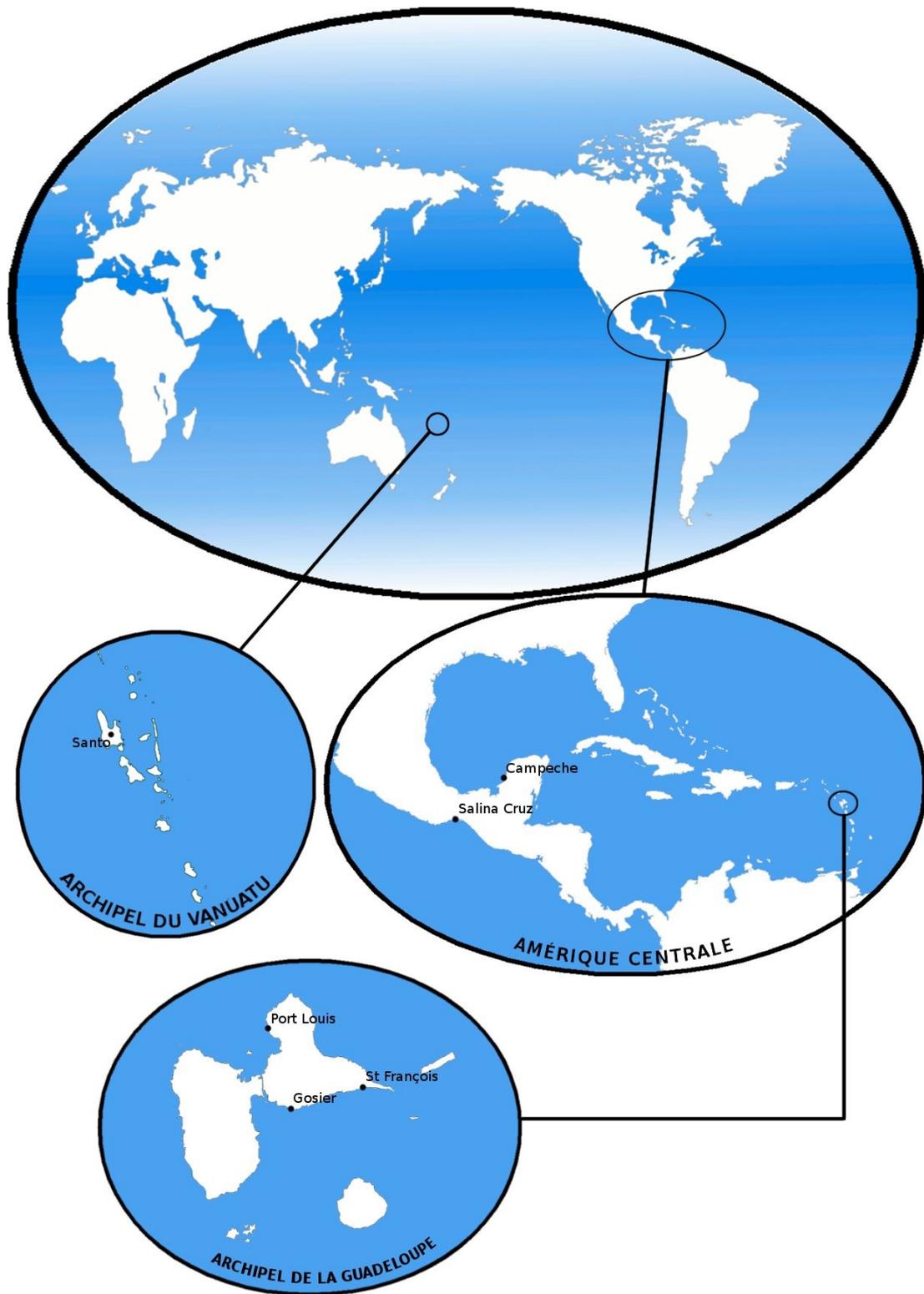


Figure 3 : Cartes des sites de prélèvement des Strombidae. Les espèces *Strombus costatus*, *S. gallus*, *S. gigas*, *S. pugilis* et *S. raninus* ont été collectées en Guadeloupe sur les sites de Gosier, Port-Louis et Saint-François. Les deux individus de *Lambis lambis* ont été collectés à Santo dans l'archipel du Vanuatu. Les deux individus de *S. galeatus* ont été collectés sur la côte pacifique du Mexique à proximité de Salina Cruz. Enfin, des individus de *S. pugilis* ont également été collectés dans le golf du Mexique au large de Campeche.

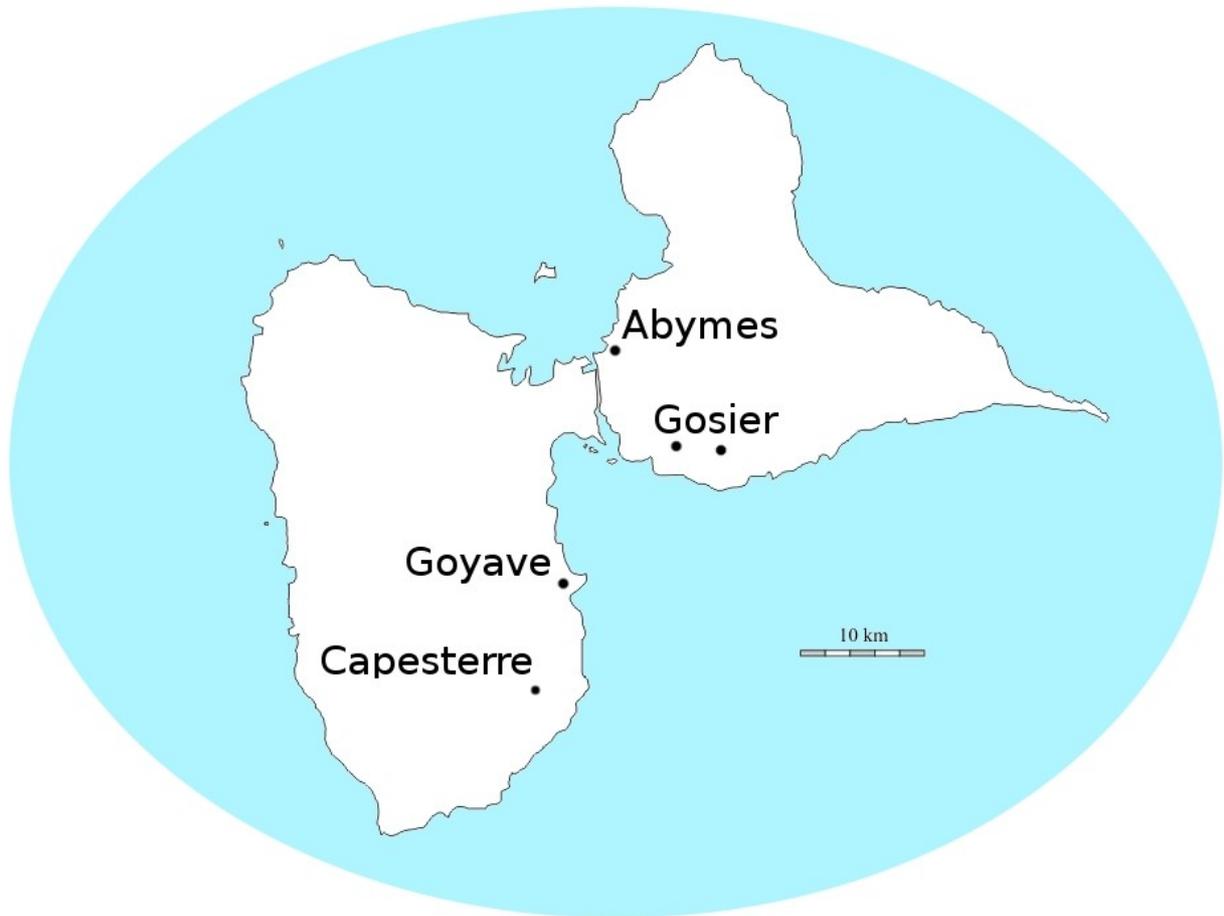


Figure 4 : Carte des sites de prélèvement des Gastéropodes d'eau douce. *Marisa cornuarietis*, Linnaeus, 1758, (n > 13) a été collecté sur le site des Abymes, sur les deux sites de Gosier et dans le Grand-Étang à Capesterre. *Pomacea glauca*, Linnaeus, 1758, (n > 15) a quant à lui été collecté sur le site des Abymes, sur les deux sites de Gosier ainsi qu'a Goyave.

2 Conditions de maintien au laboratoire

Seuls les Strombidae suivants ont fait l'objet d'expérimentations qui nécessitaient un maintien plus ou moins long au laboratoire : *S. costatus* ; *S. gigas* ; *S. pugilis*. Le cas échéant, les Strombidae ont été placés dans des bacs de type Raceway[®] de 400 l. Un bulleur assurait un brassage minimum ainsi que l'oxygénation de l'eau des bacs.

2.1 Maintien des individus en stress alimentaire

Des individus de *S. costatus* et *S. pugilis* ont subi des protocoles de stress alimentaire. Avant le début du jeûne, les individus collectés ont été brossés et débarrassés de leurs nombreuses algues épibiontes présentes sur leur coquille. Ils sont ensuite placés dans des Raceway[®] préalablement nettoyés et stérilisés à la javel (hypochlorite de sodium). Pendant la période de jeûne, l'eau du bac est filtrée sur sable et renouvelée tous les deux ou trois jours. À chaque changement d'eau, le bac est entièrement nettoyé pour limiter au maximum le développement d'algues microscopiques qui induiraient un biais dans l'expérimentation. Les coquilles des Strombidae ont également été brossées régulièrement pour les mêmes raisons. Des individus ont été sacrifiés après des durées de jeûne variables allant de quelques jours à 8 mois.

2.2 Nourrissage aux granulés d'élevage

Des individus de *S. costatus*, *S. gigas* et *S. pugilis* ont été maintenus au laboratoire avec un apport de nourriture sous forme de petits granulés. La formulation des granulés est présentée dans la tableau 1. Les granulés ont été préparés et fournis par le « Laboratoire de Biologie et de Culture de Mollusque » du CINVESTAV Unité de Mérida au Mexique. Pendant la période de nourrissage, les granulés étaient distribués *ad libitum*. L'eau du bac était renouvelée au moins une fois par semaine. À cette occasion, les bacs étaient nettoyés.

Tableau 1 : Formulation des granulés d'élevage utilisés pour le nourrissage des Strombidae.

Ingrédients	Pourcentage
Farine de poisson	33.0
Farine de soja	33.0
Farine de blé	16.9
<i>Halymenia floresia</i>	2.0
Amidon de maïs gélatinisé	10.5
Mélange de vitamines	1.0
Mélange de minéraux	0.1
Huile de poisson	0.3
Huile végétale	0.7
Lécithine de soja	1.0
Alginate de sodium	1.0
Oxyde de chrome	0.5



Figure 5 : Photographie des granulés de nourriture artificielle utilisés pour le nourrissage des Strombidae.

3 Isolement des symbiotes, extractions d'A.D.N. et amplifications

3.1 Isolement des symbiotes par centrifugations différentielles

Après avoir réalisé un isolement des symbiotes par décantation sur un gradient de percol (Percol 30 %, Imidazole 2,5 X 70 % ; pH 8,3), nous avons constaté que la purification n'était pas suffisante. Afin d'obtenir une solution ne contenant que les symbiotes des Strombidae, nous avons donc mis en place le protocole suivant :

La glande digestive est disséquée sur un individu fraîchement sorti de sa coquille. Elle est coupée en de nombreux petits fragments. Ces derniers sont ensuite homogénéisés dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm grâce à un broyeur de Dounce[®]. Les broyats sont réalisés de telle sorte qu'un volume final de 200 ml soit obtenu. Les plus gros débris sont filtrés à l'aide d'une toile en nylon de maille 200 µm puis les 200 ml sont répartis en 4 tubes Falcon[®] de 50 ml qui seront utilisés simultanément pour les centrifugations suivantes :

1. Les tubes sont centrifugés à 1 500 g pendant 5 min. Les surnageants sont éliminés.
2. Les culots sont remis dans une solution de saccharose - eau de mer 30 % et centrifugés à 1 500 g pendant 5 min. Les surnageants sont éliminés.
3. Les culots sont remis dans une solution de saccharose - eau de mer 60 % et centrifugés à 1 500 g pendant 5 min. Les surnageants sont éliminés.
4. Les culots sont remis dans une solution de saccharose - eau de mer 80 % et centrifugés 10 min à 1500 g. Les surnageants sont éliminés.
5. Les culots sont remis dans une nouvelle solution de saccharose - eau de mer 80 % et centrifugés 10 min à 2 400 g. Les surnageants sont éliminés.

6. Les culots sont remis en eau de mer filtrée et les tubes sont bien agités pour laver le saccharose. Ils sont ensuite centrifugés à 2 000 g pendant 3 min. Les surnageants sont éliminés et cette étape est répétée une seconde fois.

La qualité de la purification est contrôlée en effectuant une coloration au DAPI qui permet de détecter la présence de noyaux issus des cellules de la glande. Un volume de l'ordre de quelques microlitres de la fraction symbiote est dilué dans 1 ml d'eau de mer filtrée et 20 μl de DAPI à 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ sont ajoutés à la solution. L'ensemble est ensuite passé sur un filtre à 0,2 μm . Ce dernier est alors observé entre lame et lamelle avec une goutte de DAKO[®]. Si aucun noyau n'est détecté, la purification est correcte. Elle est donc stockée à -80°C avant d'être utilisée.

3.2 Extractions d'A.D.N. des symbiotes à partir de la fraction symbiote

3.2.1 Extraction classique après digestion à la protéinase K

Un quantité suffisante de la fraction symbiote est mise en suspension dans 300 μl de tampon de lyse (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM, E.D.T.A. 50 mM ; pH 8) auquel est ajouté 150 μl de S.D.S. à 2 % en tampon T.E. (Tris 10 mM, E.D.T.A. 1 mM ; pH 8) et 50 μl de protéinase K à 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'ensemble est laissé une nuit au bain-marie à 55°C avec agitation. Après digestion, 100 μl de T.E. sont ajoutés pour obtenir un volume final de 600 μl . Sont alors ajoutés 600 μl de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1). L'ensemble est mélangé doucement par inversion des deux phases pendant 10 min puis est centrifugé à 10 000 g. La phase aqueuse supérieure est alors récupérée en prenant soin de ne pas prélever l'interface protéique blanchâtre. Cette opération est répétée une fois. Après le second passage, la phase aqueuse est mélangée à un volume équivalent de chloroforme. Le contenu du tube est mélangé par inversion des deux phases pendant 10 min avant d'être centrifugé 10 min à 10 000 g. Le surnageant est récupéré et 10 % d'acétate de sodium 3 M sont ajoutés ainsi que 2 volumes d'éthanol 100° à -20°C qui aura pour conséquence de précipiter les molécules d'A.D.N. Le tube est alors centrifugé à 8 000 g pendant 5 min. Le culot est lavé en éthanol 70° puis centrifugé de nouveau. Finalement, le culot est remis en eau ultra-pure. À cette

étape, le tube peut être conservé à 4°C.

Des extractions ont également été réalisées à partir de la fraction symbiote de la glande en utilisant le kit Quiagen® DNeasy Blood and Tissue Kit 50.

Le contrôle des extractions est réalisé grâce à l'électrophorèse des produits d'extraction sur gel d'agarose à 1 %.

3.2.2 Extraction par digestion enzymatique des coques

A partir de la fraction symbiote de la glande digestive, plusieurs protocoles de digestion enzymatique ont été réalisés en vue de rendre accessible l'A.D.N. des symbiotes. Trois enzymes digestives ont été testées : la pepsine, la pronase et la trypsine. Les digestions ont été réalisées aux pH et aux températures optimum des enzymes et à différentes concentrations :

- [Pepsine] : 0,5 et 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. pH = 2 ; T = 42°C
- [Pronase] : 0,5 et 2 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$. pH = 7,5 ; T = 50°C
- [Trypsine] : 5 et 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. pH = 7,4 ; T = 37°C

Les digestions ont été réalisées au bain-marie durant une nuit. Pour la pronase, la digestion s'est faite en présence de CaCl_2 à 10 mM. A l'issue des digestions, des contrôles au microscope photonique sont réalisés afin de vérifier l'action des enzymes sur les symbiotes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 6000 g pendant 1 min et le surnageant est récupéré. L'A.D.N. potentiellement contenu dans le surnageant est précipité par l'ajout d'acétate de sodium 3M et d'éthanol 100° refroidi à -20°C. Le tube est centrifugé de nouveau et le culot est lavé en éthanol 70° et séché à 37°C. L'A.D.N. est ensuite dissout dans un petit volume d'eau ultra pure (20 à 50 μl) avant d'être contrôlé sur gel comme décrit précédemment.

3.2.3 Extraction par broyage mécanique des coques dans l'azote liquide

Le culot d'un tube correspondant à la fraction symbiote conservée à -80°C est placé dans de l'azote liquide dans un mortier préalablement refroidi. Le culot est broyé à l'aide d'un pilon également refroidi au préalable. Le broyage est réalisé jusqu'à l'obtention d'une poudre. Celle-ci est ensuite mise en solution dans un volume de 300 μl de tampon de lyse et l'extraction se poursuit comme

présenté dans la partie « extraction classique après digestion à la protéinase K ».

3.2.4 Extraction par broyage mécanique des coques dans un broyeur à billes de verre

Cette technique d'extraction a été réalisée par Laurent Toffin du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (U.M.R. 6197) à Brest. Une fraction symbiote lui a été envoyée conservée dans de la glace carbonique. Le kit d'extraction « Fast D.N.A.[®] Spin kit for soil » a été utilisé pour l'extraction. La particularité de cette méthode réside dans l'utilisation d'un broyeur à billes de verre qui est réputé pour rompre les parois épaisses des micro-organismes du sol. Les symbiotes ont été broyés à l'intensité 5,5 pendant 3 fois 30 s.

3.2.5 Extraction par ultrasons

Les symbiotes issus du protocole de purification ont été soumis à un traitement aux ultrasons dans le sonicateur Bioblock Scientific[®] 86485. La sonication a été réalisée à température ambiante et à l'intensité 100 de l'appareil. Cette technique vise à faciliter la rupture des coques des symbiotes. Elle a été testée seule et en complément du broyage mécanique au mortier dans de l'azote liquide. À l'issue de la sonication, une extraction d'A.D.N. classique a été réalisée. Les produits de l'extraction ont été contrôlés sur gel d'agarose.

3.2.6 Extraction par choc thermique

Des chocs thermiques ont été réalisés sur la fraction symbiote en amont d'une extraction d'A.D.N. classique. Un tube contenant les symbiotes purifiés a été plongé alternativement dans de l'eau en ébullition (~ 100°C) et dans un bain d'azote liquide (< - 190°C). Un aller-retour dans les deux bains a été effectué trois fois. Les bains sont de 5 min chacun.

3.2.7 Extraction d'après le protocole de Zhao et al. (2001)

Le protocole de Zhao *et al.* (2001) initialement prévu pour extraire l'A.D.N. des Sporozoaires de la famille des Eimeriidae a été adapté pour les symbiotes des Strombidae. La fraction symbiote est mise en suspension dans 200 µl d'hypochlorite de sodium à 5,75 %. La solution est mise à incuber pendant 30 min sur lit de glace. Les symbiotes sont ensuite lavés trois fois en P.B.S. (NaCl 300 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 1,7mM) avant d'être remis en solution dans un tampon de

lyse (E.D.T.A. 660 mM, S.D.S. 1,3 %, protéinase K 2mg.ml⁻¹; pH 9,5). La digestion se fait au bain-marie à 65°C pendant 45 min. À l'issue de la digestion, 350 µl d'eau ultra-pure sont ajoutés à la solution pour obtenir un volume final de 450 µl. Sur ce volume, une extraction classique au phénol-chloroforme-isoamylique est réalisée comme décrit précédemment.

3.3 Amplification par P.C.R. et séquençage

3.3.1 À partir des produits d'extractions issus de la fraction symbiote

Des amplifications par P.C.R. ont été réalisées sur les produits d'extractions issus des différents protocoles présentés précédemment, lorsque ceux-ci présentaient de l'A.D.N. détectable lors des contrôles par électrophorèse sur gel d'agarose. Les amplifications ont été réalisées à l'aide du kit d'A.D.N. polymérase GoTaq[®] Flexi de Promega (Cat. No M8306) dans un thermocycleur GeneAmp[®] 2700 (Applied Biosystems) selon les conditions indiquées dans le tableau 2. L'amplification a été réalisée dans un volume de 50 µl en présence de tampon 1X, de Dntp à 0,2 mM, de MgCl₂ à 2 mM, d'amorces à 0,4 pmol.µl⁻¹, et de 1,5 unités d'A.D.N. polymérase Taq. Les amorces utilisées correspondent à des amorces complémentaires du gène de la sous-unité 18S de l'A.R.N.r. dont les séquences sont :

5'- CTG GTT GAT CCT GCC AGT- 3' (18S f)

5'- TCC TGC AGG TTC ACC TAC- 3' (18S r)

Tableau 2 : Caractéristiques de la P.C.R. effectuée sur les extractions d'A.D.N. des symbiotes en vue de l'analyse phylogénétique à réaliser.

Température (°C)	Durée (s)	Phase du cycle	Nombre de cycles
94	120	Dénaturation	1
94	60	Dénaturation	35
52	60	Polymérisation	
72	90	Élongation	
72	600	Élongation	1

3.3.2 À partir d'une extraction d'A.D.N. total de la glande digestive

Une extraction d'A.D.N. total classique a été réalisée à partir d'un fragment de glande digestive de *S. gigas*. L'A.D.N. contenu dans le produit de l'extraction est donc un mélange de l'A.D.N. de l'hôte (*S. gigas*) et de ses symbiotes. À partir de cette solution, une amplification par P.C.R. a été réalisée en utilisant des amorces spécialement dessinées par Félix Muller (post-doctorant au sein de l'U.M.R. 7138 S.A.E.) dont les séquences sont : 5'- GCT YAT TAH AAC ARY TAT W -3' (18S)
5'- GTT ATT RCY THV AAC YWC C -3' (18R)

Les amorces ont été dessinées de telle sorte que la séquence soit spécifique du gène de la sous-unité 18S de l'A.R.N.r. du groupe Coccidia et totalement incompatible avec la séquence du même gène chez les Strombidae. La séquence a été dessinée à partir de l'alignement des séquences 18S de 35 espèces de Sporozoaires du groupe Coccidia. L'amplification par P.C.R. s'est déroulée dans les mêmes conditions que celles présentées dans le paragraphe précédent.

4 Obtention et élevage de larves de Strombidae

Des cordons de pontes de *S. costatus* et *S. pugilis* ont été récoltés manuellement en apnée dans le lagon de l'Anse Champagne à Saint-François en Guadeloupe. Les pontes ont été rapidement ramenées au laboratoire où elles ont été rincées dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm puis placées dans des cristallisoirs de 1 l contenant de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm. L'oxygénation de l'eau était assurée par un bulleur. L'eau des cristallisoirs était renouvelée quotidiennement. Plusieurs fois par jour, un contrôle de l'avancement du développement des embryons était réalisé à la loupe binoculaire ou au microscope photonique. À l'éclosion, les larves les plus actives étaient prélevées et lavées avant d'être placées dans un nouveau cristallisoir préalablement stérilisé. À partir de cette étape, tous les instruments utiles à l'élevage étaient quotidiennement stérilisés dans un bain d'hypochlorite de sodium et abondamment rincés à l'eau claire avant leur utilisation. Lors des quatre premiers jours de développement, de la streptomycine à 60 mg.l⁻¹ était ajoutée à l'eau de l'élevage. Durant toute la durée de l'élevage, l'eau des cristallisoirs était renouvelée quotidiennement et les larves mortes ou anormales étaient retirées de l'élevage. Les larves ont été nourries une fois par jour à l'aide d'algues unicellulaire (*Nanochloropsis* sp.) ajoutées à l'eau d'élevage à la concentration de 10 000 cellules.ml⁻¹. Ces « algues fourrages » unicellulaires ont été cultivées en culture mono-spécifique dans des ballons de 500 ml sous éclairage constant dans une pièce climatisée à 24°C. Le milieu de culture est celui de « Conway » (Walne 1979).

Des essais d'élevage dans des bacs en plastique de 10 et 30 l sans dépasser la concentration de 150 larves.l⁻¹ ont également été tentés.

5 Analyses structurales et ultrastructurales

5.1 Microscopie photonique

5.1.1 Histologie classique

La glande digestive des Strombidae a été disséquée et des échantillons de 0,25 à 0,5 cm³ ont été fixés une nuit dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % et de paraformaldéhyde (P.F.A.) à 2 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2. L'osmolarité de la solution a été amenée à 1100 mOsm avec du NaCl. Pour les Gastéropodes d'eau douce, la fixation s'est faite en glutaraldéhyde à 1,6 % en tampon cacodylate à 0,04 M ce qui confère à la solution des propriétés iso-osmotiques avec les tissus. Les échantillons ont ensuite été lavés dans le même tampon avant d'être déshydratés à l'éthanol. Certains échantillons ont également été fixés dans le liquide de bouin à l'eau de mer (Gabe 1968) avant d'être lavés en eau de mer et déshydratés à l'éthanol. La nature du tissu nécessite une déshydratation longue d'une journée à l'éthanol 70° suivie d'une nuit en éthanol 95° et enfin de 3 bains d'éthanol absolu d'une heure chacun. Trois bains de toluène ont ensuite été réalisés avant l'inclusion en paraffine. Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome Leitz[®] 1516 avant d'être collées sur lames avec de la gélatine à 1 % en solution aqueuse. Les lames ont été mises à sécher à 37°C pendant la nuit avant d'être déparaffinées, réhydratées et colorées.

Une coloration trichrome, fushine acide, hématoxyline de Groat, bleu alcian (pH 2,5) a été réalisée (Gabe 1968). Une fois colorées, les lames ont été déshydratées et montées sous lamelle dans une goutte de baume du Canada. L'observation a été réalisée avec un microscope photonique Nikon[®] Eclipse 80i couplé à une caméra digitale Nikon[®] DXM 1200F.

5.1.2 Détection histochimique des lipides

Ces protocoles n'ont été réalisés que sur les Strombidae.

Protocole de cryo-conservation des lipides

Les échantillons ont été fixés pendant 6 heures dans une solution de P.F.A. à 4 % en eau de mer. Ils ont ensuite été lavés en eau de mer et laissés 48 heures dans un bain de saccharose à 30 % en eau de mer renouvelé une fois. Les échantillons ont ensuite été congelés dans de l'isopentane refroidi à -35°C avant d'être enrobés dans du cryomount[®] sur un support métallique et conservés à -80°C . Les coupes à congélation ont été réalisées à l'aide d'un cryo-microtome Cryo-cut[®] American Optical Corporation et collées sur lames sylanisées avant d'être colorées aux bleu BZL et au noir soudan B comme décrit par Gabe (1968). Les coupes colorées ont finalement été montées sous lamelles dans une goutte de milieu de montage Aquamount[®].

Protocole de post-chromisation des lipides

Les échantillons destinés à la détection histochimique des lipides sur coupes paraffines, ont été fixés en formol à 4 % en eau de mer pendant 24 heures. Ils sont ensuite déshydratés dans des bains d'acétone de concentration croissante en présence de nitrate de cadmium à 10 %. Les échantillons sont finalement laissés 24 heures dans une solution d'acétone absolue contenant 2 % de nitrate de cadmium à saturation dans de l'éthanol absolu. Les pièces sont ensuite réhydratées en présence de nitrate de cadmium à 1 % avant d'être traitées pendant trois jours par une solution aqueuse de bichromate de potassium à 5 %. Les pièces sont finalement lavées abondamment pendant 12 à 24 heures avant inclusion classique en paraffine. Une fois inclus, les échantillons sont coupés et colorés aux bleu BZL et au noir soudan B et montés comme décrit précédemment.

5.1.3 Microscopie à épi-fluorescence

Afin de mettre en évidence l'A.D.N. sur coupes de glande digestive, des inclusions en résine LR-White ont été réalisées. Pour cela, de petits fragments de la glande ont été fixés de la même manière que pour l'histologie classique (Glutaraldéhyde 2,5 %, P.F.A. 2 % en Cacodylate 0,1 M). Après la fixation, les pièces ont été déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante puis incluses dans de la résine LR-White. La polymérisation s'est faite à 45°C dans des gélules de gélatine en absence d'oxygène. Après la polymérisation, des coupes de $0,5\ \mu\text{m}$ à $1\ \mu\text{m}$ d'épaisseur

ont été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome Reichert[®] Ultracut E. Les coupes collées sur lames ont été observées sous lamelles dans du milieu de montage DAKO additionné, soit de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à 150 µg.ml⁻¹, soit de Sybr green à la dilution 1/10 000. Les coupes ont été observées avec un microscope à épifluorescence Nikon[®] Eclipse 80i couplé à une caméra digitale Nikon[®] DXM 1200F.

5.2 Microscopie électronique à balayage

5.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons destinés à l'observation au M.E.B. ont été fixés de la même manière que pour l'histologie classique. A la suite de la fixation, les pièces ont été lavées en tampon cacodylate puis déshydratées dans des bains d'acétone de concentration croissante. Les pièces ont ensuite été séchées au point critique dans un appareil Biorad[®] Polaron, Critical Point Drier. Les échantillons secs ont été fracturés et collés sur des supports en aluminium recouverts d'un film de carbone adhésif. Ils ont été métallisés, soit à l'or, soit au carbone respectivement dans les appareils Biorad[®] Sputter Coater SC500 et E6200 avant d'être observés dans un microscope électronique à balayage Hitachi[®] S-2500 sous une tension d'accélération de 20kV.

5.2.2 Analyse par dispersion d'énergie des rayons X

Les échantillons nécessitant une analyse E.D.X. ont été préparés comme décrit précédemment. L'analyse a été réalisée grâce à une sonde E.D.X. Oxford Link Pentafet[®] refroidie à l'azote liquide. L'échantillon analysé était incliné à 30° et placé à une distance de 37 mm de la sonde. L'analyse a été prise en compte lorsqu'un taux de 100 coups minimum était obtenu. Le temps de comptage était de 100 s.

5.3 Microscopie électronique à transmission

5.3.1 Fixation et inclusion

Les échantillons de glandes digestives de Strombidae destinés à l'observation classique en microscopie électronique à transmission ont été fixés une nuit dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % et de P.F.A. à 2 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2. L'osmolarité de la solution a été amenée à 1100 mOsm avec du NaCl. Certains échantillons ont été fixés, en plus, au tétraoxyde d'osmium. Le cas échéant, après la fixation glutaraldéhyde-P.F.A., ils ont été rincés par trois bains de tampon cacodylate de 15 min avant d'être fixés dans une solution aqueuse de tétraoxyde d'osmium à 1 % toujours dans le même tampon. Les échantillons étaient ensuite lavés dans trois bains d'eau distillée avant de réaliser une post-fixation à l'acétate d'uranyle à 2 % en solution aqueuse, à l'obscurité pendant 45 min. Les échantillons sont alors à nouveau rincés en eau distillée avant d'être déshydratés par des solutions d'éthanol de concentrations croissantes. Notons que la procédure est la même pour la préparation des glandes digestives des Gastéropodes d'eau douce à la seule différence que la première fixation s'est faite en présence de glutaraldéhyde à 1,6 % en tampon cacodylate 0,04 M, ce qui confère à la solution une osmolarité de 230 mOsm.

Pour l'inclusion proprement dite, de l'oxyde de propylène a été substitué à l'éthanol par trois bains de 10 min pour chacun des échantillons. Les échantillons ont ensuite été imprégnés par des mélanges oxyde de propylène - résine de concentrations croissantes pour finalement être placés en résine pure sous vide pendant une nuit. Les échantillons ont ensuite été inclus en résine Epon-Araldite en utilisant le mélange « hard » proposé par Glauert et Hall (1991). La polymérisation se fait dans des cupules en plastique à l'étuve à 60° pendant 3 jours.

5.3.2 Coupes et contrastes

Les blocs polymérisés sont coupés à l'aide d'un ultra-microtome Reichert® Ultracut E. Des coupes semi-fines de 0,5 µm d'épaisseur sont collées sur lame et colorées au bleu de toluidine à 0,5 % dans du tétraborate de sodium 1 %. Ces coupes servent de repères pour sélectionner les zones présentant un intérêt pour l'observation en microscopie électronique. Elles servent également à l'observation de la structure générale des tubules digestifs en microscopie photonique. Des coupes fines de 60 nm sont également réalisées à l'aide d'un couteau en diamant. Elles sont récupérées sur des grilles de cuivre-rodhium de 100 et 200 mesh collodionnées. Après séchage, les coupes sont contrastées 30

min à l'acétate d'uranyle à l'obscurité puis 10 min au citrate de plomb. Les observations ont été réalisées à la plateforme de microscopie électronique de l'I.F.R. 83 à l'Université Pierre et Marie Curie. Les coupes ont été observées dans un microscope électronique à transmission LEO 912 OMEGA sous une tension d'accélération de 120 kV.

5.3.3 Cytochimie

La détection cytochimique des enzymes arylsulfatase et phosphatase acide a été réalisée sur trois espèces : *S. costatus*, *S. gigas* et *S. pugilis*. La dernière a été sélectionnée comme espèce la plus adaptée à la mise en place d'une expérimentation de détection cytochimique d'enzymes lysosomales. La détection des enzymes a été réalisée sur trois lots d'individus : un lot d'individus témoins fraîchement pêchés (T_0), un lot d'individus ayant jeûné pendant 5 mois ($T_{5m\text{ jeûné}}$) et un lot d'individus nourris aux granulés pendant 4 mois ($T_{4m\text{ granulés}}$).

Pour la détection cytochimique des enzymes arylsulfatase et phosphatase acide, des fragments de glandes digestives ont été pré-fixés 2 heures dans une solution de glutaraldéhyde 2 % et de P.F.A. 1 % en tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2 et 1100 mOsm. Les pièces ont ensuite été lavées abondamment dans le même tampon et des coupes épaisses de 50 μm à 150 μm ont été réalisées sur le tissu non inclus à l'aide d'un vibratome OCT Slicer[®] dans du tampon cacodylate à 4°C.

Détection de l'arylsulfatase

La méthode de détection utilisée a été adaptée à partir de celle de Hopsu-Havu *et al.* (1965) décrite en détail dans l'ouvrage de Lewis et Knight (1992). Les coupes de 100 à 150 μm d'épaisseur ont été incubées 45 min à 37°C en tampon acétate à 60 mM et à pH 5,5 en présence de sulfate de p-nitrocatechol à 8 mg.ml^{-1} et de chlorure de barium à 60 mM. Après l'incubation, les coupes sont lavées une nuit en tampon cacodylate avant d'être déshydratées et incluses en résine époxy comme décrit précédemment. Des coupes semi-fines sont réalisées et observées au microscope photonique après coloration par le bleu de toluidine. D'autre part, des coupes fines, non contrastées, sont observées au M.E.T. Des coupes témoins sont réalisées en suivant la même procédure à la différence que le substrat de l'enzyme (sulfate de p-nitrocatechol) est absent du milieu d'incubation. La spécificité des précipités est contrôlée par comparaison avec les coupes témoins et par la confirmation de la présence de barium dans les précipités grâce à l'analyse EELS.

Détection de la phosphatase acide

La méthode de détection utilisée pour la phosphatase acide est celle de Gomori (1952) modifiée par Pasteels (1971). Des coupes de 50 à 100 μm d'épaisseur sont pré-incubées dans du tampon acétate 50 mM puis transférées dans une solution du même tampon contenant du nitrate de plomb à saturation et du β -glycérophosphate de sodium à 3,3 mg.ml^{-1} . L'incubation est réalisée à 37°C pendant 25 min, après quoi, les coupes sont rincées en tampon acétate (acétate de sodium 50 mM, acide acétique 15 mM ; pH 5) et en acide acétique à 3,5 % en solution aqueuse avant d'être déshydratées et incluses en résine comme décrit précédemment. Comme pour l'arylsulfatase, des coupes témoins sont réalisées en omettant le substrat de l'enzyme dans le milieu d'incubation. La vérification de la présence de plomb au niveau des précipités n'a pas pu être réalisée par l'analyse EELS pour des raisons indépendantes de notre volonté.

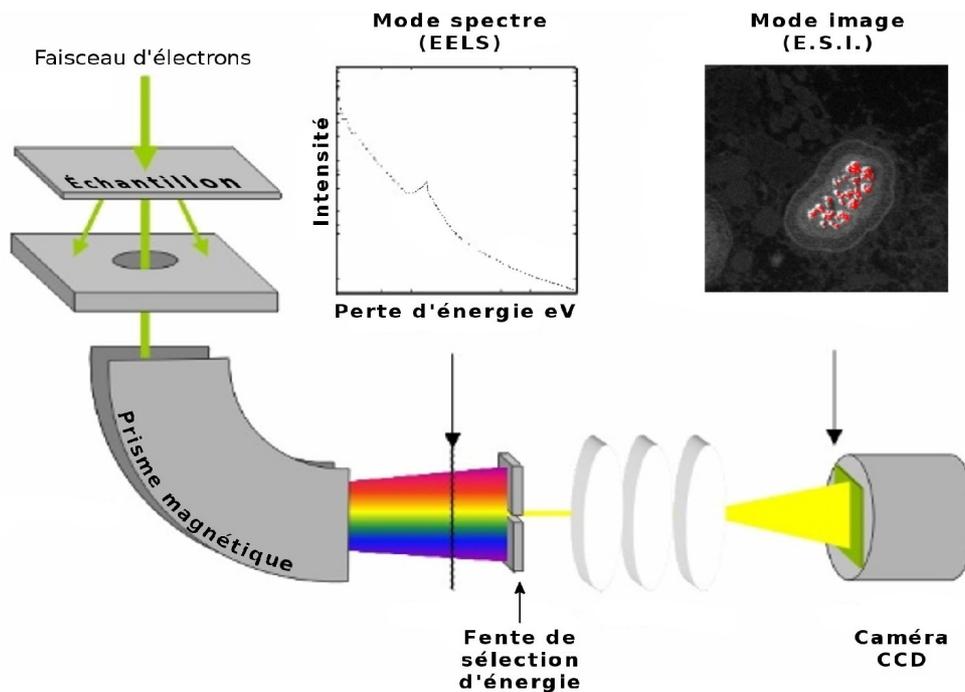


Figure 6 : Représentation schématique du principe de la microanalyse par spectrométrie en perte d'énergie des électrons. Après son passage dans l'échantillon, le faisceau d'électrons passe au travers d'un prisme magnétique. Il est alors possible d'acquérir un spectre (Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS) qui présente un pic d'énergie caractéristique d'un élément. Grâce à une fente de sélection d'énergie, il est possible de sélectionner uniquement les électrons qui ont perdu une quantité spécifique d'énergie et ainsi d'obtenir une image (E.S.I.) représentant la localisation d'un élément. Modifié d'après : www-hrem.msm.cam.ac.uk (Université de Cambridge, Royaume-Uni).

5.3.4 Microscopie électronique à transmission en perte d'énergie des électrons (E.F.T.E.M.)

La microanalyse par spectrométrie en perte d'énergie des électrons (Fig. 6) a été réalisée à la plateforme de microscopie électronique de l'I.F.R. 83 à l'Université Pierre et Marie Curie grâce à un spectromètre intégré à la colonne d'un M.E.T. (Zeiss[®] LEO 912 filtre Oméga). L'acquisition des spectres a été réalisée à un grossissement de 20 000. La microanalyse en mode "spectre" (EELS, Electron Energy-Loss Spectroscopy) a été effectuée sous une tension d'accélération de 120 kV avec un courant de filament de 6 μ A, un angle d'illumination de 0,32 mRad et un diaphragme de sélection d'aire de 100 μ m. En mode image (E.S.I., Electron Spectroscopic Imaging), nous avons utilisé la fente de sélection d'énergie en sortie du spectromètre en réglant son écartement à 15 eV. Pour la cartographie élémentaire la méthode de soustraction utilisée est celle des trois fenêtres. La microanalyse E.F.T.E.M. a été utilisée afin de caractériser les éléments en mode EELS et de les cartographier en mode E.S.I. sur le champ d'observation. Les éléments Al, Ca, Mg et Fe ont fait l'objet d'une telle microanalyse.

6 Techniques d'analyse écotoxicologique

6.1 Contaminations expérimentales

6.1.1 Contamination via l'alimentation

Des individus de *S. pugilis*, pêchés à l'Anse Champagne à Saint-François, ont été ramenés au laboratoire et placés dans des bacs Raceway[®] remplis avec environ 200 l d'eau de mer filtrée grossièrement à l'aide d'un filtre à sable, renouvelée tous les 3 jours. Les animaux ont été nourris avec les granulés d'élevage, fournis par le CINVESTAV de Mérida (Mexique), préalablement contaminés au plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à 500 mg.kg^{-1}) et au cadmium (CdCl_2 à 100 mg.kg^{-1}). Des individus ont été sacrifiés après 12, 32 et 50 jours de nourrissage, ils ont été préparés pour l'observation de coupes semi-fines en microscopie photonique ainsi que pour l'observation au M.E.B. et l'analyse E.D.X. en vue d'analyser les sphérocristaux et de détecter, ou non, les éléments Cd et Pb dans ces structures.

6.1.2 Contamination via l'eau du bac

Plusieurs expérimentations de contaminations via l'eau ont été effectuées, certaines impliquant des individus de *S. pugilis*, pêchés à l'Anse Champagne à Saint-François et d'autres impliquant des individus pêchés à Campeche (Yucatan, Mexique). Trois « individus-réplicats » ont été placés dans des bacs en plastique de 15 l avec oxygénation de l'eau grâce à un bulleur. Les animaux ont d'abord subi une dépuration de 3 jours avant d'être mis en contact avec, soit du chlorure de cadmium (CdCl_2), soit du nitrate de cadmium ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$). Le détail des contaminations (concentrations et durées) est présenté dans le tableau 3. À l'issue des contaminations, les individus ont été placés 3 jours en eau propre avant d'être sacrifiés et préparés pour l'observation de coupes semi-fines,

l'observation au M.E.B. et l'analyse E.D.X. en vue d'analyser les sphérocristaux et de détecter, ou non, l'élément Cd dans ces structures.

Tableau 3 : Détail des concentrations et des durées de contamination des *S. pugilis* au chlorure et au nitrate de cadmium. **J**, jours ; **N.R.**, non réalisé.

	0,05 mg.l ⁻¹	0,1 mg.l ⁻¹	0,5 mg.l ⁻¹	1 mg.l ⁻¹	10 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹
Cd(NO ₃) ₂	N.R.	3 j	3 j	3 j	3 j	3 j
CdCl ₂	3 j	3 et 21 j	3 et 21 j	3 j	N.R.	N.R.

6.2 Dosage de l'activité de la catalase

Le dosage de l'activité de la catalase a été réalisé suivant la méthode de Claiborne (1985). Les glandes digestives à analyser ont été disséquées sur lit de glace et des fragments pesés ont été immédiatement congelés en azote liquide. Ces échantillons ont ensuite été broyés et la fraction post-mitochondriale « S9 » a été isolée par centrifugation pendant 30 minutes à 10 000 g. Sur la fraction S9, l'activité de la catalase a été mesurée dans un spectrophotomètre en suivant la diminution de la quantité d'H₂O₂ à 240 nm. L'activité de la catalase a ensuite été ramenée à la quantité de protéines totale dans l'échantillon qui a préalablement été déterminée par la méthode de Folin-Lowry à l'aide du kit BioRad[®] DC protein assay kit II. Les cinétiques ont été répétées trois fois par échantillon.

*Chapitre III : L'association avec les
Sporozoaires*

1 Introduction

1.1 Les interactions durables

Le concept d'interaction durable a été développé dans les années 1980-1990, notamment par Claude Combes en France. Il regroupe « toutes les interactions entre génomes qui, soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs phénotypes, s'installent dans la durée » (Fig. 7) (Combes 1995). Cette définition qui intègre la notion de durée dans le concept des associations biologiques permet de distinguer les relations proie-prédateur, qui sont furtives, des interactions durables, qui s'installent

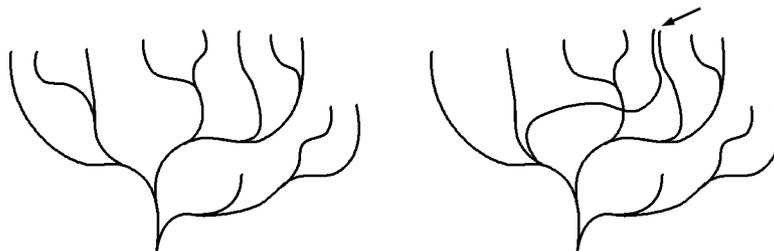


Figure 7: Représentation schématique de deux arbres phylogénétiques. Sur celui de droite, deux taxons génétiquement séparés depuis des millions d'années se rencontrent pour former une *association du vivant*. Modifié d'après Combes, 2001.

dans le temps. De plus, lorsqu'un prédateur se nourrit de sa proie, il n'exploite qu'une des quatre richesses que celle-ci a à offrir : **sa matière**. Dans le cas des interactions durables, les organismes impliqués partagent ou exploitent également les trois autres types de richesse qui sont : **leurs procédés** (réactions chimiques, enzymes...), **leur travail** (déplacement, protection...) et **le fruit de leur travail** (les nids, les maisons...) (Combes 1995). Le concept d'interaction durable se rapproche donc fortement de celui de la symbiose dans son sens le plus large possible. Le terme « symbiose » est introduit pour la première fois en 1879 par Anton de Bary dans sa monographie « Die Erscheinung der Symbiose » (le phénomène de symbiose). Il définit la symbiose comme « toutes associations étroites et durables entre deux organismes hétérosécificiques » (De Bary 1879). Dans

cette définition, qui est celle la plus souvent employée par les auteurs anglo-saxons, rien ne présage de la nature de la relation. Cependant, la communauté francophone a tendance à utiliser ce terme pour définir les interactions durables à bénéfices mutuels, autrement dit, comme synonyme du mutualisme (Smith et Douglas 1987). Dans ce manuscrit, nous utiliserons le terme de symbiose dans sa définition initiale, c'est à dire comme définissant les *associations durables d'espèces différentes*. L'étude des interactions durables représente un enjeu majeur dans la compréhension des processus biologiques et évolutifs. En effet, les associations entre les espèces ont façonné et continuent de façonner la biosphère. L'exemple le plus parlant est sans doute la version la plus aboutie de l'interaction durable qu'est **la symbiose organo-intégrée**. Fruit de symbioses multiples, la cellule Eucaryote est à l'origine d'une explosion de biodiversité dont nous sommes l'un des très nombreux aboutissements.

Les associations symbiotiques sont de différentes natures et sont caractérisées par plusieurs critères. Smith et Douglas (1987) en définissent neuf :

1. Les tailles relatives des partenaires : de façon arbitraire, dans une relation symbiotique, l'organisme le plus grand est nommé **hôte** et le plus petit est nommé **symbiote**.
2. Les positions relatives des partenaires : les symbiotes sont, soit à l'extérieur de l'hôte (**ectosymbiose**), soit à l'intérieur (**endosymbiose**). Les endosymbiotes peuvent être à l'extérieur des cellules de l'hôte (**extracellulaires**) ou, à l'intérieur (**intracellulaires**).
3. La nécessité de la relation : la symbiose est **obligatoire** si les organismes impliqués ne peuvent survivre sans leur(s) partenaire(s). Elle est dite **facultative** si les partenaires peuvent vivre indépendamment.
4. La durée et la stabilité de la symbiose.
5. Le mode de transmission des symbiotes : l'acquisition systématique des symbiotes de la génération parentale à la génération fille est nommée **transmission verticale**. On qualifie de **transmission horizontale** toute transmission qui se fait indifféremment entre les individus d'une population qu'ils soient apparentés ou non (Combes 2001). La **transmission environnementale** qualifie, quant à elle, l'infection de nouveaux hôtes à partir d'un stock de symbiotes existant sous une forme libre dans l'environnement ;
6. La spécificité de la symbiose : le niveau de différence taxinomique entre les organismes hôtes avec lesquels un symbiote peut s'associer définit **la spécificité** de la relation.
7. Le type d'interaction entre les partenaires : elles peuvent être trophiques, métaboliques,

génétiques, comportementales...

8. Le niveau d'intégration : il s'apprécie en fonction des caractéristiques nouvelles que les organismes présentent lorsqu'ils vivent ensemble.
9. Impact sur le succès reproducteur : l'équilibre du **bilan bénéfice/coût** définit la nature de la relation.

Le dernier point est sans doute un des plus fréquemment utilisés pour classer les relations symbiotiques. Lorsque celui-ci est en faveur du symbiote et en défaveur de l'hôte, la relation est dite **parasitaire**. S'il est neutre pour l'hôte et en faveur du symbiote, la relation est dite **commensale** et s'il profite aux deux partenaires, elle est dite **mutualiste**. Cette méthode de classification apparemment simple s'avère souvent insuffisante pour caractériser une relation symbiotique. Premièrement parce que le bilan bénéfice/coût est souvent difficile, voire impossible, à évaluer. Prenons l'exemple de la symbiose entre l'éponge *Stelletta grubii* et la petite huître *Ostrea permollis*. L'huître ne peut vivre que dans les replis de l'éponge en revanche, l'éponge peut vivre seule. L'huître profite de l'habitat offert par l'éponge et se trouve à l'abri des prédateurs, notamment des murex. En revanche, du côté de l'éponge, rien n'indique qu'elle soit affectée par la présence de l'huître ou qu'elle en tire un quelconque bénéfice (Forbes 1966). Cette relation est considérée comme commensale, mais ce classement résulte plus de la difficulté d'apprécier les coûts et bénéfices pour l'hôte, que d'une réelle neutralité de la relation pour l'éponge (Combes 2001). Deuxièmement, le rapport bénéfice/coût n'est pas forcément stable au cours du temps. Prenons l'exemple des larves de guêpe, *Leptopilina boulardi*, qui parasitent les larves de mouche, *Drosophila melanogaster*. Il a été démontré que lorsque les ressources se font rares, les larves infectées par le parasite sont plus compétitives que celles dites « saines ». Il faut voir ici que le parasite influence positivement son hôte et optimise ainsi ses chances de transmission vers les générations futures (Combes 1997). Cet exemple illustre comment un parasite, habituellement néfaste, est devenu l'allié de son hôte dans des conditions particulières.

1.2 Apicomplexa ou Sporozoaires

Sur la base d'observations morphologiques aux microscopes photonique et électronique, les organismes associés à la glande digestive de *S. gigas* ont été identifiés comme appartenant au groupe des Apicomplexa par les études réalisées en amont de ce travail de thèse (Aldana Aranda *et al.* 2007 ; Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007a; Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007b; Gros *et al.* 2009). Le paragraphe qui suit propose un rappel taxinomique et donne les raisons pour lesquelles, nous avons choisi d'utiliser le terme Sporozoaire (embranchement Sporozoa) plutôt que Apicomplexa pour qualifier les symbiotes des Strombidae.

Les récentes classifications proposent que le domaine des Eucaryotes soit divisé en six règnes: **les Amoebozoaires, les Chromalvéolés, les Excavobiontes, la Lignée verte, les Opistocontes et les Rhizariens**. Parmi les Chromalvéolés, la division des Alvéobiontes rassemble les Ciliés, les Dinophytes et les Apicomplexés (Adl *et al.* 2005 ; Lecointre et Le Guyader 2001). Pour comprendre l'origine du débat terminologique entre « Sporozoaire » et « Apicomplexa » il faut revenir dans les années 70. A cette époque, un nouveau genre de parasites protistes, *Perkinsus*, fut découvert. Il différait alors suffisamment des autres genres de l'embranchement Sporozoa pour qu'un groupe nouveau soit créé (Levine 1978). Le groupe des Sporozoaires devint alors une classe, Sporozoea, au même niveau que la classe nouvellement créée des Perkinsea. Ces deux taxons furent alors regroupés dans l'embranchement des **Apicomplexa**. Des analyses morphologiques et phylogénétiques plus récentes, montrent que le genre *Perkinsus* n'appartient finalement pas aux Apicomplexa mais aux Dinoflagellés (Siddall *et al.* 1997). De ce fait, il ne reste plus que la classe Sporozoea dans l'embranchement des Apicomplexa. Ces deux taxons s'avérant être équivalents et donc redondants, le terme Apicomplexa n'a plus d'intérêt et l'embranchement devrait retrouver son nom initial : **Sporozoa** (Cox 2002). Toutefois, les termes « Apicomplexa » ou « organismes apicomplexés » restent utilisés par de nombreux auteurs. Le problème tient maintenant au fait que, pour certains auteurs, le groupe Apicomplexa contient celui des Sporozoa (Lecointre et Le Guyader 2001) alors que pour d'autres, les deux termes sont des synonymes (Mehlhorn 2008 ; Morrison 2009). L'adjectif (sans majuscule) « apicomplexé » conserve un intérêt, puisqu'il exprime une des caractéristiques propres des Sporozoaires : la présence d'un complexe apical d'organites spécialisés à une extrémité de la cellule.

L'identification des symbiotes de *S. gigas* proposée par les premiers descripteurs de cette association, se base sur des observations en microscopies photonique et électroniques. La diversité

des stades rencontrés et, parmi eux, la présence de stades sporulants ou d'un complexe apical sont les éléments principaux avancés pour appuyer l'identification dans le groupe des Sporozoaires. En revanche, à l'heure actuelle, aucune analyse phylogénétique n'est venue confirmer ou infirmer cette position taxinomique.

Dans le cadre de cette thèse, nous sommes partis du postulat, proposé dans la bibliographie, que les symbiotes impliqués dans cette relation sont des protistes appartenant à l'embranchement Sporozoa. Les Sporozoaires forment un large groupe de protistes qui comprend 4000 à 7000 espèces (Cox 1994 ; Perkins 1991) (Fig. 8). Ils sont décrits comme des parasites intracellulaires obligatoires, la plupart ayant un effet pathogène avéré notamment chez l'Homme et ses animaux domestiques. Ces derniers sont d'ailleurs tous connus pour être l'hôte d'au moins un parasite Sporozoaire (Perkins 1991). Tous les Sporozoaires ont en commun la présence d'un complexe apical d'organites spécialisés dans l'échange avec la cellule hôte. Ce complexe est présent chez tous les Sporozoaires à

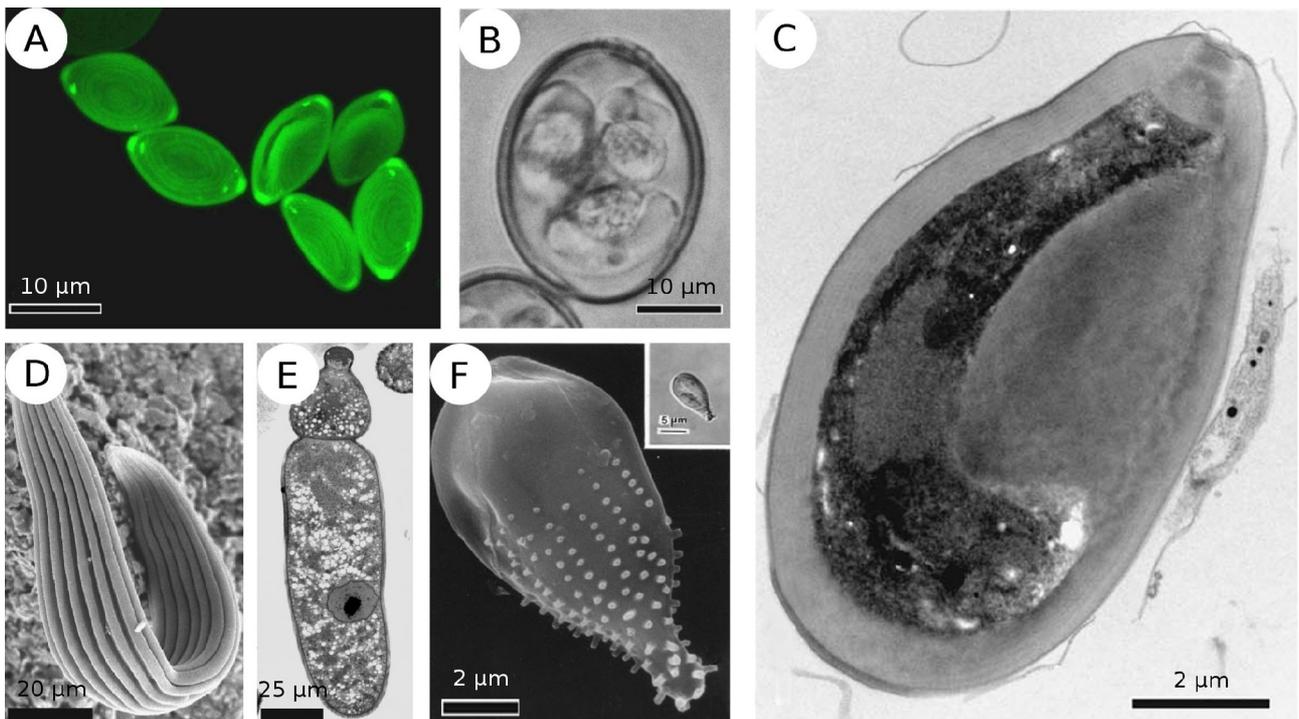


Figure 8 : Aperçu de la diversité de forme et de taille chez les Sporozoaires. **A**, microscopie confocale des oocystes de *Mattesia dispota* (Neogregarinorida) parasite du Lépidoptère *Ephestia kuchniella* (Valigurová et Koudela 2006). **B**, micrographie d'un oocyste de *Emeria nieschulzi* (Coccidia) parasite du rat *Rattus norvegicus* (Duszynski et Gardner 1991). **C**, observation au M.E.T. d'un oocyste de *M. dispota* (Valigurová et Koudela 2006). **D**, trophozoïte de *Selenidium orientale* (Gregarinimorpha), parasite du ver siponcle *Themiste pyroides*, observé au M.E.B. (Simdyanov et Kuvardina 2007). **E**, coupe transversale, vue au M.E.T., d'un trophozoïte de *Leidyana canadensis* (Eugregarinida) parasite de la larve de *Fiscellaria fiscellaria* (Lépidoptère) (Lucarotti 2000). **F**, observation au M.E.B. d'un sporocyste de *Calyptospora serrasalami* (Coccidia) qui parasite un Téléostéen du genre *Serrasalamus* (Casal et al. 2007).

au moins une des phases du cycle de développement.

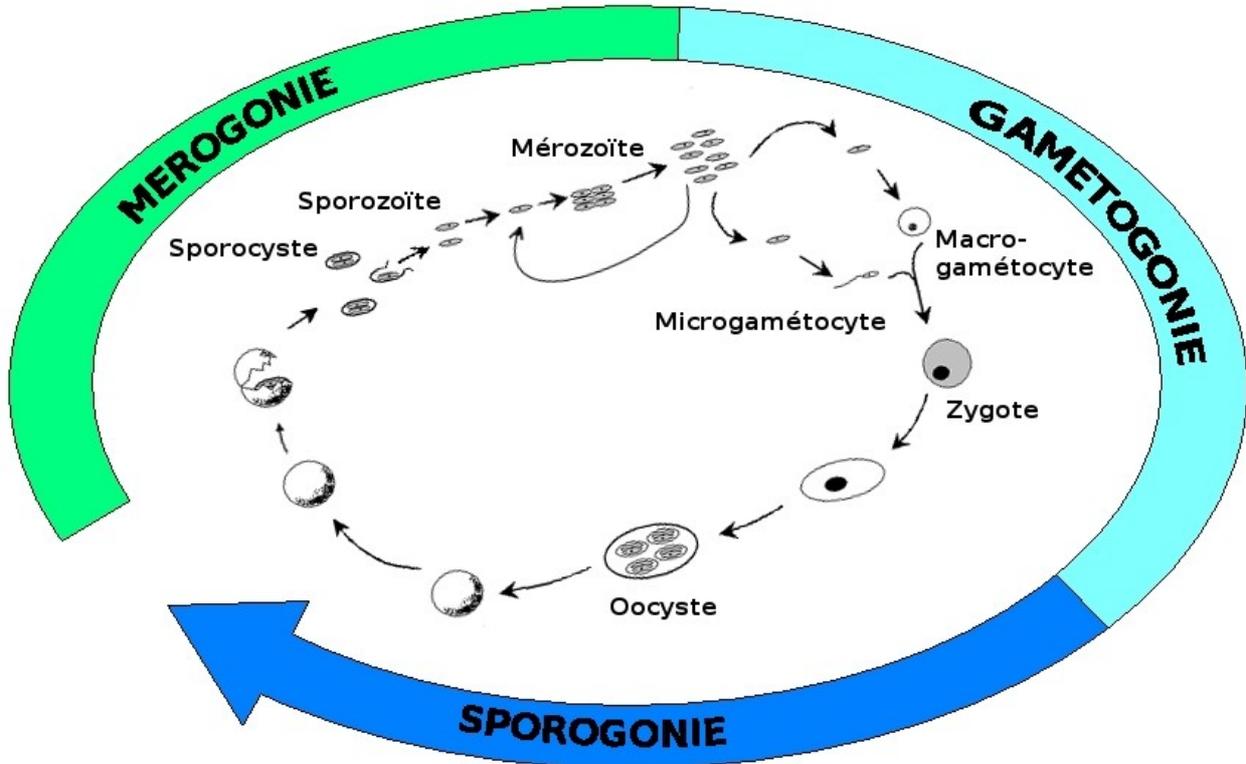


Figure 9 : Schéma général du cycle vital des Sporozoaires composé de trois phases : deux phases de reproduction asexuée, la **MÉROGONIE** et la **SPOROGENIE** et une phase de reproduction sexuée, la **GAMÉTOGONIE**. (ce travail).

Les Sporozoaires sont des parasites, ils ont donc un cycle de vie adapté à la contamination de nouveaux hôtes et à la dispersion. Les cycles vitaux des Sporozoaires sont complexes et très variables suivant les taxons. Le schéma général du cycle reproductif se compose de trois phases (Fig. 9). La première est la phase de reproduction asexuée, il s'agit de la **mérogonie**. La cellule mère, le merozoïte, se divise, chaque subdivision contenant un noyau. Les individus ainsi formés sont nommés : mérozoïtes. Après une ou plusieurs phases de reproduction asexuée qui permet un accroissement rapide du nombre d'individus et, qui est donc propice à l'infection de l'hôte, le parasite rentre dans une phase de reproduction sexuée que l'on nomme **gamétoonie**. Les gamètes, qui sont des unités résultant de la reproduction asexuée, se différencient en macrogamétocytes pour former des gamètes femelles, ou en microgamétocytes pour former des gamètes mâles. Les gamètes ainsi formés se rencontrent, la fécondation a lieu et le zygote obtenu

est nommé : oocyste. Ce dernier évolue en spore et, à l'intérieur, vont se former des sporocystes qui renferment des sporozoïtes. Il s'agit de la troisième phase : **la sporogonie** (Perkins 1991). Les spores peuvent être expulsées de l'hôte, par les fèces, et être à l'origine de nouvelles contaminations.

1.3 Le stade oocyste des Sporozoaires.

L'une des caractéristiques des Sporozoaires est de présenter un stade nommé « oocyste » qui est issu de la fusion des gamètes lors de la fécondation. Ce stade particulier correspond à l'unité qui, dans la majorité des cas, est expulsé hors de l'organisme hôte, la plupart du temps via les fèces (Perkins 1991). Il s'agit d'un stade dédié à la dispersion des individus parasites dans l'environnement, dans le but de contaminer de nouveaux individus hôtes. Dans l'oocyste, se développent des sporocystes qui contiennent eux-mêmes les sporozoïtes (Fig. 9). Ces derniers renferment l'information génétique et sont des unités infectantes qui sont donc protégées, à la fois par la paroi du sporocyste et par celle de l'oocyste (Perkins 1991). Cette protection est vitale pour les sporozoïtes. Parmi les Sporozoaires, le groupe *Coccidia* est particulièrement réputé pour présenter un stade oocyste extrêmement résistant. Cette résistance a fait l'objet d'une revue par Belli *et al.* en 2006. La paroi de l'oocyste reste assez mal connue. Des études ultrastructurales rapportent qu'elle est composée de trois couches distinctes (Belli *et al.* 2006 ; Stotish *et al.* 1978). Chez certains *Coccidia*, il a été rapporté la présence de membranes protectrices multiples qui entourent l'oocyste (Beli *et al.* 2006). Il a été montré que les sucs gastriques n'altèrent pas les oocystes. Ceux-ci sont également imperméables à la plupart des désinfectants et sont très résistants aux attaques mécaniques. Il a également été montré qu'ils restent viables et infectants après des traitements à l'hypochlorite de sodium, au bichromate de potassium ou encore à l'acide sulfurique (Belli *et al.* 2006). Pour ces raisons, il est souvent très compliqué d'atteindre le contenu génomique des oocystes de Sporozoaires. Parmi les techniques proposées dans la bibliographie, les chocs thermiques par congélation-décongélation répétées sont préconisés pour altérer la paroi des oocystes et rendre accessible l'A.D.N. aux protocoles d'extraction (Nichols *et al.* 2006). Zhao *et al.* ont également publié une méthode pour l'extraction d'A.D.N. des espèces du genre *Emeria*. Elle consiste en une incubation en présence d'hypochlorite de sodium afin de rompre la paroi externe de l'oocyste, puis une deuxième incubation en présence d'enzymes protéolytiques permet de rompre la paroi interne et rend accessible le contenu génomique (Zhao *et al.* 2001). La difficulté rencontrée lors des extractions d'A.D.N. à

Chapitre III : L'association avec les Sporozoaires

partir des oocystes de Sporozoaires réside dans le fait qu'il faut trouver un traitement suffisamment efficace pour en briser la paroi, mais sans altérer les molécules d'A.D.N. que l'on souhaite extraire.

2 Résultats

2.1 Analyse de la glande digestive des strombes caribéens et du Pacifique

2.1.1 Structure de la glande digestive

La glande digestive est un organe localisé en position terminale de l'animal. Une fois sortie de la coquille et posée à plat, elle est en forme de virgule (Pl. 2A). Les glandes digestives des cinq espèces caribéennes et des deux espèces du Pacifique étudiées (Pl. 1A-G), présentent toutes une organisation similaire. Il s'agit d'un organe composé de tubules et de canaux structurés et soutenus par du tissu conjonctif. Les tubules digestifs sont connectés à un premier type de canal de taille moyenne. Ces canaux se rejoignent ensuite pour former le second type de canal, plus grand. Ce dernier est connecté à l'estomac et sera dénommé canal primaire et les plus petits, connectés directement aux tubules, seront dénommés canaux secondaires (Pl. 2B-D). Les deux types de canaux diffèrent par leur taille et par les cellules épithéliales qui les constituent. Dans la lumière des canaux, on trouve deux types de contenu, soit un contenu relativement homogène de particules très fines, soit un contenu plus grossier comprenant de grosses particules et des débris cellulaires. Ces deux types de contenu sont souvent présents en même temps dans le même canal, dans ce cas, la lumière est divisée en deux parties (Pl. 2D).

Les tubules digestifs sont, soit de forme simple, ronde, ovale ou allongée, soit de forme plus complexe, en «L » ou en « T » (Pl. 2C, F ; 3A). L'épithélium des tubules se structure sur une lame basale bien visible en microscopie électronique à transmission (M.E.T.) (Pl. 3B, C). Il est constitué de trois types cellulaires : les cellules digestives, les cellules vacuolaires et les cellules cryptiques (Pl. 2E-G ; 3A-D). Ces trois types cellulaires sont présents chez les cinq espèces caribéennes que nous avons analysées, de plus, leurs proportions semblent être sensiblement les mêmes quelle que

soit l'espèce considérée (Pl. 2-8). La structure classique d'une coupe transversale de tubule se présente sous la forme de deux groupes de cellules digestives se faisant face dans un tubule ovale, l'espace restant est occupé par les deux autres types cellulaires (Pl. 2E, F ; 3A).

Les cellules digestives sont majoritaires, elles sont de forme allongée, avec un noyau proche du pôle basal. Elles sont caractérisées par des grains colorés par le bleu alcian localisés au milieu de la cellule (Pl. 2E-H ; 3A, B). Le diamètre de ces grains est en moyenne de 7 μm pour les cinq espèces. Les cellules vacuolaires sont moins nombreuses. Le cytoplasme de ces cellules vacuolaires est presque totalement occupé par des vésicules qui apparaissent vides après les traitements aux solvants réalisés lors de la préparation des échantillons (Pl. 2F, G ; 3A, C). Ces vésicules ou vacuoles sont de forme sphérique avec un diamètre d'environ 4 μm chez *S. costatus*, *S. galeatus*, *S. gallus*, *S. gigas* et *S. raninus*, et 2,5 μm chez *S. pugilis* et *L. lambis*. Quelle que soit l'espèce considérée, les cellules vacuolaires sont les cellules dans lesquelles on rencontre les symbiotes Sporozoaires (Pl. 2E-G ; 3E-G).

Enfin, le dernier type cellulaire est la cellule cryptique (Pl. 2E-G ; 3A, C). Dans un tubule type, les cellules cryptiques sont les moins nombreuses, et occupent le moins de volume. Cependant dans certains cas, nous avons observé des tubules digestifs où les cellules cryptiques sont prédominantes par rapport aux cellules vacuolaires. Ce sont des cellules de forme triangulaire avec un pôle apical très fin qui est en contact avec la lumière du tubule. Ces cellules sont intercalées entre les cellules vacuolaires, on ne les observe jamais entre les cellules digestives. De plus, les cellules cryptiques ont la particularité de contenir un grand nombre de petites inclusions sphériques de 0,5 à 3 μm , identifiées comme étant des sphérocristaux (Pl. 3C). L'observation des sphérocristaux en coupe, au microscope électronique à transmission, montre qu'ils sont formés par accumulation de couches concentriques alternativement claires ou denses aux électrons (Pl. 3D). Enfin, ce type cellulaire est également caractérisé par la présence de réticulum endoplasmique granuleux en grande quantité.

2.1.2 Détection des Sporozoaires chez les Strombidae

Chez les cinq espèces caribéennes, *S. costatus*, *S. gallus*, *S. gigas*, *S. pugilis* et *S. raninus*, comme chez les deux espèces du Pacifique, *S. galeatus* et *L. lambis*, nous avons détecté la présence de symbiotes similaires à ceux initialement décrits chez *S. gigas* (Pl. 2-8). Des échantillons de *S. gigas* et *S. pugilis* ont été collectés régulièrement tout au long des trois années de thèse, et quel que soit la profondeur, la localité, le mois de collecte ou la phase du cycle de reproduction, les Sporozoaires

étaient toujours présents dans la glande digestive des individus analysés. Les symbiotes ont également été détectés sur des coupes semi-fines d'un échantillon de glande digestive de *S. pugilis*, vieux de plus de 30 ans. Ces symbiotes ont été détectés en microscopie photonique comme en microscopie électronique (à balayage et en transmission). Ils ont presque toujours été détectés dans le même type cellulaire : les cellules vacuolaires (Pl. 2F, G ; Pl. 3A, E). Dans quelques rares cas, ils ont été observés dans les cellules digestives ou dans les cellules cryptiques. Les symbiotes ne sont pas libres dans le cytoplasme, ils sont contenus dans une vacuole délimitée par une membrane (Pl. 3E-G). Dans la grande majorité des cas, nous n'avons pas observé de contact entre les symbiotes et le cytoplasme, cependant sur quelques coupes histologiques et quelques observations au M.E.T., nous avons pu observer un tel contact avec le cytoplasme de la cellule hôte (Pl. 3F). En plus de la présence systématique des Sporozoaires dans les cellules vacuolaires des tubules digestifs des Strombidae, nous avons également observé la présence de ces symbiotes dans la lumière des tubules (Pl. 8A ; 30A), ainsi que dans les canaux collecteurs de la glande digestive (Pl. 19A ; 30A). Dans un unique cas, chez *S. gigas*, nous avons aussi observé un Sporozoaire isolé à l'extérieur d'un tubule digestif, dans le tissu conjonctif.

D'une part, nous apportons l'information que ces symbiotes sont présents chez toutes les espèces de la famille des Strombidae dans lesquelles nous avons échantillonné et d'autre part, ces symbiotes ont été détectés chez tous les individus de ces sept espèces de Strombidae : *L. lambis* (n=2), *S. costatus* (n > 25), *S. galeatus* (n=2), *S. gallus* (n=1), *S. gigas* (n > 25), *S. pugilis* (n > 40), *S. raninus* (n=1). Le nombre d'individus donné dans la phrase précédente ne tient compte que des observations réalisées directement par nos soins en Guadeloupe. Si l'on tient compte également des observations réalisées par le CINVESTAV à Mérida (Mexique), ce nombre est porté à plus de 70 pour *S. costatus*, plus de 2600 pour *S. gigas*, et plus de 720 pour *S. pugilis*, soit au total, toutes espèces confondues, près de 3400 Strombidae analysés avec une présence systématique des Sporozoaires dans les cellules vacuolaires de la glande digestive de ceux-ci.

D'autre part, à l'occasion d'une sortie sur le terrain, nous avons collecté un Gastéropode carnivore de la famille des Muricidae. Ce dernier a été analysé et nous n'avons pas détecté de Sporozoaires dans sa glande digestive. Des observations ont été réalisées par le CINVESTAV à Mérida (Mexique), sur 720 exemplaires de trois autres Gastéropodes carnivores : *Busycon contrarium*, *Fasciolaria tulipa* et *Turminella angulata*. Ces trois espèces partagent avec *S. costatus* et *S. pugilis* le même habitat et pourtant, elles ne présentent pas d'association avec les Sporozoaires.

2.1.3 Structure des symbiotes

Les symbiotes détectés chez les différentes espèces de Strombidae sont très similaires, cependant, il n'est pas possible de dire s'ils appartiennent à la même espèce ou non en se basant simplement sur l'observation structurale et ultrastructurale de ceux-ci. Nous présenterons dans ce paragraphe les différents types de structures que nous avons rencontrés dans les glandes digestives des différents strombes. Suivant le stade de développement et indépendamment de l'espèce hôte, les symbiotes mesurent de 10 à 60 μm de long pour 5 à 40 μm de large.

Le stade le plus fréquemment rencontré est un stade possédant une coque épaisse qui apparaît dense aux électrons en microscopie électronique à transmission (Pl. 3E ; 4D). Cette coque est particulièrement rigide puisqu'elle casse souvent lors de la coupe à l'ultramicrotome (Pl. 5A ; 7B). Dans certains cas le passage du couteau s'il ne détruit pas complètement le stade à coque, arrache le contenu du symbiote (Pl. 7D). Ce stade est le plus souvent de forme ronde ou ovale et contient souvent des inclusions rondes de taille variable (Pl. 3E ; 4D). Malheureusement, le contenu de ce stade n'est pas souvent observable, en effet, les fixateurs ne semblent pas pénétrer à l'intérieur de la coque (Pl. 4D).

Le deuxième type de structure que l'on rencontre le plus fréquemment est un stade qui présente des bourgeonnements internes (Pl. 5D ; 7E ; 8B, C, E). Nous avons observé une grande variété de stades bourgeonnants. Dans certains cas, les symbiotes contiennent plusieurs sous-structures qui elles-mêmes contiennent des sous-unités (Pl. 9B-D, F-H, J-L). Nous n'avons pas vu se dégager un nombre de bourgeonnement précis qui se répèterait systématiquement. Ces derniers ne semblent pas réguliers ni en termes de nombre ni en termes de taille.

Un autre stade identifié correspond au trophozoïte de Gros *et al.* (2009) (Pl. 3F, G ; 5D ; 7F ; 9A, E, I). Il s'agit d'un stade en forme de goutte, qui présente deux parties. La base de la « goutte » est formée par une structure ronde constituée de couches concentriques successives denses aux électrons. À l'intérieur de cette structure se rencontrent parfois des sphères plus petites qui présentent des petits bourgeonnements internes (Pl. 3F, G). Ces petites sphères s'observent également en dehors des trophozoïtes, libres dans le cytoplasme (Pl. 17D, F).

Nous avons également observé des symbiotes qui ne possèdent, ni coque, ni bourgeonnement interne. Ces stades sont facilement coupés par l'ultramicrotome Ils sont, malgré tout, mal fixés et ne permettent pas l'observation de structures cytoplasmiques (Pl. 4D).

Enfin, sur les coupes histologiques, nous avons observé des stades sphériques beaucoup plus petits, présents localement sous forme de petits agrégats à proximité des stades plus gros (Pl. 2H). Ces

stades ne s'observent pas systématiquement. Chez certains hôtes, ils sont présents en très grande quantité dans la quasi-totalité des tubules de la glande, chez d'autres, ils semblent complètement absents.

Les observations de fractures de glandes digestives au microscope électronique à balayage (M.E.B.) ont permis d'observer les symbiotes dans leur environnement cellulaire (Pl. 4C ; 5C ; 6E ; 7C ; 8F). Sur ces observations, il est possible d'identifier les trois types cellulaires décrits plus haut. Au M.E.B., les Sporozoaires apparaissent sous la forme de sphères, de bouteilles ou de structures bourgeonnantes (Pl. 9E-H). Ces différents morphotypes correspondent aux différents stades identifiés au M.E.T. Les observations au M.E.B. nous renseignent également sur la texture de la coque externe des symbiotes, il s'agit d'une surface lisse, sans ouverture apparente. Sur certains clichés, la texture est plutôt fripée (Pl. 5C), mais il s'agit probablement d'un artéfact dû au traitement de l'échantillon lors de sa préparation pour le M.E.B. Enfin, les observations au M.E.B. de Sporozoaires purifiés à partir d'un broyat de glande digestive, permettent d'apprécier la grande diversité de forme de ces symbiotes (Pl. 9E-H).

2.2 Analyse de la glande digestive des Gastéropodes d'eau douce

2.2.1 Description de la glande digestive de *Marisa cornuarietis* et de *Pomacea glauca*

La glande digestive de ces deux espèces d'eau douce, présente une organisation générale similaire à celle des Strombidae. Il s'agit d'un organe majoritairement composé de tubules digestifs qui s'ouvrent sur des canaux qui communiquent avec l'estomac, l'ensemble étant structuré par du tissu conjonctif. En revanche, la nature des tubules digestifs n'est pas la même que celle décrite chez les gastéropodes marins. Les tubules sont rarement de forme simple, ils sont le plus souvent plurilobés (3 à 6 lobes) (Pl. 10A ; 11A). L'épithélium des tubules semble être composé d'au moins deux types cellulaires. Les cellules les plus abondantes sont de type « cellules digestives », elles sont longues et possèdent un gros grain au pôle basal dans le cas de *M. cornuarietis* (Pl. 10B) et plusieurs grosses vacuoles contenant du matériel hétérogène dans le cas de *P. glauca* (Pl. 11B, C). La glande digestive de ces espèces d'eau douce n'a pas fait l'objet d'une étude ultrastructurale aussi poussée que celle des

Strombidae, mais les colorations histologiques et les observations au M.E.T. révèlent la présence d'un deuxième type cellulaire qui correspond aux cellules pyramidales décrites par Koch *et al.* (2006) (Pl. 10C ; 11C-E). Ce dernier renferme des symbiotes similaires à ceux décrits chez les strombes. Tous les individus échantillonnés de *M. cornuarietis* ($n > 13$) et de *P. glauca* ($n > 15$) présentent des symbiotes similaires à ceux des Strombidae. Chez *M. cornuarietis*, un troisième type cellulaire présente des inclusions minérales identifiées comme étant des sphérocristaux. Nous ne pouvons affirmer que ce troisième type cellulaire n'existe pas chez *P. glauca*.

2.2.2 Description des symbiotes

En microscopie photonique, les symbiotes associés aux espèces d'eau douce, sont de couleur brune à marron. Ils font de l'ordre de 26 μm de long pour 11 μm de large chez *M. cornuarietis* et de l'ordre de 23 μm de long pour 18 μm de large chez *P. glauca*. Ils sont présents en très grande quantité dans tous les tubules digestifs du champ d'observation (Pl. 10, 11). Comme pour les symbiotes des espèces marines, le type de structure le plus nombreux est celui de forme ronde à ovale, et possédant une coque (Pl. 10B, C ; 11C-E). Nous avons rencontré les mêmes problèmes de fixation qu'avec les Sporozoaires des Strombidae. Là encore, probablement, à cause de l'imperméabilité de la coque de ces structures, les fixateurs ne pénètrent pas à l'intérieur des symbiotes et, à l'observation, leur contenu est mal conservé, voire détruit (Pl. 10C, D ; 11D, E). Le stade en forme de bouteille décrit chez les strombes se retrouve également chez les deux espèces d'eau douce. Il est assez abondant, et a la particularité de présenter de petites inclusions rondes au pôle apical (Pl. 10C ; 11D-F). Ces inclusions, visibles au M.E.T., se retrouvent dans le symbiote, dans la vacuole contenant le symbiote et également dans le cytoplasme de la cellule hôte (Pl. 10D ; 11F). Enfin, comme chez les Strombidae, nous avons observé un stade bourgeonnant.

2.3 Caractérisation des Sporozoaires

2.3.1 Mise au point d'un protocole d'isolation des symbiotes

Le protocole d'isolation des symbiotes sur gradient de percol-imidazole nous a effectivement permis d'obtenir une fraction relativement purifiée de symbiotes. Cette première technique est suffisante

Chapitre III : L'association avec les Sporozoaires

pour réaliser des observations aux microscopes photonique et électronique. En revanche, les contrôles réalisés grâce au DAPI nous montrent que la solution de symbiotes obtenue contient également un nombre non négligeable de noyaux libres, issus du broyat des cellules de la glande.

Le protocole adapté de purification des symbiotes en centrifugation différentielle a, quant à lui, permis d'obtenir une solution de symbiotes purs. Les contrôles réalisés au DAPI n'ont révélé la présence d'aucun noyau dans la solution. Lors des centrifugations différentielles, différentes fractions sont isolées. Nous présentons dans le tableau 4 les contenus des surnageants à l'issue des centrifugations.

Tableau 4: Contenus des surnageants à l'issue des centrifugations lors du protocole de purification des symbiotes.

	Gros débris	Petites particules	Grains orangés	Noyaux de l'hôte	Petites sphères bleues	Symbiotes
<i>Après saccharose 30 %</i>	+++	+++	+	++++	+++++	-
<i>Après saccharose 60 %</i>	+	-	++++	+++	++++	-
<i>Après saccharose 80 % I</i>	-	-	++++	++	++	++
<i>Après saccharose 80 % II</i>	-	-	++++	+	++	+

2.3.2 Marquage de l'A.D.N. au DAPI et au Sybr Green®

Afin de mettre en évidence les noyaux des symbiotes, nous avons réalisé une série de marquages au DAPI et au Sybr Green®. À partir des solutions purifiées en symbiotes, il n'a pas été possible de révéler la présence de noyaux dans la fraction « symbiotes ». Les intercalants nucléotidiques utilisés ne pénètrent visiblement pas la coque des symbiotes. Dans une seconde approche, nous avons voulu révéler l'A.D.N. sur coupes semi-fines de tissus fixés et inclus en résine LR-White. Les planches 12 et 13 présentent les résultats des marquages de l'A.D.N. sur coupes semi-fines de la glande digestive de *S. gigas* et de *P. glauca*. Les résultats sont les mêmes avec les deux intercalants. Nous sommes en mesure de révéler les noyaux des cellules de la glande, en revanche, le matériel nucléaire des symbiotes n'est pas fluorescent (Pl. 12 ; 13). Bien que chez certains stades des symbiotes de *S. gigas*, nous ayons observé un faible marquage sous forme de plusieurs petits points dans un symbiote (Pl. 12D), nous n'avons jamais vu de noyaux Eucaryotes marqués dans les différents stades de symbiotes. Pour *P. glauca* comme pour *S. gigas*, sur les coupes marquées au DAPI ou au Sybr Green®, les symbiotes apparaissent sous forme de taches noires ou très peu teintées. Les noyaux des cellules épithéliales des tubules sont, en revanche bien marqués. Chez *P. glauca*, les cellules digestives présentent un noyau basal, à proximité des inclusions caractérisant ces cellules. Ces inclusions ne sont pas marquées par les intercalants nucléotidiques (Pl. 13C).

2.3.3 Mise en place d'un protocole d'extraction adapté à ces symbiotes

Les digestions enzymatiques que nous avons testées n'ont pas montré de résultats encourageants quant à l'attaque des coques. Quelle que soit l'enzyme testée (protéinase K, pepsine, pronase ou trypsine), quelle que soit la concentration ou encore le temps d'incubation, les contrôles au microscope optique nous ont clairement montré que cette approche est tout à fait inefficace pour attaquer les coques des symbiotes. Cette coque semble très résistante et ne laisse pas pénétrer les marqueurs nucléotidiques tels que le DAPI ou le Sybr Green®.

Le broyage mécanique des coques au mortier dans de l'azote liquide s'est révélé plus encourageant. En revanche nous n'avons pas été en mesure de réaliser une extraction d'A.D.N. exploitable à l'issue de ce type de broyage. Les contrôles au microscope optique nous ont permis de constater que seul un très faible pourcentage des symbiotes semble « cassé » par l'action du mortier. La majorité reste

intacte et l'A.D.N. des symbiotes reste donc inaccessible.

L'action des ultrasons a également été testée, mais les ultrasons seuls, ou les ultrasons combinés à un broyage mécanique au mortier dans de l'azote liquide n'apportent pas plus de résultats. De la même façon, les chocs thermiques réalisés entre des bains d'azote liquide et d'eau en ébullition (amplitude thermique de l'ordre de 300°C) restent sans effet sur les coques des symbiotes.

Le protocole de Zhao *et al.*, adapté à nos symbiotes, ne nous a pas permis d'obtenir d'A.D.N. En revanche, la première étape d'incubation en présence d'hypochlorite de sodium semble fortement fragiliser les coques des symbiotes. De plus, nous avons constaté que la congélation/décongélation, à l'issue de cette incubation, provoque la rupture systématique des coques. Il s'agit à ce jour de la seule technique parmi celles que nous avons testée qui provoque un résultat aussi encourageant.

Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec Laurent Toffin du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (U.M.R. 6197) à Brest, le kit d'extraction Fast D.N.A.[®] Spin kit for soil, initialement prévu pour l'extraction d'A.D.N. d'échantillons résistants du sol a été testé sur la fraction « symbiote » isolée à partir de la glande digestive de *S. gigas*. L'étape de broyage mécanique par l'action des billes de verre semble avoir endommagé efficacement les coques des symbiotes. À l'issue de cette extraction et après vérification par électrophorèse, nous avons obtenu une faible quantité d'A.D.N. de l'ordre de 30 ng.µl⁻¹.

2.3.4 Amplification du gène de l'A.R.N.r. 18S

L'A.D.N. obtenu à partir de la fraction « symbiote » de *S. gigas* grâce au kit Fast D.N.A.[®] a été utilisé pour réaliser une amplification par P.C.R. du gène de l'A.R.N.r. 18S avec des amorces classiques. Le contrôle par électrophorèse après l'amplification a confirmé que le gène a bien été amplifié. Le produit P.C.R. a été séquencé directement et l'analyse de la séquence obtenue a malheureusement révélé qu'il s'agissait de l'A.D.N. de l'hôte *S. gigas* et non du symbiote.

Dans le cadre d'une seconde approche, une extraction d'A.D.N. total a été réalisée à partir d'un fragment de glande digestive de *S. gigas*. Cette extraction, contrôlée par électrophorèse, a été réalisée avec succès. À partir de cet A.D.N. total (issu de *S. gigas* et des symbiotes) des amplifications par P.C.R. avec des amorces spécifiques du groupe Coccidia (Sporozoa) ont été réalisées. À l'issue de ces tentatives d'amplification, nous n'avons obtenu aucune bande d'A.D.N. lors des contrôles sur gel d'agarose en utilisant cette technique.

2.3.5 Analyse élémentaire de la coque des symbiotes

À partir des fractions purifiées, nous avons réalisé une analyse en dispersion d'énergie des rayons X (E.D.X.) sur la coque des symbiotes. En plus des éléments retrouvés classiquement dans les tissus organiques, cette analyse a permis de mettre en évidence la présence d'autres éléments. Ceux-ci sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous et les spectres obtenus sont présentés dans la planche 14.

Tableau 5: Éléments détectés par analyse en dispersion d'énergie des rayons X (analyse E.D.X.) dans la coque des symbiotes de trois espèces de la famille des Strombidae: *S. costatus*, *S. gallus* et *S. raninus*.

	Al	Ca	Cu	Fe	Mg	P	S	Zn
<i>Strombus costatus</i>	X	X		X			X	
<i>Strombus gallus</i>	X	X		X			X	X
<i>Strombus gigas</i>	X	X		X	X		X	X
<i>Strombus raninus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X

2.4 Mode de transmission des Sporozoaires

2.4.1 Analyse des fèces des Strombidae

Nous avons mis en évidence la présence de Sporozoaires identiques à ceux de la glande digestive, dans les fèces de *S. costatus*, *S. gallus*, *S. gigas* (Pl. 15), *S. pugilis* et *S. raninus*. Malheureusement, les fèces de *L. lambis* et *S. galeatus* n'ont pas pu être analysées. Les fèces des Strombidae sont composées d'un chapelet de petits amas compactés pour former une masse couleur sable. En décomposant ces amas, on observe au microscope optique qu'ils sont composés de débris de macroalgues, de phytoplancton (diatomées entre autres) et de petites sphères jaunes à brunes de 7 µm de diamètre en moyenne (Pl. 15A, B). Ces sphères correspondent, de par leur taille, leur aspect et leur couleur, aux grains des cellules digestives positifs au bleu alcian (Pl. 15B). Ils constituent une part importante des fèces des Strombidae. Enfin, les fèces contiennent également les symbiotes décrits dans la glande digestive (Pl. 15C, E). Après quelques jours de jeûne, les fèces ne sont plus constituées que des grains orange-jaune et des Sporozoaires. Les fèces n'ont pas été

incluses en résine, ni en paraffine, donc nous n'avons pas réalisé d'observation de ces symbiotes en coupe, néanmoins, l'observation directe au microscope photonique nous apprend que les trois morphotypes observés dans la glande digestive sont présents dans les fèces (Pl. 15C-E).

2.4.2 Élevage de larves

Nous avons obtenu des larves véligères de *S. costatus*, *S. gigas* et de *S. pugilis*. Ces larves sont issues, soit de cordons de ponte prélevés dans le milieu naturel (*S. costatus*, *S. gigas* et *S. pugilis*), soit de cordons de ponte obtenus spontanément au laboratoire (*S. costatus* et *S. pugilis*). Les cordons de ponte issus du milieu naturel se présentent sous la forme d'une « pelote » en forme de croissant d'environ 5 cm de long, 2,5 cm de large et 2 cm de haut (mesures pour *S. pugilis*) (Pl. 16A). Cette pelote est composée d'un unique cordon qui s'enroule en solénoïde plus ou moins régulier (Pl. 16B). Ce cordon est recouvert d'une fine couche de sable et contient les embryons en cours de développement (Pl. 16A). En revanche, les cordons de ponte obtenus au laboratoire se présentent, soit sous la forme d'une pelote désorganisée, soit sous la forme de longs filaments, tantôt emmêlés, tantôt linéaires. Les bacs d'élevage ne contenant pas de sable, les cordons de ponte obtenus au laboratoire ne sont pas recouverts d'une pellicule de sable. Ils sont translucides et laissent apparaître des centaines de milliers d'embryons par transparence (Pl. 16B, C).

Le 16 avril 2009 à 8h30, nous avons observé un individu de *S. costatus* en train de pondre. Nous avons donc prélevé une partie du cordon de ponte pour suivre le développement des embryons en temps réel et ce, depuis le stade le plus précoce. La première observation à T_{0h} révèle que les œufs, contenus dans une gangue d'un diamètre d'environ 230 nm, sont tous au stade 1 cellule (Pl. 16D). À T_{4h30} , la majorité des œufs sont devenus des embryons au stade 2 cellules (Pl. 16E) et à T_{6h30} , les embryons sont passés au stade 4 cellules (Pl. 16F). À la fin de la journée (T_{10h}), les embryons sont tous au stade 8 cellules (Pl. 16G). Après 3 jours de développement, nous commençons à voir apparaître un mouvement dans certains embryons qui sont alors des larves trochophores (Pl. 16I) et les premières éclosions sont observées après 4 jours de développement. À la fin du 5^{ème} jour, la totalité des œufs ont éclos. Les embryons sont alors des larves véligères d'environ 300 nm.

Après environ trois ou quatre jours de développement, le vélum des jeunes larves, passe de deux à quatre lobes (Pl. 16J). Dans les conditions d'élevage des larves que nous décrivons dans la partie Matériel et Méthodes, nous n'avons pas obtenu de larves plus vieilles que 11 jours de développement. Cependant, les jeunes larves possèdent déjà une glande digestive fonctionnelle (Pl. 16K). Les observations au microscope photonique montrent que l'estomac est rempli d'algues

unicellulaires, celles-ci sont entraînées par un mouvement de rotation rapide. Une partie du contenu stomacal est envoyé dans la glande digestive et on observe un flux et reflux du bol alimentaire entre la glande digestive et l'estomac. Ce mouvement est donné par les contractions rythmées de la glande digestive.

2.4.3 Détection des symbiotes dans les embryons et les larves d'élevage

Lors des observations des coupes semi-fines d'embryons aucune structure similaire aux Sporozoaires présents chez les Strombidae adultes n'a été détectée (Pl. 16L). De la même façon, sur une jeune larve (éclosion + 1 jour de développement), nous n'avons pas détecté de Sporozoaires (Pl. 16M). En revanche, sur une larve plantigrade élevée 29 jours en eau filtrée au laboratoire sans contact avec d'éventuelles contaminations issues du milieu naturel, nous observons des structures rondes, ovales et polylobées de 11,63 μm de long pour 9,1 μm de large (Pl. 17A-C). Ces structures se rencontrent à proximité des cellules cryptiques. Il est difficile de dire si elles sont dans des cellules vacuolaires, car à ce stade de développement ce type cellulaire ne semble pas encore bien en place. En revanche, nous pouvons dire que ces structures présentent de nombreux points communs avec les Sporozoaires hébergés par la glande digestive des adultes : la masse qui compose la structure est dense aux électrons, ces structures sont de forme et de taille cohérentes avec celles des Sporozoaires détectés chez les Strombidae, on les retrouve entre les blocs de cellules digestives et enfin, on observe de petites inclusions à l'intérieur (Pl. 17).

3 Discussion

3.1 La glande digestive et ses symbiotes

3.1.1 Description de la glande digestive des Strombidae

Ce n'est que très récemment qu'a été faite la première description de protistes, apparemment du groupe des Sporozoaires, infectant en grand nombre, la glande digestive de *S. gigas* (Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007a, b). *S. gigas* faisant l'objet d'études essentiellement centrées sur la reproduction, la gestion des stocks, ou l'aquaculture (Aldana Aranda 2003 ; Aldana Aranda et Suárez 1998 ; Avila-Poveda et Baqueiro-Cárdenas 2009 ; Brito-Manzano et Aranda 2004 ; Schweizer et Posada 2006), l'analyse de la glande digestive n'avait alors reçu que peu d'attention. Dans la première description de Baqueiro Cárdenas *et al.* (2007), la glande digestive de *S. gigas* est décrite comme un assemblage de tubules et de canaux. Les tubules sont décrits comme étant composés de deux types cellulaires : les cellules sécrétrices, caractérisées par des granules positifs au bleu alcian, et les cellules cryptiques, caractérisées par un cytoplasme vacuolaire. Dans un second article, les auteurs font une description beaucoup plus détaillée du tissu, dans laquelle ils proposent, finalement, que les tubules soient composés de trois types cellulaires: les cellules digestives (anciennement identifiées comme cellules sécrétrices), les cellules vacuolaires (anciennement identifiées comme cellules cryptiques) et les cellules cryptiques nouvellement décrites (Gros *et al.* 2009). Nos observations sont en accord avec cette dernière description. Comme dans les travaux précédents, nous avons identifié les cellules vacuolaires comme étant le type cellulaire qui abrite les symbiotes (Baqueiro Cárdenas *et al.* 2007a, b ; Gros *et al.* 2009).

3.1.2 Caractérisation structurale des symbiotes des Strombidae

Les observations effectuées sur les sept espèces de Strombidae nous ont appris que les différents stades de symbiotes sont présents chez toutes les espèces. Nous avons malheureusement rencontré des problèmes de fixation qui sont probablement dus à la présence d'une coque épaisse et plus ou moins étanche qui ne laisse pas bien pénétrer les fixateurs à l'intérieur des symbiotes. Duszynski et Gardner (1991) ont montré que, chez les Coccidia, l'utilisation des fixateurs classiques en solution aqueuse peut se révéler inefficace pour conserver l'intégrité structurale des oocystes et de leurs sporocystes. Dans une revue récente sur les oocystes des Coccidia, Belli *et al.* (2006) rapportent également que la paroi de l'oocyste est imperméable aux substances hydrosolubles, ce qui inclut les fixateurs que nous avons utilisés. Les Coccidia et plus généralement les Sporozoaires, sont, en effet, connus pour avoir un stade sporulant, l'oocyste, présentant une coque épaisse et rigide (Azevedo et Cachola 1992 ; Azevedo et Padovan 2004 ; Belli *et al.* 2006 ; Perkins 1991 ; Valigurová et Koudela 2006). Certains auteurs rapportent également une paroi épaisse et résistante détectée chez les sporocystes (Gestal *et al.* 2000; Gestal et Santiago 2002 ; Zhao *et al.* 2001). Dans notre cas, une coque épaisse, dense aux électrons a été détectée chez certains stades des symbiotes présents dans la glande digestive des Strombidae. Celle-ci a visiblement empêché la fixation du contenu des stades à coques.

À notre connaissance, aucune analyse élémentaire de la paroi externe des oocystes d'Apicomplexa n'a été réalisée par analyse E.D.X. Seule une étude réalisée sur la paroi du sporocyste de deux *Aggregata* (Apicomplexa) rapporte la présence des éléments : calcium, silicium, sodium, soufre et phosphore (Gestal et Santiago 2002). Nous n'avons pas détecté de sodium, ni de silicium, en revanche, en plus des autres éléments, nous avons détecté du magnésium ainsi que des métaux : aluminium, cuivre, fer et zinc.

Malgré les problèmes de fixation, nous avons identifié différents stades de développement chez les symbiotes. Le plus fréquent correspond au stade à coque épaisse. Ce stade, décrit chez *S. gigas* est nommé sporocyste par Gros *et al.* (2009). Nous souhaitons revenir sur cette terminologie et remplacer le terme de sporocyste par celui d'oocyste. Dans la bibliographie, le stade oocyste le plus proche que nous ayons trouvé, d'un point de vue morphologique, est celui du Sporozoaire *Emeria macusaniensis* qui parasite le lama, *Lama glama* (Jarvinen 1999). Chez les Sporozoaires, le stade à coque épaisse qui contient des bourgeonnements et qui est excrété dans l'environnement pour la contamination de nouveaux individus s'appelle l'oocyste. Il contient des sporocystes qui renferment

les sporozoïtes (Perkins 1991 ; Speer *et al.* 1998). Dans certains cas, les oocystes renferment directement les sporozoïtes (Valigurová et Koudela 2006). Le nombre de sporocystes et de sporozoïtes varie suivant les groupes taxinomiques, il peut y avoir plus de 16 sporozoïtes par sporocystes et plus de 16 sporocystes par oocystes et cela donne un élément de diagnostic à l'échelle du genre (Bush *et al.* 2001). Malheureusement, dans notre cas, cela ne nous a pas permis de préciser la position systématique des symbiotes puisque nous n'avons pas vu se dégager un nombre de bourgeonnements particulier, probablement du fait des problèmes de fixation que nous avons rencontrés. Ensuite, le stade caractérisé par la présence d'une paroi fine et d'inclusions sphériques est nommé gamonte par l'étude de Gros *et al.* (2009). Enfin, le stade en forme de goutte est décrit par Gros *et al.* (2009) comme étant le stade trophozoïte. Même si nous ne pouvons rien affirmer, nous ne souhaitons pas nous avancer autant pour ce qui est de l'identification des différents stades de développement des symbiotes. Tout d'abord, parce que l'identification des symbiotes ne repose que sur les premières observations en microscopie photonique et qu'elle n'a, à ce jour, jamais été confirmée par une analyse phylogénétique. Autrement dit, nous ne pouvons pas exclure que ces structures n'appartiennent pas à l'embranchement Sporozoa. Ensuite, nous n'avons jamais observé d'organites du complexe apical des Sporozoaires. En effet, les Sporozoaires sont caractérisés par la présence au stade trophozoïte d'un complexe d'organites spécifiques, composé d'anneaux polaires, de rhoptries, de micronèmes, d'un conoïde et de microtubules (Perkins 1991). Du reste, le stade trophozoïte ne présente normalement pas de coque chez les Sporozoaires, or, nos observations et celles de Gros *et al.* (2009) font état, dans les trophozoïtes, de coques internes sous forme de couches concentriques semblables à celles du stade oocyste.

3.1.3 Caractérisation moléculaire des symbiotes des Strombidae

Les tentatives d'extraction d'A.D.N. que nous avons effectuées se sont révélées infructueuses et nous n'avons malheureusement pas pu vérifier le groupe taxinomique des symbiotes par une analyse phylogénétique. Là encore, la coque des symbiotes est probablement la cause du problème. Premièrement, la résistance des coques aux attaques chimiques et mécaniques est une barrière directe aux extractions d'A.D.N. et deuxièmement, l'étanchéité des coques ne permet pas aux solutions tampons de pénétrer dans les symbiotes. Quand nous arrivons tout de même à briser une partie des coques, nous n'obtenons pas d'A.D.N., probablement parce que ce dernier, non stabilisé par les solutions tampons, s'est dégradé pendant la procédure. Le stade oocyste des Coccidia du

genre *Emeria* possède une coque connue pour être particulièrement résistante aux attaques chimiques et mécaniques (Zhao *et al.* 2001). Pour les oocystes de ce genre, une étape supplémentaire de rupture de la coque des oocystes et de la paroi des sporocystes s'avère donc indispensable au préalable d'une extraction d'A.D.N. Zhao *et al.* (2001) ont proposé un protocole en deux étapes pour extraire l'A.D.N. de ces oocystes. Une première incubation en présence d'hypochlorite de sodium permet de rompre la coque externe des oocystes. La seconde étape est la rupture de la partie interne de la coque essentiellement composée de protéines et de lipides. Cette seconde étape consiste en une digestion enzymatique classique en présence de protéinase K et de détergent. Nos tentatives d'extraction les plus encourageantes se basent sur cette technique. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu d'A.D.N. exploitable à l'issue de ces protocoles. Cette méthode représente cependant une piste à suivre.

La seconde approche que nous avons eue consiste à réaliser une amplification de l'A.D.N. des Sporozoaires à partir d'une solution d'A.D.N. total (Strombidae plus Sporozoaires). Il s'agit d'une piste intéressante, puisqu'elle rend possible l'accès au contenu génomique des stades sans coque, présent dans les cellules de la glande digestive, que nous n'isolons pas dans les fractions purifiées en symbiotes. En revanche, cette seconde technique souffre de trois points faibles :

1. Nous partons du postulat que les symbiotes sont des Sporozoaires pour dessiner des amorces P.C.R. spécifiques, or nous ne sommes pas sûrs qu'il s'agisse bien de Sporozoaires.
2. Les Sporozoaires forment un groupe très diversifié et il n'est pas possible de dessiner des amorces spécifiques de l'embranchement. Il faut donc utiliser des sondes spécifiques d'un sous-groupe (en l'occurrence les Coccidia), en espérant qu'il s'agisse bien du groupe d'appartenance des symbiotes.
3. Enfin, les Sporozoaires font partie des groupes les plus mal connus d'un point de vue phylogénétique (Morrison 2009). Si tant est que les symbiotes soient des Coccidia, il n'est pas certain que la sonde dessinée à partir du petit nombre de séquences connues pour le clade choisi soit également complémentaire du gène à amplifier chez notre espèce de symbiote.

À ces trois points, il convient d'ajouter une remarque. Les insectes, qui sont considérés comme un des groupes les plus mal connus en termes de biodiversité, comptent environ 950 000 espèces répertoriées pour un total estimé entre 4,5 et 30 millions d'espèces. L'embranchement Sporozoa ne compte que 6000 espèces connues pour un total estimé entre 1,2 et 10 millions (Adl *et al.* 2007 ;

Morrison 2009). De plus, les Sporozoaires ne sont pas étudiés de façon homogène. Seul un petit nombre de groupes taxinomiques, lesquels contiennent les espèces pathogènes pour l'Homme, ses animaux domestiques ou les espèces d'élevage (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*,...), reçoit l'attention des chercheurs. En conséquence, les connaissances qui en découlent ne sont pas représentatives de l'embranchement tout entier. Pour conclure ce paragraphe, voici une citation de la revue de Morrison D. A. sur l'évolution des Apicomplexa (2009) : « *They [Apicomplexa] are unicellular endoparasites that are hard to find and which have few easily studied characteristics (mainly life-cycle patterns, cyst organisation and ultrastructure). This combination makes them among the most difficult of organisms to work with.* »

3.1.4 Les symbiotes dans les Gastéropodes d'eau douce

Des symbiotes similaires à ceux que nous avons détectés dans la glande digestive de *Marisa cornuarietis* et de *Pomacea glauca* ont été observés dans les cellules pyramidales de la glande digestive de *Pomacea canaliculata* (Castro-Vazquez *et al.* 2002 ; Koch *et al.* 2006 ; Vega *et al.* 2005 ; 2006 ; 2007). Pour ces auteurs, le symbiote que nous présentons comme un Eucaryote du groupe des Sporozoaires serait une forme kystique d'un endosymbiote Procaryote non identifié qu'ils nomment « corpuscule K ». De plus, ils considèrent que les granules présents dans les cellules digestives de *P. canaliculata* sont le stade précoce de ce même Procaryote symbiotique qu'ils nomment alors « corpuscule C ». Nous avons également fait l'observation de ce que ces auteurs nomment « corpuscule C » dans les cellules digestives de *M. cornuarietis* et de *P. glauca*. En revanche, nous ne partageons pas leur avis quant à la nature de ces structures et ce pour plusieurs raisons que nous allons maintenant présenter.

Les « corpuscules C » : symbiotes ou poubelle cellulaire?

Tout d'abord, les grains des cellules digestives, ou « corpuscules C », ne sont pas dans le même type cellulaire que ce que Castro-Vasquez *et al.* (2002) considèrent comme la forme kystique: les « corpuscules K ». Bien qu'étonnant, il n'est pas totalement impossible qu'une endosymbiose implique deux types cellulaires distincts, avec deux stades de développement associés aux deux types cellulaires. Cependant, nous n'avons jamais observé de symbiotes à l'interface de ces deux types cellulaires. D'autre part, les « corpuscules C » et « K » sont morphologiquement très différents. Ils n'ont même rien en commun, or, nous n'avons jamais observé de morphotype

intermédiaire qui pourrait autoriser à penser que ces deux structures sont deux stades de développement du même organisme.

Deuxièmement, les grains des cellules digestives sont bien connus dans la glande digestive des Gastéropodes. Ainsi, il existe de nombreux exemples de glandes digestives qui ne présentent pas d'association avec ce qu'ils nomment « corpuscule K », mais qui présentent bien des grains dans les cellules digestives et cela dans les trois groupes de Gastéropodes de la classification traditionnelle: chez des Pulmonés (Walker 1970), chez les Opisthobranches (Lobo-Da-Cunha 2000) ou chez les Prosobranches (Taïeb 2001). De plus, les analyses cytochimiques des cellules digestives des Gastéropodes précisent que ces « corpuscules C » qui sont souvent dénommés « granules jaunes » sont formés par l'accumulation de corps résiduels de lysosomes et concentrent les matières non digérées (Nelson et Morton 1979). Par ailleurs, nous verrons dans le chapitre IV, que nos propres analyses cytochimiques précisent la nature de ces granules qui est visiblement incompatible avec l'hypothèse de Castro-Vasquez *et al.* (2002).

Troisièmement, un des arguments avancé par Castro-Vasquez *et al.* en faveur d'une nature endosymbiotique des grains des cellules digestives est la détection d'A.D.N. à partir d'une fraction purifiée en « corpuscules C ». En outre, les auteurs avancent que ces structures sont des Procaryotes puisqu'ils sont en mesure d'amplifier le gène de l'A.R.N.r. 16S, présent seulement chez les Procaryotes, à partir de cette même fraction purifiée (Vega *et al.* 2005). Ce dernier argument, s'il semble à première vue décisif pour ce qui est de l'identification des « corpuscules C », se révèle insuffisant quand on y regarde de plus près. La mise en place d'un protocole de purification des symbiotes nous a permis de constater la difficulté à aboutir à une solution parfaitement pure et exempte de contamination d'A.D.N. Vega *et al.*, eux-mêmes précisent que leur fraction purifiée de « corpuscules C » n'est pure qu'à 91,6 % (Vega *et al.* 2005). Sachant que *P. canaliculata* vit en association avec de nombreuses bactéries dans son tube digestif (Vega *et al.* 2006) et que nous avons personnellement observé des bactéries dans la glande digestive des Strombidae (données non présentées), une contamination de la fraction purifiée par des bactéries est fortement probable. Cette contamination pourrait expliquer l'amplification du gène de l'A.R.N.r. 16S. Pour ces raisons, nous souhaitons relativiser leur identification des « corpuscules C » tant qu'aucun séquençage ne viendra ôter le doute d'une éventuelle contamination d'origine Procaryote. Dans notre cas, par exemple, à l'issue d'une des tentatives d'extraction des symbiotes, nous avons obtenu une faible quantité d'A.D.N. qui nous a permis de réaliser une amplification par P.C.R. en utilisant des amorces généralistes Eucaryotes (A.R.N.r. 18S). En s'arrêtant à ce résultat, nous pourrions conclure que les

symbiotes sont des Eucaryotes mais, une fois le produit de l'amplification séquencé, l'analyse phylogénétique de la séquence a révélé qu'il s'agissait d'A.D.N. contaminant issu des cellules de l'hôte.

Enfin, nos colorations au DAPI et au Sybr Green[®] montrent que les granules des cellules digestives ne contiennent pas d'A.D.N. S'il est probable que des problèmes de fixation expliquent l'absence de fluorescence dans les symbiotes des cellules pyramidales qui présentent une coque épaisse, les granules des cellules digestives, eux, sont correctement fixés mais ne sont, malgré tout, pas marqués par les intercalants fluorescents.

Les « corpuscules K » ou les symbiotes Sporozoaires

Les « corpuscules K » décrits chez *P. canaliculata* sont similaires aux symbiotes que nous détectons chez *M. cornuarietis* et *P. glauca*. Ils sont de la même taille, de la même forme, de la même couleur et présentent la même résistance aux protocoles d'extraction d'A.D.N. que celle que nous avons rencontrée pour les symbiotes des Strombidae (Vega *et al.* 2005). Comme nous l'observons chez les Strombidae, Castro-Vasquez *et al.* (2002) rapportent que les symbiotes sont retrouvés dans les fèces. Ils rapportent également la présence de symbiotes similaires chez *M. cornuarietis*, *P. insularum*, *P. scalaris* ainsi que chez *Asolene pulchella*. Ils considèrent donc que cette symbiose résulte d'un épisode d'infection qui serait intervenu très tôt dans l'évolution des Ampullariidae. La détection de symbiotes similaires chez des Gastéropodes marins, indique que, sauf cas d'évolution convergente chez les deux groupes de Gastéropodes, un tel épisode a dû avoir lieu bien plus tôt dans l'évolution que ce que supposent Castro-Vasquez *et al.* (2002).

Les observations réalisées chez les Strombidae nous ont appris que les symbiotes occupent un volume non négligeable de la glande digestive. Ce volume a été quantifié chez *P. canaliculata*, où les symbiotes (uniquement les « corpuscules K » pour les auteurs) représentent en moyenne 5,15 % chez les mâles et 11,88 % chez les femelles du volume total de la glande (Koch *et al.* 2006).

L'analyse au microscope électronique à transmission des symbiotes de *P. canaliculata* a révélé que lorsque l'on observe le stade en forme de goutte, la partie apicale, plus fine, présente de petites inclusions sphériques qui semblent témoigner d'un échange entre le cytoplasme de la cellule hôte et le symbiote. Des observations similaires ont été réalisées par Koch *et al.* (2006) chez *P. canaliculata* et les auteurs prennent le parti de dire que le sens du transfert de ces petites inclusions va du cytoplasme de la cellule hôte vers le symbiote. Ils considèrent qu' un processus d'endocytose au pôle apical de la cellule hôte est à la base de la formation de ces petites inclusions

denses aux électrons.

Les descriptions de la glande digestive des Caenogastéropodes font souvent référence à des inclusions sphériques à ovales, de 5 à 30 μm , parfois constituées de couches successives entourant de plus petits granules. Ces structures sont décrites de couleur jaune-brun à marron et sont localisées dans un type cellulaire minoritaire, situé entre les blocs de cellules digestives (Boghen et Farley 1974 ; Fretter et Graham 1962 ; Lutfy et Demain 1967 ; Merdsoy et Farley 1973 ; Voltzow 1994 ; Wigham 1976). Ces descriptions font probablement référence à des structures similaires à celles que nous nommons symbiotes Sporozoaires. En effet, la couleur, la forme et la localisation correspondent à celles des Sporozoaires que nous décrivons dans la glande digestive de *M. cornuarietis*, de *P. glauca* et des Strombidae. Or, la bibliographie ne précise pas la nature de ces structures qui sont nommées « granules », « sphérules » ou « inclusions ». La fonction supposée de ces structures serait liée à des processus d'excrétion, mais elle reste très mal comprise.

3.2 Nature de la relation entre les Sporozoaires et les Gastéropodes

Il existe probablement une infinité d'interactions durables. Une quantité innombrable de déclinaisons peuvent se placer sur un continuum allant de la relation parasitaire la plus virulente à la relation mutualiste par excellence, qui profite largement aux deux participants. Ce qui définit la position sur ce continuum est le bilan bénéfice/coût de la relation pour les deux participants. En théorie, la parasitose stricte aurait un bilan bénéfice/coût de 1 pour le symbiote et de 0 pour l'hôte. À l'autre extrémité du continuum, dans une relation mutualiste, le bilan bénéfice/coût serait de 1 pour le symbiote comme pour l'hôte. En réalité, toute interaction durable a un coût pour les deux participants, ainsi, même dans le cas de relations commensales ou mutualistes, la relation n'est jamais à 100 % bénéfique pour aucun participant. La tolérance d'un hôte pour un organisme étranger dans son environnement proche, voire dans ses tissus, représente toujours un coût que ce soit en termes d'immunité, de perte d'espace, de réorganisation tissulaire, ou autre gêne directement ou indirectement liée à la présence du symbiote. Ces quelques phrases d'introduction sont là pour rappeler que les interactions durables ne rentrent pas dans des cases aux limites bien définies. La nature des interactions durables s'apprécie de façon subjective par l'observateur. Au mieux, celui-ci la place quelque part sur un continuum en fonction de l'évaluation, plus ou moins subjective, qu'il a

fait du bilan bénéfice/coût de l'hôte et de son symbiote.

3.2.1 Définition et estimation de la virulence

La plupart des auteurs s'accordent à dire que la virulence d'un parasite se définit par la diminution du succès reproducteur de l'hôte infecté en comparaison de l'hôte sain (Combes 2001 ; Mehlhorn 2008). Poulin & Combes (1999) ont souligné le fait que les parasites n'ont pas de « gènes de virulence » (sauf dans les cas où la transmission des parasites suppose la mort de celui-ci). L'action du parasite sur son hôte induit une réponse de ce dernier et c'est le bilan de l'action du parasite et de la réponse de l'hôte qui est mesuré par la comparaison du fitness des hôtes parasités et des hôtes sains. Ainsi, la virulence telle qu'elle est mesurée n'est pas une caractéristique du parasite mais du système parasite-hôte étudié. Du reste, pour un même parasite cette virulence peut varier suivant l'espèce hôte considérée ou même, considérant la même espèce hôte, d'un individu hôte à un autre (Poulin et Combes 1999). Certains parasites exploitent leur hôte de façon rapide et destructrice. Une exploitation rapide permet en effet aux parasites d'obtenir un rendement reproductif important. D'une façon générale, on constate que le succès reproductif, ou fitness, des parasites est positivement corrélé à la virulence (Frank 1996 ; Mackinnon et Read 1999). D'autres parasites font le choix d'une exploitation plus « prudente » de leur hôte, lequel constitue leur source de nourriture et/ou leur habitat (Frank 1996). Dans notre cas, l'estimation de la virulence par la comparaison du succès reproducteur des hôtes infectés avec celui des hôtes non infectés n'est pas faisable puisque nous n'avons, à ce jour, jamais rencontré d'hôtes ne présentant pas de symbiotes. D'autre part, nous avons tenté de purger les hôtes de leurs symbiotes en les maintenant en stabulation, c'est à dire dans des bacs d'eau de mer filtrée sans apport de nourriture, mais cela s'est avéré inefficace (données non présentées). Une telle purge des symbiotes s'observe notamment chez les Bivalves symbiotiques *Codakia orbicularis* (Lucinidae) (Caro *et al.* 2009), *Bathymodiolus azuricus* (Mytilidae) (Riou *et al.* 2008) et *Thyasiria flexuosa* (Thyasiridae) (Dufour et Felbeck 2006). Dans notre modèle d'étude, il s'avère donc pour l'instant impossible d'effectuer une comparaison hôte infecté – hôte sain.

Une étude sur une population de *S. gigas* de l'île de San Andres (Colombie), dans laquelle un cycle de reproduction atypique avait déjà été mis en évidence (Castro Gonzalez *et al.* 2007), a réalisé une comparaison statistique entre la quantité de symbiotes par hôte (*i. e.* l'intensité de l'infection) et le nombre d'hôtes atteignant la maturité sexuelle. Cette analyse suggère une corrélation négative entre la quantité de symbiotes par hôte et le nombre d'hôtes matures ainsi qu'une corrélation positive entre l'abondance des Sporozoaires et le nombre d'individus immatures (Aldana Aranda *et al.* 2009a).

Cependant, rien n'indique qu'il y ait une relation causale entre la présence des symbiotes et la situation problématique observée dans le cycle de reproduction. Dans cette population de *S. gigas*, les individus matures ne sont observés qu'en août-septembre et représentent moins de 10 % de la population, et les tubules de la glande digestive présentent une grande quantité de symbiotes (Castro Gonzalez *et al.* 2007). En revanche, rien n'indique que ces deux informations ne sont pas sous l'influence d'un troisième facteur. L'abondance observée des symbiotes pourrait également être la conséquence de la perturbation du cycle de reproduction et non la cause. De plus, plusieurs études ont montré que d'autres populations de *S. gigas* atteignent la maturité sexuelle et ont un cycle de reproduction normal (Frenkiel *et al.* 2009 ; Reynal *et al.* 2009) et cela, malgré la présence des symbiotes en grande quantité (Gros *et al.* 2009 ; Volland *et al.* 2010). Une étude sur la reproduction de *S. gigas* en Floride a montré que les individus du large ont une reproduction normale alors que ceux présents près de la côte ont une reproduction perturbée. Cette étude a également testé l'éventualité d'un lien entre la présence des symbiotes et la perturbation de la reproduction et aucune corrélation n'a été trouvée (Aldana Aranda *et al.* 2009b). Enfin, une étude réalisée au Yucatan (Mexique) a suivi parallèlement le stade de maturité de *S. pugilis* et la quantité de Sporozoaires dans la glande digestive chez un total de plus de 400 individus et sur une période de deux ans. L'analyse statistique des données n'a pas démontré d'effets négatifs des Sporozoaires sur la reproduction des hôtes. Au contraire, il est ressorti de ces analyses que l'abondance des Sporozoaires et le nombre d'individus matures étaient positivement corrélé (Ariste-Zelise 2010). En conclusion, nous ne pouvons estimer directement la virulence des symbiotes puisque nous n'avons jamais observé d'individus ne présentant pas de symbiotes. Cela étant, nous n'avons noté aucun signe de maladie ou de mauvaise santé chez les hôtes, qui atteignent, par ailleurs, la maturité sexuelle malgré la présence des symbiotes. De plus, le suivi de l'abondance des Sporozoaires, *i. e.* l'intensité de l'infection, n'a pas permis d'établir un effet pathogène pour la reproduction des hôtes. Au contraire, la plus grande étude de ce type a mis en évidence une corrélation positive entre l'intensité de l'infection et le nombre d'individus matures. Ces éléments nous invitent à penser que nous sommes en présence d'une relation peu, voire, non virulente.

3.2.2 Mode de Transmission des symbiotes

Chez toutes les espèces de Strombidae pour lesquelles nous avons pu réaliser des observations, des symbiotes ont été détectés dans les fèces. La présence de Sporozoaires dans les fèces constitue une voie de libération vers l'environnement qui pourrait être à l'origine de contamination de nouveaux

individus. En d'autres termes, la présence de symbiotes dans les fèces suggère qu'il existe une voie de transmission horizontale entre les individus hôtes. Il existe effectivement des exemples de transmission similaire via l'environnement. La sépiole *Euprymna scolopes*, qui vit en symbiose avec la bactérie *Vibrio fisheri*, contrôle sa population symbiotique en rejetant quotidiennement 90 % de ses bactéries, facilitant ainsi la contamination de nouveaux individus, notamment des juvéniles dépourvus de symbiotes (McFall-Ngai 1998). Cependant, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que les symbiotes relâchés dans les fèces sont vivants, et qu'ils sont contaminants. Une perspective intéressante et qui validerait l'hypothèse d'une transmission horizontale, serait la mise en contact de jeunes hôtes dépourvus de symbiotes (aposymbiotiques) avec les fèces d'adultes contaminés. Nos tentatives d'élevages de larves dans ce sens n'ont pas abouti à des larves aposymbiotiques. Au contraire, nous avons mis en évidence la présence de symbiotes dans la glande digestive d'une larve de 29 jours de développement, élevée en laboratoire dans une eau filtrée et donc exempte de contaminations environnementales. Ceci indique que le symbiote est transmis verticalement des parents aux embryons. Le fait que nous n'ayons pas détecté de Sporozoaires sur coupe dans un embryon de 24 heures élevé dans les mêmes conditions ne contredit pas cette hypothèse. Il est possible que les Sporozoaires prennent une forme différente lors de la transmission. Forme que nous n'avons pas été en mesure de détecter sur coupe semi-fine. L'observation de coupes semi-fines d'une larve vieille de 1 jour ne permet pas non plus de détecter les symbiotes mais, à ce stade, la glande digestive n'est pas encore bien en place et il est possible que les symbiotes ne s'installent dans la glande qu'une fois celle-ci définitivement en place. C'est le cas des bactéries symbiotiques du Bivalve *Solemya reidi*, les symbiotes transmis verticalement sont « stockés » dans des vésicules dans l'espace entre l'embryon et le test qui l'entoure et ce n'est qu'après la métamorphose et la mise en place des différents types cellulaires de la branchie que les symbiotes s'installent dans leurs cellules hôtes, les bactériocytes (Gustafson et Reid 1988). Nos observations sont suffisantes pour proposer une voie de transmission verticale des symbiotes. En revanche, seule une détection par P.C.R. avec utilisation d'amorces spécifiques de l'A.D.N. du symbiote, dans les embryons encore protégés par la gangue, permettrait de valider ce mode de transmission. La transmission verticale est un phénomène courant chez les parasites endocellulaires (Combes 1995). Il existe de tels exemples de transmission verticale chez les parasites du groupe Microsporidia (Dunn *et al.* 1998 ; Slothouber Galbreath *et al.* 2004 ; Terry *et al.* 1997). Il s'agit d'un groupe diversifié de parasites Eucaryotes endocellulaires qui a été classé pendant un temps dans le groupe Sporozoa (Perkins 1991) avant que la phylogénie le rapproche des Eumycètes (Lecointre et Le Guyader 2001). Même si elle reste

minoritaire, la transmission verticale est largement utilisée par les parasites de ce groupe (Dunn et Smith 2001 ; Terry *et al.* 2004). Il est intéressant de constater que chez *Gammarus duebeni* (Amphipode), les parasites Microsporidia verticalement transmis *Nosema granulosis* et *Microsporidium sp* n'ont aucun impact sur la quantité d'œufs produits par leur hôte, ils ne font que modifier le ratio mâles/femelles en faveur des femelles (Ironsides *et al.* 2003). Dans ce cas, la virulence, qui se mesure en termes de diminution du fitness de l'hôte infecté, serait donc nulle. Les parasites transmis verticalement voient leur succès reproductif directement lié à celui de leur hôte, c'est pourquoi ce mode de transmission est associé à une virulence réduite et peut conduire au développement de relations mutualistes (Bandi *et al.* 2001 ; Combes 2001 ; Dunn et Smith 2001). Il existe plusieurs exemples d'organismes appartenant à un groupe de parasites qui ont un mode de transmission verticale et qui, au fur et à mesure de co-évolution avec leur hôte, ont vu leur relation se pacifier pour parfois aboutir à une interaction mutualiste (Bandi *et al.* 2001). Citons le cas intéressant des bactéries du genre *Wolbachia* qui infectent très largement les Arthropodes mais également certains Nématodes (Combes 2001). Les *Wolbachia* sont transmises uniquement par les hôtes femelles, elles ont donc élaboré des stratégies afin d'augmenter la proportion de femelles dans la population (féminisation des mâles et incompatibilité cytoplasmique entre un gamète infecté et un gamète sain) (Combes 2001 ; Zimmer 2001). Ce Procaryote parasite à transmission verticale représente un bon exemple de symbiotes à la frontière entre parasitisme et mutualisme. Si, à l'échelle des individus, la modification du sexe-ratio peut sembler impacter négativement la reproduction, à l'échelle des populations, une telle modification a pour conséquence une augmentation des phénomènes de dérive génétique qui peuvent conduire à l'apparition de nouveaux caractères et à la spéciation. Nous avons vu qu'une transmission verticale implique une relation étroite entre le fitness de l'hôte et celui du parasite. Chez les *Wolbachia* cela a conduit, dans certains cas, à une co-évolution vers une relation mutualiste. Chez la guêpe *Asobara tabida*, les *Wolbachia* sont par exemple devenues des mutualistes indispensables à l'ovogenèse chez leur hôte (Dedene *et al.* 2001). Autre exemple, chez les nématodes parasites de la famille des Filariidae, les *Wolbachia* sont parfois bénéfiques à l'hôte puisqu'elles délivrent des métabolites essentiels à l'hôte et qu'elles jouent un rôle dans la diminution de la réponse immunitaire du mammifère hébergeant le nématode parasite (Bandi *et al.* 2001 ; Fenn et Blaxter 2006 ; Merçot et Poinso 2009). Dans une revue sur le conflit dans la symbiose, Douglas A. D. (2007) consacre un paragraphe aux conséquences de la transmission verticale en termes de diminution de la virulence. Elle y explique que dans une interaction durable, les conflits naissent d'une divergence d'intérêts évolutifs et qu'ils peuvent se

Chapitre III : L'association avec les Sporozoaires

résoudre en augmentant la mise en commun d'intérêts, le paroxysme de cette mise en commun étant la transmission verticale. La transmission verticale des symbiotes existe donc aussi bien chez les parasites que chez les mutualistes, mais dans le cas des parasitoses, ce mode de transmission est le plus souvent associé à une virulence faible. Nous avons mis en évidence une voie potentielle de transmission horizontale ainsi qu'une voie probable de transmission verticale. Notons que la présence des deux modes simultanés de transmission a déjà été décrite (Dunn et Smith 2001). Pour conclure, nous ne pouvons utiliser à lui seul l'argument de la transmission verticale pour déterminer la nature de la relation entre les Gastéropodes et les Sporozoaires. En revanche, la présence de ce mode de transmission implique que la relation est probablement peu, voire non virulente.

3.2.3 Prévalence vs Virulence

La prévalence est un indicateur qui correspond au nombre d'hôtes infectés par rapport au nombre d'hôtes examinés (Bush *et al.* 1997 ; Durfee 1978 ; Jovani et Tella 2006 ; Margolis *et al.* 1982). La prévalence s'exprime donc, soit avec une valeur comprise entre 0 et 1, soit en pourcentage.

$$\text{Prévalence} = \frac{\text{Hôtes infectés}}{\text{Hôtes examinés}} \quad (\times 100)$$

Dans notre cas, des individus hôtes ne présentant pas de symbiotes n'ont jamais été observés. La prévalence des Sporozoaires chez les Strombidae est donc de 1 (ou 100 %). Il est important d'insister sur quelques points quant au calcul de la prévalence dans notre modèle symbiotique. Tout d'abord, les hôtes sont systématiquement infectés quelle que soit la période de leur cycle de reproduction, mais également quel que soit l'âge des hôtes (des larves véligères d'un mois aux plus vieux individus adultes). Il n'y a donc pas de variabilité de la présence des symbiotes quel que soit l'état physiologique, morphologique ou sexuel des hôtes. De plus, ce calcul repose sur un nombre d'individus observés très important (> 3000 individus toutes espèces confondues). Jovani & Tella (2006) préconisent un échantillonnage très important, de l'ordre de 1000 individus hôtes, avant d'annoncer une prévalence de 0 % ou de 100 %. Nous avons donc une taille d'échantillonnage suffisante pour considérer que l'infection aux Sporozoaires est systématique, au moins chez *S. gigas*. Il existe des parasites qui ont une prévalence annoncée de 100 %. Dans une étude de Poulin (1998) sur les parasites des poissons d'eau douce, sur 188 parasites, seulement deux ont une prévalence annoncée de 100 % (Poulin 1998). Or, la taille d'échantillonnage pour ces deux parasites n'est que de 22 et 25 individus, ce qui est insuffisant pour annoncer avec certitude une prévalence de 100 % (Jovani et Tella 2006). De la même façon, sur 167 parasites Helminthes gastro-intestinaux chez les oiseaux et 644 chez des mammifères, les prévalences comprises entre 95 % et 100 % ne sont détectées que dans moins de 2,5 % des cas, et la prévalence moyenne est comprise entre 5 % et 10 % pour les oiseaux et entre 10 % et 15 % chez les mammifères (Poulin 1998). À notre connaissance, il n'existe pas de parasite avec une prévalence de 100 % chez les Sporozoaires. Le tableau 6 présente une synthèse bibliographique des prévalences de 16 parasites Sporozoaires chez 29 hôtes différents. La prévalence maximale observée est de 91,8 %.

Chapitre III : L'association avec les Sporozoaires

Tableau 6: Prévalence de parasites Sporozoaires chez des hôtes invertébrés et vertébrés avec détail du nombre d'hôtes infectés et du nombre d'hôtes examinés au total. Notons que la prévalence maximale est de 91,8 %. **nc** : données non connues.

	Hôte	Parasite	Infectés	Examinés	Prévalence (%)	Référence
Gasteropode	<i>Nerita ascencionis</i>	<i>Nematopsis gigas</i>	5	25	20	Azevedo & Padovan 2004
	<i>Protothaca staminea</i>	<i>Apicomplexa sp.</i>	173	235	73,62	Desser & Bower 1997
Bivalve	<i>Cerastoderme edule</i>	<i>Nematopsis sp.</i>	nc	nc	82	Azevedo & Cachola 1992
	<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>Nematopsis sp.</i>	nc	nc	8	Azevedo & Cachola 1992
	<i>Arcuatula arcuatula</i>	<i>Nematopsis sp.</i>	101	110	91,8	Tuntiwaranuruk <i>et al.</i> 2004
	<i>Anadara granosa</i>	<i>Nematopsis sp.</i>	77	130	59,2	Tuntiwaranuruk <i>et al.</i> 2004
	<i>Perna viridis</i>	<i>Nematopsis sp.</i>	78	130	60	Tuntiwaranuruk <i>et al.</i> 2004
	<i>Paphia undulata</i>	<i>Nematopsis sp.</i>	70	100	70	Tuntiwaranuruk <i>et al.</i> 2004
	Crustacé	<i>Palaemon elegans</i>	<i>Aggregata spp.</i>	45	50	90
<i>Palaemon serratus</i>		<i>Aggregata spp.</i>	45	50	90	Gestal <i>et al.</i> 2002
<i>Palaemon adpersus</i>		<i>Aggregata spp.</i>	45	50	90	Gestal <i>et al.</i> 2002
<i>Macropipus depurator</i>		<i>Aggregata spp.</i>	1	12	10	Gestal <i>et al.</i> 2002
<i>Macropipus arcuatus</i>		<i>Aggregata spp.</i>	9	10	90	Gestal <i>et al.</i> 2002
<i>Macropipus corrugatus</i>		<i>Aggregata spp.</i>	22	37	60	Gestal <i>et al.</i> 2002
<i>Macropipus marmoreus</i>		<i>Aggregata spp.</i>	4	27	14,8	Gestal <i>et al.</i> 2002
Arthropode		<i>Aedes aegypti</i>	<i>Ascogregarina culicis</i>	83	391	21,23
	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Ascogregarina culicis</i>	266	1986	13,4	Beier <i>et al.</i> 1995
Reptile	<i>Testudo graeca</i>	<i>Hemolivia mauritanica</i>	26	40	65	Siroky & Kamler 2005
	<i>Testudo marginata</i>	<i>Hemolivia mauritanica</i>	38	47	81	Siroky & Kamler 2005
	<i>Boa constrictor amarali</i>	<i>Hepatozoon spp.</i>	7	18	38,89	O'Dwyer & Moço 2003
	<i>oxyrhopus guibei</i>	<i>Hepatozoon spp.</i>	1	35	2,86	O'Dwyer & Moço 2003
	<i>Philodryas patagoniensis</i>	<i>Hepatozoon spp.</i>	1	5	20	O'Dwyer & Moço 2003
	<i>Waglerophis merremi</i>	<i>Hepatozoon spp.</i>	1	13	7,69	O'Dwyer & Moço 2003
	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Hepatozoon spp.</i>	6	17	35,29	O'Dwyer & Moço 2003
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	<i>Hepatozoon spp.</i>	21	108	19,44	O'Dwyer & Moço 2003
	<i>Cnemidophorus arubensis</i>	<i>Haemogregarine sp.</i>	63	240	26,25	Schall 1986
	Mammifère	<i>Spermophilus elegans</i>	<i>Eimeria callospermophili-morainensis</i>	347	496	70
<i>Spermophilus elegans</i>		<i>Eimeria beecheyi</i>	208	496	42	Seville <i>et al.</i> 1996
<i>Spermophilus elegans</i>		<i>Eimeria spermophili</i>	94	496	19	Seville <i>et al.</i> 1996
<i>Spermophilus elegans</i>		<i>Eimeria bilamellata</i>	55	496	11	Seville <i>et al.</i> 1996
<i>Spermophilus elegans</i>		<i>Eimeria lateralis</i>	40	496	8	Seville <i>et al.</i> 1996
<i>Spermophilus elegans</i>		<i>Eimeria larimerensis</i>	nc	nc	<20%	Seville <i>et al.</i> 1992
<i>Lama glama</i>		<i>Eimeria macusaniensis</i>	36	301	11,96	Jarvinen 1999
<i>Lama pacos</i>		<i>Eimeria macusaniensis</i>	8	115	6,96	Jarvinen 1999
<i>Lama guanicoe</i>		<i>Eimeria macusaniensis</i>	2	27	7,41	Jarvinen 1999

Dans certains cas, il est possible que localement, sur un site donné, un parasite atteigne une prévalence de 100 %, mais dans notre cas, l'échantillonnage a été effectué sur de nombreux sites très éloignés les uns des autres (plusieurs sites distants dans la Caraïbe et dans le Pacifique) et malgré cela, les Sporozoaires sont détectés systématiquement dans tous les individus analysés. L'infection d'un hôte par un parasite dépend de nombreux facteurs et il existe une variabilité importante entre les hôtes d'une même espèce. Tout les hôtes potentiels ne sont pas exposés de la même façon à un parasite donné. Une variabilité génétique, biogéographique, immunitaire ou encore écologique, explique qu'un parasite infecte certains hôtes et pas d'autres (Combes 1995). Pour cette raison, il est peu probable que tous les individus d'une population d'hôtes soient infectés par un parasite donné. Or, notre modèle symbiotique est caractérisé par une infection systématique

de tous les individus de plusieurs populations chez plusieurs espèces d'hôtes. Cela laisse supposer que nous ne sommes probablement pas en présence d'une relation virulente de type parasitisme. De plus, il a été démontré que la virulence d'un parasite est négativement corrélée à sa prévalence (Bedhomme *et al.* 2005). La prévalence de 100 % observée chez les neuf espèces de Gastéropodes étudiées est donc incohérente avec l'hypothèse d'une parasitose. De fait, il s'agit d'un argument en faveur d'une relation peu ou non virulente de type commensalisme ou mutualisme.

3.2.4 Conclusion: parasites ou mutualistes ?

De nombreux cas d'infection par des Sporozoaires ont été décrits dans les différents groupes de Mollusques. Chez les Céphalopodes: *Aggregata sagittata* n. sp. et *Aggregata andresi* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), sont par exemple des parasites du groupe des Coccidia infectant respectivement : *Todarodes sagittatus* (Omnastrephidae) et *Martialia hyadesi* (Omnastrephidae) (Gestal *et al.* 2000; Gestal *et al.* 2005). La pieuvre *Octopus vulgaris* (Octopodidae) est parasitée par la Coccidie *Aggregata octopiana* (Gestal *et al.* 2002a; 2007). Chez les Mollusques bivalves : *Protothaca staminea* (Veneridae) et *Ostrea chilensis* (Ostreidae) sont décrits comme hébergeant des parasites Sporozoaires ; *Arcuatula arcuatula* (Mytilidae), *Anadara granosa* (Arcidae) et *Perna viridis* (Mytilidae) sont parasités par des Sporozoaires du genre *Nematopsis* (Tuntiwaranuruk *et al.* 2004). Enfin, chez les Gastéropodes: *Pseudoklossia haliotis* (Coccidia) infecte l'abalone *Haliotis* spp. (Prosobranchia) (Friedman *et al.* 1995) et *Nematopsis gigas* (Porosporidae) infecte le prosobranch *Nerita ascencionis* (Neritidae). Les cas de parasitose par des Sporozoaires chez les Mollusques sont donc assez courants. À notre connaissance, il n'existe que deux descriptions de Sporozoaires non virulents qui entretiennent une relation commensale plutôt que parasitaire avec leur hôte. Le premier cas est celui de *Emeria callospermophili*, *E. morainensis* et *E. beecheyi* trois Sporozoaires (Emeriidae) détectés dans le tube digestif des écureuils terrestres du Wyoming *Spermophilus elegans*. Une analyse comparée du métabolisme d'hôtes infectés et d'hôtes sains n'a mis en évidence aucun effet pathogène attribuable aux Emeriidae. Les auteurs proposent donc que la relation, initialement parasitaire, a évolué en faveur d'une relation moins virulente, dans laquelle le coût, pour l'hôte, de tolérer les parasites est devenu inférieur à celui de s'en débarrasser (Seville *et al.* 1992). De plus, chez cette même population d'écureuil, il a été démontré que d'autres *Emeria* peu prévalents avaient un effet pathogène avéré, tandis que les trois espèces commensales sont caractérisées par une forte prévalence. En d'autres termes, une augmentation de la prévalence semble accompagner la mise en place d'une relation commensale (Seville *et al.* 1996). Le deuxième

cas de Sporozoaire non virulent est celui d'un Coccidia de la famille des Haemogregarinidae qui infecte les hématies du lézard *Cnemidophorus arubensis*. Les auteurs ont montré que les hôtes sains et les hôtes parasités présentaient les mêmes performances en termes, et de vitesse de course, et de consommation en oxygène. De plus, les mâles parasités arborent des couleurs plus vives ce qui représente un atout en termes de sélection sexuelle (Schall 1986). Autrement dit, les mâles parasités sont positivement sélectionnés par rapport aux hôtes sains.

L'identification des symbiotes des Strombidae comme Sporozoaires, ainsi qu'une attribution (erronée) de la responsabilité de la perturbation du cycle reproductif des *S. gigas* sont les éléments qui ont initialement poussé les auteurs à ranger ce symbiote dans le groupe des parasites. Les études réalisées depuis apportent un éclairage nouveau. La prévalence de 100 %, la répartition géographique aussi large, le spectre des hôtes aussi peu spécifique ainsi que la transmission verticale des symbiotes sont des éléments qui, pris individuellement, ne sont pas suffisants pour exclure l'hypothèse parasitaire mais qui, analysés de concert, présente l'interaction durable Sporozoaires – Strombidae comme peu ou non virulente. De plus, la détection de métaux lourds dans la coque des symbiotes corrélée à la présence de ceux-ci dans les fèces des individus suggère que les Sporozoaires représentent potentiellement une voie d'excrétion pour certains éléments. Ce dernier point, ainsi que les résultats de l'étude de Ariste-Zelise (2010) qui démontre une corrélation positive entre l'abondance des symbiotes et la maturité sexuelle, appuient l'hypothèse que l'hôte tire un bénéfice de sa relation avec les Sporozoaires. Nous souhaitons donc proposer que la relation initialement décrite comme parasitaire s'avère finalement de type peu voire non virulente. Le bilan bénéfice/coût de la relation n'est pas encore clair et de nombreux travaux restent à effectuer pour vérifier cela, mais nous souhaitons proposer l'hypothèse que nous sommes en présence d'une relation de type commensalisme sinon de type mutualisme. Une caractérisation moléculaire s'avère indispensable pour définir clairement la position systématique des symbiotes mais, si la classification dans l'embranchement Sporozoa est juste, nous sommes peut-être en présence d'un des rares cas non virulent connu de ce groupe. Nous avons vu que les Sporozoaires sont détectés dans toutes les espèces avec lesquelles nous avons travaillé. Elles sont toutes microphages et/ou herbivores. Le seul spécimen de Gastéropode carnivore que nous avons analysé ne présente pas de symbiotes. De plus, le CINVESTAV de Mérida (Mexique) nous a communiqué que les trois Gastéropodes carnivores *Busycon contrarium*, *Fasciolaria tulipa* et *Turminella angulata* ne présentent pas non plus de symbiotes. Pourtant, ils partagent le même habitat que les Strombidae et l'espèce *Fasciolaria tulipa* se nourrit de juvéniles de *S. costatus*, *S. gigas* et *S. pugilis* (Aldana

Aranda D., communication personnelle). Ces éléments ne sont pas suffisants pour affirmer que la présence des symbiotes est liée au régime alimentaire des hôtes mais une piste est ouverte et il serait intéressant de compléter l'échantillonnage afin de déterminer si un tel lien existe. Par ailleurs, la présence systématique des symbiotes dans des espèces aussi éloignées que des Gastéropodes d'eau douce et d'eau de mer, nous amène à penser que les structures dénommées « grains marron », « sphérules marron » ou encore « concrétions marron » dans la bibliographie, souvent décrites dans la glande digestive des Gastéropodes, pourraient faire référence à des symbiotes similaires. Ces structures que l'on prend pour des organites, supposément impliqués dans un processus d'excrétion, pourraient être des organismes endosymbiotiques mutualistes, fruit d'une longue co-évolution. Une interprétation erronée de la nature d'endosymbiotes s'est déjà vue dans le passé. Les bactéries contenues dans des cellules spécialisées de la branchie des Lucinidae ont, par exemple, été décrites comme des inclusions intracellulaires (Allen 1958) avant de comprendre qu'il s'agissait d'un endosymbiote chimioautotrophe (Berg Jr. et Alatalo 1984).

*Chapitre IV : Structure et
fonctionnement de la glande
digestive des Strombidae*

1 Introduction

Comme nous l'avons vu au début de ce manuscrit, la famille des Strombidae représente un enjeu culturel et surtout économique important dans la Caraïbe. Au moins quatre espèces sont pêchées et consommées et parmi elles, le lambi, *Strombus gigas*, est le plus convoité. Cette espèce représente une manne économique puisqu'un individu adulte pêché donne entre 250 et 600 g de chair qui se vendent autour de 20 EUR le kilogramme en Guadeloupe et en Martinique. De plus, la pêche aux lambis est relativement simple, les animaux ne peuvent pas fuir et ils se rassemblent en eaux peu profondes lors de la reproduction. Pour ces raisons, l'espèce est sur-exploitée et les stocks naturels diminuent de façon critique. L'aquaculture représente sans doute une solution à la pression qui s'exerce sur l'espèce. À l'heure actuelle, le cycle vital complet des Strombidae n'est pas maîtrisé en conditions de laboratoire. La reproduction, qui implique une copulation entre mâles et femelles, n'est pas réalisable en captivité. Les perspectives aquacoles se basent donc actuellement sur la collecte de pontes fécondées ramassées dans le milieu naturel. Ces pontes sont ramenées au laboratoire où elles sont maintenues dans des conditions favorables jusqu'à l'éclosion. Les larves véligères qui sont libérées sont ensuite nourries avec des algues unicellulaires et élevées jusqu'à la métamorphose qui intervient après 12 à 31 jours suivant les espèces (Ballantine et Appeldoorn 1982 ; Brito Manzano *et al.* 1999 ; Brito-Manzano et Aranda 2004). Après la métamorphose, les juvéniles sont mis en grossissement et atteignent des tailles de l'ordre de 8 cm. Malheureusement, à l'heure actuelle, les individus n'atteignent pas une taille suffisante pour être commercialisés à grande échelle. La phase de grossissement est réalisée grâce à de la nourriture artificielle qui se présente sous la forme de granulés. Quelques études ont porté sur l'efficacité des algues unicellulaires et des granulés utilisés pour l'élevage des Strombidae en termes de taux de croissance et de structure de la glande digestive observée en histologie (Aldana Aranda *et al.* 2007 ; 1997 ; Aldana Aranda et Suárez 1998). En revanche, aucune étude n'a été réalisée à l'échelle ultrastructurale de la microscopie électronique. Les Strombidae sont parmi les rares Gastéropodes à présenter un stylet cristallin. Il s'agit d'une fine structure gélatineuse, composée de mucoprotéines, qui agit comme un réservoir d'enzymes digestives. Ce stylet tourne sur lui-même dans l'estomac, assurant ainsi la libération continue d'enzymes digestives. La présence d'une telle structure est commune chez les

Bivalves et est souvent associée à un mode de nutrition de type microphage continu (Fretter et Graham 1962). Les quelques rares études qui portent sur la physiologie de la digestion chez les Strombidae s'intéressent à la nature des enzymes du stylet cristallin (Alyakrinskaya 2001 ; Horiuchi et Lane 1965 ; Horiuchi et Lane 1966). À notre connaissance, aucune analyse cytochimique de la glande digestive des Strombidae n'a été réalisée à l'heure actuelle.

Chez les Mollusques, le tube digestif est connecté à deux groupes de glandes. Le premier, stomodéal, comprend des glandes d'origine ectoblastique, le second, stomacal comprend des glandes d'origine endoblastique. Le groupe stomodéal, se compose de glandes buccales et œsophagiennes. Le groupe stomacal comprend, en général, une unique masse glandulaire très développée que l'on nomme « foie », « glande hépatique », « hépato-pancréas », ou encore « glande digestive ». Celle-ci se présente sous la forme de deux lobes distincts possédant chacun leur ouverture dans l'estomac chez les Mollusques primitifs (Grassé 1960). Chez certains autres, elle ne représente plus qu'une unique masse qui peut conserver ces différentes ouvertures dans l'estomac. C'est le cas chez les Strombidae, la glande bien que composée de deux lobes connectés l'un à l'autre, ne forme qu'une seule masse (Little 1965). Cette glande est un organe clef des Mollusques et constitue, avec l'estomac, la région la plus complexe de l'appareil digestif (Owen 1966). De plus, il s'agit de l'organe qui abrite les symbiotes Sporozoaires chez les Strombidae. La compréhension de son fonctionnement est donc une étape essentielle dans la compréhension de la relation Strombidae-Sporozoaires. En outre, une meilleure compréhension de la physiologie de la glande digestive est un préalable à la mise en place d'une technique d'élevage aquacole optimisée.

Au-delà des perspectives d'optimisation de la nourriture artificielle pour l'élevage de Strombidae, l'étude de la glande digestive est également un enjeu dans la compréhension des mécanismes de détoxification chez les Mollusques. De nombreuses études ont montré que cet organe complexe est impliqué dans la gestion des éléments traces métalliques (Bustamante *et al.* 2000 ; Desouky 2006 ; Dimitriadis *et al.* 2003 ; Metian *et al.* 2009a; Orbea *et al.* 2000 ; Pernice *et al.* 2009 ; Zaldibar *et al.* 2008). Les Mollusques, qui évoluent généralement sur le sédiment connu pour accumuler les polluants, sont réputés particulièrement résistants aux contaminations. Différentes voies métaboliques de la gestion des éléments traces sont connues. Nous nous sommes intéressés à l'une d'entre elles : la séquestration des éléments traces métalliques dans les « sphérocristaux ».

2 Résultats

Dans le chapitre III, nous avons brièvement présenté la structure de la glande digestive des Strombidae. Nous allons maintenant en faire une description précise. Nous verrons tout d'abord, dans le détail, l'organisation structurale et ultrastructurale des différents types cellulaires qui la composent. Puis, dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats des différentes analyses *in situ* effectuées afin de préciser les fonctions des différents types cellulaires.

2.1 Structure et ultrastructure de la glande digestive

2.1.1 Structure générale de la glande digestive

Comme nous l'avons vu, la glande digestive, en position terminale de l'animal, est un organe de couleur noire recouvert par la gonade (Pl. 18A, B). Il s'agit de l'organe le plus volumineux de la masse viscérale. La taille de cet organe est proportionnelle à la taille de l'animal. Ainsi, elle varie beaucoup, allant de 2 à 15 cm, suivant l'espèce, chez les strombes adultes ayant atteint la maturité sexuelle. Chez *S. pugilis*, par exemple, les individus prélevés au Mexique sont 1,5 à 2 fois plus petits que ceux des populations de Guadeloupe. La glande digestive des *S. pugilis* mexicains, en conséquence est 1,5 à 2 fois plus petite. La glande est composée de deux lobes, un gros et un petit, séparés par un grand canal. Ce dernier connecté à l'estomac est un canal primaire, il communique avec les canaux secondaires, plus petits, dispersés dans la glande. Les canaux secondaires sont connectés aux tubules digestifs qui occupent la grande majorité du volume de la glande (Pl. 18). Les tubules digestifs se terminent en cul-de-sac, leur lumière communique avec un ou plusieurs canaux secondaires. Ils sont formés par un épithélium composé de trois types cellulaires: les cellules digestives, les cellules vacuolaires et les cellules cryptiques. L'ensemble de la glande, tubules et canaux, est structuré par du tissu conjonctif non adipeux et des cellules musculaires lisses sont visibles localement au M.E.T. Les observations, à la loupe binoculaire, de larves véligères, ont permis de constater que la glande digestive est animée d'un mouvement de pulsation qui provoque un flux et reflux du bol alimentaire entre l'estomac et la glande digestive. Le bol alimentaire est

quant à lui, animé d'un mouvement circulaire dans l'estomac. Nous allons maintenant, présenter les résultats des observations microscopiques des canaux ainsi que des trois types cellulaires constitutifs des tubules digestifs.

2.1.2 Les canaux de la glande digestive

Nous n'avons pas réalisé d'étude spécifique sur les canaux, nous ne prétendons donc pas en décrire la structure et l'ultrastructure de façon complète. Cela étant, quelques observations méritent d'être présentées ici. Les canaux présentent différents types de contenu, suivant les échantillons, ils sont soit vides (Pl. 19E), soit remplis d'un contenu hétérogène grossier (Pl. 19A), soit remplis d'un contenu relativement homogène composé de particules fines (Pl. 19B-D, F). Dans certains cas, les canaux présentent à la fois un contenu hétérogène et un contenu homogène, dans ce cas, la lumière du canal est divisée en deux parties distinctes (Pl 20A). Les cellules épithéliales bordant la lumière des canaux sont de différentes natures. Trois types d'épithéliums ont été observés:

1. un épithélium uni-stratifié composé de cellules cylindriques, bien rangées, avec un noyau central (Pl. 19A-D ; 20A, C, E ; 21A). Le pôle apical de ces cellules présente des microvillosités et dans certains cas, il est bourgeonnant et libère de grosses vésicules dans la lumière du canal (Pl. 20C).
2. un épithélium uni-stratifié composé de cellules cylindriques irrégulières qui possèdent un noyau central et un cytoplasme vacuolaire (Pl. 19E ; 21D).
3. Un épithélium pseudo-stratifié en « dents de scie » composé de cellules fines qui possèdent un noyau basal et d'autres qui possèdent un noyau apical (Pl. 19C, F ; 20A, B, D ; 21A, B). Il semble que les cellules qui forment les creux et les pointes des « dents de scie » soient différentes. Celles qui forment les pointes, ont un pôle apical très évasé et sont plus fortement colorées pas le bleu de toluidine, elles apparaissent également plus denses aux électrons sur les observations au M.E.T. (Pl. 20B, D). Les cellules de cet épithélium sont ciliées. Comme pour le deuxième épithélium décrit, il est possible d'observer des bourgeonnements du pôle apical avec libération de vésicules dans la lumière du canal (Pl. 20B).

Sur les échantillons post-fixés au tétr oxyde d'osmium, des grains, denses aux électrons, s'observent dans la partie médiane du cytoplasme des cellules épithéliales des canaux (Pl. 20C, D). Ils ne sont pas détectés dans toutes les cellules épithéliales. Enfin, au pôle basal de certaines cellules, des replis caractéristiques de la membrane plasmique ont été observés (Pl.20C, E, F). Des mitochondries ont

été détectées dans ces replis cytoplasmiques. Ces structures ont donc été identifiées comme des zones d'échange actif de type « pompes mitochondriales » qui permet de lutter contre un gradient de concentration.

2.1.3 Les cellules digestives

Les cellules digestives sont majoritaires dans les tubules de la glande. Il s'agit de cellules longues et cylindriques qui s'organisent en épithélium uni-stratifié. Elles forment des groupes de cellules régulièrement alignées (Pl. 22). Elles font en moyenne 90 μm de long et 11 μm de large chez *S. costatus*, *S. gallus*, *S. gigas* et *S. raninus*. Elles sont plus petites chez *S. pugilis* : en moyenne 80 μm de long pour 7 μm de large. Les cellules digestives présentent un noyau basal et leur cytoplasme se divise en trois régions: basale, médiane et apicale. Le tiers basal apparaît clair en histologie après une coloration trichrome classique (Pl. 22B). Sur coupe semi-fine et en microscopie électronique à transmission, on constate que cette région est constituée du noyau et de vésicules d'un diamètre allant de 2 à 8 μm suivant les espèces et les individus (Pl. 22C ; 23A ; 24A). Ces vésicules apparaissent vides au M.E.T. et sur les coupes semi-fines, probablement du fait des traitements aux solvants lors de la préparation des échantillons. En revanche, sur un échantillon post-fixé au tétroxyde d'osmium, ces vésicules présentent un contenu métachromatique vert sur coupe semi-fine (Pl. 22D ; 23B-D). Dans le tiers médian de la cellule digestive, on trouve un ou plusieurs gros grains, colorés par le bleu alcian à pH 2,5 en histologie, que nous nommerons « grains bleus » (Pl. 22). Ils sont contenus dans une vésicule délimitée par une membrane plasmique visible au M.E.T. Ils sont de taille variable allant de 4 à plus de 10 μm dans un même groupe de cellules digestives (Pl. 23). La taille moyenne des grains bleus, toutes espèces confondues, est de 7 μm . On en compte généralement un par cellule. Ils ont un contenu hétérogène composé de particules fines et plus grossières, il est également possible d'y observer des fragments de membrane plasmique. Ces grains sont entourés d'une paroi épaisse et dense aux électrons de 100 à 200 nm (Pl. 24C). Toujours dans le tiers médian, des granules similaires à ceux que nous venons de décrire sont présents. Ils diffèrent des premiers de par leur réaction au bleu alcian acide. Ils ne sont pas colorés par ce dernier en histologie. Sur coupe semi-fine, ils n'ont qu'une très faible affinité pour le bleu de toluidine, alors que les « grains bleus » sont fortement colorés par celui-ci. Au M.E.T., ils apparaissent moins contrastés que les « grains bleus », avec un contenu plus homogène (Pl. 23E). Leur taille est sensiblement la même que celle des « grains bleus ». Enfin, le tiers apical des cellules digestives est composé de deux zones. La zone 1, à proximité des grains que nous venons de présenter, est

composée de vésicules d'un diamètre de 0,5 à 5 μm qui présentent des affinités variables pour la fushine acide et le bleu de toluidine (Pl. 23C-F). La zone 2 du tiers apical est une zone qui apparaît claire en histologie (Pl. 22A), et qui se révèle composée de petites vésicules vides sur coupes semi-fines et au M.E.T. (Pl. 22C ; 23A, C, E, F). Enfin, le pôle apical, en contact avec la lumière du tubule, présente des microvillosités courtes d'environ 2 μm , caractéristiques de ce type cellulaire (Pl. 23D, E).

Les 7 espèces de Strombidae, n'ont pas toutes fait l'objet d'une analyse ultrastructurale aussi poussée, mais chez les 5 espèces caribéennes, l'organisation que nous venons de présenter a été observée. Les trois régions de la cellule digestive sont toujours présentes, en revanche leurs proportions peuvent varier d'un individu à l'autre comme d'une espèce à l'autre. Le tiers basal est la région qui semble la plus plastique. En effet, lors de certaines observations, cette région occupe près de la moitié de la cellule (Pl. 22B-D), alors que, dans certains cas, elle semble presque absente (Pl. 22A ; 23B, C, E). Toutefois, cette observation est à relativiser car le plan de coupe peut induire de fausses observations. Notons également que le volume occupé par les cellules digestives dans le tubule est également variable. Lors d'une observation type, les tubules digestifs sont « remplis » et la lumière est réduite à une fine ouverture entre les blocs de cellules digestives, mais il arrive que les tubules présentent une lumière largement ouverte avec des cellules digestives de taille réduite. De façon peu fréquente, nous avons également observé des tubules digestifs, remplis de cellules digestives en destruction. Dans ce cas, les limites cellulaires ne sont plus visibles, et un phénomène de fragmentation générale des cellules épithéliales des tubules s'observe. Les canaux sont alors remplis de ce même contenu, à savoir, des cellules épithéliales (surtout digestives) en fragmentation.

2.1.4 Les cellules vacuolaires

Les cellules vacuolaires forment avec les cellules cryptiques un épithélium pseudo-stratifié. Ces deux types cellulaires s'intercalent pour former des groupes de cellules qui sont logés entre les groupes de cellules digestives (Pl. 25). Sur un tubule digestif typique, les cellules vacuolaires sont localisées dans les zones anguleuses. En histologie, elles apparaissent très peu colorées et sont souvent détruites lors de la coupe. Sur coupe semi-fine, leur structure est beaucoup mieux conservée. Elles font en moyenne 78 μm de long et 16 μm de large chez *S. gigas*, 30 μm de long pour 10 μm de large chez *S. costatus*, *S. gallus* et *S. pugilis* et 50 μm de long pour 10 μm de large chez *S. galeatus* et *S. raninus*. Celles de *L. lambis* n'ont pas pu être mesurées du fait d'un problème

de fixation rencontré avec les deux échantillons de cette espèce. L'abondance et la forme des cellules vacuolaires dans la glande sont très variables. Généralement elles représentent le deuxième type cellulaire en nombre et en volume occupé dans le tubule. Il arrive également qu'elles soient réduites à un faible nombre de cellules de petite taille, dans ce cas, les cellules cryptiques, que nous décrivons plus bas, occupent l'espace. La forme des cellules vacuolaires est très variable également. Elles sont polymorphes avec une forme pyramidale de façon générale (Pl. 25). Lorsqu'elles sont bien pyramidales, elles présentent un pôle basal fin, en contact avec la lame basale et un pôle apical évasé qui s'ouvre sur la lumière du tubule (Pl. 25D). Bien que nous n'ayons pas confirmé cette observation au M.E.T., l'observation de coupes semi-fines a révélé la présence de replis de la membrane plasmique au pôle basal de la cellule (Pl. 25C). Le pôle apical des cellules vacuolaires présente quant à lui, des microvillosités (Pl. 25A, B). Sur les échantillons non post-fixés à l'osmium, les cellules vacuolaires sont caractérisées par un cytoplasme presque exclusivement rempli de vésicules qui apparaissent non contrastées en microscopie photonique sur coupe semi-fine comme au M.E.T. (Pl. 25B, D). Sur coupe semi-fine d'échantillons post-fixés, ces vésicules sont métachromatiques (vertes) (Pl. 25C). Le diamètre de ces vésicules varie de 3 à 7 μm suivant les individus et l'espèce considérée. Il est en moyenne de 5 μm toutes espèces confondues. Les observations réalisées n'ont permis d'observer aucune autre structure cytoplasmique que ces vésicules et un noyau, généralement central. Enfin, ce type cellulaire est également caractérisé par la présence très fréquente dans son cytoplasme des symbiotes Sporozoaires décrits dans le chapitre précédent (Pl. 25A, B, D, E).

2.1.5 Les cellules cryptiques

Le troisième et dernier type cellulaire qui compose l'épithélium des tubules digestifs est la cellule cryptique. De forme généralement pyramidale, la taille de ces cellules est très variable sur un même échantillon : quelle que soit l'espèce, elles mesurent de 10 à 50 μm de large au pôle basal et également de 10 à 50 μm de long. En histologie, les cellules cryptiques sont d'aspect granuleux (Pl. 26A, B). Sur les échantillons fixés au bouin, à fort grossissement, les structures qui donnent cet aspect granuleux sont colorées par le bleu alcian à pH 2,5 (Pl. 26B). En coupe semi-fine, les cellules cryptiques présentent de nombreuses petites inclusions sphériques qui occupent parfois la quasi-totalité du cytoplasme (Pl. 26C-F). Un noyau central est également visible en histologie comme sur coupe semi-fine avec un nucléole bien développé. Au M.E.T., les inclusions sphériques se révèlent être des sphérocristaux, c'est à dire de petites inclusions minérales formées par accumulation de

couches concentriques. Ces couches sont bien visibles au M.E.T. puisqu'elles sont alternativement claires et denses aux électrons (Pl. 27A, D-F ; Pl. 28A-C ; Pl. 29A, C). Les sphérocristaux sont de forme sphérique, mais il arrive que deux ou trois d'entre eux fusionnent, après quoi, de nouvelles couches englobent l'ensemble et confère ainsi à l'inclusion une forme plus ovale (Pl. 28B). Le diamètre de ces sphérocristaux varie de 1 à 3 μm , mais la moyenne est d'environ 2 μm toutes espèces confondues. À plus fort grossissement, on observe une zone centrale, un cœur, d'aspect granulo-fibrillaire qui ne semble pas être de la même nature que les anneaux périphériques (Pl. 29A, C). Dans certaines structures, il est possible d'observer une matrice grise, granulo-fibrillaire et peu dense, qui sépare deux couches (Pl. 29A, C). Certains sphérocristaux sont d'aspect homogène, dans ce cas, on ne distingue aucune couche à l'intérieur de la structure (Pl. 28A, C). Les cellules cryptiques sont également caractérisées par un réticulum endoplasmique rugueux très développé (Pl. 27E). Il occupe souvent tout l'espace qui n'est pas pris par le noyau ou les sphérocristaux. La forme typique de la cellule cryptique est pyramidale avec la grande base au pôle basal (Pl. 28C ; 29A). Ainsi, sur un tubule typique, les cellules cryptiques et les cellules vacuolaires s'emboîtent parfaitement pour former un épithélium pseudo-stratifié. Cela étant, la forme « typique » des cellules cryptiques ne s'observe pas systématiquement et dans certains cas, les cellules cryptiques sont plutôt de forme cylindrique, voire fusiforme (Pl. 26E, F). Le pôle apical de ces cellules est étroit et en contact avec la lumière du tubule. Il présente des microvillosités. Le pôle basal, quant à lui, présente des replis de la membrane plasmique, ce qui augmente considérablement la surface d'échange en contact avec la lame basale (Pl. 27C).

2.1.6 Le cycle de la glande digestive

La description qui vient d'être faite des canaux et des trois types cellulaires composant les tubules digestifs est celle de la glande digestive dans son état normal de fonctionnement. Dans la grande majorité des cas, c'est comme cela que nous l'avons observée. Pour autant, il nous a été donné d'observer des échantillons sur lesquels, les tubules ne présentaient pas cette organisation. Dans certains cas, l'épithélium des tubules est complètement désorganisé. Les cellules épithéliales sont fragmentées et l'ensemble se déverse dans la lumière du tubule. Dans ce cas, les canaux sont remplis de cellules épithéliales fragmentées, on y retrouve donc, en grande quantité les « grains bleus » des cellules digestives mais également les symbiotes Sporozoaires ainsi que d'autres débris cellulaires (Pl. 30A). D'autre part, lorsqu'elles sont bien organisées, les cellules épithéliales des tubules occupent la quasi-totalité de l'espace du tubule, ne laissant qu'une fine lumière, mais dans

certains cas, il est possible d'observer des tubules avec des cellules épithéliales plus petites et une lumière plus large (Pl. 30B, C). Notons qu'il est délicat de dégager des informations de ce genre d'observations parce qu'il est difficile de dire ce qui est la part de l'état physiologique de la glande et ce qui revient au traitement de l'échantillon lors de la préparation. Nous nous limiterons donc à constater que les tubules de la glande digestive ne présentent pas systématiquement la même organisation. Lors d'une pêche, plusieurs individus préparés de façon identique peuvent présenter une glande dans deux états physiologiques différents.

2.2 Physiologie de la glande digestive

2.2.1 Étude de la fonction de digestion intracellulaire

Détection cytochimique de l'arylsulfatase

L'observation de coupes semi-fines à l'issue du protocole de détection cytochimique de l'arylsulfatase chez *S. gigas* révèle la présence de précipités de couleur jaune à verte. Ceux-ci sont abîmés par le passage du couteau de verre lors de la préparation des coupes, néanmoins, il est possible de détecter l'activité de l'arylsulfatase sur coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine (Pl. 31A, B). Celle-ci est très clairement localisée dans les cellules digestives et plus précisément dans le tiers apical des cellules. L'observation de coupes ultra-fines au M.E.T. permet de localiser de façon plus précise l'activité de l'enzyme. L'observation au M.E.T. révèle la présence de précipités denses aux électrons sur des coupes non contrastées (Pl 31C-E). Sur une vue d'ensemble, il apparaît que les cellules vacuolaires et les cellules cryptiques ne présentent pas de précipités (Pl. 31C). Ceux-ci ne sont localisés que dans les cellules digestives. L'activité de l'arylsulfatase est détectée dans le tiers apical des cellules digestives. Plus précisément, c'est la zone 1 du tiers apical qui est positive à la détection de l'enzyme (Pl. 31D, E). La majorité des vésicules de petites tailles (de 0,5 à 2 μm de diamètre) présente à l'extrémité apicale de la cellule n'est pas positive pour l'arylsulfatase. Les premiers précipités s'observent dans des vésicules de taille moyenne (1,5 à 3 μm de diamètre). En s'éloignant du pôle apical, l'activité de l'enzyme se fait plus importante et est localisée dans des vésicules de taille croissante (3 à 8 μm de diamètre). L'activité est maximale dans les plus grosses

vésicules d'un diamètre moyen de 8 μm , où le précipité occupe la quasi-totalité de la vésicule (Pl. 31E). En se rapprochant du pôle basal, l'activité de l'enzyme diminue brusquement. Les vésicules deviennent exemptes de précipités. Celles-ci sont alors de taille maximale (9 à 12 μm de diamètre). En se rapprochant du pôle basal, on observe les premiers « grains bleus » caractéristiques de ce type cellulaire. Une faible activité arylsulfatase est parfois détectée dans ces grains, mais elle se limite à quelques zones très localisées à l'intérieur du grain (Pl. 31D). Notons que la spécificité de la réaction a été contrôlée de deux façons. D'une part, par comparaison avec un témoin négatif et d'autre part, par l'analyse en perte d'énergie des précipités observés. Cette dernière a confirmé la présence de baryum et la cartographie de l'élément révèle qu'il est présent dans tout le précipité et uniquement à ce niveau-là, ce qui indique que nous n'avons pas rencontré de problèmes de « fuite » (Pl. 31F).

Détection cytochimique de la phosphatase acide

L'observation au M.E.T. de la glande digestive de *S. gigas* après un protocole de détection cytochimique de la phosphatase acide révèle la présence de précipités denses aux électrons. Les observations réalisées sur *S. gigas* au M.E.T. sont préliminaires, elles ont permis de mettre en évidence l'activité de l'enzyme, en comparaison d'échantillons témoins sur lesquels aucun précipité n'a été détecté. En revanche, ces observations n'ont pas permis de localiser précisément les sites d'activité de la phosphatase acide. Quelques points ont néanmoins attiré notre attention. Premièrement, des précipités ont été observés dans certains noyaux des cellules épithéliales des tubules, plus précisément, au niveau de l'hétérochromatine (Pl. 32A). Deuxièmement, au niveau des microvillosités bordant la lumière des tubules, des précipités ont également été observés (Pl. 32A). Enfin, une activité phosphatase acide semble être mise en évidence au niveau des sphérocristaux des cellules cryptiques (Pl. 32C, D). Suite à ces observations préliminaires, nous avons pu adapter le protocole de détection de la phosphatase acide. Ainsi, dans un deuxième temps, l'observation de coupes semi-fines de glande digestive de *S. gigas*, après cytodétection de l'enzyme, a permis de détecter une activité localisée dans le tiers apical des cellules digestives (Pl. 32E). Dans ce type cellulaire, la phosphatase acide est détectée dans de petites vésicules de 0,5 à 2 μm de diamètre. Celles-ci sont plus nombreuses et plus petites au pôle apical. Malheureusement, pour des raisons logistiques, ces échantillons n'ont pas pu être observés au M.E.T.

Suivi de l'activité des enzymes lysosomales au cours du jeûne et du nourrissage aux aliments de synthèse chez *Strombus pugilis*

Des stress alimentaires préliminaires de durées variables ont été réalisés avec *S. costatus* et *S. pugilis*. L'arylsulfatase et la phosphatase acide ont été détectées au microscope photonique même après des périodes de jeûne de plusieurs semaines. Il a donc été choisi de réaliser la détection cytochimique des enzymes lysosomales sur les lots les plus anciens du laboratoire ainsi que sur un lot témoin. Trois lots de *S. pugilis* ont donc été sélectionnés. Le premier, dénommé T₀, correspond à des individus témoins fraîchement pêchés et sacrifiés, le deuxième, T_{4m} granulés, correspond aux individus ayant été nourris aux granulés d'aquaculture pendant 4 mois et le dernier, T_{5m} jeûne, correspond aux individus ayant jeûné pendant une période de 5 mois. Concernant la phosphatase acide, une activité a été détectée sur les individus T₀ (Pl. 33). Comme pour *S. gigas*, celle-ci se situe principalement dans les cellules digestives, mais elle a également été détectée dans les cellules cryptiques au niveau des sphérocristaux (Pl. 33A). Des précipités de tailles variables (de moins de 100 nm à 1 µm) sont détectés dans le tiers apical des cellules digestives (Pl. 33). Ils sont soit épars dans le cytoplasme, soit concentrés dans des vésicules de 2 à 3 µm de diamètre (Pl. 33D). Rarement, une activité phosphatase acide a également été détectée dans les « grains bleus » caractéristiques des cellules digestives (Pl. 33C). Après 4 mois de nourrissage aux aliments de synthèse, des précipités sont toujours détectables sur les coupes de glandes digestives (Pl. 34A, B). Bien qu'il ne s'agisse que d'une analyse qualitative, nous avons constaté qu'après ce traitement, la phosphatase acide n'est pas détectée de façon aussi importante que sur les témoins T₀. En revanche, après 5 mois de jeûne, l'activité phosphatase acide n'est plus détectable dans les cellules de la glande digestive (Pl. 34C). Concernant l'arylsulfatase, des précipités traduisant l'activité de l'enzyme ont été détectés dans les cellules digestives des trois lots T₀, T_{4m} granulés et T_{5m} jeûne (Pl. 34D, E, F). La localisation de l'enzyme semble être la même que pour *S. gigas*. Des problèmes de fuites ont été constatés sur certains échantillons (Pl. 34 E). Parallèlement à l'activité des enzymes lysosomales, l'évolution de la structure générale des tubules digestifs a également été observée. Sur les trois lots, l'organisation des tubules en trois types cellulaires, cellules digestives, cryptiques et vacuolaires a toujours été observée. En revanche, une modification des proportions de ces types cellulaires a été constatée sur le lot T_{5m} jeûne. Les « grains bleus » des cellules digestives de ce lot présentent des modifications structurelles importantes (Pl. 35B). Enfin, notons que les observations de la glande digestive du lot T_{4m} granulés révèlent une diminution de l'espace occupé par les tubules digestifs au

profit de tissu conjonctif en comparaison du lot témoin où les tubules digestifs sont jointifs (Pl. 35C). D'une façon générale, des modifications structurales sont détectées sur les deux lots T_{4m} granulé et T_{5m} jeune mais chez les individus ayant jeûné, la structure de la glande digestive semble beaucoup plus « perturbée » que chez les individus nourris aux aliments de synthèse (Pl. 35).

2.2.2 Détection histochimique des lipides

La coloration de cryo-coupes de glande digestive de *S. gigas* et *S. pugilis* au bleu B.Z.L. ainsi qu'au noir soudan B a révélé la présence de lipides en quantité importante (Pl. 36). Les lipides sont localisés dans les cellules vacuolaires ainsi que dans les cellules digestives. Dans les cellules digestives la coloration bleue donnée par les deux colorants en présence de lipides est détectée du pôle basal jusqu'à environ la moitié de la cellule où se trouve le grain caractéristique de ce type cellulaire (Pl. 36B, C). Dans les cellules vacuolaires, les lipides sont détectés dans l'ensemble du cytoplasme. La coloration bleue se présente sous forme de petites vésicules sphériques qui entourent les symbiotes lorsque ceux-ci sont présents (Pl. 36C). D'autre part, des lipides ont également été détectés sur cryo-coupes dans les cellules épithéliales des canaux. L'épithélium en « dents de scie » à bordure ciliée est particulièrement bien marqué par le noir soudan B, qui révèle la présence de lipides au pôle apical des cellules (Pl. 36E). La coloration forme une bande qui suit la bordure en « dents de scie ». Des lipides ont également été mis en évidence dans la région située sous le pôle apical des cellules épithéliales des canaux, organisées en épithélium uni-stratifié avec un bourgeonnement du pôle apical (Pl. 36F).

Sur coupes histologiques des échantillons ayant subi le protocole de conservation des phospho- et sphingo-lipides (protocole de post-chromisation de Ciaccio) le bleu B.Z.L. s'est avéré inefficace pour la détection des lipides. En revanche, le noir soudan B a permis de révéler les lipides des cellules vacuolaires et des cellules épithéliales des canaux. Les lipides initialement détectés dans les cellules digestives ne sont pas conservés par le protocole de Ciaccio (Pl. 36D, F).

2.2.3 Analyse élémentaire des sphérocristaux et contamination aux métaux lourds

Analyse par dispersion d'énergie des rayons X (E.D.X.) couplée au M.E.B.

Au M.E.B., les sphérocristaux se présentent sous la forme de petites sphères d'aspect lisse. Sur les

fractures de glande digestive, l'identification de telles sphères comme étant des sphérocristaux s'est faite suivant deux critères: premièrement les sphères doivent posséder un diamètre de 2 µm (+/- 1 µm) et deuxièmement les sphères doivent se trouver à proximité des symbiotes afin de garantir que nous sommes dans le bon type cellulaire : les cellules cryptiques. Sur la base de ces critères, *S. costatus*, *S. gallus*, *S. gigas*, *S. pugilis* et *S. raninus* ont fait l'objet d'analyses en dispersion d'énergie des rayons X (Pl. 37). Sur chaque espèce, plusieurs sphérocristaux ont été analysés dans plusieurs cellules cryptiques. Les spectres obtenus ont révélé la présence de divers éléments qui sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 7 : Éléments détectés lors de l'analyse EDX des sphérocristaux à partir de fractures de glandes digestives de *S. costatus*, *S. gallus*, *S. gigas*, *S. pugilis* et *S. raninus*. Entre parenthèses le nombre de sphérocristaux analysés.

	Al	Ca	Fe	Mg	Mn	P	Zn
<i>Strombus costatus</i> (3)	X	X	X			X	X
<i>Strombus gallus</i> (3)	X	X	X	X		X	X
<i>Strombus gigas</i> (10)	X	X	X	X	X	X	X
<i>Strombus pugilis</i> (15)		X	X	X		X	X
<i>Strombus raninus</i> (5)	X	X		X		X	X

Notons que la composition élémentaire des sphérocristaux est variable. Dans la même cellule, deux sphérocristaux voisins peuvent présenter un spectre différent. Par ailleurs, les éléments Ca, P et Zn sont les seuls que nous ayons retrouvés, au moins une fois, chez les cinq espèces analysées. Ils sont également les éléments les plus fréquemment rencontrés dans les sphérocristaux. Enfin, le phosphore est le seul que nous retrouvons systématiquement dans tous les sphérocristaux analysés quelle que soit l'espèce considérée.

Microscopie électronique à transmission en perte d'énergie des électrons (E.F.T.E.M.)

La structure caractéristique des sphérocristaux sur coupe au M.E.T. est telle qu'ils sont facilement reconnaissables. Sur coupes ultra-fines de *S. gigas*, une fois les sphérocristaux localisés, les éléments Al, Ca, Mg et Fe ont fait l'objet d'une microanalyse en mode spectre (EELS). Cette technique d'analyse élémentaire a confirmée la présence des quatre éléments testés. De plus, la

microanalyse en mode image (E.S.I.) à permis de cartographier les éléments sur le champ d'observation (Pl. 38A-D). De cette cartographie, il ressort que les éléments recherchés sont localisés uniquement dans les sphérocristaux. Il ressort également qu'ils sont, soit répartis de façon uniforme dans la structure des sphérocristaux, soit cantonnés à une ou plusieurs couches selon les cas. Enfin, il a été mis en évidence la présence des éléments Al, Fe et Mg dans le cœur des sphérocristaux (Pl. 38B-D).

Contaminations expérimentales au cadmium et au plomb

Des individus de l'espèce *S. pugilis* ayant été nourris aux granulés contaminés par le Cadmium (CdCl_2 à 100 mg.Kg^{-1}) et le plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à 500 mg.Kg^{-1}) ont été sacrifiés après différentes durées de contamination : 12, 32 et 50 jours. Quelle que soit la durée de nourrissage aux granulés contaminés, l'analyse E.D.X. des sphérocristaux n'a jamais révélé la présence, ni de cadmium, ni de plomb. En revanche l'analyse E.D.X. d'un granulé contaminé, utilisé comme témoin positif, révèle bien la présence de cadmium et de plomb. La structure de la glande digestive des individus contaminés par l'alimentation a été observée sur coupes semi-fines. Ces observations ont révélé que même après la durée de contamination la plus longue, 50 jours, l'organisation de la glande en tubules et en canaux est conservée. À l'échelle de l'observation du microscope photonique, aucune modification notable de l'organisation de la glande n'a été relevée à part la diminution de l'espace occupé par les tubules au profit d'un tissu conjonctif (Pl. 39B). Cette unique modification est la même que celle observée sur les individus nourris aux granulés d'élevage non contaminés (Pl. 35C). Dans un second temps, des individus de *S. pugilis* ont été contaminés au cadmium (CdCl_2 et $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) directement par l'eau du bac d'élevage. Des contaminations préliminaires ont été réalisées pour déterminer les concentrations optimales à utiliser pour l'intoxication. Les concentrations de 10 et 100 mg.l^{-1} induisent une mort systématique des animaux après respectivement quelques jours et quelques heures. À la concentration de 1 mg.l^{-1} , les animaux survivent à la contamination, mais ils montrent d'importants signes de réaction à la présence du toxique tels qu'une intense production de mucus et de fèces. Les fèces sont d'un aspect différent de celles des individus témoins, elles sont filamenteuses et irrégulières. L'analyse structurale de la glande digestive des individus contaminés à 1 mg.l^{-1} révèle que l'organe est totalement déstructuré (Pl. 39E). Aucun tubule digestif normal ne persiste dans la glande. Ces derniers sont totalement désorganisés et difficilement reconnaissables (Pl. 39F). Les canaux sont également difficilement reconnaissables, les cellules qui les bordent ne sont plus organisées en épithélium uni-stratifié, ni

pseudo-stratifié et ils sont pleins d'un contenu hétérogène de cellules fragmentées. Notons cependant que les symbiotes sont toujours présents dans la glande (Pl. 39E, F). Les concentrations 0,1 et 0,5 mg.l⁻¹ se sont révélées optimales. Elles n'induisent pas, ou peu de modifications structurales de la glande digestive. En utilisant ces concentrations, les tubules digestifs présentent toujours une organisation classique. Les cellules digestives, cryptiques et vacuolaires sont bien en place (Pl. 39C, D). À la concentration 0,5 mg.l⁻¹, une diminution de l'espace occupé par les tubules au profit du tissu conjonctif est observée sur certains individus (Pl. 39D). Ces deux concentrations ainsi qu'une troisième, 0,05 mg.l⁻¹, ont donc fait l'objet de notre choix pour réaliser les contaminations au chlorure de cadmium (CdCl₂) via l'eau d'élevage en vue d'analyser par E.D.X. les sphérocristaux des cellules cryptiques. Parallèlement à l'analyse E.D.X. des sphérocristaux, l'activité de la catalase a été dosée. Les résultats de ces dosages sont présentés dans la figure 10.

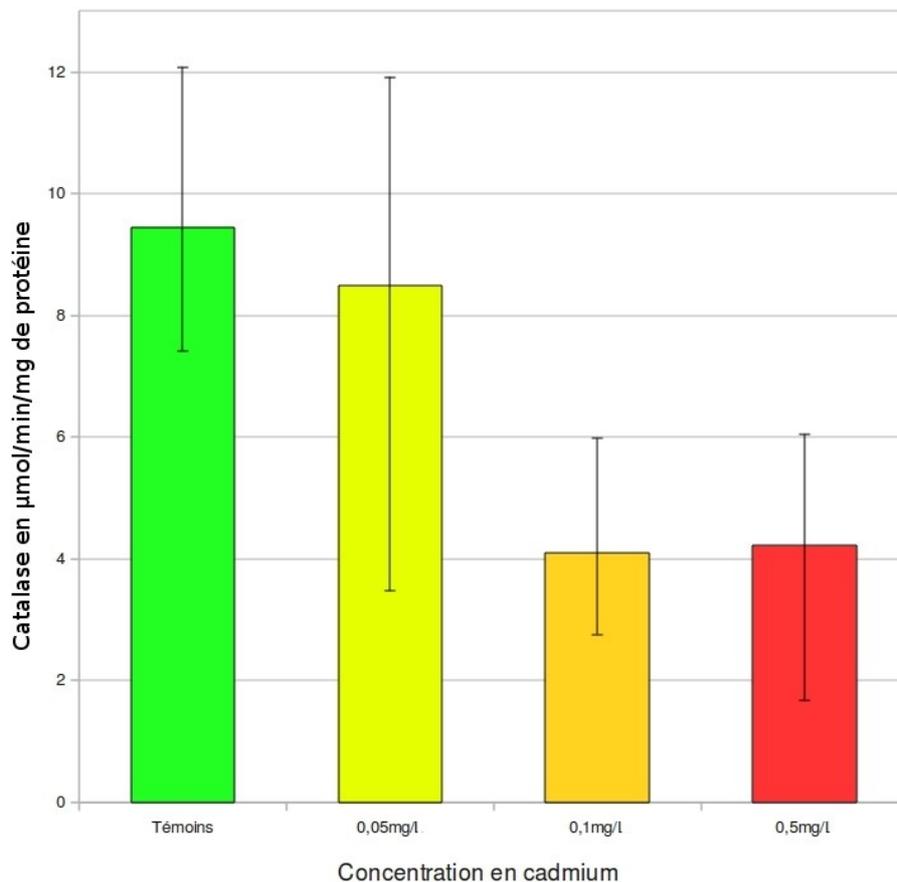


Figure 10 : Activité de la catalase dans la glande digestive de *S. pugilis* contaminés au chlorure de cadmium aux concentrations : 0 (témoin), 0,05 ; 0,1 et 0,5 mg.l⁻¹ pendant trois jours. Pour chaque concentration, trois mesures ont été effectuées sur trois individus répliqués. Les barres d'erreur représentent les valeurs minimales et maximales. Un test de Kruskal-Wallis couplé à une comparaison multiple par paires a confirmé qu'il existe une différence significative entre l'activité chez les témoins et chez les individus contaminés à 0,5 et 0,1 mg.l⁻¹ (K=18,103 ; P<0,001).

À la concentration la plus faible, l'activité de la catalase ne montre pas de différence significative avec les témoins. En revanche, aux concentrations 0,1 et 0,5 mg.l⁻¹, une inhibition de l'enzyme est constatée. Sur les mêmes individus que ceux utilisés pour la détermination de l'activité de la catalase, l'analyse E.D.X. des sphérocristaux a été réalisée. Elle n'a pas révélé la présence de l'élément cadmium. L'analyse des sphérocristaux des individus contaminés pendant 21 jours donne les mêmes résultats.

3 Discussion

3.1 Structure générale de la glande digestive

Elle a fait l'objet de nombreuses descriptions, notamment chez les Bivalves, les Céphalopodes, les Gastéropodes et les Pulmonés. Une organisation en canaux reliés à des tubules digestifs est commune à tous les groupes. En revanche la nature des épithélia tubulaires varie d'un groupe à l'autre et dans certains cas à l'intérieur d'un même groupe. Chez les Bivalves, on ne retrouve généralement que deux types cellulaires dans les tubules digestifs : les cellules digestives (parfois appelées cellules acidophiles) et les cellules cryptiques (parfois appelées cellules basophiles, pyramidales ou encore sécrétrices) (Henry 1984a, b ; Morse *et al.* 1997 ; Pal 1971 ; Pal 1972). Chez les Céphalopodes, l'épithélium des tubules digestifs n'est composé que d'un unique type cellulaire, les cellules digestives, présentes sous la forme de petites cellules pyramidales immatures et de grandes cellules matures (Purchon 1968 ; Semmens 2002 ; Swift *et al.* 2005). La glande digestive des Polyplacophores n'a fait l'objet que de rares études. Les tubules digestifs qui la composent sont formés par deux types cellulaires : les cellules digestives et les cellules basophiles (Lobo-da-Cunha 1997). Chez les Mollusques Gastéropodes enfin, l'épithélium des tubules digestifs semble plus complexe. Il est composé d'au moins trois types cellulaires chez les Gastéropodes Pulmonés : les cellules digestives, les cellules excrétrices et les cellules cryptiques (aussi appelées cellules à calcium, cellules basophiles ou cellules d'accumulation de métaux). Certains auteurs ajoutent à ces trois types cellulaires les cellules fines (indifférenciées) ainsi que les cellules à mucus (Luchtel *et al.* 1997 ; Walker 1970). Dans les tubules digestifs des Gastéropodes Opisthobranches, on reconnaît également trois à quatre types cellulaires : les cellules digestives, les cellules cryptiques (qui regroupent les cellules à calcium, les cellules excrétrices et les cellules fines) et chez *Aplysia californica*, il existe un type cellulaire particulier nommé cellule digestive de rhodoplastes (Coelho *et al.* 1998 ; Lobo-Da-Cunha 2000 ; Taïeb et Vicente 1999 ; Taïeb 2001). Les Caenogastéropodes, dont font partie les Strombidae, sont connus pour présenter des tubules digestifs composés d'au

moins deux types cellulaires : les cellules digestives et les cellules cryptiques pyramidales. Ces dernières regroupent les cellules sécrétrices, les cellules excrétrices, les cellules basophiles et les cellules à calcium auxquelles font référence les différents auteurs. En réalité, il est difficile de savoir si les différents auteurs font référence à un même type cellulaire en le nommant de différentes façons ou s'il s'agit bien de différents types cellulaires. Il est également discuté le fait que ces différentes cellules cryptiques constituent potentiellement différents stades du même type cellulaire (Purchon 1968). Pour synthétiser, nous dirons que le terme « cellule cryptique » englobe toutes les cellules qui se trouvent entre les blocs de cellules digestives. Il s'agit de cellules pyramidales assez petites avec un pôle basal évasé et un pôle apical étroit (Boghen et Farley 1974 ; DEVI *et al.* 1981 ; Fretter et Graham 1962 ; Lutfy et Demain 1967 ; Merdsoy et Farley 1973 ; Voltzow 1994 ; Wigham 1976). Nos observations chez les Strombidae, en accord avec celles de Gros *et al.* (2009), font état de trois types cellulaires bien distincts : les cellules digestives, les cellules vacuolaires et les cellules cryptiques. Les cellules digestives sont, comme cela est décrit dans la littérature, les cellules les plus abondantes des tubules digestifs. Les deux autres types cellulaires occupent l'espace, limité, entre les blocs des cellules digestives, dans les zones anguleuses des tubules. Notre description des cellules cryptiques est semblable à celle présente dans la bibliographie. La forme pyramidale caractéristique, la présence de réticulum endoplasmique rugueux en grande quantité et la présence des sphérocristaux permettent de rapprocher ce type cellulaire de celui largement décrit chez les Mollusques, que l'on retrouve sous le nom de cellule cryptique. En revanche, les cellules vacuolaires présentes chez les Strombidae ne semblent pas communes chez les Mollusques. Elles sont similaires aux cellules vacuolaires décrites chez le Caenogastéropode *Maoricrypta monoxyla* (Nelson et Morton 1979).

3.2 Les cellules digestives

La cellule digestive représente le type cellulaire le plus abondant dans la glande digestive des Strombidae. Il est également décrit comme type cellulaire majoritaire dans les tubules digestifs des Mollusques en général (Lobo-Da-Cunha 2000 ; Lutfy et Demain 1967 ; Owen 1966). De nombreuses études en décrivent la structure et l'ultrastructure en lien avec sa fonction : chez les Bivalves (Henry 1984b; Morse *et al.* 1997 ; Pal 1972), chez les Céphalopodes (Semmens 2002 ; Swift *et al.* 2005) et chez les Polyplacophores (Lobo-da-Cunha 1997). Chez les Gastéropodes, la cellule digestive a également fait l'objet de nombreuses études : chez les Opisthobranches (Coelho *et al.* 1998 ; Lobo-Da-Cunha 2000 ; Taïeb 2001), chez les Pulmonés (Luchtel *et al.* 1997 ; Walker 1970 ; Walker 1972) et chez les Prosobranches (Boghen et Farley 1974 ; Fretter et Graham 1962 ; Lutfy et Demain 1967 ; Merdsoy et Farley 1973 ; Voltzow 1994 ; Wigham 1976). Il ressort de ces études plusieurs caractéristiques de la cellule digestive communes à tous les groupes de Mollusques. Il s'agit du type cellulaire responsable de la digestion intracellulaire. Le pôle apical présente des microvillosités et un système endocyttaire très développé. La fonction d'absorption liée à la digestion intracellulaire semble donc avérée, en revanche, la fonction de sécrétion que plusieurs auteurs lui supposent reste hypothétique. La forme de la cellule digestive est également constante, il s'agit de longues cellules cylindriques. Enfin, de nombreuses vacuoles et de nombreux granules de tailles variables sont détectés dans ce type cellulaire. Nous retrouvons ces caractéristiques chez les Strombidae. Ce qui semble plus spécifique à la cellule digestive des strombes est sa structuration en trois régions distinctes : le tiers basal, le tiers médian et le tiers apical. Le tiers basal est caractérisé par la présence du noyau et d'un cytoplasme vacuolaire. Les vacuoles en question, sont vides au M.E.T. (pour les échantillons non osmiés) et remplies d'un contenu métachromatique (vert) sur coupes semi-fines des échantillons post-fixés au tétr oxyde d'osmium et colorés au bleu de toluidine. L'osmium étant connu pour conserver les lipides, cela suppose que la nature de ces vacuoles est lipidique (Gabe 1968). Ceci est confirmé par l'analyse histochimique de la glande digestive. Le colorant bleu B.Z.L. ainsi que le noir soudan B révèlent la présence de lipides dans le tiers basal des cellules digestives. D'autre part, ces lipides ne sont pas conservés par le protocole de Ciaccio, ce qui indique qu'il ne s'agit ni de phospho- ni de sphingo-lipides (Gabe 1968). Le tiers basal de la cellule semble donc spécialisé dans le stockage de lipides. Dans la littérature, seuls quelques auteurs font référence à des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques au pôle basal des cellules digestives et elles

ne sont pas présentes en aussi grande quantité que chez les Strombidae (Dimitriadis et Andrews 2000 ; Lobo-Da-Cunha 2000). Notons que la cellule digestive a déjà été suspectée de jouer le rôle de stockage de réserves (Owen 1966).

Dans le tiers médian et le tiers apical, on détecte une activité phosphatase acide. Une activité arylsulfatase est détectée dans le tiers apical uniquement. Ces deux enzymes lysosomales sont des marqueurs de la digestion intracellulaire (Kádár *et al.* 2008). De plus, des microvillosités au pôle apical traduisent un processus d'échange entre la lumière du tubule et le pôle apical de la cellule. L'activité de digestion intracellulaire est donc avérée dans les tiers apical et médian de la cellule digestive. Si les études en microscopies photonique et électroniques de la cellule digestive sont nombreuses, en revanche, celles faisant état d'une analyse cytochimique sont plus rares. L'arylsulfatase a déjà été détectée dans les cellules digestives de *Aplysia depilans* (Opisthobranchia) (Lobo-Da-Cunha 2000). L'auteur rapporte une activité détectée dans l'appareil de Golgi, dans les lysosomes ainsi qu'une forte activité dans les hétérolysosomes, dans les régions médiane et apicale de la cellule. Chez le bivalve *Mytilus galloprovincialis* une activité arylsulfatase a également été détectée mais elle est limitée à l'appareil de Golgi (Dimitriadis *et al.* 2004). Chez la même espèce, une autre étude a également montré la présence d'arylsulfatase dans les hétérolysosomes du pôle apical de la cellule ainsi que dans certains corps résiduels de lysosomes (Robledo *et al.* 2006). Enfin, une troisième étude a montré la présence de l'enzyme dans des « granules cytoplasmiques » de la cellule digestive chez *M. edulis* et chez le Pulmoné *Helix aspersa* (Sumner 1969). Chez les Strombidae, on observe une augmentation progressive de la taille des vésicules positives à l'arylsulfatase du pôle apical jusqu'au milieu de la cellule. Ces vésicules de tailles croissantes correspondent sans doute à des hétérolysosomes à différents stades de digestion. La phosphatase acide a également fait l'objet d'une détection cytochimique dans les cellules digestives de quelques Mollusques. Chez le Prosobranch carnivore *Nucella lapillus* et chez le Bivalve *M. galloprovincialis*, elle est détectée dans les hétérolysosomes au milieu de la cellule et, localement, dans certains corps résiduels (Dimitriadis et Andrews 2000 ; Robledo *et al.* 2006). Sumner (1969) rapporte également la présence de cette enzyme dans des « granules cytoplasmiques » de la cellule digestive de *M. edulis* ainsi que dans l'ensemble de la cellule chez *H. aspersa* (Sumner 1969). Chez *S. gigas* et *S. pugilis*, la zone de détection de la phosphatase acide est sensiblement la même que celle de l'arylsulfatase. Les vésicules ou vacuoles de tailles variables du tiers apical de la cellule présentent une réaction positive aux deux enzymes ce qui confirme qu'il s'agit bien de lysosomes et d'hétérolysosomes lorsque leur taille dépasse le micromètre (Sumner 1969). Nous détectons la

phosphatase acide dans les gros grains bleus du tiers médian de la cellule, alors que l'arylsulfatase y est absente. Ces grains de taille remarquable sont très semblables aux gros corps résiduels décrits dans les cellules digestives d'autres Mollusques (Dimitriadis *et al.* 2004 ; Henry 1984b; Lobo-Da-Cunha 2000 ; Taïeb 2001). Lobo-da-Cunha (2000) a montré que ces gros grains caractéristiques résultent de la fusion de tous les hétérolysosomes et corps résiduels lysosomiaux de la cellule. Le pigment lipofushine a été mis en évidence dans de telles structures chez *Aplisya punctata* et chez *Maoricrypta monoxylla* et son rôle dans la détoxification de certains éléments est discuté (Nelson et Morton 1979 ; Taïeb 2001). Dimitriadis et Papadaki (2004) ont également mis en évidence la présence de métaux (Ag, Cu, Hg, Pb et Zn) dans les hétérolysosomes et dans les corps résiduels de la cellule digestive de la moule *M. galloprovincialis*. Des contaminations aux métaux (Al, Cd et Zn) réalisées chez le Pulmoné *Lymnaea stagnalis* ont également montré que les corps résiduels (alors appelés « grains jaunes ») accumulent et séquestrent des éléments traces métalliques (essentiels et non essentiels) et qu'ils représentent ainsi une voie de détoxification de ces éléments (Desouky 2006). Chez *L. littorea* (Prosobranche), une voie de détoxification du Cd a été mise en évidence par séquestration dans les corps résiduels des cellules digestives. Les auteurs font la proposition que le Cd est, dans un premier temps, séquestré par des protéines de liaison de type métallothionéine, puis que les complexes Cd-Métallothionéines sont endocytés par les cellules digestives qui les concentrent alors dans les corps résiduels de lysosomes (Marigomez *et al.* 1990). D'autre part, dans le chapitre III de ce manuscrit, nous avons montré que ces grains sont excrétés de la glande digestive et se retrouvent en très grande quantité dans les fèces des strombes. Cette observation conforte l'hypothèse d'une voie de détoxification qui emprunte le même chemin que l'excrétion des matières non digérées de la glande digestive. Chez les individus en stress alimentaire prolongé, les gros corps résiduels (grains bleus) des cellules digestives subissent des modifications structurales importantes. Ils ne sont plus sphériques et présentent des formes variées (fusiformes et patatoïdes). De telles modifications morphologiques des corps résiduels de cellules digestives, suite à une pollution, ont également été mises en évidence chez la moule *M. galloprovincialis* (Domouhtsidou et Dimitriadis 2001).

La détection cytochimique de l'arylsulfatase sur les lots d'individus nourris aux granulés et des animaux en jeûne est la même que celle du lot témoin. L'enzyme est donc produite par les cellules digestives quel que soit le statut alimentaire de l'animal. La phosphatase acide a quant à elle été détectée fortement sur le lot témoin, un peu plus faiblement sur les individus nourris aux granulés et était absente sur les individus en jeûne. Les deux enzymes lysosomales étudiées ont donc des profils

différents. L'activité de la phosphatase acide réagit au jeûne puisque l'enzyme n'est plus produite par les cellules de la glande digestive lorsque celles-ci ne reçoivent plus de nourriture. Une étude réalisée sur *Helix aspersa* a mis en évidence que, outre la capacité des individus à survivre à un jeûne d'une durée de plus d'un an, la production d'enzymes lysosomales est continue pendant le jeûne. Cinq enzymes lysosomales ont été analysées et parmi elles, seules la phosphatase acide et l'arylsulfatase ont vu leur activité réduite ou stoppée (Sumner 1969). Chez la même espèce, une autre étude a proposé que pendant les six premiers mois de jeûne, l'organisme mobilise les ressources énergétiques stockées (hétérophagie), puisqu'il en vient à utiliser ses propres tissus comme source de nourriture (autophagie) (Porcel *et al.* 1996). L'autophagie des cellules digestives de la glande a également été proposée comme réponse à un jeûne prolongé chez la moule *M. edulis* (McVeigh *et al.* 2006). Nous avons effectivement observé une diminution de la quantité de tubules digestifs dans la glande au cours du jeûne. Ce processus pourrait expliquer pourquoi une activité lysosomale continue d'être détectée dans les cellules digestives des individus en jeûne. Borges *et al.* (2004), qui ont travaillé sur l'effet du jeûne sur *H. aspersa*, ont discuté le fait que la glande digestive puisse être utilisée comme source d'énergie principale durant le jeûne. L'activité phosphatase acide détectée chez les individus nourris aux granulés nous apprend que ceux-ci sont bien métabolisés par les cellules digestives. En effet, la digestion des granulés développés pour l'aquaculture des Strombidae n'avait encore fait l'objet d'aucune analyse cytochimique. Chez les individus nourris aux granulés, nous avons mis en évidence une activité lysosomale faisant intervenir les deux enzymes, phosphatase acide et arylsulfatase, alors que chez les individus en jeûne, on ne détecte une activité que pour une des deux enzymes. Ceci constitue donc la première validation cytochimique de l'efficacité des granulés d'élevage en termes de digestion intracellulaire. La mise en place de nourriture artificielle pour l'aquaculture optimisée passe par une meilleure compréhension du processus de digestion des Strombidae. De plus, la cytochimie s'avère une technique tout à fait appropriée pour suivre l'efficacité de la digestion.

3.3 Les cellules vacuolaires

La cellule vacuaire des Strombidae présente deux caractéristiques principales : 1) elle abrite les symbiotes Sporozoaires ; 2) son cytoplasme est presque exclusivement rempli de gouttelettes lipidiques. Bien qu'aucune analyse quantitative n'ait été réalisée, ce type cellulaire représente une proportion non négligeable de la glande et les réserves lipidiques qu'il abrite sont donc relativement importantes. Les lipides des cellules vacuolaires sont conservés par le protocole de Ciaccio, ce qui indique qu'il s'agit de phospho- et/ou de sphingo-lipides (Gabe 1968). La nature des lipides des cellules vacuolaires est donc différente de celle des lipides des cellules digestives. La présence d'un type cellulaire dédié au stockage des lipides laisse supposer que la glande a une fonction de stockage de réserves énergétiques. Cependant, nous n'avons pas constaté de diminution de la quantité de cellules vacuolaires au cours du jeûne. Les cellules vacuolaires et leurs lipides sont toujours présents chez les individus ayant jeûné plusieurs mois. Chez les individus contaminés aux métaux (Cd et Pb), nous avons même constaté une augmentation importante de la quantité de cellules vacuolaires après seulement quelques jours. La cellule vacuaire est un type cellulaire rarement décrit dans la glande digestive des Mollusques. Seules quelques analyses font état d'un tel type cellulaire (Voltzow 1994). Chez *Maoricrypta monoxylla*, la cellule vacuaire est décrite mais elle ne présente pas les mêmes caractéristiques que celle des Strombidae, notamment pour ce qui est de la présence de lipides. En revanche, on y décrit des sphérules brunes à marron qui pourraient correspondre aux symbiotes des Strombidae (Nelson et Morton 1979). Le stockage de réserves énergétiques fait partie des fonctions supposées et mal connues de la glande digestive des Mollusques (Berthelin *et al.* 2000 ; Owen 1966 ; Voltzow 1994). Bien que nous ayons mis en évidence des réserves importantes de lipides dans ce type cellulaire, il n'est pas certain que ceux-ci soient une forme de stockage de réserves pour pallier un manque de nourriture par exemple. Une étude chez *Helix aspersa* a montré que les individus soumis à un jeûne prolongé finissent par mourir de faim sans pour autant que les réserves lipidiques de la glande digestive aient été utilisées (Borges *et al.* 2004). Une autre étude sur la même espèce propose que l'utilisation des lipides de la glande soit cyclique et liée à la reproduction (Porcel *et al.* 1996). Une analyse biochimique des lipides de la glande s'avère nécessaire pour préciser leur nature et donc leur rôle physiologique.

3.4 Les cellules cryptiques

3.4.1 Caractérisation du type cellulaire

La cellule cryptique est, après la cellule digestive, le type cellulaire le plus documenté de la glande digestive des Mollusques. Elle porte le nom de cellule à calcium, cellule sécrétrice, cellule pyramidale, cellule basophile (Lobo-da-Cunha 1999), cellule à ferments ou encore cellule excrétrice (Fretter et Graham 1962 ; Merdsoy et Farley 1973 ; Voltzow 1994). Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, il est difficile de savoir si ces différentes dénominations qualifient un même type cellulaire, ou s'il en existe plusieurs. Certains auteurs proposent de regrouper sous le nom de cellule cryptique toutes les cellules qui sont localisées dans les « cryptes » des tubules digestifs, c'est à dire, dans les zones anguleuses des tubules, entre les blocs de cellules digestives (Taïeb et Vicente 1999). Chez les Strombidae, la cellule cryptique est la cellule pyramidale, caractérisée par la présence de petites inclusions sphériques, les sphérocristaux. Elle a fait l'objet d'une unique description par Gros *et al.* (2009). En histologie, du fait de sa petite taille, ce type cellulaire n'est pas facilement observable. En revanche, au M.E.T., les études ultrastructurales de la glande digestive ont permis de caractériser ce type cellulaire chez les différents groupes de Mollusques. Il s'agit d'une cellule généralement de forme pyramidale avec une base évasée en contact avec la lame basale de l'épithélium. La membrane plasmique en contact avec la lame basale présente, dans certains cas, des invaginations associées à la présence de réticulum endoplasmique rugueux et de mitochondries (Lobo-da-Cunha 1999 ; Lutfy et Demain 1967 ; Taïeb et Vicente 1999). Le pôle apical de la cellule, étroit, est en contact avec la lumière du tubule et présente des microvillosités. Le cytoplasme de la cellule est dense et présente un réticulum endoplasmique rugueux extrêmement développé ainsi qu'un noyau central de grosse taille avec un nucléole proéminent (Fretter et Graham 1962 ; Lobo-da-Cunha 1999 ; Lutfy et Demain 1967 ; Merdsoy et Farley 1973 ; Taïeb et Vicente 1999 ; Voltzow 1994 ; Wigham 1976). La cellule cryptique des Strombidae présente les mêmes caractéristiques. Malgré les nombreuses observations réalisées, le rôle physiologique de la cellule cryptique reste assez mal compris. Le rapport nucléo-cytoplasmique élevé ainsi que la présence, importante, de réticulum endoplasmique rugueux laisse supposer que la cellule présente une activité de synthèse protéique intense. Gros *et al.* (2009) ont confirmé cela grâce à un marquage fluorescent *in situ* des ribosomes qui s'est révélé fortement positif dans ce type

cellulaire chez *S. gigas*. Il a été proposé que cette synthèse de protéines traduisait une fonction de sécrétion d'enzymes dans la lumière du tubule. C'est d'ailleurs ce qui vaut aux cellules cryptiques le nom de cellules sécrétrices dans certains cas. La détection cytochimique d'enzymes lysosomales a montré que ce type cellulaire n'est pas impliqué dans la digestion intracellulaire (Lobo-da-Cunha 1999). Lors des protocoles de cytochimie, nous avons mis en évidence la présence de phosphatase acide dans les cellules cryptiques au niveau des sphérocristaux. Une activité phosphatase alcaline a déjà été détectée au niveau des sphérocristaux chez l'Arthropode *Raillietiella sp.* (Pentastomida: Cephalobaenida) dans les cellules de l'intestin moyen (Thomas *et al.* 1999). Dimitriadis *et al.* (2004) rapportent, quant à eux, une activité β -glucuronidase au niveau des sphérocristaux des cellules basophiles de la moule *M. galloprovincialis* et proposent que l'enzyme soit présente sous une forme inactive dans l'inclusion et qu'elle sera activée une fois le granule sécrété dans la lumière du tubule pour participer à la digestion extracellulaire du bol alimentaire. La détection d'enzymes lysosomales dans les cellules cryptiques peut avoir deux explications : 1) soit elle traduit un processus de recyclage cellulaire d'organites cytoplasmiques ; 2) soit elle confirme la fonction supposée de production et de sécrétion d'enzymes digestives dans la lumière du tubule pour participer à une « pré-digestion » extracellulaire. Dimitriadis *et al.* (2004) ont également proposé qu'il y ait un transfert d'enzymes des cellules cryptiques aux cellules digestives. Bien que nous ne soyons pas en mesure de déterminer clairement l'implication de ce type cellulaire dans le processus de sécrétion d'enzymes pour la digestion extracellulaire, nos observations nous permettent d'écarter l'hypothèse de son implication dans la digestion intracellulaire du bol alimentaire. En effet, la trop faible activité des enzymes lysosomales, ainsi que l'absence de corps résiduels permet d'écarter cette fonction qui est définitivement prise en charge par les cellules digestives. En revanche, la forme de la cellule, ainsi que la présence d'invaginations de la membrane plasmique au pôle basal, invite à penser à un processus d'absorption d'éléments de l'hémolymphe. D'autre part, l'activité de synthèse protéique intense ainsi que le pôle apical en contact avec la lumière nous permet d'émettre l'hypothèse que les éléments récupérés au pôle basal subissent un traitement dans le corps cellulaire avant d'être excrétés au pôle apical. Un tel processus pourrait correspondre aux fonctions supposées de détoxification et d'osmorégulation attribuées à la glande digestive.

3.4.2 Les sphérocristaux de la cellule cryptique

Le dernier constituant remarquable de la cellule cryptique est le sphérocrystal. Bien qu'ils ne soient

pas détectés systématiquement dans les cellules cryptiques, les sphérocristaux sont souvent caractéristiques de ce type cellulaire. Également appelés sphérites (Lipovšek Delakorda *et al.* 2009 ; Lobo-da-Cunha 1999), sphérules (Taïeb et Vicente 1999), granules de phosphate (Gibbs *et al.* 1998) ou granules de calcium (Gallien *et al.* 2001), ces structures sont de petites inclusions minérales sphériques formées par l'accumulation de couches concentriques autour d'une matrice. Elles sont supposément impliquées dans des processus de détoxification et d'osmorégulation de certains minéraux (Greaves *et al.* 1984 ; Howard *et al.* 1981 ; Lipovšek Delakorda *et al.* 2009 ; Simkiss et Mason 1988 ; Taïeb et Vicente 1999). Les sphérocristaux ont été observés et décrits chez les Mammifères (Gallien *et al.* 2001), chez les Annélides (Ireland et Richards 1977 ; Jenkins *et al.* 2002 ; Mouneyrac *et al.* 2003), et largement décrits et étudiés chez les Arthropodes (Ballan-Dufrançais 2002 ; Barka 2007 ; Chavez-Crooker *et al.* 2003 ; Lipovšek Delakorda *et al.* 2009 ; Lipovšek *et al.* 2002 ; Schill et Köhler 2004 ; Thomas *et al.* 1999) et ils existent probablement chez d'autres groupes taxinomiques. Les sphérocristaux ont également été décrits chez les Mollusques, notamment chez les Pulmonés *H. aspersa* (Greaves *et al.* 1984 ; Howard *et al.* 1981) et *Deroceras reticulatum* (Tribskorn et Köhler 1996) et chez le Gastéropode Opistobranche *Aplysia punctata* (Taïeb et Vicente 1999). Chez les Gastéropodes Prosobranches, plusieurs études ont été réalisées sur les sphérocristaux de la glande digestive de *Littorina littorea* (Nott et Langston 1989 ; 1993 ; Nott *et al.* 1993) et une synthèse sur la composition des sphérocristaux chez les Prosobranches rapporte leur présence dans 40 espèces appartenant à 20 familles différentes (Gibbs *et al.* 1998). Ces structures, largement répandues dans le règne animal, n'ont fait l'objet que de quelques dizaines de publications, et les mécanismes qui sous-tendent leur formation et leurs rôles physiologiques restent mal compris. Il a été proposé que les sphérocristaux soient formés par dépôts de sels de pyrophosphate (CaMgP_2O_7) qui agissent comme un piège pour les éléments traces métalliques (Masala *et al.* 2002 ; Taylor *et al.* 1988). Il a également été proposé que les métaux prennent la place du magnésium dans la structure cristalline (Nott et Nicolaidou 1989). Le rôle du manganèse a été suggéré dans la formation et la structuration des sphérocristaux (Masala *et al.* 2002). Taïeb et Vicente (1999) ont proposé un schéma pour leur formation. Ils ont observé que ces structures se forment au niveau du réticulum endoplasmique rugueux autour d'un cœur constitué de mucopolysaccharides et que l'appareil de Golgi joue également un rôle dans la mise en place de ce cœur granulo-fibrillaire organique autour duquel viendront précipiter les couches concentriques d'éléments minéraux. Les colorations au bleu alcian réalisées chez *S. pugilis* ont mis en évidence la présence de mucopolysaccharides au niveau des sphérocristaux, cette observation confirme

l'hypothèse de Taïeb et Vicente (1999) quant à la nature organique du cœur des sphérocristaux. Ces auteurs proposent que l'ensemble des organites (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries) de la cellule cryptique soit dédié à l'élaboration des sphérocristaux. Ceci est à relativiser puisque chez certains Mollusques, des cellules cryptiques avec les mêmes caractéristiques (R.E.G., Golgi et mitochondries abondantes) sont décrites alors que les sphérocristaux en sont absents (Lobo-da-Cunha 1999).

Chez les Strombidae, les éléments Al, Ca, Fe, Mg, Mn, P et Zn ont été détectés suivant les espèces de Strombidae analysées, les éléments Ca, P et Zn étant détectés chez toutes les espèces. Gibbs *et al.* (1998) proposent quatre types de spectres E.D.X. qu'ils mettent en relation avec des groupes taxinomiques chez les Prosobranches. Nous ne pouvons rapprocher les spectres des Strombidae d'un de ces quatre types. Les analyses par spectroscopie en perte d'énergie des électrons (EELS) sont beaucoup plus rares et pourtant bien plus précises, avec des seuils de détection beaucoup plus bas que les analyses E.D.X. À notre connaissance, seules trois études sur les sphérocristaux font état d'une analyse EELS (Lipovšek *et al.* 2002 ; Triebkorn et Köhler 1996) ou EELS couplée à de l'analyse E.D.X. (Delakorda *et al.* 2008). Les microanalyses E.F.T.E.M. réalisées sur coupes ultra-fines, nous ont permis de confirmer la présence de certains éléments et de les cartographier sur le champ d'observation. Nous avons ainsi pu apprendre que les éléments sont parfois répartis de façon homogène dans le sphérocrystal, et parfois cantonnés à une zone précise (cœur ou anneaux périphériques). L'analyse EELS offre de nombreuses possibilités pour l'étude des sphérocristaux en cela qu'elle est bien plus sensible que l'analyse E.D.X. et qu'elle permet notamment de discriminer les éléments à des degrés d'oxydation différents, ou impliqués dans des structures moléculaires différentes. Nous recommandons vivement son usage pour des investigations futures sur la formation et le fonctionnement des sphérocristaux.

3.4.3 Osmorégulation et détoxification des métaux essentiels

Ce que nous retiendrons des analyses élémentaires est que, premièrement, les éléments composants la structure cristalline des sphérocristaux chez les Strombidae sont le calcium, le magnésium et le phosphore, avec une présence systématique du phosphore. Et que les éléments traces métalliques qui sont séquestrés sont l'aluminium, le fer, le manganèse et surtout le zinc. Ces quatre éléments traces sont des métaux essentiels, en ce sens qu'ils sont naturellement présents dans le métabolisme des organismes vivants et qu'ils sont nécessaires au bon fonctionnement de certains processus métaboliques (Goyer 1997). Les sphérocristaux sont connus pour être impliqués dans la régulation de certains éléments minéraux. Chez les Strombidae, il s'agit des éléments que nous venons de citer. Il est fort probable que la cellule cryptique, qui présente une morphologie adaptée à l'absorption d'éléments de l'hémolymphe, joue un rôle régulateur pour les éléments détectés dans les sphérocristaux. Des analyses E.D.X. ont déjà été réalisées sur les sphérocristaux d'autres familles. Les éléments communément retrouvés sont les suivants : Ca, Fe, K, Mg, Mn et Zn (Gibbs *et al.* 1998). Certaines analyses rapportent également la présence d'éléments tels que Cl, Cu, Na, Ni, S, Ti et V (Nott et Langston 1989 ; Nott *et al.* 1993 ; Nott et Nicolaidou 1996). La nature calcaire de la coquille des Strombidae est à mettre en lien avec la présence d'un système de régulation d'éléments minéraux tels que le calcium et le magnésium. Porcel *et al.* (1996) ont mis en évidence qu'au cours du jeûne prolongé, l'épaisseur de la coquille de *H. aspersa* (Pulmoné) diminue et que le rapport Mg/Ca de la coquille et celui de la glande digestive varient proportionnellement. Ils proposent que les minéraux récupérés de la coquille soient transférés via l'hémolymphe à la glande digestive, où ils seront pris en charge par les cellules à calcium (équivalent des cellules cryptiques des Strombidae). De plus, certains éléments minéraux séquestrés dans les sphérocristaux sont impliqués dans l'équilibre acide-base de l'organisme (Porcel *et al.* 1996) et le rôle des sphérocristaux dans la régulation des ions et du pH des fluides corporels a déjà été avancé (Nicolaidou et Nott 1998).

La morphologie de la cellule cryptique, son activité métabolique intense, ainsi que la présence de sphérocristaux capables de stocker et donc de réguler des minéraux tels que Ca, Mg, mais également des métaux tels que Al, Fe, Mn et Zn, sont autant d'éléments qui nous permettent d'attribuer une fonction de régulation à ce type cellulaire. D'autre part, la présence d'éléments traces métalliques (Al, Fe, Mn et Zn) suggère également son implication dans la gestion de l'excès de ces métaux essentiels, autrement dit dans la détoxification. La détoxification d'éléments traces métalliques

peut prendre plusieurs formes. Elle peut consister en une séquestration des éléments toxiques en excès qui restent dans l'organisme sous une forme inactive donc non toxique, ou, elle peut consister en une élimination des éléments en excès, hors de l'organisme. Les observations des fèces des Strombidae n'ont été réalisées qu'au microscope optique, ce qui n'est pas suffisant pour détecter les sphérocristaux, en revanche, certains auteurs ont réalisés des expérimentations poussées afin de vérifier si les sphérocristaux sont libérés dans la lumière des tubules et s'ils sont excrétés de l'organisme via les fèces. Ces deux informations ont été vérifiées chez *L. littorea*, *Cerithium vulgatum* et *Monodonta mutabilis* (Nott et Nicolaidou 1990 ; 1993 ; 1996). Ces études ont par ailleurs mis en évidence un processus de bioréduction le long de la chaîne alimentaire. En effet, dans les fèces de carnivores nourris avec de la glande digestive de *L. littorea*, on retrouve les sphérocristaux issus des tissus consommés. De plus, des analyses élémentaires ont mis en évidence que ceux-ci ont conservé 50 % de leur teneur en zinc et 33 % de leur teneur en manganèse, après leur passage dans le tube digestif du prédateur (Nott et Nicolaidou 1990 ; 1993).

3.4.4 détoxification des métaux non essentiels

Afin de répondre à la question : « Les sphérocristaux sont-ils impliqués dans la détoxification des métaux dits non essentiels ? », nous avons réalisé des contaminations expérimentales au cadmium et au plomb. Quel que soit le mode de contamination (via la nourriture ou via l'eau d'élevage), quelle que soit la nature du polluant ($Pb(NO_3)_2$, $CdCl_2$ ou $Cd(NO_3)_2$) et quel que soit le temps de contamination, nous n'avons jamais détecté de traces de cadmium ou de plomb dans les sphérocristaux de la glande digestive. Nous devons être très vigilants quant à de possibles biais dans l'expérimentation qui seraient la cause d'un résultat négatif, c'est pourquoi la détection du cadmium et du plomb a été réalisée sur des granulés contaminés afin de vérifier la « détectabilité » de ces deux éléments. La concentration en cadmium de ce témoin positif est de l'ordre de $100 \mu g.g^{-1}$, or, il a été montré que dans la glande digestive d'un individu contaminé au cadmium à $0,4 mg.l^{-1}$ pendant 30 jours, on retrouve l'élément cadmium à la concentration de $150 \mu g.g^{-1}$ (Nott et Langston 1989). De plus, si le cadmium est piégé dans les sphérocristaux, on peut s'attendre à des concentrations locales bien plus fortes que la moyenne calculée sur l'ensemble de l'organe. De la même manière, des contaminations expérimentales via l'eau environnante ont montré que la concentration en métaux (Co, Mn et Zn) est de 64 à 94 fois supérieure dans les tissus que dans l'eau après seulement sept jours de traitement (Metian *et al.* 2009a). Deuxièmement, la question de la perte du cadmium et du plomb lors de la préparation des échantillons doit également être posée. Une étude de Nott *et al.*,

(1993) est consacrée à cela. Ils rapportent que la cryo-fixation est la meilleure technique pour conserver les éléments tel que Cd, Mg et K et leurs proportions relatives, mais que la fixation chimique à la glutaraldéhyde, si elle peut entraîner des modifications des ratios entre les éléments, n'a pas d'impact sur la détection qualitative de ceux-ci (Nott *et al.* 1993). Il a également été vérifié dans la bibliographie que la déshydratation par l'acétone n'aboutit pas à un lessivage du cadmium et du plomb (Gallien *et al.* 2001 ; Ireland et Richards 1977 ; Nott *et al.* 1993). Enfin, l'activité de la catalase, qui est un biomarqueur du stress oxydatif, lui-même induit par la contamination aux métaux lourds, a été dosée dans la glande digestive. L'activité de la catalase peut être utilisée comme biomarqueur de la contamination au cadmium. En effet, en réponse à une contamination au cadmium l'activité de la catalase peut être partiellement inhibée (Chandran *et al.* 2005). Chez *S. pugilis*, elle s'est vue inhibée à partir d'une concentration en cadmium de 0,1 mg.l⁻¹. D'autre part, la glande digestive était d'autant plus déstructurée que la concentration en cadmium était importante. Ces deux informations nous permettent de confirmer que le cadmium a bien atteint l'organe cible de notre étude : la glande digestive. Dans la bibliographie, un seul article rapporte la détection de cadmium dans des sphérocristaux. Il s'agit d'une étude menée chez un Mammifère marin, le dauphin à flancs blancs *Lagenorhynchus acutus*. Les auteurs ont détecté par analyse E.D.X. un ratio Ca/Cd de 10/1 au cœur des sphérocristaux présents dans le rein de l'animal. Ils décrivent cette détection du cadmium dans les sphérocristaux comme une première du genre (Gallien *et al.* 2001). Chez les Mollusques, la glande digestive est connue pour concentrer les éléments traces métalliques, notamment le cadmium (Bustamante *et al.* 1998 ; 2000 ; 2008 ; Desouky 2006 ; Pernice *et al.* 2009). Plusieurs analyses ont été réalisées sur des individus contaminés au laboratoire ou issus de milieux contaminés et aucune ne rapporte la présence de cadmium dans les sphérocristaux de la glande digestive (Bebianno *et al.* 1993 ; Marigomez *et al.* 1990 ; Nott et Langston 1989 ; 1993). Seule une étude rapporte la présence de l'élément dans des granules mesurant jusqu'à 40 µm dans les cellules du tissu conjonctif autour des vaisseaux sanguins (Nott *et al.* 1993). Il a été proposé que les sphérocristaux puissent séquestrer et donc détoxiquer les métaux de classe A tels que Ca, Co, Fe, Mg, Mn, Ni, K et Zn alors que les métaux de classe B (Ag, Cd, Cu et Hg) s'associent plutôt aux protéines de type métallothionéines riches en soufre (Nott et Langston 1989 ; Nott et Nicolaidou 1989). Nos résultats vont également dans ce sens. Une étude réalisée sur la palourde *Ruditapes decussata* a également rapporté qu'à l'issue d'une contamination au cadmium, la majorité de l'élément est pris en charge par des métallothionéines cytosoliques (Bebianno *et al.* 1993). Nott et Langston (1989) rapportent qu'à l'issue d'une contamination, 60 % du cadmium se

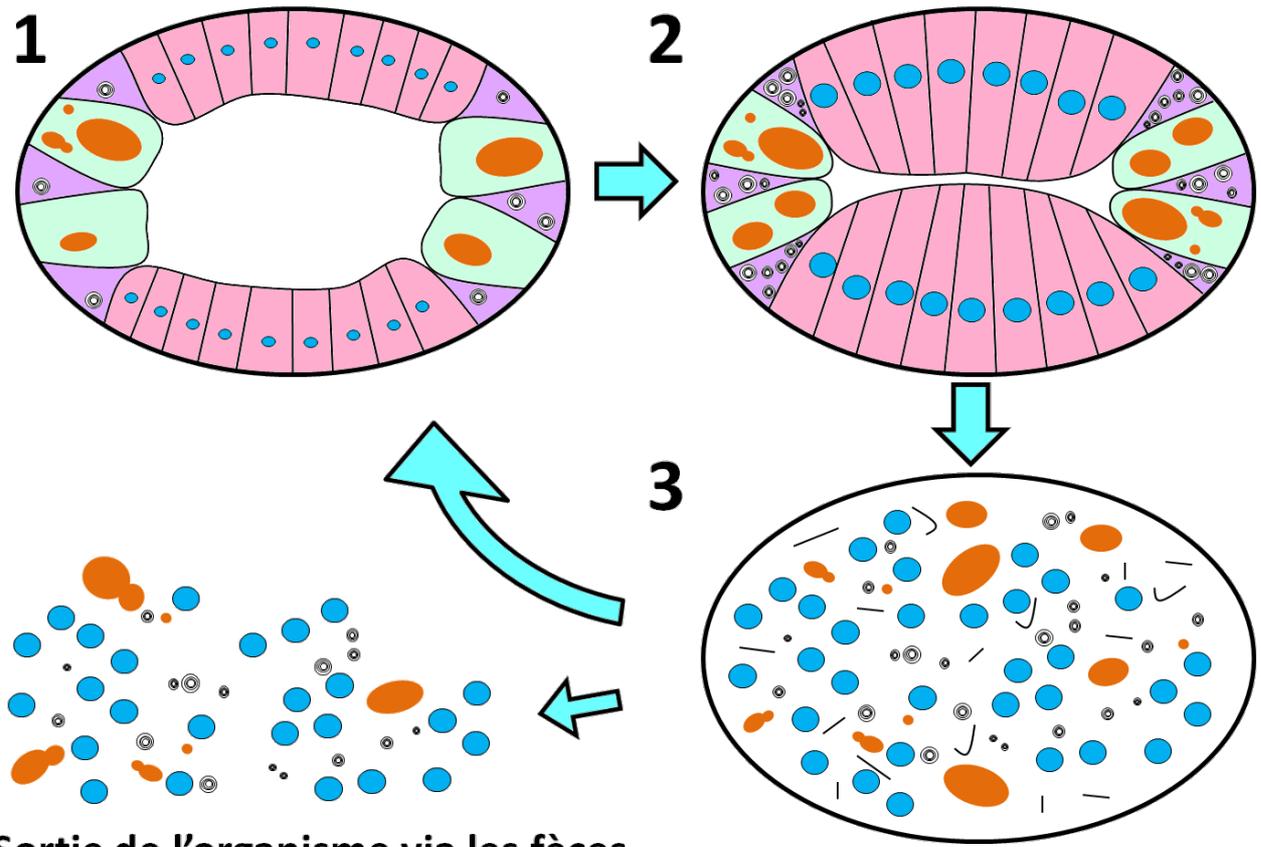
trouve dans la fraction soluble des tissus, liés aux métallothionéines et que 40 % se trouvent liés à des particules ou granules. Une étude portant sur deux Bivalves, *Gafrarium tumidium* et *Isognomon isognomon*, rapporte également que la majorité du cadmium entré dans l'organisme est dans la fraction cytosolique, lié à des métallothionéines (Metian *et al.* 2005). Une étude portant sur sept espèces de Céphalopodes abonde également dans le sens d'une gestion majoritairement cytosolique du cadmium et pointe ainsi du doigt l'importante biodisponibilité de ce toxique pour les maillons supérieurs de la chaîne trophique (Bustamante *et al.* 2002). Nott *et al.* (1993) proposent pour leur part que le cadmium présent dans l'eau rentre dans l'organisme via la branchie. Il rejoint ensuite l'hémolymphe où il se lie aux hémocyanines avant d'être transféré à des métallothionéines (CdBP-1 puis CdBP-2). Les complexes ainsi formés rejoindraient ensuite les différents organes cibles (rein, glande digestive) où ils sont endocytés et séquestrés dans des hétérolysosomes qui deviendront des corps résiduels (Nott *et al.* 1993).

Concernant le plomb, certaines études relatent une accumulation de cet élément dans la glande digestive des Mollusques (Dimitriadis *et al.* 2003 ; Metian *et al.* 2009b), cela étant nous n'avons pas trouvé de référence faisant état de cet élément dans les sphérocristaux. Seule une publication rapporte la détection du plomb dans des sphérocristaux présents dans les tissus chloragogènes des vers de terre *Lumbricus rubellus* et *Dendrobaena rubida* (Ireland et Richards 1977). En 2003, Dimitriadis *et al.* ont réalisé une étude sur la localisation du mercure et du plomb dans la glande digestive de la moule *M. galloprovincialis*. Par autométallographie, ils détectent le plomb dans les corps résiduels et les hétérolysosomes des cellules digestives (Dimitriadis *et al.* 2003). Certains auteurs rapportent que le rein, plus que la glande digestive des Mollusques, est un organe impliqué dans la bioaccumulation et la détoxification du plomb (Bustamante et Miramand 2005 ; Metian *et al.* 2009b; Pernice *et al.* 2009).

Pour conclure, les contaminations expérimentales couplées aux techniques d'analyses élémentaires (EELS et E.D.X.) nous permettent d'écarter les sphérocristaux comme voie de détoxification des éléments tels que le cadmium et le plomb. Cependant, chez le Caenogastéropode *L. littorea*, une augmentation du nombre de cellules basophiles (ou cryptiques) a été mise en relation avec une contamination expérimentale au cadmium, ce qui suggère malgré tout une implication de ce type cellulaire dans la détoxification de cet élément (Zaldibar *et al.* 2008). Des analyses élémentaires des lysosomes et des corps résiduels des cellules cryptiques et digestives, ainsi que des lipides des cellules vacuolaires, s'avèrent une perspective intéressante pour déterminer quels types cellulaires et quelles structures cellulaires sont impliqués dans la détoxification de ces deux éléments.

3.5 Le cycle de la glande digestive

Les observations réalisées sur les différentes espèces de Strombidae nous ont appris que la glande digestive peut se trouver dans états différents. Bien qu'elle présente le plus souvent des tubules digestifs dont les cellules épithéliales sont bien structurées, il nous a été donné d'observer certains individus présentant des tubules digestifs dont les cellules épithéliales étaient complètement détruites et formaient une matrice hétérogène libérée dans la lumière du tubule. Le cas échéant, les canaux secondaires étaient également remplis d'un contenu identique à celui des tubules. Un fonctionnement cyclique de la glande digestive a été décrit chez certains Mollusques, notamment chez ceux vivant dans la zone intertidale et donc soumis au cycle des marées (Nelson et Morton 1979 ; Zaldibar *et al.* 2004). Chez le Bivalve *Lasaea rubra*, Owen (1966) a décrit une alternance de phases de construction et de destruction de l'épithélium des tubules digestifs. Il a par ailleurs proposé que l'apport de nourriture, rythmé par les marées, le stylet cristallin ainsi que l'épithélium des tubules de la glande digestive fonctionnaient de façon cyclique et synchronisée. Chez d'autres Mollusques, non soumis au cycle des marées, un tel fonctionnement a été conservé. Il a été proposé que la destruction des tubules digestifs permettait une libération massive d'enzymes digestives dans l'estomac participant ainsi à une pré-digestion extracellulaire du bol alimentaire (Morton 1979). Sur la base des observations réalisées ainsi que des informations issues de la bibliographie, nous proposons de résumer schématiquement le fonctionnement global des tubules digestifs dans la figure 11.



Sortie de l'organisme via les fèces

Figure 11 :Schéma théorique proposé pour le fonctionnement cyclique de la glande digestive des Strombidae. Au **stade 1**, les cellules épithéliales n'occupent pas tout l'espace du tubule et la lumière est largement ouverte. Après une phase de croissance des cellules épithéliales, on observe le **stade 2**, où les cellules digestives, encore en pleine activité de digestion intracellulaire, ont accumulé les matières non digérées dans leurs grains bleus cytoplasmiques. Les cellules cryptiques ont, quant à elles, absorbé minéraux et métaux essentiels de l'hémolymphe par le pôle basal. Elles les ont séquestrés et accumulés dans leurs sphérocristaux cytoplasmiques. Enfin, une phase de destruction (**stade 3**) intervient, les cellules épithéliales sont détruites, libérant ainsi leur contenu dans la lumière du tubule. Sphérocristaux, grains bleus et symbiotes, sont alors libérés en direction du tube digestif et seront évacués de l'organisme via les fèces de l'animal. De cette façon, les matières non digérées (grains bleus), mais également des éléments traces métalliques sont excrétés de l'organisme.

*Chapitre V : Conclusion générale et
perspectives*

Des associations mutualistes célèbres, comme celle du poisson clown avec son anémone, jusqu'aux parasitoses les plus meurtrières comme le *Plasmodium* responsable du paludisme, nous savons aujourd'hui que les interactions durables sont partout. Nous savons qu'elles ont joué et qu'elles continuent de jouer un rôle majeur dans l'évolution de la vie. C'est la symbiose qui a permis à la cellule Eucaryote de voir le jour, c'est la symbiose qui permet à certains organismes de coloniser des milieux extrêmes, autour des sources hydrothermales profondes notamment. Plus simplement, c'est aussi la symbiose qui rend possible la digestion du bois par les termites ou des plantes par les bovins. La fixation de l'azote atmosphérique par certaines légumineuses, la colonisation des eaux oligotrophes par les coraux ou encore l'équilibre du sol des forêts et son exploitation optimisée grâce aux mycorhizes sont autant d'exemples illustrant l'importance écologique, biogéochimique et évolutive de la symbiose dans la nature. La recherche fondamentale, comme la recherche appliquée, porte un intérêt croissant aux interactions durables. En recherche fondamentale, à l'échelle de la biologie cellulaire, de nombreuses connaissances sont encore à acquérir, notamment quant à l'origine des compartiments de la cellule Eucaryote.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une endosymbiose impliquant des Gastéropodes et des Sporozoaires. L'espèce « phare » de notre étude, *Strombus gigas* est une des ressources marines importante de la Caraïbe. Elle présente également une importance écologique non négligeable de par sa position dans les réseaux trophiques. Dans l'hypothèse de départ, les Sporozoaires étaient considérés comme des parasites perturbateurs du cycle de reproduction de leur hôte, *S. gigas*. L'un des objectifs principaux de cette étude était la caractérisation de la relation symbiotique Strombidae-Sporozoaires. Les travaux réalisés durant ces trois années de thèse ont permis de révéler que les symbiotes initialement décrits chez *S. gigas*, sont également détectés dans les cellules vacuolaires de la glande digestive des six autres espèces de la famille des Strombidae ainsi que chez les deux espèces de Gastéropode d'eau douce. Nous sommes donc en présence d'une **endosymbiose de faible spécificité**. De plus, nous avons montré que la présence des symbiotes est systématique. Tous les individus analysés au cours de ce travail abritent des symbiotes quels que soient leur âge et leur localisation géographique. Autrement dit, les symbiotes ont une **prévalence de 100 %** et la symbiose peut être considérée comme **stable et durable**. Les résultats indiquent que **la transmission des symbiotes** se fait au moins **verticalement** et une voie potentielle de **transmission horizontale** a été mise en évidence. L'ensemble de ces informations nous a amené à reconsidérer l'hypothèse d'une parasitose et à proposer que les Sporozoaires et les Strombidae entretiennent une **relation peu, voire non virulente** de type **commensalisme** ou **mutualisme**. En

introduction du chapitre III, nous avons présenté neuf caractéristiques qui permettent d'apprécier la nature des symbioses. Les travaux effectués nous ont permis d'en préciser quelques-unes (en gras ci-dessus). Nous ne sommes, malgré tout, qu'au début de la caractérisation de la relation et il reste notamment deux points primordiaux à préciser :

1. Existe-t-il des échanges trophiques ou métaboliques entre l'hôte et le symbiote ? En effet, nous n'avons pas d'informations quant à la nature des échanges qui ont lieu entre les deux partenaires.
2. Il faudrait obtenir de l'A.D.N. exploitable pour réaliser une analyse phylogénétique sur les symbiotes.

Les perspectives que nous souhaitons proposer concernant la caractérisation de la relation sont donc axées sur ces deux points. Pour ce qui est du premier point, nous avons mis en évidence la présence d'éléments traces métalliques dans la coque des Sporozoaires. Nous avons également montré que ces derniers sont expulsés de l'organisme de l'hôte par les fèces. Cela représente une piste majeure concernant la nature de la coopération entre l'hôte et le symbiote. Il ne s'agit que d'une hypothèse mais il est possible que le symbiote soit impliqué dans un processus de détoxification des tissus de l'hôte. Les éléments zinc, fer ou cuivre, sont naturellement présents dans la coque des symbiotes. Il serait intéressant de maintenir des individus hôtes dans un environnement enrichi en l'un de ces éléments et de suivre grâce à l'analyse E.D.X. l'évolution de cet élément dans la coque des symbiotes. Suivant la même logique, il serait également envisageable d'utiliser la technique du nanoSIMS qui permet de visualiser au M.E.T. la distribution d'éléments lourds. Le nanoSIMS couplé à une analyse pulse-chase permettrait de mettre en évidence un éventuel transfert d'éléments de l'hôte aux symbiotes. Nous avons vu que les symbiotes sont détectés chez les Strombidae et chez les Ampullariidae, qui sont des familles de Gastéropodes microphages et herbivores, alors qu'ils sont absents des quelques Gastéropodes carnivores qui ont été analysés. Il serait intéressant d'effectuer un échantillonnage plus large, incluant plusieurs familles de Gastéropode afin de préciser quels sont ceux qui présentent l'association avec les Sporozoaires. Ceci afin de voir s'il existe une réelle corrélation entre la présence des symbiotes et un paramètre écologique tel que le régime alimentaire.

Concernant le second point, les protocoles d'extraction d'A.D.N. les plus encourageants sont ceux incluant une pré-incubation en hypochlorite de sodium. Il serait bon de poursuivre les efforts dans ce sens. L'autre approche, qui consiste à n'amplifier que les gènes de l'A.R.N.r. 18S du symbiote,

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives

avec des amorces spécifiques, à partir d'une extraction d'A.D.N. total de la glande, reste intéressante. D'autant plus qu'une fois effective, cette technique permettra de détecter la présence des symbiotes dans les embryons et de confirmer de façon certaine le mode de transmission verticale. Une fois l'A.D.N.r. des symbiotes séquencé, il sera également possible d'utiliser des sondes oligonucléotidiques spécifiques des symbiotes pour réaliser des protocoles d'hybridation *in situ*. Cela serait d'une grande aide pour commencer à comprendre, entre autre, le cycle écologique des symbiotes. Enfin, l'analyse phylogénétique des symbiotes permettra, notamment, de répondre à la question : les Strombidae sont-ils tous associés à la même espèce de Sporozoaires ou en existe-t-il plusieurs espèces ?

Le deuxième objectif de ce travail consistait à préciser nos connaissances sur le fonctionnement de l'organe hôte de la relation, la glande digestive. Il est important de pouvoir attribuer aux différents types cellulaires de la glande des fonctions physiologiques. Nous avons observé, à l'échelle de la structure et de l'ultrastructure, les glandes digestives des sept espèces de Strombidae. Des expérimentations ont également été mises en place afin de comprendre quel rôle physiologique est joué par quel type cellulaire. Il a été mis en évidence que les symbiotes sont hébergés par les cellules vacuolaires, qui sont dédiées au stockage de lipides. Le processus de digestion intracellulaire a été mis en évidence dans les cellules digestives et nous avons montré qu'une activité lysosomale est toujours détectable dans ce type cellulaire, même après une période de jeûne prolongé. L'étude de la physiologie de la digestion chez les Strombidae, et plus généralement chez les Mollusques, représente un enjeu majeur dans la mise en place de filières aquacoles. Nous avons pu montrer que la nourriture artificielle développée pour l'élevage des Strombidae, induit une activité phosphatase acide dans les cellules de la glande, ce qui constitue une validation de la digestion effective de ce type de nourriture. La cytochimie et l'analyse ultrastructurale de la glande digestive sont à préconiser pour la mise en place de nourriture optimisée et, de nombreuses perspectives sont à envisager en ce sens.

Par ailleurs, les fonctions d'osmorégulation de certains minéraux et de détoxification des éléments traces essentiels semblent être attribuées aux cellules cryptiques, qui, par l'intermédiaire des sphérocristaux, sont capables de piéger et de stocker des éléments suivant : Al, Ca, Fe, Mg, P et Zn. La capacité des sphérocristaux de prendre en charge la détoxification de métaux non essentiels tels que le cadmium ou le plomb semble, en revanche, écartée. Cette seconde catégorie d'éléments traces métalliques emprunte probablement des voies métaboliques différentes. Parmi les perspectives dans ce domaine, une analyse élémentaire des corps résiduels des cellules digestives

est à réaliser afin de savoir si ces structures, que l'on retrouve en grande quantité dans les fèces, sont impliquées dans l'élimination des métaux non essentiels. D'une façon générale, nous avons pu constater les grandes possibilités qu'offrent les techniques d'analyses élémentaires que sont l'analyse par spectrométrie en perte d'énergie des électrons (EELS) et l'analyse en dispersion d'énergie des rayons X (E.D.X.). Ces deux techniques, couplées à la microscopie électronique, sont encore assez peu utilisées dans le domaine de l'écotoxicologie et nous envisageons de les utiliser dans des expérimentations à venir. Parmi les perspectives qu'elles offrent, nous proposons d'effectuer des contaminations aux éléments traces métalliques (essentiels et non essentiels) afin de réaliser au M.E.T., grâce à l'analyse E.D.X. et à l'EELS, la cartographie des contaminants sur coupe de la glande digestive, afin de mettre en évidence le devenir des polluants (prise en charge par les sphérocrystaux, les métallothionéines, les lysosomes, les lipides...) dans les tissus de la glande digestive. Les Mollusques sont souvent employés comme espèce bio-indicatrice de la qualité des milieux, il est donc important d'aller vers une meilleure compréhension des voies métaboliques de gestion des xénobiotiques.

Au commencement de cette thèse, nous pensions travailler sur un parasite. Durant ces trois années de recherche, notre vision des Sporozoaires associés aux Strombidae a évolué et nous sommes maintenant en mesure de proposer qu'il s'agisse d'organismes endosymbiotiques non virulents vivant en coopération avec plusieurs groupes de Gastéropodes. Dans la bibliographie, les descriptions de la glande digestive de nombreux Mollusques font référence à des structures apparemment proches des symbiotes que nous étudions et leur supposent un rôle dans la détoxification. Il pourrait s'agir d'organismes appartenant au même groupe que les symbiotes des Strombidae. De fait, nous sous-estimons peut-être encore le niveau d'intégration de ces symbiotes. Ceux-ci pourraient avoir établi une relation mutualiste avec leur hôte il y a fort longtemps et être aujourd'hui présents dans de très nombreux Mollusques. La nature précise de la coopération reste à étudier...

Références

- Adams JE (1970) Conch fishing industry of Union Island, Grenadines, West Indies. *Tropical Science* 12(4): 279-288
- Adl SM, Leander BS, Simpson AG, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge DJ, Mann DG, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Smirnov AV, Spiegel F (2007) Diversity, nomenclature, and taxonomy of Protists. *Systematic Biology* 56(4): 684-689
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR (2005) The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(5): 399-451
- Aldana Aranda D, Baqueiro Cárdenas E, Montero J, Frenkiel L (2009a) Attenuated reproduction of *Strombus gigas* by an Apicomplexa parasite. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 61: 498-502
- Aldana Aranda D, Glazer R, Delgado G, Baqueiro Cárdenas E, Montero J (2009b) Occurrence of Apicomplexa infecting queen conch, *Strombus gigas*, from off shore and near shore in Florida. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 61: 491-497
- Aldana Aranda D, Frenkiel L, Baqueiro Cárdenas E, Zetina Zarate A, Garcia Moliner G, Rodriguez A, Mateo Pérez J, Tagliafico A, Castro E, Camarena T, Arenciba G (2007) Geographic distribution of Apicomplexa infecting *Strombus gigas*. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 59: 355-359
- Aldana Aranda D (2003) El Caracol *Strombus gigas*: Conocimiento integral para su manejo sustentable en el caribe. 165p. Impresos profesionales Aranda

- Aldana Aranda D et Perez Perez M (2007) Abundance and distribution of queen conch (*Strombus gigas*, Linné 1758) veligers of Alacranes reef, Yucatan, Mexico. *Journal of Shellfish Research* 26(1): 59-63
- Aldana Aranda D, Frenkiel L, Zetina Zarate A, Garcia Santaella E, Rios E, Saenz R, Brullé T (2007) Digestive gland as a feed index for juveniles of queen conch *Strombus gigas* reared with formulated food. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 60: 516-518
- Aldana Aranda D et Suárez VP (1998) Overview of diets used in larviculture of three caribbean conchs: Queen conch *Strombus gigas*, milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture* 167(3-4): 163-178
- Aldana Aranda D, Patiño-Suárez V, Brulé T (1997) Nutritional potentialities of *Chlamydomonas coccoides* and *Thalassiosira fluviatilis*, as measured by their ingestion and digestion rates by the queen conch larvae (*Strombus gigas*). *Aquaculture* 156(1-2): 9-20
- Allen JA (1958) On the basic form and adaptations to habitat in the Lucinacea (Eulamellibranchia). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 241(684): 421-484
- Alyakrinskaya IO (2003) Certain biological traits and morphobiochemical adaptations to nutrition in *Strombus decorus raybaudii* Nicolay and Manoja, 1983. *Biology Bulletin* 30(2): 171-179
- Alyakrinskaya IO (2001) The dimensions, characteristics and functions of the crystalline style of molluscs. *Biology Bulletin* 28(5): 523-535
- Appeldoorn RS (1987) Assessment of mortality in an offshore population of queen conch, *Strombus gigas* L., in southwest Puerto Rico. *Fishery Bulletin* 85(4): 797-804
- Ariste-Zelise O (2010) Variation du cycle reproductif de *Strombus pugilis* en fonction de l'abondance d'Apicomplexa le long de la côte de l'état de Campeche, mexique. *Rapport de Master 2, Université des Antilles et de la Guyane*. 40p
- Avila Poveda OH et Baqueiro Cárdenas ER (2009) Reproductive cycle of *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Caenogastropoda: Strombidae) from Archipelago of San Andres, Providencia and Santa

Catalina, Colombia. *Invertebrate Reproduction and Development* 53(1): 1-12

Azevedo C et Padovan I (2004) *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51(2): 214-219

Azevedo C et Cachola R (1992) Fine structure of the Apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine Bivalve Molluscs. *Diseases of Aquatic Organisms* 14: 69-73

Ballan-Dufrançais C (2002) Localization of metals in cells of Pterygote insects. *Microscopy Research and Technique* 56(6): 403-420

Ballantine DL et Appeldoorn RS (1982) Queen conch culture and future prospect in Puerto Rico. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 35: 59-63

Bandi C, Dunn AM, Hurst GDD, Rigaud T (2001) Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in Parasitology* 17(2): 88-94

Baqueiro Cárdenas E, Aldana Aranda D, Martínez Olivares G (2005) Gonad development and reproductive pattern of the fighting conch *Strombus pugilis* (Linné, 1758) (Gastropoda, Prosobranchia) from Campeche, Mexico. *Journal of Shellfish Research* 24(4): 1127-1133

Baqueiro Cárdenas E, Frenkiel L, Aldana Aranda D (2007a) One more threat for the queen conch *Strombus gigas*? Coccidian (Apicomplexa) infection of *S. gigas* digestive gland (preliminary results). *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 58: 421-426

Baqueiro Cárdenas E, Frenkiel L, Zetina Zarate AI, Aldana Aranda D (2007b) Coccidian (Apicomplexa) parasite infecting *Strombus gigas* Linné, 1758 digestive gland. *Journal of Shellfish Research* 26(2): 319-321

Barka S (2007) Insoluble detoxification of trace metals in a marine Copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to copper, zinc, nickel, cadmium, silver and mercury. *Ecotoxicology* 16(7): 491-502

Bebianno MJ, Nott JA, Langston WJ (1993) Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: The role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology* 27(3-4): 315-334

- Bedhomme S, Agnew P, Vital Y, Sidobre C, Michalakis Y (2005) Prevalence-dependent costs of parasite virulence. *PLoS Biology* 3(8): 1403-1408
- Beier JC, Chadee DD, Charran A, Comiskey NM, Wesson DM (1995) Country-wide prevalence of *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae), a Protozoan parasite of *Aedes aegypti* in Trinidad, West Indies. *Journal of American Mosquito Control Association* 11(4): 419-423
- Belli SI, Smith NC, Ferguson DJP (2006) The Coccidian oocyst: A tough nut to crack! *Trends in Parasitology* 22(9): 416-423
- Berg Jr. CJ et Alatalo P (1984) Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. *Aquaculture* 39(1-4): 165-179
- Berg CJ (1975) Behavior and ecology of conch (superfamily Strombacea) on a deep subtidal algal plain. *Bulletin of Marine Science* 25(3): 307-317
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 125(3): 359-369
- Boettcher AA (2005) Heat shock induced metamorphosis of the queen conch, *Strombus gigas*: Comparison with induction by algal associated cues. *Journal of Shellfish Research* 24(4): 1123-1126
- Boghen A et Farley J (1974) Phasic activity in the digestive gland cells of the intertidal Prosobranch, *Littorina saxatilis* (olivi) and its relations to the tidal cycle. *Journal of Molluscan Studies* 41(1): 41-55
- Borges E, Vuaden FC, Cognato GDP, Fauth MDG, Bonan CD, Turcato G, Rossi ICDC, Dias RD (2004) Effects of starvation on haemolymphatic glucose levels, glycogen contents and nucleotidase activities in different tissues of *Helix aspersa* (Müller, 1774) (Mollusca, Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 301(11): 891-897
- Brito Manzano N, Aldana Aranda D, Baqueiro Cárdenas E (1999) Development, growth and

survival of larvae of the fighting conch *Strombus pugilis* L. (Mollusca, Gastropoda) in the laboratory. *Bulletin of Marine Science* 64(2): 201-203

Brito-Manzano N et Aldana Aranda D (2004) Development, growth and survival of the larvae of queen conch *Strombus gigas* under laboratory conditions. *Aquaculture* 242(1-4): 479-487

Bush AO, Fernández JC, Seed JR (2001) *Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites*. 566p. Cambridge University Press, Cambridge.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* 83(4): 575-583

Bustamante P et Miramand P (2005) Subcellular and body distributions of 17 trace elements in the variegated scallop *Chlamys varia* from the french coast of the bay of Biscay. *Science of the Total Environment* 337(1-3): 59-73

Bustamante P, Cherel Y, Caurant F, Miramand P (1998) Cadmium, copper and zinc in octopuses from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. *Polar Biology* 19(4): 264-271

Bustamante P, González AF, Rocha F, Miramand P, Guerra A (2008) Metal and metalloid concentrations in the giant squid *Architeuthis dux* from iberian waters. *Marine Environmental Research* 66(2): 278-287

Bustamante P, Cosson RP, Gallien I, Caurant F, Miramand P (2002) Cadmium detoxification processes in the digestive gland of Cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Marine Environmental Research* 53(3): 227-241

Bustamante P, Grigioni S, Boucher-Rodoni R, Caurant F, Miramand P (2000) Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the Nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin* 40(8): 688-696

Caro A, Got P, Bouvy M, Troussellier M, Gros O (2009) Effects of long-term starvation on a host Bivalve (*Codakia Orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population. *Applied and Environmental Microbiology* 75(10): 3304-3313

Casal G, Padovan I, Matos E, Padovan P, Matos P, Guimarães A, Azevedo C (2007) Morphological

and ultrastructural redescription of *Calyptospora serrasalmi* Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1986 (Apicomplexa: Calyptosporidae), a parasite found in two new host species of the genus *Serrasalmus*. Brazilian Journal for Morphological Sciences 24(1): 11-16

Castro Gonzalez E, Frenkiel L, Baqueiro Cárdenas E, Aldana Aranda D (2007) Atypical reproductive cycle of the queen conch *Strombus gigas* (Mollusca: Gastropoda). Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute 58: 419-425

Castro-Vazquez A, Albrecht EA, Vega IA, Koch E, Gamarra-Luques C (2002) Pigmented corpuscles in the midgut gland of *Pomacea canaliculata* and other neotropical apple-snails (Prosobranchia, Ampullariidae): A possible symbiotic association. Biocell 26(1): 101-109

Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S, Aruchami M (2005) Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the Gastropod, *Achatina fulica*. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 140: 422-426

Chavez-Crooker P, Pozo P, Castro H, Dice MS, Boutet I, Tanguy A, Moraga D, Ahearn GA (2003) Cellular localization of calcium, heavy metals, and metallothionein in lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreas. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 136(3): 213-224

Cipriani R, Guzman HM, Vega AJ, Lopez M (2008) Population assessment of the conch *Strombus galeatus* (Gastropoda, Strombidae) in Pacific Panama. Journal of Shellfish Research 27(4): 889-896

Claiborne A (1985) Catalase activity. In: Greenwald RA (ed) Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, pp 283

Cob ZC, Arshad A, Bujang JS, Ghaffar MA (2008) Sexual maturity and sex determination in *Strombus canarium* linnaeus, 1758 (Gastropoda: Strombidae). Journal of Biological Sciences 8(3): 616-621

Cob ZC, Arshad A, Ghaffar MA, Bujang JS, Muda WLW (2009) Development and growth of larvae of the dog conch, *Strombus canarium* (Mollusca: Gastropoda), in the laboratory. Zoological Studies 48(1): 1-11

- Coelho L, Prince J, Nolen TG (1998) Processing of defensive pigment in *Aplysia californica*: acquisition, modification and mobilization of the red algal pigment, r-phycoerythrin by the digestive gland. *Journal of Experimental Biology* 201(3): 425-438
- Colgan DJ, Ponder WF, Beacham E, Macaranas J (2007) Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42(3): 717-737
- Combes C (2001) *L'art d'être parasite. Les associations du vivant*. 362p. Flammarion, Paris.
- Combes C (1995) *Interactions durables : Écologie et évolution du parasitisme*. 524p. Masson, Paris.
- Combes C (1997) Fitness of parasites: Pathology and selection. *International Journal of Parasitology* 27(1): 1-10
- Cox LR (1960) Thoughts on the classification of the Gastropoda. *Journal of Molluscan Studies* 33(6): 239
- Cox FEG (2002) Systematics of the parasitic Protozoa [2]. *Trends in Parasitology* 18(3): 108
- Cox FEG (1994) The evolutionary expansion of the Sporozoa. *International Journal of Parasitology* 24(8): 1301-1316
- De Bary A (1879) *Die erscheinung der symbiose*. 30p. Verlag von Karl J. Trübner, Strasbourg.
- De Jesus-Navarrete A, Davis M, Shawl AL (2007) Development and growth of the hawk wing conch, *Strombus raninus* (Gmelin, 1791) in culture conditions: Egg mass to early juvenile stage. *Veliger* 49(1): 44-50
- Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME, Boulétreau M (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11): 6247-6252
- Delakorda SL, Letofsky-Papst I, Novak T, Giovannelli M, Hofer F, Pabst MA (2008) Application of elemental microanalysis to elucidate the role of spherites in the digestive gland of the Helicid snail *Chilostoma lefeburiana*. *Journal of Microscopy* 231(1): 38-46

- Desouky MMA (2006) Tissue distribution and subcellular localization of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 77(2): 143-152
- Desser SS et Bower SM (1997) The distribution, prevalence, and morphological features of the cystic stage of an apicomplexan parasite of native littleneck clams (*Protothaca staminea*) in British Columbia. *Journal of Parasitology* 83(4): 642-646
- Devi C, Rao KH, Shyamasundari K (1981) Observations on the histology and cytochemistry of the digestive gland in *Pila virens* (Lamarck) (Mollusca: Gastropoda). *Proceedings of Indian Academy of Sciences Section B* 90: 307-314
- Dimitriadis VK et Papadaki M (2004) Field application of autometallography and X-ray microanalysis using the digestive gland of the common mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59(1): 31-37
- Dimitriadis VK et Andrews EB (2000) Ultrastructural and cytochemical study of the digestive gland cells of the marine Prosobranch Mollusc *Nucella lapillus* (L.) in relation to function. *Malacologia* 42(1-2): 103-112
- Dimitriadis VK, Domouhtsidou GP, Cajaraville MP (2004) Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus Galloprovincialis* (L.) in relation to function. *Journal of Molecular Histology* 35(5): 501-509
- Dimitriadis VK, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E (2003) Localization of Hg and Pb in the palps, the digestive gland and the gills in *Mytilus galloprovincialis* (L.) using autometallography and X-ray microanalysis. *Environmental Pollution* 125(3): 345-353
- Domouhtsidou GP et Dimitriadis VK (2001) Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environmental Pollution* 115(1): 123-137
- Douglas AE (2008) Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist* 177(4): 849-858
- Dufour SC et Felbeck H (2006) Symbiont abundance in Thyasirids (Bivalvia) is related to

- particulate food and sulphide availability. *Marine Ecology Progress Series* 320: 185-194
- Dunn AM et Smith JE (2001) Microsporidian life cycles and diversity: The relationship between virulence and transmission. *Microbes Infection* 3(5): 381-388
- Dunn AM, Terry RS, Taneyhill DE (1998) Within-host transmission strategies of transovarial, feminizing parasites of *Gammarus duebeni*. *Parasitology* 117(1): 21-30
- Durfee PT (1978) Incidence and prevalence defined. *Australian Veterinary Journal* 54(8): 405-406
- Duszynski DW et Gardner SL (1991) Fixing Coccidian oocysts is not an adequate solution to the problem of preserving Protozoan type material. *Journal of Parasitology* 77(1): 52-57
- Dwyer G, Levin SA, Buttel L (1990) A simulation model of the population dynamics and evolution of myxomatosis. *Ecological Monographs* 60(4): 423-447
- Fenn K et Blaxter M (2006) *Wolbachia* genomes: Revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends in Parasitology* 22(2): 60-65
- Foissner W (2008) Protist diversity and distribution: Some basic considerations. *Biodiversity and Conservation* 17(2): 235-242
- Forbes ML (1966) Life cycle of *Ostrea permollis* and its relationship to the host sponge, *Stelletta grubii*. *Bulletin of Marine Science* 16(2): 273-301
- Frank SA (1996) Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* 71(1): 37-78
- Frenkiel L, Pruvost L, Zetina Zarate A, Enriquez Diaz M, Aldana Aranda D (2009) Reproductive cycle of the queen conch *Strombus gigas* L. 1758 in Guadeloupe FWI. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 61: 518-520
- Fretter V et Graham A (1962) *British Prosobranch Molluscs: Their functional anatomy and ecology.* 756p. The Ray Society Series, Londres.
- Friedman CS, Gardner GR, Hedrick RP, Stephenson M, Cawthorn RJ, Upton SJ (1995) *Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca). *Journal of Invertebrate Pathology* 66(1): 33-38

- Gabe M (1968) Techniques histologiques. 1113p. Masson, Paris.
- Gallien I, Caurant F, Bordes M, Bustamante P, Miramand P, Fernandez B, Quellard N, Babin P (2001) Cadmium-containing granules in kidney tissue of the Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) off the Faroe Islands. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 130(3): 389-395
- Gascoigne J et Lipcius RN (2004) Conserving populations at low abundance: Delayed functional maturity and allee effects in reproductive behaviour of the queen conch *Strombus gigas*. *Marine Ecology Progress Series* 284: 185-194
- Gestal C et Santiago P (2002) Comparative x-ray microanalysis of the sporocyst wall of *Aggregata octopiana* and *Aggregata eberthi* (Protista: Apicomplexa). *European Journal of Protistology* 38(3): 209-211
- Gestal C, Guerra A, Pascual S (2007) *Aggregata octopiana* (protista: Apicomplexa): A dangerous pathogen during commercial *Octopus vulgaris* ongrowing. *ICES Journal of Marine Science* 64(9): 1743-1748
- Gestal C, Páez de la Cadena M, Pascual S (2002a) Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms* 51(1): 61-65
- Gestal C, Guerra A, Pascual S, Azevedo C (2002b) On the life cycle of *Aggregata eberthi* and observations on *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae) from Galicia (NE Atlantic). *European Journal of Protistology* 37(4): 427-435
- Gestal C, Guerra A, Abollo E, Pascual S (2000) *Aggregata sagittata* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), a coccidian parasite from the european flying squid *Todarodes sagittatus* (Mollusca: Cephalopoda). *Systematics Parasitology* 47(3): 203-206
- Gestal C, Nigmatullin CM, Hochberg FG, Guerra A, Pascual S (2005) *Aggregata andresi* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from the Ommastrephid squid *Martialia Hyadesi* in the SW Atlantic Ocean and some general remarks on *Aggregata* spp. in Cephalopod hosts. *Systematics Parasitology* 60(1): 65-73

- Gibbs PE, Nott JA, Nicolaidou A, Bebianno MJ (1998) The composition of phosphate granules in the digestive glands of marine Prosobranch Gastropods: Variation in relation to taxonomy. *Journal of Molluscan Studies* 64(4): 423-433
- Glauert AM et Hall C (1991) Epoxy resins: An update on their selection and use. *European Microscopy and Analysis* 25: 13-18
- Gomez AMG, Orozco ALD, Sevilla NPM, Gil LAR (2007) Obtaining of egg masses of the snail, *Strombus pugilis* (Mesogastropoda: Strombidae) under laboratory conditions. *Revista of Biologia Tropical* 55(1): 183-188
- Gomori G (1952) *Microscopic histochemistry: Principles and practice*. 273p. University of Chicago Press Chicago, Chicago.
- Goyer RA (1997) Toxic and essential metal interactions. *Annual Review of Nutrition* 17: 37-50
- Grassé PP (1960) *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie*. Tome V, fascicule III. 1083p. Masson et Cie, Paris.
- Greaves GN, Simkiss K, Taylor M, Binsted N (1984) The local environment of metal sites in intracellular granules investigated by using X-ray-absorption spectroscopy. *Biochemical Journal* 221(3): 855-868
- Gros O, Frenkiel L, Aldana Aranda D (2009) Structural analysis of the digestive gland of the queen conch *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 and its intracellular parasites. *Journal of Molluscan Studies* 75(1): 59-68
- Gustafson RG et Reid RGB (1988) Association of bacteria with larvae of the gutless Protobranch Bivalve *Solemya reidi* (Cryptodonta: Solemyidae). *Marine Biology* 97(3): 389-401
- Henry M (1984a) Ultrastructure des tubules digestifs d'un mollusque bivalve marin, la palourde *Ruditapes decussatus* L., en métabolisme de routine. II la cellule sécrétrice. *Vie Marine* 6: 17-24
- Henry M (1984b) Ultrastructure des tubules digestifs d'un mollusque bivalve marin, la palourde *Ruditapes decussatus* L., en métabolisme de routine. I la cellule digestive. *Vie Marine* 6: 7-15

- Hopsu VK, Arstila A, Glenner GG (1965) A method for electron microscopic localization of arylsulphatase. *Annale Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fenniae* 43(2): 114-116
- Horiuchi S et Lane CE (1966) Carbohydrases of the crystalline style and hepatopancreas of *Strombus gigas* Linné. *Comparative Biochemistry and Physiology* 17(4): 1189-1197
- Horiuchi S et Lane CE (1965) Digestive enzymes of the crystalline style of *Strombus gigas* Linné. I. cellulase and some other carbohydrases. *The Biological Bulletin* 129(2): 273-281
- Howard B, Mitchell PC, Ritchie A, Simkiss K, Taylor M (1981) The composition of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). *Biochemical Journal* 194(2): 507-511
- Ireland MP et Richards KS (1977) The occurrence and localisation of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. *Histochemistry* 51(2-3): 153-166
- Ironside JE, Smith JE, Hatcher MJ, Sharpe RG, Rollinson D, Dunn AM (2003) Two species of feminizing microsporidian parasite coexist in populations of *Gammarus duebeni*. *Journal of Evolutionary Biology* 16(3): 467-473
- Jarvinen JA (1999) Prevalence of *Eimeria macusaniensis* (Apicomplexa: Eimeriidae) in Midwestern *Lama* spp. *Journal of Parasitology* 85(2): 373-376
- Jenkins CD, Ward ME, Turnipseed M, Osterberg J, Lee Van Dover C (2002) The digestive system of the hydrothermal vent Polychaete *Galapagomystides aristata* (Phyllodocidae): Evidence for hematophagy? *Invertebrate Biology* 121(3): 243-254
- Jovani R et Tella JL (2006) Parasite prevalence and sample size: Misconceptions and solutions. *Trends in Parasitology* 22(5): 214-218
- Kádár E, Davis SA, Lobo-Da-Cunha A (2008) Cytoenzymatic investigation of intracellular digestion in the symbiont-bearing hydrothermal *Bivalve Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology* 153(5): 995-1004
- Koch E, Vega IA, Albrecht EA, Ortega HH, Castro-Vazquez A (2006) A light and electron

microscopic study of pigmented corpuscles in the midgut gland and feces of *Pomacea Canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Veliger* 48(1): 17-25

Lecointre L et Le Guyader L (2001) Classification phylogénétique du vivant. 543p. Belin, Paris.

Levine ND (1978) *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the Protozoan phylum Apicomplexa. *Journal of Parasitology* 64(3): 549-549

Lewis PR et Knight DP (1992) Cytochemical staining methods for electron microscopy. 321p. Elsevier, Amsterdam.

Lipovšek Delakorda S, Letofsky-Papst I, Novak T, Hofer F, Pabst MA (2009) Structure of the malpighian tubule cells and annual changes in the structure and chemical composition of their spherites in the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss, 1878 (Rhaphidophoridae, Saltatoria). *Arthropod Structure and Development* 38(4): 315-327

Lipovšek S, Letofsky-Papst I, Hofer F, Pabst MA (2002) Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulatus* (Opiliones). *Micron* 33(7-8): 647-654

Little C (1965) Notes on the anatomy of the queen conch, *Strombus gigas*. *Bulletin of Marine Science* 15(2): 338-358

Lobo-Da-Cunha A (2000) The digestive cells of the hepatopancreas in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia): Ultrastructural and cytochemical study. *Tissue and Cell* 32(1): 49-57

Lobo-da-Cunha A (1999) Ultrastructural and cytochemical aspects of the basophilic cells in the hepatopancreas of *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia). *Tissue and Cell* 31(1): 8-16

Lobo-da-Cunha A (1997) The peroxisomes of the hepatopancreas in two species of chitons. *Cell Tissue Research* 290(3): 655-664

Lucarotti CJ (2000) Cytology of *Leidyana canadensis* (Apicomplexa: Eugregarinida) in *Lambdina fiscellaria fiscellaria* larvae (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 75(2): 117-125

Luchtel DL, Martin AW, Deyrup-Olsen I, Boer HH (1997) Gastropoda: Pulmonata. In: Harrison WF

- et Kohn AJ (eds) Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley-Liss, New York, pp 459
- Lutfy RG et Demain ES (1967) The histology of the alimentary system of *Marisa cornuarietis*. *Malacologia* 5(3): 375-422
- Mackinnon MJ et Read AF (1999) Genetic relationships between parasite virulence and transmission in the rodent Malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution* 53(3): 689-703
- Margolis L, Esch GW, Holmes JC (1982) The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the american society of parasitologists). *Journal of Parasitology* 68(1): 131-133
- Marigomez JA, Cajaraville MP, Angulo E (1990) Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94(2): 191-199
- Masala O, McInnes EJJ, O'Brien P (2002) Modelling the formation of granules: The influence of manganese ions on calcium pyrophosphate precipitates. *Inorganica Chimica Acta* 339: 366-372
- McFall-Ngai MJ (1998) Pioneering the squid-vibrio model. *ASM News* 64(11): 639-645
- McVeigh A, Moore M, Allen JJ, Dyke P (2006) Lysosomal responses to nutritional and contaminant stress in mussel hepatopancreatic digestive cells: A modelling study. *Marine Environmental Research* 62(1): 433-438
- Mehlhorn H (2008) *Encyclopedia of parasitology*. 860p. Springer Verlag, Berlin.
- Merçot H et Poinot D (2009) Infection by *Wolbachia*: From passengers to residents. *Comptes Rendus - Biologies* 332(2-3): 284-297
- Merdsoy B et Farley J (1973) Phasic activity in the digestive gland cells of the marine Prosobranch Gastropod, *Littorina littorea* (L.). *Journal of Molluscan Studies* 40: 473-482
- Metian M, Warnau M, Hédouin L, Bustamante P (2009a) Bioaccumulation of essential metals (Co, Mn and Zn) in the king scallop *Pecten maximus*: Seawater, food and sediment exposures. *Marine Biology* 156(10): 2063-2075

- Metian M, Warnau M, Oberhänsli F, Bustamante P (2009b) Delineation of Pb contamination pathways in two Pectinidae: The variegated scallop *Chlamys varia* and the king scallop *Pecten maximus*. *Science of the Total Environment* 407(11): 3503-3509
- Metian M, Hédouin L, Barbot C, Teyssié J, Fowler SW, Goudard F, Bustamante P, Durand J, Piéri J, Warnau M (2005) Use of radiotracer techniques to study subcellular distribution of metals and radionuclides in Bivalves from the Noumea lagoon, New Caledonia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75(1): 89-93
- Morrison DA (2009) Evolution of the Apicomplexa: Where are we now? *Trends in Parasitology* 25(8): 375-382
- Morse MP, Zardas JD, Harrison FW, Kohn AJ (1997) Bivalvia. Microscopic anatomy of invertebrates. volume 6A: Mollusca II. 828p. Wiley-Liss, New York.
- Morton JE (1979) Molluscs 5th Edition. 264p. Hutchinson University Library, Hutchinson.
- Mouneyrac C, Mastain O, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Beaunier P, Jeantet A, Smith BD, Rainbow PS (2003) Trace-metal detoxification and tolerance of the estuarine worm *Hediste diversicolor* chronically exposed in their environment. *Marine Biology* 143(4): 731-744
- Nelson L et Morton JE (1979) Cyclic activity and epithelial renewal in the digestive gland tubules of the marine Prosobranch *Maoricrypta monoxyla* (Lesson). *Journal of Molluscan Studies* 45(3): 262-283
- Nichols RAB, Moore JE, Smith HV (2006) A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. *Journal of Microbiological Methods* 65: 512-524
- Nicolaidou A et Nott JA (1998) Metals in sediment, seagrass and Gastropods near a nickel smelter in Greece: Possible interactions. *Marine Pollution Bulletin* 36(5): 360-365
- Nott JA et Nicolaidou A (1996) Kinetics of metals in molluscan faecal pellets and mineralized granules, incubated in marine sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 197(2): 203-218

- Nott JA et Nicolaidou A (1993) Bioreduction of zinc and manganese along a Molluscan food chain. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology* 104(2): 235-238
- Nott JA et Langston WJ (1993) Effects of cadmium and zinc on the composition of phosphate granules in the marine snail *Littorina littorea*. *Aquatic Toxicology* 25(1-2): 43-54
- Nott JA et Nicolaidou A (1990) Transfer of metal detoxification along marine food chains. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70(4): 905-912
- Nott JA et Nicolaidou A (1989) Metals in Gastropods-metabolism and bioreduction. *Marine Environmental Research* 28(1-4): 201-205
- Nott JA et Langston WJ (1989) Cadmium and the phosphate granules in *Littorina littorea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 69(01): 219-227
- Nott JA, Bebianno MJ, Langston WJ, Ryan KP (1993) Cadmium in the Gastropod *Littorina littorea*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 73(3): 655-665
- O'Dwyer LH, Moço TC, Barrella TH, Vilela FC, Silva RJ (2003) Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) among recently captured brazilian snakes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 55(3): 309-314
- Orbea A, Dariush Fahimi H, Cajaraville MP (2000) Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of Mollusks and Crustaceans and fish liver. *Histochemistry and Cell Biology* 114(5): 393-404
- Owen G 1966 Digestion. In: Wilbur KM et Yonge CM (eds) *Physiology of mollusca*. Academic Press ed. New York et Londres, pp 53
- Pal SG (1972) The fine structure of the digestive tubules of *Mya arenaria* L. II Digestive cell. *Journal of Molluscan Studies* 40(3): 161-170
- Pal SG (1971) The fine structure of the digestive tubules of *Mya arenaria* L. I Basiphil cell. *Journal of Molluscan Studies* 39(4): 303-309
- Pasteels JJ (1971) Acidic phosphatase and golgian polarity in the absorbing cells of the gill of *Mytilus edulis* - an electron microscopy study. *Histochemie* 28(4): 296-304

- Perkins FO (1991) "Sporozoa": Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramyxea, Myxosporidia and Actinosporidia. In: Harrison FW et Corliss JO (eds) Microscopic anatomy of invertebrate, Protozoa. Wiley-Liss, New York, pp 261
- Pernice M, Boucher J, Boucher-Rodoni R, Joannot P, Bustamante P (2009) Comparative bioaccumulation of trace elements between *Nautilus pompilius* and *Nautilus macromphalus* (Cephalopoda: Nautiloidea) from Vanuatu and New Caledonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(2): 365-371
- Porcel D, Bueno JD, Almendros A (1996) Alterations in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata) after prolonged starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology* 115(1): 11-17
- Poulin R (1998) Comparison of three estimators of species richness in parasite component communities. *Journal of Parasitology* 84(3): 485-490
- Poulin R et Combes C (1999) The concept of virulence: Interpretations and implications. *Parasitology Today* 15(12): 474-475
- Purchon RD (1968) The biology of the Mollusca. 560p. Pergamon Press, Hongrie.
- Reynal L, Enriquez Diaz M, Aldana Aranda D (2009) First results of reproductive cycle of deep-sea queen conch, *Strombus gigas*, from FWI, Martinique. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 61: 506-508
- Riou V, Halary S, Duperron S, Bouillon S, Elskens M, Bettencourt R, Santos RS, Dehairs F, Colaço A (2008) Influence of chemosynthetic substrates availability on symbiont densities, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences Discussions* 5(3): 2279-2304
- Robledo Y, Marigómez I, Angulo E, Cajaraville MP (2006) Glycosylation and sorting pathways of lysosomal enzymes in mussel digestive cells. *Cell and Tissue Research* 324(2): 319-333
- Schall JJ (1986) Prevalence and virulence of a haemogregarine parasite of the Aruban whiptail lizard, *Cnemidophorus arubensis*. *Journal of Herpetology* 20(3): 318-324

- Schapira D, Montaña IA, Antczak A, Posada JM (2009) Using shell middens to assess effects of fishing on queen conch (*Strombus gigas*) populations in Los Roques Archipelago National Park, Venezuela. *Marine Biology* 156(4): 787-795
- Schill RO et Köhler H (2004) Energy reserves and metal-storage granules in the hepatopancreas of *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber* (Isopoda) from a metal gradient at Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* 13(8): 787-796
- Schweizer D et Posada JM (2006) Distribution, density, and abundance of the queen conch, *Strombus gigas*, in Los Roques Archipelago National Park, Venezuela. *Bulletin of Marine Science* 79(2): 243-257
- Semmens JM (2002) Changes in the digestive gland of the Loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson 1830) associated with feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 274(1): 19-39
- Seville RS, Stanton NL, Gerow K (1996) Stable parasite guilds: Coccidia in spermophiline rodents. *Oikos* 75(3): 365-372
- Seville RS, Harlow HJ, Stanton NL, Wagner ML (1992) Effects of Eimerian (Apicomplexa: Eimeriidae) infections on nutrient assimilation in the wyoming ground squirrel. *Journal of Parasitology* 78(5): 881-885
- Siddall ME, Reece KS, Graves JE, Burreson EM (1997) 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology* 115(2): 165-176
- Simdyanov TG et Kuvardina ON (2007) Fine structure and putative feeding mechanism of the Archigregarine *Selenidium orientale* (Apicomplexa: Gregarinomorpha). *European Journal of Protistology* 43(1): 17-25
- Simkiss K et Mason AZ (1988) Metal ions: Metabolic and toxic effects. In: *The mollusca - environmental biochemistry and physiology*. Acad. Press, pp 101
- Široký P, Kamler M, Modrý D (2005) Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the genus *Testudo* in the East Mediterranean Region. *Folia Parasitologica* 52(4): 359-361

- Slothouber Galbreath JGM, Smith JE, Terry RS, Becnel JJ, Dunn AM (2004) Invasion success of *Fibrillanosema crangonycis*, n.sp., n.g.: A novel vertically transmitted Microsporidian parasite from the invasive Amphipod host *Crangonyx pseudogracilis*. *International Journal for Parasitology* 34(2): 235-244
- Smith DC et Douglas AE (1987) *The biology of symbiosis*. 302p. Edward Arnold, Londres.
- Speer CA, Clark S, Dubey JP (1998) Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* 84(3): 505-512
- Stotish RL, Wang CC, Meyenhofer M (1978) Structure and composition of the wall of *Emeria tenella*. *Journal of Parasitology* 64(6): 1074-1081
- Sumner AT (1969) The distribution of some hydrolytic enzymes in the cells of the digestive gland of certain Lamellibranchs and Gastropods. *Journal of Zoology* 158(3): 277-291
- Swift K, Johnston D, Moltschaniwskyj N (2005) The digestive gland of the southern dumpling squid (*Euprymna tasmanica*): Structure and function. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 315(2): 177-186
- Taïeb N (2001) Distribution of digestive tubules and fine structure of digestive cells of *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803). *Journal of Molluscan Studies* 67(2): 169-182
- Taïeb N et Vicente N (1999) Histochemistry and ultrastructure of the crypt cells in the digestive gland of *Aplysia punctata* (Cuvier, 1803). *Journal of Molluscan Studies* 65(4): 385-398
- Taylor MG, Simkiss K, Greaves GN, Harries J (1988) Corrosion of intracellular granules and cell death. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 234(1277): 463-476
- Terry RS, Dunn AM, Smith JE (1997) Cellular distribution of a feminizing microsporidian parasite: A strategy for transovarial transmission. *Parasitology* 115(2): 157-163
- Terry RS, Smith JE, Sharpe RG, Rigaud T, Littlewood DTJ, Ironside JE, Rollinson D, Bouchon D, MacNeil C, Dick JTA, Dunn AM (2004) Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271(1550): 1783-1789

- Thomas G, Stender-Seidel S, Böckeler W (1999) Investigation of different ontogenetic stages of *Raillietiella* sp. (Pentastomida: Cephalobaenida): Excretory functions of the midgut. *Parasitology Research* 85(4): 274-279
- Triebkorn R et Köhler H (1996) The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): Metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environmental Pollution* 93(3): 327-343
- Tuntiwaranuruk C, Chalermwat K, Upatham ES, Kruatrachue M, Azevedo C (2004) Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of Bivalves from Chonburi Province, Gulf of Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 58(1): 47-53
- Valigurová A et Koudela B (2006) Ultrastructural study of developmental stages of *Mattesia dispora* (Neogregarinorida: Lipotrophidae), a parasite of the flour moth *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *European Journal of Protistology* 42(4): 313-323
- Vega IA, Giraud-Billoud M, Koch E, Gamarra-Luques C, Castro-Vazquez A (2007) Uric acid accumulation within intracellular crystalloid corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Veliger* 48(4): 276-283
- Vega IA, Gamarra-Luques C, Koch E, Bussmann LE, Castro-Vazquez A (2005) A study of corpuscular DNA and midgut gland occupancy by putative symbiotic elements in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Symbiosis* 39(1): 37-45
- Vega IA, Damborenea MC, Gamarra-Luques C, Koch E, Cueto JA, Castro-Vazquez A (2006) Facultative and obligate symbiotic associations of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell* 30(2): 367-375
- Vezzani D et Wisnivesky C (2006) Prevalence and seasonality of *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in natural populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from temperate Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 91(3): 183-187
- Volland J-M, Frenkiel L, Aldana Aranda D, Gros O (2010) Occurrence of Sporozoa-like microorganisms in the digestive gland of various species of Strombidae. *Journal of Molluscan Studies* 76(2): 196-198

- Voltzow J (1994) Gastropoda: Prosobranchia. In: Frederick W et Harrison W (eds) Microscopic anatomy of invertebrates. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, pp 111
- Walker G (1972) The digestive system of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller): Experiments on phagocytosis and nutrient absorption. Proceedings of the Malacology Society 40: 33-43
- Walker G (1970) The cytology, histochemistry, and ultrastructure of the cell types found in the digestive gland of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller). Protoplasma 71(1-2): 91-109
- Walne PR (1979) Culture of Bivalve Molluscs: 50 years' experience at Conwy. 189p. Whitefriars press Ltd., Londres.
- Wiedemeyer WL (1998) Contributions to the larval biology of the red-lipped conch, *Strombus Luhuanus* L. 1758, with respect to seed production for mariculture. Aquaculture Research 29(1): 1-7
- Wigham GD (1976) Feeding and digestion in the marine Prosobranch *Rissoa parva* (Da costa). Journal of Molluscan Studies 42(1): 74-94
- Zaldibar B, Cancio I, Soto M, Marigómez I (2004) Circatidal variation in epithelial cell proliferation in the mussel digestive gland and stomach. Cell and Tissue Research 318: 395-402
- Zaldibar B, Cancio I, Soto M, Marigómez I (2008) Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. Environmental Pollution 156(2): 367-379
- Zhao X, Duszynski DW, Loker ES (2001) A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. Journal of Microbiological Methods 44(2): 131-137
- Zimmer C (2001) *Wolbachia*: A tale of sex and survival. Science 292(5519): 1093-1095

Annexes

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 :

Volland J-M, Gros O, Frenkiel L, Aldana Aranda D (2008) Apicomplexan parasite in the digestive gland of various species of the family Strombidae: *Strombus costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis*. Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute 60

Annexe 2 :

Volland J-M, Aldana Aranda D, Gros O (2009) Detection of Apicomplexa like parasites in two species belonging to the family Strombidae: *Strombus gallus*, Linnaeus, 1758 and *Strombus raninus*, Gmelin, 1791. Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute 61: 503-505

Annexe 3 :

Volland J-M, Frenkiel L, Aldana Aranda D, Gros O (2010) Occurrence of Sporozoa-like microorganisms in the digestive gland of various species of Strombidae. Journal of Molluscan Studies 76(2): 196-198

ANNEXE 1

**Apicomplexan parasite in the digestive gland of various species
of the family Strombidae: *Strombus costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis*.**

**Apicomplexa parasito en la glandula digestiva de varias especies
de la familia Strombidae: *Strombus costatus*, *S. gigas* y *S. pugilis*.**

Jean-Marie VOLLAND¹, Olivier GROS¹, Liliane FRENKIEL², and Dalila ALDANA ARANDA²

1 UMR-CNRS 7138, SAE, Equipe « Symbiose ». Université des Antilles et de la Guyane. UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Département de Biologie. B.P. 592. 97159. Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe. France. jmvollan@univ-ag.fr

2 CINVESTAV IPN Unidad Mérida, laboratorio de Biología y Cultivo de Moluscos, Merida Yucatan, Mexico.
daldana@mda.cinvestav.mx

Abstract

The present study aims to detect the presence of intracellular Apicomplexa in various species of the genus *Strombus*. *Strombus costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis*. Such presence of intracellular Protozoa associated with all individuals in every studied population and in all examined members of the same family raises diverse hypothesis. The parasitic interaction described in *S. gigas* extends to both other species of Strombidae studied. Such relationship could occur in the whole Strombidae family. Further investigations will focus on strombid species from other geographic areas to confirm this hypothesis. Complementary investigations are also scheduled to ascertain the nature of relationship between Apicomplexa and the family Strombidae.

Key words: Apicomplexan parasite, Caribbean conchs, structure.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue verificar la presencia de Apicomplexa en varias especies del género *Strombus*. La presencia de Apicomplexa intracelular en todos organismos de todas las poblaciones estudiadas de la misma familia plantean varias hipótesis. Este tipo de relación podría estar presente en toda la familia Strombidae. Se requiere de otras investigaciones sobre las especies de *Strombus* de otras localidades geográficas a fin de confirmar esta hipótesis. Estudios complementarios se están realizando para conocer la naturaleza del tipo de relación entre Apicomplexa y la familia Strombidae.

Palabras claves: Apicomplexan parásito, caracol, estructura.

INTRODUCTION

The five common species of the *Strombus* genus in the Caribbean are: *Strombus costatus* (Gmelin, 1791); *S. gallus* (Linnaeus, 1758); *S. gigas* (Linnaeus, 1758), *S. pugilis* (Linnaeus, 1758) and *S. raninus* (Gmelin, 1791). Some of them are eaten (*S. costatus*, and *S. pugilis*) in various countries; however, *S. gigas* is the only species fished throughout the region and object of international trade. Previous observations of *S. gigas* digestive gland have shown several foreign structures in the population of San Andres Archipelago (Colombia). These structures have been defined as parasitic belonging to the Apicomplexa group (Baqueiro *et al.*, 2007). Apicomplexa is a group of Sporozoa containing about 5000 species, all described as parasites. They are characterized by a complex life cycle composed of three phases: merogony (asexual reproduction), gametogony (sexual reproduction), and sporogony (asexual reproduction). Infecting units, formed by the second asexual reproduction are called trophozoites. This stage is characterized by an apical complex (Perkins, 1991).

This study focuses on three Caribbean Strombidae: *S. costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis*.

MATERIALS AND METHODS

Individuals of *S. costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis* were collected from Guadeloupe (FWI) and Yucatan (Mexico) on *Thalassia testudinum* seagrass beds. Living materials were brought to the laboratory for analysis. The digestive glands were dissected and fixed in 5% glutaraldehyde in sea water for 24h at room temperature. Samples were then dehydrated through an ascending ethanol series and embedded either in paraplast wax for histology (5µm thick sections) or in epoxy resin for semi thin sections (0.5µm thick) according to standard methods. Histological sections were stained using a trichrome staining (hematoxylin, alcian blue, and acid fuchsin). Semi thin sections were stained using toluidine blue in borax.

RESULTS

For the three species, the digestive gland of every analyzed individual was infected by a large number of putative Apicomplexa organisms. In fact, the overall black colour of the digestive gland seems to be due to the presence of a huge number of parasites. Similar structures were observed in *S. costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis*. For each species, apicomplexan parasites occur most frequently in vacuolated cells (Fig. 1.) but were also found in the lumen of tubules, in the collector ducts of the gland, and in the faeces. Sporocysts are spherical to ellipsoidal, they are always included in a parasitophorous vacuole (Figs. 1-4). Their diameter is comprised between 10 and 60 µm with a thick, hard wall which is often destroyed by sectioning (Figs. 2 & 4). Four different stages of Apicomplexa life cycle were usually observed in the digestive gland. The most frequent is the sporocyst stage with a thick wall described above (Figs. 1 - 3). Some thin walled stages may be considered as gamont (Fig. 3). Last but not least, typical bottle shaped organisms were frequently observed from the parasitic purified fraction but rarely on sections probably due to the section plan. This morphotype could be assimilated to the trophozoite stage, because of the presence of an apical complex characteristic of this stage and of the Apicomplexa group. (Fig. 4)

DISCUSSION

Apicomplexa have already been described in several molluscan species: *Nematopsis gigas* is a parasite of *Nerita ascencionis* (Azevedo and Padovan, 2004) ; *Pseudoklossia haliotis* is a parasite of *Haliotis spp* (Friedman *et al.*, 1995). Similar morphotypes as those observed here (thick walled sporocysts, thin walled gamonts, and trophozoites) have previously been described as different stages of Apicomplexa life cycle (Perkins, 1991). Parasites are found in the faeces of the three conch species studied, that is potentially an excretion way for the parasite dissemination.

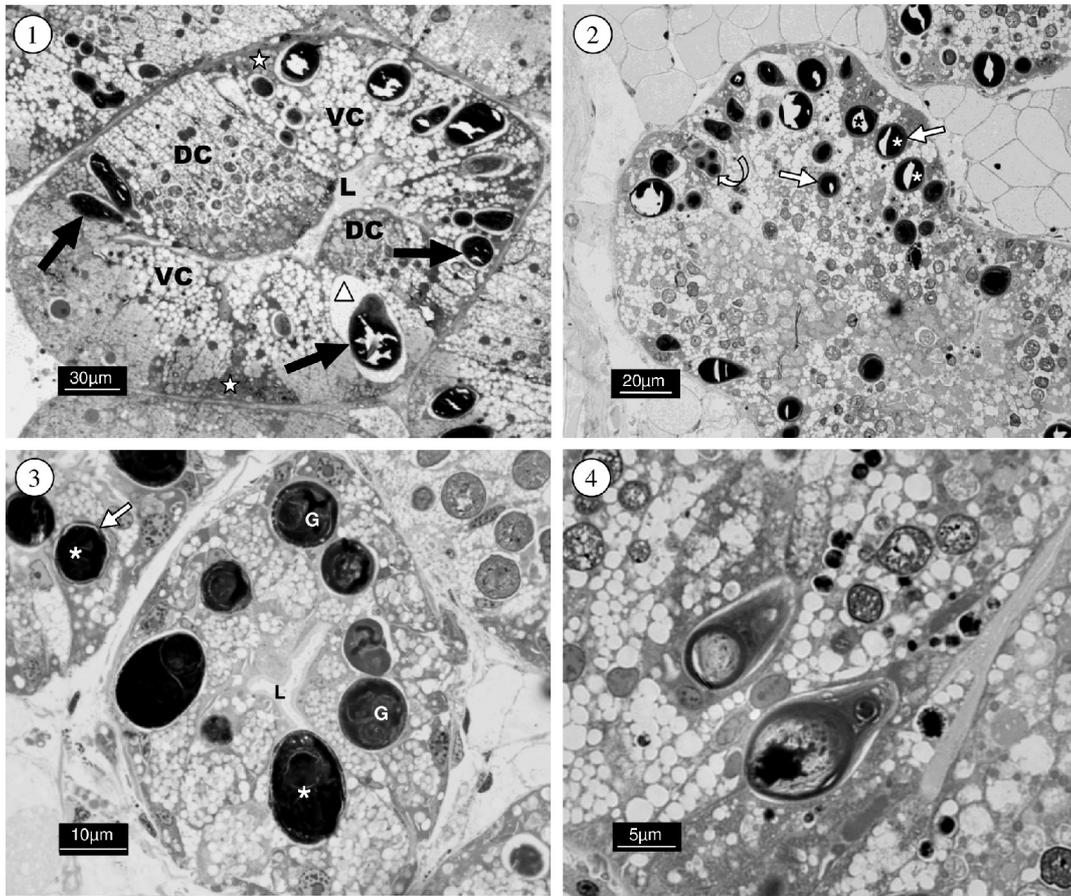
We emphasize that the parasitic interaction described in *S. gigas* extends to both other species of Strombidae studied. Such relationship could occur in the whole Strombidae family. Further investigations will focus on strombid species from other geographic areas to confirm this hypothesis.

For the three species investigated, we have observed the presence of the apicomplexan parasites in the digestive gland of all sampled individuals (n>1000) from different Caribbean sites (Baqueiro *et al.*, 2005; Aldana *et al.*, 2006; Baqueiro *et al.*, 2007) . This suggests to reevaluate the assumption of parasitism and we propose to consider the possibility of a symbiosis relationship.

Phylogenetic analysis is in progress in our lab in order to confirm that these endobiont-like structures belong to the Apicomplexa group. Moreover, physiological studies should be performed to clearly determine the nature of the interaction between conchs and their endobionts.

REFERENCES

- Aldana *et al.*, 2006;
- Azevedo, C., and I. Padovan, 2004.** *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gasteropoda, Neritidae) from Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **51**(2): 214-219.
- Baqueiro, C. E., L. Frenkiel, and D. A. Aldana Aranda. 2005.** One more threat for the Queen Conch *Strombus gigas*? Coccidian (Apicomplexa) infection of *S. gigas* digestive gland: preliminary results. *Proceeding of the Gulf Caribbean Fisheries Institute (GCFI)*.
- Baqueiro *et al.*, 2007)
- Friedman, C. S., G. R. Gardner, R. P. Hedrick, M. Stephenson, R. J. Cawthorn, and S. J. Upton. 1995.** *Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California Abalone, *Haliotis spp.* (Mollusca). *Journal of Invertebrate Pathology* **66**(1): 33-38.
- Perkins F. O. 1991.** "Sporozoa": Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramixea, Myxosporidia, and Actinosporidia . Pages 261-331 in: J. O. Corliss and F. W. Harrison (eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New York, USA.



Figs. 1-4. Light microscopy of semi-thin section of digestive gland of different Strombidae showing apicomplexan parasites in their parasitophorus vacuole in vacuolated cells. **Fig. 1:** *S. gigas*'s digestive gland. **Fig. 2:** *S. costatus*'s digestive gland. **Fig. 3:** *S. pugilis*'s digestive gland. **Fig. 4:** Detail of a trophozoite observed in digestive cells of *S. costatus*'s digestive gland. Black arrows point on apicomplexan parasites. White arrows point on the thick wall of the sporocysts. Curved arrow points the thin wall of the gamont. Asterisk: sporocyst; stars: cryptic cells; triangle: parasitophorus vacuole; DC: digestive cells; G: gamont; L: lumen of the tubule; VC: vacuolated cells.

ANNEXE 2

Detection of Apicomplexa like Parasites in Two Species Belonging to the Family Strombidae: *Strombus gallus*, Linnaeus, 1758 and *S. raninus*, Gmelin, 1791.

JEAN-MARIE VOLLAND¹, DALILA ALDANA ARANDA², and OLIVIER GROS¹

¹UMR-CNRS 7138, SAE, Equipe « Symbiose ». Université des Antilles et de la Guyane. UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Département de Biologie. B.P. 592. 97159. Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France

²CINVESTAV IPN Unidad Mérida, laboratorio de Biología y Cultivo de Moluscos, Mérida Yucatan, Mexico

ABSTRACT

The present study aims to detect the presence of intracellular Apicomplexa in two species of the genus *Strombus*: *Strombus gallus* and *S. raninus*. This parasitic interaction was initially described in *S. gigas* and extends to both other species of Strombidae studied. Such relationships could occur in the whole Strombidae family. Further investigations will focus on strombid species from other geographic areas to confirm this hypothesis. Complementary investigations are also scheduled to ascertain the nature of relationship between Apicomplexa and the family Strombidae.

KEY WORDS: Apicomplexan parasite, Caribbean conchs, structure

Puesta en Evidencia de Presencia del Parasito Apicomplexes en dos Especies de la Familia des Strombidae: *Strombus galas*, Linnaeus, 1758 y *S. raninus*, Gmelin, 1791

El estudio de la glándula digestiva de *S. gigas* puso en evidencia la presencia de una infección importante y generalizada. Una cantidad importante de estructuras de tipo Apicomplexa fueron detectadas en las células vacuolares de los túbulos digestivos de todos los individuos muestreados. En este estudio, se analizó la glándula digestiva de dos otros *Strombidae* del Caribe: *S. gallus* y *S. raninus*. Las glándulas digestivas de los organismos fueron fijadas y el análisis estructural fue realizado con técnicas de histología y de microscopía electrónica y a transmisión. Para las dos especies, los túbulos digestivos se componen de tres tipos celulares: células digestivas, células vacuolares y células cripticas. Este estudio puso en evidencia la presencia de estructuras semejantes a los Apicomplexa, parecidos a lo observado en *S. gigas*, en las células vacuolares de *S. gallus* y *S. raninus*. Para las dos especies, los estadios del desarrollo característico del ciclo de vida de los Apicomplexa fue observado: El estadio trofozoito (caracterizado por su compleja estructura apical), el estadio esporozoito (con sus esporas internas) y el estadio gamont (caracterizado por una pared fina). Los parásitos de *S. gallus* midieron de 10 a 20 µm de diámetro y los de *S. raninus* en promedio fueron dos veces más grandes. Así, los dos *Strombidae* analizados tuvieron la presencia de parásitos que nos recuerdan a los Apicomplexa. Sin embargo, ningún síntoma de mala salud como incipiente desarrollo gonádico o desorganización de los túbulos digestivos fueron observados. Este estudio puso en evidencia que la infección descrita inicialmente en *S. gigas*, se presenta también en otras dos especies del mismo genero *Strombus*.

PALABRAS CLAVES: Apicomplexan parásito, caracol, estructura

Mise en Évidence de la Présence de Parsites Apicomplexes chez deux Éspecies de la Famille des Strombidae: *Strombus gallus*, Linnaeus, 1758 et *S. raninas*, Gmelin, 1791

L'étude de la glande digestive de *S. gigas* a révélée la présence d'une infection importante et généralisée. Une quantité importante de structures rappelant les Apicomplexes a été détectée dans les cellules vacuolaires des tubules digestifs de tout les individus échantillonnés. Dans cette étude, nous avons analysé la glande digestive de deux autres *Strombidae* de la Caraïbe : *S. gallus* et *S. raninus*. Les glandes digestives des individus ont été fixées et des analyses structurelles ont été réalisées en faisant appel aux techniques d'histologie et de microscopie électronique à transmission. Pour les deux espèces, les tubules digestifs se composent de trois types cellulaires : les cellules digestives, les cellules vacuolaire et les cellules cryptiques. Notre étude a mis en évidence la présence de structures rappelant des Apicomplexes, semblables à celles observées chez *S. gigas*, dans les cellules vacuolaires de *S. gallus* et *S. raninus*. Pour les deux espèces, les stades de développement caractéristiques du cycle vital des Apicomplexes ont été observés : le stade trophozoïte (caractérisé par son complexe apical), le stade sporozoïte (avec ses bourgeonnements internes) et le stade gamonte (caractérisé par une paroi fine). Les parasites de *S. gallus* font de 10 à 20 µm de diamètre et ceux de *S. raninus* sont en moyenne deux fois plus gros. Ainsi, les deux *Strombidae* analysés ont révélés la présence de parasites rappelant les Apicomplexes. Cependant, aucun signe de mauvaise santé tel qu'un retard de développement de la gonade ou une désorganisation des tubules digestifs n'a été observé. Cette étude a donc mis en évidence que l'infection décrite initialement chez *S. gigas*, s'étend à deux autres espèces du même genre.

MOTS CLÉS: Parasite Apicomplexe, lambis, structure

INTRODUCTION

The five common species of the *Strombus* genus in the Caribbean are: *Strombus costatus* (Gmelin, 1791), *S. gallus* (Linnaeus, 1758), *S. gigas* (Linnaeus, 1758), *S. pugilis* (Linnaeus, 1758) and *S. raninus* (Gmelin, 1791). Some of

them are consumed (*S. costatus*, *S. gigas*, and *S. pugilis*) in various countries; however, *S. gigas* is the only species fished throughout the region and object of international trade. Previous observations of *S. gigas* digestive gland have shown several foreign structures in the population of

San Andres Archipelago (Colombia). These structures have been defined as parasitic belonging to the Apicomplexa group (Baqueiro-Cárdenas *et al.* 2005, 2007, Gros *et al.* 2009). Apicomplexa is a group of Sporozoa containing about 5,000 species, all described as parasites. They are characterized by a complex life cycle composed of three phases: merogony (asexual reproduction), gametogony (sexual reproduction), and sporogony (asexual reproduction). Infecting units, formed by the second asexual reproduction are called trophozoites. This stage is characterized by an apical complex (Perkins 1991).

This study focuses on two Caribbean Strombidae: *S. gallus* and *S. raninus*.

MATERIALS AND METHODS

Individuals of *S. gallus* and *S. raninus* were collected from Guadeloupe (FWI) on *Thalassia testudinum* seagrass beds. Living materials were brought to the laboratory for analysis. The digestive glands were dissected and fixed in 5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in sea water overnight at 4°C. Samples were then dehydrated through an ascending ethanol series and embedded either in paraplast wax for histology (5µm thick sections) or in epoxy resin for semi thin sections (0.5µm thick) according to standard methods. Histological sections were stained using a trichrome staining (hematoxylin, alcian blue, and acid fuchsin). Semi thin sections were stained using toluidine blue in borax. Thin sections were obtained from samples embedded in epoxy resin and contrasted with uranyl acetate and lead citrate before observation in a Leo 912 transmission electronic microscope (TEM).

RESULTS

The digestive gland of both species was composed by an assemblage of digestive tubules and ducts. Digestive tubules epithelium was composed by three cell types: long and columnar digestive cells, vacuolated cells and smaller triangular cells identified as crypt cells (Figures 1, 2).

Digestive gland of *S. gallus* and *S. raninus* was infected by a large number of putative Apicomplexa-like organisms. For each species, Apicomplexa-like parasites occur most frequently in vacuolated cells (Figures 1 - 3, 6) but were also found in the lumen of tubules and in the collector ducts of the gland (not shown). Sporocysts are spherical to ellipsoidal, they are always included in a parasitophorus vacuole. Their diameter is comprised between 10 and 30 µm (21 µm on average) in *S. gallus* and between 20 and 50 µm (36 µm on average) in *S. raninus* with a thick, hard wall which is often damaged by sectioning (Figures 5, 8). Three different stages of Apicomplexa life cycle were usually observed in the digestive gland. The most frequent is the sporocyst stage with a thick wall described above (Figures 5, 8). Some thin walled stages may be considered as gamont. Last but not least, typical bottle shaped organisms were observed. This morphotype

could be assimilated to the trophozoite stage, because of the presence of an apical complex characteristic of this stage and of the Apicomplexa group (Figures 4, 7).

DISCUSSION

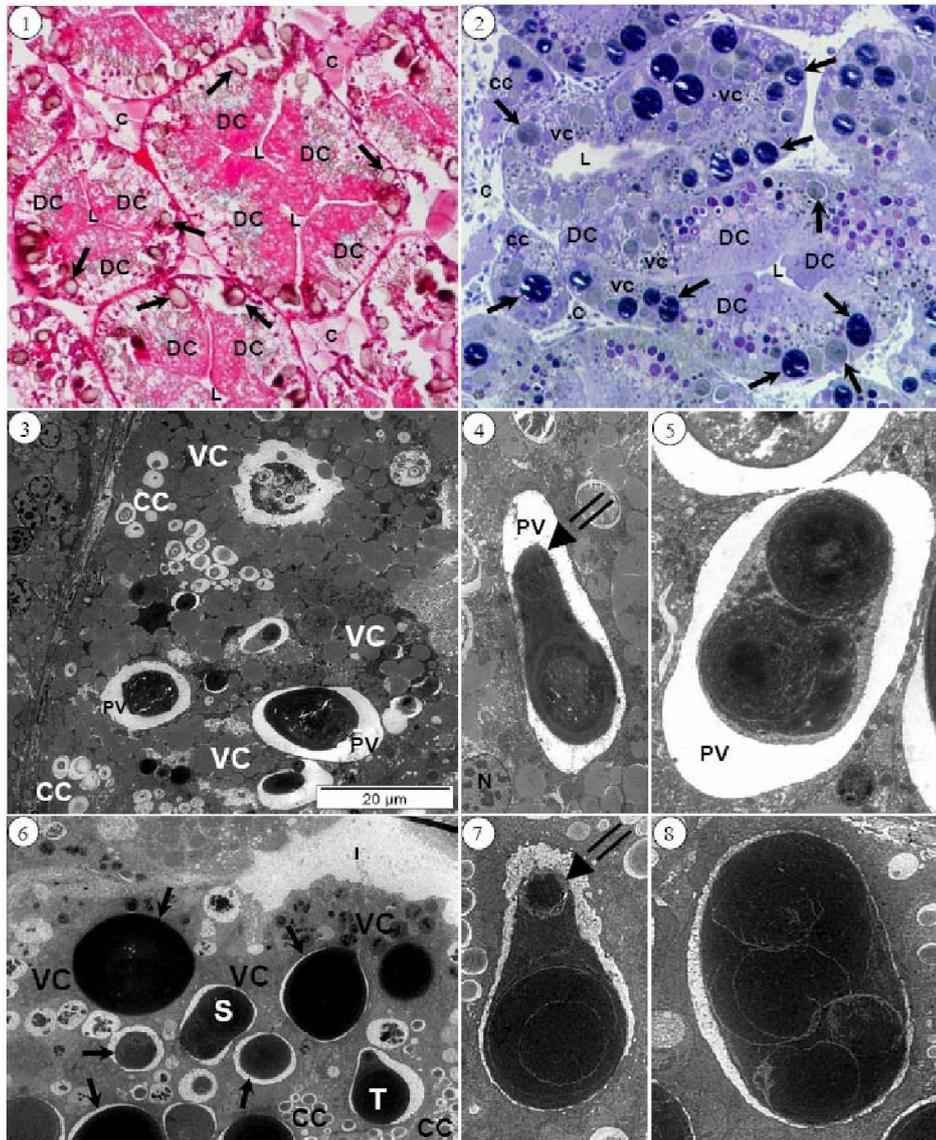
Apicomplexa have already been described in several molluscan species: *Nematopsis gigas* is a parasite of *Nerita ascencionis* (Azevedo and Padovan 2004). *Pseudoklossia haliotis* is a parasite of *Haliotis spp* (Friedman *et al.* 1995). Similar morphotypes as those observed here (thick walled sporocysts, thin walled gamonts, and trophozoites) have previously been described as different stages of Apicomplexa life cycle (Perkins 1991).

We emphasize that the parasitic interaction described in *S. gigas* extends to both other species of Strombidae studied. Such relationship could occur in the whole Strombidae family. Further investigations will focus on strombid species from other geographic areas to confirm this hypothesis. Previous studies have highlight the presence of the Apicomplexa-like parasites in the digestive gland of all *S. gigas* sampled individuals (n > 1000 for *S. gigas*) from different Caribbean sites (Baqueiro-Cárdenas *et al.* 2005, 2007, Gros *et al.* 2009). We add two other species at the list of infected Strombidae: *S. gallus* and *S. raninus*. This suggests to re-evaluate the assumption of parasitism, and we propose to consider the possibility of a non-virulent relationship like commensalisms or even mutualism.

Phylogenetic analysis is in progress in our laboratory in order to confirm that these Apicomplexa-like structures belong to the Apicomplexa group. Moreover, physiological studies should be performed to clearly determine the nature of the interaction between conchs and their Apicomplexa-like.

LITERATURE CITED

- Azevedo, C. and I. Padovan. 2004. *Nematopsis gigas* sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **51** (2):214-219
- Baqueiro-Cárdenas, E., L. Frenkiel, and D. Aldana Aranda. 2005. One more threat for the Queen conch *Strombus gigas*? Coccidian (Apicomplexa) infection of *S. gigas* digestive gland: preliminary results. *Proceedings of the Gulf Caribbean Fisheries Institute* **58**:421-426
- Baqueiro-Cárdenas, E., L. Frenkiel, A. Zetina Zarate, and D. Aldana Aranda. 2007. Coccidian (Apicomplexa) parasite infecting *Strombus gigas* linné, 1758 digestive gland. *Journal of Shellfish Research* **26**(2):319-321
- Friedman, C.S., G.R. Gardner, R.P. Hedrick, M. Stephenson, R.J. Cawthorn, and S.J. Upton. 1995. *Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca). *Journal of Invertebrate Pathology* **66**(1):33-38
- Gros, O., Frenkiel, L., and D. Aldana Aranda. [2009]. Structural analysis of the digestive gland of the Queen conch *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) and its intracellular Apicomplexa parasites. *Journal of Molluscan Studies* [In press] 75(1).
- Perkins, F.O. 1991. "Sporozoa": Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramixia, Myxosporidia, and Actinosporidia. Pages 261-331 in: F.W. Harrison (Ed.) *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 1 Protozoa*. FW Harrison and Corliss New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore



Figures 1-8 . Observations of *S. gallus* and *S. raninus* digestive gland.

1-2: Histological observation of *S. raninus* (1) and semi-thin section of *S. gallus* (2) digestive gland showing digestive tubules mostly composed by digestive cells (DC). Parasites (arrows) are grouped in vacuolated cells (VC) between digestives cells. They are often damaged by sectioning. CC: crypt cells. L: lumen of the tubule. **3:** TEM views of *S. raninus* digestive gland showing Apicomplexa-like parasites in vacuolated cells. Note the presence of two crypt cells interspersed with vacuolated cells. **4-5:** TEM view of *S. raninus* digestive gland showing a trophozoite (4) characterized by the presence of an apical complex (double arrow) and a sporocyst (5) with its inner budding. **6:** TEM view of *S. gallus* digestive gland. Note the presence of different life stages (trophozoite: T and sporocyst: S) in vacuolated cells. **7-8:** TEM detail of *S. gallus* trophozoite (7) and sporocyst (8).

ANNEXE 3

RESEARCH NOTE

Occurrence of Sporozoa-like microorganisms in the digestive gland of various species of Strombidae

Jean-Marie Volland¹, Liliane Frenkiel^{1,2}, Dalila Aldana Aranda² and Olivier Gros¹

¹UMR-CNRS 7138, Systématique-Adaptation-Evolution, 'Équipe symbiose', Université des Antilles et de la Guyane, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Département de Biologie, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre cedex, Guadeloupe, France; and
²CINVESTAV-IPN unidad Mérida, Km 6 carretera a Progreso, Mérida, Yucatán México

Correspondence: J.-M. Volland; e-mail: jmvolland@univ-ag.fr

The digestive gland of *Strombus* (*Eustrombus*) *gigas* Linnaeus, 1758 has been described by Gros, Frenkiel & Aldana Aranda (2009) as an assemblage of tubules and ducts that are connected to the stomach. Three cell types occur in the epithelium of the blind-ending tubules, according to histological and TEM observations: digestive cells, crypt cells and vacuolated cells. Several examples of parasitic relationships between marine gastropods and apicomplexan parasites have been described (Friedman *et al.*, 1995; Azevedo & Padovan, 2004). Baqueiro Cárdenas *et al.* (2007) reported the presence of intracellular microorganisms that they interpreted as belonging to various life cycle stages characteristic of Apicomplexa within some cells in the digestive gland of *S. gigas*. Heterospecific interactions between organisms living inside the cells of another one are not easy to characterize. The description of Sporozoa-like microorganisms occurring in the digestive gland of *S. gigas* raises several questions: How broad is the geographic distribution of the Sporozoa-like microorganism? Are other species of Strombidae also infected? The present study reports the occurrence of Sporozoa-like microorganisms from a structural analysis of the digestive gland of six species belonging to the family Strombidae found in distant geographic regions.

Individuals from four Caribbean species: *Strombus* (*Aliger*) *costatus* Gmelin, 1791 ($n = 50$); *S. (Aliger)* *gallus* Linnaeus, 1758 ($n = 1$); *S. (Eustrombus)* *gigas* ($n > 1,500$) and *S. pugilis* Linnaeus, 1758 ($n = 100$) and two species from the Pacific Ocean: *S. galeatus* Swainson, 1823 ($n = 1$) and *Lambis lambis* Linnaeus, 1758 ($n = 2$) were sampled. Specimens of *S. costatus*, *S. gallus*, *S. gigas* and *S. pugilis* were collected from Guadeloupe (French West Indies) and Yucatan (Mexico) in beds of the seagrass *Thalassia testudinum* or on coarse sand bottoms. Specimens of *L. lambis* were collected in 2006 from the Vanuatu Archipelago in the Pacific Ocean during the Santo 2006 expedition. The unique specimen of *S. galeatus* collected from the Pacific coast of Mexico was preserved in 10% formalin in seawater. The others samples were fixed in 5% glutaraldehyde in filtered seawater. Samples of the digestive gland were prepared for histological and ultrastructural analyses as previously described (Gros *et al.*, 2009).

The digestive glands of all six species were composed of an assemblage of digestive tubules and ducts. Three cell types were identified in the tubules: digestive cells, vacuolated cells and crypt cells (Fig. 1). The typical structures observed in the samples were two functional groups of digestive cells and vacuolar cells facing each other. Sporozoa-like microorganisms were detected in all sampled specimens, whatever the species (Fig. 1). When in host cells, these microorganisms were always found in vacuolated cells inside a parasitophorous vacuole. In a few cases, they were observed in digestive cells. We also

observed microorganisms in the lumina of tubules and ducts of all species, as well as in the faeces of *S. costatus*, *S. gigas* and *S. pugilis*. Faeces of *L. lambis*, *S. galeatus* and *S. gallus* could not be analysed. The microorganisms measured 10–60 µm long and 5–40 µm wide. Various life cycle stages were identified according to Perkins (1991), based on the presence or lack of a thick wall and/or an inner budding. The most frequent stage found was the thick-walled sporocyst, which was often damaged by sectioning. Typical bottle-shaped trophozoites characterized by an apical complex were observed. Gamont stages were characterized by thin walls. The digestive gland samples of *S. galeatus* were not fixed for TEM analysis. However, microorganisms similar to those found in the other Strombidae were observed in semi-thin sections of this species (Fig. 1F).

Sporozoa infections have already been described for several marine gastropods. *Pseudoklossia haliotis* was reported as a parasite of California *Haliotis* species (Friedman *et al.*, 1995). *Nematopsis gigas* was reported as a parasite of *Nerita ascensionis* (Azevedo & Padovan, 2004). Sporozoa is a very large clade of parasitic protists (including Apicomplexa), which comprises 4,000–7,000 species (Perkins, 1991; Cox, 1994). Several life cycle stages have been identified in the six strombid species, of which the most commonly described are: sporocyst, gamont and trophozoite. According to Friedman *et al.* (1995), the presence of various stages within the same host supports the hypothesis of a monoxenous life cycle. The presence of several life-cycle stages in digestive tubule cells of the six strombid species analysed in this study also supports this hypothesis. The occurrence of Sporozoa-like stages observed in all six species of Strombidae analysed in this paper is similar to a sporozoa infection. Although various life cycle stages of the presumed parasitic microorganisms were identified, no clinical evidence of disease was observed. Gros *et al.* (2009) have emphasized the opportunity of parasite dispersal through the host's faeces that allows parasite transmission to new hosts through the environment. The presence of the thick cellular walls of the Sporozoa-like microorganism in strombids analysed in this study supports the hypothesis that the microorganism might be dispersed through faeces, because these walls could provide protection against digestive enzymes. An environmental transmission mechanism involving a continuous release of the symbionts has been described in various marine invertebrates such as the squid *Euprymna scolopes*, which daily rejects 90% of its symbiotic bacteria which are then transmitted to other individuals (McFall-Ngai, 1998). Regardless of species, gender and gonadic maturity the digestive gland of all sampled specimens contained a large number of Sporozoa-like microorganisms (i.e. 100% prevalence). The fact that all the individuals of the six different species examined in this study were infected by

RESEARCH NOTE

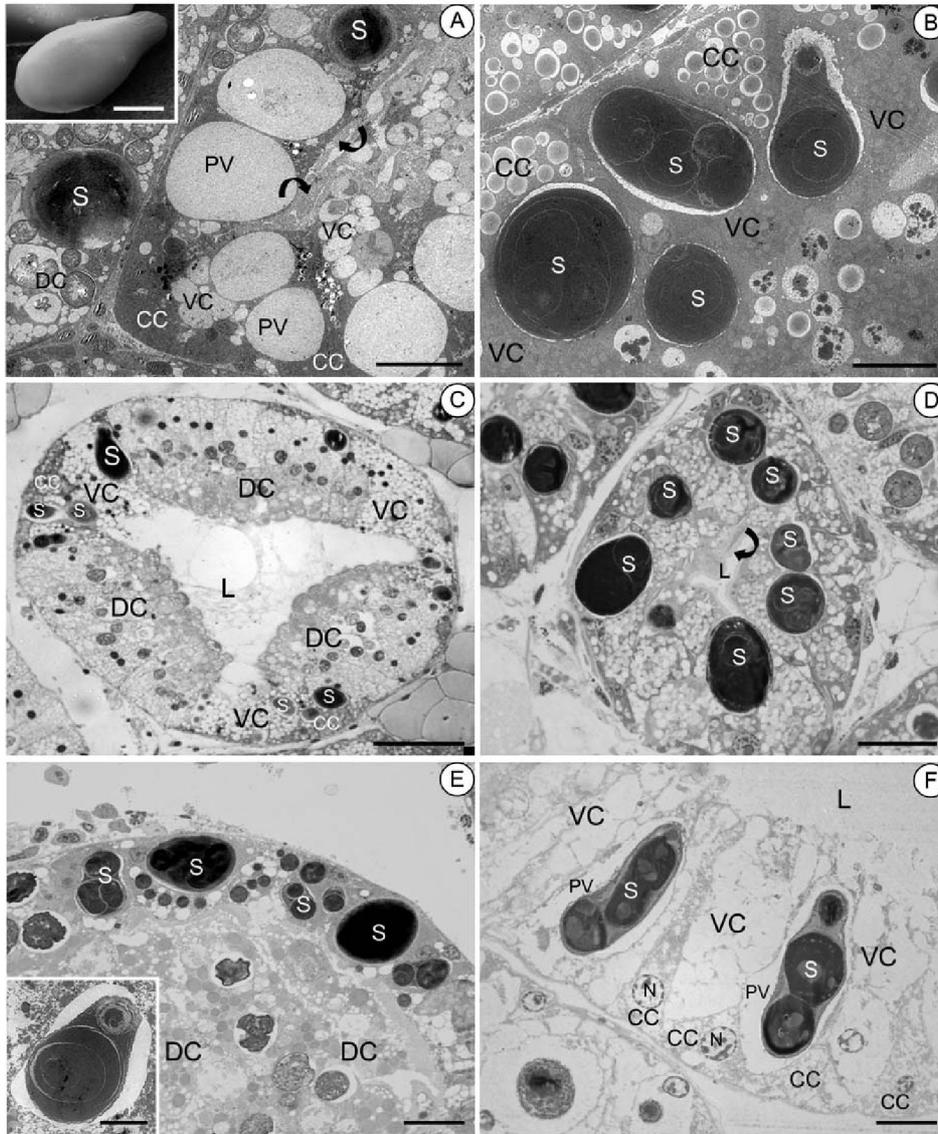


Figure 1. Micrographs of the digestive gland of strombid species showing the presence of Sporozoa-like organisms. **A.** *Strombus costatus*. TEM of the edge of a digestive tubule. The large electron-lucent vesicles correspond to Sporozoa-like organisms which appear weakly contrasted. Inset: SEM of a single Sporozoa-like organism obtained from a purified solution from the digestive gland of *S. costatus*. **B.** *Strombus gallus*. TEM of a digestive tubule showing various life stages typical of Sporozoa in vacuolated cells. **C.** *Strombus gigas*. Semi-thin section showing the three cell types that composed the digestive tubule and Sporozoa-like organisms in vacuolated cells. **D.** *Strombus pugilis*. Semi-thin section of a digestive tubule containing spherical Sporozoa-like organisms. **E.** *Lambis lambis*. Edge of a digestive tubule containing Sporozoa-like structures of various sizes and life stages. Inset: TEM of a single Sporozoa-like organism from *L. lambis*. **F.** *Strombus galeatus*. Semi-thin section showing two Sporozoa-like organisms in their parasitophorous vacuoles. Note the presence of triangular crypt cells interspaced between vacuolated cells. Abbreviations: CC, crypt cells; DC, digestive cells; L, lumen; N, nucleus; PV, parasitophorous vacuole; S, Sporozoa-like organism; VC, vacuolated cells. Curved arrows point to microvilli. Scale bars **A** = 20 μm , inset = 10 μm ; **B** = 10 μm ; **C** = 40 μm ; **D** = 20 μm ; **E** = 10 μm , inset = 5 μm ; **F** = 10 μm .

RESEARCH NOTE

large numbers of these Sporozoa-like microorganisms contradicts one of the assumptions of a parasitic relationship (Combes, 1995). Moreover, Combes (2001) suggested that virulence should be defined by a decrease in the reproductive success of the host. Sporozoa-like microorganisms observed in two independent populations of *S. gigas* from Florida (Aldana Aranda *et al.*, 2009) and Guadeloupe (Frenkiel *et al.*, 2009), however, do not affect the reproductive cycle of this species. Similar low virulence was observed in *S. pugilis* by Baqueiro Cárdenas, Aldana Aranda & Martínez Olivares (2005). These observations suggest a relationship of very low virulence, so that these Sporozoa-like microorganisms could be commensal rather than parasitic in the Strombidae.

REFERENCES

- ALDANA ARANDA, D., GLAZER, R., DELGADO, G., BAQUEIRO CARDENAS, E. & MONTERO, J. 2009. Occurrence of Apicomplexa infecting queen conch, *Strombus gigas*, from off shore and near shore in Florida. *Proceedings of Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, **61**: 491–497.
- AZEVEDO, C. & PADOVAN, I. 2004. *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **51**: 214–219.
- BAQUEIRO CÁRDENAS, E., ALDANA ARANDA, D. & MARTÍNEZ OLIVARES, G. 2005. Gonad development and reproductive pattern of the fighting conch *Strombus pugilis* Linné, 1758 (Gastropoda, Prosobranchia) from Campeche, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, **24**: 1127–1133.
- BAQUEIRO CÁRDENAS, E., FRENKIEL, L., ZETINA ZARATE, A. & ALDANA ARANDA, D. 2007. Coccidian (Apicomplexa) parasite infecting *Strombus gigas* Linné, 1758 digestive gland. *Journal of Shellfish Research*, **26**: 319–321.
- COMBES, C. 1995. *Interactions durables*. Masson, Paris.
- COMBES, C. 2001. *L'art d'être parasite. Les associations du vivant*. Flammarion, Paris.
- COX, F.E.G. 1994. The evolutionary expansion of the Sporozoa. *International Journal for Parasitology*, **24**: 1301–1316.
- FRENKIEL, L., PRUVOST, L., ZETINA ZARATE, A., ENRIQUÉZ DIAZ, M. & ALDANA ARANDA, D. 2009. Reproduction cycle of the queen conch *Strombus gigas* L. 1758. *Proceedings of Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, **61**: 518–520.
- FRIEDMAN, C.S., GARDNER, G.R., HEDRICK, R.P., STEPHENSON, M., CAWTHORN, R.J. & UPTON, S.J. 1995. *Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca). *Journal of Invertebrate Pathology*, **66**: 33–38.
- GROS, O., FRENKIEL, L. & ALDANA ARANDA, D. 2009. Structural analysis of the digestive gland of the queen conch *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) and its intracellular Apicomplexa parasites. *Journal of Molluscan Studies*, **75**: 59–68.
- McFALL-NGAI, M.J. 1998. Pioneering the squid-*Vibrio* model. *American Society for Microbiology News*, **64**: 639–645.
- PERKINS, F.O. 1991. 'Sporozoa': Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramixia, Myxosporidia, and Actinosporidia. In: *Microscopic anatomy of invertebrates*. Vol. 1: Protozoa (F.W. Harrison & J.O. Corliss, eds), pp. 261–331. Wiley-Liss, New York.

INTERACTION DURABLE STROMBIDAE – SPOROZOAIRES ET FONCTIONNEMENT DE L'ORGANE HÔTE DE LA RELATION : LA GLANDE DIGESTIVE

Le lambi *Strombus gigas* (Strombidae) est une espèce de Mollusque Gastéropode particulièrement importante dans toute la région Caraïbe. En 2007, il a été rapporté la présence de structures étrangères en grand nombre dans les cellules de la glande digestive des animaux analysés. Ces structures, apparemment des protistes, sont alors décrites comme des parasites appartenant au groupe des Apicomplexa (Sporozoaires). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous proposons de poser les bases de l'étude d'une thématique nouvelle : l'association Strombidae-Sporozoaires.

Dans un premier temps, une analyse structurale et ultrastructurale de la glande digestive et de ses micro-organismes associés a été réalisée sur neuf espèces de Gastéropodes. Il ressort de ces analyses que les Sporozoaires sont des endosymbiotes intracellulaires présentant une prévalence de 100 % dans toutes les espèces analysées. Ils sont très largement répartis et la transmission se fait verticalement. Rien ne semble indiquer qu'ils soient virulents. Nous souhaitons donc proposer qu'ils entretiennent, avec leurs hôtes, une relation peu, voire pas virulente de type commensalisme ou mutualisme.

Dans un deuxième temps, la glande digestive a été étudiée d'un point de vue structural et fonctionnel. Nous nous sommes intéressés aux fonctions associées aux trois types cellulaires rencontrés dans les tubules digestifs de la glande : les cellules digestives, les cellules vacuolaires et les cellules cryptiques. La digestion intracellulaire a été mise en évidence par une analyse cytochimique dans les cellules digestives. Les cellules vacuolaires, qui hébergent les symbiotes, sont dédiées au stockage de lipides. Enfin, l'osmorégulation de certains minéraux, ainsi que la détoxification de certains métaux essentiels sont des fonctions attribuées aux sphérocristaux rencontrés dans les cellules cryptiques.

Mots clés : Ampullariidae, Apicomplexa, détoxification, histologie, physiologie, sphérocrystal structure, symbiose.

STROMBIDAE-SPOROZOAN RELATIONSHIP AND FUNCTIONING OF THE HOST ORGAN : THE DIGESTIVE GLAND

The Queen Conch, *Strombus gigas* (Strombidae) is a Gastropod Mollusc particularly important in the Caribbean. In 2007, a huge number of foreigner structures have been detected in the digestive gland cells. These structures have been defined as parasites belonging to the Apicomplexa (Sporozoa) group. Thus, this thesis proposes a new research topic: the Strombidae-Sporozoa relationship.

First, a structural and ultrastructural analysis of the digestive gland and its symbionts was performed on nine Gastropods species. These analyses revealed that Sporozoa are intracellular endosymbionts with a 100 % prevalence in every species analyzed. Symbionts are widely distributed and vertically transmitted. No evidences have been found suggesting that they are virulent. Accordingly, we propose that they are involved in a weakly, or not, virulent relationship such as commensalism or mutualism.

Secondly, functional and structural studies of the digestive gland have been done. We have focused on functions associated to the three cell types which compose the digestive tubules of the gland: the digestive cells, the vacuolated cells and the cryptic cells. Intracellular digestion has been highlighted by cytochemistry in digestive cells. Vacuolated cells harbor symbionts and store lipid reserves. Mineral osmoregulation and detoxification of trace elements seems to be mostly attributed to spherocrystals in crypt cells.

Key words: Ampullariidae, Apicomplexa, detoxification, histology, physiology, spherocrystal, structure, symbiosis.