

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

ANNEEE 2004

**PATHOLOGIE D'ARGULUS FOLIACEUS (LINNE)
CHEZ ONCORHYNCHUS MYKISS (WALBAUM)**

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

Présenté et soutenu publiquement
le.....
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Emmanuel Jacques Robert LEGUAY

Né le 11 Juillet 1976 à Alfortville (94)

JURY

Président : **Monsieur RICHET**
Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : **Monsieur BLANC**, Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Assesseur : **Madame WYERS**, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

CORPS ENSEIGNANT DE L'E.N.V.N

Directeur : Pierre SAÏ (Pr)

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE		
BIOCHIMIE	Brigitte SILIART (Pr) François ANDRE (Pr)	Bruno LE BIZEC (MC)
NUTRITION-ALIMENTATION	Patrick NGUYEN (Pr) Henry DUMON (Pr)	Lucile MARTIN (MC)
PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE	Marc GOGNY (Pr) Louis PINAULT (Pr) (MC) Martine KAMMERER (Pr)	Jean-Dominique PUYT (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (MC) Hervé POULIQUEN (MC)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (MC)	Jean-MARIE BACH (MC) Vanessa LOUZIER (MCC)
DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE GENERALE		
ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Monoque WYERS (Pr) (AERC) Yan CHEREL (Pr)	Frédérique NGUYEN Jérôme ABADIE (MC) Marie-Anne COLLE (MCC)
PATHOLOGIE GENERALE-MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE	Jean-Marc PERSON (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Hervé SEBBAG (MC) Stéphann BRIKLE (MCC)
AQUACULTURE-PATHOLOGIE AQUACOLE et STATISTIQUE	Hervé LE BRIS (Pr) Chantal THORIN (PCEA)	Guillaume BLANC (MC)
UNITE DE LANGUES	Marc BRIDOU (PI)	Joe Mc GUIRE (Lecteur)
DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGES ET SANTE PUBLIQUE		
HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Catherine MAGRAS-RESCH (MC) Jean-Michel CAPELIER (MC) Eric DROMIGNY (MC)	Michel FEDERIGHI (Pr) Marie-France PILET (MC)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Arlette LAVAL (Pr) Catherine BELLOC (MC)	Isabelle BREYTON (MC) Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (AERC)
PARASITOLOGIE GENERALE, PARASITOLOGIE DES ANIMAUX DE RENTE, FAUNE SAUVAGE	Monique L'HOSTIS (Pr) Alain CHAUVIN (Pr)	Albert AGOULON (MC)
PATHOLOGIE INFECTIEUSE	Jean-Pierre GANIERE (Pr) CLOUET (MC) Geneviève ANDRE-FONTAINE (Pr)	Nathalie RUVOEN-
ZOOTECNIE-ECONOMIE	Henri SEEGERS (Pr) Jean-Claude LEBOSSE (Pr) (MC) Xavier MALHER (Pr) (AERC) Nathalie BAREILLE (MC)	François BEAUDEAU (MC) Christine FOURICHON Raphaël GUATTEO
DEPARTEMENT DES SCIENCES CLINIQUES		
ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES	Patrick COSTIOU (Pr) Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
BILOGIE CHIRURGICALE, IMAGERIE MEDICALE	Eric AGUADO (MC) Jean-Claude LE NIHOJANNEN (Pr) Laurent MARESCAUX (MC) (AERC)	Eric GOYENVALLE (MC) GAUTHIER Olivier (MC) Delphine HOLOPHERNE Marion FUSELIER (AERC)
DERMATOLOGIE, PARASITOLOGIE CARNIVORES, EQUIDES, MYCOLOGIE	Patrick BOURDEAU (Pr) Alain MARCHAND (Pr)	Catherine IBISCH (MC)
MEDECINE INTERNE ET LEGISLATION PROFESSIONNELLE	Yves LEGEAY (Pr) (MC) Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCHE-MALBLANC (MCC)	Jack-Yves DESCHAMPS Odile SENECAT (MC)
BIOTECHNOLOGIES ET PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Daniel TAINURIER (Pr) (Pr) Francis FIENI (Pr)	Jean-François BRUYAS Isabelle BATTUT (MC)

Pr : Professeur, PrC : Professeur Contractuel, MC : Maître de Conférences, MCC : Maître de Conférences Contractuel, AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherches, PI : Professeur certifié Enseignement Agricole.

A notre président de thèse,
A Monsieur MARJOLET,
Professeur de la faculté de Médecine de Nantes

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

A Monsieur BLANC
Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Ainsi que

A Madame WYERS
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

En remerciement de leur confiance et de leurs précieux conseils.
Qu'ils trouvent ici la marque de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A l'Institut d'Aquaculture de l'Université de Stirling,

A Madame SOMMERVILLE et Monsieur WOOTTEN
Professeurs de l'Institut d'Aquaculture de l'Université de Stirling.

Qui nous ont fait l'honneur de nous confier ce travail et nous ont soutenu dans sa réalisation, en nous transmettant leur enthousiasme.

Remerciement sincère

A toute l'équipe de parasitologie de l'Institut d'aquaculture
Pour leur aide leur soutien et toute leur bonne humeur.

A Nick TAILOR
Pour ses conseils avisés et son aide quant à la réalisation de cette étude et sa pêche miraculeuse.

A ma famille

A mes parents,
Pour leur soutien et leur confiance durant ces dures années de labeur, merci d'avoir été là.

A mes grands-parents,
Qui m'ont toujours supporté et qui sans leur aides cette expérience n'aurait pu être possible.

A ma sœur et mon frère,
Que leurs souhaits se réalisent.

A Hélène,

Pour son soutien et sa patience attentive.

A Martine et Bernard,

Pour m'avoir permis de survivre à la rédaction de ma thèse.

A mes amis d'enfances, JB et Marc,

Pour leur amitié sans faille.

A Scaf, aux Gibolins, Jeff, Thev et Xav et leur compagne, Céline, Vio et Milou,

Pour leur amitié et ces moments de bonheur pendant ces laborieuses années et celles qui restent à venir, que l'astuce soient avec eux !

A Djedje et Meuh, Ston et Minetto,

Pour leur amitié et leur hospitalité au pied levé, plein de bonheur !!!

A mes poulots de Saint-Simon, Mat, Psi, Romu et Bubble,

Pour ces moments de partage et d'hospitalité.

A Manos Dimakis et Costas Zorgios, Rob Mac Moran, Simon Menanteau, Pierre Burray, Michel Shram,

Pour cette formidable année passée auprès d'eux en Ecosse et celles qui restent à venir.

MERCI.

SOMMAIRE

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA BIOLOGIE D'ARGULUS FOLIACEUS.....	13
1.1. POSITION TAXONOMIQUE	14
1.2. CYCLE BIOLOGIQUE.....	14
1.3. ANATOMIE.....	18
1.4. BIOLOGIE:	21
1.5. HÔTE : SPECIFICITE ET REPARTITION ANATOMIQUE.....	23
1.6. PATHOGENIE D'ARGULUS FOLIACEUS	24
1.7. INFECTIONS SECONDAIRES	27
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	28
2.1. ANIMAUX ET CONDITIONS EXPERIMENTALES	29
2.2. PARASITE.....	31
2.3. MÉTHODE D'INFESTATION ET D'ÉCHANTILLONAGE	32
2.4. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'ÉCLOSION	35
2.5. TECHNIQUES DE LABORATOIRE	36
3. RÉSULTATS	43
3.1. DISTRIBUTION D'ARGULUS FOLIACEUS SUR LA TRUITE ARC-EN-CIEL	44
3.2. DISTRIBUTION DES LÉSIONS CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL	50
3.3. ÉTUDES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE.....	54
3.4. HISTOPATHOLOGIE DE LA PEAU.....	62
3.5. INFECTION SECONDAIRE	88
4. DISCUSSION.....	91
4.1. DISTRIBUTION D'ARGULUS FOLIACEUS CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL	92
4.2. DISTRIBUTION DES LÉSIONS SOUS UV APRÈS TRAITEMENT À LA FLUORESCÉINE	94
4.3. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE	95
4.4. HISTOLOGIE DES LESIONS	97
4.5. INFECTION SECONDAIRE	103
CONCLUSION	104
ANNEXES	106
BIBLIOGRAPHIE	109
BIBLIOGRAPHIE COMPLEMENTAIRE.....	114

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma du cycle biologique d' <i>Argulus foliaceus</i>	16
Figure 2: Vue ventrale d' <i>A. foliaceus</i> au stade métanauplius.....	18
Figure 3: Vue ventrale du 6 ^{ième} stade de développement d' <i>A. foliaceus</i>	19
Figure 4: Dessin de la région buccale d' <i>Argulus japonicus</i>	20
Figure 5: Schéma des systèmes glandulaires associés au stylet et au proboscis d' <i>A. japonicus</i>	21
Figure 6: Schéma des bacs de maintenance de 20 l utilisés pour les expérimentations.	30
Figure 7: Schéma de la chambre noire et de son utilisation.	38
Figure 8: Distribution des métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> sur le flanc droit des truites arc-en-ciel quatre jours PI.	44
Figure 9: Distribution des métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel quatre jours PI.	44
Figure 10: Distribution des stades 6 d' <i>Argulus foliaceus</i> sur le flanc droit des truites arc-en-ciel trente jours PI avec des métanauplius.....	46
Figure 11: Distribution des stades 6 d' <i>Argulus foliaceus</i> sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel trente jours PI avec des métanauplius.....	46
Figure 12: Distribution des stades pré-adultes d' <i>Argulus foliaceus</i> sur le flanc droit des truites arc-en-ciel quatre jours PI.	48
Figure 13: Distribution des stades pré-adultes d' <i>Argulus foliaceus</i> sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel quatre jours PI.....	48
Figure 14 : Distribution des stades adultes d' <i>Argulus foliaceus</i> sur le flanc droit des truites arc-en-ciel quatre jours PI.	49
Figure 15: Distribution des stades adultes d' <i>Argulus foliaceus</i> sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel quatre jours PI.....	49
Figure 16: Photographie du côté gauche de la nageoire dorsal du poisson numéro quatre infesté par des <i>A. foliaceus</i> adultes.	50

Figure 17: Photographie au MEB de la partie sélectionnée pour l'étude en MEB de la Figure 16	51
Figure 18: Photographie d'une section de la zone jaune de la Figure 16.....	52
Figure 19: Photographie sous lumière UV du côté droit de la queue du poisson 3, sacrifié 30 jours PI	53
Figure 20: Photographie sous lumière UV du côté droit de la queue d'un poisson témoin.....	53
Figure 21: Photographie sous lumière UV de l'opercule droit du poisson 3 quatre jours PI avec des stades pré-adultes d' <i>A. foliaceus</i>	53
Figure 22: Photographie sous lumière UV de l'opercule droit d'un poisson témoin.....	53
Figure 23 : Photographie sous lumière UV du côté gauche de la nageoire dorsale du poisson 4 quatre jours PI avec des stades adultes d' <i>A.</i> <i>foliaceus</i>	54
Figure 24 : Photographie sous lumière UV du côté gauche de la nageoire dorsale d'un poisson témoin.	54
Figure 25: Photographie au MEB d'un métanauplius d' <i>Argulus foliaceus</i> fixé sur une nageoire pelvienne de truite arc-en ciel	55
Figure 26: Photographie au MEB du même échantillon que la Figure 25 à plus fort grossissement et concentrée sur la pince droite d' <i>A. foliaceus</i>	56
Figure 27 : Photographie au MEB de l'empreinte du métanauplius photographié sur la figure25.....	57
Figure 28: Photographie d'un stade pré-adulte d' <i>Argulus foliaceus</i>	58
Figure 29: Photographie d'une empreinte récente d' <i>Argulus foliaceus</i>	59
Figure 30: Photographie au MEB du bord gauche d'une nageoire adipeuse de truite arc-en-ciel parasitée par un stade 6 d' <i>A. foliaceus</i>	60
Figure 31: Photographie en MEB du côté interne d'une nageoire pectorale parasitée par un stade pré-adulte de <i>A. foliaceus</i>	61
Figure 32: Section histologique de la peau d'une nageoire de truite arc-en-ciel.....	64
Figure 33: Section histologique normale de peau du corps d'une truite arc-en- ciel.	65

Figure 34: Photographie d'un métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> fixé sur la nageoire adipeuse d'une truite arc-en-ciel, en coupe sagittale passant par le stylet, l'orifice buccal.....	68
Figure 35: Photographie de la section histologique précédente au plus fort grossissement montrant l'insertion du métanauplius avec une de ses pinces sur la lame basale de l'épiderme.....	69
Figure 36: Photographie d'un métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> en coupe longitudinale fixé sur une nageoire pelvienne de truite arc-en-ciel..	70
Figure 37: Photographie d'un métanauplius d' <i>Argulus foliaceus</i> en coupe longitudinale sur la limite d'insertion de la nageoire dorsale d'une truite arc-en-ciel.	71
Figure 38: Photographie d'un métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> en coupe transversale passant par les 1 ^{er} maxillaires et l'orifice buccal sur une nageoire pectorale de truite arc-en-ciel.....	72
Figure 39: Photographie d'une coupe longitudinale d'un métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> en passant par une antenne sur la peau du corps d'une truite arc-en-ciel.	73
Figure 40: Photographie d'une section histologique d'un stade pré-adulte d' <i>Argulus foliaceus</i> en coupe transversale passant par ses ventouses sur la peau du corps d'une truite arc-en-ciel.....	76
Figure 41: Photographie d'une section de nageoire pelvienne d'une truite arc-en-ciel proche du lieu de fixation d'un stade pré-adulte d' <i>A. foliaceus</i> , trente jours après infestation avec des stades métanauplius d' <i>A. foliaceus</i>	77
Figure 42: Photographie d'une section histologique d'un stade adulte d' <i>A. foliaceus</i> en coupe longitudinale sur le dos et sous la nageoire adipeuse d'une truite arc-en-ciel.....	79
Figure 43: Photographie d'une coupe histologique d'un stade adulte d' <i>A. foliaceus</i> en coupe transversale à la base de l'insertion d'une nageoire pectorale d'une truite arc-en-ciel.....	80
Figure 44: Détail photographique de la section histologique que la Figure 43 centrée sur la lésion dermique.....	81

Figure 45: Photographie d'une section histologique d'un stade adulte d' <i>A. foliaceus</i> en coupe longitudinale sur une nageoire anale de truite arc-en-ciel montrant une spongiose importante de l'épiderme accompagnée de la formation d'une cavité importante dans le derme.	82
Figure 46: Détail de la Figure 45 sur la cavité dermique.	83
Figure 47: Photographie d'une section histologique de peau du corps d'une truite arc-en-ciel infestée par <i>A. foliaceus</i>	85
Figure 48: Photographie d'une section histologique d'une nageoire pelvienne de truite arc-en-ciel infestée par <i>A. foliaceus</i>	86
Figure 49: Photographie d'une section histologique d'une nageoire adipeuse de truite arc-en-ciel infestée par <i>A. foliaceus</i>	87
Figure 50 : Photographie en MEB d'un stade preadulte d' <i>A. foliaceus</i> provenant du Loch Lomond infesté par <i>Epistylis sp.</i>	88
Figure 51: Photographie en MEB des crochets d'un second maxillaire de l' <i>A. foliaceus</i> photographié Figure 50 avec des paquets d' <i>Epistylis sp.</i> à leur base. (X 320).	89
Figure 52: Photographie d'une section histologique d'un stade adulte d' <i>A. foliaceus</i> passant par un crochet céphalothoracique infesté par <i>Epistylis sp.</i>	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Période d'éclosion des œufs en fonction de leurs différents stades	35
Tableau 2: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> pendant quatre jours.....	66
Tableau 3: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des métanauplius d' <i>A. foliaceus</i> après trente jours PI.	74
Tableau 4: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des stades pré-adultes d' <i>A. foliaceus</i> quatre jours PI.	74
Tableau 5: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des stades adultes d' <i>A. foliaceus</i> quatre jours PI	78
Tableau 6: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel de la pêcherie infestées par <i>A. foliaceus</i>	84

LISTE DES ANNEXES

Coloration de GRAM.....	91
Coloration en Hématoxyline et éosine.....	92

INTRODUCTION

Le "pou d'eau douce", *Argulus foliaceus* L., est un crustacé de la sous-classe des Branchiures. C'est un ectoparasite obligatoire de nombreuses espèces de poissons d'eau douce, communément rencontré dans les retenues (d'eau, étangs, réservoirs, lacs etc.) à travers toute l'Europe (Bower-shore, 1940) et de nombreuses autres parties du globe comme la Thaïlande, la Malaisie (Kabata, 1985). Dans le passé il était considéré comme un pathogène majeur de la carpe en aquaculture et, depuis cette dernière décennie, il a été reconnu responsable de nombreuses hécatombes en élevage truiticole (Menezes *et al.*, 1990) et dans de nombreux parcours de pêche au Royaume Unis (Northcott et Campbell, 1995 ; Northcott *et al.*, 1997 ; Bark, 2000).

Selon ces mêmes auteurs, la mortalité observée chez différentes espèces d'hôte résulte d'une infestation massive. Martin (1932), Bower-shore (1940), Becker (1942), Stammer (1957), Hoffman (1962), Shimura et Inoue (1984), et Kabata (1985), considèrent que ce sont l'injection de toxines et la sécrétion d'enzymes digestives induisant des irritations, de l'œdème, et la destruction de l'épiderme qui entraînent le plus de lésions, et sont fatales à l'hôte. Tandis que pour Vanheerden et Oldewage (1988 ; 2001), Shafir et Oldewage (1992) ce sont les modes d'attachement d'*A. foliaceus* qui entraîneraient des lésions épidermiques plus importantes que celles induites par le mode de nutrition ; les infections secondaires favorisées par ces deux modes seraient fatales. L'importance relative de ces facteurs n'est pas clairement définie.

L'objectif de nos recherches est une étude lésionnelle de l'interface hôte/parasite d'*A. foliaceus* chez la truite arc-en-ciel et de définir sa pathogénicité à partir d'analyse de coupes histologiques.

Argulus foliaceus est un crustacée qui subit de nombreuse mue. Du stade juvénile (métanauplius à la 5^{ème} mue), il passe par un stade pré-adulte (6-11^{ème} mue) pour atteindre le stade adulte. Outre une croissance importante pendant son

développement, il subit une transformation de ses appendices de fixation. Les stades juvéniles se fixent principalement par deux paires de pinces. Elles se transforment en ventouse au cours de la quatrième et cinquième mue. Par conséquent les lésions induites peuvent être différentes. Il a donc été choisi d'étudier les lésions quatre jours après fixation du premier stade libre ainsi que quatre jours après fixation de stades pré-adultes et adultes. Une autre expérience avec des sujets infestés par des premiers stades mais échantillonnés au stade pré-adulte a été jugé nécessaire afin d'observer des lésions chroniques.

Les échantillons ont été observé dans chaque expérience en Microscopie Electronique à Balayage (MEB). La MEB permet une étude superficielle des lésions à très faible grossissement (X20), donc d'avoir une interprétation de la surface de l'interaction hôte/parasite. Elle nous permet aussi une observation à fort grossissement (X 600).

Les études histologiques sont à fort grossissement et servent à étudier cette interaction en profondeur au niveau cellulaire. Ces deux techniques sont donc complémentaires et permettront une meilleure interprétation.

Le marquage à la fluorescéine indique quant à lui la distribution, le nombre et la surfaces des ulcères cutanés de la truite.

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA BIOLOGIE
D'ARGULUS FOLIACEUS

1.1. POSITION TAXONOMIQUE

EMBRANCHEMENT	ARTHROPODES
Sous-embranchement	Crustacés
Classe	Maxillopoda
Sous-classe	Branchiura
Ordre	Arguloidea
Famille	Argulidae
Genre	<i>Argulus</i>
Espèce	<i>foliaceus</i>

Il a été recensé plus de 150 espèces de Branchiures dont un peu plus de 100 appartiennent au genre *Argulus* (Müller, 1785). *Argulus* a une répartition mondiale, avec des espèces marines et d'eau douce. L'identification spécifique repose sur des critères morphologiques des individus (Kabata, 1985). Les critères morphologiques retenus sont la longueur maximale atteinte, l'extension des lobes postérieurs de la carapace du céphalothorax par rapport à l'abdomen, la forme des lobes de l'abdomen et l'importance de leur division.

Seule une étude poussée en MEB des différents appendices permet de faire la distinction précise des différents stades de développement d'*Argulus*.

1.2. CYCLE BIOLOGIQUE

Le cycle biologique est monoxène direct et son hôte est le poisson. Cependant, *A. foliaceus* peut quitter momentanément son hôte et nager librement, quel que soit son sexe, pour se reproduire et changer d'hôte (Kabata, 1970; Shafir et van As, 1986). Le cycle complet est accompli en 55 jours à une température de 20°C (Rahman M, 1995) (Figure 1).

Le développement commence dans les œufs jusqu'au stade métanauplius qui éclot à une température supérieure à 11°C (Stammer, 1959). Clark (1902) et Stammer (1959) ont décrit partiellement les différentes séquences de développement d'A.

foliaceus. Récemment Rushton-Mellor et Boxshall (1994) ont décrit en Microscope Electronique à Balayage (MEB) tous les stades de développement d'*A. foliaceus*. Le stade métanauplius est suivi de 9 stades juvéniles. Les œufs ont été observés dans les cavités génitales des femelles à partir du 11^{ème} stade ; Rushton-Mellor et Boxshall en ont déduit que ce stade correspondait au stade adulte. Il a été démontré que la vitesse de développement du parasite est directement proportionnelle à la température de l'eau, une augmentation de la température engendre une accélération du taux de développement. D'après les études de (Rushton-Mellor et Boxshall, 1994), *Argulus foliaceus* atteint la taille de 12 mm en 70, 55, 28, et 18 jours quand il est respectivement maintenu aux températures de 16, 20, 24, et 28°C ce qui donne une moyenne de 51 jours (49-61) à 15°C, pour un développement complet. On a aussi mis en évidence que la photopériode est un important facteur de développement (Mikheev *et al.*, 2001). Après la rencontre avec le sexe opposé, la femelle quitte son hôte pour déposer en une ou plusieurs fois ses œufs en chapelets à la surface d'une grande variété de substrats tels que des pierres, des algues, des plantes ou des bouts de bois (Mikheev *et al.*, 2001 ; Pasternak *et al.*, 2000).

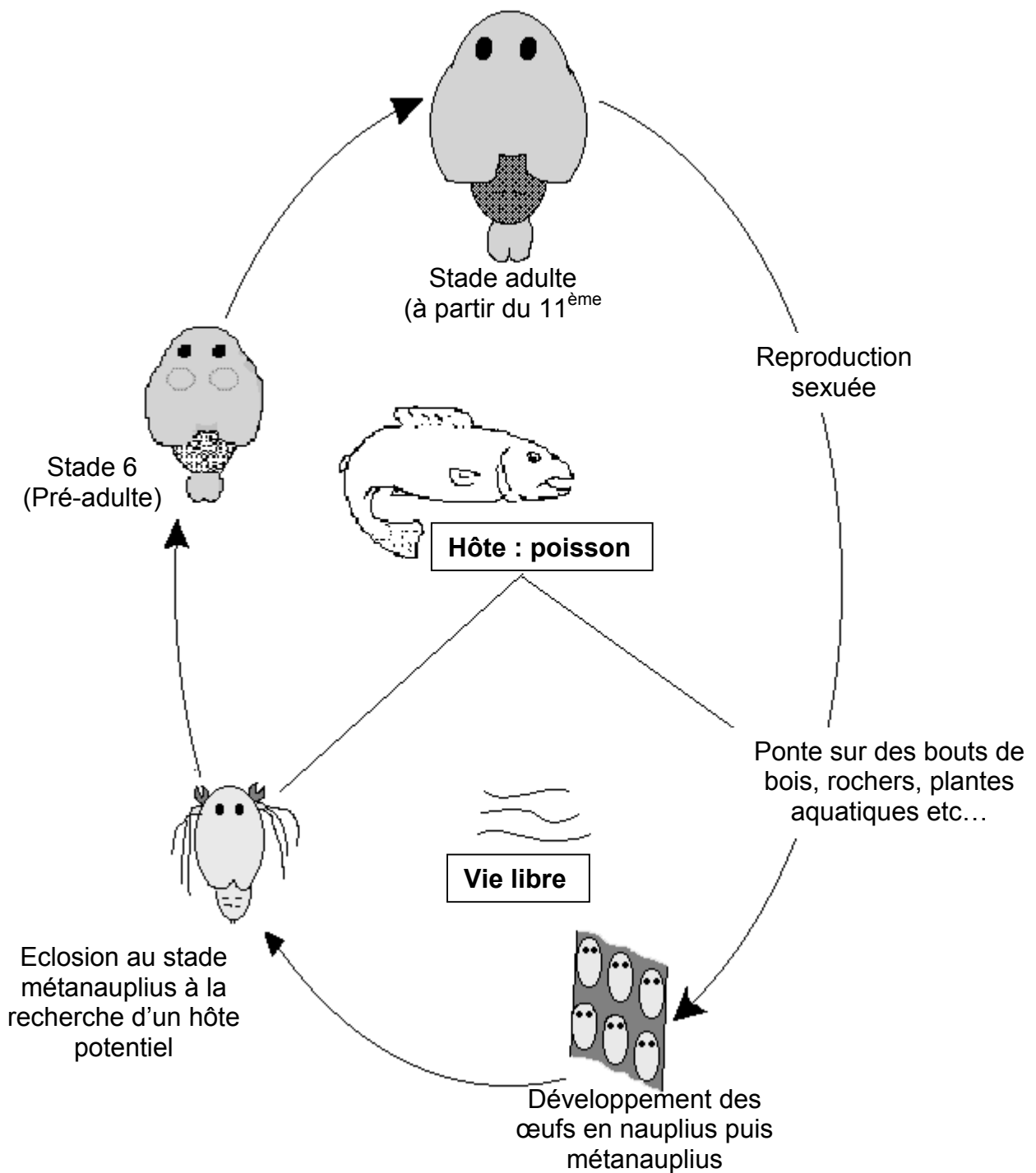


Figure 1: Schéma du cycle biologique d'*Argulus foliaceus*. Durée du cycle environ 1100 degré jours.

Prévalence saisonnière : comme on l'a vu précédemment, le développement dépend de la température. *A. foliaceus* éclot quand la température de l'eau dépasse 11°C (Bower-shore, 1940). Shimura (1983a-1983b) et (Stammer, 1959) ont observé,

qu'en région tempérée, le parasite passait l'hiver au stade d'œuf et qu'il y avait 3 générations de parasite par an, d'avril à septembre, de juin à novembre et de septembre à mai.

Dans des études menées en Finlande, la prévalence est très faible en hiver, et augmente nettement de mai à juin, puis diminue de manière importante d'août à septembre (Pasternak *et al.*, 2000). Ce même schéma est observé en Ecosse, par contre, il est avancé d'un mois au sud de l'Angleterre (Nick Taylor, 2003, source personnelle).

1.3. ANATOMIE

1.3.1. Anatomie externe

Argulus foliaceus est de forme ovale et aplatie dorsoventralement. Il possède deux ocelles non pédonculés placés dorsalement en avant du céphalothorax.

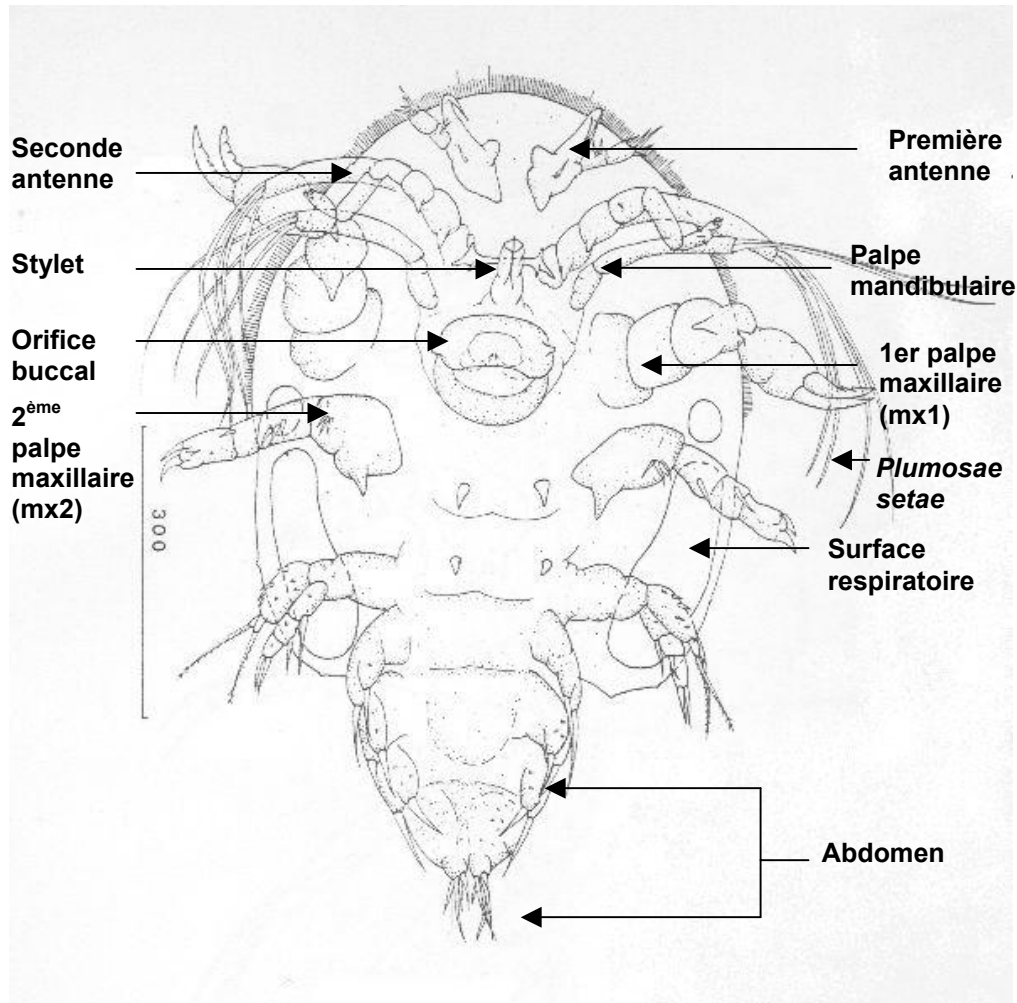


Figure 2: Vue ventrale d'*A. foliaceus* au stade métanauplius (Rushton-Mellor et Boxshall, 1994). (Echelle: barre = 300 µm).

Du 1^{er} au 5^{ème} stade de développement après éclosion, il n'existe pas de différence anatomique significative si ce n'est la perte des *plumosae setae* au niveau des deuxièmes paires d'antennes et des palpes mandibulaires au deuxième stade

(Figure 2). Seule la taille change : de 740 μm pour le 1^{er} stade à 1,56 mm pour le 5^{ème} stade (Rushton-Mellor et Boxshall, 1994).

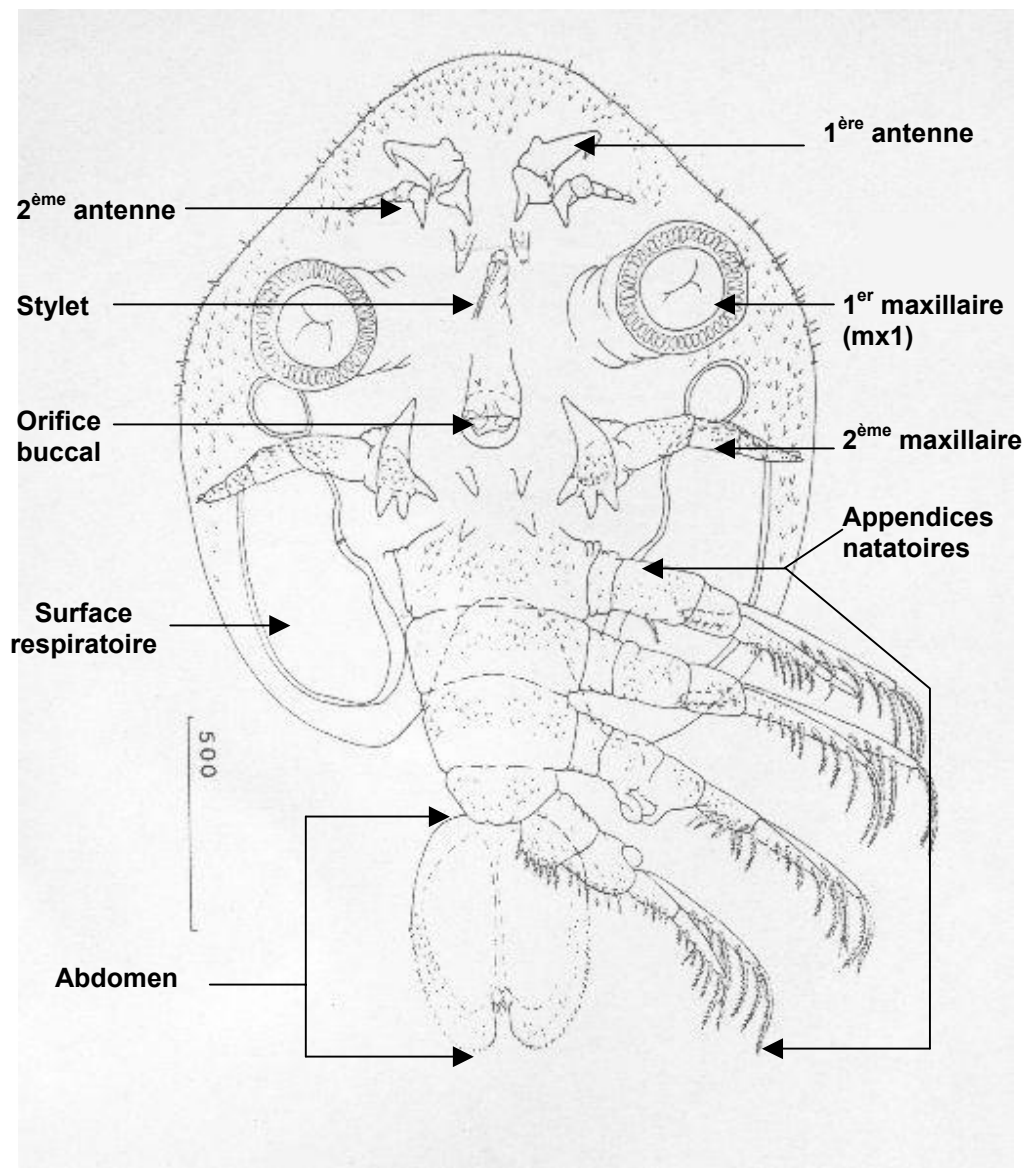


Figure 3: Vue ventrale du 6^{ème} stade de développement d'*A. foliaceus* (Rushton-Mellor et Boxshall, 1994). (Echelle: barre = 500 μm).

La principale transformation anatomique apparaît au cours de la quatrième mue et résulte en l'apparition d'une ventouse sur le premier maxillaire avec la conservation d'une paire de pince à son extrémité. C'est au cours de la mue suivante qu'*A. foliaceus* perdra complètement ses pinces et que le premier maxillaire ne sera constitué que d'une unique ventouse (Figure 3). Les mues suivantes n'apporteront

que quelques modifications mineures dans la morphologie des appendices céphalothoraciques et seul un accroissement régulier de la taille est notable.

1.3.2. Anatomie interne de la région buccale et du stylet

La morphologie externe du stylet et de l'orifice buccal d'*A. japonicus* a été très bien étudiée en MEB par Shimura (1983b). Le stylet est fin et flexible et présente un orifice à son extrémité. L'orifice buccal ressemble à une mâchoire et présente, juste derrière un labre, deux conduits sécréteurs d'enzymes digestives. Swanepoel et Avenant-Oldewage (1992) ont étudié et décrit les glandes sécrétrices liées à la région buccale et au stylet d'*A. japonicus* (Thiele) qui est l'espèce la plus proche d'*A. foliaceus* (Figure 4). Le stylet qui est un tube rempli d'hémolymphe, est engainé dans un fourreau rigide et exempt d'hémolymphe. Le stylet est associé à trois glandes sécrétrices dont la nature des sécrétions reste inconnue.

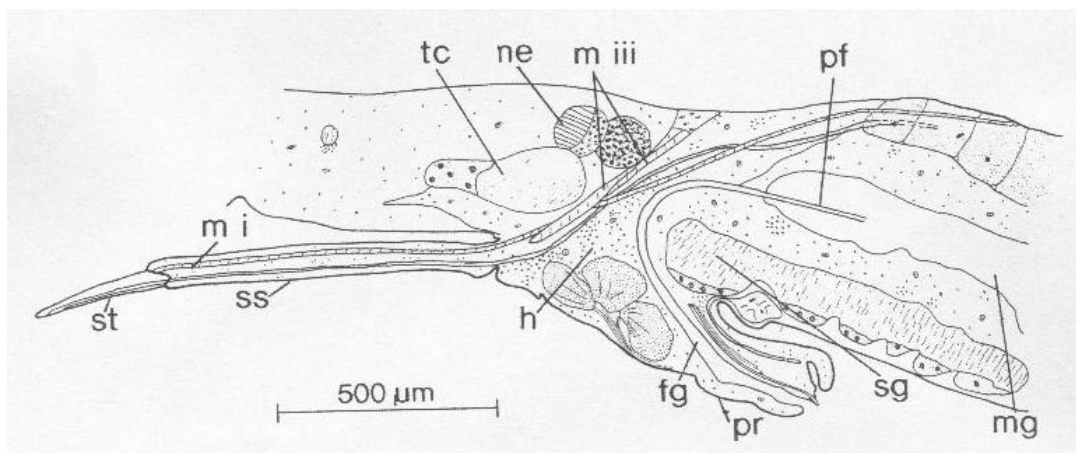


Figure 4: Dessin de la région buccale d'*Argulus japonicus* d'après une coupe longitudinale de 25 µm d'épaisseur pour montrer le stylet préoral et ses structures associées. Fg, Oesophage; h, hémolymphe; m, muscle; mg, intestin; ne, ocelle; pf, cheminée proventriculaire; pr, proboscis; sg, ganglion sub-oesophagique; ss, fourreau du stylet ; st, stylet; tc, tritocerebrum. D'après Swanepoel et Avenant-Oldewage(1992).

1.4. BIOLOGIE:

1.4.1. La Nutrition

Le mécanisme de nutrition d'*A. foliaceus* n'est pas très bien documenté. La théorie communément acceptée est qu'*A. foliaceus* ne se nourrit que par ingestion de sang (Bower-shore, 1940), probablement à la suite d'une digestion des tissus externes. Walter (Walter, P, Department of Animal Ecology and Ecophysiology, University of Nijmegen, Netherlands, article en cour de publication) montre qu'*A. foliaceus* se nourrit de sang et que les stades juvéniles n'ingèrent pas le sang dans sa totalité mais se nourrissent de plasma sanguin grâce à des observations en Microscope Electronique à Transmission (MET) et des coupes histologiques.

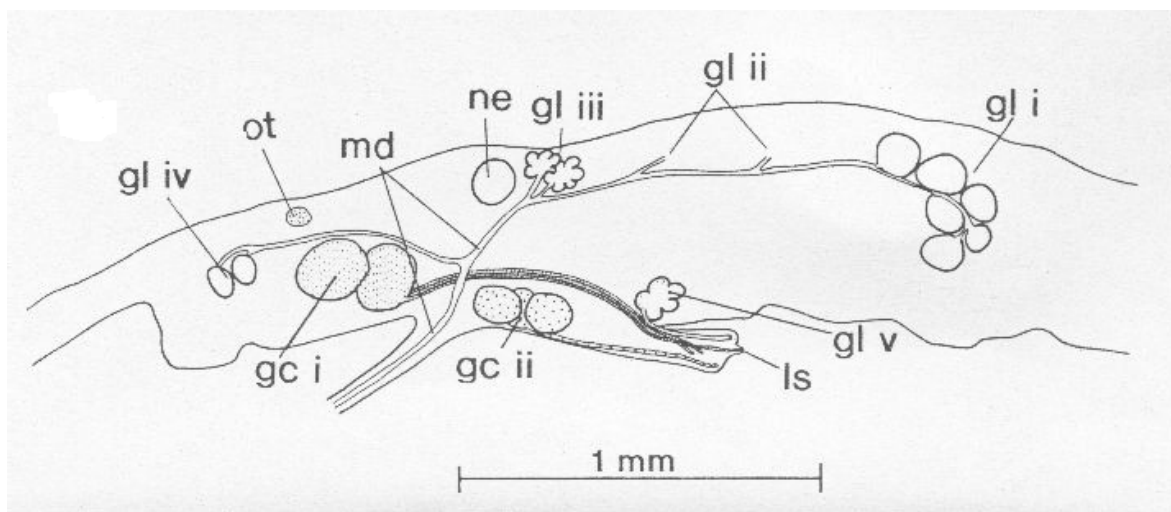


Figure 5: Schéma des systèmes glandulaires associés au stylet et au proboscis d'*A. japonicus*. Gc, cellules géantes; gl, cellules glandulaires; ls, épine labiale; md, canal principal du stylet; ne, œil ; ot, conduit optique (Swanepoel et Avenant-Oldewage, 1992).

La bouche et le stylet sont tous deux utilisés lors de la nutrition. Ils sont tous deux associés à plusieurs types de glandes (Figure 5) qui sécrètent des toxines et enzymes de digestion qui induisent des irritations, de l'œdème et une destruction de l'épiderme chez l'hôte (Martin, 1932 ; Bower-shore, 1940 ; Stammer, 1959 ; Shimura, 1984).

1.4.2. La respiration

Argulus foliaceus accomplit ses échanges gazeux entre l'hémolymphe et le milieu extérieur, à travers sa cuticule, au niveau d'aires bien définies. Ces aires sont au nombre de quatre, deux de chaque côté en arrière du 1er maxillaire en position ventrale. Les deux plus crâniales sont de forme ronde, les deux plus caudales sont en forme de haricot et de surface beaucoup plus importante (Figure 2, Figure 3 et Figure 28). La ventilation est assurée par les appendices natatoires.

1.4.3. La locomotion

Le premier stade métanauplius nage dès son éclosion à l'aide de ses *plumosae setae* à la rencontre de son hôte. Une fois sur l'hôte, la locomotion des premiers stades de développement n'est pas très bien documentée. Par contre, les stades pré-adultes et adultes sont connus pour se déplacer rapidement sur la peau du poisson (Bower-shore, 1940) et se fixent à l'aide des ventouses. Les stades pré-adultes et adultes peuvent également nager librement en pleine eau à l'aide de leurs appendices natatoires. Le taux de détachement et attachement est de 0,186 (nombre d'attachement par individu et par heure) pour les femelles adultes et de 0,305 pour les mâles (Mikheev *et al.*, 2000).

1.4.4. La reproduction

La reproduction est sexuée et interne chez les *Argulus*. La copulation a lieu sur le poisson mais occasionnellement sur des rochers ou des feuilles (Pasternak *et al.*, 2000). La femelle gravide quitte son hôte pour déposer ses œufs retourne systématiquement sur un hôte si elle n'a pas fini de tous les déposer (Shafir et Van As, 1986).

1.5. HÔTE : SPECIFICITE ET REPARTITION ANATOMIQUE

1.5.1. Spécificité d'hôte

Hindle (1950), Lamarre et Cochran (Lamarre et Cochran, 1992) ont observé que le brochet (*Esox lucius*, L.) et la carpe (*Cyprinus carpio*, L.) étaient plus réceptifs aux infestations que les autres espèces.

La truite fario (*Salmo trutta fario*, L.) semble, quant à elle plus réceptif que la truite arc-en-ciel et que les jeunes épinoches (*Pungitius pungitius pungitius*, L.) (Bowershore, 1940).

Buckley et Morrice (1976), ont étudié la spécificité d'hôte et la distribution d'*A. foliaceus* sur quatre espèces différentes de poissons : la carpe herbivore, ou amour, (*Ctenopharyngodon idella*, Valenciennes), le gardon (*Rutilus rutilus*, L.) le rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*, L.) et la carpe miroir (*Cyprinus carpio*). Comparativement à leur taille, la carpe miroir et herbivore ont significativement plus de parasites que le gardon puis le rotengle. Pasternak *et al* (2000) ont montré que la perche (*Perca fluviatilis*, L.) était plus infestée que le gardon.

Plusieurs facteurs comme le milieu de vie (benthique, pélagique, eau vive ou stagnante), la différence d'activité surtout nocturne entre les différentes espèces de poisson ainsi que leur réflectivité, sont des points soulevés par les auteurs pour expliquer la sélectivité du parasite, mais aucun n'est clairement établi. Il existe aussi une sélection passive pour les poissons déjà infestés décrite par Buckley et Morrice (1976), ainsi que Poulin et FitzGerald (1989) et Mikheev *et al.* (1998). En effet, les poissons déjà infestés montrent un changement de comportement, perte de leur capacité à nager et regroupement anormal, qui facilite une réinfestation.

1.5.2. Distribution sur l'hôte

La distribution d'*Argulus* sur son hôte dépend de l'espèce, de l'hôte ainsi que de son stade de développement.

Bazal, Lucký et Dyk (1969) ont examiné en détail les sites d'attachement d'*A. foliaceus* sur la carpe et ont observé une préférence pour la nageoire caudale ainsi que le pédoncule caudal, puis la nageoire dorsale et pelvienne. Chez les différents Cyprinidés, il existe une légère différence de prédilection : chez la carpe herbivore ils sont plus concentrés sur la tête, chez le rotengle et le gardon, sur les nageoires et chez la carpe miroir, sur le dos et la nageoire dorsale (Buckley et Morrice, 1976).

A. coregoni (Thorell), indépendamment de sa taille, s'attache préférentiellement sur la peau autour des nageoires, plus particulièrement les nageoires pectorales et pelviennes d'*Oncorhynchus masou* (Breevort) et *O. mykiss*. Par contre les stades juvéniles préfèrent nettement s'attacher sur les nageoires, exceptée la nageoire caudale (Shimura, 1983a-1983b). Pour Shimura la différence de localisation, entre les deux espèces d'*Argulus* est liée à l'hôte, ce qu'il explique par une différence de milieu de vie. Les *O. masou* vivant en eau vive et les carpes en eau stagnante, la différence de courant explique les localisations privilégiées. La différence de comportements, surtout celle de frottement sur le fond, serait aussi un facteur non négligeable.

Shimura (1983a) explique la différence de localisation entre les stades de développement du parasite. Les stades juvéniles sont munis de pinces et se déplacent moins facilement et rapidement que les stades pré-adultes qui possèdent des ventouses.

1.6. PATHOGENIE D'ARGULUS FOLIACEUS

1.6.1. Signes cliniques

La présence d'*A. foliaceus* sur l'hôte est évidente lorsqu'il s'agit des stades pré-adultes et adultes. Une observation plus attentive, nécessitant parfois une loupe binoculaire, est impérative pour révéler la présence des premiers stades de développement. En général, un éventail de différents stades est observable sur un même poisson.

1.6.1.1. Modification du comportement

-Flashing et râclage : associés sur des surfaces, entraînent l'apparition de blessures et cicatrices (Kabata, 1970 ; Stoskopf, 1993).

-Regroupement anormal : des truites arc-en-ciel ont été observées dans un Loch en banc et nageant en cercles serrés par Northcott dans deux aires distinctes d'un Loch lors d'une infestation massive (Northcott *et al.*, 1997). Le même comportement a été observé par Poulin et FitzGerald (1989) sur des épinoches (*Pungitius pungitius*, L).

-Perte des capacités à nager : observée également sur des épinoches (Bower-shore, 1940), Poulin et FitzGerald (1989).

-Perte d'appétit : (Kabata, 1970 ; Stoskopf, 1993 ; Rahman, 1996)

1.6.1.2. Effets pathologiques sur le poisson

La pathogénicité de *Argulus foliaceus* est aussi bien locale que systémique (Ferguson, 1989).

2.3.3.1.1. Effets localisés sur la peau

-Abrasions et hémorragies cutanées entraînant la mort (Menezes *et al.*, 1990).

-Erythème avec hémorragies accompagnées d'œdèmes cutanés et d'une surproduction de mucus suivi d'une nécrose et ulcération (Stoskopf, 1993).

-Réduction de la surface des nageoires pouvant atteindre 95% de celles-ci dans des cas extrêmes (Kabata, 1970).

-Pertes locales de la pigmentation cutanée (Bower-shore, 1940).

2.3.3.1.1. Effets systémiques

Les effets systémiques résultent :

-De l'effet de stress engendré par les irritations, les toxines etc.

Hoffman (1962) rapporte qu'une simple injection de toxines cytolytiques de la part d'*A. foliaceus* peut tuer une civelle (*Anguilla anguilla*, Linné). Shimura *et al.* (1984) ont mis en évidence, à partir d'extraits de glandes du stylet d'*A. coregoni* injectés

dans le derme d'*Oncorhynchus masou*, une activité hémorragique sans effet hémolytique ni cytotoxique.

-De l'abrasion cutanée engendrant une perte d'étanchéité de la surface du corps et des problèmes d'osmorégulation. Les abrasions ainsi que les perforations répétées de l'épiderme interfèrent avec les fonctions propres à l'épiderme et surtout celle de barrière osmotique très importante en milieu aquatique. Il en résulte un déséquilibre osmotique par perte d'ions et hyperhydratation. Ranzani-Paiva *et al.*, (1989) rapporte une diminution du sodium (Na⁺) et potassium (K⁺) plasmatique sur des carpes infestées par *A. foliaceus*.

-De la spoliation sanguine. Ranzani-Paiva *et al.*, (1987) ont rapporté une hypohémoglobinémie et Shimura *et al.* (1983a) une anémie régénérative chez *O. masou* infesté par *A. coregoni*. Tavares-Dias *et al.*, (1999) ont montré quant à eux une monocytose ainsi qu'une érythropénie chez la carpe infestée par *A. foliaceus*. Cependant, ces expériences ont été menées de manière succincte et dans des conditions non appropriées. De ce fait, aucune conclusion ne peut en être déduite ou prise en compte.

1.6.2. Histopathologie chez la carpe miroir

Bower-shore (1940) a décrit la genèse des blessures infligées par *A. foliaceus* :

“Après une courte période d'attachement du parasite, l'épithélium montre des signes de réaction. Il devient légèrement plus épais et produit plus de cellules à mucus. La surface cutanée en-dessous du parasite devient alors plus glissante, l'épithélium est déprimé juste au-dessous des organes d'attachement d'*A. foliaceus*. Comme la nutrition commence, une cavité se forme au sein de l'épithélium.

Plus tard, la dépression engendrée par le parasite s'approfondit et des zébrures apparaissent tout autour, elle est alors assez saillante. Une complète disparition de toutes les cellules à mucus de l'épiderme sous le parasite est alors observable.”

Ferguson(1989) quant à lui décrit la réponse de l'hôte vis-à-vis d'*A. foliaceus* comme une dermatite nécrosante souvent sévère. Rhaman (1996) décrit brièvement sur la

carpe (*Cyprinus carpio*). Il observe des lésions d'ulcération épidermique superficielle et la présence des premiers maxillaires profondément dans l'épiderme de l'hôte, et des lésions épidermiques beaucoup plus importantes sont créées par des stades adultes.

1.7. INFECTIONS SECONDAIRES

Du fait de son mode de nutrition et de ses modes d'attachement, *A. foliaceus* détériore la peau du poisson qui constitue la première barrière de défense contre toute agression externe. Il permet ainsi la pénétration d'agents pathogènes secondaires. *A. foliaceus* est un parasite qui nage en pleine eau et passe de poisson en poisson lorsqu'il est à la recherche d'un partenaire pour la reproduction ou lorsqu'il va pondre. De ce fait, il est un vecteur potentiel non négligeable d'agents pathogènes. Dans la littérature, *A. foliaceus* a été souvent décrit comme vecteur indirect de différents pathogènes comme:

-Des champignons tel que *Saprolegnia ferax* (Bower-shore, 1940) ; (Singhal *et al.* 1990),

-Des bactéries: *Aeromonas salmonicida* (une épidémie de furunculose sur *O. masou* a été favorisée par la présence de *A. coregoni* (Shimura *et al.* 1983b)).

-Des Virus: *Rhabdovirus carpio*, agent de la virémie printanière de la carpe, (Ahne, 1985), (Pfeil-Putzien, 1978).

Mais aussi comme vecteur direct de Nématodes de la famille des Skrjabillanidés et Daniconematidés (Molnar K et Szekely C, 1998) ; (Moravec *et al.* 1999) après ingestion de *A. foliaceus* par l'hôte.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. ANIMAUX ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

2.1.1. Origine des poissons

Les truites arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, proviennent d'une ferme du nord du Perthshire (Ecosse). Leur poids moyen est de 71g (SD = 10.2) et leur taille moyenne de 17 cm (SD = 2,2 cm). Le stock de poissons est maintenu dans des bacs en plastique de 80 l alimentés en eau potable à une température de 11°C et préalablement passée à travers un filtre à charbon actif. Les bacs sont équipés de diffuseurs en pierre reliés à une pompe à air afin de fournir une oxygénation parfaite. Les truites sont quotidiennement alimentées *ad libitum* avec les mêmes granulés commerciaux que ceux dispensés dans l'élevage.

2.1.2. Conditions expérimentales

2.1.2.1. Système

Douze poissons sont répartis individuellement et de manière aléatoire dans douze bacs en plastique blanc de 20 l, fermés par un couvercle (Figure 6). Ces bacs sont connectés en parallèle et en circuit ouvert. Chacun d'eux est équipé d'un diffuseur d'air et entouré d'un sac plastique noir suffisamment opaque pour réduire le taux de luminosité de manière à éviter toute prédation de la part des truites sur *A. foliaceus* et optimiser le taux d'infestation qui augmente dans la pénombre (Mikheev *et al.*, 1998). Ces bacs sont logés dans l'unité de l'Aquarium tropical de l'Institut d'Aquaculture de Stirling. Une photopériode de 12 heures de jour et 12 heures de nuit est maintenue constante tout au long des expérimentations. Le maintien de la température de l'eau est assuré grâce à un bac de tête de 400 l utilisant une résistance (3kW Howden, modifiée par les soigneurs de l'aquarium tropical de l'Institut) et grâce à un réglage fin du débit d'arrivée d'eau. La température constante de $14,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ est contrôlée quotidiennement tout au long des expérimentations à l'aide d'un thermomètre à alcool. De manière à ce que les parasites ne se fassent

pas emporter par le courant d'eau, un tube en maille de 200 μm est posé autour des trop-pleins des bacs (Figure 6) et le débit réduit à $0,3 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$.

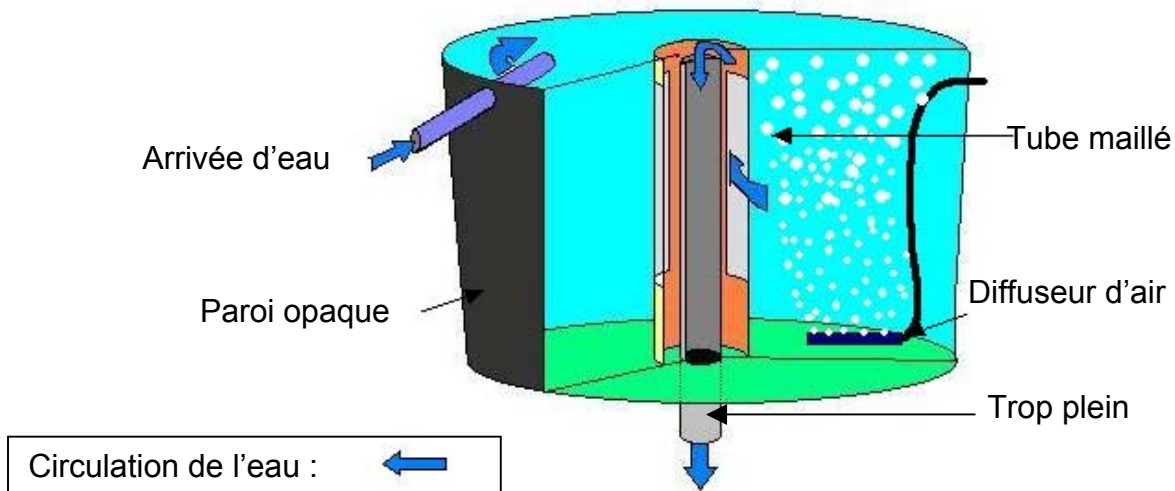


Figure 6: Schéma des bacs de maintenance de 20 l utilisés pour les expérimentations.

2.1.2.2. Qualité de l'eau

Une eau courante d'une température de 11°C passe au préalable dans un bac de tête de 400 l où elle est chauffée, aérée et filtrée (filtre à charbon actif). Les paramètres majeurs de la qualité de l'eau comme le pH, la teneur en ammoniacque, nitrates, nitrites et le taux d'oxygène dissous sont déterminés au début de l'expérience. Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Fox 52, pW9404 digital ph-mètre) et le taux d'oxygène dissous à l'aide d'un oxymètre (Oxi 381i/SET 25g, Wissenschaftlich Technisch Werkstatt). A une température de 15°C , les valeurs trouvées sont en moyenne de $10,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour l'oxygène dissous et de 7,2 de pH.

Pour les mesures des teneurs en ammoniacque, nitrate et nitrite les procédures suivantes ont été appliquées : un échantillon d'eau des bacs est pris dans une bouteille en plastique de 100 ml puis filtré avec un filtre en fibre de verre Whatman

de 0,2 µm. 25 ml de la solution filtrée est collectée dans une flasque en plastique et conservés congelés en attente d'être analysés.

Les échantillons sont analysés à l'aide d'un Auto analyseur Technicon IV qui réalise des titrations standard pour une analyse mécanique complète de l'ammoniaque total, des nitrates et nitrites. Le pourcentage d'ammonium par rapport à l'ammoniaque total fut calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ ammonium} = 100 / (1 - \text{antilog}(\text{pKa} - \text{pH}))$$

où pKa est le logarithme inverse de la constante d'ionisation qui dépend de la température.

Les valeurs calculées sont de 5.0 µg.l⁻¹ pour l'ammonium, 147.0 µg.l⁻¹ pour les nitrates et 1.2 µg.l⁻¹ pour les nitrites. Ces valeurs sont bien en-dessous du seuil de toxicité.

2.1.2.3. Alimentation

Les truites sont quotidiennement alimentées *ad libitum* avec des granulés commerciaux utilisés à la ferme d'origine.

2.2. PARASITE : ARGULUS FOLIACEUS

2.2.1. Origine des parasites

2.2.1.1. Stade métanauplius

Des chapelets d'œufs de *A. foliaceus* provenant d'une ferme du sud de l'Angleterre, ont été prélevés en juin 2002 et conservés pendant un an dans des bouteilles d'eau maintenues à 9°C dans une chambre froide avec une photopériode de 12J/12N.

Les œufs furent transférés dans des pots de 200 ml dans un incubateur (WTB Binder®). La température fut graduellement augmentée d'un degré par jour jusqu'à atteindre 14,5°C toujours avec une photopériode de 12J/12N. L'eau a été changée tous les deux jours avec de l'eau déchlorée du robinet de manière à limiter toute

prolifération de champignons et d'algues sur les oeufs. Après éclosion, les métanauplius ont été prélevés et utilisés pour les expérimentations.

2.2.1.2. Stades pré-adultes et adultes

Les stades pré-adultes et adultes de *A. foliaceus* utilisés au cours des expériences proviennent de brochets, *Esox lucius* (Linné), pêchés en mai 2003 dans le Loch Lomond (Ecosse). Les parasites sont directement placés dans des seaux d'eau. Une fois transportés à l'institut, ils sont triés par taille et transférés dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant de l'eau du Loch, puis placés en incubateur à 14.5°C.

Certains spécimens sont observés sous loupe binoculaire pour identification. Pour ce faire, ils sont préalablement nettoyés dans deux bains successifs d'éthanol titrés à 70% puis 100%, d'une durée de 1 minute chacun, puis placés 5 minutes dans de l'huile de clou de girofle pour rinçage.

D'autres spécimens sont préparés pour examination sous MEB, sans avoir été préalablement nettoyés de manière à pouvoir observer et caractériser la présence éventuelle de tout pathogène (bactéries, champignons, protozoaires).

Les spécimens restants sont utilisés pour les infestations.

2.3. MÉTHODE D'INFESTATION ET D'ÉCHANTILLONAGE

2.3.1. Infestation artificielle

Différents stades d'*A. foliaceus* sont utilisés pour ces expériences. Invariablement ils sont transférés et comptés dans des pots de 200 ml contenant de l'eau déchlorée du robinet à 14°C de température. Chaque pot est ensuite utilisé pour infester un poisson dans un bac de maintenance.

Juste avant l'infestation et pendant deux heures post-infestation, les aérateurs ainsi que les arrivées d'eau des bacs infestés sont coupés de manière à augmenter le succès d'infestation. Les pots contenant un nombre défini de parasite sont placés individuellement dans les bacs expérimentaux. Suite à l'infestation, le

comportement des poissons infestés (ventilation, nage) et la température des bacs infestés sont contrôlés toutes les vingt minutes pendant deux heures.

Durant tous ces contrôles aucune modification du comportement des sujets parasités n'est observée. Seule une augmentation de la température est régulièrement observée mais jamais supérieure à 0.5 °C.

2.3.2. Infestation naturelle

Des échantillons de peau et nageoires sont prélevés dans une exploitation du sud de l'Angleterre infestée par *A. foliaceus*. Les poissons sont capturés à l'aide d'une seine et euthanasiés à l'aide d'une overdose de benzocaïne. De larges échantillons de tissus (3 cm x 4cm x 0.5 cm) ainsi que les nageoires ont été prélevées à l'aide d'un scalpel. Les prélèvements ainsi obtenus ont été directement placés dans des flacons remplis de formol tamponné à 10% pour fixation et immédiatement identifiés. Un rapport volumique de 1/20 entre la pièce et le volume du fixateur ainsi qu'une période de fixation d'un minimum de 24 heures ont été respectés.

Les poissons présentant des *A. foliaceus* sont considérés comme infectés, ceux prélevés sans aucun parasite sont considérés comme témoins.

2.3.3. Durée des expériences et intervalles d'échantillonnage

Toutes les expériences sont réalisées dans une eau à 14,5°C. Les poissons sont prélevés à des périodes bien particulières, correspondant à des stades de développement d'*A. foliaceus*. Les échantillonnages sont réalisés tous les quatre jours post-infestation et trente jours post-infestation. Rushton-Mellor (1994) a montré que les mues successives ainsi que la croissance d'*A. foliaceus* sont directement proportionnelles à la température de l'eau. D'après ses résultats, quatre jours après éclosion à une température de 15°C le premier stade métanauplius n'a pas encore effectué sa première mue. Trente jours post-infestation, *A. foliaceus* a terminé sa sixième mue, qui correspond au premier stade possédant uniquement des ventouses comme mx1.

2.3.3.1. Quatre jours post-infestation avec des métanauplius d'*A. foliaceus*

Deux bacs choisis de manière aléatoire, chacun contenant une seule truite furent mis en présence de trente à quarante métanauplius d'*A. foliaceus* selon les méthodes présentées dans la partie 1.1.2.1. Un troisième bac fut utilisé comme contrôle.

Quatre jours après infestation, ces trois poissons furent sacrifiés et échantillonnés comme décrit aux parties 1.5.1 et 1.5.2.

L'expérience a été répétée deux fois à deux jours d'intervalle. Au total six poissons ont été étudiés au stade quatre jours post-infestation.

2.3.3.2. Trente jours post-infestation avec des métanauplius d'*A. foliaceus*

Neuf truites sont placées individuellement dans neuf bacs. Au jour 0, deux bacs sont infestés avec trente à quarante métanauplius d'*A. foliaceus*. A J2, deux nouveaux bacs sont infestés avec le même nombre de parasites. A J4 l'expérience est répétée. Les trois bacs restant sont gardés comme témoins.

Chaque paire de bacs ainsi infestée est échantillonnée comme précédemment trente jours post-infestation, ainsi qu'un avec un bac non infesté (témoin).

2.3.3.3. Quatre jours post-infestation avec des stades pré-adultes (stade 6) et des stades adultes d'*A. foliaceus*

Les différents stades de développement d'*A. foliaceus* sont tout d'abord triés et classés par taille, car selon Rushton-Mellor et Boxshall (1994), la taille des stades d'*A. foliaceus* est directement liée au stade de développement. Une fois classés et acclimatés à la température des bacs expérimentaux, ils sont directement utilisés pour les infestations.

De ce fait, quatre bacs contenant chacun une truite sont infestés chacun par 13 adultes d'*A. foliaceus* et 5 autres par 30 pré-adultes chacun. Les quatre premiers bacs sont infestés à J1 et les 5 autres à J2. Tous les poissons sont par la suite sacrifiés respectivement 4 jours après l'infestation. Les poissons non infestés des expériences précédentes (2.3.3.1) sont utilisés comme témoins contrôle négatif.

2.4. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'ÉCLOSION

2.4.1. Origines des œufs

Plusieurs rubans d'œufs d'*Argulus foliaceus* obtenus l'année précédente, début avril, ont été utilisés. Comme la description et l'évaluation de la qualité des œufs n'est pas bien décrite dans la littérature, quelques expériences ont été entreprises. Des rubans d'œufs de *A. foliaceus*, provenant de trois fermes différentes sont sélectionnés et observés à la loupe binoculaire. Cinq différents types de rubans d'œufs sont décrits et classés par stades.

1^{er} stade : Les œufs du ruban sont complètement blancs.

2^{ème} stade : Les œufs ont une teinte jaune claire.

3^{ème} stade : Les œufs sont bicolores (jaune et blanc) et on peut distinguer les yeux des métanauplius.

4^{ème} stade : L'intérieur de l'œuf est rose et les yeux sont noirs et plus gros que dans le stade précédent.

5^{ème} stade : L'intérieur de l'œuf est gris foncé, les yeux sont de même taille que dans le stade précédent.

Par la suite chaque stade est placé en fonction de son origine dans des Erlenmeyer de 200 ml étiquetés, dans de l'eau du robinet préfiltrée sur charbon actif à 11°C et placé dans l'incubateur puis progressivement amené à température ambiante (24±2°C) par augmentation de 1°C par jour. Les résultats sont présentés sous forme de tableau dans le Tableau 1.

Tableau 1: période d'éclosion des œufs en fonction de leurs différents stades

STADE DES OEUFS	PERIODE D'ECLOSION
1	Après 5 semaines d'incubation
2	Au cours de la 4 ^{ème} semaine
3	Au cours de la 3 ^{ème} semaine
4	Pas d'éclosion, pas d'évolution
5	Pas d'éclosion, pas d'évolution

Les stades 2 et 3 sont alors sélectionnés et placés dans l'incubateur dans des Erlenmeyers de 200 ml selon leur stade et leur origine, puis de la même manière progressivement mis à la température des bacs d'expérience : 14,5 °C. Les

métanauplius ainsi éclos sont par la suite utilisés dans les expériences 2.3.3.1 et 2.3.3.2. Ainsi tous les deux jours une paire de bacs expérimentaux a pu être infestée avec le même nombre de métanauplius, en fonction du nombre total de métanauplius récoltés, la première paire de bacs est infestée par 30 métanauplius et les 2 suivantes par 40 métanauplius.

2.4.2. Conditions de maintenance

Tous les Erlenmeyers contenant des rubans d'œufs sont maintenus dans les mêmes conditions au sein de l'incubateur. Chacun est contrôlé tous les jours pour observer toute éclosion et tous les deux jours l'eau est changée à température adéquate (température de l'incubateur).

2.5. TECHNIQUES DE LABORATOIRE

2.5.1. Technique à la fluorescéine

La fluorescéine est un colorant utilisé couramment en ophtalmologie pour mettre en évidence les ulcérations de la cornée. Ce colorant après application se fixe sur les tissus endommagés, ainsi la fluorescence, mise en évidence après rinçage, indique toute lésion de la cornée (Ubels et Edelhauser, 1982-83). Cette technique a déjà été utilisée au cours d'expérimentations sur des poissons pour observer des lésions cutanées expérimentalement induites, sur des truites arc-en-ciel, des poissons chats (*Ictalurus punctatus*) et des carassins dorés (*Carassius auratus auratus*, Linné) (Noga et Udomkusonsri, 2002).

Cette technique peut être appliquée sur l'ensemble du corps du poisson, afin de visualiser des lésions cutanées et d'observer leur répartition. Ces lésions pourraient ensuite être reliées à la présence d'*A. foliaceus* et fournir des informations sur la distribution corporelle du parasite et la quantification de ses effets pathogènes. En effet, il est très difficile de suivre le mouvement du parasite sur la surface du poisson et de déterminer si les lésions sont induites par un ou plusieurs parasites au cours d'une période bien définie. De plus, il pourrait être possible d'observer et de distinguer des lésions générées par le frottement du poisson contre toute surface

(gêne, prurit), des lésions de parasitisme et ainsi de quantifier leur importance relative.

Par la suite, l'histologie et l'étude en MEB de ces lésions aideront à la caractérisation des types de lésions observées.

2.5.1.1. Préparation

La solution de fluorescéine utilisée au cours des expérimentations est préparée à partir de Fluoret ND (CHAUVIN Pharmaceutical Ltd. Englet). Ce sont des languettes stériles ophtalmiques contenant 1 mg de sodium de fluorescéine. La partie de la languette contenant la fluorescéine est découpée en très fines lanières puis placées dans un tube Eppendorf d'1 ml, dans lequel fut ajouté 0,5 ml d'eau du robinet filtrée sur charbon actif.

2.5.1.2. Application

Le poisson entier est placé dans une grande boîte de Pétri. La solution préparée de fluorescéine est appliquée en excès sur toute la surface du poisson à l'aide d'une pipette en plastique. Après trente secondes d'application, la surface est rincée abondamment à l'eau à l'aide du même type de pipette, pour éliminer l'excès de fluorescéine qui se mélange avec le mucus produit par le poisson. Le poisson est ensuite placé sur un nouveau plateau dans la chambre de révélation.

2.5.1.3. Visualisation

La chambre de révélation est une chambre noire contenant une lampe Ultraviolette (UVGL-58 Mineralight® Lamp) éclairant sous une longueur d'onde de 365nm. Sous UV, seule la fluorescéine est révélée et émet une lumière de couleur jaune verte. La répartition générale des lésions a pu être observées à l'œil nu, protégé par un masque anti-UV. Les photographies sont prises à l'aide d'une caméra numérique AXIOCam MRc Zeiss®, fixée sur une loupe binoculaire, reliée à un ordinateur comme montré dans la Figure 7.

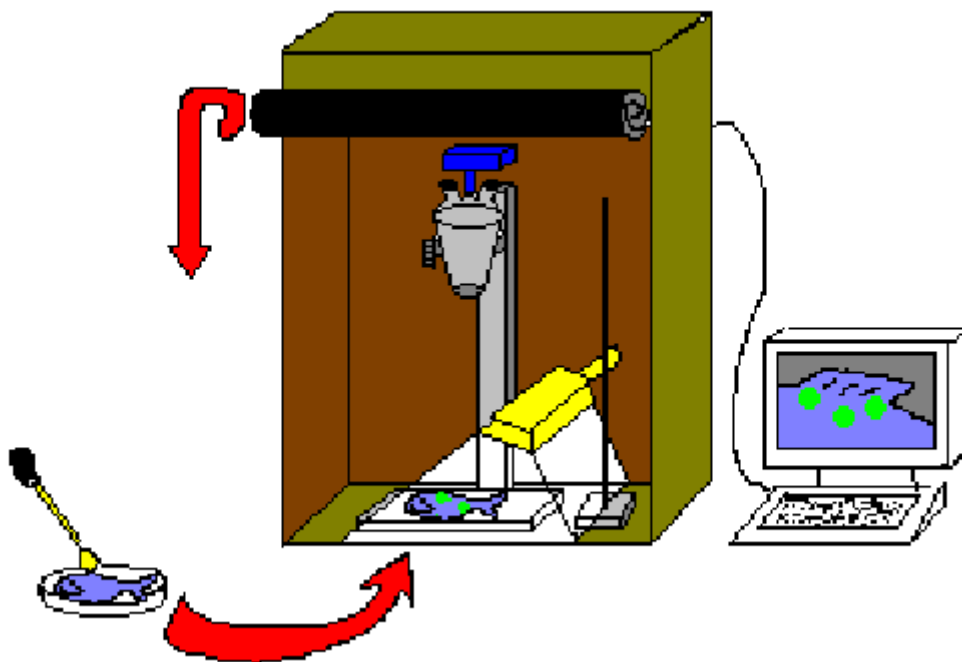


Figure 7: Schéma de la chambre noire et de son utilisation.

Des échantillons des tissus montrant une réaction à la fluorescéine sont prélevés pour des études histologiques, et des observations en MEB.

2.5.2. PRÉSERVATION DE L'INTERFACE HÔTE-PARASITE ET DE L'ORIENTATION DU PARASITE

De manière à être capable d'étudier au mieux les lésions induites par les parasite et de différencier les lésions causées par sa nutrition de celles causées par sa fixation, il est nécessaire d'étudier des échantillons avec le parasite *in situ*. Il a donc été nécessaire de mettre au points des techniques permettant de conserver intact l'interface hôte parasite et ceci tout au long des procédés de préparation des échantillons pour les études histologiques et en MEB. Les manipulations suivantes sont menées à chaque échantillonnage sur tous les poissons infestés.

2.5.2.1. Manipulations

Les poissons ont tout d'abord été euthanasiés par une overdose de 2-phénoxyéthanol, et dès lors retirés des bacs à l'aide d'un collier d'électricien TY-

FAST® passé au travers de la bouche et des ouïes, puis placés dans un plateau en plastique rempli d'eau provenant du bac.

2.5.2.2. Échantillonnage, fixation et inclusion

Une large pièce de tissus autour du parasite est prélevée à l'aide d'un scapel dont la lame est changée régulièrement. La pièce, prise par une extrémité à l'aide d'une pince, est directement plongée dans le fixateur approprié afin d'éviter tout dommage à l'épiderme dans la région de fixation du parasite. Quelques variantes sont utilisées en fonction des stades de développement.

2.3.3.1.1. Stade métanauplius

Le stade métanauplius est de loin moins mobile que les stades pré-adultes et adultes et reste bien fixé par ses pinces. Il est, de ce fait, directement immergé dans un fixateur sans autre manipulation. Par contre, lors de la mise en cassette, pour l'inclusion, les échantillons sont préalablement emballés dans un papier filtre de manière à conserver le parasite en place sans compromettre les différents traitements subis au cours de l'inclusion.

2.3.3.1.1. Stade pré-adulte

Certains parasites se déplacent sur les poissons euthanasiés et posés sur un plateau, se détachent et nagent en pleine eau. Deux techniques sont utilisées.

La première est de placer la pièce de tissus prélevée dans un moule histologique pour enrobage immédiatement après échantillonnage, puis de la recouvrir d'une solution liquide de formol tamponné à 10% contenant 2% d'Agar. Cette solution est préparée bien avant l'échantillonnage et maintenue à température adéquate dans un bain-marie à 70°C pour rester liquide. Une fois la solution solidifiée, quelques secondes après application, les échantillons sont placés dans une solution de formol tamponnée à 10%.

La deuxième est de fixer, à l'aide d'aiguilles d'acupuncture (B type needle, Seirin) le parasite dans sa localisation juste après euthanasie du poisson.

La première solution est utilisée lorsque les parasites sont fixés aux nageoires car alors il est alors facile de découper rapidement la nageoire sans perturber le parasite et permettre à la solution d'Agar/ formol de se déposer correctement.

La seconde, combinée à la première, est utilisée pour les parasites sur le reste du corps, ce qui permet de conserver la localisation par l'aiguille d'acupuncture et son orientation par la solution d'Agar/formol tout en garantissant une fixation optimale de l'échantillon. Ces aiguilles sont délicatement retirées au moment de la mise en cassette pour l'inclusion.

2.3.3.1.1. Stade adulte

A ce stade beaucoup plus développé, il est possible de fixer les parasites par deux aiguilles d'acupuncture dans l'axe du plan bilatéral du parasite. Les échantillons une fois prélevés sont directement fixés dans une solution de formol tamponnée à 10%.

2.5.2.3. Orientation des échantillons pour l'histologie

Après une fixation dans le formol d'un peu plus de 24 heures, les échantillons sont recoupés de manière à : réduire la taille des échantillons autour du parasite pour la suite des traitements histologiques et définir un plan de coupe suivant l'orientation du parasite. Tout ceci est fait, avec une extrême attention, à l'aide de pinces et d'un scalpel, sous une hotte, et en utilisant une loupe binoculaire. Une fois recoupé l'échantillon est marqué pour pouvoir conserver et indiquer l'orientation du parasite lors des étapes d'enrobage et de localisation lors de la recoupe. Pour ce faire, les échantillons de nageoire sont échancrés, la limite de l'échancrure correspondant à la position du parasite. Les échantillons du corps sont marqués avec des colorants (Tissue marking Dye blue, Triangle biomedical Science, UK) injectés dans les muscles de l'échantillon par une aiguille d'acupuncture.

2.5.3. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

2.5.3.1. Fixation

Immédiatement après échantillonnage, les prélèvements de tissus sont immergés dans des pots contenant du formol tamponné à 10%. Un rapport volumique de 1/20 entre la pièce et le volume du fixateur ainsi qu'une période de fixation d'un minimum de 24 heures sont observés.

2.5.3.2. Inclusion et enrobage

Toutes les pièces de tissus sont déposées séparément dans des cassettes étiquetées de taille appropriée. Ces cassettes ont ensuite été placées dans un HISTOKINETTE 2000®. Une fois traités et imprégnés de paraffine, les tissus sont directement placés dans de la paraffine liquide. Dans l'heure qui suit, chaque échantillon est placé dans des moules prévus à cet effet puis immédiatement enrobé de paraffine liquide et déposé sur une platine réfrigérée.

2.5.3.3. Découpe

Les blocs sont dégrossis à l'aide d'un microtome Leitz-Weitzlar jusqu'aux marques précédemment faites de manière à mettre en évidence le parasite *in situ* à la surface du bloc de paraffine. A la fin de cette étape les blocs sont systématiquement observés sous loupe binoculaire pour affiner la localisation du parasite.

Les échantillons sont ensuite placés dans un décalcifiant rapide pendant un peu plus d'une heure. Les blocs sont par la suite rincés à l'eau courante et essuyés avec un Kleenex® et placés sur une platine réfrigérée.

Le même microtome Leitz-Weitzlar est utilisé pour débiter les blocs en sections de 5 µm d'épaisseur. En fonction de la qualité des échantillons, une série de vingt à quarante sections est déposée et étalée à la surface d'un bain-marie d'eau distillée maintenue à 42°C. Ces sections sont collectées deux par deux sur des lames de verre étiquetées en fonction de l'échantillon, du numéro de section dans la série et du nombre de la série.

Les lames sont ensuite séchées sur des platines chauffantes et placées dans un four à 60°C pendant une durée minimale d'une heure afin de fixer les sections sur la lame avant coloration.

Une fois la série terminée, l'échantillon est replacé dans le bain de décalcifiant pendant au moins une heure et prêt pour une nouvelle série de coupes.

2.5.3.4. Coloration

Pour les observations de routine, les lames sont colorées à Hématoxyline et Eosine (H&E) (Annexe 1). Pour les échantillons provenant de la pêcherie certaines coupes de chaque échantillon sont colorées avec la coloration de Gram de manière à observer toute infection secondaire possible par des bactéries (Annexe 2).

2.5.4. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE

Les échantillons sélectionnés pour la MEB sont placés pour fixation dans de petits pots en verre, fermés hermétiquement, contenant une solution à 1% de glutéraldéhyde et 0,1 mol de cacodylate de sodium. Ces pots sont ensuite déposés pendant une heure dans un réfrigérateur à 4°C puis les échantillons sont transférés dans une solution à 3% de glutéraldéhyde et 0,1 mol de cacodylate de sodium pour 48 heures de plus, à 4°C. Les échantillons sont alors rincés et placés dans une solution tampon de cacodylate.

Les échantillons sont par la suite post-fixés dans du tétr oxyde d'osmium, déshydratés par bains successifs d'éthanol et d' hexaméthylsilazane.

Les échantillons obtenus sont montés sur des supports en aluminium recouverts de scotch double face et reliés au support par de la peinture d'argent pour conserver le contact. Les échantillons sont transférés dans un Edward S-150 Sputter coater pour être recouverts d'une fine pellicule d'or palladium puis examinés à l'aide d'un microscope électronique à balayage, Philips SEM 500. Les photomicrographies sont prises à 12kV.

3. RÉSULTATS

3.1. DISTRIBUTION D'ARGULUS FOLIACEUS SUR LA TRUITE ARC-EN-CIEL

3.1.1. Distribution des métanauplius quatre jours post-infestation (PI)

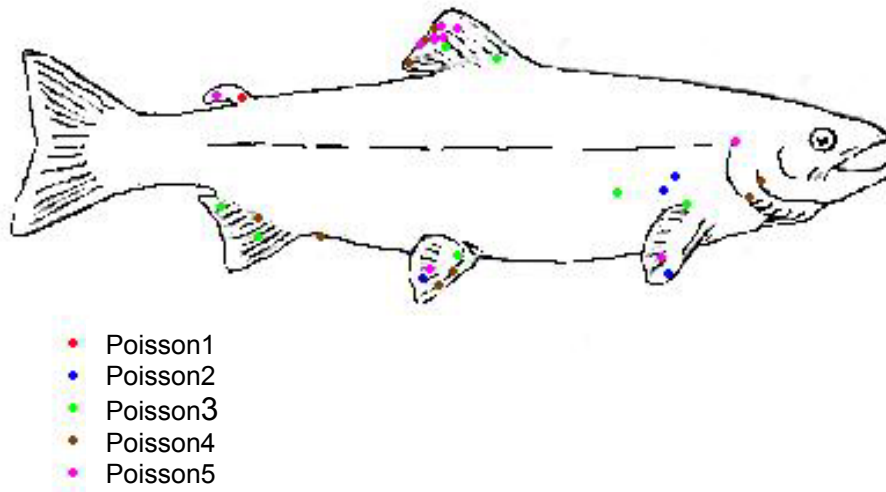


Figure 8: Distribution des métanauplius d'*A. foliaceus* sur le flanc droit des truites arc-en-ciel quatre jours PI.

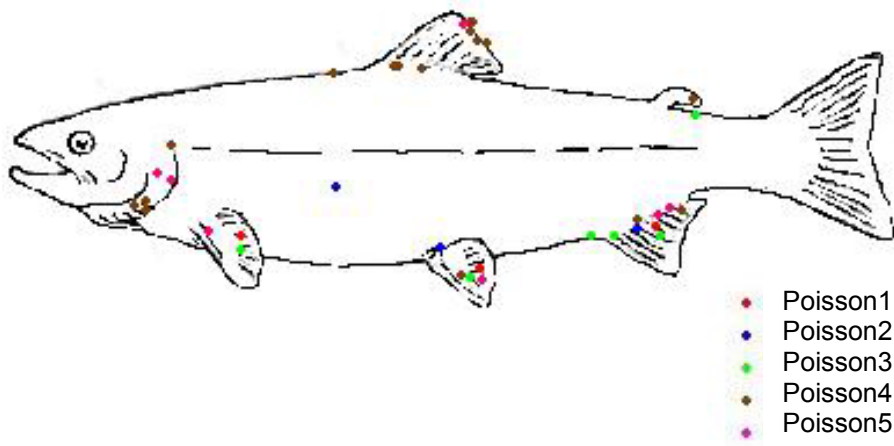


Figure 9: Distribution des métanauplius d'*A. foliaceus* sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel quatre jours PI.

Il ressort de cette étude (Figure 8 et Figure 9) que 76,2% des métanauplius se situent préférentiellement sur les nageoires, dont plus de 60% sur les nageoires

anale et dorsale et plus particulièrement au niveau de l'insertion de ces nageoires. Seul 14% se trouvent sur les bords des opercules et 10% sur le corps des poissons. La prévalence (rapport entre le nombre de poissons infesté à J0 et le nombre de poissons retrouvés infestés à la fin de l'expérimentation) est de 100%. Le succès d'infestation (nombre de parasites comptabilisés sur les poissons infestés par rapport au nombre de parasites initialement introduits) à quatre jours PI est en moyenne de 28,4% avec un écart type de 13,7%.

3.1.2. Distribution des stades 6 d'*Argulus foliaceus* trente jours PI avec des métanauplius

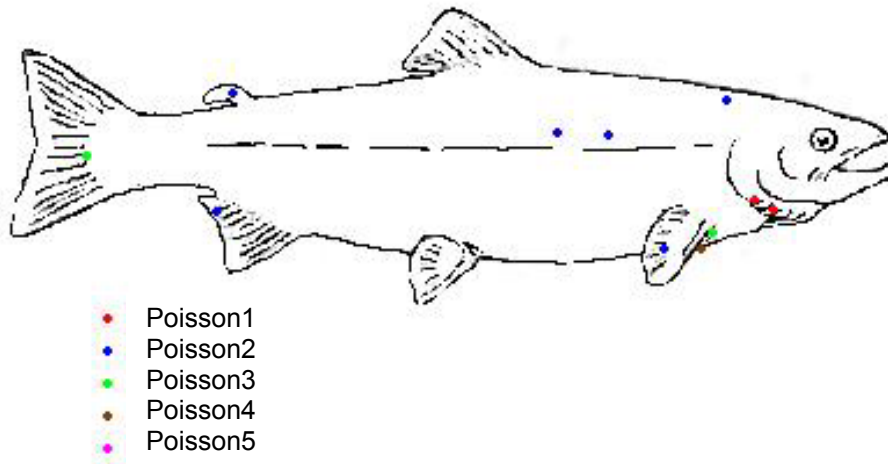


Figure 10: Distribution des stades 6 d'*Argulus foliaceus* sur le flanc droit des truites arc-en-ciel trente jours PI avec des métanauplius.

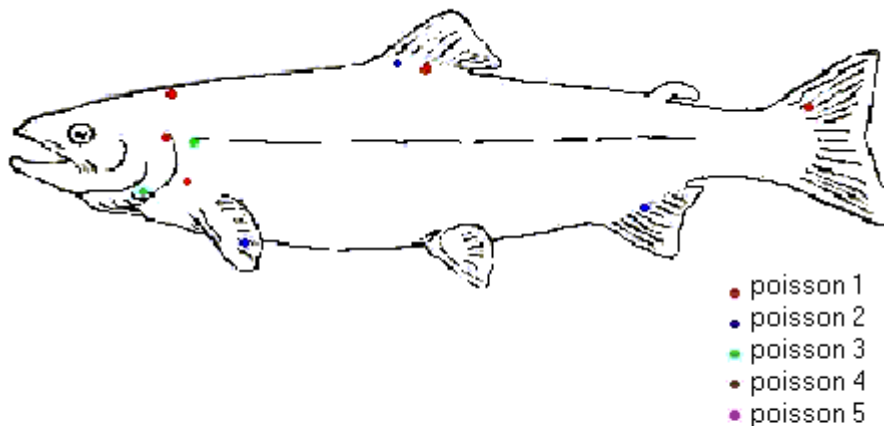


Figure 11: Distribution des stades 6 d'*Argulus foliaceus* sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel trente jours PI avec des métanauplius.

À la différence des stades métanauplius, les 6^{èmes} stades se retrouvent plus sur le corps des individus (49% sur les nageoires). Sur les nageoires, on constate que

ces spécimens sont à 75% sur la limite d'insertion des nageoires. Ces stades sont beaucoup plus mobiles et se déplacent rapidement sur l'individu. De nombreux spécimens se sont détachés lors de la manipulation des poissons dans le plateau, après euthanasie. Il a été impossible de relever la position initiale des parasites contaminant le poisson 5, c'est pour cela qu'il n'y a aucune donnée pour ce poisson (Figure 10 et Figure 11). La prévalence est de 100% et le succès d'infestation après trente jours est en moyenne de 15% et avec un écart type de 9%.

3.1.3. Distribution des stades pré-adultes d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI

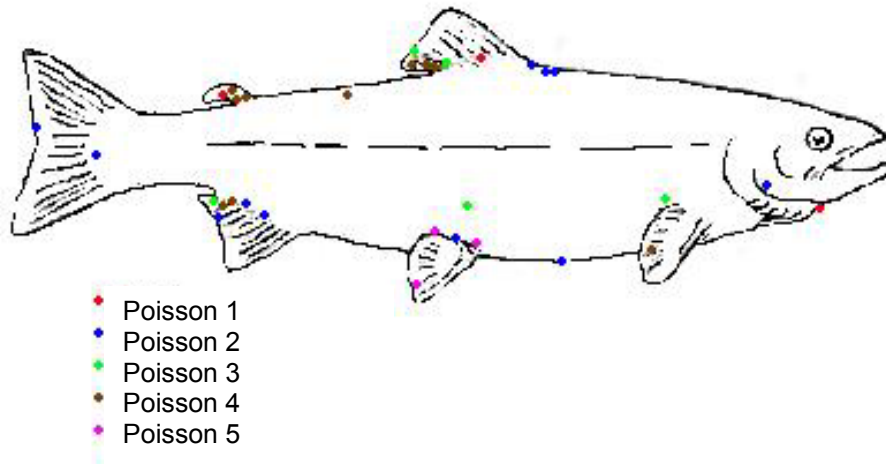


Figure 12: Distribution des stades pré-adultes d'*Argulus foliaceus* sur le flanc droit des truites arc-en-ciel quatre jours PI.

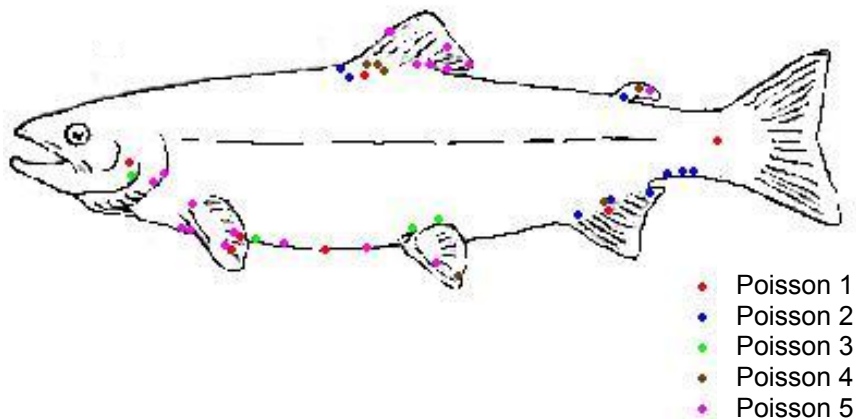


Figure 13: Distribution des stades pré-adultes d'*Argulus foliaceus* sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel quatre jours PI.

On retrouve ici une majorité d'*A. foliaceus* sur les nageoires : 69% dont 64,5% à la base de celles-ci. La prévalence est de 100% et le succès d'infestation est en moyenne de 48% et avec un écart type de 15,4%.

3.1.4. Distribution des stades adultes d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI

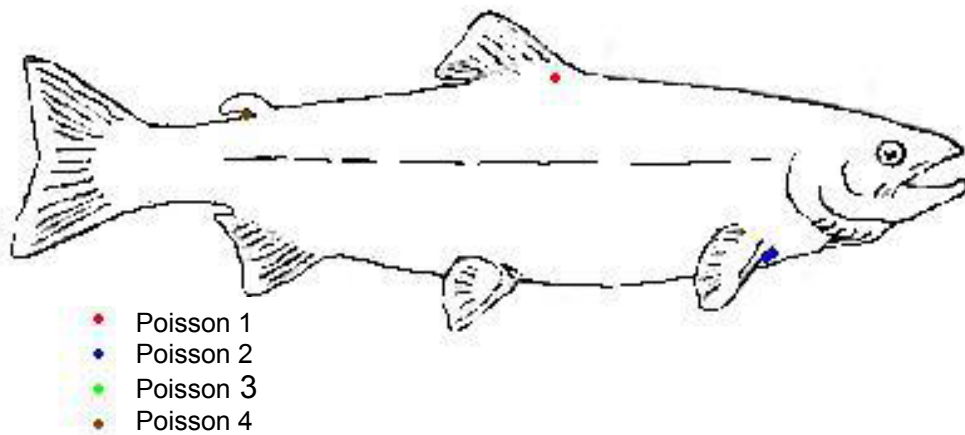


Figure 14 : Distribution des stades adultes d'*Argulus foliaceus* sur le flanc droit des truites arc-en-ciel quatre jours PI.

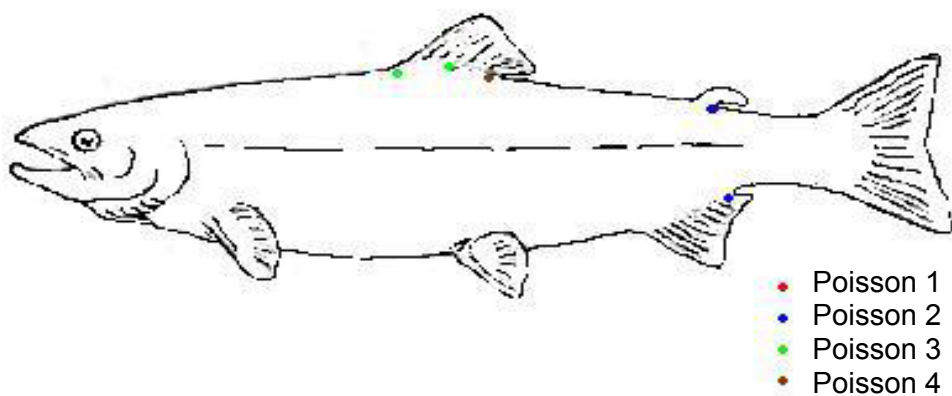


Figure 15: Distribution des stades adultes d'*Argulus foliaceus* sur le flanc gauche des truites arc-en-ciel quatre jours PI.

Les adultes ont tous été trouvés aux bases d'insertion des nageoires. Ils sont apparus moins mobiles que les stades précédents et sont restés en place tout au

long des manipulations. La prévalence est de 100% et le succès d'infestation est en moyenne de 17,3% et avec un écart type de 9,7%.

3.2. DISTRIBUTION DES LÉSIONS CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

3.2.1. Technique de visualisation des lésions sous Fluorescéine

Le temps d'absorption et de fixation de la fluorescéine semble être le même que pour les mammifères. Le mucus n'a pas empêché la fixation de la fluorescéine. Ceci a été réalisé à l'aide d'une pipette en plastique contenant l'eau des bacs expérimentaux. Seules quelques parties de chaque poisson ont été photographiées. Il est apparu plus pratique de réaliser les échantillons histologiques après visualisation des lésions sous fluorescéine dus aux lésions induites qui fixaient la fluorescéine. Les poissons étaient dès lors observés dans leur ensemble à l'œil nu (protégé par de lunettes anti-UV).

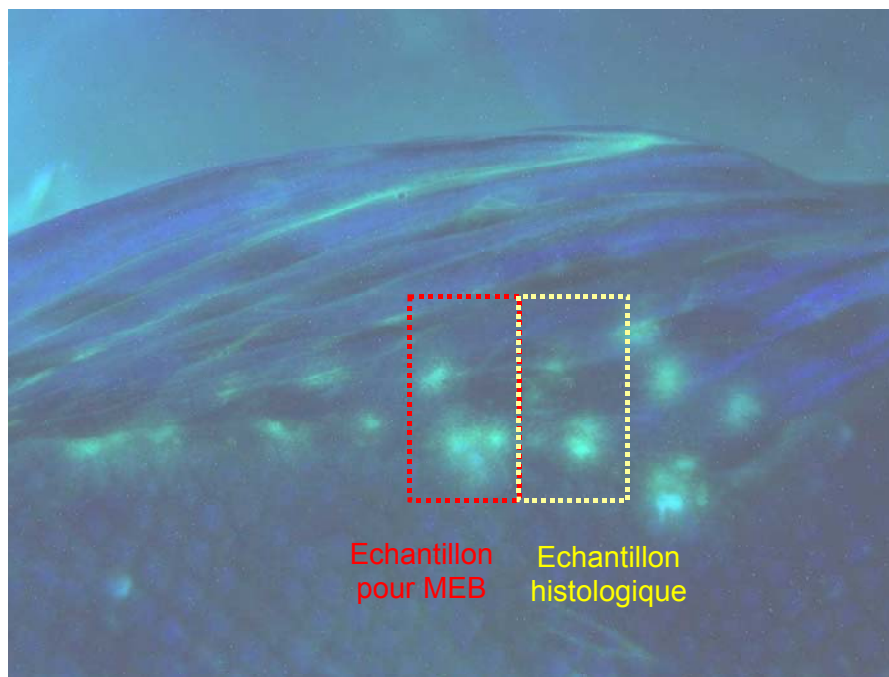


Figure 16: Photographie du côté gauche de la nageoire dorsale du poisson numéro quatre infesté par des *A. foliaceus* adultes. Les cadres représentent les zones échantillonnées pour analyse histologique et MEB.

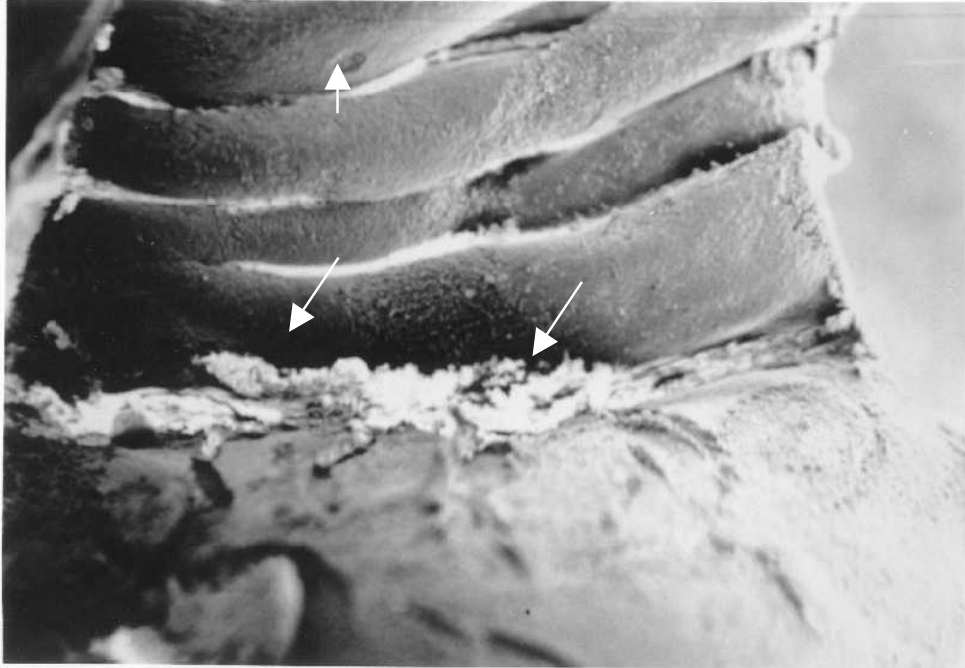


Figure 17: Photographie au MEB de la partie sélectionnée pour l'étude en MEB de la Figure 16 . GX40.

Les flèches blanches sur la Figure 17 indiquent trois zones d'ulcération épidermique dans la zone sélectionnée. Cette photo montre une interruption épidermique comparable aux spots fluorescents de la Figure 16.

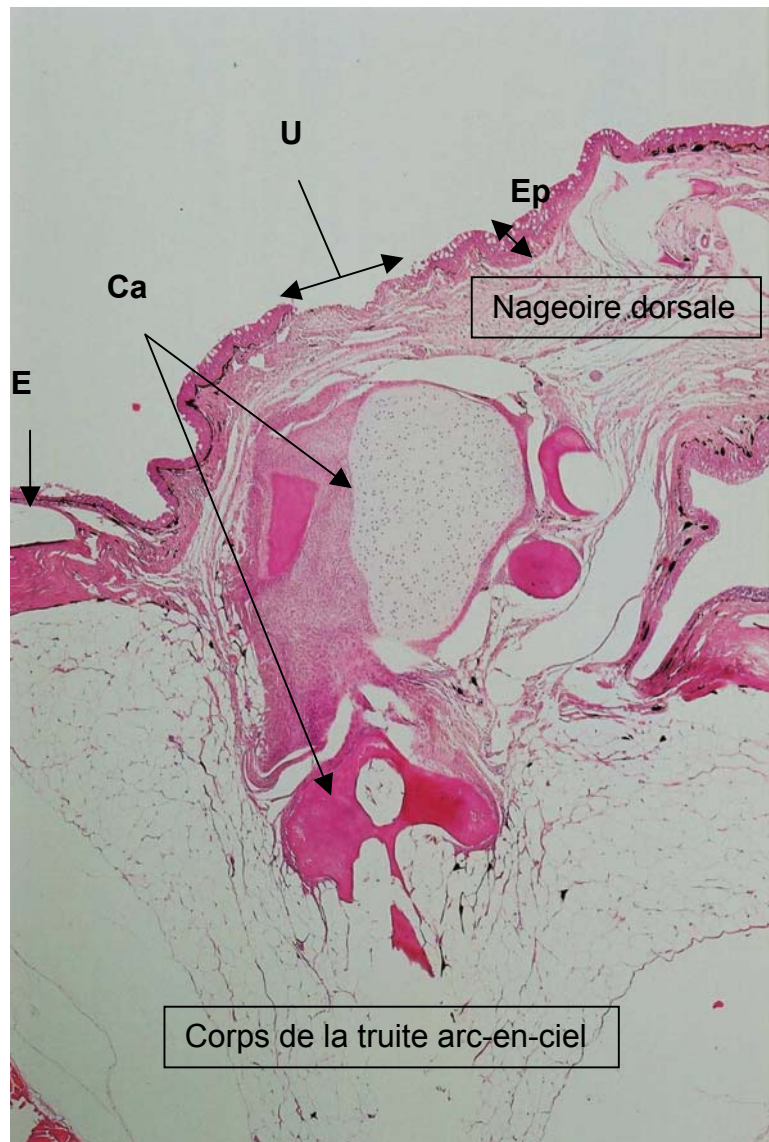


Figure 18: Photographie d'une section de la zone jaune de la Figure 16. Cette section montre une complète absence d'épiderme jusqu'au *stratum compactum*. Ca, Cartilage ; E, Ecaille ; Ep, épiderme ; U, ulcérationn épidermique. H&E GX43.

Ces lésions épidermiques semblent correspondre aux spots fluorescents observés sur la photographie de la Figure 16.

3.2.1.1. Distribution des lésions sous UV après traitement à la fluorescéine

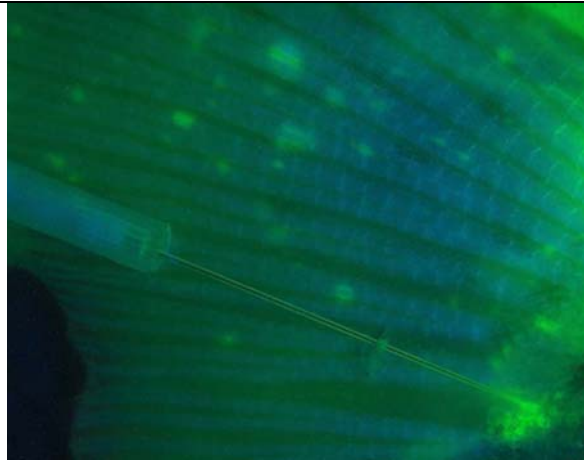


Figure 19: Photographie sous lumière UV du côté droit de la queue du poisson 3, sacrifié 30 jours PI avec des métanauplius d'*A. foliaceus*

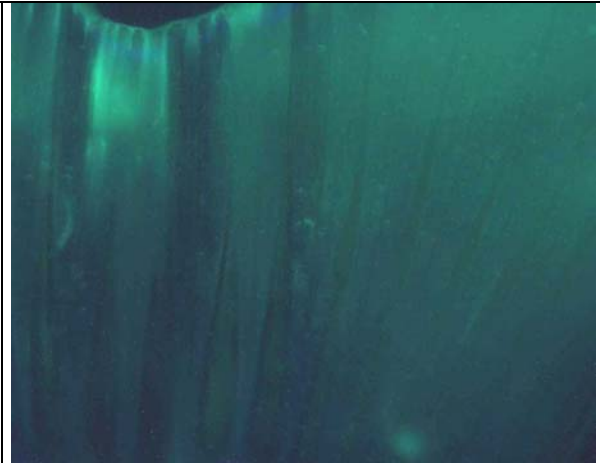


Figure 20: Photographie sous lumière UV du côté droit de la queue d'un poisson témoin.

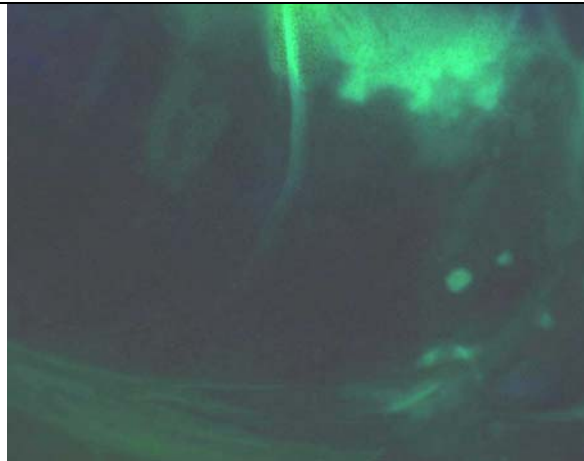


Figure 21: Photographie sous lumière UV de l'opercule droit du poisson 3 quatre jours PI avec des stades pré-adultes d'*A. foliaceus*.

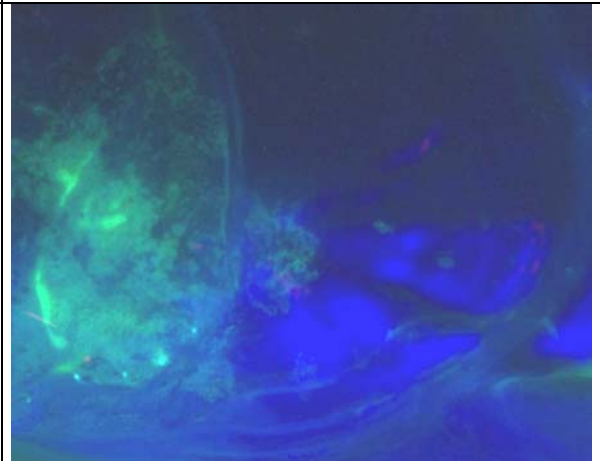


Figure 22: Photographie sous lumière UV de l'opercule droit d'un poisson témoin.

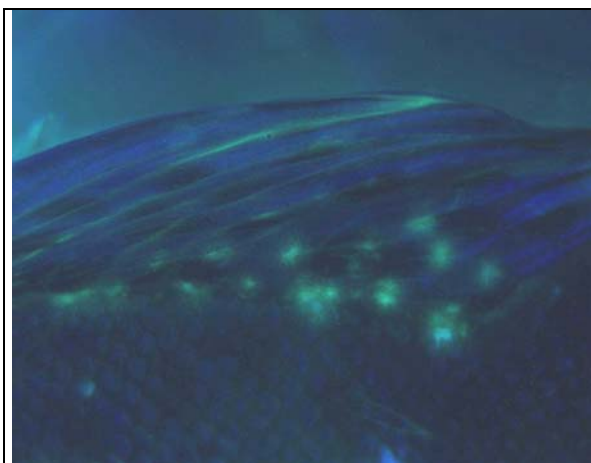


Figure 23 : Photographie sous lumière UV du côté gauche de la nageoire dorsale du poisson 4 quatre jours PI avec des stades adultes d'*A. foliaceus*.

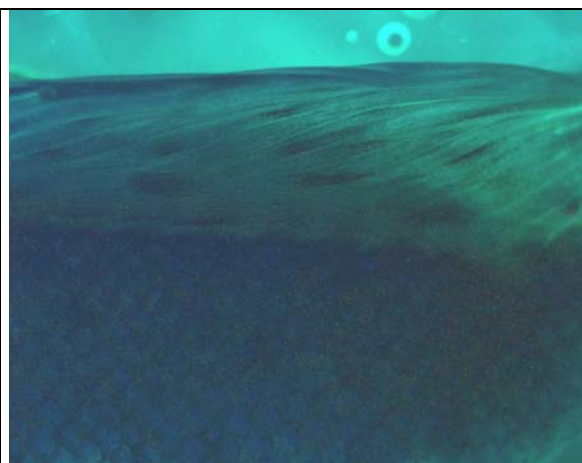


Figure 24 : Photographie sous lumière UV du côté gauche de la nageoire dorsale d'un poisson témoin.

Les spots observés sont de formes rondes à ellipsoïdales, souvent de taille inférieure à celle du parasite. La distribution des spots est à peu près la même que celle des parasites. Les spots fluorescents sont rares sur la surface du corps, 92% des spots étant sur les nageoires et leur insertion (Figure 19 et Figure 23). De longues traînées fluorescentes de 1 à 3 cm ont été observées sur le flanc dans la région céphalique ainsi que sur le dessus de la tête de 20% des poissons. La localisation précise des parasites montre qu'à chaque parasite correspond un spot fluorescent. Autour de ces parasites il y a de 2 à 15 fois plus de spots fluorescents qu'il n'y a de parasites (Figure 19 et Figure 23). Les spots fluorescents sont plus nombreux sur les poissons infestés par des stades pré-adultes que par des stades adultes. Comme le montrent les Figure 21 et Figure 22, les pores de la ligne latérale des poissons retenaient la fluorescéine. Aucun poisson infesté par des métanauplius et sacrifié quatre jours après infestation n'a été observé sous fluorescéine.

3.3. ÉTUDES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE

3.3.1. Etude lésionnelle des métanauplius d'*Argulus foliaceus* en MEB

Cette étude a été faite avec des *A. foliaceus in situ*. Les échantillons ont été observés avec les parasites en place, puis ces derniers ont été enlevés et une

nouvelle couche d'or-palladium a été déposée de manière à mieux étudier les lésions induites par les parasites.

3.3.1.1. Lésions induites par le mode d'attachement des métanauplius d'*A. foliaceus*

Les métanauplius d'*A. foliaceus* s'attachent à son hôte par sa paire de pince (mx1) et ses antennes (Figure 2). Les études menées après enlèvement des parasites montrent que les antennes sont fixées en surface de l'épiderme et que les pinces de mx1 pénètrent, quant à elle, beaucoup plus profondément dans l'épiderme (Figure 25 et Figure 26). Les lésions les plus importantes sont dues à ces dernières. Les lésions correspondent au diamètre des pinces. L'épiderme alentour est surélevé et les cellules épidermiques œdématiées.

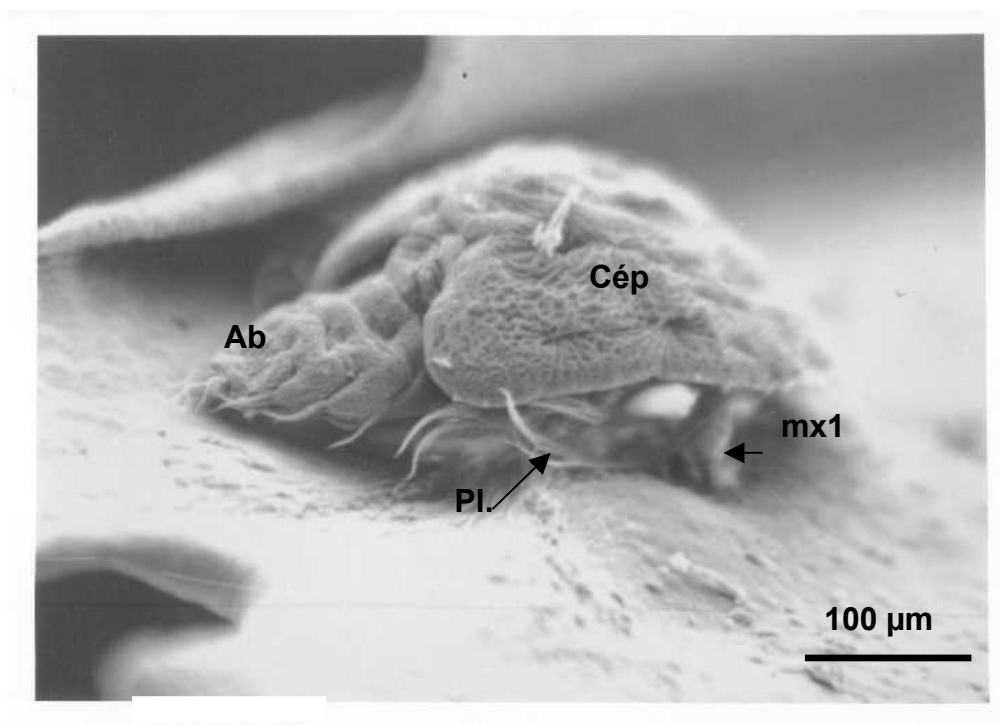


Figure 25: Photographie au MEB d'un métanauplius d'*Argulus foliaceus* fixée sur une nageoire pelvienne de truite arc-en ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ab, Abdomen ; Cép, Céphalothorax ; mx1, pince de mx1 droite ; Pl, Plumosa setae. (GX160). Barre=100 μ m.

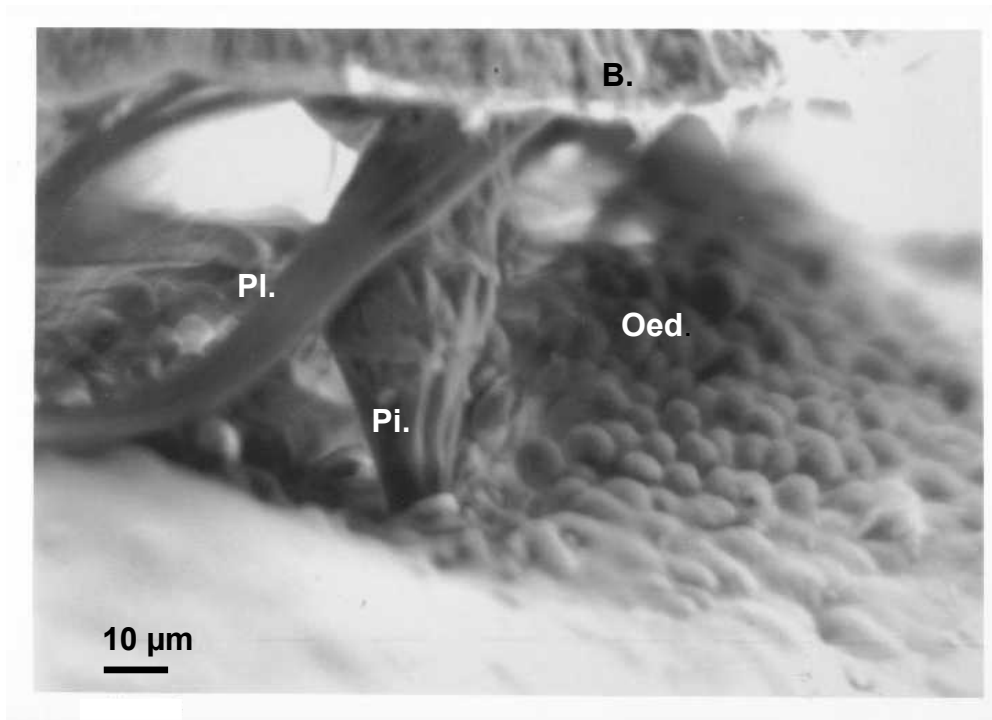


Figure 26: Photographie au MEB du même échantillon que la Figure 25 à plus fort grossissement et concentrée sur la pince droite d'*A. foliaceus*. (GX640) B, Bord de la céphalothorax ; Oed., Cellules œdématisées du stratum pavimenteux ; Pi., Pince droite ; PL., Plumosa setae. Barre=10 μm .

3.3.1.2. Lésions induites par le mode de nutrition des métanauplius d'*A. foliaceus*

Les lésions sont induites par le stylet et l'orifice buccal des métanauplius. Une perforation de l'épithélium pavimenteux de 7 μm de diamètre est la seule lésion liée au stylet des métanauplius observable en MEB (flèche noire sur la Figure 27). En région buccale une dépression de 60 μm de profondeur, de 100 μm de long et de 50 μm de large en moyenne est visible (étoile noire sur la Figure 27). L'épiderme à cet endroit est détruit et se compose de débris cellulaires et de cellules œdématisées. Les lésions de nutrition sont superficielles et semblent montrer que les métanauplius d'*A. foliaceus* se nourrissent de l'épiderme de leur hôte.

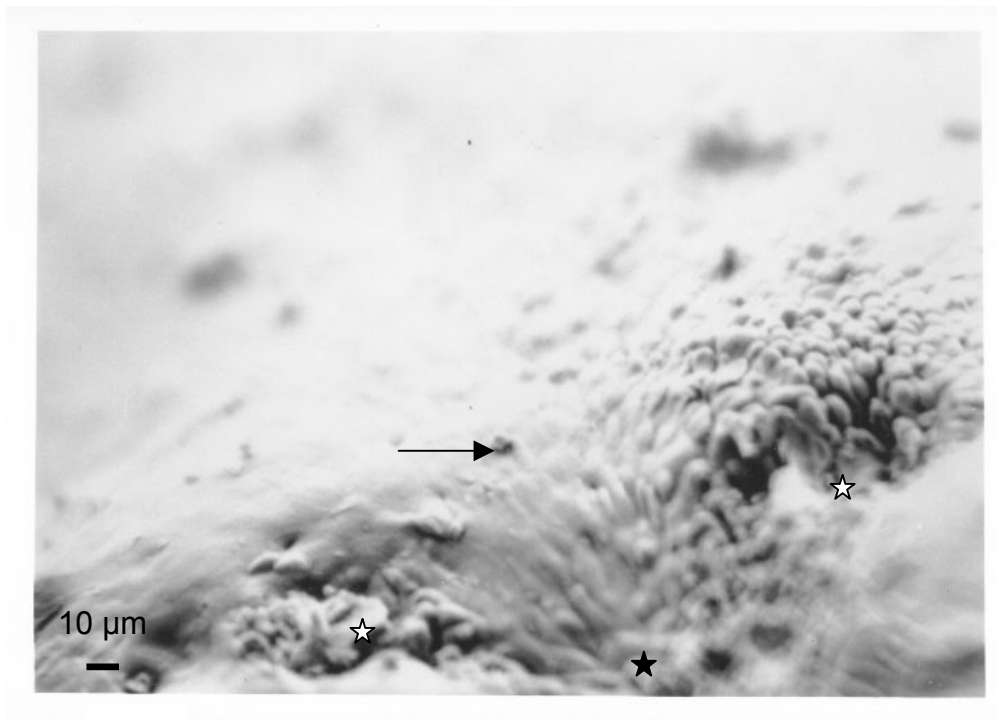


Figure 27 : Photographie au MEB de l’empreinte du métanauplius photographié sur la Figure 25 , prise dans le sens de la longueur du parasite depuis l’arrière du parasite et avec un angle de 24° par rapport à la surface. —▶, lésion du stylet ; ☆, lésion épidermique laissé par les mx1 ; ★ , dépression épidermique de l’orifice buccale. GX320.

En MEB, l’étendue des lésions provoquées par l’attachement des métanauplius et le mode de nutrition sont de même importance, par contre les lésions entraînées par la fixation du parasite par ses mx1 apparaissent plus profondes et engendrent une réaction plus importante des tissus adjacents.

3.3.2. Etude lésionnelle des stades pré-adultes d’*Argulus foliaceus* en MEB

L’étude en MEB n’a pas pu être réalisée avec le parasite *in situ* à ce stade de développement, le parasite ne restant pas en place au cours de la fixation de l’échantillon.

3.3.2.1. Anatomie externe du stade pré-adulte d'*A. foliaceus*

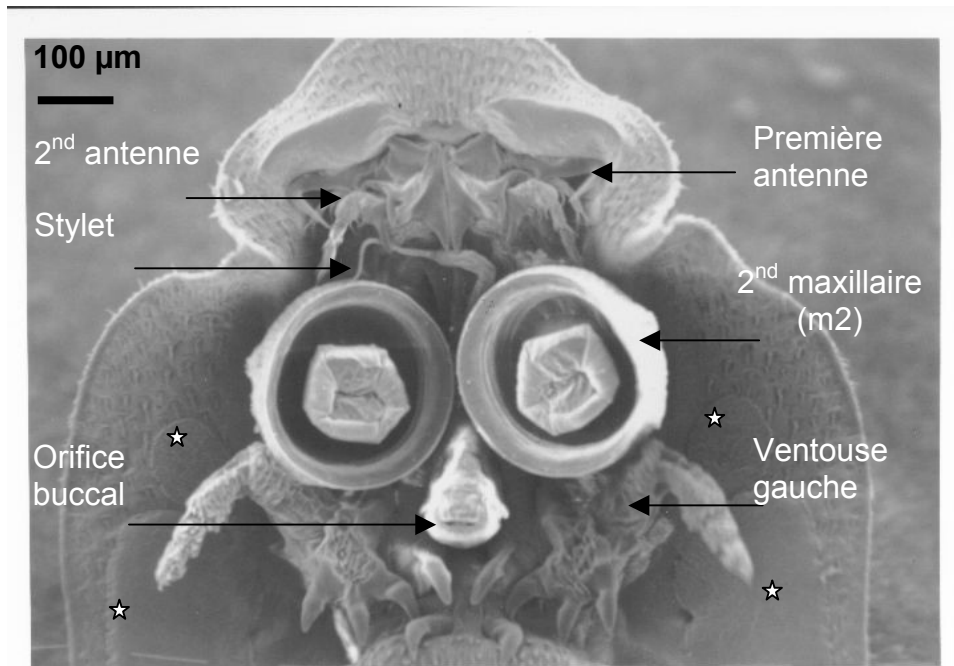


Figure 28: Photographie d'un stade pré-adulte d'*Argulus foliaceus*. Surfaces respiratoires (☆). (GX80). Barre=100 µm.

3.3.2.2. Lésions induites par le mode d'attachement des stades pré-adultes d'*A. foliaceus*

Les empreintes d'*Argulus foliaceus* semblent différentes en fonction du temps passé par le parasite sur le site.

Des empreintes fraîches, non associées avec des lésions de nutrition sont nettement visibles (Figure 29). Ces empreintes sont des cercles nets de 100 µm de diamètre, parfaitement ronds. Les bords de ces cercles sont espacés d'environ 250 µm. L'épiderme compris dans ces cercles apparaît légèrement surélevé par rapport au reste de l'épiderme mais l'aspect des cellules épidermiques semble normal. Dans certains cas la couronne radiée d'une 20^{aine} de µm correspondant aux rayons des ventouses est plus ou moins distinct (double flèche noire sur la Figure 29).

Ces observations, montrent de manière indéniable que ces marques correspondent à des empreintes d'*A. foliaceus* et que celles-ci sont récentes. Mais aucune vraie lésion n'est observée.

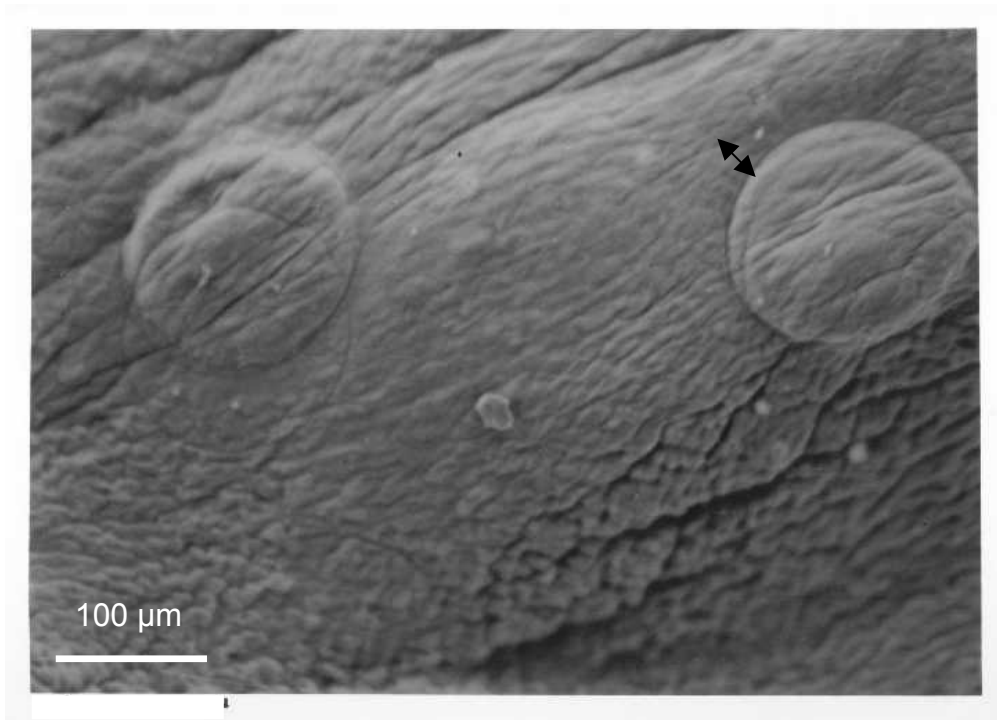


Figure 29: Photographie d'une empreinte récente d'*Argulus foliaceus*. (X160). Barre=100 μm . Couronne radiée ($\blacktriangleleft\blacktriangleright$).

De nombreuses autres lésions plus chroniques liées au mode d'attachement des stades pré-adultes d'*A. foliaceus* sont étudiées. Dans la zone de localisation du parasite les cellules en surface de l'épiderme apparaissent alors œdématisées et l'aspect caractéristique de l'épiderme est totalement désorganisé (Figure 30). A certains endroits se sont formés des paquets de cellules turgescents. Ces paquets forment des surélévations, toutes de même forme et de 100 μm de haut et 300 μm de diamètre, groupés par paire, invariablement séparés de 300 μm (Figure 30). Ils résulteraient donc de la fixation plus prolongée d'*A. Foliaceus* à ces endroits.

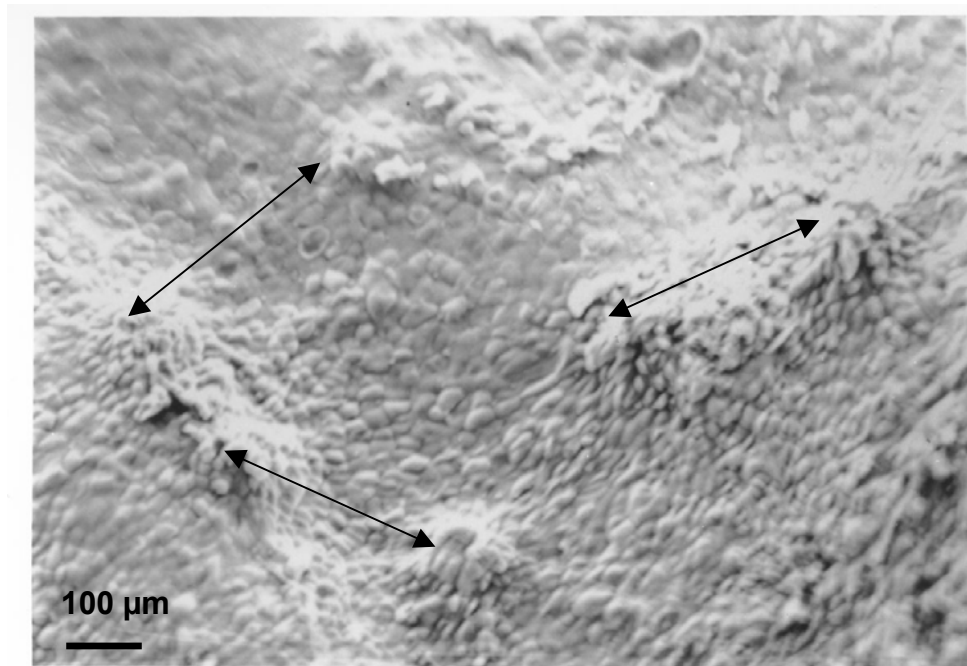


Figure 30: Photographie au MEB du bord gauche d'une nageoire adipeuse de truite arc-en-ciel parasitée par un stade 6 d'*A. foliaceus*. (GX80). Barre=100 µm.

3.3.2.3. Lésions induites par le mode de nutrition des stades pré-adultes d'*A. foliaceus*

L'aspect et les caractéristiques des lésions de nutrition semblent aussi varier en fonction de l'ancienneté des lésions. En effet, les empreintes d'*A. foliaceus* ne sont pas toujours associées à des lésions de nutrition (Figure 29).

Les lésions anciennes forment des plages de dépressions sur l'ensemble de l'épiderme. On les observe autour des massifs des lésions de fixation du parasite (Figure 30). Ces dépressions semblent être liées au mode de nutrition du parasite. Ces lésions sont plus étendues et profondes que celles liées à l'attachement du parasite, donc plus importantes.

Un échantillon a révélé des lésions aiguës de nutrition. C'est un prélèvement de nageoire pelvienne d'un poisson infesté par des stades pré-adulte du Loch Lomond (Figure 31). Cette empreinte d'*A. foliaceus* présente une destruction de l'épiderme de 1.2mm sur 1.8mm. Une destruction beaucoup plus profonde dans l'épiderme de forme triangulaire est observable dans la partie basse de l'empreinte ; elle représente environ 30% de la surface totale de la lésion. Un pertuis au centre d'une surélévation épidermique est visible au centre de cette lésion (flèche noire sur la Figure 31). De

part sa position et ses caractéristiques, ce pertuis semble lié au stylet d'*A. foliaceus* et, l'érosion triangulaire à la nutrition du parasite.

De chaque côté du pertuis on observe de faibles empreintes circulaires (étoile sur la Figure 31). Il semblerait que les ventouses laissent moins d'empreintes visibles, cependant la forme générale de la lésion correspond à la forme de la carapace d'*A. foliaceus*. De ces observations, on en déduit que la surface de la lésion due à la fixation du parasite est plus étendue mais moins profonde que celle provoquée par sa nutrition et semble donc moins préjudiciable.

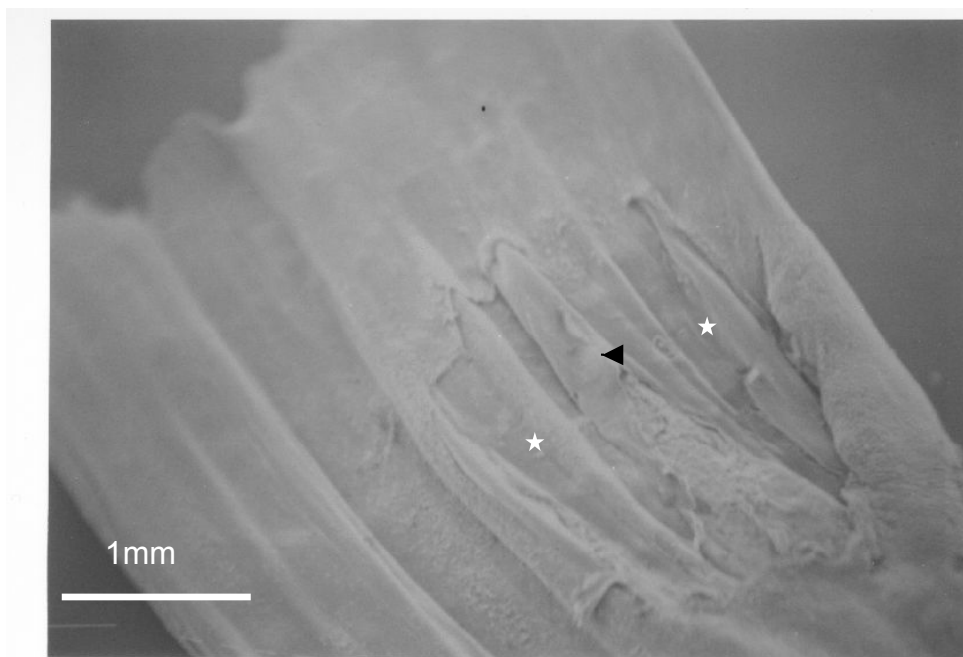


Figure 31: Photographie en MEB du côté interne d'une nageoire pectorale parasitée par un stade pré-adulte de *A. foliaceus*. ☆, empreintes circulaires ; ►, pertuis. (GX20). Barre=1 mm.

3.3.3. Étude lésionnelle des stades adultes d'*Argulus foliaceus* en MEB

Du fait du peu d'échantillons d'adultes d'*A. foliaceus* prélevés sur les poissons infestés, aucun n'a été préparé pour être observé en MEB. Ils ont tous été traités pour les études histologiques.

3.4. HISTOPATHOLOGIE DE LA PEAU

Les lésions cutanées sont communes chez les téléostéens. C'est un organe très délicat, en comparaison avec la peau des mammifères, et du fait de sa fonction de barrière osmotique, une lésion mineure peut évoluer rapidement en lésion majeure, surtout en eau douce (Ferguson, 1989). L'histologie permet l'étude en profondeur de l'interaction entre le parasite et son hôte, et la gravité des lésions induites. Plus les lésions seront profondes et plus les conséquences pour l'hôte seront importantes.

3.4.1. Histologie normale de la peau (Ferguson, 1989 ; Roberts, 2001)

La peau est la première barrière contre l'environnement externe. Les différentes couches constitutives de la peau sont : la cuticule, l'épiderme, la lame basale, le derme et l'hypoderme (Figure 32 et Figure 33).

La cuticule : est une couche sus-épidermique d'environ 1µm d'épaisseur constituée principalement de mucopolysaccharides. C'est un complexe constitué en partie de cellules desquamées, mais surtout de sécrétions des cellules à mucus de l'épiderme. La cuticule contient aussi de nombreuses immunoglobulines, des lysozymes (dont la quantité varie d'une espèce à l'autre), et des acides gras libres. Cette cuticule constitue la première barrière physique et chimique et immunitaire, mais elle est inapparente après les traitements histologiques de routine pour coloration à l'hématoxyline et éosine.

L'épiderme : est un épithélium squameux stratifié non kératinisé allant de 3-4 cellules à une vingtaine de cellules d'épaisseur en fonction des espèces, de la localisation sur le poisson, de son âge et sa maturation sexuelle. Chez les salmonidés l'épiderme est plus épais sur les zones du corps n'ayant pas d'écaille comme le dessus de la tête et les nageoires (Figure 32). A la différence des mammifères, l'épiderme des poissons n'est constitué que de cellules vivantes non kératinisées à grand pouvoir de régénération et de nombreuses cellules à mucus qui par sécrétion mérocrine excrètent un film de mucus sur l'ensemble du corps de l'animal. L'épiderme contient un nombre variable d'autres types de cellules comme des macrophages, pouvant contenir de la mélanine, des lymphocytes, impliqués dans la défense immunitaire

locale, que l'on peut retrouver en grande quantité juste au-dessus de la lame basale, ainsi que d'autres structures spécialisées comme les papilles gustatives et neuromastes.

Le derme : se situe sous la lame basale de l'épiderme et est constitué de deux couches, une superficielle, le *stratum spongiosum*, et une profonde, le *stratum compactum*. Le *stratum spongiosum* est une matrice lâche, de fibres de collagène et de réticuline, en continuité avec la lame basale. Il contient les cellules pigmentaires, ou chromatophores (mélanophores, iridophores et xanthophores), ainsi que les cellules souches des écailles et les écailles. Les écailles sont la caractéristique majeure de la plupart des Téléostéens. Quand elles sont présentes, elles sont synthétisées dans une poche d'écaille d'origine dermique et au fur et à mesure de leur croissance émergent dans l'épiderme et sont alors recouvertes de celui-ci (Figure 33). Ainsi une perte d'écaille représente une brèche très importante dans la défense osmotique du poisson. Le *stratum compactum* est par contre une matrice dense de fibres de collagène qui confère à la peau sa robustesse.

L'hypoderme : est le tissu le plus lâche et principalement constitué de tissus adipeux. Il est relativement bien vascularisé et constitue la principale route de dissémination des agents pathogènes et des processus inflammatoires.

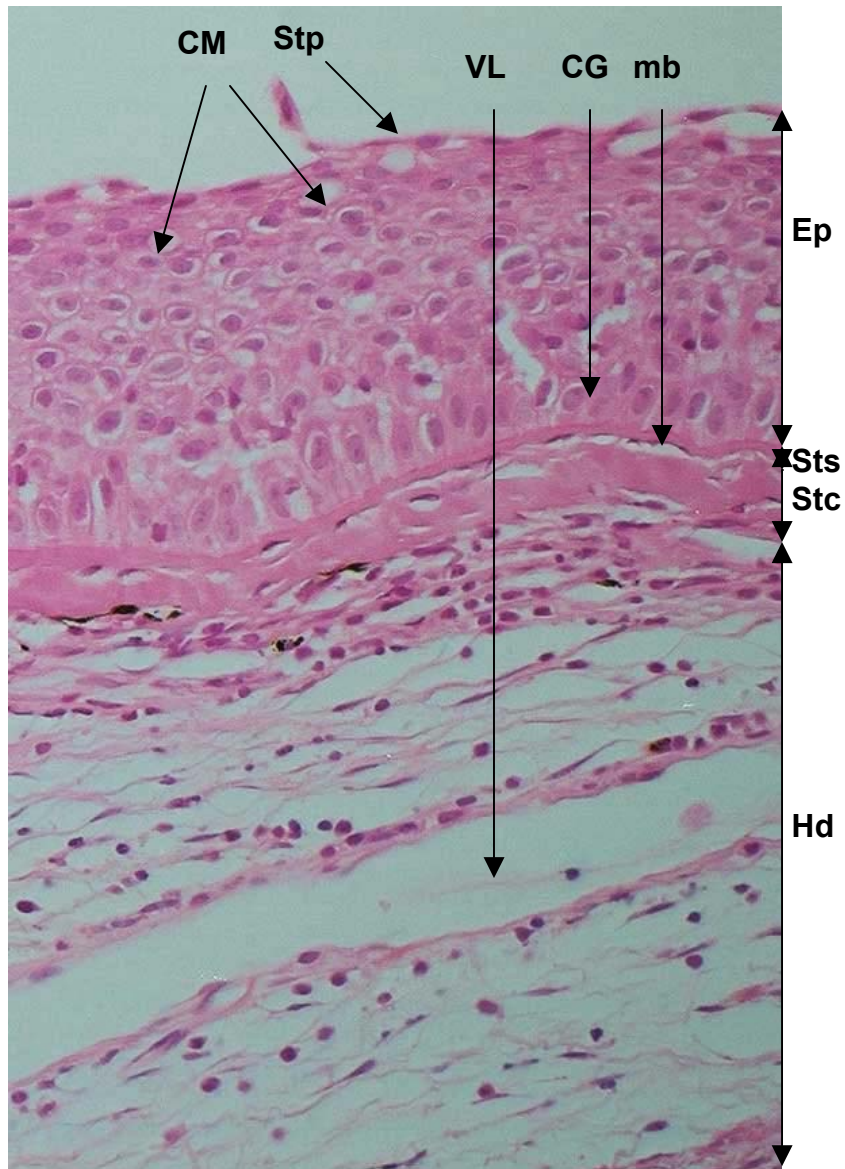


Figure 32: Section histologique de la peau d'une nageoire de truite arc-en-ciel. CM, Cellule à mucus ; Ep, Epiderme ; Hd, Hypoderme ; mb, Membrane basale ; ml, Mélanophore ; Stc, *Stratum compactum* ; Stp, Stratum pavementosum, Sts, *Stratum spongiosum* ; VL Vaisseau lymphatique. H&E.

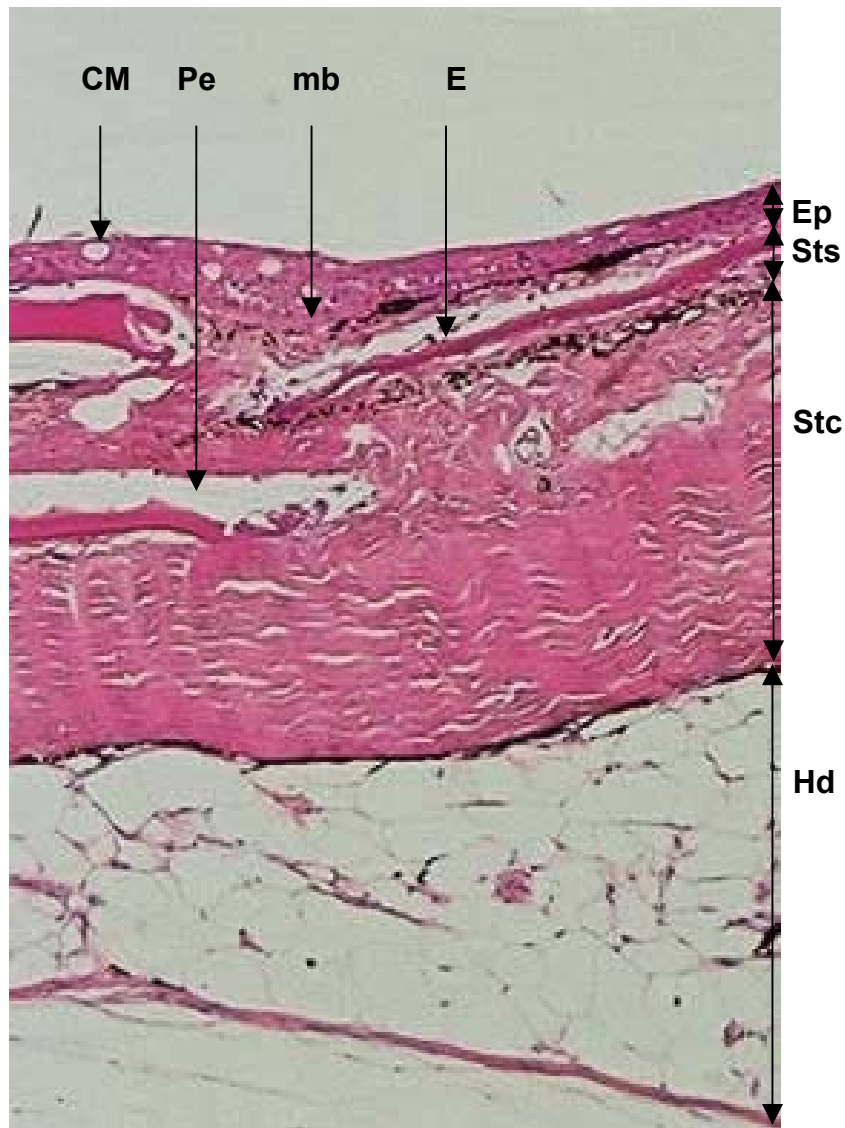


Figure 33: Section histologique normale de peau du corps d'une truite arc-en-ciel. CM, Cellule à mucus ; E, Ecaille ; Ep, Epiderme ; Hd, Hypoderme ; mb, Membrane basale ; ml, Mélanophore ; Pe, Poche de l'écaille ; Sts, *Stratum spongiosum* ; Stc, *Stratum compactum*. H&E x 121.

L'importance des lésions induites par tout stade d'*A. foliaceus* dépend de la structure de l'épiderme. Les observations et caractérisations des lésions sont donc différentes en fonction de la localisation du parasite mais aussi du stade de développement de celui-ci.

3.4.2. Lésions histologiques induites par le stade métanauplius d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI

Tableau 2 : Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des métanauplius d'*A. foliaceus* pendant quatre jours.

<i>POISSONS INFESTÉS</i>	<i>Nombre d'échantillons histologiques de NAGEOIRE</i>	<i>Nombre d'échantillons histologiques du reste du CORPS</i>
poisson 1	2	1
poisson 2	2	2
poisson 3	2	1
poisson 4	6	3
poisson 5	5	5
TOTAL	17	13

Les modifications histologiques principales sont des images de dégénérescence hydropique (œdème intracellulaire avec noyaux pycnotiques) focales des cellules profondes de l'épiderme laissent place à des vésicules épidermiques multifocales et confluentes qui, accompagnées d'une spongiose (œdème inter-cellulaire) de l'ensemble des cellules de l'épiderme, entraînent un décollement de l'épiderme de sa membrane basale. Ceci est observé en même temps qu'une ulcération de l'épiderme entier (assise des cellules germinales de l'épiderme) localisée dessous et en arrière du parasite. Ces ulcérations font la largeur du parasite et peuvent aller jusqu'à 1,5 fois sa taille. Une infiltration de neutrophiles dans l'hypoderme et le derme du tégument des poissons est présente sur tous les échantillons, preuve d'une réaction inflammatoire de l'hôte.

En fonction du degré d'importance des lésions observées, celles-ci ont été graduées de 1 à 4.

Score 1 : lyses focales et zones de dégénérescences hydropiques épidermiques.

Score 2 : lyses focales et zones de dégénérescences hydropiques épidermiques avec décollement de l'épiderme.

Score 3 : lyses focales plus étendues et spongiose épidermique accompagnée de dégénération hydropiques.

Score 4 : lyses focales et ulcération totale de l'épiderme.

Certaines lésions spécifiques ont pu être reliées au mode d'attachement et de nutrition d'*A. foliaceus*.

3.4.2.1. Lésions de score 1

Les lésions sont de deux types : des lyses focales aiguës et des zones de dégénérescence hydropique.

En avant du parasite en position superficielle de l'épiderme, on note deux lyses focales des cellules épidermiques. Ce sont des cavités éosinophiles focales, de forme ovale mesurant 40 µm de large sur 140 µm de long dont leur grand axe est perpendiculaire au plan de symétrie bilatérale du métanauplius. Leur contenu est constitué de liquide très éosinophile contenant des inclusions basophiles (noyaux pycnotiques) (Figure 34). En coupe transversale elles sont symétriques par rapport au plan de symétrie bilatéral du parasite (Figure 38), de forme pyramidale et espacées de 150 µm en moyenne. Leur base est située directement sur la lame basale et leur sommet en surface de l'épiderme. Les pinces ont été trouvées fixées profondément dans la lame basale, systématiquement au centre de ces cavités (Figure 35). Dans de rares cas elles peuvent être superficielles et sont dès lors de taille plus petite (Figure 36). Elles sont toujours présentes quelle que soit l'importance des lésions observées (Figure 34, 35,36,37).

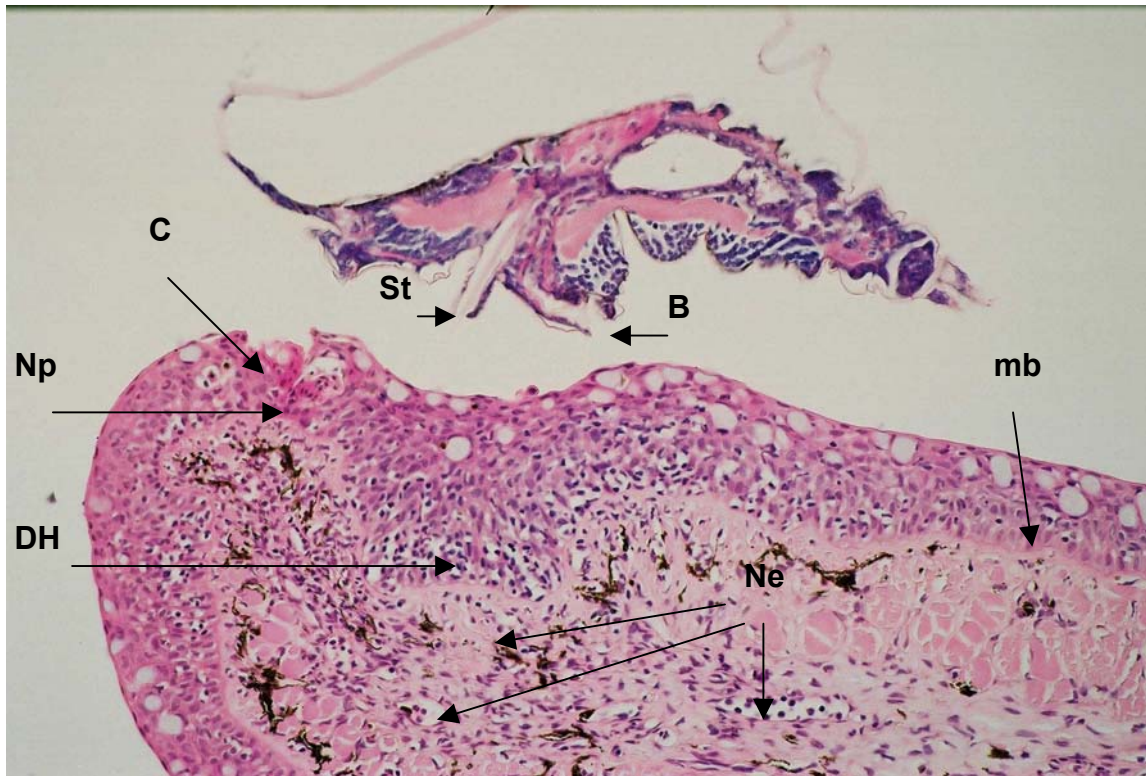


Figure 34: Photographie d'un métanauplius d'*A. foliaceus* fixée sur la nageoire adipeuse d'une truite arc-en-ciel, en coupe sagittale passant par le stylet (St), l'orifice buccal (B). C, Cavité éosinophile de lyse cellulaire aiguë ; DH, Dégénérescence hydropique ; Ne, Neutrophiles ; Np, Noyaux pycnotiques ; mb, Membrane basale .H&E X214.

L'épiderme superficiel sous le parasite est intact, seule une légère dépression épousant la forme du parasite est notable (Figure 34). Par contre plus profondément, dans toute la zone de projection de la bouche et du stylet de la métanauplius, les cellules germinales de la lame basale et celles des premières couches superposées présentent des dégénérescences hydropiques importantes (Figure 34).

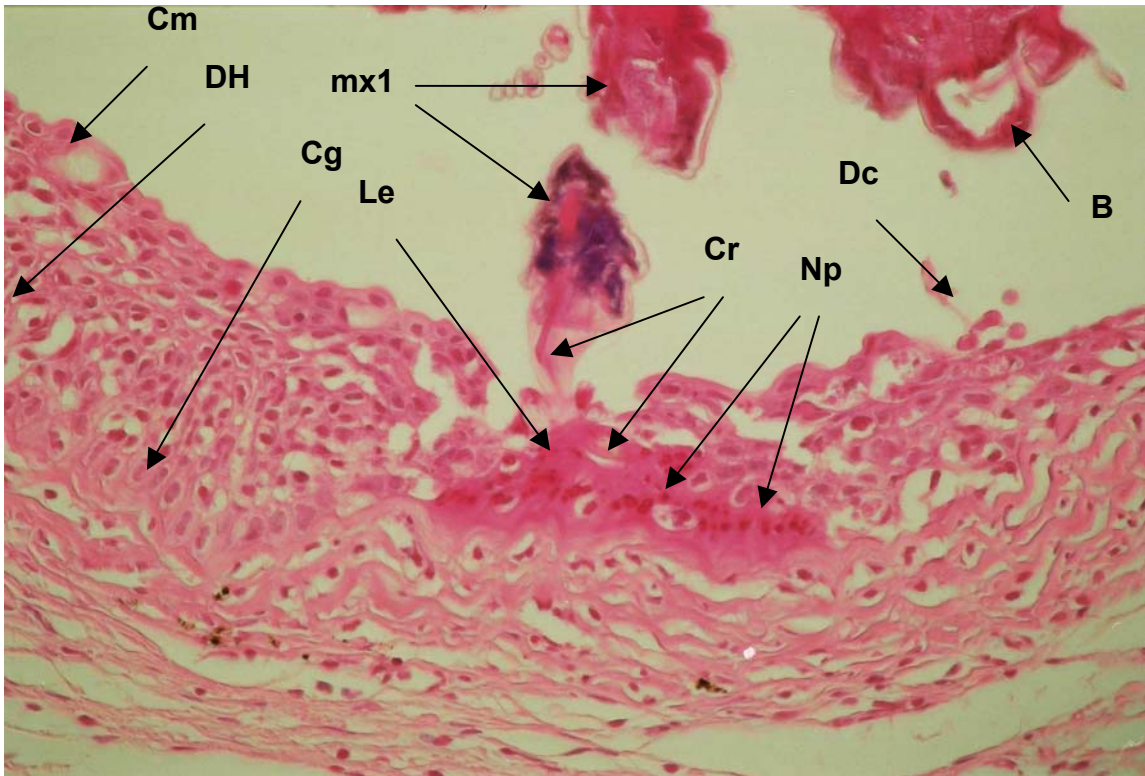


Figure 35: Photographie de la section histologique précédente à la Figure 38 et au plus fort grossissement montrant l'insertion du métanauplius avec une de ses pinces sur la lame basale de l'épiderme. Un des crochets est nettement visible dans une cavité emplie de liquide éosinophile contenant les noyaux pycnotiques en ligne des cellules germinales (Cg) de l'épiderme. B, Orifice buccal ; Cg, Cellules germinales de l'épiderme ; Cr, Crochet ; Cm, Cellule à mucus ; Dc, Débris cellulaires ; DH, Dégénérescence hydropique ; Le, Liquide éosinophile ; Np, Noyaux pycnotiques ; mx1, 1er maxillaire droit. H&E X 250.

3.4.2.2. Lésions de score 2

Les principales modifications lésionnelles sont profondes et touchent les cellules de la lame basale de l'épiderme et celles des couches juste superposées. On observe la formation de vacuoles multifocales (Figure 36), entourées d'images de dégénérescence hydropique et de figures de pycnose. Ces vacuoles semblent converger et entraîner un décollement de l'épiderme de sa lame basale (Figure 36). Les plus importantes se situent dans la zone de projection du stylet.

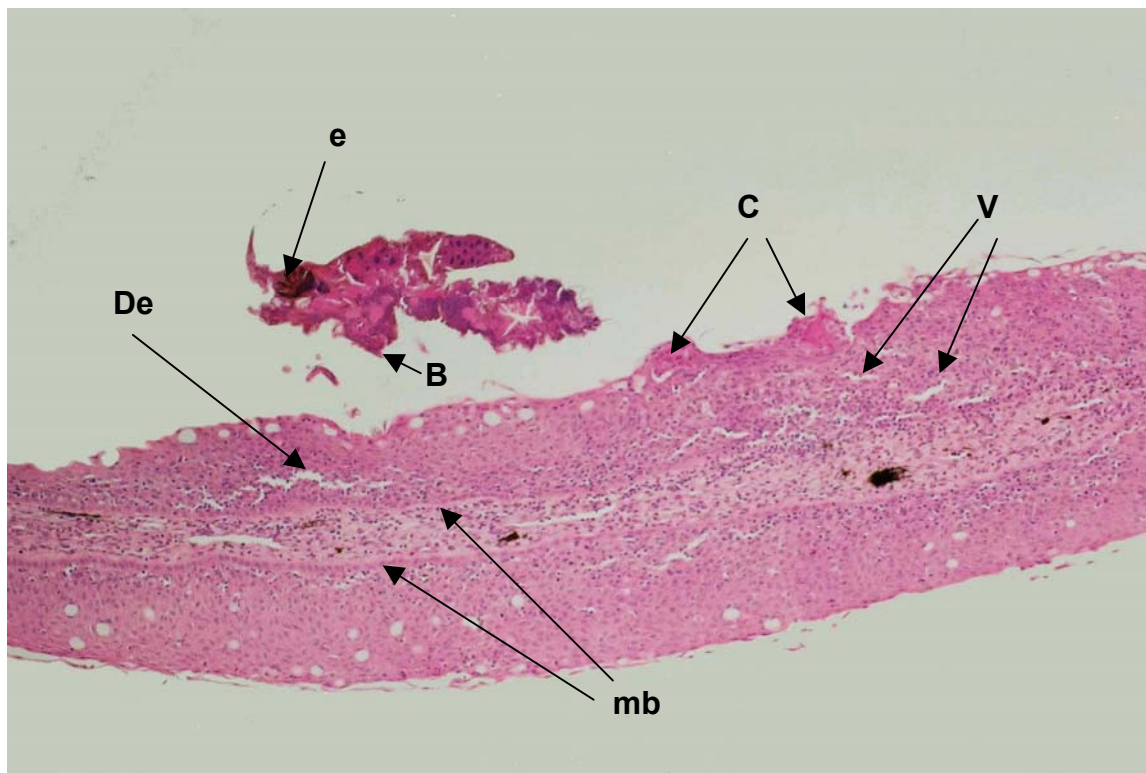


Figure 36: Photographie d'un métanauplius d'*A. foliaceus* en coupe longitudinale fixée sur une nageoire pelvienne de truite arc-en-ciel. B, Orifice buccal d'*Argulus foliaceus* ; C, Cavité de liquide éosinophile avec des noyaux pycnotiques ; De, Décollement épidermique ; e, Oeil d'*Argulus foliaceus* ; Mb, Membrane basale ; V, Vacuoles. H&E x 107.

3.4.2.3. Lésions de score 3

Les modifications lésionnelles touchent l'ensemble de l'épiderme sous-jacent aux métanauplius. Il y a une spongiose généralisée de l'épiderme, accompagnée d'images de dégénérescence hydropique des cellules germinales épidermiques (Figure 37). L'épiderme triple alors d'épaisseur et sa structure générale apparaît complètement désorganisée. De rares cellules à mucus sont encore présentes.

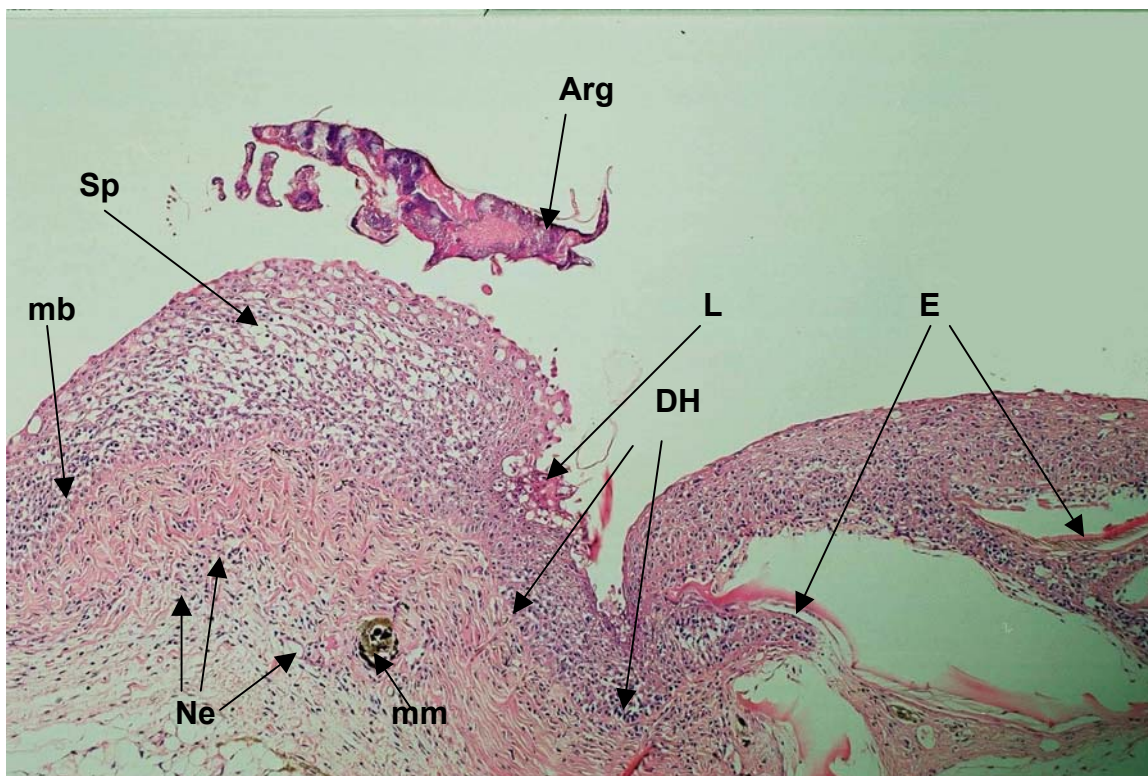


Figure 37: Photographie d'un métanauplius d'*Argulus foliaceus* en coupe longitudinale sur la limite d'insertion de la nageoire dorsale d'une truite arc-en-ciel. Arg, Tête d'*A. foliaceus* ; DH, Dégénérescence hydropique ; E, Ecaille ; L, lyse cellulaire aiguë ; mb, Membrane basale ; mm, Mélanomacrophage ; Ne, Neutrophiles ; Sp, Spongiose épidermique. H&E x107.

3.4.2.4. Lésions de score 4

L'épiderme est totalement ulcéré, seuls quelques débris cellulaires persistent. Ces ulcérations font la largeur du métanauplius (350 μm) sur presque 1mm (890 μm) au-dessous et en arrière du métanauplius (Figure 38 et Figure 39). Il n'a jamais été constaté de lésion plus profonde dans le tégument.

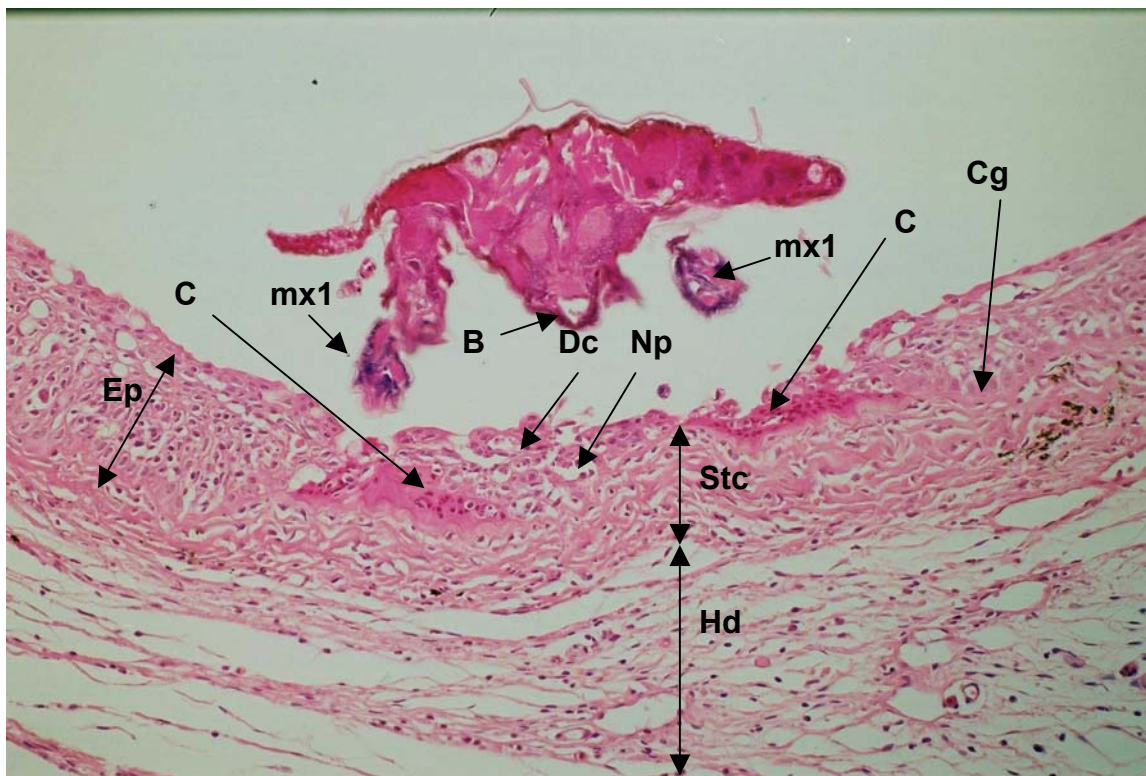


Figure 38: Photographie d'un métanauplius d'*A. foliaceus* en coupe transversale passant par les 1^{er} maxillaires et l'orifice buccal sur une nageoire pectorale de truite arc-en-ciel. Deux cavités épidermiques symétriques emplies de liquide éosinophilique et noyaux pycnotiques basophiles. Entre ces deux cavités l'épiderme et les cellules germinales de la lame basale sont détruits et alors réduits à des débris cellulaires et des noyaux pycnotiques. B, Orifice buccal ; C, Cavité éosinophilique ; Cg, Cellules germinales de la lame basale ; Dc, Débris cellulaires ; mb, Membrane basale ; mx, 1^{er} maxillaire ; Ep, Epiderme ; Np, Noyaux pycnotiques ; Stc, *Stratum compactum*; Hd, Hypoderme. H&E x 214.

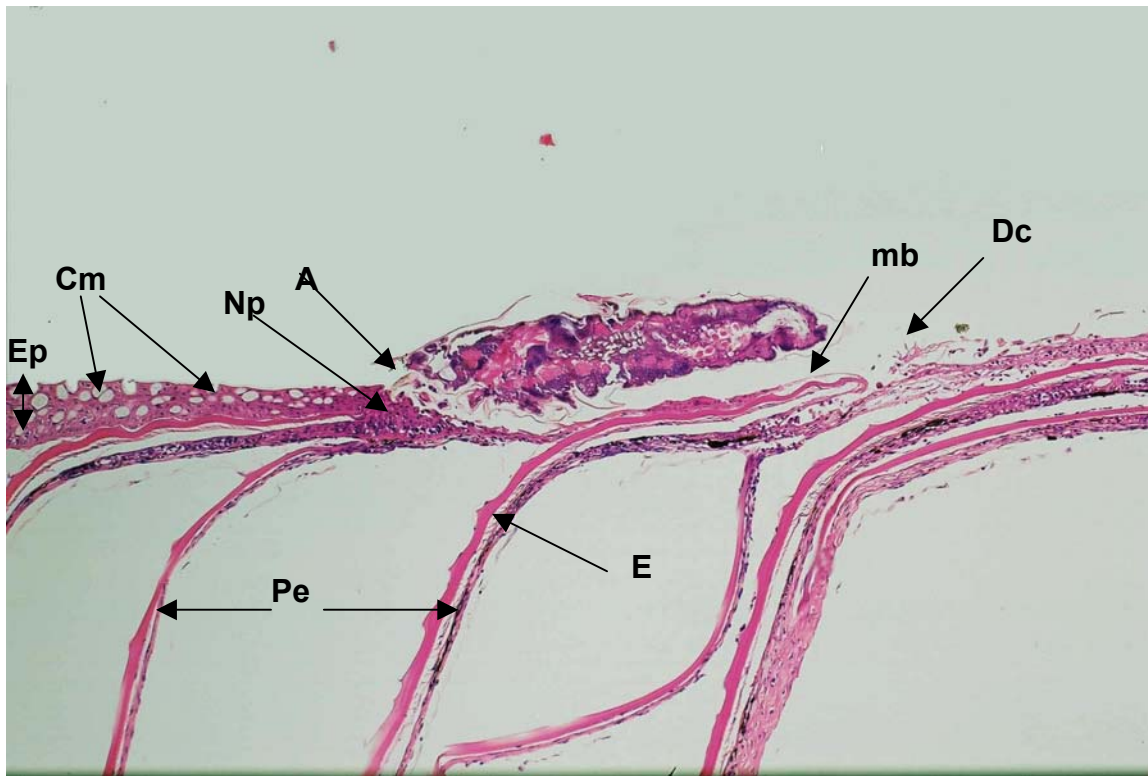


Figure 39: Photographie d'une coupe longitudinale d'un métanauplius d'*A. foliaceus* en passant par une antenne sur la peau du corps d'une truite arc-en-ciel. L'épiderme est détruit totalement jusqu'à sa lame basale . A, Antenne ; Cm, Cellules à mucus ; Dc, Débris cellulaires ; E, Ecaille ; Ep, Epiderm ;mb, Membrane basale ; Np, Noyaux pycnotique ; Pe, Poche de l'écaille. H&E x 107.

3.4.3. Lésions histologiques induites par le stade pré-adulte d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI et trente jours PI

L'étude histologique a été menée de deux manières différentes. Il a été procédé à deux expériences : une sur quatre jours avec une infestation par des stades pré-adultes de manière à observer des lésions aiguës induites par ces stades et une autre sur trente jours après infestation avec des métanauplius pour observer des lésions plus chroniques.

Tableau 3: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des métanauplius d'*A. foliaceus* après trente jours PI.

POISSONS INFESTÉS	<i>Nombre d'échantillons histologiques de NAGEOIRE</i>	<i>Nombre d'échantillons histologiques du reste du CORPS</i>
poisson 1	0	1
poisson 2	7	1
poisson 3	1	0
poisson 4	1	3
poisson 5	0	0
TOTAL	9	5

Tableau 4: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des stades pré-adultes d'*A. foliaceus* quatre jours PI.

POISSONS INFESTÉS	<i>Nombre d'échantillons histologiques de NAGEOIRE</i>	<i>Nombre d'échantillons histologiques du reste du CORPS</i>
poisson 1	3	1
poisson 2	4	0
poisson 3	2	5
poisson 4	3	3
poisson 5	3	0
TOTAL	15	9

Du fait des techniques de fixation et de la motilité importante du parasite, peu d'échantillons ont été interprétables. La technique de fixation du parasite avec des aiguilles d'acupuncture n'a pas donné de résultats convaincants. Les aiguilles, même très fines, étaient trop grosses pour ce stade de développement et n'empêchaient pas le parasite de se déplacer autour de l'aiguille lors de la fixation de l'échantillon. Sur les nombreuses coupes examinées, celles fixées par un mélange d'agar et formol semblaient montrer une rotation du parasite sur l'échantillon. Il est dès lors impossible de lier les lésions aux appendices d'*A. foliaceus*.

Sur l'ensemble des échantillons, malgré de nombreux artéfacts, il a quand même été possible d'étudier trois modifications lésionnelles différentes.

La première, observée sur la plupart des échantillons, est une ulcération épidermique superficielle de toute la surface sous-jacente au parasite. L'épiderme sous le parasite est alors d'épaisseur moins importante, ne présente plus de cellules à mucus et la surface de l'épiderme est le siège de dégénérescences hydropiques et pycnose (Figure 40).

La deuxième modification lésionnelle est une ulcération totale de l'épiderme. Sur les échantillons du corps des poissons, l'ulcération s'arrête au niveau de la poche des écailles et sur les échantillons de nageoire à la membrane basale de l'épiderme. Ces ulcérations sont présentes sur toute la surface d'insertion des parasites.

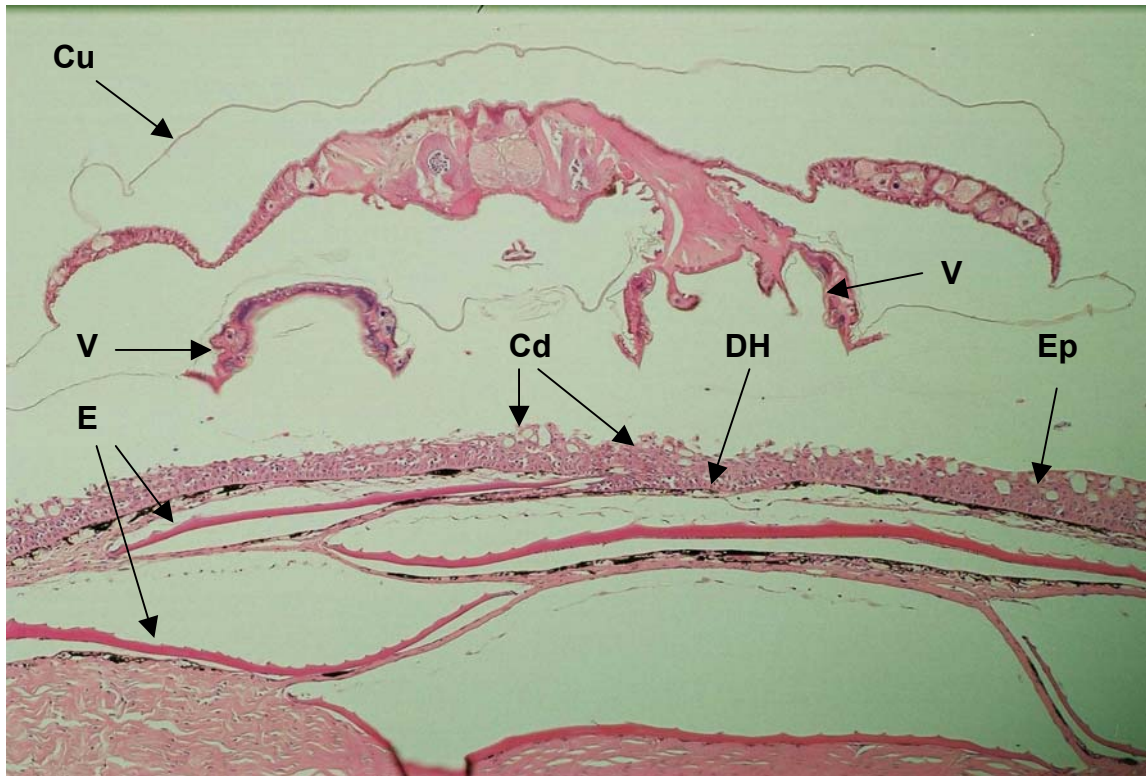


Figure 40: Photographie d'une section histologique d'un stade pré-adulte d'*Argulus foliaceus* en coupe transversale passant par ses ventouses (V) sur la peau du corps d'une truite arc-en-ciel. Cd, Paquets de cellules en pycnose et débris cellulaires ; Cu, Cuticule; DH, Dégénérescence hydropique; E, Ecaille ; Ep, Epiderme ; ml, Mélanophore ; V, Ventouse. H&E x 107.

La troisième modification lésionnelle a été trouvée à trois reprises sur des échantillons de nageoire provenant de poissons infestés par des stades métanauplius d'*A. foliaceus* et sacrifiés trente jours après infestation. Ces lésions sont focales, sphériques d'une centaine de micromètre de diamètre. Elles sont profondes et touchent l'épiderme, le derme et l'hypoderme, par contre l'épiderme superficiel est intact. Ce sont des lésions de spongiose épidermiques focales accompagnées de dégénérescences hydropiques des cellules épidermiques ainsi que d'infiltration de mélanophores dermiques (Figure 41). Au niveau du derme, les fibres de collagène du *stratum compactum* sont complètement absentes sur l'ensemble de la lésion. L'hypoderme est le siège d'une importante infiltration de neutrophiles.

Aucune cavité éosinophile présente dans l'étude précédente n'a été observée dans celle-ci.

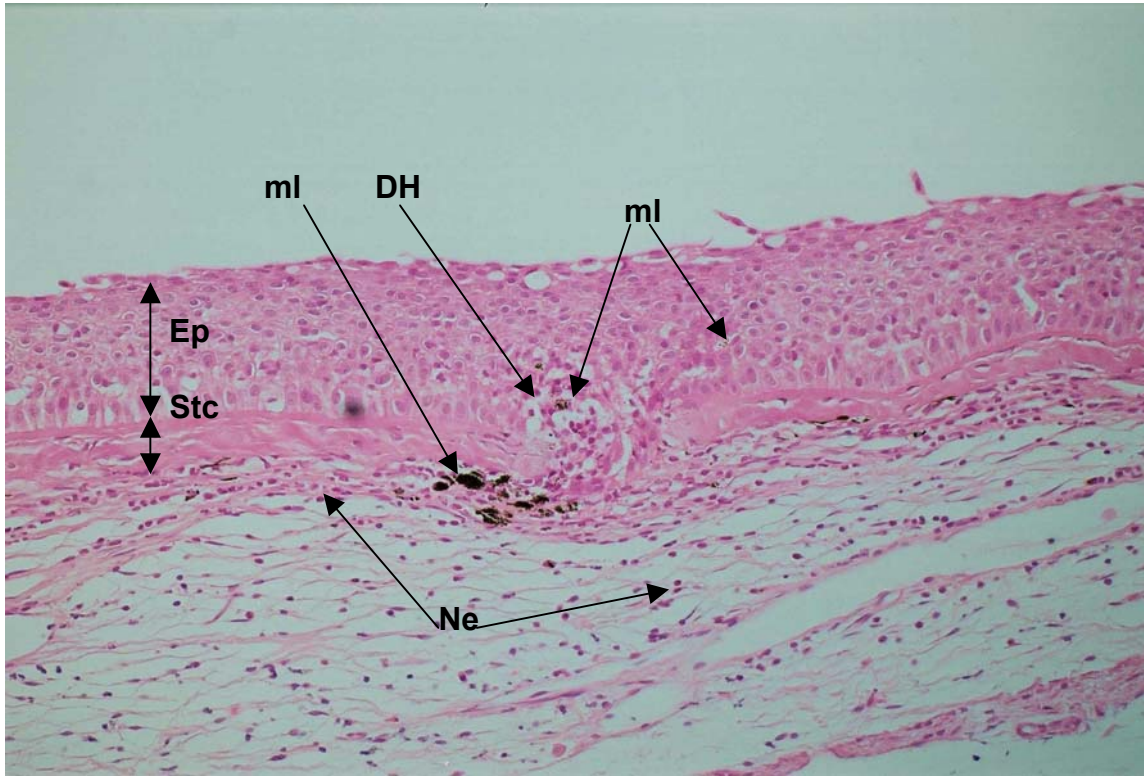


Figure 41: Photographie d'une section de nageoire pelvienne d'une truite arc-en-ciel proche du lieu de fixation d'un stade pré-adulte d'*A. foliaceus*, trente jours après infestation avec des stades métanauplius d'*A. foliaceus*. Il a été observé une destruction totale de la lame basale et du *stratum compactum* sous-jacent plus une infiltration de mélanophores. DH, Dégénérescence hydropique ; Ep, Epiderme; ml, Mélanophore ; Ne, Neutrophiles ; Stc, *Stratum compactum*. H&E x 214.

3.4.4. Lésions histologiques induites par le stade adulte d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI

Tableau 5: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel infestées par des stades adultes d'*A. foliaceus* quatre jours PI

POISSONS INFESTÉS	Nombre d'échantillons histologiques de NAGEOIRE	Nombre d'échantillons histologiques du reste du CORPS
poisson 1	1	0
poisson 2	1	1
poisson 3	1	1
poisson 4	0	1
TOTAL	3	3

Les adultes sont deux fois plus gros que les pré-adultes, les artéfacts induits par la fixation avec les aiguilles d'acupuncture sont minimales et les échantillons ont pu être interprétés de manière plus rigoureuse. De plus, il a été possible de traiter les échantillons avec les parasites *in situ*.

3.4.4.1. Lésions histologiques observées sur le corps

Deux des échantillons examinés présentent une ulcération de tout l'épiderme jusqu'aux écailles et ceci sur des surfaces importantes, allant de 3 mm de large (Figure 43) jusqu'à 4.3 mm de longueur (Figure 42), accompagnée d'une réaction inflammatoire importante caractérisée par une infiltration massive de neutrophiles du *stratum spongiosum*. Les écailles ne tiennent alors que par une extrémité de la poche de l'écaille.

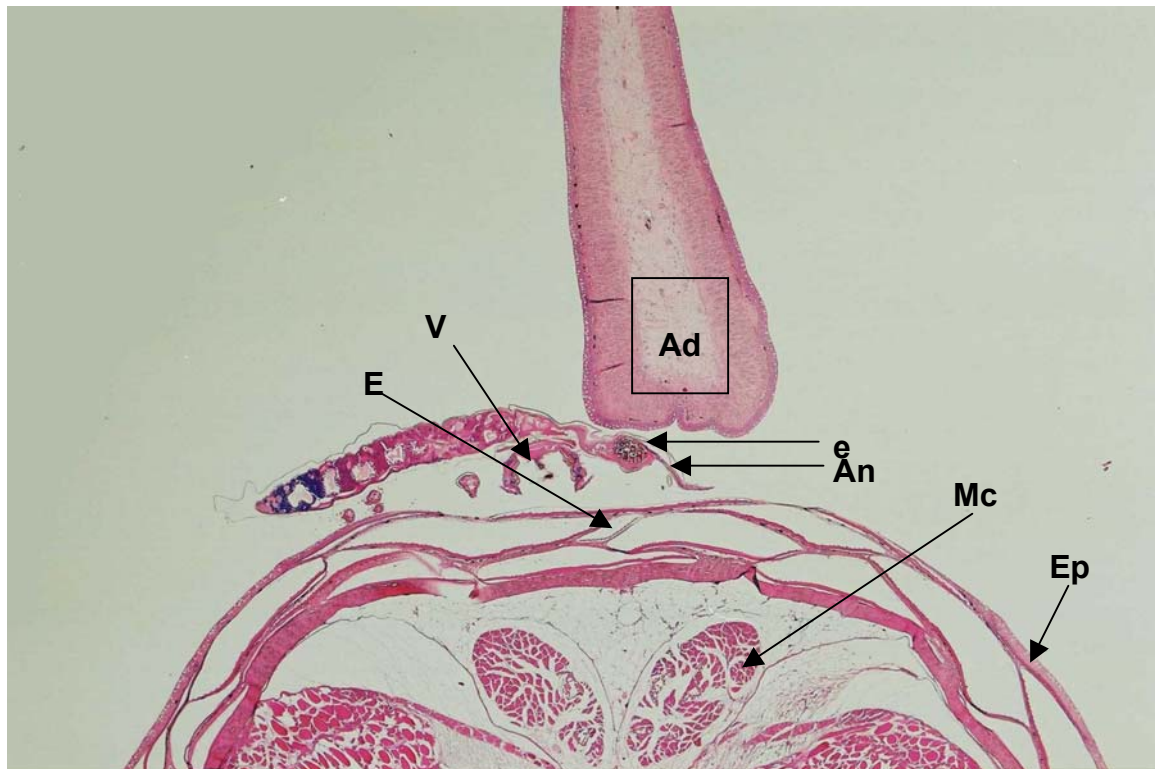


Figure 42: Photographie d'une section histologique d'un stade adulte d'*A. foliaceus* en coupe longitudinale sur le dos et sous la nageoire adipeuse d'une truite arc-en-ciel. Il a été observé une abrasion totale de l'épiderme sur 4,3 mm de long. L'écaille supérieure est complètement à nu. Muscle : Ad, Nageoire adipeuse ; An, Antenne ; e, Oeil; E, Ecaille ; Ep, Epiderme; Mc, Muscle dorsal ; V, Ventouse. H&E x 21.

Le troisième échantillon est un prélèvement réalisé à la base de la nageoire pectorale, à un endroit où les écailles sont moins denses (Figure 43). On observe une lésion beaucoup plus importante. L'épiderme autour du parasite montre des figures de spongiose étendues. L'épiderme en-dessous du parasite est complètement ulcéré sur toute la surface d'insertion du parasite. Cette ulcération est très profonde, 500 μm , et atteint le derme de la peau. Plus profondément, le derme a subi une modification importante de sa structure.

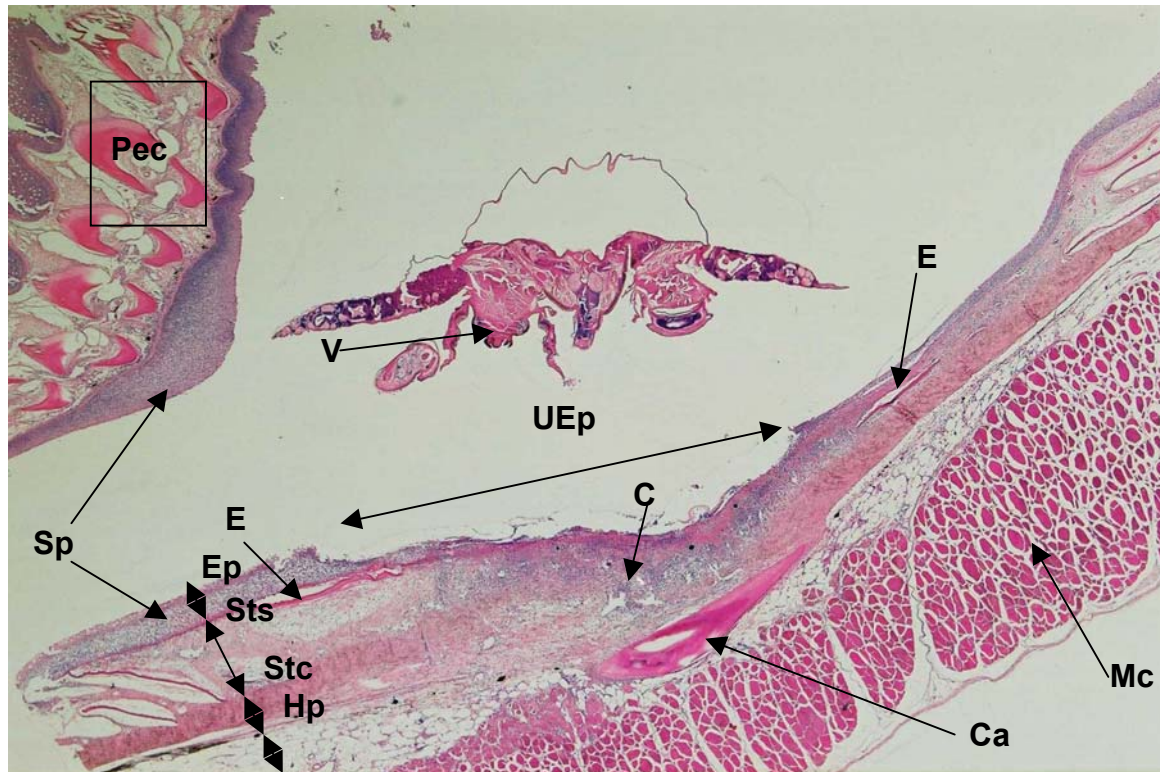


Figure 43: Photographie d'une coupe histologique d'un stade adulte d'*A. foliaceus* en coupe transversale à la base de l'insertion d'une nageoire pectorale d'une truite arc-en-ciel. C, Cavités multifocales ; Ca, Cartilage de la ceinture pectorale ; E, Ecaille ; Ep, Epiderme ; Hp, Hypoderme ; Mc, Muscles ; Ne, Neutrophiles ; Pec, Nageoire pectorale ; Sts, *Stratum spongiosum* ; Stc, *Stratum compactum* ; Sp, Spongiose épidermique ; UEp, Ulcération épidermique ; V, Ventouse. H&E x 21.

Au fort grossissement, les fibres de collagène, composantes du *stratum compactum*, sont en grande partie invisibles donc détruites ou indifférentiables de celles du *stratum spongiosum* (Figure 44). De plus, le derme est cavitaire et le siège d'une importante infiltration neutrophilique et d'images de dégénérescence cellulaire. Ces cavités sont multifocales de taille allant jusqu'à 200 μm pour les plus importantes, et de formes variables.

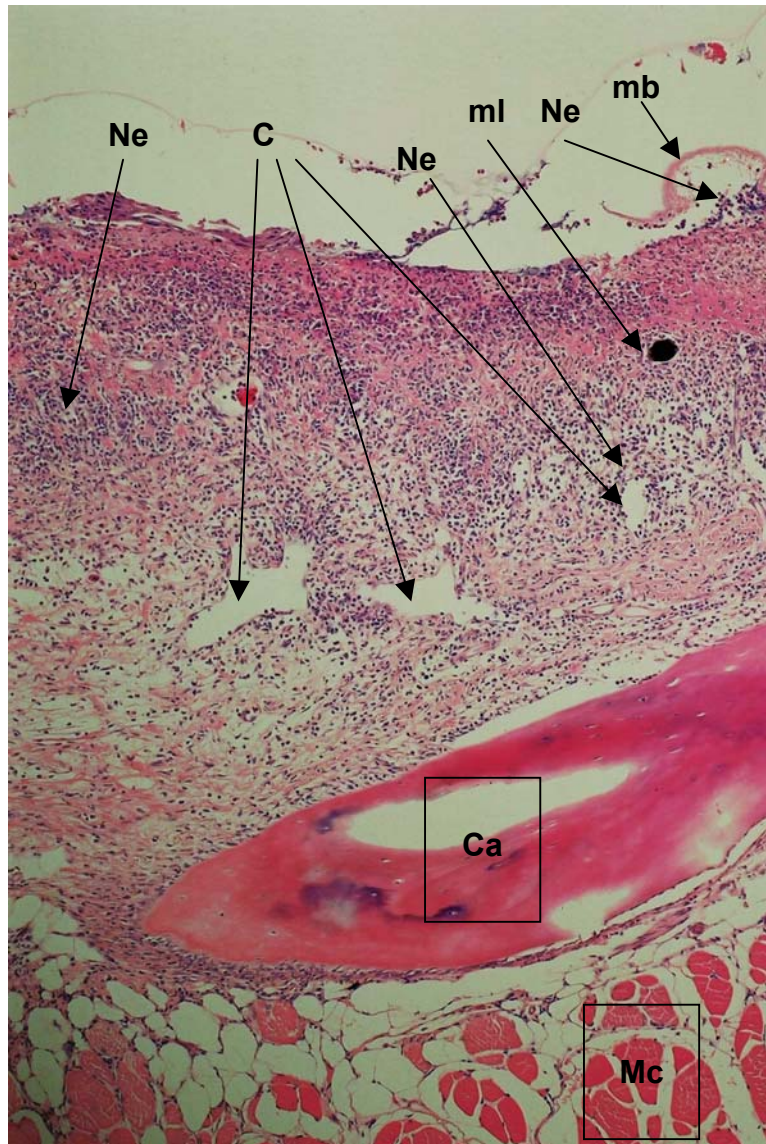


Figure 44: Détail photographique de la section histologique que la Figure 43 centrée sur la lésion dermique. C, Cavités multifocales ; Ca, Cartilage de la ceinture pectorale ; Hp, Hypoderme ; mb, Membrane basale ; Mc, Muscles ; ml, Mélanophore ; Ne, Neutrophiles. H&E x 107

3.4.4.2. Lésions histologiques des nageoires

La taille des lésions est de même importance (de 3 à 4 mm de diamètre) que celles observées sur le corps des poissons. Mais elles sont plus profondes (0.5 mm sous la membrane basale) et atteignent l'hypoderme. L'épiderme ne présente pas d'ulcération, par contre l'épiderme est le siège d'une spongiose sévère accompagnée de dégénérescences hydropiques. Ces lésions sont observées en région céphalique du parasite dans le prolongement du stylet (Figure 45).

L'épiderme sous les ventouses est compact en surface. Le derme et l'hypoderme sont le siège d'une inflammation importante. Le *stratum compactum* est détruit et ne présente plus de fibre de collagène. Il y a alors formation de cavités multifocales semblant converger et former alors un grande cavité sous-épidermique. Une de ces cavités fait environ 1.5 mm de diamètre.

Le derme et l'hypoderme sont le siège d'une infiltration massive de neutrophiles (Figure 46).

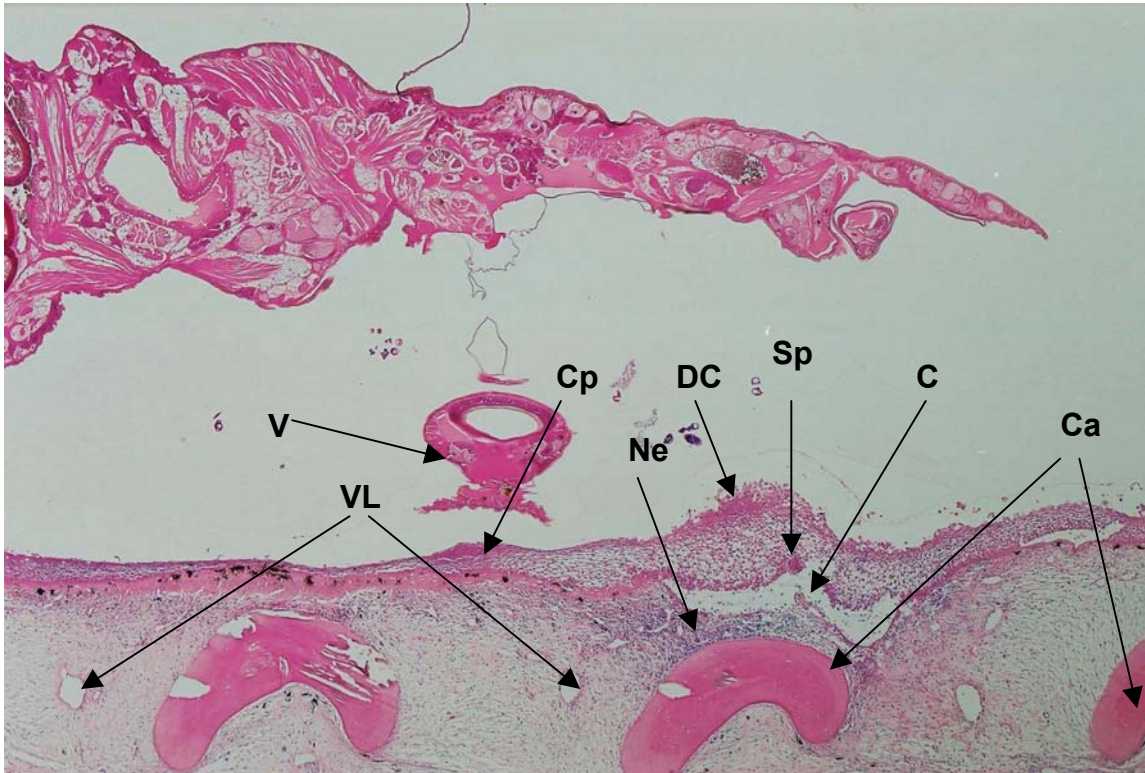


Figure 45: Photographie d'une section histologique d'un stade adulte d'*A. foliaceus* en coupe longitudinale sur une nageoire anale de truite arc-en-ciel montrant un spongiose importante de l'épiderme accompagnée de la formation d'une cavité importante dans le derme. C, Cavité sous épidermique ; Ca, Cartilage; Cp, Compression épidermique ; DC, Débris cellulaires ; Ne, Infiltration neutrophilique; Sp, Spongiose; V, Ventouse; VL, Vaisseaux lymphatiques. H&E X 21.

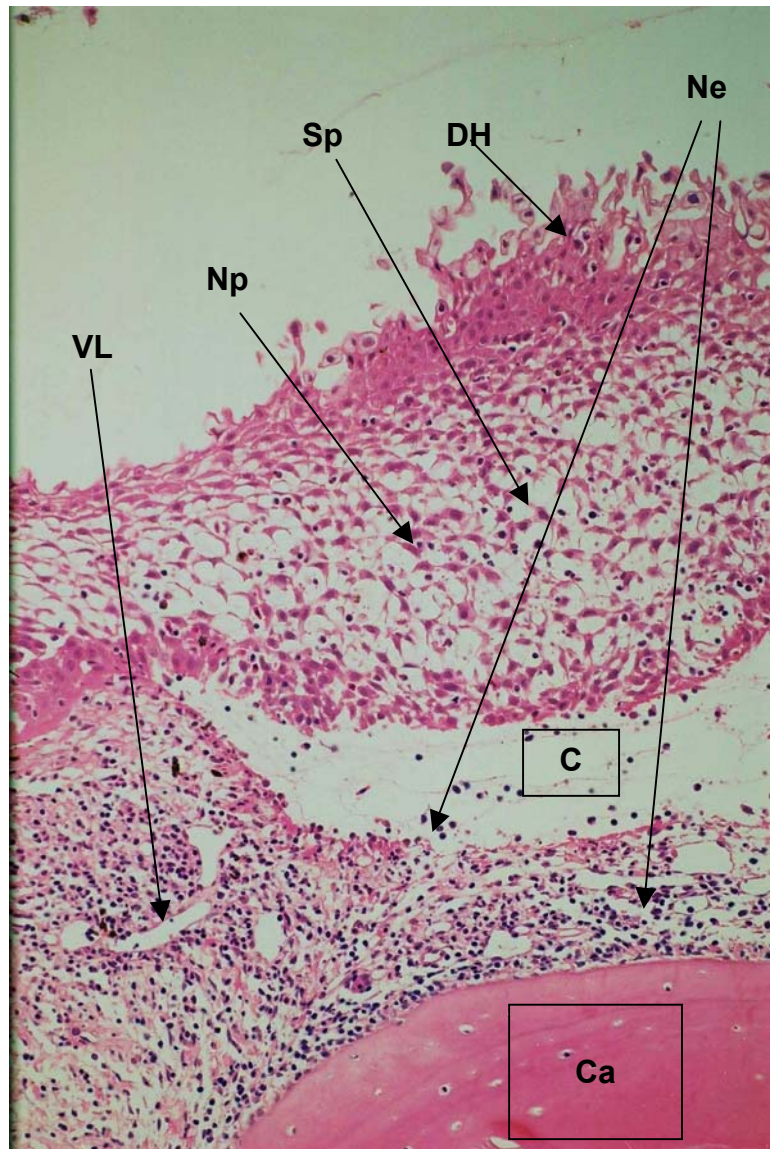


Figure 46: Détail de la Figure 45 sur la cavité dermique. C, Cavité sous épidermique ; Ca, Cartilage ; DH, Dégénérescence hydropique ; Ne, Neutrophiles ; Np, Noyaux pycnotique ; Sp, Spongiose ; VL, Vaisseau lymphatique. H&E X 43.

3.4.5. Lésions histologiques des poissons de la pêche

Les lésions trouvées sur les échantillons recueillis sont des lésions d'ulcérations nécrotiques accompagnées de fibrose. Elles sont beaucoup plus importantes et plus profondes que celles observées dans les infestations expérimentales.

Tableau 6: Nombre d'échantillons histologiques étudiés provenant de truites arc-en-ciel de la pêche infestées par *A. foliaceus*.

POISSONS INFESTÉS	<i>Nombre d'échantillons histologiques de NAGEOIRE</i>	<i>Nombre d'échantillons histologiques du reste du CORPS</i>
poisson 1	3	2
poisson 2	2	2
poisson 3	4	2
poisson 4	5	2
TOTAL	14	8

3.4.5.1. Lésions histologiques corporelles des truites arc-en-ciel

Les lésions d'ulcération font en moyenne 3 mm de diamètre et 0,5 mm de profondeur et atteignent ainsi le *stratum compactum* du derme. Elles sont accompagnées de perte d'écailles. L'épiderme alentour présente une spongiose sévère et des images de dégénérescence hydropique, accompagnées d'un décollement de l'épiderme de la lame basale (Figure 47). Dans certains cas plusieurs foyers d'ulcération épidermique sont observables. Au niveau de ces ulcérations, le *stratum spongiosum* est infiltré par de nombreux neutrophiles ainsi que de mélanophores (Figure 47). Comme dans l'étude précédente nous avons noté la présence de nombreuses cavités dans le *stratum compactum* du derme pouvant faire 70 µm de diamètre.

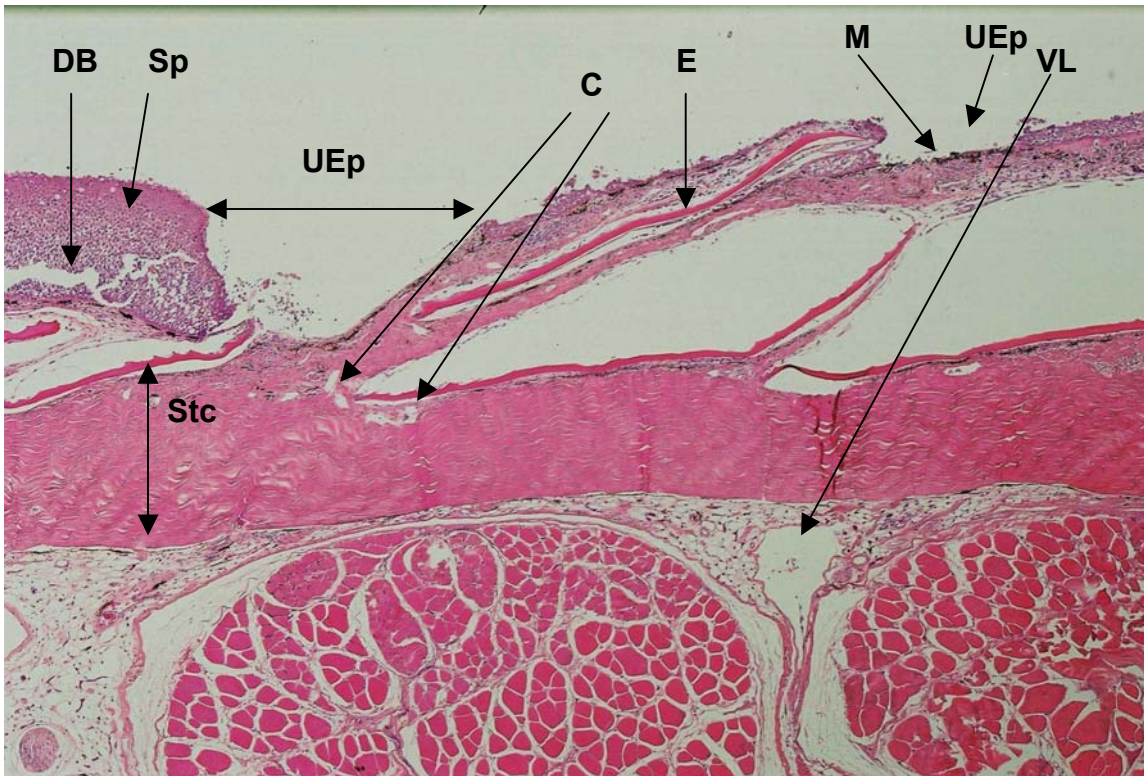


Figure 47: Photographie d'une section histologique de peau du corps d'une truite arc-en-ciel infestée par *A. foliaceus*. L'épiderme présente d'importantes lésions avec perte d'écaille, une spongiose ainsi qu'un décollement basal. Le *Stratum compactum* présente des cavités multifocales, le *Stratum spongiosum* une mélanose ainsi qu'une infiltration neutrophilique. C, Cavités multifocales ; DB, Décollement basal ; E, Ecaille ; M, Mélanose ; Sp, Spongiose ; Stc, *Stratum compactum* ; Uep, Ulcération épidermique ; VL, Vaisseau lymphatique. H&E x 43.

3.4.5.2. Lésions histologiques des nageoires

Nous avons découvert deux aspects histologiques bien différents :

– Des lésions hémorragiques et ulcératives profondes et bien localisées :

Ces lésions ulcératives sont focales de 1,6 mm de large et d'environ 300 µm de profondeur. L'épiderme et le derme sont complètement ulcérés. Ce qui reste du derme est nécro-hémorragique, il est le siège de nombreux foyers de dégénérescences cellulaires accompagnés d'une inflammation importante (Figure 48). Le derme et l'hypoderme sont hyperplasiques avec quelques foyers de fibrose, les vaisseaux sanguins et lymphatiques sont dilatés. Le *stratum compactum* n'est plus constitué de fibres de collagènes mais infiltré massivement par des neutrophiles et érythrocytes (Figure 48).

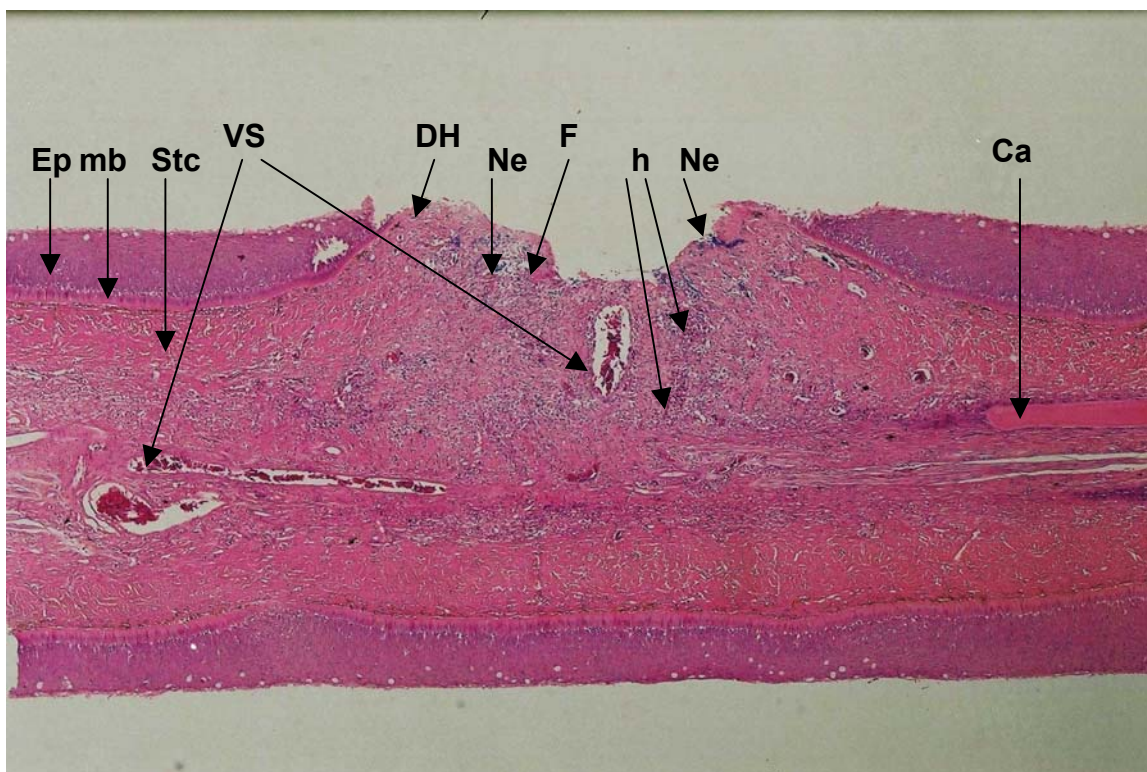


Figure 48: Photographie d'une section histologique d'une nageoire pelvienne de truite arc-en-ciel infestée par *A. foliaceus*. L'épiderme et le derme présentent une ulcération nécrotique accompagnée d'hémorragies, de fibrose ainsi qu'une importante infiltration neutrophilique. Ca, Cartilage ; DH, Dégénérescence hydropique ; Ep, Epiderme ; F, Fibrose ; h, Hémorragie ; mb, Membrane basale ; Ne, Neutrophiles ; Stc, *Stratum compactum* ; VS, Vaisseaux sanguins vasodilatés. H&E x43.

–Des lésions ulcératives superficielles étendues accompagnées d'hypermélanose

Ces lésions sont retrouvées sur les nageoires adipeuses. Les lésions sont de grandes plages d'ulcération allant jusqu'à 7mm de long et 200µm de profondeur (Figure 49). L'épiderme est alors complètement absent. Le derme est le siège d'importantes modifications. Le *stratum spongiosum* présente une infiltration massive de mélanophores tandis que le *stratum compactum* est superficiellement fibreux et ponctué de nombreuses cavités de taille et formes variables d'environ 10 µm de longueur. Sur un échantillon, nous avons noté la présence d'un granulome, en région centrale de l'hypoderme, caractérisé par une concentration focale de neutrophiles et macrophages contenant des cellules pycnotiques (Figure 49).

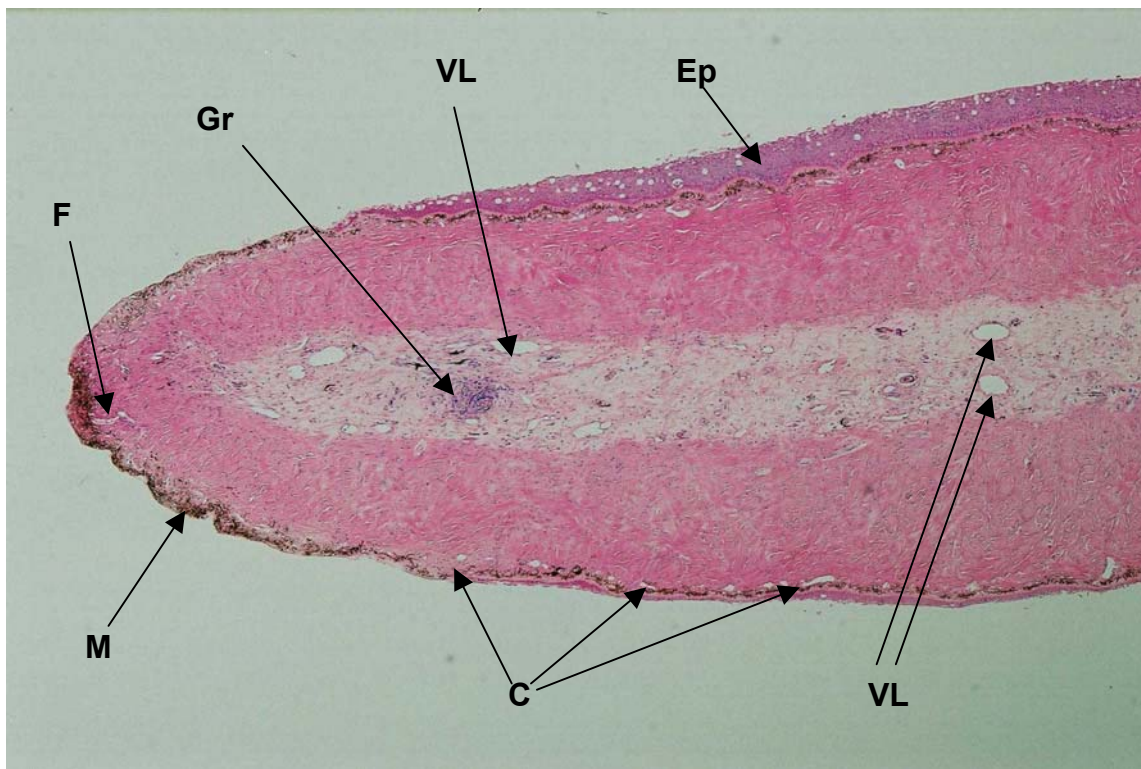


Figure 49: Photographie d'une section histologique d'une nageoire adipeuse de truite arc-en-ciel infestée par *A. foliaceus*. L'épiderme est détruit sur 30% de sa longueur totale ; Il présente une ulcération importante accompagnée de fibrose, mélanose et cavitation du *Stratum compactum*. C, Cavités dermiques ; Ep, Epiderme ; F, Fibrose ; Gr, Granulome ; M, Mélanose ; VL, Vaisseau lymphatique. H&E x 43.

3.5. INFECTION SECONDAIRE

Comme il a été présenté dans 2.2. , les *A. foliaceus* provenant du Loch Lomond ont été examinés en MEB afin de visualiser la présence éventuelle de tout agent pathogène. Des colorations de Gram sur les lames histologiques ont été faites.

Après coloration de Gram, aucune lame n'a révélé la présence de bactérie, même au niveau des granulomes et lésions ulcéraives. En MEB, les *A. foliaceus* semblent indemnes de toute infection par des champignons, par contre 2% des *A. foliaceus* du Loch Lomond examinés se sont révélés parasités par *Epistylis sp.* (Figure 50 et Figure 51) sur les appendices céphalothoraciques et crochets d'*A. foliaceus*.



Figure 50 : Photographie en MEB d'un stade pré-adulte d'*A. foliaceus* provenant du Loch Lomond infesté par *Epistylis sp.* (Petites boules blanches sur ses seconds maxillaires et sur son thorax). (X 20).



Figure 51: Photographie en MEB des crochets d'un second maxillaire de l'*A. foliaceus* photographié, Figure 50, avec des paquets d'*Epistylis sp.* à leur base. (X 320).

De même certaines lames histologiques provenant d'échantillons de peau de truites infestées par *A. foliaceus* du Loch Lomond montrent des *A. foliaceus* parasités par *Epistylis sp* (Figure 52).



Figure 52: Photographie d'une section histologique d'un stade adulte d'*A. foliaceus* passant par un crochet (Cr) céphalothoracique infesté par *Epistylis* sp. *A. foliaceus*: Cu, Cuticule ; In, Intestin ; Lu, Lumière intestinale. *Epistylis* sp. : cc, Couronne ciliée (cc) ; Va, Vacuole cytoplasmique ; Nu, Nucléus. H&E X 214.

4. DISCUSSION

4.1. DISTRIBUTION D'*Argulus foliaceus* SUR LA TRUITE ARC-EN-CIEL

La distribution de *A. foliaceus* aux différents stades de développement correspond à celle déjà étudiée par Buckley et Morrice (Buckley et Morrice, 1976) sur la truite fario et par Shimura (1983a) avec des *A. coregoni* sur *Oncorhynchus masou*. Elle est, par contre, différente de celle rapportée par Stammer (1959) et Buckley et Morrice (Buckley et Morrice, 1976) sur la carpe où les *Argulus* sont répartis sur les nageoires et surtout la queue. On pourrait émettre l'hypothèse qu'*A. foliaceus*, classé dans la catégorie des hématophages, se retrouverait exclusivement dans des zones où les vaisseaux sanguins et lymphatiques seraient les plus abordables, c'est-à-dire sur les nageoires où le tégument est sans écaille. Il a certes été observé une plus grande prévalence de ces stades à la base des nageoires mais la prévalence du parasite sur d'autres régions n'est pas négligeable (30%). Cette différence observée entre *Oncorhynchus sp.* et *Cyprinus carpio* semble davantage être spécifique de l'hôte (Shimura 1983a) et liée aux morphologies différentes de ces espèces et donc à leur hydrodynamisme. En effet, *A. foliaceus*, comme la plupart des ectoparasites, semble réagir aux contraintes hydrodynamiques et se retrouve aux endroits où les courants et mouvements des poissons sont les plus faibles : base et arrière de la dorsale et nageoire adipeuse ainsi qu'à l'intérieur et à la base des nageoires pelviennes et pectorales qui sont peu utilisées par *Oncorhynchus sp.*

La prédilection des stades métanauplius pour les nageoires lors de l'infestation, semble liée à la dynamique du courant d'eau sur le corps des poissons. Sur une étude menée sur les sites de prédilection des stades copépodes de *Lepeophtheirus pectoralis* par Boxshall (1976), il ressort qu'ils avaient les mêmes zones de prédilections, à savoir la nageoire dorsale et les nageoires pectorales, que les stades métanauplius d'*Argulus*. Pour Boxshall, ces zones privilégiées sont le reflet de l'hydrodynamisme sur les corps des poissons. En effet, comme les stades métanauplius d'*Argulus*, les stades copépodes de *Lepeophtheirus pectoralis* se déplacent dans les courants d'eau. Même s'ils ont des capacités natatoires celles-ci restent faibles et les parasites sont soumis aux courants. Or lors de ses déplacements, les poissons utilisent leurs nageoires qui génèrent alors un courant

d'eau, ou un influx d'eau plus important à leur niveau. Par conséquent, les probabilités de rencontre et donc d'attachement dans ces régions sont plus importantes.

En outre, les stades juvéniles ont des pinces leur permettant un ancrage en profondeur dans la lame basale de l'épithélium plus efficace sur les nageoires que sur le reste du tégument où il y a des écailles, et les nageoires avec leur rayons fournissent aussi un micro-habitat plus protecteur pour l'attachement des parasites (Tucker *et al.* , 2002).

Les différences de localisation entre les premiers stades de développement et les suivants sont sans doute liées aux différences de taille et de mode d'attachement de ces stades.

En effet, les stades pré-adultes et adultes ont des ventouses qui se fixent superficiellement sur l'épiderme. Leur fixation est plus efficace sur les surfaces planes, comme le corps de ses hôtes. De plus, au fur et à mesure de leur développement, leur taille augmente considérablement. Proportionnellement des surfaces planes de plus en plus importantes seront nécessaires et plus appropriées à une bonne fixation. De même, les régions corporelles où les courants d'eau se font moins sentir ou plaquent le parasite sur les poissons, comme la région dorsale et sous la nageoire adipeuse sont plus favorables au maintien du parasite. Quant aux métanauplius, ils se déplacent moins aisément sur le corps du poisson et restent dans les zones proches du premier site de fixation : les nageoires.

Les succès d'infestation quatre jours PI et trente jours PI ont été jugés satisfaisants compte tenu des contraintes suivantes :

- les truites arc-en-ciel nécessitent un renouvellement d'eau et une oxygénation plus important que les carpes
- les truites arc-en-ciel ont une vision beaucoup plus fine

Ceci peut expliquer en parti les différences entre les taux obtenus à 4 jours PI et à 30 jours PI, mais il faut aussi tenir compte du taux de mortalité au cours du développement car tous les individus éclos n'atteignent pas le stade mature.

La plupart des stades adultes d'*A. foliaceus* ont été retrouvés morts au fond des bacs et de nombreux rubans d'œufs ont été déposés sur les parois des bacs. Le faible

taux observé lors de ces infestations peut s'expliquer par le fait que ces adultes étaient en fin de cycle de vie.

4.2. DISTRIBUTION DES LÉSIONS SOUS UV APRÈS TRAITEMENT À LA FLUORESCÉINE

Nous avons constaté la présence de lésions de formes longilignes et de tailles variées en faible quantité sur la région céphalique, et d'autres focales rondes à ovales de faible diamètre et plus nombreuses aux endroits parasités par *A. foliaceus*. Etant donné l'absence de tout autre élément pathogène qu'*A. foliaceus* dans les bacs, le premier type de lésion est lié aux frottements des poissons sur les parois ou sur le trop plein des bacs et le second type lié à l'action directe du parasite. Les lésions induites par les parasites sont 2 à 15 fois supérieures au nombre de parasites situés à proximité. Il en a donc été déduit qu'*A. foliaceus* prenaient ses repas à différents endroits sur son hôte. Mais surtout qu'il est très mobile et induit de nombreuses lésions en peu de temps. Cependant il faut pondérer ces résultats.

Du fait des difficultés associées aux prélèvements histologiques, il n'a pas été possible lors de cette étude d'avoir assez de temps pour comptabiliser et enregistrer de manière rigoureuse toutes les lésions observées en fluorescence. De plus, la technique étant utilisée pour la première fois sur le corps de poissons parasités, du temps a donc été consacré à l'optimisation et la vérification de la validité de cette méthode. En outre, le nombre d'échantillons traités sous histologie et MEB ne sont pas, d'un point de vue statistique, suffisants pour valider cette méthode.

Bien que les résultats rapportés semblent indiquer que la technique de marquage à la fluorescéine des lésions soit suffisamment sensible et spécifique, il faut se garder de toute conclusion définitive. Une étude utilisant cette méthode avec un nombre fixe de parasites et un nombre plus important de poissons, pourrait apporter des conclusions plus fiables.

Malgré tout, cette technique semble intéressante pour quantifier le pouvoir pathogène de parasites, et dans toutes autres études sur des blessures et ulcères,

causés par tout autre agent sur l'ensemble du corps des poissons.

4.3. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE

Les études en MEB ont permis d'apprécier l'étendue des lésions superficielles occasionnées par *A. foliaceus* et de les associer directement à chaque appendice.

4.3.1. Lésions induites par les métanauplius d'*Argulus foliaceus* en MEB

Les lésions les plus importantes observées en MEB ont été associées aux mx1. En effet, le mode d'attachement semble provoquer une forte réponse de l'hôte vis-à-vis du parasite et les pinces s'enfoncent profondément dans l'épiderme de l'hôte. Cependant, le mode de nutrition semble au moins presque aussi délétère mais plus difficile à apprécier en MEB. Il a été très difficile d'étudier le pouvoir pathogène du stylet. Ce dernier semble induire uniquement un trou dans l'épiderme et la MEB ne nous permet pas d'étudier les lésions sans doute induites par le stylet dans l'épithélium.

Cette étude a été limitée à l'examen de quatre échantillons à quatre jours PI. Ce nombre est donc trop faible pour pouvoir être représentatif d'un point de vue statistique. Aucune lésion chronique n'a pu être observée pour comparaison. De ce fait, bien que chaque échantillon présente les mêmes caractéristiques, il est difficile de généraliser.

4.3.2. Lésions induites par les stades pré-adultes d'*A. foliaceus*

Sur quelques échantillons, seules des lésions liées aux ventouses étaient visibles. Deux échantillons présentent une simple surélévation de l'épiderme au niveau de l'attachement des ventouses sans lésion apparente de l'épithélium. Les traces des rayons des ventouses sont visibles (Figure 29) ce qui suggère que le parasite venait juste de se fixer avant l'échantillonnage.

D'autres échantillons ont montré des lésions plus importantes avec des cellules de l'épiderme œdématiées. Il semble alors que les lésions soient plus anciennes mais restent superficielles. Autour de ces lésions, l'aspect de l'épiderme est anormal :

cellules légèrement œdématisées et l'épithélium semble creusé ou déprimé (Figure 30). En MEB, il est difficile de savoir si ces dépressions résultent d'un écrasement et de déformations induites par *Argulus* ou sont le fait de la nutrition du parasite.

Un échantillon semble plus interprétable que les autres (Figure 31). La forme des lésions correspond à l'empreinte du céphalothorax du parasite. Il a été observé un important pertuis au centre haut de cette ulcération épidermique. En aval de celui-ci une ulcération plus profonde de forme triangulaire dont le sommet est accolé à ce pertuis est présente. Si l'on compare la disposition de ces différentes lésions à la disposition des appendices céphalothoraciques d'*A. foliaceus* (Figure 3 et Figure 28), le pertuis correspond à l'insertion du stylet et l'ulcération triangulaire à la région buccale du parasite. L'ulcération triangulaire résulterait donc de l'action des pièces buccales d'*Argulus*. Vu la forme triangulaire de cette ulcération et du fait de l'anatomie particulière de la région buccale, il semble raisonnable de penser qu'*Argulus* se nourrit de l'épiderme de son hôte en s'avancant progressivement tout en déplaçant latéralement de droite à gauche son orifice buccal. Comme Shimura (1983b ; 1984), Swanepoel et Avenant-Oldewage (1992) le suggèrent, la principale fonction du stylet serait alors d'injecter des enzymes dans l'épiderme en avant de l'orifice buccal permettant une prédigestion des tissus sous-jacent et facilitant ainsi l'action de nutrition.

Cette ulcération triangulaire ne représente que 30% de la surface de la lésion totale, mais elle reste plus importante que les 70% restants car plus invasive. Les lésions les plus importantes en MEB sont donc associées au mode de nutrition d'*A. foliaceus*.

Du fait des contraintes matérielles (des parasites peu nombreux et difficiles à trouver à ces stades à cette période de l'année) il a été décidé de garder la plupart des échantillons pour l'étude histologique. Seul un échantillon montrant des lésions plus chroniques a donc pu être étudié, et son interprétation est de ce fait impossible à généraliser. Cependant, elle donne une idée complémentaire de l'étude histologique.

4.4. HISTOLOGIE DES LESIONS

4.4.1. Lésions histologiques induites par le stade métanauplius d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI

L'étude histologique confirme l'étude en MEB de ces stades. Les mx1 ont été, dans la plupart des cas, observés fixés sur la lame basale de l'épiderme.

Les cavités éosinophiles contenant des noyaux pycnotiques ont été sans ambiguïté liées aux conséquences directes de la fixation du parasite dans l'épiderme. Elles sont toujours présentes quel que soit le score de la lésion. Elles sont au nombre de deux, symétriques par rapport à l'axe de symétrie bilatérale du parasite et à chaque fois les pinces du parasite ont été retrouvées dans ces cavités. Du fait d'une importante liquéfaction sans débris cellulaire apparents, si ce n'est la présence des noyaux des cellules lysées, ces cavités peuvent résulter d'une lyse aiguë, pouvant être due à une excrétion d'enzymes par les pinces ou d'une rupture mécanique lors de fermeture des pinces sur la membrane basale. En fait, dans les lames examinées, la présence de glandes sécrétrices dans les pinces n'a pas été mise en évidence. De plus, ces lésions sont ovales avec leur grand axe dans l'axe de fermeture et d'ouverture des pinces. Or les appendices (mx1) sont utilisés pour la fixation du parasite. De ce fait, on en conclut que ces cavités résultent d'une destruction mécanique engendrée par la fermeture des pinces sur la lame basale.

Les différents scores semblent correspondre au temps passé par le parasite sur l'épiderme. Les intervalles d'échantillonnage ont tous été respectés. La différence des scores peut s'expliquer par le fait que chaque parasite ne s'est pas fixé au même moment sur les truites. En effet les métanauplius d'*Argulus foliaceus* peuvent rester 3-4 jours sans fixer sur un hôte. Au-delà les chances de survie du parasite sont nulles (Bower-shore, 1940). Cela peut aussi s'expliquer par le fait que le parasite se déplace sur le corps de son hôte à la recherche d'un site plus approprié ou un nouveau site de nutrition. Sur un des échantillons plusieurs de ces cavités éosinophiles ont été observées à la surface de l'épiderme. Elles correspondent à la fixation du parasite par ses premiers maxillaires. Ces cavités se situent alors en

arrière et dans l'axe du parasite ce qui montre que le parasite n'est pas statique sur l'hôte et se déplace à l'aide de ses pinces dans le sens de la marche.

Sur les lésions de score 1, ainsi que de score supérieur, outre les cavités éosinophiles induites par la fixation du parasite, nous avons décrit des dégénérescences hydropiques des cellules basales de l'épiderme puis une spongiose et la formation de vacuoles générant un décollement de l'épiderme. Ces dégénérescences sont profondes dans l'épiderme et se situent dans la zone de projection de la région céphalique du parasite. De plus ces images de dégénérescence apparaissent dans les lésions de score 1, donc précocement dans la formation des lésions. Ces images de dégénérescence ne concernent que les cellules profondes de l'épiderme. Les cellules des couches supérieures de l'épiderme apparaissent alors indemnes et normales. On peut déduire de ces observations que ces lésions résultent de l'action des enzymes sécrétées par le stylet d'*A. foliaceus*.

Sur les lésions de score 3 et 4, les métanauplius d'*A. foliaceus* entraînent une destruction totale de l'épiderme jusqu'aux écailles. Ces dernières semblent bien remplir leur rôle de protection et interdisent aux métanauplius de léser plus profondément l'épiderme. Aucune lésion plus profonde que l'épiderme n'a été trouvée sur les échantillons de nageoire. Dans ces zones il est alors impossible au stade métanauplius d'*A. foliaceus* d'atteindre tout vaisseau sanguin ou lymphatique. Par contre les ulcérations épidermiques semblent progresser en superficie et longueur. En effet elles sont de largeurs toujours égales à celle du parasite mais de plus en plus longues en arrière de celui-ci. Il est donc possible de conclure que le parasite se fixe pour se nourrir puis se déplace à différents endroits de l'épiderme de leur hôte à la recherche d'une nouvelle zone d'épiderme.

Sur les lésions des différents scores nous avons donc observé une action cytotoxique des sécrétions du stylet d'*Argulus foliaceus* qui se manifeste par des dégénérescence hydropiques résultant en un décollement de l'épiderme de sa membrane basale. Ceci est en contradiction avec les effets non cytotoxiques observés par Shimura *et al.* (1984) mais explique les pertes locales de la pigmentation cutanée (Bower-shore, 1940).

L'appareil buccal du stade métanauplius d'*A. foliaceus* est constitué du stylet et de l'orifice buccal. Tous deux sont bien distincts, d'orientation opposée et perpendiculaires l'un à l'autre (Figure 34) et (Swanepoel et Avenant-Oldewage, 1992). Il semble alors que le stylet soit utilisé pour injecter des enzymes prédigestives dans l'épiderme en avant de l'orifice buccal. Celui-ci sert alors à ingérer les débris cellulaires ainsi obtenus. *A. foliaceus* serait donc histophage et ne se nourrirait pas de plasma ou de sang de l'hôte.

Le nombre d'échantillons (30) semble d'un point de vue statistique suffisant pour en tirer certaines conclusions. Cependant, l'étude a été menée sur 4 jours ce qui peut être insuffisant pour le parasite pour induire des lésions plus profondes.

4.4.2. Lésions histologiques induites par le stade pré-adulte d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI et trente jours PI

Aucune affirmation ne peut être déduite de cette étude du fait des problèmes rencontrés dans le prélèvement et le traitement des échantillons. Ce qui a seulement pu être déduit c'est que ces stades, comme les précédents entraînent une ulcération épidermique qui est limitée à l'épiderme. L'importance et l'étendue de ces lésions ne peuvent être déduites de manière rigoureuse.

4.4.3. Lésions histologiques induites par le stade adulte d'*Argulus foliaceus* quatre jours PI

Les lésions induites par le stade adulte d'*A. foliaceus* sont plus importantes en profondeur et en surface que celles induites par les stades précédents au cours d'un même laps de temps. L'importance de ces lésions est donc proportionnelle à la taille des individus. À la différence des stades précédents, les adultes sont capables d'induire des lésions dermiques et même hypodermiques, avec ou sans la présence d'écaille dans le derme. Ils sont en effet capables de décoller les écailles et d'infliger des lésions plus profondément dans le tégument.

Les lésions récentes ne présentent aucune ulcération épidermique mais une spongieuse importante de l'épiderme située dans la zone de projection de la région céphalique des parasites. Sous cette spongieuse épidermique de grandes plages de destruction cellulaire laissent place à la formation d'une grosse bulle ou cavité. Du fait de leur localisation et leur profondeur ces lésions semblent être liées à l'action directe du stylet des parasites. A ce stade les ventouses n'induisent qu'une faible compression cellulaire de l'épiderme superficiel.

Excepté au stade précoce des lésions, les ulcérations épidermiques et même dermiques sont plus étendues que profondes. Elles s'étendent plus dans le sens longitudinal du parasite que transversal. Il semble donc que le stade adulte soit aussi histophage mais se nourrisse de tissus sous cutanés, ce qui peut expliquer les résultats obtenus par Stammer (1959) (4.4.5.). Les lésions induites par le mode de nutrition apparaissent, sans ambiguïté, plus importantes que celles générées par le mode d'attachement du parasite.

Les lésions (perte d'écaillés et lésions ulcératives profondes) générées en moins de quatre jours à 14,5°C sont alors assez importantes en intensité et nombre (3.2.1.1) pour qu'une infestation importante de ces stades, relativement à la taille de l'hôte, engendre des troubles osmotiques perturbants les fonctions d'homéostasie de l'animal, et ceci suffisamment pour entraîner la mort de l'hôte.

Une expérimentation avec plus d'adultes d'*A. foliaceus* sur une période plus importante serait intéressante et permettrait de conclure sur le régime alimentaire du stade adulte. Mais à cause des difficultés à obtenir ces stades il n'a pas été possible de réaliser cette étude.

4.4.4. Infection naturelle

Les truites arc-en-ciel prélevées étaient infectées par une grande variété de stades d'*A. foliaceus* qui ont été retirés, avant le prélèvement des échantillons. Ils ont servi à une autre étude sur la dynamique des populations d'*A. foliaceus* dans les pêcheries du sud de l'Angleterre. De ce fait, il a été impossible de relier les

lésions à un stade ou à un appendice précis des *A. foliaceus*. Cependant, vu la taille des lésions observées il semble raisonnable de dire que celles-ci résultent de l'action de stades adultes d'*A. foliaceus* mais aucune conclusion définitive ne peut être apportée sur ce point.

Il est intéressant de noter que ces lésions sont plus chroniques que celle observées dans l'expérimentation sur les adultes. En effet, les lésions induites par *A. foliaceus* sont très profondes, jusqu'à l'hypoderme, ulcéraives et hémorragiques.

4.4.5. Comparaison avec les résultats d'études précédentes sur d'autres espèces d'hôte et de parasites

Stammer (1959) s'appuie sur des réactions chimiques positives de caractérisation de l'hème de l'hémoglobine sur des broyats de stades adultes d'*A. foliaceus* pour en déduire qu'*A. foliaceus* est un hématophage. En effet, les Crustacés utilisent de l'hémocyanine et non de l'hémoglobine pour le transport et leurs échanges gazeux, une réaction positive signifie qu'*A. foliaceus* a ingéré des érythrocytes de son hôte. Il est aussi remarquable lorsqu'on observe *A. foliaceus* sur son hôte de constater une coloration orangée de son tractus digestif à travers sa cuticule. Le régime hématophage d'*A. foliaceus* est depuis une théorie largement admise. Cependant, ce n'est pas parce que les réactions de caractérisation de l'hémoglobine sont positives qu'*A. foliaceus* se nourrit exclusivement de sang. S'il est histophage et en se nourrissant des tissus cutanés et sous-cutanés de son hôte, il ingère en partie aussi des érythrocytes.

Cette théorie infère sûrement d'une comparaison excessive entre le stylet d'*A. foliaceus* et les appendices buccaux des Arthropodes terrestres exclusivement hématophages comme les moustiques ou les tiques. Cependant, les études histologiques et anatomiques en MEB de l'appareil buccal semblent contredire cette théorie. Comme le décrivent Martin (1932), Bower-shore (1940), Shimura (1984) et Swanepoel et Avenant-Oldewage (1992), le stylet semble bien être utilisé pour sécréter des enzymes prédigestives, et non comme une trompe. De plus, le stylet et l'orifice buccal d'*A. foliaceus* sont deux organes bien distincts anatomiquement et

fonctionnellement, contrairement aux appareils buccaux des Arthropodes terrestres piqueurs ou suceurs.

Becker (1942) a décrit le même processus de formation des lésions sur la carpe miroir que celui de cette étude. Cependant les lésions diffèrent légèrement du fait de la présence d'écaillés sur les truites arc-en-ciel. Celles-ci offrent une bonne protection à court terme vis-à-vis des stades pré-adultes et adultes d'*A. foliaceus*, cependant une fois enlevées cela entraîne des ulcérations plus profondes.

Une étude histologique de lésions associées aux stades pré-adultes et adultes de *Lepeophtheirus salmonis*, sur le saumon atlantique, *Salmo salar* L., présente les mêmes caractéristiques (Jónsdóttir, Bron, Wotten, Turnbull, 1992). *Lepeophtheirus salmonis*, ou « pou du saumon », est un copépode ectoparasite d'eau de mer des saumons et truites de mer. *Lepeophtheirus salmonis* se nourrit du mucus, des débris cellulaires ainsi que du sang de son hôte (Jónsdóttir *et al.*, 1992). Dans l'étude les lésions décrites sont un œdème épidermique de temps en temps associé à un décollement de celui-ci. Les cellules de la lame basale sont rondes, mal définies avec un noyau élargi d'aspect granuleux. En avant du parasite il y a systématiquement une inflammation cellulaire caractérisée par une infiltration dermique de neutrophiles. Dans l'étude, il a été montré que *L. salmonis* place le bord antérieur de sa carapace sous les écaillés de son hôte. Les lésions peuvent être d'importance non négligeable. Cependant, après six jours d'infestation, il a été relevé des lésions de faible importance qui selon les auteurs augmentent avec le temps. Elles sont alors associées avec des hémorragies et pertes d'écaillés. Lorsqu'il se nourrit, *L. salmonis* ne cause pas systématiquement des lésions importantes. Par contre dans des conditions d'élevage intensif, les parasites se concentrent et la pression d'infestation est telle que l'on retrouve des lésions d'ulcération dermique sévères. Elles entraînent sur une grande surface de la peau une perte substantielle de peau pouvant atteindre le crâne sur le dessus de la tête (Ferguson, 1989).

A la différence d'*Argulus*, *Lepeophtheirus salmonis* ne possède pas de stylet. Ce qui explique l'absence des lésions associées de dégénérescences hydropiques des cellules basales de l'épiderme et une réaction inflammatoire cellulaire beaucoup moins importante. De plus *L. salmonis* ne possède pas de ventouse propre mais

utilise sa carapace comme ventouse. Les lésions d'attachement sont de ce fait plus importantes mais restent inférieures à celles provoqué par sa nutrition (Jónsdóttir *et al.*, 1992).

4.5. INFECTION SECONDAIRE

Sur les échantillons prélevés nous n'avons décelé aucune infection bactérienne ni fongique. On a cependant mis en évidence la présence d'un agent pathogène possible, *Epistylis sp.*. Ce n'est pas un pathogène de grande importance mais plutôt un saprophyte. Cependant il n'est pas rare de trouver *Aeromonas hydrophila* attachée sur *Epistylis sp.* (Cusack et Cone, 1986). *Epistylis sp.* a été rencontré sur 2% des *Argulus* provenant du Loch Lomond examinés en MEB.

Pour Vanheerden et Oldewage (1988), les causes de mortalité des sujets infestés par *A. foliaceus* seraient dues aux conséquences des infections secondaires. Shimura *et al.* (1983b) a montré que le niveau d'infection (prévalence et incidence) par *Aeromonas salmonicida* augmentait de manière significative lors de la présence d'*A. coregoni*. Ahne (1985) a montré qu'*A. foliaceus* était un vecteur passif de la virémie printanière de la carpe. Cependant, ces deux agents pathogènes sont des pathogènes infectieux importants et suffisants à eux seuls pour entraîner la mort. Des études réalisées dans des conditions de qualité d'eau plus faible contenant des pathogènes secondaires ou ubiquistes tel que *Aeromonas hydrophila* ou avec des *Argulus* infectés seraient intéressantes pour comparer le pouvoir pathogène intrinsèque d'*A. foliaceus*.

CONCLUSION

Les stades pré-adultes et adultes induisent des ulcères jusqu'à l'hypoderme en peu de temps (4 jours maximum) indépendamment de la présence d'écaille à la surface de la peau. Les lésions histologiques sont profondes et touchent à l'intégrité de la peau du poisson et de ses fonctions de barrière osmotique.

De plus, le marquage à la fluorescéine semble montrer que le nombre de lésions engendrées par chaque individu semble varier en fonction des stades de développement. Il est maximal aux stades pré-adulte. Il est donc certain qu'une infestation massive de ces stades entraînera plus de lésions sur une surface plus importante du tégument.

Enfin, d'après les interprétations des observations en MEB et histologiques, le régime alimentaire d'*A. foliaceus* doit être considéré comme non exclusivement hématophage mais plutôt comme histophage. Cependant il faudrait faire des études plus poussées sur des lésions chroniques des différents stades avant de trancher définitivement sur l'importance relative de ces deux modes d'alimentation.

De cette étude, on conclura que le mode de nutrition d'*A. foliaceus* est plus invasif que son mode de fixation, et suffisant pour engendrer un déséquilibre osmotique conduisant à la mort de l'hôte.

La mise en évidence d'ulcères du tégument peut aussi être mise en évidence par la fluorescéine, ces lésions peuvent avoir une origine très différente. La technique de

fluorescéine utilisée sur l'ensemble du corps des poissons semble une technique prometteuse et peut être utilisée pour de nouvelles applications.

ANNEXES

COLORATION DE GRAM.

1. XYLENE (Déparaffiner) **5 min**
2. 100% ETHANOL **2 min**
3. ALCOOL METHYLIQUE **1 min**
4. RINCER SOUS L'EAU COURANTE
5. REMPLIR LA LAME AVEC DU CRISTAL VIOLET
A L'OXALATE D'AMMONIUM **2-3 min**
6. LAVER LE CRISTAL VIOLET AVEC L'IODE DE GRAM
(continuer tant que les précipitats métalliques ne sont pas éliminés)
PUIS REMPLIR LA LAME AVEC L'IODE DE GRAM **2-3 min**
7. RINCER A L'EAU COURANTE ET DIFFERENCIER
A L'ACETONE (la section doit apparaître peu colorée),
RINCER IMMEDIATEMENT SOUS L'EAU COURANTE
8. CONTRE COLORER AU ROUGE NEUTRE A 1% **1 min**
9. RINCER SOUS L'EAU COURANTE
10. ABSORBE DELICATEMENT L'EAU RESUDUELLE
AVEC UN PAPIER FILTRE
11. DESHYDRAER ET DIFFERENCIER RAPIDEMENT
AVEC DE L'ETHANOL ABSOLUS
12. XYLENE (Nettoyage) **5 min**
13. XYLENE (Nettoyage), MONTER UNE LAMELLE AVEC DU PERTX[®]

~ RESULTATS

BACTERIE GRAM POSITIVE: BLEUE/VIOLET
BACTERIE GRAM NEGATIVE: ROSE/ROUGE

COLORATION EN HEMATOXYLINE ET EOSINE

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. XYLENE (déparaffiner1) | 3 min |
| 2. XYLENE (déparaffiner2) | 2 min |
| 3. ETHANOL ABSOLUS | 2 min |
| 4. ALCOOL METHYLIQUE | 1 min |
| 5. Rincer sous l'eau courante | 30 sec-1 min |
| 6. HAEMATOXYLINE DE MAYER | 5 min |
| 7. RINCER SOUS L'EAU COURANTE | 30 sec-1 min |
| 8. ALCOOL CHLORIDRIQUE 1% | tremper rapidement 3 fois |
| 9. RINCER SOUS L'EAU COURANTE | 30 sec-1 min |
| 10.EAU SUBSTITUE DE SCOTTS | 1 min |
| 11.RINCER A L'EAU COURANTE | 30 sec-1 min |
| 12.8 PARTS 1%EOSIN (AQ) TO 1 PART PUTT'S EOSIN | 5 min |
| 13.RINCER A L'EAU COURANTE | 30 sec- 1 min |
| 14.ALCOOL METHYLE | 1 min |
| 15.ETHANOL ABSOLU | 2 min |
| 16.ETHANOL ABSOLU | 1 min |
| 17.XYLENE (Nettoyage) | 5 min |
| 18.XYLENE (Nettoyage), MONTER UNE LAMELLE AVEC DU PERTX® | |

BIBLIOGRAPHIE

1. AHNE W. : *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). J. Fish Dis., 1985, **8**. 241-242.
2. BARK S. : *Argulus*. Fish farmer , 2000. 40.
3. BAZAL K., LUCKÝ Z. et DYK Y. : 1969. Localization of fish-lice and leeches on carps during the autumn fishing. Acta veterinaria, **38**. 533-544.
4. BECKER J. : Die Abwehreinrichtungen von Haut und Kieme beim Karpfen gegenüber mechanischen, chemischen und parasitären Reizen. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. Hydrogr., 1942, **41**. 265-344.
5. BOWER-SHORE C. : An investigation of the common fish louse, *Argulus foliaceus* (Linn.). Parasitology, 1940, **32**. 361-371.
6. BUCKLEY B.R. et MORRICE C.P. : Some observations on host selectivity et preferred location of *Argulus foliaceus* L. on four fish species. Fish. Mgmt., 1976, **7** (2). 34-37.
7. BOXSAHLL G.A. : The host specificity of *Lepeophtheirus pectoralis* (Muller, 1776) (Copepoda : Caligidae). J. Fish Biol., 1976, **8**. 225-264.
8. CLARK F.N., 1902. *Argulus foliaceus*. A contribution to the Life History. *Proceedings of the South London Entomological and Natural History Society*, 12-21.
9. CUSACK R. AND CONE D.K. : A review of parasites as vectors of viral and bacterial diseases of fish. J. Fish Dis., 1986, **9**, 109-111.
10. FERGUSON H.W. : Skin. In : Systemic Pathology of Fish. 1st ed. - Iowa, Iowa State University Press, 1989, 41-63.
11. HINDLE, W. : Notes on the treatment of fish infected by *Aurgulus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1950, **119**. 79-81.
12. HOFFMAN G.L.,. Parasitic diseases of laboratory fishes and their control. *J. Fish Dis.*, 1962, **3**. 348-352.
13. JÓNSDÓTTIR H. ; BRON J.E. ; WOTTEN R. et TURNBULL J.F. : The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. J. Fish Dis., 1992, **15**. 521-527.
14. KABATA Z. : 1970. Diseases of fishes : Crustacea as enemies of fishes. 1st ed- Jersey city. F. Stanislas, Snieszko and Herbert R. Axelrod, 1970-171p.
15. LAMARRE E. et COCHRAN P.A. : Lack of host species selection by the exotic parasitic crustacean, *Argulus japonicus*. J. Freshwat. Ecol., 1992, **7**. 77-80.
16. MARTIN M. F. : The morphology and classification of *Argulus* (Crustacea). *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 1932, 771-806.
17. MENEZES J., RAMOS M.A, PEIRERA T.G. AND MOREIRA DA SILVA A., 1990. Rainbow trout culture failure in a small lake as a result of massive parasitosis related to careless fish introductions. *Aquaculture*, **89**, 123-126.
18. MIKHEEV V.N. ; VALTONEN E.T. et RINTAMÄKI-KINNUNEN P. : Host searching in *Argulus foliaceus* L. (Crustacea : Branchiura) : the role of vision and selectivity. *Parasitology*, 1998, **116**. 425-430.

19. MIKHEEV V.N. ; MIKHEEV A.V. ; PASTERNAK A.F. et VALTONEN E.T. : Light-mediated host searching strategies in a fish ectoparasite, *Argulus foliaceus* L. (Crustacea: Branchiura). *Parasitology*, 2000, **120** (4). 409-416.
20. MIKHEEV V.N. ; PASTERNAK A.F. ; VALTONEN E.T. et LANKINEN, Y. : Spatial distribution and hatching of overwintered eggs of a fish ectoparasite, *Argulus coregoni* (Crustacea: Branchiura). *Dis. Aquat. Org.*, 2001, **46** (2). 123-128.
21. MOLNAR K. et SZEKELY C. : Occurrence of *Skrjabillanid* nematodes in fishes of Hungary and in the intermediate host, *Argulus foliaceus* L. *Acta veterinaria Hungarica*, 1998, **46** (4). 451-63.
22. MORAVEC F. ; VIDAL-MARTINEZ V. et AGUIRRE-MACEDO L. : Branchiurids (*ARGULUS*) as intermediate hosts of the Daniconematid nematode mexiconema *Cichlasomae*. *Folia Parasitologica*, 1999, **46**. 79.
23. NOGA E.J. et UDOMKUSONSRI P. : A rapid, sensitive, nonlethal method for detecting skin ulceration in fish. *Vet. Pathol.*, 2002, **39**. 726-731.
24. NORTHCOTT S.J. et CAMPBELL A.D. : Lousy trout. *Atlantic Salmon Trust Progress Report*, 1995, juin, 24-25.
25. NORTHCOTT S.J. ; LYNDON A.R. et CAMPBELL A.D. : An outbreak of freshwater fish lice, *Argulus foliaceus* L., seriously affecting a Scottish stillwater fisherie. *Fisheries Management and Ecology*, 1997, **4** (1). 73-75.
26. PASTERNAK A.F. ; MIKHEEV V.N. et VALTONEN E.T. : Life history characteristics of *Argulus foliaceus* L. (Crustacea: Branchiura) populations in Central Finlet. *Ann. Zool. Fennici*, 2000, **37** (1). 25-35.
27. PFEIL-PUTZIEN C. : Experimental transmission of spring viraemia of carp through carp lice (*Argulus foliaceus*). *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 1978, **25**, 319-323.
28. POULIN R. et FITZGERALD G. : A possible explanation for the aggregated distribution of *Argulus canadensis* Wilson, 1916 (Crustacea: Branchiura) on juvenile sticklebacks (Gasterosteidae). *Journal of Parasitology*, 1989, **75**. 58-60.
29. RAHMAN M. : Some aspects of the biology of the freshwater fish parasite *Argulus foliaceus* (L.) (Argulidae, Branchiura, Crustacea). *Bangladesh J. Zool.*, 1995, **23**, 77-86.
30. RAHMAN M. : Effects of a freshwater parasite, *Argulus foliaceus* Linn. infection on common carp, *Cyprinus carpio* Linn.. *Bangladesh J. Zool.*, 1996, **24** (1). 57-63.
31. RANZANI-PAIVA M.J.T. ; ISHIKAWA C.M. ; PORTELLA M.C. et CELIBERTO R.J. : Hematology of the carp *Cyprinus carpio*, infested by *Argulus sp* and after been treated with Fosfonato de 0,0-Dimetil-Oxi-2,2,2-Tricloroetilo (Nevuvon). *Boletim do Instituto de Pesca Sao Paulo*, 1987, **14**. 83-92.
32. RANZANI-PAIVA M.J.T. ; VIEIRA A.L. et ISHIKAWA C.M. : Analysis of blood plasma constituents of common carp, *Cyprinus carpio*, infested by *Argulus sp*. *Boletim do Instituto de Pesca Sao Paulo*, 1989, **16** (1). 117-121.
33. ROBERTS R.J. et ELLIS A.E. : The anatomy and physiology of Teleosts. In : ROBERTS (Ronald J.) *Fish pathology*, 3ème ed.. London, WB SAUNDERS, 2001, 12-15.

34. RUSHTON-MELLOR S.K. et BOXSHALL G.A. : The developmental sequence of *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura). *Journal of Natural History*, 1994, **28**. 763-785.
35. SHAFIR A. et OLDEWAGE W.H. : Dynamics of a fish ectoparasite population: Opportunistic parasitism in *Argulus japonicus* (Branchiura). *Crustaceana*, 1992, **62** (1). 50-64.
36. SHAFIR A. et VAN AS J.G. : Laying, development and hatching of eggs of the fish ectoparasite *Argulus japonicus* (Crustacea: Branchiura). *J. Zool. (London)*, 1986, **210** (3), 401-414.
37. SHIMURA S. : Seasonal occurrence, sex ratio and site preference of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea: Branchiura) parasitic on cultured salmonids in Japan. *Parasitology*, 1983a. 537-552.
38. SHIMURA S. : SEM observation on the mouth tube and preoral sting of *Argulus coregoni* Thorell and *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura). *Fish pathol.*, 1983b, **18** (3). 151-156.
39. SHIMURA S. et INOUE K. : Toxic effects of extract from the mouth-parts of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea: Branchiura). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1984, **50** (4). 729.
40. SHIMURA S. ; INOUE K. ; KASAI K. et SAITO M. : Hematological changes of *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) caused by infection of *Argulus coregoni* (Crustacea : Branchiura). *Fish pathol.*, 1983a, **18** (3). 157-162.
41. SHIMURA, S. ; INOUE, K. ; KUDO, M. et EGUSA, S. : Studies on effects of parasitism of *Argulus coregoni* (Crustacea: Branchiura) on furunculosis of *Oncorhynchus masou* (Salmonidae). *Fish pathol.*, 1983b, **18** (1). 37-40.
42. SINGHAL R.N. ; JEET S. et DAVIES R.W. : The effects of argulosis-saprolegniasis on the growth and production of *Cyprinus carpio*. *Hydrobiologia* , 1990, **202** (1-2). 27-31.
43. STAMMER J. : Beitrage zur Morphologie, biologie und Bekampfung der Karpfenlaus. *Z. f. Parasitenk.* 1959, **19**, 135-208.
44. STOSKOPF M,K.:. *Fish Medicine*, 1^{ère} ed. - Philadelphia. 1993, 307-308.
45. SWANEPOEL J.H. et AVENANT-OLDEWAGE A. : Comments on the morphology of the pre-oral spine in *Argulus* (Crustacea, Branchiura). *Journal of Morphology*, 1992, **212**. 155-162.
46. TAVARES-DIAS M. ; MARTINS M.L. et DO NASCIMENTO KRONKA S. :. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus sp.* (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1999, **16** (2). 553-555.
47. TUCKER C.S. ; SOMMERVILLE C. ;WOOTTEN R. : Does size really matter ? Effects of fish surface area on the settlement and initial survival of *Lepeophtheirus salmonis*, an ectoparasite of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, 20002, **49**. 145-152.

48. UBELS J.L. et EDELHAUSER H.F. : Healing of corneal epithelial wounds in marine and freshwater fish. *Curr. Eye Res.*, 1982-83, **2** (9). 613-619.
49. VAN HEERDEN P.W. et OLDEWAGE W.H. : Damage to fish skin epithelium by the ectoparasite *Argulus japonicus* Thiele, 1900. *South African Journal of Science*, 1988, **84**, 139-140.

BIBLIOGRAPHIE COMPLEMENTAIRE

1. DAWSON L.H.J. ; PIKE A.W. ; HOULIHAN D.F. et MC VICAR A. : Changes in physiological parameters and feeding behaviour of Atlantic salmon *Salmo salar* infected with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. Dis. Aquat. Org., 1999, **35**. 89-99.
2. GALAROWITCZ T. et COCHRAN P.A. : Response by the parasitic crustacean *Argulus japonicus* to host chemical cues. Journal of Freshwater Ecology, 1991, **6**.455-456.
3. GAULT N.F.S. ; KILPATRICK D.J. et STEWART M.T. : Biological control of the fish louse in rainbow trout fishery. Journal of Fish Biology, 2002, **60**. 226-237.
4. FAST M.D. ; SIMS D.E. ; BURKA J.F. ; MUSTAFA A. et ROSS N.W. : Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2002, **132**. 645-657.
5. PICKERING A.D. : Factors influencing the structure, function and biota of the salmonid epidermis. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 1980, **79B**. 93-104.
6. RUANE N. ; MC CARTHY T.K. et REILLY P. : Antibody response to crustacean ectoparasite in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), immunized with *Argulus foliaceus* L. antigen extract. J. Fish Dis., 1995, **18**.529-537.
7. RUANE N.M. ; NOLAN D.T. ; ROTLANT J. ; TORT L. ; BALM P.H.M. et WENDELAAR BONGA S. E. : Modulation of the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to confinement, by an ectoparasite (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. Fish Physiology and Biochemistry, 1999, **20**. 43-51.
8. RUSHTON-MELLOR S.K. et WHITFIELD P.J. : Transmission and scanning electron microscopy studies of crustacean shell disease in fish lice of the genus *Argulus* (Crustacen : Branchiura). J. Zool. Lond., 1993, **229**.397-404
9. WOO P.T.K. : Immunological response of fish to parasitic organisms. Annual Revue of Fish Diseases, 1992. 339-366.
10. SHAFIR A. et VAN AS J.G. : The opportunistic nature of *Argulus japonicus* in maintaining host-parasite relationships. South African Journal of Science, 1985, **81**. 638.

PATHOLOGIE D'ARGULUS FOLIACEUS LINNE CHEZ ONCORHYNCHUS MYKISS WALBAUM.

RESUME

Argulus foliaceus est un ectoparasite obligatoire de nombreuses espèces de poissons d'eau douce. Bien qu'étudiés depuis de nombreuses décennies, la pathogénie et le mode de nutrition des différents stades de développement restent à définir.

Une étude a donc été menée afin de déterminer les différentes causes de son pouvoir pathogène, ainsi que leur importance relative aux différents stades de développement du parasite. Elle combine des techniques histologiques, une analyse en Microscope Electronique à Balayage, ainsi qu'une nouvelle technique de visualisation des lésions cutanées sous fluorescéine.

Cette étude montre que :

- la technique de fluorescéine présente un intérêt indéniable pour de futures applications.
- *Argulus foliaceus* possède un pouvoir pathogène propre important, et peut devenir létal pour son hôte.
- *Argulus foliaceus* est histophage, ce qui représente une apparente contradiction vis-à-vis des théories communément acceptées.

Mots clés : *Argulus foliaceus*, Brianchiura, Crustacé, truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, pathologie, fluorescéine, histologie, microscopie électronique à balayage.

SUMMERY

Argulus foliaceus is an obligate ecto-parasite infecting many freshwater fish species. Although known and studied for a long time, the relative pathogenicity of its diverse feeding behaviour and of its diverse developmental stages are still to be definitively assessed.

Therefore, an experiment was conducted, combining histological examination, SEM analysis and trials of damage visualisation using Fluorecein in order to assess the relative importance of the different components of its harmful potential and that at different stages of the parasite development stages.

This study shows that :

- Fluorescein technique possesses the potential interest to be further applied.
- *Argulus foliaceus*' own pathogenic potential was high, enough to be lethal to its host.
- *Argulus foliaceus* has been shown to histophage, a result in apparent contradiction with commonly accepted theories.

JURY

Président : **Monsieur RICHET,**

Professeur à la faculté de Médecine de Nantes.

Rapporteur : **Monsieur BLANC,**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Assesseur : **Madame WYERS,**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Adresse de l'auteur

Mas des vignes, chemin du grand puits

13770 Venelles