HAL
open science

Effet de la température sur les interactions hôte/pathogène : Un cas concret original appliqué à l'omble chevalier (Salvelinus alpinus L.) et la bactérie Aeromonas salmonicida responsable de la furonculose Resp: Stéphan Jacquet (INRAE CARRTEL)

Etienne Richy

To cite this version:

Etienne Richy. Effet de la température sur les interactions hôte/pathogène : Un cas concret original appliqué à l'omble chevalier (Salvelinus alpinus L.) et la bactérie Aeromonas salmonicida responsable de la furonculose Resp: Stéphan Jacquet (INRAE CARRTEL). Sciences de l'environnement. 2017. hal-02916798

HAL Id: hal-02916798

https://hal.inrae.fr/hal-02916798

Submitted on 18 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Paris, France

Thèse de Master

Année 2016-2017

Mention Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie
Spécialité Océanographie et Environnements Marins

Effet de la température sur les interactions hôte/pathogène :

Un cas concret original appliqué à l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus L.)* et la bactérie *Aeromonas salmonicida* responsable de la furonculose

Etienne RICHY

Stage réalisé sous la responsabilité scientifique de

Stéphan JACQUET & Emilien LASNE

Centre Alpin de Recherches sur les Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques

(INRA, Thonon-les-Bains)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement mes encadrants, Stéphan Jacquet et Emilien Lasne, pour la qualité de leurs conseils, écoutes et soutiens tout au long de ce stage.

Je tiens à remercier tout particulièrement Louis Jacas et Cécile Chardon pour m'avoir transmis leurs connaissances en biologie moléculaire, et pour leurs conseils avisés.

Je tiens également à remercier Laurent Espinat dont les talents de pisciculteur ont été très précieux pour les échantillonnages et la faisabilité de l'expérience portant sur les œufs.

Mes remerciements s'adressent plus largement à tous les personnels du CARRTEL, dont la direction d'unité, pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer un stage particulièrement enrichissant tant du point de vue humain que professionnel.

Je remercie les personnels de VET'EAU, Alain Le Breton, la responsable de laboratoire Mariana Lagrange, mais aussi Robin Carpentier pour leurs réactivités, leurs connaissances et leur aide. Pour les mêmes raisons, je remercie les personnels du LDA39, Françoise Pozet la responsable du secteur Santé Animale, Alain Viry et Camille Marle.

Jean-François Bernardet et Christian Michel, membres de l'équipe Virologie et Immunologie Moléculaires au centre de recherche INRA de Jouy-en-Josas, sont également remerciés pour nous avoir transmis leurs souches bactériennes, contribuant ainsi également, à la bonne réalisation de cette étude.

Je remercie Alain Nierga et Jean-Marc Guarini, responsable administratif et directeur du master OEM, pour m'avoir épaulé administrativement et m'avoir recommandé Stéphan Jacquet.

Enfin je tiens à remercier les châtelains et particulièrement Sinziana Rivera, Mathieu Ramon, Laura Crepin, Alice Riti, pour l'ambiance de tous les jours. Sans eux, ce stage n'aurait jamais été aussi complet.

Sommaire

Liste des Figures et Tableaux 4

Liste des symboles 5

I. Introduction 1

II. Matériels et méthodes 5

II.1 Isolement de la bactérie 5

II.2 Caractérisation bactérienne 9

II.3 Effet de la température sur l'occurrence et la virulence d'*A. salmonicida* sur les œufs d'omble chevalier 12

II.4 Analyses statistiques 16

III. Résultats 17

III.1 Culture bactérienne 17

III.2 Identification bactérienne 17

III.3 Effet de la température sur l'occurrence et la virulence d'*A. salmonicida* sur les œufs d'omble chevalier 21

IV. Discussion 25

V. Conclusions et perspectives 29

Références bibliographiques 31

Annexes 35

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 Résumé des différentes étapes d'isolement de la bactérie pathogène *A. salmonicida* 8

Figure 2 Résumé des différentes méthodes utilisées pour identifier et caractériser *A. salmonicida* 12

Figure 3 Taux de survie des œufs 23

Figure 4 Pourcentage des œufs et alevins infectés 24

Figure 5 Pourcentage d'œufs infectés à t0 pour les différents traitements 24

Figure 6 Pourcentage des œufs et des alevins infectés 25

Tableau I Caractéristiques des échantillons clonés-séquencés 10

Tableau II Détection d'*A. salmonicida* dans les tissus du poisson n°1 18

Tableau III Identification d'*A. salmonicida* par différentes méthodes 19

Tableau IV Résultats de l'optimisation des 5 couples d'amorces 20

Tableau V Analyse du modèle le plus parcimonieux 22

Tableau VI Résultat du Modèle Linéaire Généralisé à effets Mixtes (GLMM) 22

Liste des symboles

Symbole/ sigle	Description	Première apparition	Valeur (si pertinent)	Unité (S.I.)
INRA	Institut National de Recherche Agronomique	p.2		
°C	Degré Celsius	p.2		
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique	p.6		
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation	p.8		
TOF	Time-of-flight mass spectrometry	p.8		
CHCA	Acide α-Cyano-4-hydroxycinnamique	p.8		
DHB	Acide 2,3-dihydroxybenzoïque	p.8		
UV	Ultraviolet	p.8		nm
PCR	Polymerase Chain Reaction	p.9		
ADN	Acide désoxyribonucléique	p.9		
+	Présence de la bactérie	p.9		
$cell.mL^{-1}$	Nombre de cellules par millilitre	p.12		$cell.mL^{-1}$
P0	Traitement témoin: solution mère filtrée à deux reprises à 0,2 µm sur Steritop, ne contenant pas de bactérie, uniquement du milieu nutritif liquide furunculosis	p.12		
P1	Traitement intermédiaire: traitement composé de milieux nutritifs liquides furunculosis avec une concentration bactérienne égale $7x10^7$ $cell.mL^{-1}$	p.12		
P2	Traitement fortement concentré: traitement composé de milieu nutritif liquide furunculosis avec une concentration bactérienne environ égale $5x10^8$ $cell.mL^{-1}$	p.12		
°J	Âge des œufs est estimé en °J correspondant à la somme des températures journalières sur toute la durée d'incubation	p.13		
GLMM	Modèle Linéaire Généralisé à effets Mixtes	p.15		
AIC	Critère d'Information Akaike	p.15		
p	*p*-value = probabilité d'obtenir la même valeur (ou une valeur encore plus extrême) du test si l'hypothèse nulle était vraie	p.15		
H0	Hypothèse nulle	p.15		
-	Absence de la bactérie	p.17		
pb	Paire de bases : appariement de deux bases nucléiques situées sur deux brins complémentaires d'ADN	p.19		
*	Degré de significativité : plus le nombre de * augmente plus le degré significativité est élevé (0,01<*<0,05 et 0,001<**<0,01)	p.20		
N	Nombre d'échantillons	p.20		
PP	Potentiel pathogène	p.28		
I	Quantité de bactéries présentes dans l'inoculum infectieux	p.28		$cell.mL^{-1}$
M	Mortalité	p.28		%
Fs	Fraction d'œufs/larves devenant symptomatiques	p.28		%

I. Introduction

L'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) est un poisson sténotherme d'eau froide appartenant à la famille des salmonidés. Possédant une distribution boréale circumpolaire, il est commun dans les régions arctiques et subarctiques d'Amérique du Nord et de l'Europe (Klemetsen *et al.*, 2003). La France représente sa limite extrême méridionale en Europe, et on le trouve principalement dans les grands lacs péri-alpins froids et bien oxygénés comme le Léman ou le Bourget, où il est autochtone (Gerdeaux, 2011). Les autres populations des 130 lacs de moyenne montagne français ont été introduites (et sont d'origines lémanique, autrichienne ou scandinave). C'est un poisson relativement rare (du point de vue de sa distribution et sur les étalages), ce qui lui confère une forte valeur patrimoniale à l'échelle régionale. Possédant une forte valeur marchande, il est exploité par la pêcherie professionnelle depuis de nombreuses années. Au-delà de ces aspects (économique et patrimonial), une forte valeur scientifique est également accordée à l'omble chevalier. En effet, associé au fait que ce poisson est l'un des vertébrés les plus polymorphes connus (Klemetsen, 2013), de nombreux chercheurs se servent de cette espèce comme modèle afin de mieux comprendre, par exemple, les mécanismes de spéciation ou de mise en place et de maintien de la biodiversité.

Suite à une forte eutrophisation du Léman à la fin du XXème siècle, un très faible effectif d'omble chevalier a été observé à la fin des années 1980 (Caudron *et al.*, 2014). Pour pallier à ce déclin, un effort de repeuplement important a donc été entrepris, permettant à la population d'omble de s'accroitre jusqu'à la fin des années 1990 (Caudron *et al.*, 2014). La quantité de poissons pêchés par an a alors été multipliée par 10, passant d'environ 10 à 100 tonnes, pêcheurs professionnels et amateurs confondus. Cependant, cette tendance s'est inversée depuis le début des années 2000, engendrant un effondrement des captures, et ce en dépit de l'effort de repeuplement maintenu, voire accru (Caudron et *al.*, 2014). *S. alpinus* étant une espèce évoluant dans des eaux froides, le changement climatique est une des hypothèses avancées pour expliquer une part du déclin enregistré au cours de ces 15 dernières années (Gerdeaux, 2011 ; Mari *et al*., 2016). L'augmentation de la température des eaux est en effet un facteur pouvant impacter directement la population de *Salvelinus alpinus* (Winfield *et al.*, 2008) en affectant la physiologie des individus, notamment lors de la reproduction ou pendant l'incubation des embryons. De plus, elle peut également moduler et

amplifier l'effet d'autres facteurs environnementaux dont les effets peuvent être faibles, voire anodins, dans un état thermiquement normal non stressant (Jones *et al.*, 2008). C'est le cas par exemple pour l'impact des sédiments qui, avec le réchauffement des eaux, semble avoir un effet négatif accru sur le développement des œufs en limitant l'accès à l'oxygène de ces derniers (Mari *et al.*, 2016). Ainsi, même si les effets directs du changement climatique commencent à être appréhendés, il n'en est pas de même pour les effets indirects et synergiques, car ceux-ci sont beaucoup plus complexes à mettre en évidence.

Plusieurs études ont montré que le réchauffement des eaux peut augmenter l'occurrence et la virulence de pathogènes sur les populations de poissons (Alborali, 2006 ; Karvonen *et al.*, 2010 ; Marcogliese, 2008 ; Marcos-López *et al.*, 2010 ; Mohanty *et al.*, 2010 ; Tam *et al.*, 2011 dans Hidalgo et Figueras, 2012). En effet, la température va influencer directement le métabolisme des ectothermes (e.g. la plupart des organismes aquatiques), leurs développements et leurs taux de croissance, leurs besoins en énergie nécessaire à la synthèse et à l'activité corporelle, et enfin leurs physiologies et leur âge à maturité sexuelle (Zuo *et al.*, 2012 dans Mari *et al.*, 2016). Ainsi, l'augmentation des températures peut engendrer un stress thermique rendant les individus plus vulnérables aux infections par des agents pathogènes (Alborali, 2006 ; Marc *et al.*, 2010 ; Marc *et al.*, 2010 dans Hidalgo et Figueras, 2012). À cela s'ajoute le fait que la plupart des bactéries se multiplient et se développent beaucoup plus rapidement lorsque les températures sont plus élevées (Marcos-López *et al.*, 2010). Comme la température est un facteur clé de l'expression du gène de la virulence chez les bactéries (Guijarro *et al.*, 2015) son augmentation pourrait à la fois augmenter la virulence des agents pathogènes (Marcogliese, 2008), prolonger également la saison de transmission (Karvonen *et al.*, 2010) et entrainer l'émergence de nouvelles souches pathogènes (Karvonen *et al.*, 2010; Marcos-López *et al.*, 2010).

Récemment, il a été constaté, sur un certain nombre de poissons élevés en bassin dans la pisciculture INRA de Thonon-les-Bains, des ombles chevaliers présentant des symptômes de furonculose. Il s'agit d'une maladie causée par la bactérie *Aeromonas salmonicida*, un pathogène important chez les poissons (Kim *et al.*, 2011), touchant différentes familles de poissons dont les salmonidés. Étant davantage prévalente pour des températures comprises entre 12,8°C et 21,1°C en milieu naturel, les épidémies ont donc généralement lieu au printemps et en été dans les piscicultures (Tam *et al.*, 2011). Cette bactérie à gram négatif de

la famille des Aeromonadacea, non mobile et pigmentée, possède un optimum de croissance compris entre 22 et 25°C (Hidalgo et Figueras, 2012). Sa distribution est mondiale, et peut ainsi se rencontrer aussi bien en eaux douces, qu'en milieu marin (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2016). Sa première description date de 1894 par Emmerich and Weibel, après avoir observé des furoncles ou des ulcères sur la peau de truites. Depuis, la furonculose est devenue une maladie parmi les plus importantes connues en aquaculture (Hidalgo et Figueras, 2012). Aujourd'hui, la furonculose a été répertoriée partout, en Écosse, en France, en Norvège, en Islande, en Espagne, aux États-Unis, au Canada, au Japon, au Chili et en Australie (Hidalgo et Figueras, 2012). Elle touche principalement des salmonidés, mais d'autres poissons comme les cyprinidés, les sparidés, les soleidés, les scophthalmidés ou encore les Gadidés, peuvent également être infectés (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2016, Fernandez-Alvarez *et al.*, 2016). L'impact économique est particulièrement important, car ce pathogène peut engendrer de fortes mortalités sur les poissons élevés en pisciculture (Trust *et al.*, 1980; Fryer *et al*., 1988; Johnsen and Jensen, 1994; Mooney *et al.*, 1995; Nomura *et al.*, 2002 dans Kim *et al.*, 2011). Une fois implantée dans l'animal, *A. salmonicida* peut provoquer de graves septicémies et un fort taux de mortalité. Ceci va dépendre à la fois de la qualité de l'eau, des paramètres environnementaux, de l'âge et des défenses immunitaires de l'individu. Généralement, les premiers signes d'infection sont le manque d'appétit, la faible activité physique, la léthargie ou encore l'hyperpigmentation cutanée. Associé à cela, la présence de furoncles ou d'ulcères, l'exophtalmie, la septicémie, l'anémie, l'ascite et une hémorragie au niveau de diverses parties du corps peuvent également apparaître (Austin *et al.,* 2007, Hiney et Olivier, 1999, Wiklund et Dalsgaard, 1998 dans Hidalgo et Figueras, 2012). Cependant, tous ces symptômes peuvent ne pas être exprimés par les poissons atteints par la furonculose (Noga, 2010).

Pour se prévenir des infections bactériennes, les poissons ont mis aux points diverses stratégies de défense comme la sécrétion de mucus à forte activité antibactérienne, le renouvellement cellulaire, ou encore la production d'acide intestinal et gastrique. En parallèle, les micro-organismes pathogènes ont également développé des mécanismes leur permettant de pénétrer à l'intérieur des individus. Il existe trois voies principales d'infection : la peau, les branchies et le tractus gastro-intestinal (Birkbeck et Ringø, 2004 ; Sakai, 1979 ; Rose *et al.*, 1989 ; Chair *et al.*, 1994 ; *Grisez et al.,* 1996 ; Olsson *et al.*, 1996 ; Romalde *et al.*, 1996 ; Jöborn *et al.*, 1997 ; Robertson *et al.*, 2000 ; Lødemel *et al.*, 2001 dans Ringø *et al.*, 2004). Les individus

porteurs sains d'*A. salmonicida* peuvent transmettre la bactérie horizontalement par contact physique ou par dispersion du pathogène dans la colonne d'eau (Cipriano et Bullock, 2001). Il est toutefois fait mention dans la littérature que le transfert vertical prévaut très fortement sur le transfert horizontal (Cipriano et Bullock, 2001, MacCarthy et Roberts 1980 dans Evelyn *et al.*, 1986). En laboratoire, il a été démontré qu'*A. salmonicida* peut causer des infections intra-ovules (Evelyn *et al.*, 1986 ; Kohara *et al*., 2012). Cependant, en milieu naturel, le transfert horizontal serait limité car il semblerait que le pathogène tue son hôte avant que le nombre de bactéries dans les tissus soit suffisamment important pour assurer l'infection des œufs (Evelyn *et al.*, 1986). L'étude effectuée par Kohara *et al.* (2012) montre, quant à elle, qu'il est possible d'infecter des œufs avec ce pathogène, mais que contrairement à un autre pathogène bactérien, *Flavobacterium psychrophilum*, la quantité de bactéries viables décroit dans l'embryon jusqu'à devenir indétectable au bout d'une dizaine de jours. L'une des hypothèses fréquemment évoquées pour expliquer cela est la présence d'agents antimicrobiens dans l'espace périvitellin et dans la membrane des œufs fertilisés (Kudo, 1983 ; Iwamatsu, 2004 ; Shiina *et al.*, 2002 ; Tateno *et al.*, 1998 dans Kohara *et al.* 2012). Cependant, l'étude de Kohara *et al.* (2012) se déroulait dans des conditions optimales pour le développement de l'œuf, et donc non soumis à un stress. Le potentiel infectieux de la bactérie est en revanche inconnu lorsque le poisson n'est pas en état de stress physiologique. Dans le contexte de changement climatique, il apparait donc pertinent d'évaluer la virulence dans des conditions de températures stressantes. Pour les poissons élevés en captivité et en conditions naturelles, ces connaissances sont essentielles pour prédire le potentiel infectieux d'*A. salmonicida* et la résistance des œufs d'ombles chevalier en fonction de l'augmentation des températures.

L'hypothèse principale de ce travail a donc été de dire que l'augmentation des températures pourrait modifier l'occurrence et la virulence de la bactérie pathogène *A. salmonicida* car, en conditions de températures relativement élevées (i) les œufs seraient plus fragilisés (en état de stress thermique) et (ii) la bactérie se développerait mieux et plus rapidement. Il était donc prédit un taux d'infection plus fort et des effets négatifs plus importants dans des conditions relativement chaudes.

Afin de pouvoir effectuer notre expérience dans des conditions optimales et réalistes, nous avons fait le choix d'utiliser une souche bactérienne isolée localement. Ainsi, la

démarche a été la suivante : dans un premier temps, nous avons (i) déterminé l'existence de bactéries pathogènes dans divers individus d'omble chevalier présentant des signes d'infections, puis nous avons (ii) isolé l'ensemble des bactéries prélevées, pour enfin (iii) détecter et caractériser *A. salmonicida*. Dans un second temps, nous avons (iiii) tenté d'infecter les œufs au moment de la fécondation, pour enfin (iiiii) tester l'effet de la température sur le taux d'infection des œufs et des alevins et leur taux de survie.

II. Matériels et méthodes

II.1 Isolement de la bactérie

Échantillonnage. L'échantillonnage des poissons a été effectué au sein de la pisciculture de l'INRA de Thonon-les-Bains. Il s'agit d'une population captive d'ombles chevaliers dont l'élevage a débuté dans les années 1970, fondée à partir de géniteurs issus du Léman. Cette population est devenue entièrement captive depuis 1995 puisqu'il n'y a pas eu de contribution extérieure depuis lors. Durant la période de reproduction « artificielle » qui a lieu en janvier/février, chaque poisson est contrôlé de façon à estimer son état de maturation. Au cours de ce contrôle, 3 poissons (2 femelles, 1 mâle) ont été diagnostiqués comme étant atteints par la furonculose au début de l'année 2017. En plus de présenter des signes apparents de furonculose (avec toujours un gros furoncle observé sur le flanc des poissons) leur comportement a été décrit comme inhabituel (nage de surface et peu active, peu de réactions aux stimuli et alimentation réduite). Des nécroses au niveau des nageoires caudales et pectorales ont régulièrement été observées. Pour l'un des poissons, une exophtalmie mono-oculaire et des lésions orbitales ont également été constatées. Un quatrième poisson a également été échantillonné au mois de mars. Il s'agissait d'un poisson moribond, mais au contraire des 3 autres, celui-ci ne présentait pas de signe apparent de furonculose.

Pour les trois premiers poissons, les prélèvements ont été effectués à la mort provoquée par surdose anesthésique à l'Eugénol des poissons. La dissection a été faite de manière à éviter la contamination entre organes ou matrices, de l'arrière vers l'avant du poisson, en finissant par le furoncle. À chaque fois, le mucus et le sang ont été prélevés sur place de manière à limiter une contamination extérieure. Le foie, le pue issu du furoncle, la rate, le rein, l'intestin, les branchies, le cœur ainsi que la laitance ou le liquide cœlomique ont

été prélevés dans l'heure, en conditions stériles et protégées, sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Les foies, cœurs et reins ont été broyés à l'aide d'un potter en verre, de façon à obtenir un échantillon le plus homogène possible. Tous les échantillons ont été mis à ensemencer dans un milieu nutritif liquide (furunculosis pour le poisson n°1 et Trypticase Soy Broth pour les poissons n°2 et 3- Voir Annexe 1) et 1 mL de chaque prélèvement liquide a été mélangé avec 30% de glycérol (permettant de congeler les échantillons sans endommager les cellules) puis conservés à -80°C. Pour le poisson n°4, nous avons procédé différemment et avons employé une autre technique d'échantillonnage. Les prélèvements ont été effectués sur place à la pisciculture proche d'un chalumeau pour stériliser l'atmosphère. Le matériel de dissection était stérile et le plan de travail préalablement nettoyé à l'alcool. Des pipettes Pasteur à pointes fermées en verre stérilisées au chalumeau ont été utilisées pour prélever à l'intérieur des organes et étaler directement sur boite de pétri. Le foie, la rate, et le rein ont été échantillonnés. Des échantillons de sang, de mucus et de liquide cœlomique ont également été prélevés juste après la mise à mort, et placés dans des petits bocaux en plastique fermés stériles. Au laboratoire, ces 3 échantillons ont été étalés sur une seule boite (divisée en 3 parties distinctes). Le reste des échantillons a été placé en chambre froide à 4°C (Figure 1).

L'équipe « Infection et Immunité des poissons » du laboratoire INRA de Jouy en Josas ayant préalablement travaillé sur *Aeromonas salmonicida*, cinq souches (considérées comme des contrôles positifs) nous ont été transmis par Jean-François Bernadet fin février 2017. Toutes ces bactéries ont été isolées en France, à partir de salmonidés (truite arc-en-ciel pour quatre d'entre elles et à partir d'une truite fario pour la dernière). Reçues lyophilisées dans des ampoules scellées, elles ont été ensemencées dans du milieu nutritif liquide (Trypticase Soy Broth) à leur arrivée au laboratoire puis, après quelques jours, étalées également sur boite comme précédemment indiqué.

Culture bactérienne. Pour le poisson n°1, après deux jours d'incubation en milieu liquide, un étalement sur boite (sur milieu furonculosis agar) a été effectué. Différentes conditions de température ont été testées : 6°C (i.e. la température proche de celle à laquelle vivent les ombles chevaliers dans la pisciculture), 22°C (i.e. la température de croissance supposée optimale pour *A. salmonicida* d'après la littérature) et 14°C (i.e. une température intermédiaire). Pour chaque prélèvement, des triplicats ont été réalisés. Après 48h

d’incubation, l’isolement a été effectué sur un autre milieu (e.g. du Trypticase Soy Agar) pour les poissons n°2, 3, 4 et pour les bactéries reçues de l’INRA de Jouy en Josas, et placés à incuber à 22°C uniquement (Figure 1).

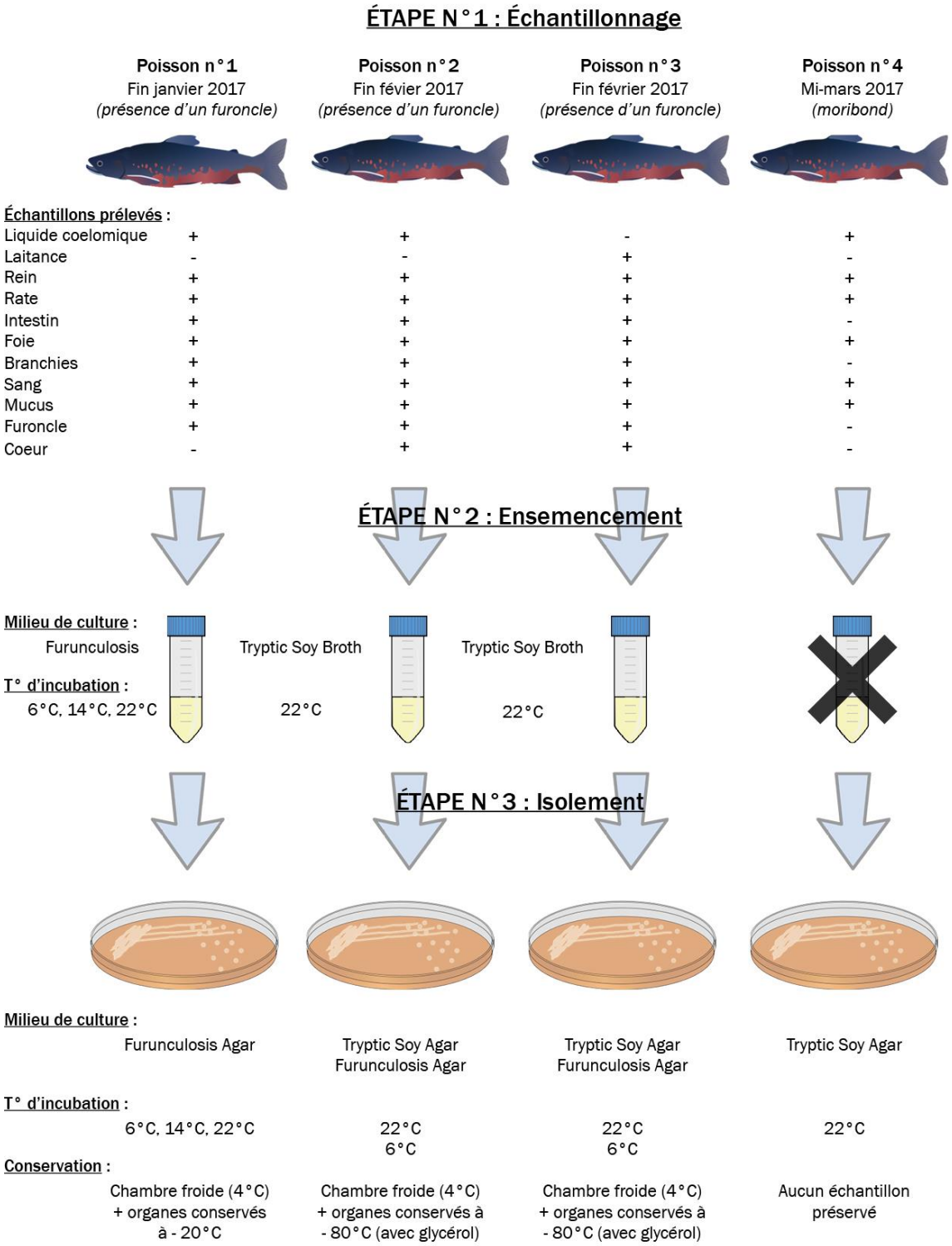


Figure 1 Résumé des différentes étapes d'isolement de la bactérie pathogène *A. salmonicida*

Dans l'optique d'optimiser la méthode d'isolement, le protocole différent a été utilisé pour chaque poisson. Pour les échantillons prélevés : Organes échantillonnés (+) ; organes non échantillonnés (-)

II.2 Caractérisation bactérienne

L'identification taxonomique d'*Aeromonas salmonicida* étant complexe et laborieuse (Latif-Eugenin *et al.*, 2016), nous avons décidé d'utiliser plusieurs techniques complémentaires pour caractériser ce pathogène (Figure 2).

MALDI-TOF. Dans un premier temps, 5 échantillons issus du poisson n°1 et prélevés dans divers matrices/organes ont été envoyés au laboratoire d'analyse du Jura (LDA39) pour caractérisation des colonies bactériennes. Une détermination protéique via la technique MALDI-TOF a été opérée. Dans un second temps, nous avons renouvelé cette opération pour 12 autres échantillons, mais qui cette fois-ci a aussi été confiée parallèlement à un autre laboratoire d'analyses, vétérinaire, spécialisé dans les pathogènes de poissons (Vet'Eau). Ainsi, les échantillons ont été analysés conjointement par deux laboratoires indépendants (voir Tableau I). Brièvement, cette technique est basée sur une reconnaissance/identification protéique. Les peptides (produits par l'hydrolyse des protéines) sont déposés sur la plaque MALDI et cristallisent en contact d'un composé chimique (matrice : CHCA, DHB, …). Les peptides subissent des tirs laser UV d'azote, sont vaporisés et forment des ions peptidiques. La spectrométrie à temps de vol (TOF) permet de séparer les substances ionisées en fonction de la charge et du poids moléculaire. Compte tenu du fait que la vitesse des molécules (inversement proportionnelle à la racine carrée de la masse) dépend de leur ratio masse/charge, plus les molécules sont grandes, plus elles mettront du temps à atteindre le détecteur et inversement. Le spectromètre mesure ainsi le temps mis par les ions pour arriver au détecteur. À chaque tire de laser, l'information de masse est mesurée et enregistrée sous forme de spectre appelé empreinte peptidique de masse. À partir de ce spectre, l'interrogation des banques de données protéiques permet d'identifier la protéine qui est l'origine du spectre mesuré dans le spectromètre de masse.

Caractérisation biochimique. Pour aider ou confirmer l'identification des souches bactériennes, les deux laboratoires on établit un profil biochimique des bactéries. Les principaux critères contribuant à l'identification taxonomique d'*Aeromonas salmonicida* ont été : la coloration de gram (les bactéries à gram négatif apparaissent en roses sous microscope), la production de pigments marrons sur la gélose, le développement et la croissance des bactéries à 22°C mais pas à 37°C et la recherche de l'oxydase (les bactéries à oxydase positive oxyde le réactif et font apparaître une coloration rose/violette).

Amplification en chaîne par polymérase. Afin d'identifier la bactérie *A. salmonicida*, nous avons employé la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (i.e. PCR), en utilisant une variété d'amorces spécifiques. Nous avons en effet testé 5 couples d'amorces (parmi les 6 connus et répertoriés dans la littérature) répertoriés comme étant spécifiques de cette bactérie (Hidalgo et Figueras, 2012). L'ADN des bactéries a été obtenu après avoir récolté une colonie isolée, remise en milieu nutritif liquide pendant 24 h. L'extraction de l'ADN a été obtenue par choc thermique (en faisant bouillir la colonie bactérienne diluée dans 20 µL d'eau de qualité biologie moléculaire filtrée à travers 0,2 µm). L'amplification de l'ADN a été obtenue en utilisant un thermocycleur Tprofessional basic et après avoir réalisé une solution mixte composée d'eau, de Taq polymérase, du couple d'amorces, de magnésium, de desoxyribonucleotides et le tampon. Différentes conditions PCR (température, nombre de cycles) ont été testées pour chaque couple d'amorces. Les produits PCR obtenus ont tous été contrôlés sur gel d'agarose.

Tableau I Caractéristiques des échantillons clonés-séquencés

Ont été sélectionnés : un échantillon de chaque organe en fonction de différentes conditions d'incubation (contrôles positifs inclus). Un contrôle par PCR a été effectué (« + » = présence de la bactérie). Parallèlement, une grande majorité d'entre eux ont été envoyés aux deux laboratoires pour analyses

n°	n° d'échantillon original	Organe à partir duquel la *A. salmonicida* a été isolée	Température initiale d'incubation	Résultat PCR (Amorces PAAS 1-2)	Caractérisation MALDI-TOF par laboratoire LDA 39 & Vet'Eau
1	0788	NC (INRA Jouy)	22°C	+	Oui
2	2605	NC (INRA Jouy)	22°C	+	Oui
3	2683	NC (INRA Jouy)	22°C	+	Oui
4	3640	NC (INRA Jouy)	22°C	+	Oui
5	4079	NC (INRA Jouy)	22°C	+	Oui
6	4	Rein	6°C	+	Oui
7	5	Rate	6°C	+	Oui
8	13	Foie	6°C	+	Non
9	16	Branchies	6°C	+	Non
10	18	Furoncle	14°C	+	Oui
11	28	Sang	14°C	+	Non
12	36	Rein	22°C	+	Non
13	43	Sang	22°C	+	Oui
14	45	Foie	22°C	+	Oui (son duplicat)
15	51	Liquide cœlomique	14°C	+	Oui (son duplicat)
16	62	Furoncle	22°C	+	Oui

Clonage-Séquençage. Une partie des échantillons telle que résumée dans le tableau I ci-dessus, supposés être les plus représentatifs et incluant les témoins positifs, a été sélectionnée pour être clonée et séquencée. Brièvement, le clonage a consisté à insérer un fragment d'ADN issu des colonies poussant sur boite, obtenu après amplification PCR dans un vecteur (plasmide) apte à se répliquer de manière autonome à l'intérieur d'une cellule hôte (e.g. *Escherichia coli*). Le détail est donné en Annexe 2.

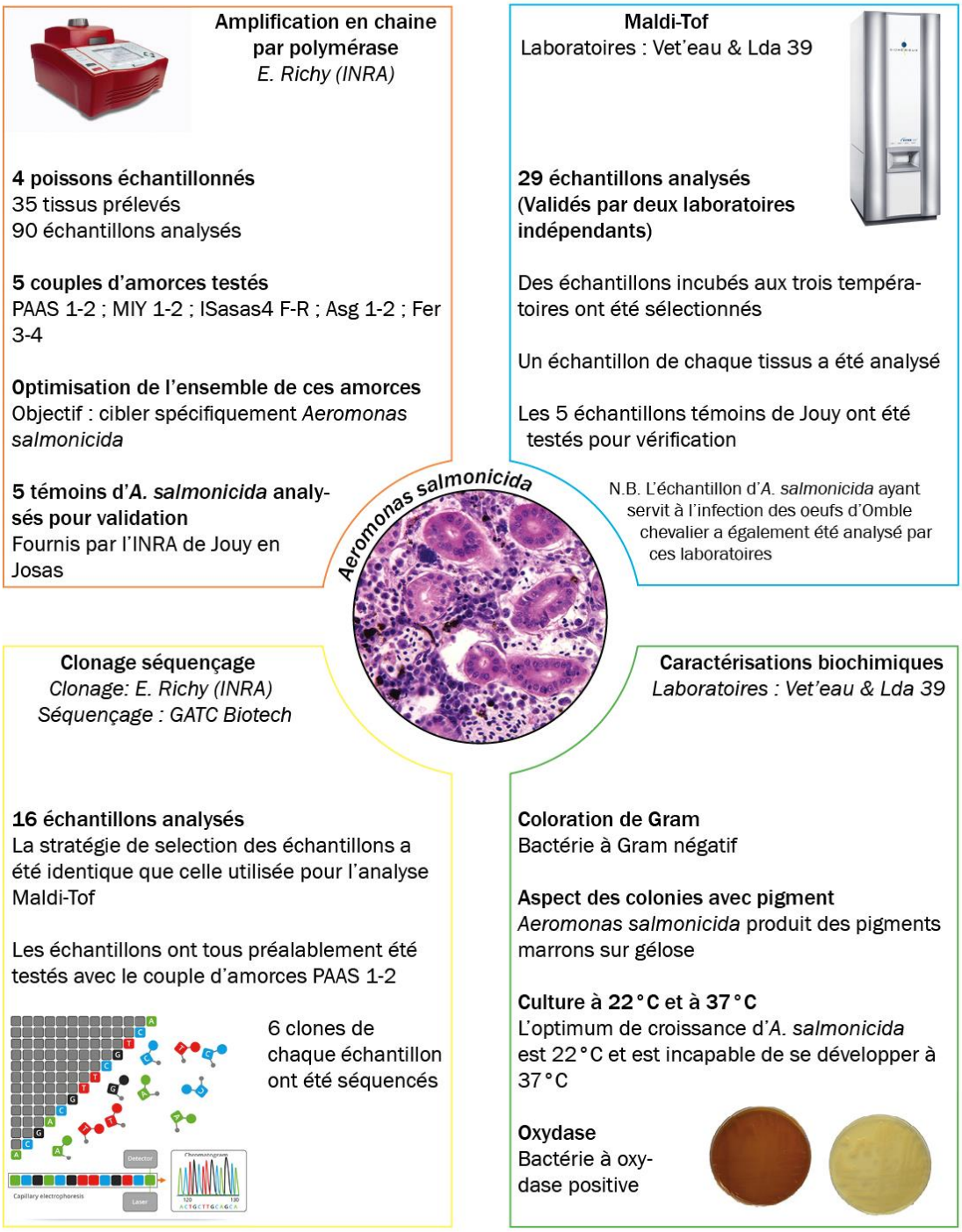


Figure 2 Résumé des différentes méthodes utilisées pour identifier et caractériser *A. salmonicida*

Quatre méthodes ont été employées, faisant appel à 3 laboratoires extérieurs indépendants. L'amplification en chaine par polymérase et le clonage ont été effectués à l'INRA de Thonon-les-Bains

II.3 Effet de la température sur l'occurrence et la virulence d'*A. salmonicida* sur les œufs d'omble chevalier

Une expérience a été conduite afin de tester l'effet de la température sur la vulnérabilité des œufs d'omble chevalier à l'infection par *A. salmonicida*. Les œufs de 5 femelles issues de la pisciculture de Thonon-les-Bains ont été mis en présence de la bactérie à deux concentrations différentes (mesurées par cytométrie en flux) au moment de la fécondation : ~$5x10^8$ cell mL^{-1} et $7x10^7$ cell mL^{-1}. Ensuite, les œufs ont été répartis de façon équitable, dans deux réfrigérateurs à deux températures différentes, optimale pour le développement des œufs (5,5°C) et stressante (8,5°C) mais réaliste car régulièrement observé sur certaines frayères en milieu naturel (Mari *et al.*, 2016).

Infection des œufs d'omble chevalier par A. salmonicida. Une colonie d'*A. salmonicida* a été ensemencée dans du milieu nutritif liquide furunculosis puis placée à 22°C. Après 48 h 300 mL de milieu nutritif liquide furunculosis a été rajouté à cette solution et le tout a été remis à incuber à 22°C pendant 48 h. À partir de cette solution mère, trois solutions filles ont été préparées le jour même de l'infection. La première est un échantillon de la solution mère mesurée à ~$5x10^8$ cell mL^{-1} = P2. La deuxième est une quantité de la solution mère filtrée deux fois à travers 0,2 µm sur Steritop (contrôle = P0). La troisième est une solution intermédiaire diluée à partir de la solution mère environ 10 fois ($7x10^7$ cell mL^{-1} = P1).

Après avoir anesthésié les poissons dans une solution à 0,3 mL d'Eugénol à 10% par litre d'eau, les ovules de cinq femelles ont été récupérés et répartis dans 15 flacons en plastique stérile, avec environ 150 à 200 ovules par flacon. Cinq mâles ont ensuite été sélectionnés pour récupérer leur sperme.

En 2012, Kohara *et al.* ont montré qu'aucune bactérie n'était capable de pénétrer à l'intérieur de l'œuf au-delà de 10 min après le début du stade de durcissement, indiquant ainsi que le micropyle semble être une voie infectieuse préférentielle. Les ovules d'omble chevalier ont donc été « contaminés » lors de la fécondation, de manière quasi simultanée (moins de 10 secondes). Pour ce faire, trois lots d'ovules ont été recouverts avec 15 mL de solution avec les différentes concentrations. Dès cette opération effectuée, 0,6 mL de laitance a été ajouté dans chaque flacon. Cette opération a été réalisée en déposant les échantillons sur un bac de glace pour maintenir une température basse (optimale). L'ensemble a tout de suite été

mélangé délicatement et laissé reposer pendant environ 2,5 heures dans le noir à 2,5°C (chambre froide), pendant l'étape de durcissement.

Après 2,5 heures, les œufs ont été rincés à l'eau minérale (Volvic©) plusieurs fois : 3 rinçages ont été opérés sur les œufs mis dans une petite passoire. Les œufs ont alors été remis dans leur contenant rincé, pendant 1 h. Toute cette opération a été effectuée en chambre froide (~4°C) pour ne pas rompre la chaine du froid.

Les œufs ont été distribués dans des microplaques de 24 puits à raison d'un œuf par puit préalablement remplis avec 2 mL d'eau minérale Volvic©. 36 œufs de chaque famille ont été répartis sur 3 plaques à raison de 12 œufs par plaque en combinant deux familles différentes dans chaque plaque. De façon à randomiser l'erreur due à l'hétérogénéité potentielle des conditions d'incubation, les plaques ont été disposées aléatoirement dans des enceintes réfrigérées dédiées. Pour appréhender et contrôler l'homogénéité des températures, deux loggers HOBO Temperature Data Logger - UX100-001 ont été placés à l'avant et à l'arrière des enceintes réfrigérées mesurant ainsi les petits écarts de températures dus à la présence du circuit de refroidissement positionné à l'arrière de l'enceinte. Très rapidement, ces loggers ont permis de mettre un en évidence une variation de température de près de 1°C dans la l'enceinte réglée initialement à 8,5°C entre l'avant et l'arrière. De même, une augmentation de 0,5°C a été constatée dans l'autre enceinte initialement réglée à 5°C, à l'avant près de la porte.

Une fois l'ensemble des œufs répartis, les plaques ont été disposées aléatoirement dans 2 enceintes réfrigérées à 5,5°C et 8,5°C. Le contrôle de la température a été effectué régulièrement. Tous les œufs n'ont pas été utilisés et une partie a été conservée pour effectuer une pesée afin d'estimer leur masse sèche[1]. Ces œufs ont servi à estimer « l'effet maternel » hérité des cinq femelles et visible sur le phénotype de leurs progénitures. En effet, pour les espèces se nourrissant exclusivement sur les vésicules vitellines jusqu'à plusieurs semaines après l'éclosion (e.g. les salmonidés), il existe une corrélation entre les réserves héritées de la mère et la taille de la vésicule, celui du poisson et parfois au taux de survie. Il est donc nécessaire d'ajouter ce terme comme co-variable lors des différents traitements statistiques. Ainsi, nous avons préservé un échantillon (une vingtaine d'œufs environ)

[1] Le poids sec est préféré au poids « humide » car beaucoup moins variable

permettant ainsi de calculer un poids moyen d'œuf par femelle. Une autre partie des œufs a été congelée dans du glycérol 30% pour une analyse différée afin d'y détecter la présence ou l'absence de la bactérie d'intérêt à t0.

Suivie des éclosions. Pour les œufs incubés dans l'enceinte à 8,5°C, les éclosions étaient censées débuter à 450°/J[2] (Mari *et al.*, 2016). Quelques jours avant le début des éclosions, les œufs ont donc été surveillés quotidiennement pour ne pas manquer le début des éclosions. Une fois éclos, les alevins ont été baignés dans une solution contenant 0,185 mL d'eugénol pour 500 mL d'eau dans le but de les endormir. Ils ont été photographiés afin de mesurer leurs caractères morphologiques[3], puis congelés à -20°C dans une solution contenant 25% de glycérol et 75% d'eau. Pour les œufs placés dans l'enceinte à 5,5°C, le même protocole a été suivi, à la différence que les œufs étaient censés éclore à 400°/J. Une fois les éclosions terminées, les œufs qui n'ont pas réussi à se développer jusqu'à l'éclosion, ont été congelés dans du glycérol 25%.

Analyse du taux d'infection. 150 œufs non éclos et 134 alevins ont été broyés à l'aide de potters en plastique dans un eppendorf© de 1,5 ml et 750 µL de milieu de culture furunculosis. Entre chaque échantillon, les potters ont été nettoyés à l'alcool ainsi que la spatule servant à récupérer l'œuf ou l'alevin. Les échantillons ont tous été incubés 24 h à 22°C. Une attention particulière a été apportée quant au choix des œufs. Dans un premier temps, il s'est agi des œufs fécondés et qui se sont développés mais qui n'ont pas réussi à atteindre le stade de l'éclosion. Lorsqu'il n'y en avait pas ou pas assez, ce sont les œufs blancs (vs. verts = œufs non fécondés) qui ont été sélectionnés. De même, la laitance des 5 mâles et 75 œufs ayant été congelés à t0, juste après la fin de la dispersion des œufs dans les plaques, ont également été broyés suivant le même protocole.

Tous les échantillons ont été isolés sur boite de pétri contenant du milieu furunculosis Agar, à l'aide d'une pipette Pasteur, stérilisée et façonnée manuellement à l'aide d'un chalumeau. Ils ont ensuite été placés dans l'incubateur à 22°C pendant 72h.

---

[2] L'âge des œufs est estimé en °J correspondant à la somme des températures journalières sur toute la durée d'incubation

[3] La longueur totale des alevins et le volume de leurs réserves vitellines n'ont pas encore été mesurés et analysés à ce jour

Les analyses du taux d'infection des œufs et des alevins ont été effectuées par biologie moléculaire (PCR), en utilisant le couple d'amorces PAAS 1-2.

II.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel RStudio (version 3.2.5).

Taux d'éclosion. La relation, entre le taux d'éclosions et les différents paramètres qui les ont conditionnés, a été analysée à l'aide d'un Modèle Linéaire Généralisé à effets Mixtes (GLMM). Il s'agit d'un modèle linéaire qui prend en compte des facteurs à effets fixes et des facteurs à effets aléatoires. Le package utilisé a été le lme4.

Un modèle initial, contenant tous les effets (température, concentration en pathogène P0, P1, P2) fixes et aléatoires, a d'abord été construit. Les effets aléatoires pris en compte ont été la famille (afin de prendre en compte les effets génétiques/parentaux qui peuvent induire des réponses différentes entre les familles) et la position dans les enceintes thermostatées (car nous avons constaté par des mesures, une hétérogénéité de température au sein de ces dernières). Le modèle a été dégradé (approche « backward stepwise ») en retirant les interactions d'ordre 1 puis les variables une à une. La sélection du meilleur modèle a été effectuée en se basant d'une part sur l'AIC (Critère d'Information Akaike : test du rapport des vraisemblances), et sur un test de vraisemblance (likelihood ratio test) entre les modèles incluant ou non la variable d'intérêt. Pour toutes les variables utilisées, nous avons appliqué une erreur gaussienne. Les résidus ont été vérifiés graphiquement pour s'assurer qu'ils ne s'écartent pas des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité.

Le taux de survie à l'éclosion a été testé en utilisant le modèle suivant où la variable dépendante Éclosion a été intégrée comme variable binomiale (i.e. prenant comme valeur 0 ou 1) :

Éclosion ~ Traitement en pathogène + température + traitement en pathogène x interaction température (en ajoutant à la variable fixe « température » la variable aléatoire « position dans la l'enceinte réfrigérée ») + famille

Les valeurs p critiques ont été fixées à 0,05 et tous les résultats sont présentés « *résultat* + erreur de défaut standard ».

Taux infection. Le taux d'infection, soit la proportion d'individus infectés par groupe (e.g. famille, traitement), a été calculé. La relation entre la présence ou l'absence d'*Aeromonas*

salmonicida dans les œufs ou les alevins (après éclosion comme à t0), a été analysée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis. En effet, pour des raisons logistiques de temps, un sous échantillonnage a été effectué. Ainsi, comme ce sont 5 échantillons par famille, par traitement et par stade (œuf ou alevin) qui ont été analysés (normalité pas acceptable), c'est ce test non paramétrique qui a été utilisé pour des échantillons indépendants. Un test de Dunn a ensuite été appliqué, afin d'identifier les échantillons responsables du rejet de H0.

Les données portant sur le taux d'infection des œufs et les alevins ont été analysées avec un test de Mann-Whitney. En effet, s'agissant d'échantillons non appariés, l'emploi d'un test non paramétrique se justifiait par le fait que la normalité (test de Shapiro-Wilk) et l'homoscédasticité (test de Bartlett) n'étaient pas respectées.

III. Résultats

III.1 Culture bactérienne

Les bactéries placées dans l'incubateur à 22°C se sont globalement multipliées plus rapidement que les bactéries placées à 14 et à 6°C. Alors qu'il a fallu généralement 24 heures aux colonies bactériennes incubées à 22°C pour coloniser une partie importante des boites de pétri, il en a fallu entre 48 et 72 heures pour celles placées à 14°C et plus de 192 heures pour celles placées à 6°C. Pour le poisson n°1 (Tableau II), *Aeromonas salmonicida* a été retrouvée dans quasiment tous les échantillons poussant à 6°C issus du rein, de la rate, du mucus, du sang, du foie et des branchies. À 14°C, Il a été possible d'isoler la bactérie à partir du furoncle, du rein, de la rate, du sang, des branchies et du liquide cœlomique. À 22°C, la bactérie a pu être isolée à partir du furoncle, du rein, du sang et du foie. Comparativement, et un peu contre toute attente, aucune bactérie n'a pu être isolée des poissons n°2, 3 et 4.

III.2 Identification bactérienne

MALDI-TOF et analyses biochimiques. Ne possédant pas l'équipement nécessaire à l'INRA de Thonon-les-Bains, une partie des analyses permettant l'identification taxonomique d'*Aeromonas salmonicida* a été effectuée par deux laboratoires indépendants. Ces derniers ont opéré de différentes manières, sur des critères biochimiques et protéiques.

Dans un premier temps, les 5 premiers échantillons ont été analysés par un seul laboratoire (LDA39) avec les résultats suivants : les échantillons In (23) 57, Fo (45) 69, Re (36) 66 ont pu être identifiés avec 99,9 % de confiance. En revanche, pour les échantillons Br (31) 60 et FU (33) 63, ce sont les analyses biochimiques qui ont permis d'identifier les souches bactériennes jusqu'au rang taxonomique de l'espèce, car il y avait 50% de chance que ce soit une autre espèce que celle identifiée avec la seule méthode MALDI-TOF. Ce qui a permis alors de discriminer et affirmer que FU (33) 63 était bien *A. salmonicida* est qu'elle ne poussait pas à 37°C, qu'elle possédait des pigments marrons et se déplaçait en glissant, laissant ainsi une trace visqueuse sur gélose derrière elle. Les résultats sont résumés dans le Tableau III ci-dessous.

Les résultats obtenus pour 12 autres échantillons analysés conjointement par LDA39 et Vet'Eau n'ont pas été identiques en fonction du laboratoire. Alors que *A. salmonicida* était identifiée dans 10 des 12 échantillons par LDA39, le laboratoire Vet'Eau n'a identifié qu'à 3 reprises *A. salmonicida* sur les 12 échantillons analysés. Les détails sont proposés dans l'Annexe 3.

Tableau II Détection d'*A. salmonicida* dans les tissus du poisson n°1

Organes prélevés en duplicat. Trois températures d'ensemencement et d'isolement ont été testées. Résultat : présence de la bactérie d'intérêt (+) ; absence (-)

Tissus	6°C	14°C	22°C
Furoncle (Fu)	-	+	+
Fu	-	+	+
Rein (Re)	-	+	-
Re	+	+	+
Rate (Ra)	+	+	-
Ra	+	+	-
Intestin (In)	-	-	-
In	-	-	-
Mucus (Mu)	+	-	-
Mu	-	-	-
Sang (Sa)	+	+	+
Sa	+	+	-
Foie (Fo)	+	-	+
Fo	+	-	+
Branchie (Br)	+	-	-
Br	+	+	-
Liquide coelomique (Lc)	-	+	-
Lc	-	+	-

Amplification en chaîne par polymérase. À partir de l'analyse des 5 mêmes échantillons que ceux envoyés à analyser au laboratoire LDA39, nous avons trouvé que le primer PAAS permettait d'amplifier l'ADN en respectant la taille du fragment attendue pour les échantillons Br 59, Fu 62 et Fo 68. De la même manière, les amorces MIY et Fer ont permis d'amplifier correctement l'ADN des échantillons Br 59 et Fu 62. Le primer Asg a donné les résultats attendus pour les échantillons, In56, Br 59 et Fu 62. Finalement, le primer ISasa n'a pas fonctionné. (Tableau III).

Tableau III Identification d'*A. salmonicida* par différentes méthodes

À partir d'un échantillon isolé, 3 colonies ont été ensemencées puis isolées à leurs tours sur boite de pétri. Cinq couples d'amorces testés sur 5 organes différents issus du poisson n°1. Résultat : présence de la bactérie d'intérêt (+); absence (-)

Primer	Intestin (In 56)	Branchies (Br 59)	Furoncle (Fu 62)	Rein (Re 64)	Foie (Fo 68)
PASS	-	+	+	-	+
MIY	-	+	+	-	-
Fer	-	+	+	-	-
Asg	+	+	+	-	-
ISasa	-	-	-	-	-
Résultat Biochimie & MALDI-TOF	*Aeromonas sobria*	*Aeromonas punctata (caviae)*	***Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida***	*Pseudomonas putida*	*Chryseobacterium indologenes*

Aucun des amorces n'a permis de cibler à chaque fois de manière spécifique *A. salmonicida*. Toutefois, les amorces MIY, Asg et Fer semblent cibler spécifiquement les espèces du genre *Aeromonas*.

Des optimisations des conditions PCR ont alors été effectuées dans le but de pouvoir discriminer plus spécifiquement les différentes bactéries (modification de la quantité d'ADN, température durant la phase d'hybridation, durée et nombre de cycles). À partir des informations obtenues dans la littérature (Hidalgo et Figueras, 2012), de l'optimum des températures transmis par le fabriquant pour chaque amorce et des précédentes études

effectuées au sein de l'INRA de Thonon-les-Bains, nous avons testé plusieurs températures d'hybridation pour les cinq couples d'amorces (e.g. un gradient de température avec deux températures au-dessus et en dessous de celles décrites par Hidalgo et Figueras comme indiqué dans le Tableau IV ci-dessous). Étant donné que la température d'hybridation choisie en 2012 par Hidalgo et Figueras était déjà très élevée (67°C) un poids supplémentaire a été accordé aux données du fabricant pour l'amorce Isasa4 et le gradient testé a été choisi par rapport à l'optimum des deux amorces (R et F). *In fine*, seul le couple d'amorces PAAS 1-2 utilisé avec une température d'hybridation de 60°C, a permis de détecter de manière spécifique *Aeromonas salmonicida* sur notre échantillon modèle (Fu 62), d'autres échantillons issus du poisson 1 et les contrôles positifs (Tableau IV).

Tableau IV Résultats de l'optimisation des 5 couples d'amorces

Cinq températures d'hybridations ont été testées sur chaque couple d'amorces. Les échantillons analysés sont identiques à ceux du Tab. III. Des conditions identiques ont été appliquées aux contrôles positifs pour validation. Résultat : présence de la bactérie d'intérêt (+) ; absence (-)

Essai n°1 sur échantillons : Poisson n°1 (In 56, Br 59, Fu 62, Re 64, Fo 68)

Isasa4 R-F	53°C	54.8°C	60.2°C	62°C	67°C
Résultat	-	-	-	-	-
Fer 3-4	55.9°C	57.9°C	60°C	62.2°C	64°C
Résultat	-	-	-	-	-
Asg 1-2	52°C	54.9°C	57°C	59.2°C	61°C
Résultat	-	-	-	-	-
MIY 1-2	55.9°C	57.9°C	60°C	62.2°C	64°C
Résultat	-	-	-	-	-
PAAS 1-2	51°C	52.8°C	55°C	57.1°C	60°C
Résultat	-	-	-	-	**+**

Essai n°2 sur échantillons : Inra de Jouy (*Aeromonas salmonicida*)

PAAS 1-2 (T° d'hybridation = 60°C)	JIP 07/88	JIP 26/05	JIP 26/83	JIP 36/75R	JIP 40/79
Résultat	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**

Séquençage. Le résultat relatif au séquençage des clones sélectionnés, à partir de leur produit PCR, a été de très bonne qualité. 95% des séquences obtenues faisaient entre 500 et 600 pb soit la taille attendue de l'amplicon associé aux amorces. Seulement 4 séquences n'ont pas été conformes au résultat attendu sur les 96, trois n'ayant donné aucun résultat et une séquence étant très courte (91 pb). Un simple blast (pour *Basic Local Alignment Search Tool* permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides) de chacune des 92 séquences de bonne qualité sur la base du National Center for Biotechnology Information (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a permis de confirmer que les bactéries étaient toutes, majoritairement et en premier lieu, affiliées à la bactérie *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida,* soit le résultat attendu.

III.3 Effet de la température sur l'occurrence et la virulence d'*A. salmonicida* sur les œufs d'omble chevalier

Taux de survie. En moyenne, les œufs ont mis 458 ± 22°J à éclore dans l'enceinte réfrigérée à 8,5°C et 445 ± 25°J dans celle à 5°C. Globalement, un meilleur taux de survie a été observé chez les œufs incubés à 5°C que ceux incubés à 8,5°C. En effet, alors qu'il était égal à 50% au « froid », il chutait pour atteindre 35% au « chaud ».

Les résultats de l'AIC ont révélé que pour analyser la survie (éclosion) des œufs, il n'était pas nécessaire d'utiliser le modèle complet. Les variances entre le modèle comprenant les interactions température/traitement en pathogène et celles du modèle complet n'étant pas significativement différente, il n'était donc pas nécessaire de prendre en compte les interactions (Anova, p = 0,348, N = 1050). Cependant, il semble qu'à lui seul le paramètre « traitement en pathogène » expliquait la variance de la survie des œufs (Anova, p = 0,009, N = 1050), et pas la variable température (Anova, p = 0,058, N = 1050). Or, associé au fait que la valeur se trouve très proche du seuil de significativité, nous savons que la température joue un rôle très important sur la survie des œufs (Mari *et al*., 2016). Des difficultés rencontrées lors de l'expérience expliqueraient avec de grandes certitudes ces résultats (voir discussion). Nous avons donc fait le choix de garder la variable « température » dans les analyses (Tableau V).

Tableau V Analyse du modèle le plus parcimonieux

Cinq modèles différents sont comparés entre eux afin d'obtenir un compromis entre un modèle le plus simple possible mais qui explique au mieux la variance. Le modèle complet est donc « dégradé » en retirant une à une des variables. Le modèle nul est un modèle sans variable explicative où l'on suppose une distribution aléatoire de la variable à expliquer. Résultat : « * » = degré de significativité (plus le nombre d'* augmente, plus le degré de significativité est élevé : 0,01<*<0,05 et 0,001<**<0,01)

Modèles testés	ddl	AIC	Anova *p*-value			
Modèle nul	5	1257,393				
Modèle complet	10	1252,31	0,01*			
Modèle sans interaction	8	1250,422		0,3479		
Modèle sans taitement pathogène	6	1255,789			0,009**	
Modèle sans interaction	8	1250,422				
Modèle sans tempétature	7	1252,011				0,058

Après analyse des résultats issus du GLMM (Tableau VI), il semble qu'il y ait bien un effet de la température et des différentes concentrations en pathogène sur le taux d'éclosion (GLMM, p < 0,005, N = 1050). En effet, la concentration en pathogène P1 influençait le taux de survie significativement (GLMM, p = 0,043, N = 1050) mais la concentration en pathogène P2 et la température avaient une influence d'autant plus significative sur le taux de survie (GLMM, p = 0,002, N = 1050 et GLMM, p = 0,009, N = 1050 respectivement). La Figue 3 ci-dessous synthétise l'ensemble de ces résultats

Tableau VI Résultat du Modèle Linéaire Généralisé à effets Mixtes (GLMM)

Son représenté ici l'erreur standard et les statistiques calculées par le modèle mixte sur les effets fixes estimés. Résultat : « * » = degré de significativité (plus le nombre d'* augmente, plus le degré de significativité est élevé : 0,01<*<0,05 et 0,001<**<0,01)

	Survie (N=1050)		
Terme du modèle	Estimation	z-value	*p*-value
Intercepte	-0,447 ± 0,45	-0,978	0,328
Pathogène P1	-0,342 ± 0,17	-2,021	0,043 *
Pathogène P2	-0,530 ± 0,17	-3,076	0,002 **
Température froide	0,783 ± 0,30	2,61	0,009 **

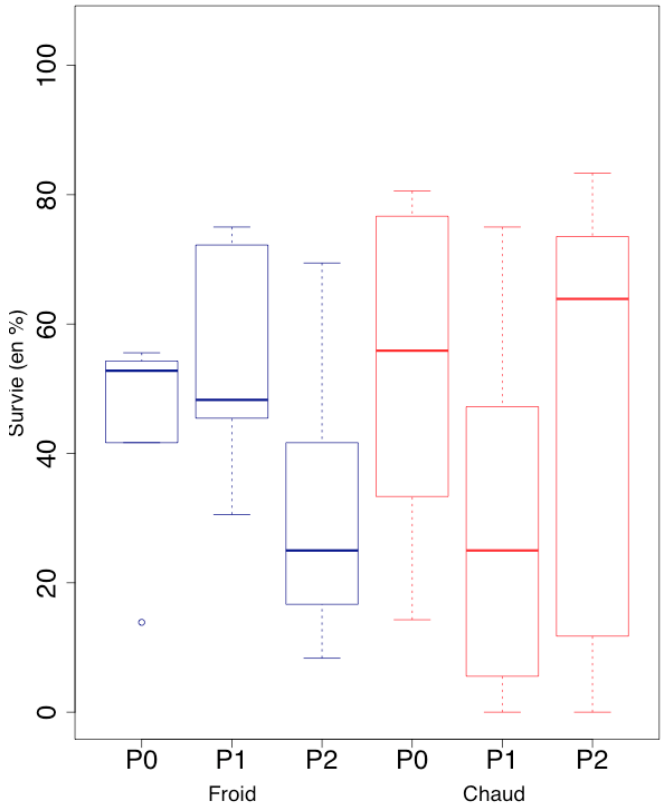


Figure 3 Taux de survie des œufs

Taux de survie estimé par rapport au nombre d'individus éclos en fonction de la température et du traitement en pathogène. N = 1066 ; P0 = témoin (sans pathogène), P1 = $7x10^7$ cell.mL^{-1}, P2 = $5x10^8$ cell.mL^{-1}

Taux d'infection. Après analyses par PCR, les résultats ont révélé une infection importante chez les œufs non éclos comparativement à celle observée chez les alevins (Figure 4), qui était quant à elle beaucoup plus rare (Mann-Whitney, p = 0,006, N = 12). Les œufs et alevins infectés l'ont été pour les deux concentrations bactériennes testées. Dans quelques cas (16% des témoins incubés à 5°C, contre 32% de ceux incubés à 8,5°C), les œufs et les alevins témoins, à priori non contaminés, ont également révélé la présence de la bactérie.

À t0, un fort taux d'infection a été observé chez les œufs artificiellement contaminés avec le traitement P1 (« faiblement » concentré en bactéries) comme pour le traitement P2 (fortement concentré en bactéries). Ici aussi, il a été constaté la présence de la bactérie pathogène *A. salmonicida* pour environ 1/3 des œufs témoins. Les œufs soumis au traitement

P0 (milieu de culture sans bactérie) étaient significativement moins infectés que ceux soumis au traitement P1 et P2 (Kruskal-Wallis, p = 0,004, N = 15 ; Dunn, p < 0,05, N = 15 ; Figure 5). À noter que l'analyse des laitances des 5 mâles n'ont pas révélé la présence de la bactérie d'intérêt.

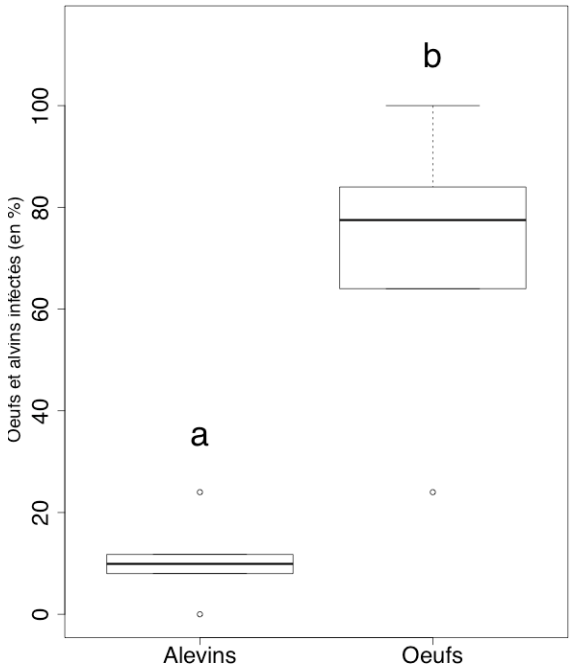


Figure 4 Pourcentage des œufs et alevins infectés

Nombre moyenne d'œuf ou d'alevin infecté (N = 2 états x 3 traitements x 2 températures = 12) - test de Mann-Whitney. Résultat : a, b = significativité obtenue à partir des résultats des tests. Lorsqu'il existe une différence significative entre deux boites à moustaches : une lettre différente est figurée au-dessus d'elles. S'il n'en existe pas, les deux boites on une lettre identique

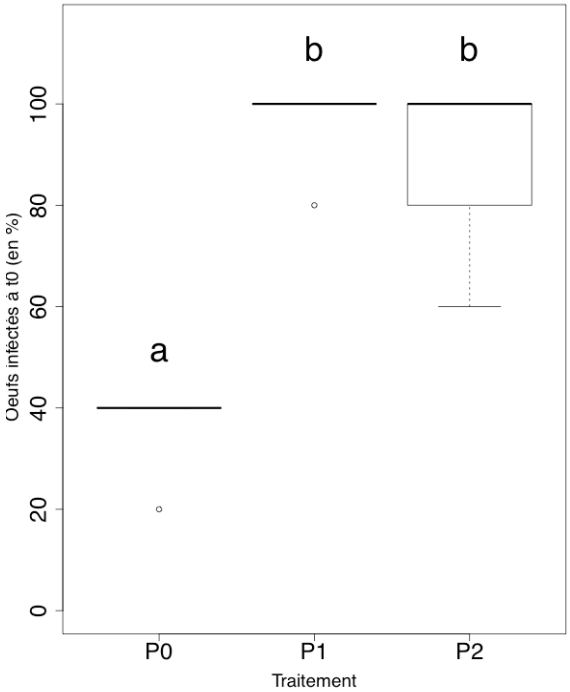


Figure 5 Pourcentage d'œufs infectés à t0 pour les différents traitements

Moyenne des œufs infectés par famille, en fonction de P0, P1, et P2 (N = 5 familles x 3 traitements = 15) - teste de Kruskal-Wallis et de Dunn.
Résultat : a, b = significativité obtenue à partir des résultats des tests. Lorsqu'il existe une différence significative entre deux boites à moustaches : une lettre différente est figurée au-dessus d'elles. S'il n'en existe pas, les deux boites on une lettre identique

L'analyse des données a révélé l'existence d'une différence significative (Kruskal-Wallis, p = 0,014, N = 30) entre traitements (que ce soit pour la température et/ou la concentration en pathogène). Le pourcentage de la quantité d'œufs ou d'alevins infectés par la bactérie variait significativement entre les traitements P0 Froid et P1 Froid, P2 Froid, P0 Chaud, P1 Chaud, P2 Chaud (Dunn, p < 0,05, N = 30, Figure 6). De même, elles variaient également significativement entre P0 Chaud et P2 Chaud (Dunn, p = 0,006, N = 30).

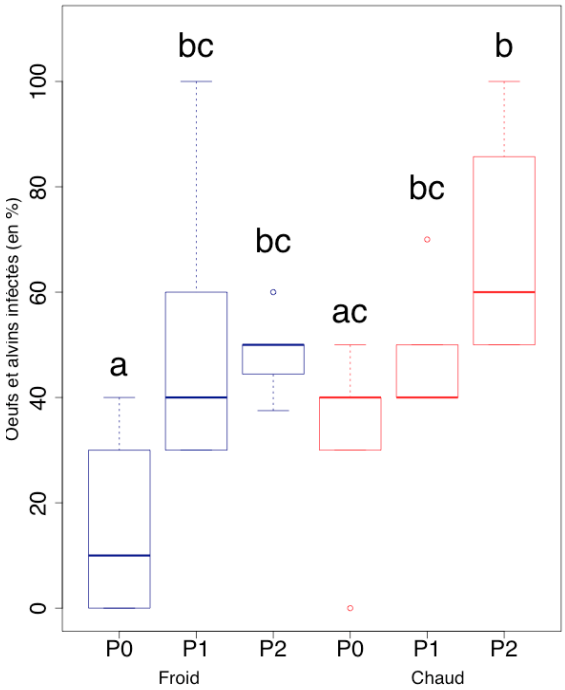


Figure 6 Pourcentage des œufs et des alevins infectés

Nombre d'œufs ou d'alevins contaminé par *A. salmonicida* (analyses PCR), en fonction de la température et du traitement en pathogène. P0 = témoin (sans pathogène), P1 = $7x10^7$ cell.mL^{-1} et P2 = $5x10^8$ cell.mL^{-1} (N = 5 familles x 2 températures x 3 traitements = 30) - test de Kruskal-Wallis et de Dunn
Résultat : a, b, c = significativité obtenue à partir des résultats des tests. Lorsqu'il existe une différence significative entre deux boites à moustaches : une lettre différente est figurée au-dessus d'elles. S'il n'en existe pas, les deux boites ont une lettre identique

IV. Discussion

Face au changement climatique qui menace la biodiversité et l'équilibre des écosystèmes, il est essentiel de multiplier les études afin de pouvoir anticiper les réponses potentielles des organismes qui y vivent et les impacts sur les populations/communautés. En amont, il faut être capable d'identifier non seulement les facteurs pouvant avoir des impacts directs, mais également ceux aux effets indirects, qui peuvent se combiner de façon synergique ou antagoniste avec d'autres facteurs (Sokolova et Lannig, 2008 ; Mari *et al.*, 2016). Parmi ces facteurs, la température joue un rôle clé sur la physiologie des organismes et notamment chez les ectothermes dont la température corporelle est directement liée à la celle de l'environnement (Sokolova et Lannig, 2008). Une légère augmentation de température est

susceptible d'entrainer une modification majeure de leur physiologie, de leur comportement, et engendrer le déplacement ou le déclin des populations (Hochachka et Somero 2002, Gomez *et al.*, 2008 dans Sokolova et Lannig, 2008). Ainsi, dans les lacs péri-alpins et dans les piscicultures à circuit ouvert comme celle de l'INRA de Thonon-les-Bains, l'augmentation des températures pourrait avoir un impact majeur sur les populations de poissons. Associé au stress thermique *sensu stricto*, un deuxième effet pouvant potentiellement s'y ajouter est l'augmentation du taux d'infection bactérienne, associé à une augmentation de la virulence et du développement de ces bactéries pathogènes (Marcogliese, 2008 ; Marcos-López *et al.*, 2010 ; Guijarro *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, un enjeu est donc d'être capable de diagnostiquer la maladie et d'identifier la bactérie dans les organismes symptomatiques ou asymptomatiques et dans le milieu. Notre étude a logiquement commencé par éclairer ce point en recherchant des individus malades et susceptibles d'être infectés par des pathogènes bactériens. Le comportement anormal de certains poissons au sein de la pisciculture INRA et la manifestation visible de la furonculose caractéristique des salmonidés nous ont conduits à nous intéresser plus spécifiquement à la bactérie *Aeromonas salmonoicida*. Dans le but d'isoler, identifier et caractériser cette bactérie, une batterie de méthodes complémentaire a été employée. Les analyses protéiques associées à la technique MALDI-TOF et les analyses biochimiques, effectuées par deux laboratoires indépendants, ont permis de révéler la présence de cette bactérie mais aussi de mettre à jour les limites de ces méthodes. En effet, les deux laboratoires ont, pour certains échantillons, donné des résultats différents pour des échantillons identiques. Ceci a pu être expliqué par le fait que chaque laboratoire possède une base de données qui lui est propre et qu'il interroge pour donner une identification taxonomique. Parallèlement, l'optimisation de l'utilisation d'amorces existantes nous a permis de cibler et identifier spécifiquement *A. salmonicid*a, à travers une méthode sensible, rapide et relativement peu onéreuse (e.g. l'amplification en chaîne par polymérase). Enfin, le séquençage a permis de confirmer que nous avions bien réussi à isoler *A. salmonicid*a.

Fort de cette première étape, nous avons pu réalisé une expérience consistant à infecter à un stade précoce (e.g. au moment même de la fécondation) l'omble chevalier, avec différentes concentrations bactériennes et pour deux conditions de température. Cette expérience nous a permis de révéler plusieurs résultats importants.

Premièrement, il a été démontré que la température joue un rôle déterminant dans la survie des œufs. Ce résultat était attendu et est en adéquation avec la littérature et notamment les travaux récents de Mari *et al.* (2016) sur cette même population.

Deuxièmement, et même s'il apparait que la survie des œufs soit dépendante de la présence de la bactérie pathogène lors de la fécondation, nous n'avons montré d'effet synergique entre contamination bactérienne et hausse de température sur la survie des œufs comme prédit. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. Tout d'abord, le taux de survie était de seulement 50% pour les œufs témoins incubés à 5°C, alors qu'il était de 85% pour des conditions similaires dans l'étude de Mari *et al.* (2016), et même proche de 30% seulement pour une des familles, ce qui laisse supposer une mauvaise qualité des familles utilisées. L'hypothèse que les effets température et traitement en pathogène soit possiblement masqués par la mauvaise qualité des œufs ou des laitances des géniteurs peut donc être formulée. Par ailleurs, l'hétérogénéité des températures mesurées au sein des enceintes thermostaté (gradient avant-arrière d'environ 1°C révélé par des loggers), a constitué une source de variance supplémentaire qui a probablement contribué à brouiller les effets traitement. Nous avons aussi constaté la présence de quelques puits déshydratés au fond de l'armoire, probablement due à la ventilation au sein des enceintes (échantillons retirés du jeu de données). Néanmoins, notre analyse a permis de révéler que les chances de survie diminuent à mesure que l'on augmente la concentration en bactéries pathogènes dans le milieu.

Troisièmement, nous avons pu mettre en évidence que les alevins étaient beaucoup moins infectés par la bactérie que les œufs non éclos, et ce quelques soient la température ou la concentration en pathogène utilisées lors de l'infection artificielle. En effet, alors que le taux d'infection avoisinait les 10 % chez les alevins, il était 7 fois plus important chez les œufs. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que les œufs ayant éclos sont les œufs qui ont réussi à contenir l'infection du pathogène et empêcher que celui-ci ne se développe. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de défense et plus particulièrement de la présence d'agents antimicrobiens dans la membrane de l'œuf capables de limiter l'infection bactérienne (Kudo, 1983 ; Iwamatsu, 2004 ; Shiina *et al.*, 2002 ; Tateno *et al.*, 1998 dans Kohara *et al.* 2012). Toutefois, certains alevins étaient infectés. Ce résultat est intéressant car, contrairement à ce que Kohara *et al.* (2012) ont montré par le passé (à savoir qu'il était impossible pour *Aeromonas*

salmonicida de perdurer plus de 7 jours dans des œufs fécondés artificiellement), les alevins pourraient être infectés et « conserver » en eux le pathogène. Associé à cela, nous avons également pu montrer une augmentation du taux d'infection causé par la contamination artificielle, au froid comme au chaud. Au froid, une différence significative était observée entre les échantillons témoins et ceux infectés artificiellement, mais pas entre les traitements. Au chaud en revanche, une différence significative n'a été mesurée qu'à partir de l'exposition au traitement P2. *In fine*, nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer qu'une augmentation de l'infection en fonction de la température peut être établie, mais qu'une légère tendance s'en dégage, et qu'elle mériterait d'être explorée à travers une nouvelle expérience.

Quatrièmement, et contre toute attente, nous avons trouvé en fin d'expérience que 16% des témoins (non contaminés par nos soins) incubés à 5°C et 32% de ceux incubés à 8,5°C révélaient la présence *d'Aeromonas salmonicida*. Nous avons également trouvé le pathogène dans 36% des œufs témoins congelés juste après la contamination artificielle à t0. Ces résultats suggèrent fortement la possibilité d'un transfert vertical du pathogène de la mère à l'œuf. Ce résultat est aussi très intéressant car il va à l'encontre d'Evelyn *et al.* (1986) qui avaient suggéré que ce type de transfert est limité par le fait que le pathogène tuerait son hôte avant que le nombre de bactéries soit suffisamment important pour assurer l'infection des œufs. D'une part, nous avons montré que la bactérie contaminait le liquide cœlomique, laissant penser que les œufs pourraient être contaminés par cette voie. D'autre part, puisque nous l'avons retrouvé dans les témoins de 4 familles sur 5 au chaud et dans 3 familles sur 5 au froid, nous pouvons faire l'hypothèse que ces femelles étaient des porteuses saines ou tout au moins asymptomatiques. Au vu de ces résultats, nous pouvons même faire l'hypothèse qu'une grande proportion des femelles présentes à la pisciculture sont porteuses saines d'*A. salmonicida*. Néanmoins, le pourcentage d'œufs témoins contaminés ayant réussi à atteindre le stade de l'éclosion étant anecdotique comparativement à celui des œufs témoins initialement contaminés (8% pour les œufs incubés à 5°C et 0% pour ceux à 8,5°C alors qu'il était de 36% à t0), nous laisse penser qu'il existerait une sélection, et que la plus grande majorité des œufs infectés naturellement par la mère ne serait pas amenée à éclore.

V. Conclusions et perspectives

Ces travaux de recherches ont permis de mettre en évidence à la fois un transfert horizontal et un transfert et vertical de la bactérie pathogène *Aeromonas salmonicida*, susceptible de provoquer la furonculose, chez l'omble chevalier. Nos résultats suggèrent que les chances de survie chez les œufs et les alevins diminuent à mesure que l'on augmente la concentration en bactéries dans le milieu. Nous avons également confirmé que la température joue un rôle important dans la survie des œufs, et que, « au chaud », une tendance à l'augmentation du pourcentage d'infection d'œufs et d'alevins augmente avec la concentration en bactéries dans le milieu, restant à confirmer à travers une nouvelle expérience comportant des effectifs plus importants et des armoires thermostatées plus fiables. « Au froid » en revanche, une concentration moyenne ou élevée ne semble pas avoir plus d'influence sur l'infection. Enfin, nous avons montré que l'infection était beaucoup plus rare chez les alevins que chez les œufs. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence le rôle synergique de la température et de la virulence bactérienne. Une nouvelle expérience avec des incubateurs où la température serait plus homogène au cours du temps permettrait peut-être d'infirmer ou de confirmer ce résultat. Il serait également intéressant d'utiliser des géniteurs sauvages pour obtenir des œufs de meilleure qualité et ainsi limiter la mortalité chez les témoins.

Pour aller plus loin, nous pourrons dans un avenir proche analyser d'autres paramètres des alevins notamment la morphologie (longueur, volume du sac vitellin), puisque nous les avons photographiés individuellement à l'éclosion dans cette perspective. Ce type de données supplémentaires permettra d'affiner le rôle du pathogène et/ou de la température sur la physiologie du poisson. Une prédictoin est que les poissons ayant été infectés seraient en moyenne plus petits car stressés et devant mobiliser leurs ressources pour se défendre contre le pathogène. L'énergie ne serait donc plus disponible pour la croissance. Nous pourrions également évaluer le potentiel pathogène d'*Aeromonas salmonicida,* en appliquant par exemple le concept et la formule proposés récemment par Casadevall (2017). Brièvement, cela consiste à partir de la solution bactérienne mise au contact des ovules au moment de leur fécondation, à déterminer le potentiel pathogène (PP) d'*Aeromonas* (ou dit autrement sa capacité virulente) qui est proportionnel à la fraction d'œufs/larves devenant

symptomatiques (Fs) après infection par un inoculum (I) défini, en prenant en compte la mortalité. Ainsi, le Potentiel Pathogène se calculerait de la façon suivante :

$$P \quad \text{Ꝑ} \frac{F}{l} \times {}^{s}1 \quad {}^{\Lambda}$$

Parmi les autres perspectives envisagées, il apparait comme critique de déterminer la source et le cycle de vie du pathogène. Il serait donc particulièrement intéressant de tenter de détecter la présence, la concentration, la persistance, la survie d'*A salmonicida* dans différents environnements et matrices tels que la colonne d'eau, les sédiments, les biofilms, le phytoplancton et le zooplancton. D'ailleurs il vient d'être démontré, en zone estuarienne, un lien très fort entre *A. salmonicida* et la population de copépodes de l'espèce *E. affinis* (Chaix *et al.,* 2017). Cette information pourrait être utile dans un objectif de contrôle/régulation du pathogène tel que proposé ci-dessous.

Ce travail de rechercheavait pour vocation de servir d'appui pour des projets de plus grande ampleur visantnotamment à produire des connaissance permettant d'aboutirà des moyens de contrôle ou de régulation des pathogènes bactériens (projet régional déposé). Dans ce but, il est prévu de tenter d'isoler des phages infectieux de la bactérie et tester les possibilités d'une thérapie phagique, également dans les différentes conditions de température testées. En effet, le changement climatique est susceptible d'influencer l'ensemble des organismes, y compris les virus (Danovaro *et al.*, 2011), tant et si bien qu'il est critique d'analyser comment les interactions phage-bactérie seront impactées. La thérapie phagique évoquée plus haut représente une alternative à l'antibiothérapie de plus en plus citée, notamment en réponse à l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, et parce qu'elle pourrait constituer un moyen ciblé très efficace pour prévenir les maladies, et ce avec un impact environnemental faible (Nakai et Park, 2002 ; Almeida *et al.*, 2009). Quelques études ont déjà testé la thérapie phagique sur *Aeromonas salmonicida* et sur quelques poissons de la famille des salmonidés avec des succès variables (Imbeault *et al.*, 2006 ; Pereira *et al.*, 2011 ; Verner-Jeffreys *et al.*, 2007). Dans un avenir proche, il serait donc intéressant d'essayer d'isoler des phages susceptibles de lyser *Aeromonas salmonicida* responsable de la furonculose chez l'omble chevalier, caractériser ces phages et les tester/utiliser dans diverses conditions de températures et à différents moments de la vie du poisson (de l'œuf à l'adulte).

Références bibliographiques

Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Alves, E., Costa, L., Faustino, M.A.F., 2009. Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. Marine Drugs 7, 268–313. doi:10.3390/md7030268

Casadevall, A., 2017. The Pathogenic Potential of a Microbe. mSphere 2, e00015–17. doi:10.1128/mSphere.00015-17

Caudron, A., Lasne, E., Gillet, C., Guillard, J., Champigneulle, A., 2014. Thirty years of reoligotrophication do not contribute to restore self-sustaining fisheries of Arctic charr, Salvelinus alpinus, in Lake Geneva. Fisheries Research 154, 165–171. doi:10.1016/j.fishres.2014.01.023

Chaix, G., Roger, F.,Berthe, T.,Lamy, B., Jumas-Bilak, E., Lafite, R., Forget-Leray, J., Petit, F., 2017. Distinct Aeromonas populations in water column and associated with copepods from estuarine environment (Seine, France). Frontiers in Microbiology.

Cipriano, R.C., Bullock, G.L., 2001. Furunculosis and other diseases caused by Aeromonas salmonicida. National Fish Health Research Laboratory.

Danovaro, R., Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., Fuhrman, J.A., Middelburg, J.J., Noble, R.T., Suttle, C.A., 2011. Marine viruses and global climate change. FEMS Microbiology Reviews 35, 993–1034. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00258.x

Evelyn, T.P.T., Prosperi-Porta, L., Ketcheson, J.E., others, 1986. Experimental intra-ovum infection of salmonid eggs with Renibacterium salmoninarum and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin. Diseases of Aquatic Organisms 1, 197–202.

Fernández-Álvarez, C., Gijón, D., Álvarez, M., Santos, Y., 2016. First isolation of Aeromonas salmonicida subspecies salmonicida from diseased sea bass, Dicentrarchus labrax (L.), cultured in Spain. Aquaculture Reports 4, 36–41. doi:10.1016/j.aqrep.2016.05.006

Gerdeaux, D., 2011. Does global warming threaten the dynamics of Arctic charr in Lake Geneva? Hydrobiologia 660, 69–78. doi:10.1007/s10750-010-0412-7

Glubokovskiy, M.K., Alekseyev, S.S., 2013. Charr studies across countries, continents and decades: Aspects of ecology, evolution, genetics and management. Journal of Ichthyology 53, 779–780. doi:10.1134/S0032945213100032

Goldschmidt-Clermont, E., Hochwartner, O., Demarta, A., Caminada, A., Frey, J., 2009. Outbreaks of an ulcerative and haemorrhagic disease in Arctic char Salvelinus alpinus caused by Aeromonas salmonicida subsp. smithia. Diseases of Aquatic Organisms 86, 81–86. doi:10.3354/dao02110

Guijarro, J.A., Cascales, D., García-Torrico, A.I., García-Domínguez, M., Méndez, J., 2015. Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria. Frontiers in Microbiology 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00700

Hidalgo, R.B., Figueras, M.J., 2012. Molecular detection and characterization of furunculosis and other Aeromonas fish infections. INTECH Open Access Publisher.

Imbeault, S., Parent, S., Blais, J.-F., Lagacé, M., Uhland, C., 2006. Utilisation de bactériophages pour contrôler les populations de Aeromonas salmonicida résistantes aux antibiotiques. Revue des sciences de l'eau 19, 275. doi:10.7202/014415ar

Jones, I.D., Winfield, I.J., Carse, F., 2008. Assessment of long-term changes in habitat availability for Arctic charr (Salvelinus alpinus) in a temperate lake using oxygen profiles and hydroacoustic surveys. Freshwater Biology 53, 393–402.

Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., Valtonen, E.T., 2010. Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. International Journal for Parasitology 40, 1483–1488. doi:10.1016/j.ijpara.2010.04.015

Kim, Y.-S., Yoon, J.-W., Han, H.-J., Suebsing, R., Kim, J.-H., 2011. Prevalence and Characterization of Typical Aeromonas salmonicida Chum Salmon Isolates in Korea. Fisheries and aquatic sciences 14, 347–354. doi:10.5657/FAS.2011.0347

Klemetsen, A., 2013. The most variable vertebrate on Earth. Journal of Ichthyology 53, 781–791. doi:10.1134/S0032945213100044

Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'connell, M.F., Mortensen, E., 2003. Atlantic salmon Salmo salar L., brown trout Salmo trutta L. and Arctic charr Salvelinus alpinus (L.): a review of aspects of their life histories. Ecology of freshwater fish 12, 1–59.

Kohara, M., Kasai, H., Yoshimizu, M., 2012. Intra-ovum Infection in Salmonid Eggs Artificially Contaminated with Fish Pathogenic Bacteria : Flavobacterium psychrophilum, Renibacterium salmoninarum and Aeromonas salmonicida. Fish Pathology 47, 49-55.

Marcogliese, D.J., 2008. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. Revue scientifique et technique Office international of Epizootics 27, 467-484.

Marcos-López, M., Gale, P., Oidtmann, B.C., Peeler, E.J., 2010. Assessing the Impact of Climate Change on Disease Emergence in Freshwater Fish in the United Kingdom: Climate Change and Disease Emergence in Freshwater Fish. Transboundary and Emerging Diseases 57, 293–304. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01150.x

Mari, L., Garaud, L., Evanno, G., Lasne, E., 2016. Higher temperature exacerbates the impact of sediments on embryo performances in a salmonid. Biology Letters 12, 20160745. doi:10.1098/rsbl.2016.0745

Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2016. Aeromonas salmonicida: updates on an old acquaintance. Diseases of Aquatic Organisms 120, 49–68. doi:10.3354/dao03006

Nakai, T., Park, S. C., 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Research in Microbiology, 153, 13-18. PII: S0923-2508(01)01280-3

Noga, E.J. (2010). Fish Diseases (2nd edition) Willey-Blackwell, ISBN 978-0-8138-0697-6, Singapore.

Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A., Pereira, M.J., 2012. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. Aquaculture International 20, 879–910. doi:10.1007/s10499-012-9515-7

Pereira, C., Silva, Y.J., Santos, A.L., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Almeida, A., 2011. Bacteriophages with Potential for Inactivation of Fish Pathogenic Bacteria: Survival, Host Specificity and Effect on Bacterial Community Structure. Marine Drugs 9, 2236–2255. doi:10.3390/md9112236

Richards, G.P., 2014. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology. Bacteriophage 4, e975540. doi:10.4161/21597081.2014.975540

Ring, E., Jutfelt, F., Kanapathippillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., 2004. Damaging effect of the fish pathogen Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (Salmo salar L.). Cell and Tissue Research 318, 305–311. doi:10.1007/s00441-004-0934-2

Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N.C.M., Almeida, A., 2014.

Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture: Impact of environmental variables in phage therapy. Microbial Biotechnology 7, 401–413. doi:10.1111/1751-7915.12090

Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. Climate Research 37, 181–201. doi:10.3354/cr00764

Tam, B., Gough, W.A., Tsuji, L., 2011. The impact of warming on the appearance of furunculosis in fish of the James Bay region, Quebec, Canada. Regional Environmental Change 11, 123–132. doi:10.1007/s10113-010-0122-8

Verner–Jeffreys, D.W., Algoet, M., Pond, M.J., Virdee, H.K., Bagwell, N.J., Roberts, E.G., 2007. Furunculosis in Atlantic salmon (Salmo salar L.) is not readily controllable by bacteriophage therapy. Aquaculture 270, 475–484. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.023

Winfield, I.J., Fletcher, J.M., Ben James, J., 2012. Long-term changes in the diet of pike (Esox lucius), the top aquatic predator in a changing Windermere: Long-term changes in pike diet. Freshwater Biology 57, 373–383. doi:10.1111/j.1365-2427.2011.02607.x

Winfield, I.J., Fletcher, J.M., James, J.B., 2008. The Arctic charr (Salvelinus alpinus) populations of Windermere, UK: population trends associated with eutrophication, climate change and increased abundance of roach (Rutilus rutilus). Environmental Biology of Fishes 83, 25–35. doi:10.1007/s10641-007-9235-4

Annexes

Annexe 1 Spécificité, test et choix des milieux nutritifs

Furunculosis Agar

Pour 1L d'eau distillée (milli-Q) :

Agar..... 15,0g
Bacto Tryptone..... 10,0g
Yeast extract..... 5,0g
Soduim Chloride..... 2,5g
Tyrosine..... 1,0g
pH 7,3 ± 0,2 à 25 °C

Tryptic Soy Agar (TSA)

Pour 1L d'eau distillée (milli-Q) :

Agar..... 15,0g
Casein Peptone..... 15,0g
Sodium Chloride..... 5,0g
Soy Peptone..... 5,0g
pH 7,3 ± 0,2 à 25 °C

Furunculosis

Pour 1L d'eau distillée (milli-Q) :

Bacto Tryptone..... 10,0g
Yeast extract..... 5,0g
Soduim Chloride..... 2,5g
Tyrosine..... 1,0g
pH 7,3 ± 0,2 à 25 °C

Tryptic Soy Broth (TSB)

Pour 1L d'eau distillée (milli-Q) :

Bacto Tryptone..... 17,0g
Sodium Chloride..... 5,0g
Bacto Soytone..... 3,0g
Glucose..... 2,5g
Dipotassium Hydrogen Phosphate..... 2,5g
pH 7,3 ± 0,2 à 25 °C

À stériliser dans l'autoclave : 15 min à 1 bar et 121 °C

Référence :
1. Popoff M., 1984. Genus III *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936, 398 AL. *In* Krieg N. R. and Holt J. G., (ed.), Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 545–548.
2. Austin B. and Austin D. A., 1987. Bacterial fish pathogens: diseasein farmed and wild fish. Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom, 112–117.
3. McCarthy D. H., 1977. Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen - *Aeromonas salmonicida*. *In* Skinner FA, Shewan JM (ed.).Aquatic Microbiology. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 6, 299-324.
4. Griffin P.J., Snieszko S.F., Friddle S.B., 1953. A new adjuvant in the diagnosis of fish furunculosis caused by bacterium *salmonicida*. Vet. Med. 48, 280.

Référence :
1. Beaz-Hidalgo, R., Magi, G.E., Balboa, S., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the fstA (ferric siderophore receptor) gene. Veterinary Microbiology 128, 386–394.
2. Fernández-Álvarez, C., Gijón, D., Álvarez, M., Santos, Y., 2016. First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies salmonicida from diseased sea bass, Dicentrarchus labrax (L.), cultured in Spain. Aquaculture Reports 4, 36–41.
3. Goldschmidt-Clermont, E., Hochwartner, O., Demarta, A., Caminada, A., Frey, J., 2009. Outbreaks of an ulcerative and haemorrhagic disease in Arctic char *Salvelinus alpinus* caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia*. Diseases of Aquatic Organisms 86, 81–86.
4. Kim, Y.-S., Yoon, J.-W., Han, H.-J., Suebsing, R., Kim, J.-H., 2011. Prevalence and Characterization of Typical *Aeromonas salmonicida* Chum Salmon Isolates in Korea. Fisheries and aquatic sciences 14, 347–354.
5. Kulkarni, A., Caipang, C.M.A., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2009. Simultaneous detection of pathogens causing francisellosis, furunculosis and vibriosis in Atlantic cod by multiplex polymerase chain reaction. Aquaculture Research.
6. Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2016. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. Diseases of Aquatic Organisms 120, 49–68.

Annexe 2 Protocole clonage

Dans l'objectif de séquencer une partie de nos échantillons, nous avons effectué une étape de clonage à partir des colonies isolées. Cette méthode consiste à insérer un fragment d'ADN propre à l'espèce étudiée dans un vecteur (plasmide), qui va se répliquer de manière autonome à l'intérieur d'une cellule hôte (ici E. coli). Cette cellule sera ensuite mise en culture afin qu'elle reproduise le fragment d'ADN en grande quantité : le but étant d'obtenir un grand nombre de copies identiques et pures d'un fragment d'ADN donné. Il se déroule en plusieurs étapes :

- Purification : l'étape de purification est nécessaire pour nettoyer l'amplicon et éliminer les restes des réactifs encore présents dans les produits PCR. Le protocole suivi est visualisable ci-après, cependant, quelques optimisations ont été effectuées. Dans l'étape 1 il a été ajouté 10 µL de NaAc au 500 µL de Capture buffer type 3, permettant de précipiter l'ADN. Dans l'étape 2 et 3, les échantillons ont été centrifugés à température ambiante puisqu'elle n'était pas précisée. Afin d'éliminer à maximum de Wash buffer type 1, un deuxième cycle de centrifugeuse a été effectué durant 1 min à 16000 x g (donc 2 min puisqu'une minute est nécessaire pour monter la centrifugeuse à 16000 x g). Durant l'étape 4, ce sont 15 µL d'eau stérile de qualité biologie moléculaire filtrée à 0.2µm (permettant de détacher l'ADN accroché à la membrane) afin d'augmenter au maximum la concentration en acides nucléiques dans l'échantillon.

  Une fois cette étape terminée, nous avons mesuré la concentration par densité optique afin d'estimer la quantité d'ADN dans nos échantillons.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280		260/230		Constant		Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
H2O	Default	04/04/2017	11:03	-0,70	-0,014	-0,019	0,75	0,58	50,00	230	-0,024	0,002			
H2O	Default	04/04/2017	11:05	0,30	0,006	0,012	0,50	0,33	50,00	230	0,018	-0,008			
0788	Default	04/04/2017	11:08	60,81	1,216	0,590	2,06	0,11	50,00	230	10,692	-0,518			
0788.1	Default	04/04/2017	11:09	63,02	1,260	0,631	2,00	0,20	50,00	230	6,455	0,001			
2683	Default	04/04/2017	11:10	45,39	0,908	0,501	1,81	0,48	50,00	230	1,892	0,035			
3675	Default	04/04/2017	11:12	76,75	1,535	0,808	1,90	0,20	50,00	230	7,800	0,006			
4	Default	04/04/2017	11:13	82,83	1,657	0,893	1,86	1,32	50,00	230	1,252	0,009			
H2O	Default	04/04/2017	11:16	0,77	0,015	0,020	0,76	1,27	50,00	230	0,012	0,000			

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280		260/230		Constant		Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
H2O	Default	04/04/2017	17:15	0,35	0,007	0,003	2,66	1,54	50,00	230	0,004	-0,005			
5	Default	04/04/2017	17:16	74,99	1,500	0,778	1,93	0,60	50,00	230	2,517	-0,015			
13	Default	04/04/2017	17:17	81,66	1,633	0,769	2,12	0,37	50,00	230	4,469	-0,001			
16	Default	04/04/2017	17:18	81,83	1,637	0,751	2,18	0,38	50,00	230	4,272	0,009			
18	Default	04/04/2017	17:18	63,01	1,260	0,634	1,99	0,12	50,00	230	10,446	-0,012			
28	Default	04/04/2017	17:19	71,33	1,427	0,734	1,94	0,18	50,00	230	8,100	0,013			
36	Default	04/04/2017	17:19	26,24	0,525	0,279	1,88	0,46	50,00	230	1,151	0,034			
43	Default	04/04/2017	17:20	68,38	1,368	0,723	1,89	0,72	50,00	230	1,913	-0,007			
45	Default	04/04/2017	17:20	71,61	1,432	0,759	1,89	1,36	50,00	230	1,055	0,018			
51	Default	04/04/2017	17:21	70,12	1,402	0,719	1,95	1,31	50,00	230	1,070	-0,027			
68	Default	04/04/2017	17:22	60,99	1,220	0,609	2,00	0,12	50,00	230	10,197	-0,015			
2605	Default	04/04/2017	17:22	29,85	0,597	0,296	2,02	0,25	50,00	230	2,402	-0,021			
4089	Default	04/04/2017	17:23	40,63	0,813	0,426	1,91	0,40	50,00	230	2,046	-0,081			

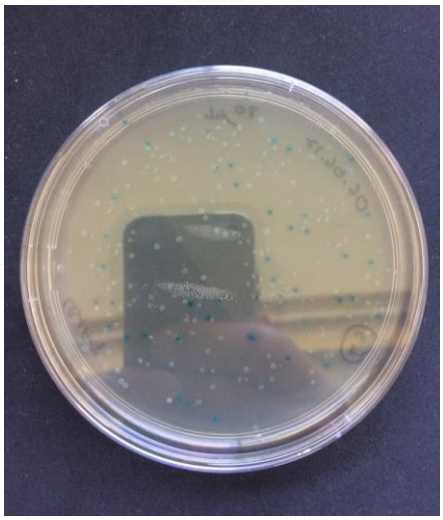
- Ligation : elle permet de « souder » le fragment d'ADN au vecteur, permettant ainsi d'obtenir un vecteur recombiné. Puisque tous nos échantillons possédaient une concentration en acides

nucléiques > 15 ng/μL, nous avons utilisé les quantités suivantes : 1 μL de Salt solution, 2 μL d'eau, 2 μL du produit PCR frais et 1 μL de Topo Vector.

- Transformation : consiste à insérer le vecteur recombiné à l'intérieur d'une bactérie rendue compétente (fragiliser la paroi d'une cellule la rend capable d'accepter un fragment d'ADN étranger) dans l'optique de le multiplier. Deux marqueurs à l'intérieur du plasmide (un gène de résistance à un l'antibiotique et un gène LacZ) sont utilisés pour repérer les bactéries ayant incorporées le vecteur recombiné. Les bactéries sont cultivées sur un milieu de culture sélectif contenant l'antibiotique (ampicilline) et un substrat (Xgal et IPTG) de la β-galactosidase. Seules les colonies ayant incorporé le vecteur recombiné pousseront en gardant la couleur blanche, alors que les autres seront soit tuées, soit seront de couleur bleue si elles possèdent le vecteur non recombiné.

  C'est par le biais d'un choc thermique qu'on transforme la 2 μL de ligation en cellules compétentes. Après 8 min passées dans la glace, on place les échantillons 1 minute dans l'eau à 42°C, puis replacée pendant 3 min dans la glace. 400 μL de milieu nutritif SOC medium sont ajoutés dans les échantillons qui sont ensuite placé sous agitateur pendant 2h dans un incubateur à 37°C.

  - Ensemencement des boites de pétri : 80, 100 et 150 μL de cellules compétentes ont été ajoutés dans des boites de pétri préalablement remplie par du milieu de culture (LB agar) et par 100 μL de X-Gal-IPTG. Cette solution permet de vérifier l'activité enzymatique : l'insertion du fragment d'ADN à l'intérieur du plasmide conduisant à l'inactivation du gène qui code pour la β-galactosidase, les bactéries qui auront inséré le fragment d'ADN apparaîtront blanchâtres alors que les autres apparaîtront bleus.



  - Vérification des clones : une PCR a été effectuée avec les amorces M13 qui se trouvent de part et d'autre du fragment inséré qui ont un amplicon plus important et ainsi englobant le fragment d'ADN. Cela permet donc de vérifier la validité des clones et d'avoir la séquence la plus longue de fragment inséré.

Annexe 3 Résultats analyses MALDI-TOF et biochimiques pour les laboratoires LDA39 et Vet'Eau

Organe à partir duquel la *A. salmonicida* a été isolée	**Référence de l'échantillon**	**Température initiale d'incubation**	**Résultats analyses LDA39**	**Résultats analyses Vet'Eau**
NC (INRA Jouy)	0788	22°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas salmonicida*
NC (INRA Jouy)	2605	22°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas salmonicida*
NC (INRA Jouy)	2683	22°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas salmonicida*
NC (INRA Jouy)	3640	22°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas eucrenophila*
NC (INRA Jouy)	4079	22°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas salmonicida*
Rein	Re 4	6°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas bestiarum*
Rate	Ra 5	6°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	Germe abs. De la base de données
Furoncle	Fu 18	14°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas bestiarum*
Sang	Sa 43	22°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas sp.*
Foie	Fo 46	22°C	*Acinetobacter radioresistens Micrococcus luteus/lylae*	*Arthrobacter sp.*
Liquide cœlomique	Lc 52	14°C	*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*	*Aeromonas bestiarum*
Furoncle	Fu 62	22°C	*Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)*	*Aeromonas eucrenophila*

Effet de la température sur les interactions hôte/pathogène : Un cas concret original appliqué à l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus L.)* et la bactérie *Aeromonas salmonicida* responsable de la furonculose

Résumé Dans un contexte de changement climatique, l'augmentation des températures de l'eau menace la biodiversité et l'équilibre des écosystèmes aquatiques. Cette dernière a des effets directs sur la physiologie des organismes qui sont relativement bien documentés. Elle a aussi des effets indirects en modulant l'effet d'autres facteurs qui sont quant à eux bien moins connus. Divers travaux suggèrent que le changement climatique va induire une modification de la pathogénicité de divers microparasites et représente une menace pour les populations naturelles ou d'élevage. En mettant en œuvre une approche expérimentale, nous nous sommes intéressés ici à l'interaction entre *Aeromonas salmonicida*, bactérie pathogène, et l'omble chevalier, poisson sténotherme d'eau froide et à l'effet de la température sur le caractère pathogène de la bactérie. Les premiers résultats ont pu montrer qu'il existait à la fois un transfert horizontal et un transfert vertical de la bactérie chez ce poisson puisque des œufs témoins étaient contaminés. Ils ont pu mettre en évidence que le taux de survie des œufs et des alevins diminue à mesure que l'on augmente la concentration en bactéries dans le milieu. Nous avons également confirmé que la température joue un rôle important dans la survie des œufs, et que l'infection était beaucoup plus rare chez les alevins que chez les œufs supportant l'hypothèse d'une mortalité induite par le pathogène au stade œuf. Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence de synergie de la température et de la virulence bactérienne.

Mots-clés Changement climatique, multi-stress, interaction, embryon, pathogène

Temperature effect on host-pathogen interaction: An original case of studies applied to Arctic char (*Salvelinus alpinus L.*) and bacteria *Aeromonas salmonicida* responsible to furunculosis.

Abstract In the context of climatic change, increasing water temperature threaten aquatic biodiversity and ecosystems. Lot of studies have shown directs effects on organism's physiology. However, the indirect effect of others factors modulated by a rise of temperature are less documented. Some studies suggested that climatic change could induce a modification of pathogenicity of diverse micro-parasites that represent a threat for naturals or farming populations. Here, we used an experimental approach to investigate i) the interaction between pathogen bacteria *Aeromonas salmonicida* and Arctic charr that is a cold-water stenotherm fish, and ii) the effect temperature on the pathogenic character of the bacteria. First results showed a contamination of eggs control sample suggests the existence of an horizontal and vertical transfer of the bacteria. Furthermore, increasing bacteria concentration led to a decreasing rate survival of eggs and fish larvae. Results also showed that temperature plays an important role on eggs survival and that infection was lower for alevins than eggs. Then, we supposed that mortality is induced by pathogen at the egg stage. However, no temperature and bacteria virulence synergy was shown.

Keywords : Climatic change, multistress, interaction, embryo, pathogen