

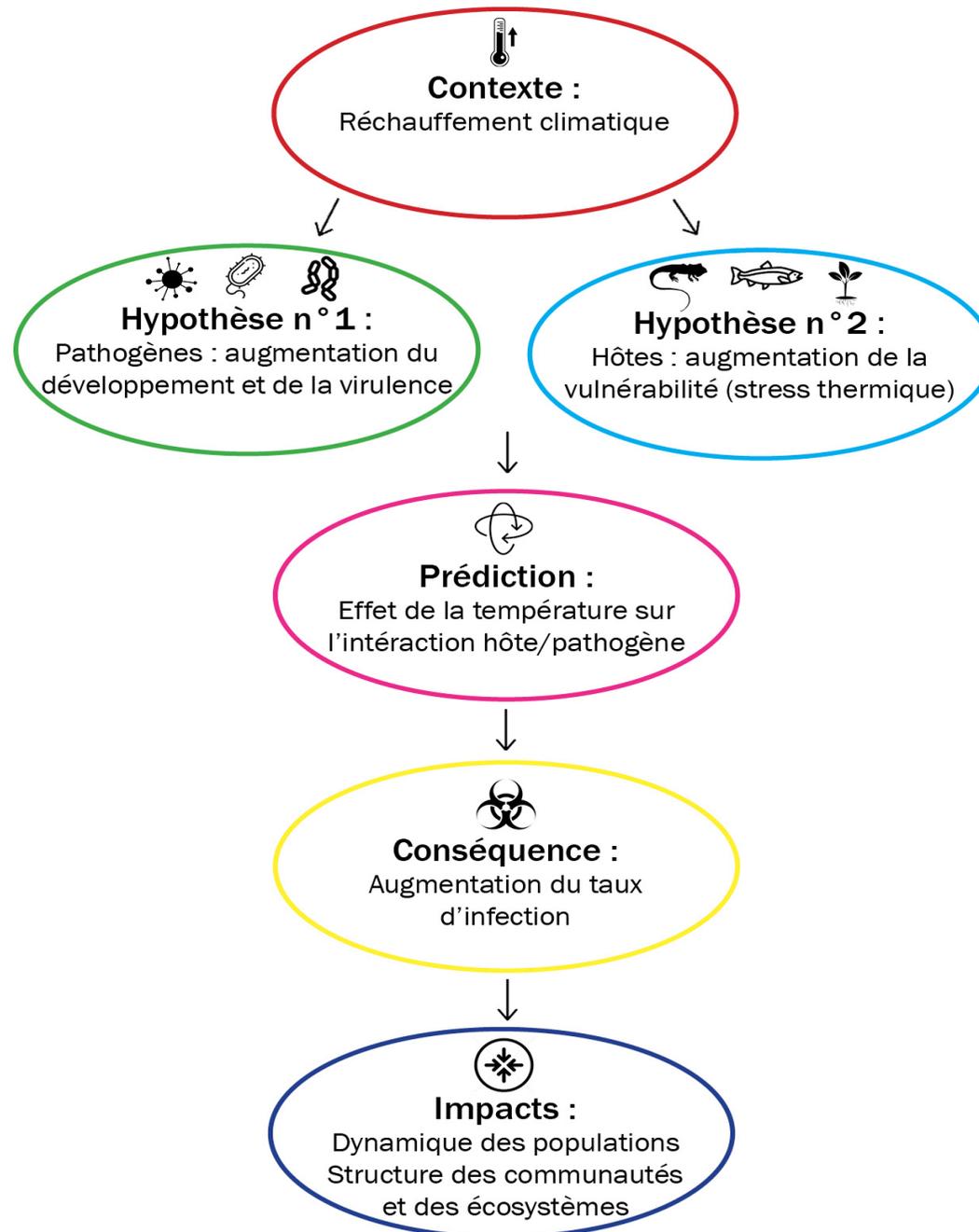


Effet de la température sur les interactions hôte/pathogène :

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

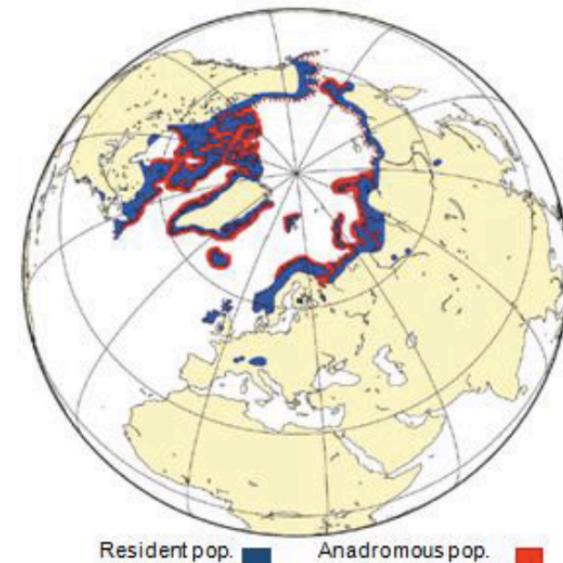
Etienne RICHY

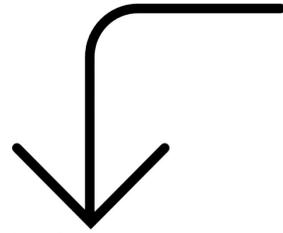
Stage réalisé sous la responsabilité scientifique de
Stéphane JACQUET & Emilien LASNE



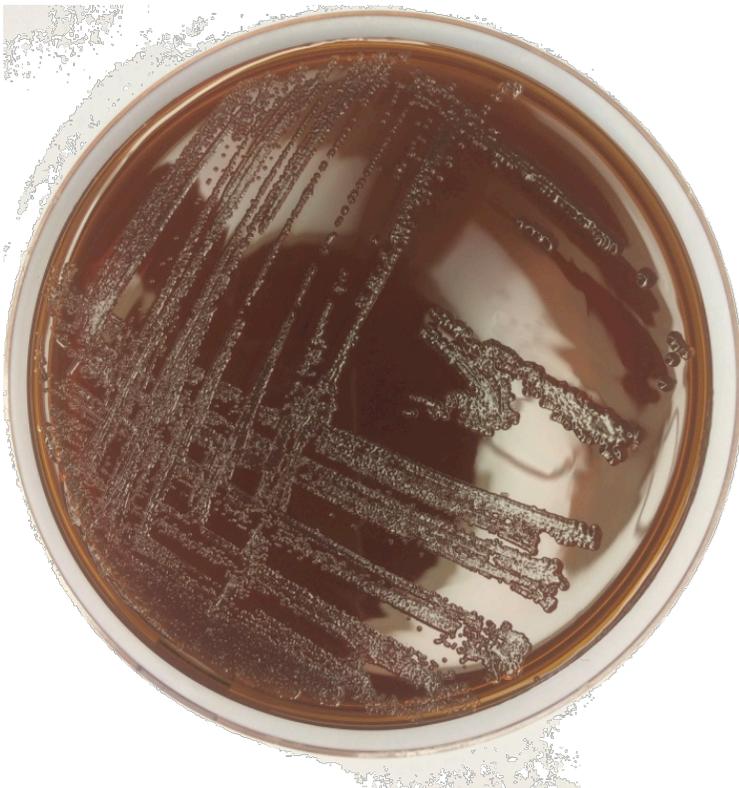
Ombles chevalier (*Salvelinus alpinus*)

- Salmonidé
- Poisson sténotherme d'eau froide
- Grande valeur patrimoniale, économique et scientifique
- Population sauvage et captive
- Répartition circumpolaire (France = limite sud)





Aeromonas salmonicida



- Responsable de la furunculose chez beaucoup de poissons
- Ubiquiste
- Bactérie d'eau froide < 25°C
- Gram -, oxydase +, pigmentée
- Peut engendrer un fort taux de mortalité chez les poissons d'élevages

Objectifs de l'étude

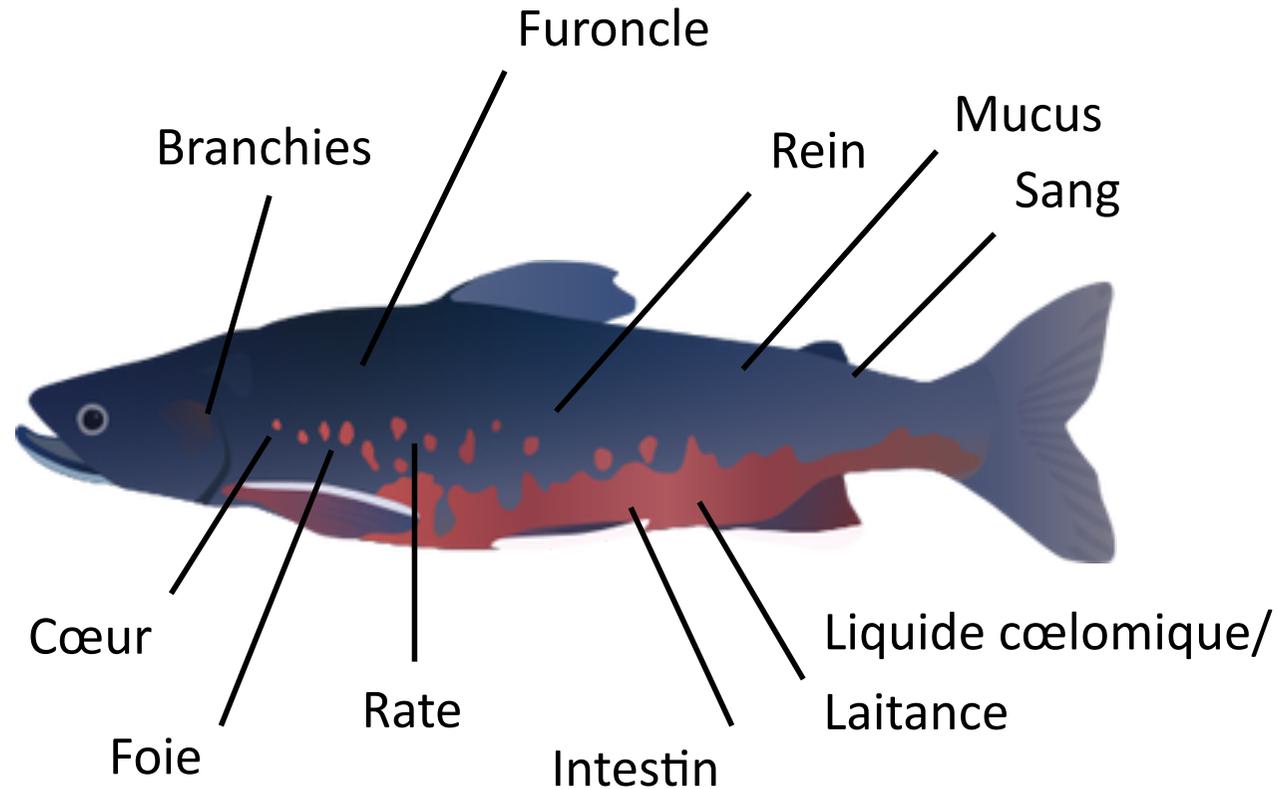
L'augmentation de la température va-t-elle avoir une influence sur l'interaction hôte/pathogène?

- ↳ Infecter des œufs en fonction de deux températures
- Déterminer l'existence de bactéries pathogènes dans l'Omble chevalier captif
 - Détecter et caractériser *A. salmonicida*
 - Infection d'œufs de femelles saines à un stade précoce (transfert horizontal)
 - Évaluer l'effet de la température sur le taux d'infection et de survie des œufs et des alevins

Prérequis

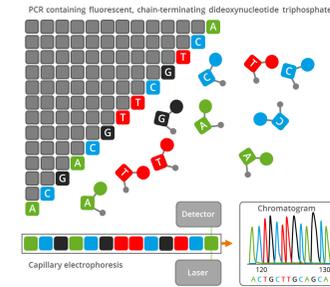
Détecter, isoler et caractériser
Aeromonas salmonicida

Culture de la bactérie :



- 4 poissons échantillonnés
- 4 milieux de cultures utilisés
- 3 températures d'incubation testées (6°C, 14°C, 22°C)

Détection et identification :



MALDI-TOF & analyses biochimiques :

- 29 échantillons analysés par deux laboratoires indépendants (Lda39 & Vet'eau)

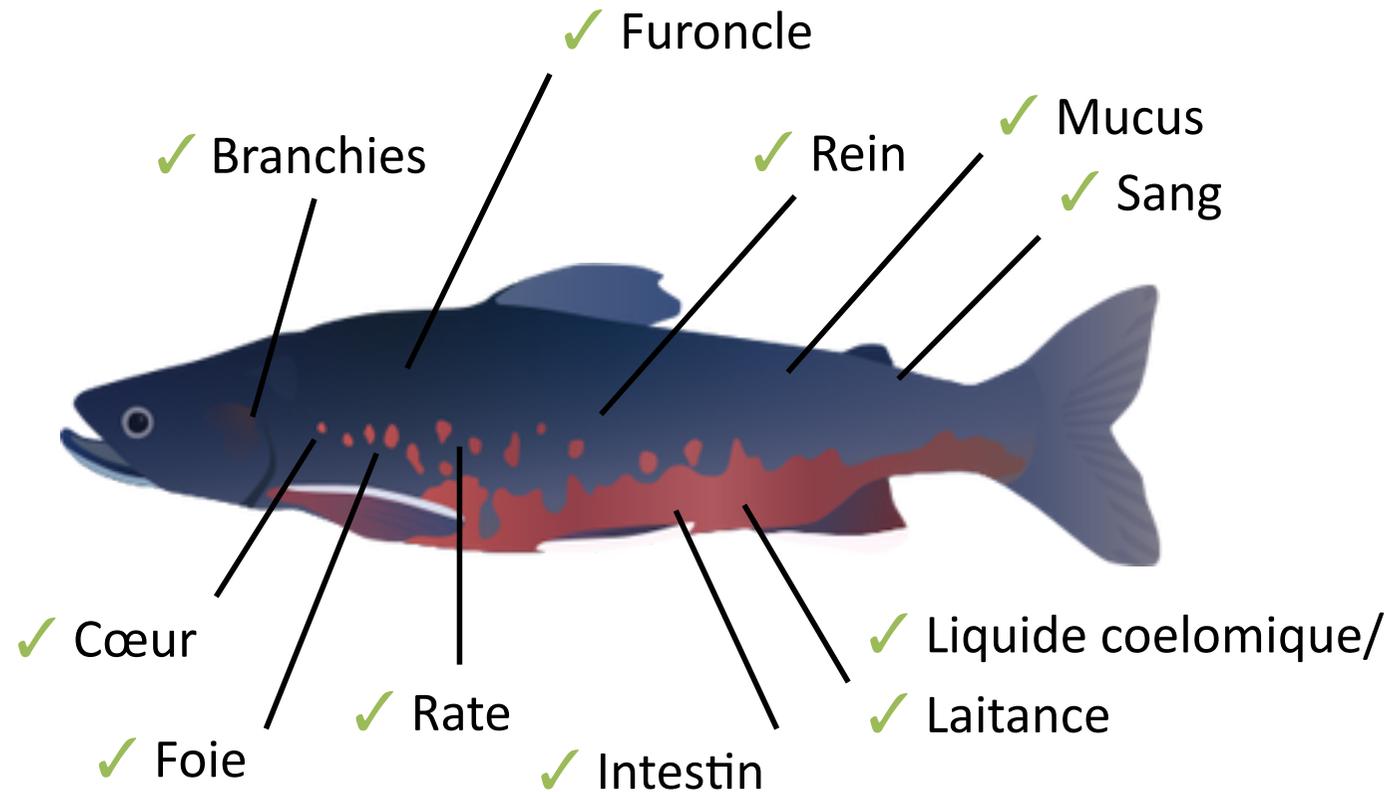
Amplification en chaîne par Polymérase :

- 90 échantillons analysés
- 5 couples d'amorces testés
- Optimisation du couple PAAS 1-2

Clonage séquençage :

- 16 échantillons analysés pour validation des résultats (GATC Biotech)

Résultats :

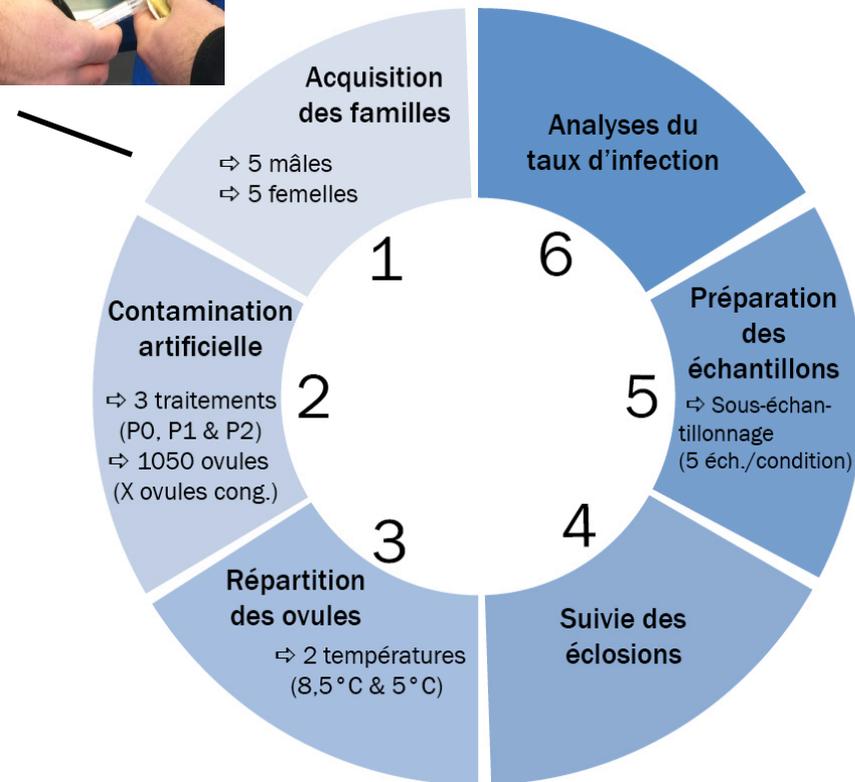


- 4 poissons échantillonnés (✓ Poisson n°1 uniquement)
- 4 milieux de cultures utilisés
- 3 températures d'incubation testées (✓ 6°C, ✓ 14°C, ✓ 22°C)

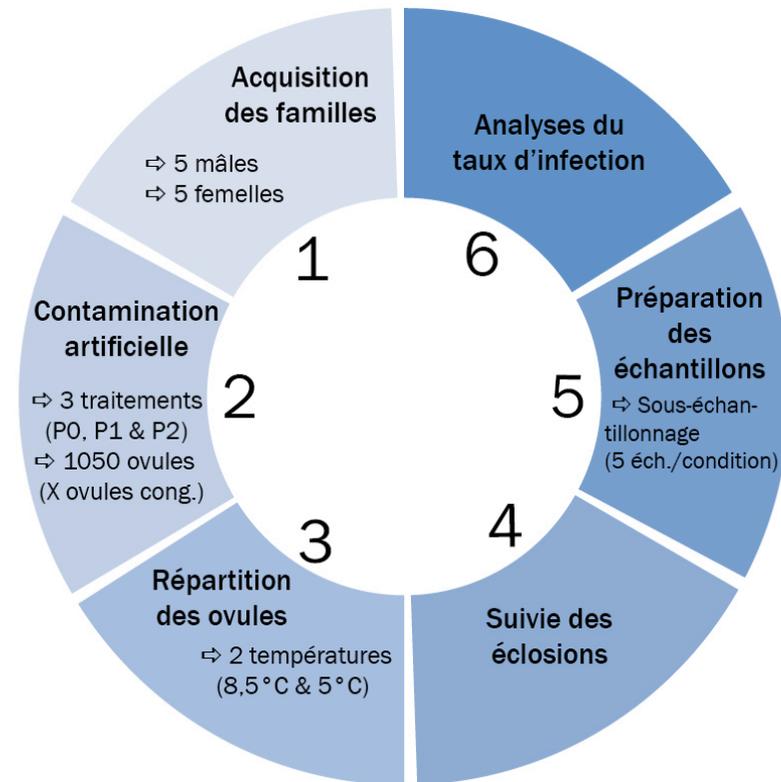
Matériels et méthodes

Analyser l'effet de la température sur
l'interaction hôte/pathogène

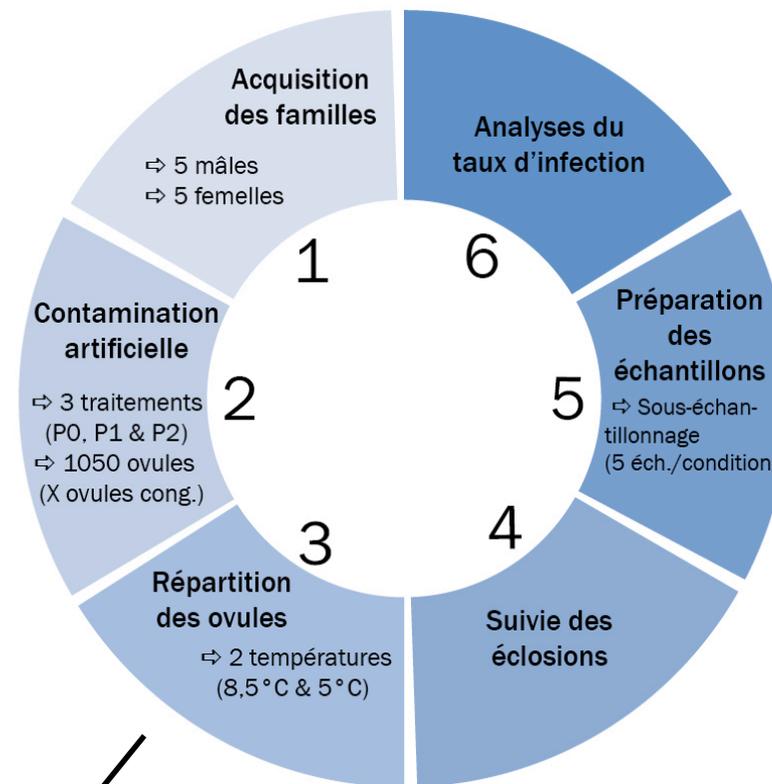
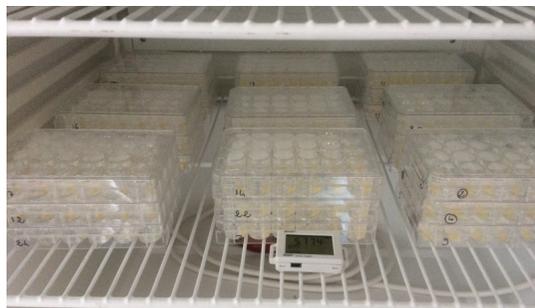
Expérience d'infection des œufs



Expérience d'infection des œufs

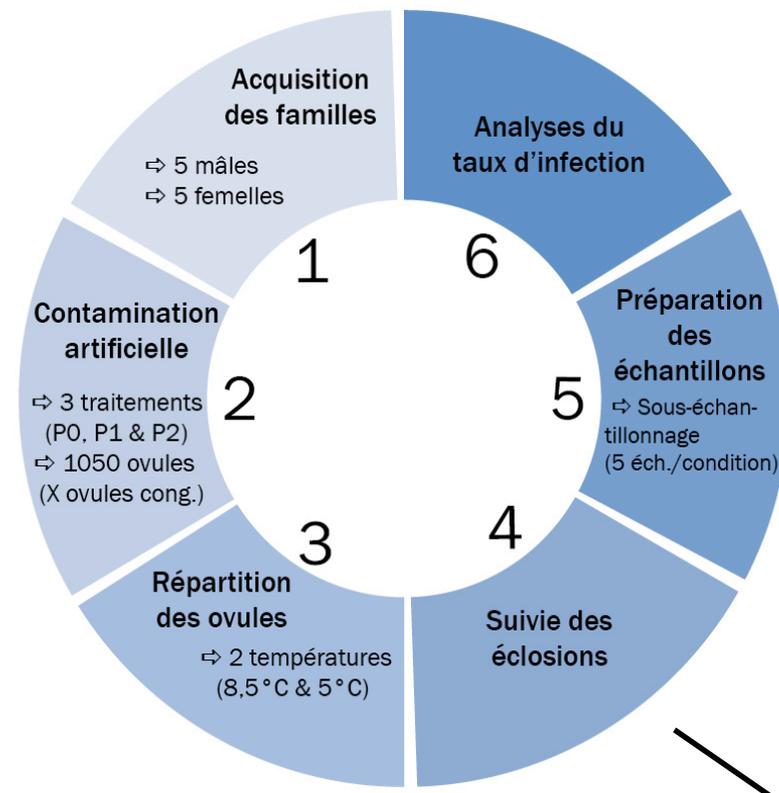


Expérience d'infection des œufs

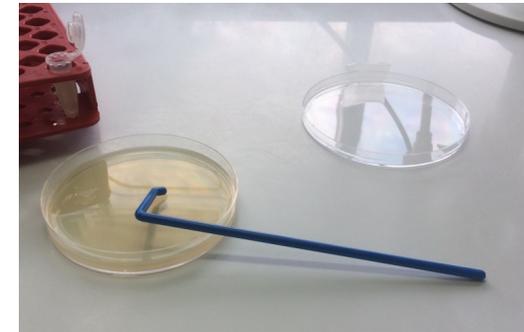
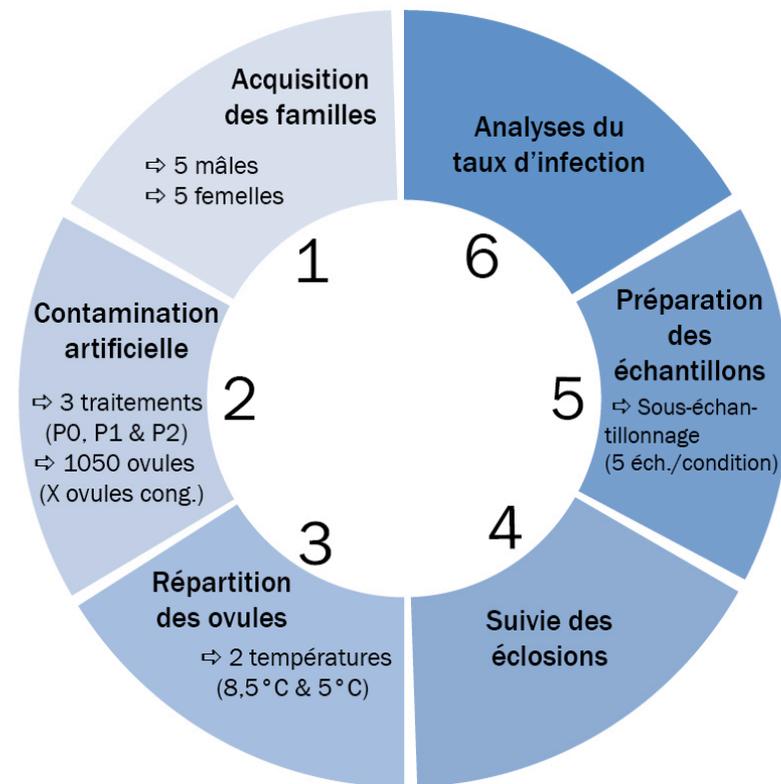


5°C & 8,5°C

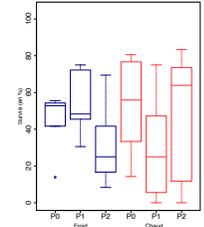
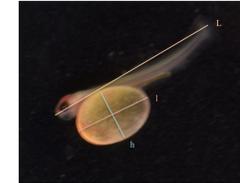
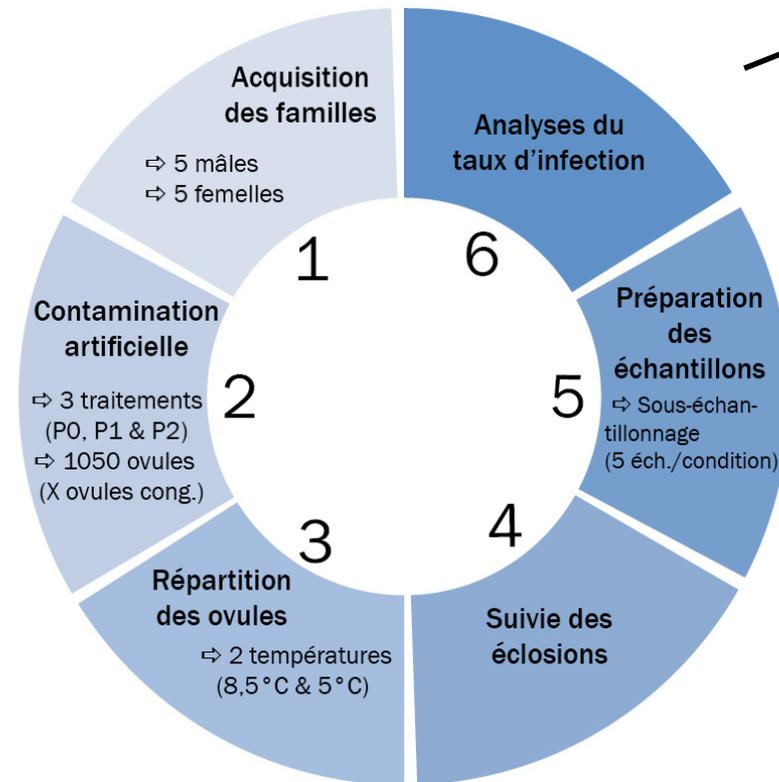
Expérience d'infection des œufs



Expérience d'infection des œufs



Expérience d'infection des œufs



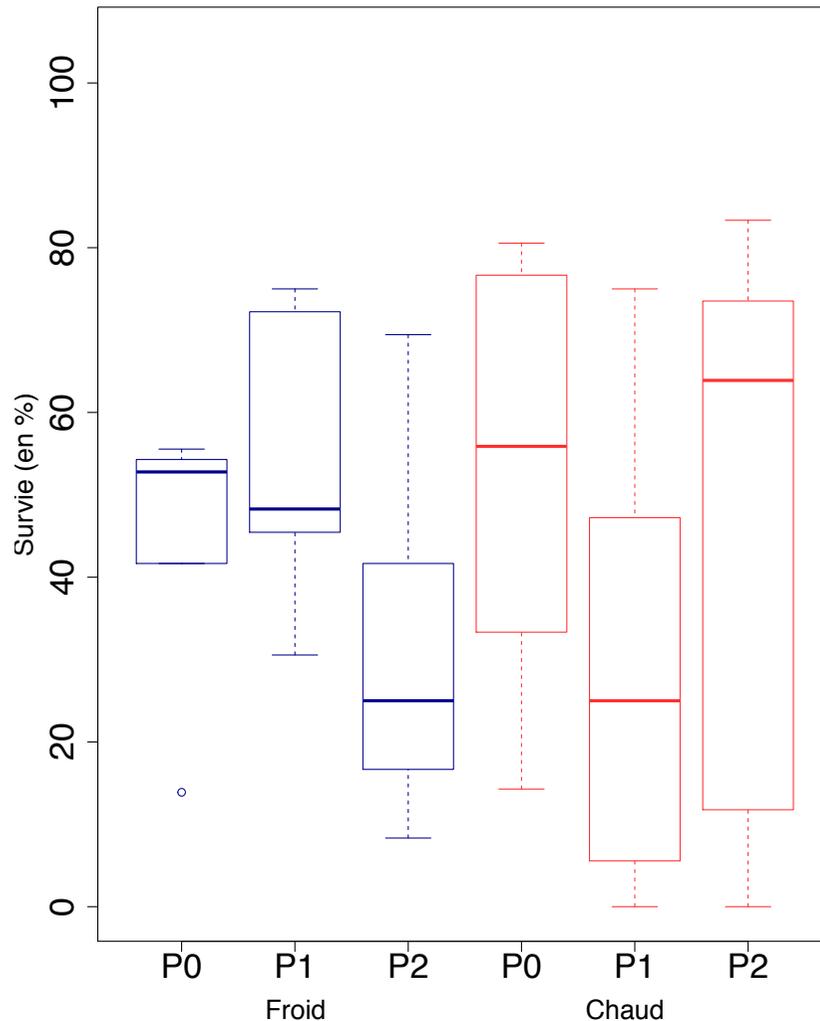
% d'éclosion
% d'infection
Caractères morphologique



Résultats et discussion

Analyser l'effet de la température sur
l'interaction hôte/pathogène

Pourcentage de survie des œufs



Grande variance des données :

↪ Biais non contrôlé (variance entre familles)

↪ Biais méthodologique (hétérogénéité des températures au sein des incubateurs)

Pourcentage de survie des œufs

(Modèle Linéaire Généralisé à effets Mixtes)

Effets fixes :

- Traitement pathogène
- Température

Effets aléatoires :

- Famille
- Position dans l'incubateur

Modèle : $\text{Éclosion} \sim \text{Traitement en pathogène} + \text{température}$
(sans interaction)

Pourcentage de survie des œufs

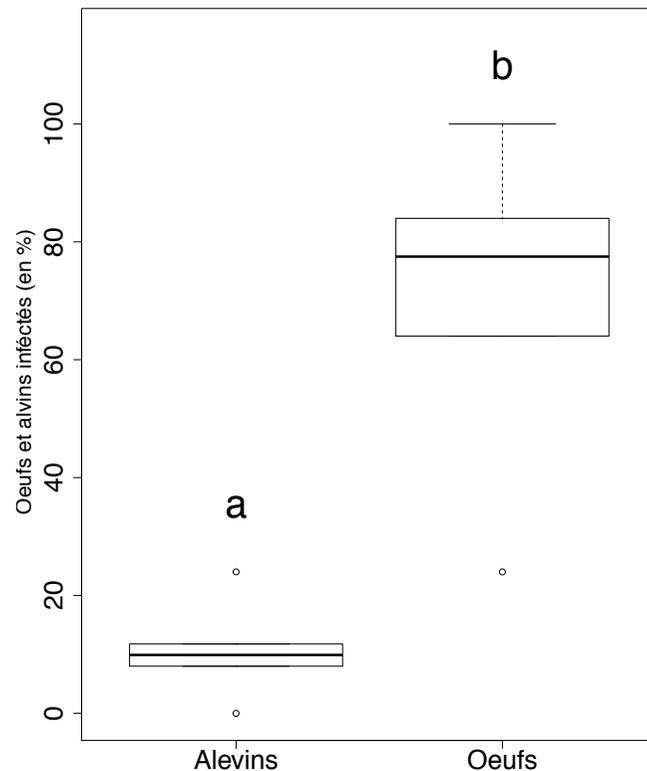
(Modèle Linéaire Généralisé à effets Mixtes)

Résultats :

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 **

- Température joue un rôle dans la survie des œufs
- Les chances de survie diminuent avec l'augmentation de la concentration en pathogène

Pourcentage d'infection



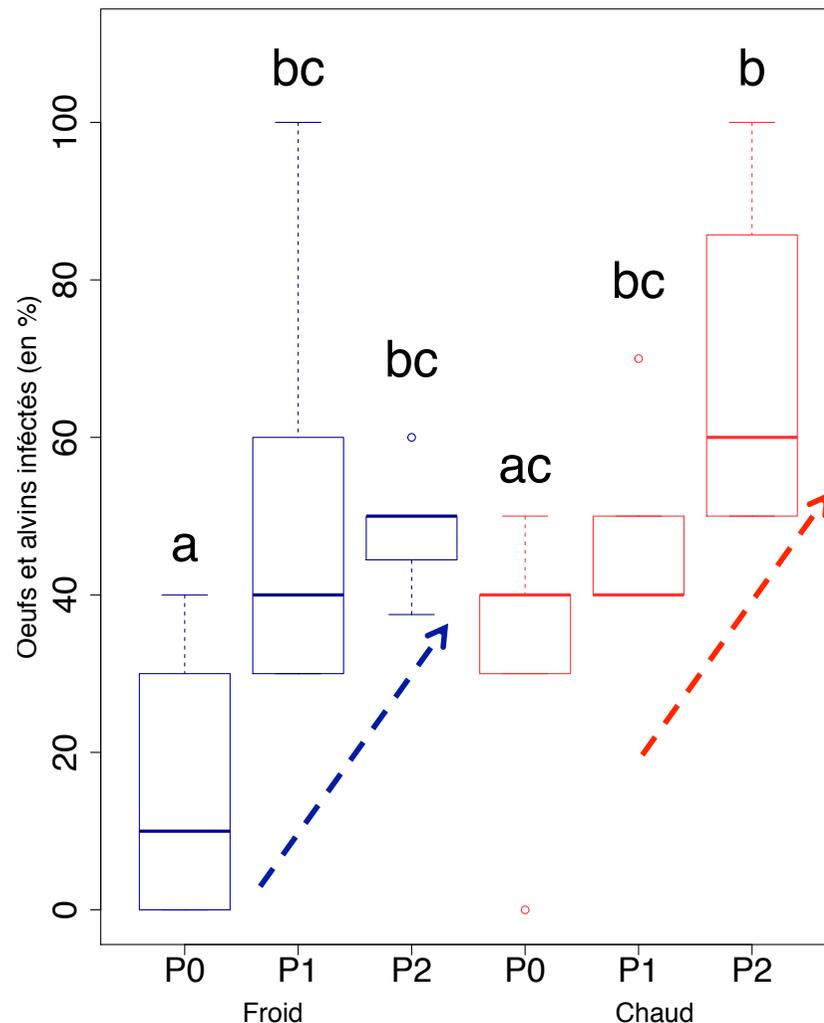
(Mann-Whitney, $p = 0,006$, $N = 12$)

Infection chez les œufs mort et les alevins :

- Peu d'alevins infectés par rapport au œufs mort

↪ Lien entre mort et infection ???

Pourcentage d'infection



(Kruskal-Wallis, $p = 0,014$, $N = 30$)

(Dunn, $p < 0,05$, $N = 30$)

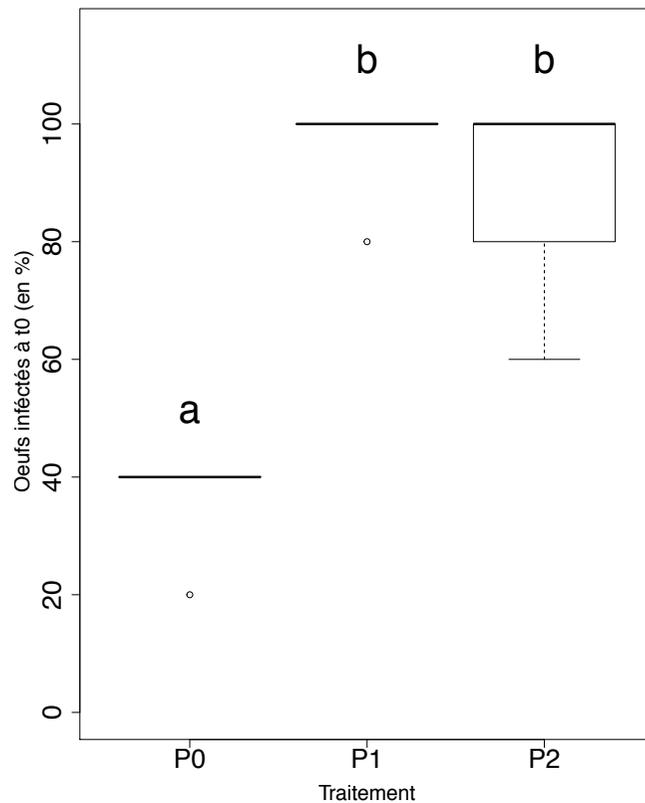
Pourcentage d'infection des œufs et des alevins :

- Tendence à l'augmentation de l'infection à mesure que l'on augmente la concentration en pathogène et qu'on augmente la température

Problèmes :

- ↳ Pas assez de point
- ↳ Individus témoins infectés rajoutant de la variabilité

Pourcentage d'infection



(Kruskal-Wallis, $p = 0,004$, $N = 15$)

(Dunn, $p < 0,05$, $N = 15$)

Oeufs infectés à t0 :

- Différence significative entre traitement témoin et traitement P1, P2
 - ↳ Contamination artificielle réussie
- Témoins infectés
 - ↳ Mise en évidence d'un **transfert vertical** de la mère à l'œuf (liquide cœlomique)

Conclusions et perspectives

Conclusion

- ✓ Mise en évidence du transfert horizontal ET vertical du pathogène
- ✓ Température joue un rôle important dans la survie des œufs
- ✓ Chances de survie chez les œufs diminuent à mesure que l'on augmente la concentration en bactéries dans le milieu
- ✓ Infection beaucoup plus rare chez les alevins que chez les œufs = œufs infectés sont-ils voués à mourir??
- ✓ La concentration en pathogène et la température ont tendance à augmenter l'infection chez les œufs et les alevins

Perspective

Cependant :

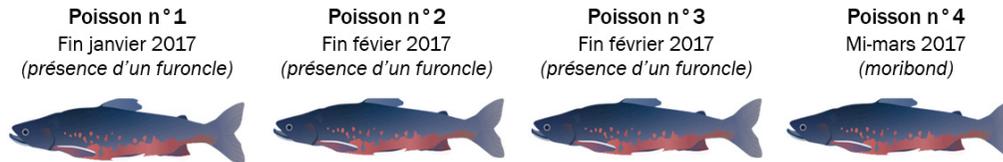
Pas d'effet synergique de la température et de la virulence bactérienne

- Une nouvelle expérience avec des incubateurs où la température serait plus homogène au cours du temps
- Utiliser des géniteurs sauvages pour obtenir des œufs de meilleure qualité et ainsi limiter la mortalité chez les témoins
- Analyser les caractères morphologiques

Merci de votre attention...

AVEZ-VOUS DES QUESTIONS???

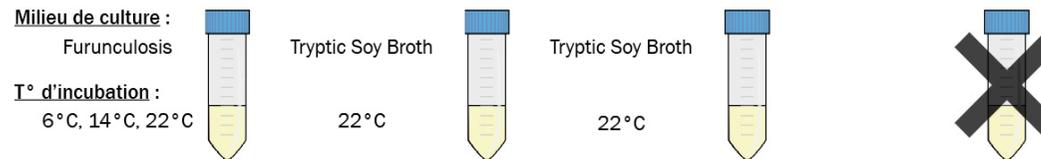
ÉTAPE N° 1 : Échantillonnage



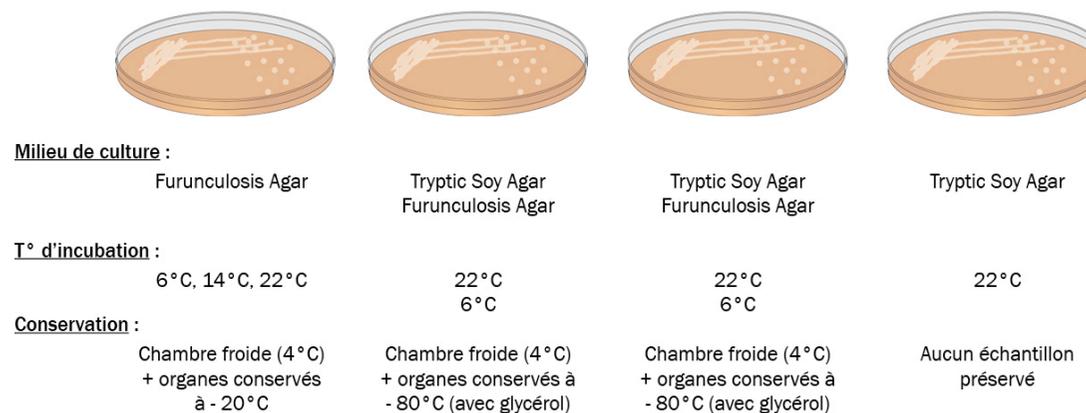
Échantillons prélevés :

Liquide coelomique	+	+	-	+
Laitance	-	-	+	-
Rein	+	+	+	+
Rate	+	+	+	+
Intestin	+	+	+	-
Foie	+	+	+	+
Branchies	+	+	+	-
Sang	+	+	+	+
Mucus	+	+	+	+
Furoncle	+	+	+	-
Coeur	-	+	+	-

ÉTAPE N° 2 : Ensemencement



ÉTAPE N° 3 : Isolement





Amplification en chaine par polymérase
E. Richy (INRA)

4 poissons échantillonnés
35 tissus prélevés
90 échantillons analysés

5 couples d'amorces testés
PAAS 1-2 ; MIY 1-2 ; ISasas4 F-R ; Asg 1-2 ; Fer 3-4

Optimisation de l'ensemble de ces amorces
Objectif : cibler spécifiquement *Aeromonas salmonicida*

5 témoins d'*A. salmonicida* analysés pour validation
Fournis par l'INRA de Jouy en Josas

Maldi-Tof
Laboratoires : Vet'eau & Lda 39



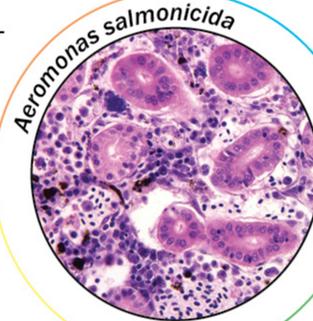
29 échantillons analysés (Validés par deux laboratoires indépendants)

Des échantillons incubés aux trois températures ont été sélectionnés

Un échantillon de chaque tissu a été analysé

Les 5 échantillons témoins de Jouy ont été testés pour vérification

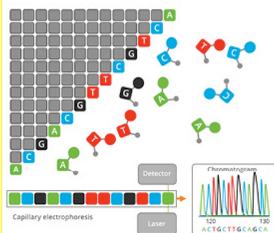
N.B. L'échantillon d'*A. salmonicida* ayant servi à l'infection des oeufs d'Omble chevalier a également été analysé par ces laboratoires



Clonage séquençage
Clonage: *E. Richy (INRA)*
Séquençage : *GATC Biotech*

16 échantillons analysés
La stratégie de selection des échantillons a été identique que celle utilisée pour l'analyse Maldi-Tof

Les échantillons ont tous préalablement été testés avec le couple d'amorces PAAS 1-2



6 clones de chaque échantillon ont été séquencés

Caractérisations biochimiques
Laboratoires : Vet'eau & Lda 39

Coloration de Gram
Bactérie à Gram négatif

Aspect des colonies avec pigment
Aeromonas salmonicida produit des pigments marrons sur gélose

Culture à 22 °C et à 37 °C
L'optimum de croissance d'*A. salmonicida* est 22 °C et est incapable de se développer à 37 °C

Oxydase
Bactérie à oxydase positive

