

# Thèse de Doctorat

Y. J. Charlène  
**SIEKOULA-NGUEDIA**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention  
du grade de Docteur d'Oniris  
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans*

**Discipline** : Biologie, Médecine et Santé

**Spécialité** : Biologie moléculaire et Microbiologie

**Laboratoire** : Aquaculture, Equipe VIP, UMR INRA – Oniris BioEpaR

**Soutenue le 30 Octobre 2012**

## Etude de la variabilité génétique de *Flavobacterium psychrophilum*, pathogène de salmonidés

### JURY

Rapporteurs : **Mlle. Frederique LEROUX**, Chargée de recherche, Ifremer – Roscoff  
**M. Michel LE HENAFF**, Maître de conférences, Bordeaux Sciences Agro

Examineurs : **Mme. Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE**, Professeure, Université de Nantes  
**M. Thomas WAHLI**, PD, Université de Bern (Suisse)

Directeur de Thèse : **Mme Laurence MALANDRIN**, Chargée de recherche, INRA – Centre Angers Nantes

Co-directeur de Thèse : **M. Eric DUCHAUD**, Directeur de recherche, INRA – Centre Jouy-en-Josas

## ***Remerciements***

Ces trois dernières années ont constitué pour moi une étape clé de ma vie, avec son lot de moments exaltants et de grandes remises en questions. Cette aventure s'est construite avec la participation de plusieurs acteurs que je ne pourrais pas manquer de remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Henri Seegers, ainsi que Mme Christine Fourichon de m'avoir accueillie au sein de l'UMR INRA-Oniris BioEpAR.

Merci à Mlle Frédérique LeRoux et Mr Michel LeHenaff d'avoir accepté d'examiner ma thèse. Mes sincères remerciements à Mme Berthe-Marie Imbert-Marcille et à Mr Thomas Wahli qui ont très aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Mes vifs remerciements à Laurence Malandrin qui a accepté la direction de ma thèse, et qui s'y est impliquée de manière considérable. Merci d'avoir fait plus que ton travail de directrice.

Merci à Mr Eric Duchaud, mon co-directeur de thèse, qui a été l'un des instigateurs de ce projet. Merci pour ton aide et ta disponibilité.

Je ne peux oublier Ségolène Calvez, qui a été mon encadrante au quotidien. Je te remercie sincèrement pour ton soutien. Tu t'es toujours montrée attentive à mon égard et tu as su faire preuve de délicatesse envers moi.

Que dire des « filles d'Aqua », Catherine Fournel, Michaëlle Larhantec et Isabelle Perray, les techniciennes du service d'Aquaculture ? Je vous remercie pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre efficacité. Nos fous rires dans la cafétéria auront été de belles poses dans mes journées. Entre les truites glacées, Dédé et 'dame Catherine, les campagnes d'échantillonnage auront laissé grâce à vous des souvenirs impérissables...

Je souhaite remercier tous les pisciculteurs de la région de Morlaix qui nous ont ouvert leurs sites de production, ainsi que le Mathieu Jamin, pour ses conseils.

Merci à Anne Frieda, (ex !) camarade doctorante pour son écoute et sa gentillesse. Merci à Philippe, mon collègue de bureau et tous les autres doctorants de l'UMR pour la bonne ambiance.

Merci à mes amies de longue date, Rolande, Helmie et Sabrinna, à Sandra et Thomas, ainsi qu'à Célimène et à Rouillon, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ces trois années.

Un hommage particulier à mes parents et mes frères qui, dès mes premiers instants ont tout mis en œuvre pour me pousser toujours plus loin. Vous avez cru en moi, et malgré la distance qui nous sépare depuis si longtemps, vous avez toujours été présents. Merci pour votre investissement, vos prières, et vos encouragements. Merci papa pour ton conseil avisé. Merci maman pour ton indéfectible présence.

Merci à mon époux Patrick, qui a vécu cette thèse avec moi. Merci d'avoir tout supporté dans le silence et d'avoir créer une atmosphère propice à ma réussite. Ta présence et ton affection ont été un profond réconfort.

Enfin, merci à Papa qui a toujours veillé sur moi.

## ***Valorisation du travail de thèse***

- **Article dans périodiques internationaux à comité de lecture**

Siekoula-Nguedia, C., Blanc, G., Duchaud, E., Calvez, S., 2012, Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. *Veterinary Microbiology*, Available online 20 July 2012, ISSN 0378-1135, 10.1016/j.vetmic.2012.07.022.

- **Communication orale avec actes dans un congrès ou symposium international**

Siekoula-Nguedia, C., Blanc, G., Duchaud, E., Calvez, S. Insight into the genetic diversity and population structure of *Flavobacterium psychrophilum* in France. *Flavobacterium 2012*, Turku, 5-7 juin 2012.

- **Communications par affiche dans un congrès international ou national**

Siekoula Y. J. C., Calvez S., Blanc G., Duchaud E., Seegers H., 2010. Markers selection for molecular epidemiology of *Yersinia ruckeri* and *Flavobacterium psychrophilum*, major pathogenic bacteria in salmonid farming. *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM)*, Nantes, France, 2010/03/24-26.

Siekoula Y. J. C., Duchaud E., Blanc G., Calvez S., 2011. Insight into genetic diversity and population structure of *Flavobacterium psychrophilum* in France via an MLST approach. in *4. Congress of European Microbiologists*, Genève, Suisse, 2011/06/26-30.



# ***Table des matières***

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b><i>CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</i></b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>2. VARIABILITE GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Origines de la diversité génétique.....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Mutations.....	7
2.1.1.1. Caractéristiques.....	7
2.1.1.2. Mutations sans changement du cadre de lecture : substitutions .....	8
2.1.1.3. Mutations avec changement du cadre de lecture : insertions et délétions de bases.....	9
2.1.2. Transfert et intégration de matériel génétique exogène : parasexualité des bactéries .....	10
2.1.3. Répétitions de séquences.....	11
2.1.4. Remaniements chromosomiques .....	13
<b>2.2. Etude de la variabilité génétique : le génotypage .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. Critères de choix d'une méthode de génotypage .....	13
2.2.2. Principales méthodes d'étude de la variabilité génétique .....	14
2.2.2.1. Méthodes basées sur l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments d'ADN .....	16
2.2.2.1.1. Restriction enzymatique : RFLP et PFGE .....	16
2.2.2.1.2. Amplification par PCR : RAPD, AP-PCR, Rep-PCR, MLVA, DGE et HRM.....	18
2.2.2.1.3. Restriction enzymatique associée à la PCR : AFLP et PCR-RFLP .....	20
2.2.2.1.4. Méthodes d'analyse des profils électrophorétiques .....	21
2.2.2.2. Méthodes combinant amplification par PCR et gradient de dénaturation .....	22
2.2.2.2.1. DGE (Denaturing Gradient Electrophoresis).....	22

2.2.2.2.2.	HRM (Hight Resolution Melting) analysis.....	23
2.2.2.3.	Méthodes basées sur l'analyse de séquences .....	24
2.2.2.3.1.	Analyse des SNP (Single Nucleotide Polymorphism).....	24
2.2.2.3.2.	MLST (Multi Locus Sequence Typing).....	25
2.2.2.3.3.	MST (Multispacer Typing).....	26
2.2.2.3.4.	Méthode d'analyse des résultats .....	26
2.2.2.4.	Méthodes basées sur l'hybridation moléculaire .....	26
2.2.2.4.1.	Macropuces à ADN .....	27
2.2.2.4.2.	Micropuces ADN.....	28
2.2.3.	Bilan des avantages et inconvénients des différentes méthodes.....	29
<b>2.3.</b>	<b>Variabilité génétique et structures de population .....</b>	<b>31</b>
2.3.1.	Notion d'espèce bactérienne .....	31
2.3.2.	Marqueurs de variabilité génétique au sein de populations bactériennes.....	32
2.3.3.	Structures de population.....	34
2.3.4.	Impact des variations génétiques et de la sélection naturelle sur la structure de population .....	36
<b>3.</b>	<b>LA FLAVOBACTERIOSE ET SON AGENT .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.</b>	<b>La maladie .....</b>	<b>39</b>
3.1.1.	Historique .....	39
3.1.2.	Espèces concernées .....	39
3.1.3.	Répartition géographique .....	40
3.1.4.	Signes cliniques.....	43
3.1.5.	Epidémiologie de la flavobactériose .....	44
3.1.5.1.	Réservoirs .....	44
3.1.5.2.	Transmission horizontale .....	44
3.1.5.3.	Transmission verticale .....	45
3.1.6.	Mécanismes de pathogénicité.....	46
3.1.7.	Méthodes de lutte .....	46
3.1.7.1.	Mesures préventives.....	46
3.1.7.2.	Mesures thérapeutiques.....	48
<b>3.2.</b>	<b>L'agent <i>Flavobacterium psychrophilum</i>.....</b>	<b>49</b>
3.2.1.	Taxonomie.....	49
3.2.2.	Morphologie et caractéristiques .....	49
3.2.3.	Méthodes d'identification.....	50
3.2.3.1.	Culture et identification phénotypique.....	50
3.2.3.2.	Détection et identification moléculaire .....	52
3.2.4.	Variabilité phénotypique .....	53

3.2.5.	Typage moléculaire .....	55
<b>OBJECTIFS DETAILLES DE LA THESE .....</b>		<b>67</b>
<b>CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES.....</b>		<b>71</b>
<b>1. ISOLEMENT, CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET CONSERVATION DE <i>F. PSYCHROPHILUM</i> .....</b>		<b>73</b>
<b>2. ISOLATS BACTERIENS UTILISES DANS L'ETUDE.....</b>		<b>74</b>
2.1.	Souches de référence.....	74
2.2.	Isolats échantillonnés sur l'arc Atlantique français.....	76
2.3.	Isolats échantillonnés dans un bassin versant de Bretagne .....	80
2.3.1.	Contexte géographique.....	80
2.3.2.	Stratégie d'échantillonnage .....	81
<b>3. EXTRACTION D'ADN ET IDENTIFICATION MOLECULAIRE.....</b>		<b>82</b>
<b>4. ANALYSE MLST.....</b>		<b>83</b>
4.1.	Méthodologie .....	84
4.2.	Analyse des résultats de MLST.....	88
4.2.1.	Analyse des séquences .....	88
4.2.2.	Recombinaison et structure de population.....	88
4.2.3.	Analyses phylogénétiques .....	89
<b>5. ANALYSE PFGE .....</b>		<b>90</b>
5.1.	Méthodologie .....	91
5.2.	Analyse des résultats.....	93
5.2.1.	Evaluation de la similarité des profils .....	93
5.2.2.	Analyse phylogénétique .....	93
5.2.3.	Attribution de pulsotype et de cluster.....	94
5.2.4.	Mesure de la diversité génotypique.....	94

<b>CHAPITRE III. RESULTATS.....</b>	<b>95</b>
<b>1. MISE AU POINT DE L'IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE <i>F. PSYCHROPHILUM</i> PAR PCR DUPLEX <i>GYRA/GYRB</i> .....</b>	<b>97</b>
<b>2. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DE <i>F. PSYCHROPHILUM</i> DANS L'ARC ATLANTIQUE FRANÇAIS PAR LA METHODE MLST.....</b>	<b>98</b>
2.1. Identification moléculaire des isolats .....	98
2.2. Analyse des séquences des gènes de ménage.....	98
2.3. Assignation des allèles types (ATs) et profils alléliques (STs) .....	99
2.3.1. Identification et localisation des SNPs .....	99
2.3.2. Identification des ATs .....	102
2.3.3. Identification des profils alléliques .....	102
2.4. Liens évolutifs entre profils alléliques et analyse phylogénétique.....	105
2.5. Analyse des évènements de recombinaison et structure de population .....	108
2.5.1. Test PHI .....	108
2.5.2. Analyse « Split Decomposition » .....	108
2.5.3. Indice d'association standardisé et structure de population .....	109
2.6. Répartition géographique des isolats .....	111
2.7. Répartition par organe interne/externe .....	112
<b>3. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DE <i>F. PSYCHROPHILUM</i> DANS UN BASSIN VERSANT FRANÇAIS PAR LA METHODE PFGE .....</b>	<b>115</b>
3.1. Description du site d'étude, suivi des lots de poissons et isolement de <i>F. psychrophilum</i> .....	115
3.2. Prévalence d'infection des poissons et résultats des dénombrements au cours de l'année.....	118
3.3. Etude de la variabilité génétique de <i>F. psychrophilum</i> , collectés dans un bassin versant, par la méthode PFGE .....	122
3.3.1. Variabilité génétique à l'échelle d'un poisson .....	122
3.3.1.1. Bilan et origine des isolats collectés pour cette analyse.....	122
3.3.1.2. Analyse PFGE des isolats collectés .....	125

3.3.2.	Etudes de variabilité génétique de <i>F. psychrophilum</i> par site piscicole d'origine.....	130
3.3.2.1.	Site A .....	130
3.3.2.2.	Site B .....	133
3.3.2.3.	Site C .....	136
3.3.2.4.	Site D .....	137
3.3.3.	Comparaison des 4 sites : variabilité observée, communauté de pulsotypes.....	139
3.3.4.	Analyse globale des sites : variabilité génétique de <i>F. psychrophilum</i> au niveau du bassin versant.....	140
 <b>4. COMPARAISON DES METHODES PFGE ET MLST POUR L'ANALYSE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DE <i>F. PSYCHROPHYLUM</i> .....</b>		<b>145</b>
<b>4.1.</b>	<b>Choix des isolats .....</b>	<b>145</b>
<b>4.2.</b>	<b>Analyse MLST.....</b>	<b>148</b>
4.2.1.	Analyse des séquences des gènes de ménage .....	148
4.2.2.	Identification des allèles types (ATs) et des profils alléliques.....	149
4.2.3.	Analyse des liens évolutifs entre profils alléliques.....	152
4.2.4.	Analyse de la recombinaison : analyse « Split decomposition » et Test PHI.....	153
<b>4.3.</b>	<b>Comparaison des résultats et pouvoirs discriminants .....</b>	<b>155</b>
4.3.1.	Pouvoir de discrimination des isolats .....	155
4.3.2.	Analyse de diversité .....	156
4.3.3.	Comparaison des liens phylogénétiques.....	156
 <b>DISCUSSION - CONCLUSIONS.....</b>		<b>161</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>177</b>
 <b>ANNEXE.....</b>		<b>201</b>
 <b>Annexe 1 : Préparation des milieux de culture.....</b>		<b>203</b>
1.	Milieux FLP .....	203
2.	Milieu TSA .....	203
 <b>Annexe 2 : Solutions utilisées pour la PFGE .....</b>		<b>204</b>
1.	Préparation des solutions mères .....	204
2.	Tampon TE .....	204
3.	Tampon Cell Suspension .....	204

4. Tampon de lyse .....	205
5. Références et fournisseurs des réactifs et agarose utilisés en PFGE .....	205
<b>Annexe 3 : Fiche commémorative pour l'échantillon « arc Atlantique» .....</b>	<b>206</b>
<b>Annexe 4 : Fiches relatives à l'échantillonnage dans un bassin versant breton .....</b>	<b>212</b>
1. Fiche de renseignement.....	212
2. Fiche commémorative.....	214
<b>Annexe 5 : Liste des logiciels utilisés dans l'étude et leur lien de téléchargement et/ou utilisation on-line</b>	<b>215</b>
1. Traitement de séquences .....	215
2. Traitement de données MLST.....	215
3. Traitements d'images.....	216
4. Outils statistique.....	216
<b>Annexe 6 : Valorisation scientifique .....</b>	<b>217</b>

# Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Schématisation des différents types de mutations de bases nucléotidiques.....	9
<b>Figure 2:</b> Schématisation des événements d'insertion et de délétion de bases nucléotidiques. .....	10
<b>Figure 3:</b> Diagramme des méthodes de génotypage basées sur le polymorphisme de longueur. .....	15
<b>Figure 4:</b> Diagramme des méthodes de génotypage basées sur le séquençage de marqueurs génétiques.....	24
<b>Figure 5:</b> Diagramme des méthodes de génotypage basées sur l'hybridation ADN-ADN.....	27
<b>Figure 6:</b> Arbre phylogénétique hypothétique décrivant la divergence évolutive entre des génotypes de bactéries.....	33
<b>Figure 7:</b> Représentation des structures de populations. ....	35
<b>Figure 8:</b> Diversité et nombre d'états alléliques affectant la diversité. ....	36
<b>Figure 9:</b> Signes cliniques externes de la flavobactériose des eaux froides chez des truites arc- en-ciel. ....	44
<b>Figure 10:</b> Culture de <i>F. psychrophilum</i> en culture.....	50
<b>Figure 11:</b> Isolement, caractérisation biochimique et conservation des isolats bactériens. ....	74
<b>Figure 12:</b> Origine géographique des isolats. ....	76
<b>Figure 13:</b> Positionnement des piscicultures et liens commerciaux.....	81
<b>Figure 14:</b> Schématisation des étapes de la MLST .....	84
<b>Figure 15:</b> Schématisation des étapes de la PFGE .....	90
<b>Figure 16:</b> Amplification par PCR des gènes <i>gyrA</i> et <i>gyrB</i> pour l'identification spécifique de <i>F. psychrophilum</i> .....	97
<b>Figure 17:</b> Positionnement des SNPs sur les variants alléliques des gènes de ménage. ....	101
<b>Figure 18:</b> Fréquences des profils alléliques dans l'échantillon des isolats de <i>F.</i> <i>psychrophilum</i> de l'arc Atlantique. ....	105
<b>Figure 19:</b> Liens évolutifs entre STs représentés sous la forme d'un diagramme e-BURST.. .....	106

<b>Figure 20:</b> Arbre phylogénétique circulaire des 66 isolats de <i>F. psychrophilum</i> collectés dans l’arc Atlantique français et des souches de référence JIP 02/86 et NCIMB 1947 <sup>T</sup> .....	107
<b>Figure 21:</b> Analyse de « split decomposition » des STs retrouvés dans l’arc Atlantique français. ....	109
<b>Figure 22:</b> Clusterisation des 15 STs selon leur distance génétique. ....	110
<b>Figure 23:</b> Répartition géographique des profils alléliques (STs) selon les régions. ....	111
<b>Figure 24:</b> Evolution du pourcentage de poissons infectés par site piscicole dans un bassin versant breton, et évolution des températures moyennes. ....	120
<b>Figure 25:</b> Comparaison des profils des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sélectionnés pour l’étude de variabilité génétique à l’échelle d’un poisson, échantillonnés sur le site A. ....	125
<b>Figure 26:</b> Comparaison des profils des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sélectionnés pour l’étude de variabilité génétique à l’échelle d’un poisson, collectés sur des truites du site B. ....	126
<b>Figure 27:</b> Comparaison des profils des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sélectionnés pour l’étude de variabilité génétique à l’échelle d’un poisson, collectés sur les sites C et D. ....	127
<b>Figure 28:</b> Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l’indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE <i>salI</i> des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sur le site A. ....	131
<b>Figure 29:</b> Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l’indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE <i>salI</i> des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sur le site B. ....	134
<b>Figure 30:</b> Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l’indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE <i>salI</i> des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sur le site C. ....	136
<b>Figure 31:</b> Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l’indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE <i>salI</i> des isolats de <i>F. psychrophilum</i> sur le site D. ....	138
<b>Figure 32:</b> Dendrogramme représentant les 90 pulsotypes obtenus sur l’ensemble des 4 sites de l’étude. ....	141
<b>Figure 33:</b> Pulsotypes des isolats choisis pour la comparaison des méthodes MLST et PFGE. ....	147
<b>Figure 34:</b> Diagramme e-BURST des isolats sélectionnés pour la comparaison des méthodes PFGE et MLST. ....	152



**Figure 35:** Analyse de « split decomposition » des STs retrouvés dans le bassin versant breton..... 153

**Figure 36:** Dendrogramme de l'ensemble des pulsotypes observés un bassin versant de Bretagne, et isolats de l'étude comparative MLST-PFGE.....158



# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Familles de séquences répétées chez les procaryotes .....	12
<b>Tableau 2</b> : Caractères des principales méthodes de génotypage.....	30
<b>Tableau 3</b> : Sélection de méthode de génotypage selon la vitesse d'évolution des marqueurs. .....	34
<b>Tableau 4</b> : Principaux pays (A) d'Europe et (B) hors Europe, et espèces hôtes pour lesquels des cas de flavobactérioses ont été déclarés.....	41
<b>Tableau 5</b> : Caractéristiques biochimiques de <i>F. psychrophilum</i> . .....	51
<b>Tableau 6</b> : Harmonisation du système de sérotypage de <i>F. psychrophilum</i> .....	54
<b>Tableau 7</b> : Méthodes de génotypage appliquées à l'étude de la variabilité génétique de <i>F.</i> <i>psychrophilum</i> et leurs conclusions.....	60
<b>Tableau 8</b> : Caractéristiques des souches de référence. ....	75
<b>Tableau 9</b> : Isolats échantillonnés sur l'arc Atlantique français. ....	78
<b>Tableau 10</b> : Stratégies de prélèvement pour l'étude de la variabilité génétique de <i>F.</i> <i>psychrophilum</i> à l'échelle d'un poisson, d'une pisciculture et d'un ensemble de piscicultures. .....	82
<b>Tableau 11</b> : Amorces utilisées pour l'amplification des loci MLST. ....	87
<b>Tableau 12</b> : Caractéristiques des séquences des 7 loci MLST .....	99
<b>Tableau 13</b> : Nombre de SNPs observés selon le gène de ménage amplifié.....	100
<b>Tableau 14</b> : Nombre de variants alléliques pour chaque locus.....	102
<b>Tableau 15</b> : Variants (AT) et profils alléliques (ST) des isolats de l'arc Atlantique.....	103
<b>Tableau 16</b> : Résultats du test PHI obtenus pour chaque locus et pour la séquence concaténée. .....	108
<b>Tableau 17</b> : Répartition des STs par organe. ....	113
<b>Tableau 18</b> : Lots de poissons par site, suivis pour l'étude de variabilité génétique de <i>F.</i> <i>psychrophilum</i> dans un bassin versant. ....	117
<b>Tableau 19</b> : Nombre de poissons infectés par <i>F. psychrophilum</i> analysés par site et par mois.....	119
<b>Tableau 20</b> : Prévalence de poissons infectés en fonction du stade de développement.....	120

<b>Tableau 21</b> : Nombre d'isolats de <i>F. psychrophilum</i> isolés par mois sur chaque site piscicole. ....	121
<b>Tableau 22</b> : Origine des poissons (site, lot, numéro, mois, stade du poisson), nombre d'isolats collectés par organe (rate/branchie) et nombre de pulsotypes différents observés..	124
<b>Tableau 23</b> : Nombre de profils PFGE de <i>F. psychrophilum</i> pour des isolats provenant de rate ou de branchies.....	129
<b>Tableau 24</b> : Evolution mensuelle sur le site A du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. ....	132
<b>Tableau 25</b> : Evolution mensuelle sur le site B du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. ....	135
<b>Tableau 26</b> : Evolution mensuelle sur le site C du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. ....	137
<b>Tableau 27</b> : Evolution mensuelle sur le site D du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et puslotypes obtenus. ....	138
<b>Tableau 28</b> : Indices de Simpson calculés par site d'étude. ....	140
<b>Tableau 29</b> : Indices de Simpson calculés pour l'ensemble des sites. ....	142
<b>Tableau 30</b> : Correspondance entre clusters définis dans l'analyse globale des pulsotypes du bassin versant et clusters définis par sites. ....	143
<b>Tableau 31</b> : Caractéristiques des séquences des 7 loci MLST des 31 isolats de <i>F. psychrophilum</i> collectés dans un même bassin versant breton. ....	149
<b>Tableau 32</b> : ATs retrouvés dans la sélection d'isolats de <i>F. psychrophilum</i> collectés dans un bassin versant breton. Les nouveaux ATs sont soulignés. ....	150
<b>Tableau 33</b> : Variants (AT) et profils (ST) alléliques des isolats du bassin versant de Bretagne étudié. ....	151
<b>Tableau 34</b> : P-values du test PHI, pour chaque locus et pour les séquences concaténées...	154
<b>Tableau 35</b> : Indices de Simpson calculés pour chaque groupe d'isolats, selon la méthode de génotypage (PFGE ou MLST). ....	156

# Abréviations

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique

ADNc: ADN complémentaire

ADNg: ADN génomique

ADNr: ADN ribosomique

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

AP-PCR : Arbitrarily primed PCR

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

AT: Allèle type

BCWD : Bacterial Cold Water Disease

BET : Bromure d'éthidium

BIME : Bacterial Interspersed Mosaic Element

BSA : Bovine serum albumin

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DGE : Denaturing Gradient Electrophoresis

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ER : enzyme de restriction

ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

FR: fragment de restriction

FLP: (milieu) FLavobacterium Psychrophilum

HGMS: High Gradient Magnetic Separation

HRM: (analyse) High Resolution Melting

IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Technique

IRU : Intergenic repeat unit

IS: Insertion Sequence

Kb: kilobase

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification

Mb: mégabase

MITE: Miniature Inverted Repeat Transposable Elements

MLST: MultiLocus Sequence Typing

MLVA: MultiLocus VNTR Analysis  
mM: millimolaire  
MST: MultiSpacer Typing  
OMF: Outer Membrane Fraction  
ONPG: Ortho-Nitro-Phénol-Galactopyranoside  
Pb: paire de bases  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis  
PU: Palindromic Units  
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA  
REP: Repetitive Extragenic Palindromic  
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism  
RTFS: Rainbow Trout Fry Syndrome  
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
SNP: Single Nucleotid Polymorphism  
ST: Séquence type  
Tn : Transposon  
TSA: Trypticase Soja Agar  
TTGE: Temporal Temperature Gel Electrophoresis  
TYE: Tryptone Yeast Extract  
UV: ultraviolet  
VNTR: Variable Number of Tandem Repea

# Introduction générale

Les produits issus de milieux aquatiques (pêche et aquaculture) constituent aujourd'hui une part importante de la production alimentaire à l'échelle mondiale. Ce secteur représente un flux financier du même ordre de grandeur que le secteur de la production de viande (FAO, 2008). En réponse à l'épuisement des stocks de pêche et face à une croissance démographique importante (en Asie notamment, et en Chine plus particulièrement), la production piscicole mondiale a considérablement augmenté depuis ces 50 dernières années. Elle correspond actuellement au tiers des poissons consommés dans le monde et tend vers l'équilibre de la consommation de poisson (½ pêche, ½ aquaculture) dans les années qui viennent (FAO, 2008).

L'essor de l'aquaculture qui voit une production d'espèces très diverses, repose en grande partie sur l'élevage de poissons d'eau douce et de mollusques. En 2004, les espèces aquacoles les plus produites dans le monde étaient l'huître japonaise *Crassostrea gigas* (4,4 millions de tonnes), la carpe argentée *Hypophthalmichthys molitrix* (4,0 millions de tonnes), et la « carpe herbivore » *Ctenopharyngodon idellus* (Chevassus-au-Louis and Lazard, 2009). En Europe, la France a été un des premiers pays à développer la pisciculture de façon intensive, avec principalement l'élevage de salmonidés et de poissons marins tels que le bar, la daurade royale et le turbot. L'élevage de Truite arc-en-ciel, qui constitue l'essentiel de la production salmonicole française, en fait l'un des leaders pour la production de cette espèce (36 000 tonnes/an, soit plus de 90% de la production salmonicole totale), placée au deuxième rang européen après l'Italie en 2007 (AGRESTE, 2011).

Avec les années, la salmoniculture française a dû s'adapter à un contexte difficile : contraintes environnementales plus fortes, mise aux normes réglementaires des élevages, concurrence commerciale mais aussi, menaces pathogènes. En effet, l'apparition de maladies au sein d'un élevage peut causer d'importantes pertes physiques et économiques aux conséquences pouvant atteindre des niveaux dramatiques.

La transmission des maladies infectieuses en milieu aquatique peut être très importante du fait de la continuité de la circulation des agents pathogènes au travers de l'eau d'un site à l'autre, et également au travers des échanges commerciaux (œufs et poissons). Parmi les bactéries ichtyopathogènes, *Flavobacterium psychrophilum* est l'une des plus virulentes en France. Cette bactérie est en effet responsable de la « flavobactériose des eaux froides », qui a été

identifiée comme la deuxième maladie la plus déclarée après la furonculose (Guichard, 2004). Peu de données sur la variabilité génétique ainsi que sur les modalités de diffusion de l'agent *F. psychrophilum* dans le contexte français existent. C'est dans l'optique de répondre à ce besoin de connaissances, nécessaire à long terme pour aider à une gestion efficace concernant le contrôle de la maladie, que nous avons mené ces travaux de thèse.

Dans un premier chapitre de revue bibliographique sur les origines de la variabilité génétique au sein des populations bactériennes, ainsi que les principales méthodes qui permettent de la caractériser, nous présenterons les intérêts et objectifs du travail de thèse. Les matériels et méthodes utilisés pour ces travaux seront présentés dans le deuxième chapitre. Enfin, le troisième chapitre sera consacré aux résultats de l'étude, exposés selon trois points : (i) variabilité génétique de *F. psychrophilum* dans les principaux bassins de production salmonicole en France, (ii) variabilité génétique dans un ensemble de sites piscicoles présents dans un même bassin versant et, (iii) comparaison des méthodes utilisées pour l'étude de la variabilité génétique de cet agent.



# **CHAPITRE I.**

## **Synthèse bibliographique**



# 1. Introduction

Les populations bactériennes ne sont pas statiques, mais évoluent au cours du temps et dans l'espace. Ainsi, au sein de ces populations bactériennes peuvent apparaître au niveau génomique, des variations résultant de modifications dans une portion codante ou non codante de séquences ADN qui peuvent faire émerger de nouveaux allèles ou de nouveaux caractères dans une population. Chaque variation de séquences peut, ou non, s'exprimer au niveau phénotypique (Wisniewski-Dyé and Vial, 2008). Ces variations génèrent une diversité intra-populationnelle qui constitue un élément important pour une meilleure adaptation à l'écosystème dans lequel les populations se développent, comme par exemple dans le cas de bactéries pathogènes, pour permettre d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (Hall, 1991; Wisniewski-Dyé and Vial, 2008).

Historiquement, la recherche de variations dans les populations naturelles de bactéries a concerné des caractères exprimés phénotypiquement et accessibles par observation directe des colonies bactériennes, tels que la morphologie, la couleur etc... Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis l'étude de la variabilité génétique ou génotypage de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes, et ce à grande échelle avec l'essor récent des outils de séquençage haut débit (Van Belkum et al., 2007). L'étude de la variabilité génétique constitue par exemple un moyen de définir des niveaux de similarité et de parenté entre les isolats bactériens d'une même espèce, qui revêt un intérêt majeur en épidémiologie et en phylogénie.

Lorsqu'une infection bactérienne survient dans une population humaine ou animale donnée, la première et la plus urgente étape, pour une prise en charge appropriée, est l'identification de l'agent infectieux. La seconde étape que constitue la maîtrise de l'infection, passe par l'identification du foyer initial d'une infection et l'explication des scénarii impliqués dans la dissémination de l'agent. Le génotypage constitue un outil essentiel pour répondre à cette seconde attente. A une échelle locale (hôpital, communauté, élevage...), en plus d'identifier l'origine de l'épidémie et les vecteurs de la diffusion (personnel en milieu hospitalier, objets/outils contaminés...), l'étude de la variabilité génétique entre isolats bactériens permet de différencier l'accumulation indépendante de cas d'infections d'une véritable diffusion épidémique. Dans le contexte d'une accumulation de cas, les infections peuvent être dues à

des problèmes d'hygiène générale ou de pression de sélection, alors que dans un contexte épidémique, il y a une source commune de contamination (ou réservoir du germe) de laquelle proviennent les contaminations. A une échelle plus étendue (région, pays, continent), l'étude de la variabilité génétique de populations bactériennes permet une surveillance épidémiologique dans le temps et/ou l'espace. Ceci permet afin d'observer la présence d'un variant génétique dominant, et d'associer des polymorphismes génétiques à certains caractères de résistance aux antibiotiques ou même à des signes cliniques. Les éléments de connaissance ainsi apportés par le typage moléculaire peuvent permettre de comprendre l'émergence et la dissémination d'une maladie et de mettre en place des mesures sanitaires appropriées pour limiter la propagation.

En dehors du contexte épidémiologique, le génotypage a aussi un intérêt sur le plan du diagnostic individuel, puisqu'il peut permettre de distinguer les infections chroniques des ré-infections, et dans les études de phylogénies dans lesquelles il permet d'observer les niveaux de similarités entre isolats (utile pour reconnaître la transmission de lignées clonales au cours du temps), d'identifier des facteurs de pathogénicité, et de déterminer la vitesse d'une horloge moléculaire.

## 2. Variabilité génétique chez les bactéries

### 2.1. Origines de la diversité génétique

Le support génétique de l'information peut être modifié par des phénomènes de mutations, de répétitions de séquences plus ou moins longues, ou de transferts de matériel génétique entre bactéries apparentées ou non.

#### 2.1.1. Mutations

##### 2.1.1.1. Caractéristiques

Les mutations correspondent à des modifications d'une ou plusieurs bases nucléotidiques et apparaissent rarement dans une population bactérienne. La mutagenèse *in vivo* est un phénomène complexe impliquant des enzymes jouant un rôle dans les métabolismes précurseurs de l'ADN, la réplication, la réparation et la recombinaison (Maki, 2002). Dans ces cas, on parle de mutations spontanées, par opposition aux mutations induites qui résultent de l'exposition des cellules à des facteurs mutagènes tels que rayons X, rayons UV, ou encore agents intercalants de l'ADN. Les mutations surviennent de manière aléatoire dans les génomes, même si elles semblent plus fréquentes dans certaines régions (« hotspot ») (Rogozin and Pavlov, 2003). Elles n'affectent qu'une faible proportion de cellules dans une population. Ceci est mesurable par le taux de mutation qui correspond à la probabilité pour une bactérie de muter pendant une unité de temps définie, correspondant à son temps de génération. Le taux de mutation moyen est de l'ordre de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  pour les bactéries. Pour un caractère donné, le taux de mutation est fixe, alors que le nombre de mutants d'une souche donnée fluctue en fonction des conditions de pression de sélection). D'autre part, les mutations acquises sont transmissibles à la descendance, ce qui n'empêche pas que le phénotype initial puisse être rétabli dans la descendance par le biais de mutations inverses (Wisniewski-Dyé and Vial, 2008).

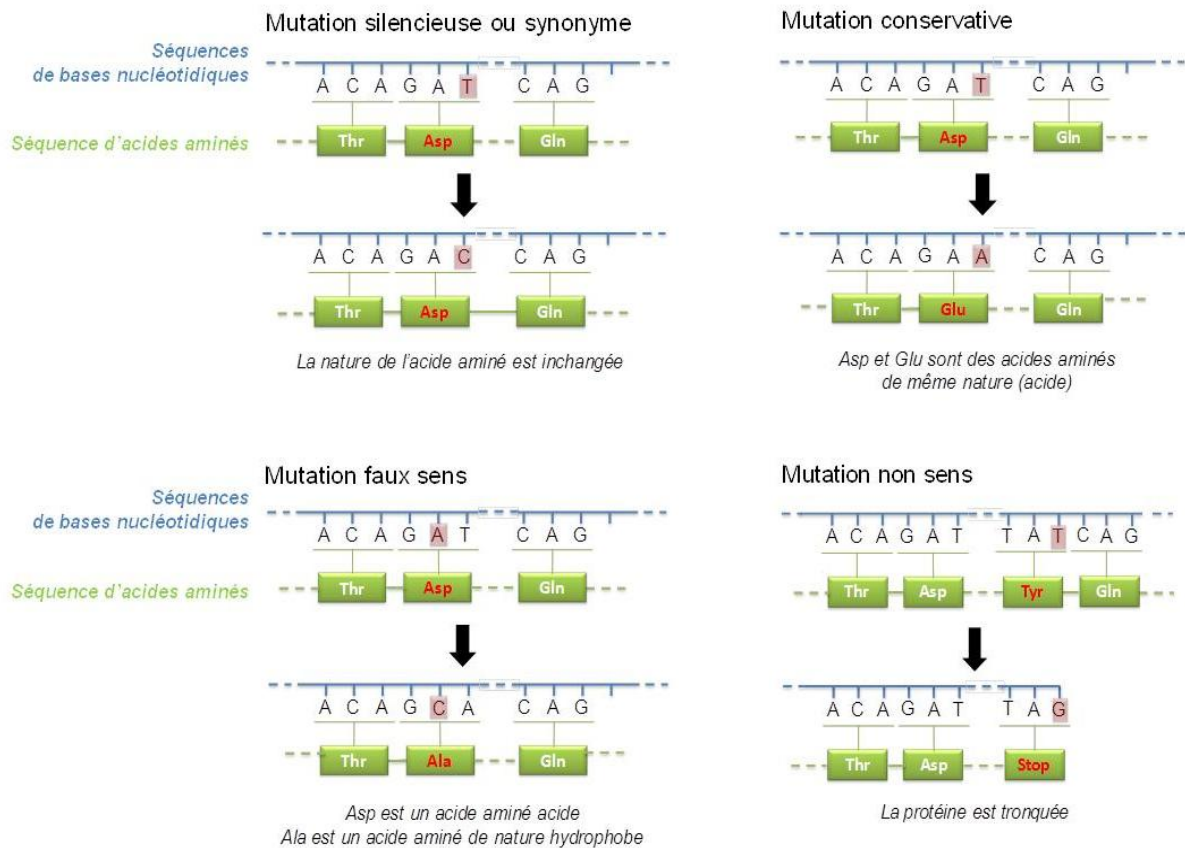
On peut classer les mutations en 2 grandes catégories, qui sont présentées ici dans l'ordre croissant d'importance de leur impact sur le caractère exprimé.

### **2.1.1.2. Mutations sans changement du cadre de lecture : substitutions**

Une substitution est le remplacement d'une base nucléotidique par une autre. Il existe différents types de mutations par substitution (Figure 1):

- mutation silencieuse: la substitution d'une ou plusieurs bases dans un codon conduit à une mutation silencieuse (ou synonyme) si la nature de l'acide aminé codé n'est pas changée (fait de la dégénérescence du code génétique)
- mutation conservative : la substitution entraîne le remplacement d'un acide aminé par un autre du même groupe (acide par exemple), avec souvent peu de conséquences sur la protéine
- mutation faux sens : elle se produit lorsque la substitution d'une base d'un codon se traduit par un remplacement d'acide aminé de groupes différents, par opposition à la mutation conservative
- mutation non-sens : la substitution d'une base entraîne le changement d'un codon en un codon stop, ce qui induit la production d'une protéine tronquée dont l'activité peut alors être modifiée.

Ces trois derniers types de mutations sont dites non synonymes par opposition à la première.

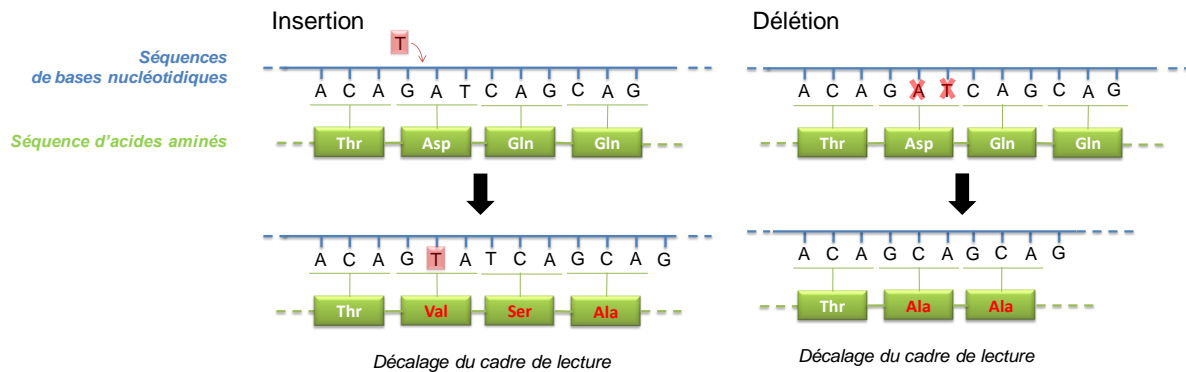


**Figure 1 :** Schématisation des différents types de mutations de bases nucléotidiques (C. Siekoula-Nguedia)

### 2.1.1.3. Mutations avec changement du cadre de lecture : insertions et délétions de bases

Ces événements ont des répercussions sur tous les codons situés en aval et conduisent à la production d'une protéine anormale (Figure 2). Le plus souvent, la protéine est tronquée à cause de l'apparition précoce d'un codon stop. Dans le cas où le nombre de paires de bases délétées ou ajoutées dans une séquence codante est un multiple trois, le cadre de lecture n'est pas altéré. Toutefois, la protéine produite est raccourcie ou rallongée d'un ou plusieurs acides aminés, et peut voir ainsi sa fonction altérée.

Ces mutations peuvent aussi avoir lieu dans les zones promotrices non codantes et ainsi, influencer le niveau d'expression du gène situé en aval.



**Figure 2 :** Schématisation des événements d'insertion et de délétion de bases nucléotidiques (C. Siekoula-Nguedia)

### 2.1.2. Transfert et intégration de matériel génétique exogène : parasexualité des bactéries

Les génomes bactériens peuvent se diversifier *via* des échanges de matériel génétique. Ce transfert de matériel génétique se fait selon trois modes possibles :

- la transformation : transfert d'ADN nu, présent dans l'environnement direct de la bactérie (mode largement utilisé en génie génétique pour l'introduction de plasmides dans les souches bactériennes),
- la conjugaison : transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre au travers de pili sexuels,
- la transduction : transfert d'ADN entre deux bactéries par l'intermédiaire d'un virus (bactériophage).

A la suite du transfert d'ADN s'opère le processus de « recombinaison » qui permet l'intégration de la molécule d'ADN exogène (exogénote provenant de l'environnement ou d'une bactérie donneuse) dans le chromosome d'une cellule receveuse (l'endogénote). Il existe différents types de recombinaisons :

- recombinaison générale ou homologue : échange d'une paire de séquences double brins d'ADN nécessairement homologues, à n'importe quel endroit du génome. Ce phénomène permet de maintenir l'intégrité d'un génome par le remplacement d'une



séquence endommagée. En génie génétique, la recombinaison homologue est utilisée pour remplacer un gène ou une séquence, de manière ciblée.

- recombinaison site spécifique : échange de paires de séquences non nécessairement homologues, catalysé par une ou plusieurs protéines les reconnaissant spécifiquement. Ce type de recombinaison est très important lors de l'intégration des génomes viraux dans les chromosomes bactériens et participe fortement aux échanges de gènes de virulence et de résistance.
- recombinaison transpositionnelle ou illégitime : échange de séquences non homologues. C'est le mécanisme recombinatoire générant le plus de diversité à cause du caractère aléatoire des réarrangements. La recombinaison illégitime s'opère lors du déplacement, au sein de génomes bactériens, de segments d'ADN non codants (dits séquences d'insertion) seuls ou bordant des gènes entiers fonctionnels (transposons).

### **2.1.3.Répétitions de séquences**

L'avènement du séquençage de nombreux génomes de bactéries a permis de mettre en évidence la très grande variété de séquences répétées. La taille des fragments constitutifs d'une séquence répétée varie d'une à plusieurs centaines de paires de bases. Ces fragments sont constitués soit d'un type unique de nucléotides (poly T), soit de plusieurs multimères. Les répétitions multimériques sont construites à partir d'unités nucléotiques identiques (répétitions homogènes), d'unités mixtes (répétitions hétérogènes), ou de répétitions dégénérées de motifs. Les unités d'une séquence répétée peuvent être reproduites en tandem (c'est-à-dire répétées les unes derrière les autres) à un seul locus, ou dispersées de manière aléatoire dans le génome. Les répétitions dispersées dans le génome sont de différentes natures, dont les principales familles sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 1).

Les séquences répétées sont générées au travers de processus de recombinaison intra-chromosomique, par transfert de gènes, ou générées lors de la réplication de l'ADN par une ADN polymérase. La distribution et l'abondance des séquences répétées varient beaucoup entre espèces. En effet, un génome tel que celui de *Mycoplasma pneumoniae*, de taille pourtant très réduite (0,8 Mb), comprend 6% de séquences répétées (Himmelreich et al., 1997) alors que *Campylobacter jejuni* n'en possède presque pas (4 séquences répétées pour un génome de 1,6 Mb) (Parkhill et al., 2000).

**Tableau 1 :** Familles de séquences répétées chez les procaryotes (d'après Treangen et al., 2009).

<i>Type de séquence</i>	<i>Caractéristiques</i>
<b>REP ou PU</b> (Repetitive Extragenic Palindromic or Palindromic Units)	21-65 pb Palindrome imparfait Séquence extragénique Probablement transcrite
<b>BIME</b> (Bacterial Interspersed Mosaic Element)	40-500 pb Mosaïque de combinaisons de séquences REP séparées par d'autres motifs
<b>CRISPR</b> (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)	Répétitions directes non contigües (de 24-47 pb) séparées par des espaceurs de tailles similaires (26-72 pb)
<b>MITE</b> (Miniature Inverted Repeat Transposable Elements)	100-200 pb Élément non-autonome
<b>ERIC ou IRU</b> (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus ou Intergenic Repeat Unit)	69-127 pb Large séquence palindromique Probablement transcrite
<b>IS</b> (Insertion Sequence)	0,7-3,5 pb; Élément autonome; Souvent bordé par des séquences inversées (10-40 pb) Code pour la transposase Impliqué dans la transposition conservative ou replicative
<b>Tn</b> (Transposon)	Élément autonome; Code pour la transposase et d'autres produits (résistance aux antibiotiques, facteurs de virulence) <b>Composite (Classe I):</b> Bordé par deux IS (identiques ou différentes, directes ou inversées); impliqué dans la transposition conservative <b>Non-Composite (Classe II):</b> Bordé par deux séquences inversées (Tn3, Tn9); impliquée dans la transposition replicative, code pour la résolvasse

#### **2.1.4. Remaniements chromosomiques**

Il existe différents types de remaniements chromosomiques : (i) les duplications qui se produisent à l'intérieur d'un gène, (ii) les inversions correspondant au changement d'orientation d'un gène et, (iii) les délétions concernant des fragments de gènes plus importants en taille que quelques nucléotides, et qui entraînent souvent des effets létaux.

### **2.2. Etude de la variabilité génétique : le génotypage**

Le typage de bactéries correspond d'une manière générale, à leur classification d'après un certain nombre de caractéristiques. A cet effet, le phénotypage (utilisation des caractères morphologiques et phénotypiques) et le génotypage (basé sur l'analyse d'acides nucléiques) constituent les deux systèmes de typage distincts pour ce genre d'étude. Le génotypage présente l'avantage qu'une majorité d'isolats est typable, contrairement au phénotypage pour lequel les caractères étudiés ont une plus grande propension à présenter une variabilité insuffisante pour discriminer les souches (Wisniewski-Dyé and Vial, 2008). Comme annoncé en introduction, l'étude de la variabilité génétique au sein d'une population bactérienne répond au besoin de déterminer les liens génétiques entre isolats bactériens à des fins d'analyse de diversité ou encore, d'analyses phylogénétiques ou épidémiologiques.

#### **2.2.1. Critères de choix d'une méthode de génotypage**

Le choix d'une méthode de génotypage repose sur différents critères à la fois de performance et de faisabilité (Li et al., 2009; Van Belkum et al., 2007). Parmi les critères les plus importants de performance, on retrouve :

- la typabilité : c'est la capacité d'une méthode à assigner un type à un isolat ; ceci correspond au pourcentage d'isolats typables sur le nombre total d'isolats typés. Pour qu'une méthode soit utilisée en routine, l'idéal est que le plus grand nombre possible d'isolats bactériens soient typables par celle-ci ;
- le pouvoir discriminant ou de résolution: il s'agit de la capacité d'une méthode à assigner un type différent à deux souches non apparentées, échantillonnées au hasard

dans une population d'une espèce donnée ; il est souvent exprimé par l'index de Simpson (idéalement égal à 1, mais généralement une erreur de 5% est acceptée) ;

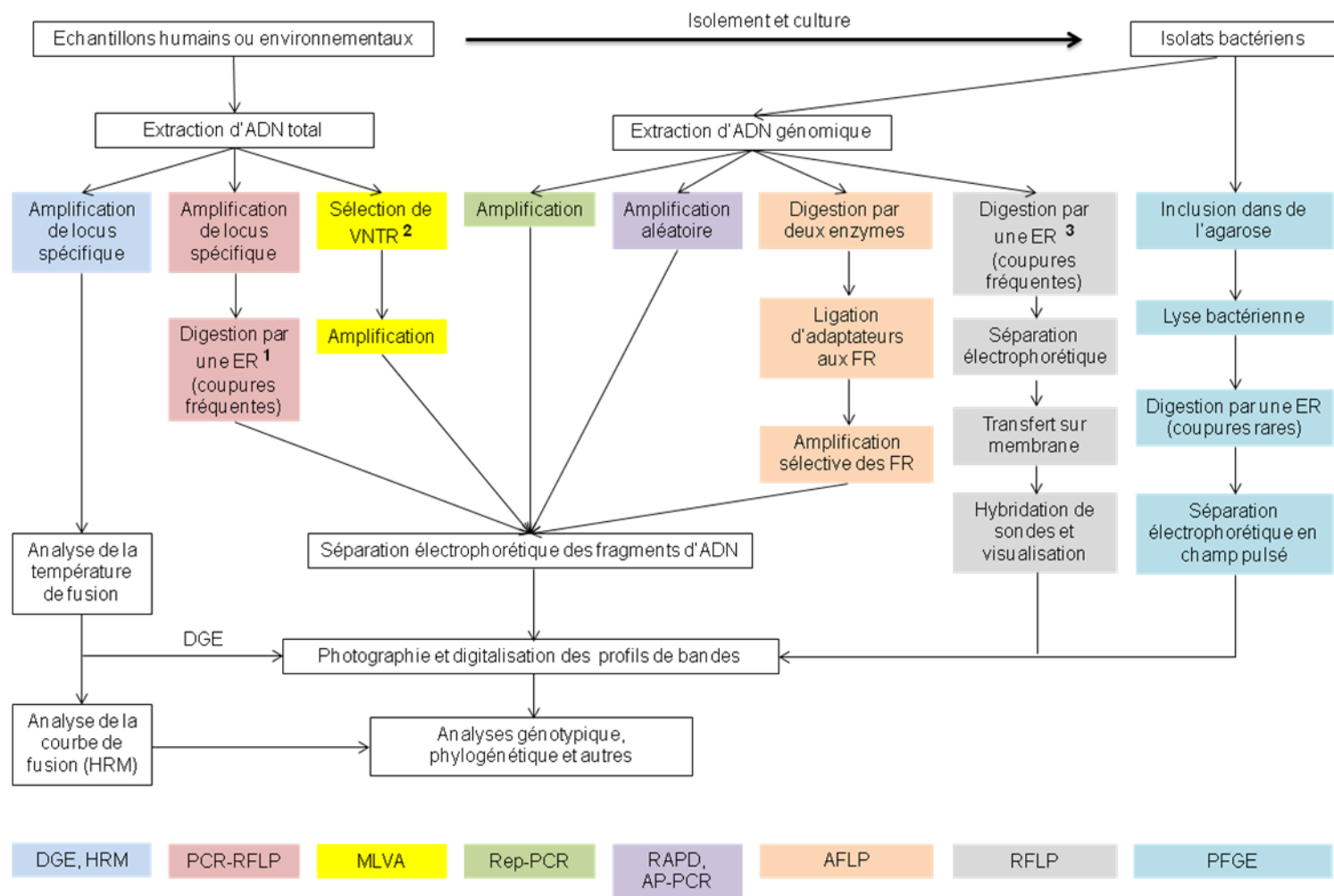
- la reproductibilité : c'est l'aptitude d'une méthode à attribuer le même type génétique à un isolat testé à des moments différents et dans des conditions différentes ; elle peut néanmoins être influencée à plusieurs niveaux (variabilité dans les protocoles, la préparation du matériel, les conditions de culture, les réactifs etc...). C'est un critère important pour la comparaison des résultats entre laboratoires et pour la mise en place de bases des données qui doivent reposer sur des données solides.

D'autres critères, d'importance variable selon les contextes, sont des éléments importants à considérer pour le choix d'une méthode. Il s'agit de la facilité d'interprétation des résultats obtenus, le coût, la rapidité, la facilité de la réalisation, la disponibilité des sondes ou amorces spécifiques connues et du degré d'urgence de l'étude (Li et al., 2009). Le choix du (des) marqueur(s) de variabilité génétiques, développé dans le paragraphe 2.3.2, est aussi primordial.

Malgré le nombre important de méthodes de génotypage actuelles, aucune méthode n'est idéale car elles ont toutes leurs avantages et leur inconvénients (Van Belkum et al., 2001), et leur choix dépend de la finalité des travaux engagés.

### **2.2.2.Principales méthodes d'étude de la variabilité génétique**

Actuellement, les méthodes d'étude de la variabilité génétique des espèces bactériennes peuvent être classées en trois catégories : (i) celles basées sur le polymorphisme de longueur de fragments électrophorétiques, (ii) celles basées sur l'analyse de séquences d'ADN et (iii) celles basées sur l'hybridation moléculaire. De nombreuses méthodes mettent en œuvre plusieurs de ces catégories. L'organisation schématique des étapes de ces méthodes est présentée sur la Figure 3.



**Figure 3 :** Diagramme des méthodes de génotypage basées sur le polymorphisme de longueur (traduit de Li et al., 2009).  
<sup>1</sup> ER : enzyme de restriction, <sup>2</sup> VNTR : Variable Number of Tandem Repeats, <sup>3</sup> FR : fragment de restriction.

### **2.2.2.1. Méthodes basées sur l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments d'ADN**

La variabilité génétique entre isolats d'une espèce bactérienne peut être observée par comparaison de profils électrophorétiques générés soit par digestion enzymatique de leur génome, soit par amplification par PCR de cibles, ou par la combinaison des deux.

#### **2.2.2.1.1. Restriction enzymatique : RFLP et PFGE**

La restriction d'ADN est réalisée par une enzyme qui reconnaît un motif (succession définie de nucléotides) au sein d'une séquence et y opère une coupure. La distance entre deux sites de clivage correspond à la taille du fragment généré. Ces méthodes permettent de mettre en évidence les mutations au niveau des sites de restriction et les insertions et délétions entre sites de restriction. Elles s'appliquent à l'ADN non amplifié, et nécessitent le passage par une étape de culture.

#### ***RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)***

La méthode RFLP a été mise au point en 1980 pour la construction d'une carte génétique pour le génome humain (Botstein et al., 1980). Cette technique repose sur la digestion d'ADN génomique par une endonucléase de restriction à coupures fréquentes. Les fragments résultants, de longueurs différentes selon les isolats bactériens, sont séparés sur un gel d'électrophorèse, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon (principe du Southern blot). L'hybridation de l'ADN digéré est réalisée par une sonde nucléique dont la nature dépend de la cible recherchée (gène, élément mobile...). Les fragments cibles sont alors révélés selon la nature du marquage de la sonde : au contact d'un film sensible à la radioactivité si la sonde est radioactive (sonde « chaude ») ou, par réaction enzymatique colorée spécifique si la sonde est marquée chimiquement (sonde « froide »). Le nombre et la taille des bandes d'hybridation observables sont alors fonction du nombre de sites de restriction présents dans la cible.

Le ribotypage est une application de l'approche RFLP mise au point pour la première fois en 1986 (Grimont and Grimont, 1986), où la sonde utilisée correspond au locus de l'ADN ribosomique (ADNr 16S ou 23S). Elle a depuis été largement développée et appliquée aussi bien au typage de levures telles que les espèces du genre *Saccharomyces* (McCullough et al.,

1998), que de bactéries telles qu'*Escherichia coli* (Parveen et al., 1999) ou encore *Listeria monocytogenes* (Wiedmann et al., 1996).

La RFLP est une méthode relativement peu coûteuse. Elle présente néanmoins l'inconvénient de nécessiter de grandes quantités d'ADN génomique de haute qualité et se montre longue à mettre en œuvre notamment du fait de l'étape de Southern blot.

### *PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)*

Considérée actuellement comme la méthode « gold standard » pour le typage moléculaire de nombreux pathogènes, l'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN fait appel à la restriction enzymatique de l'ADN génomique.

Développée en 1984 (Schwartz and Cantor, 1984), cette méthode permet de séparer, grâce au champ pulsé où l'orientation du champ électrique est alternée au cours du temps, des fragments d'ADN de très grande taille (plus de 50 kb). Pour éviter les cassures mécaniques de l'ADN, les cellules bactériennes sont enrobées dans de l'agarose (« plug ») et vont subir une étape de lyse *in situ*. L'ADN ainsi libéré est alors digéré par une endonucléase de restriction générant un faible nombre de coupure. Ensuite, le « plug » contenant l'ADN bactérien digéré est placé en haut d'un gel d'agarose coloré au Bromure d'éthidium, auquel un champ pulsé est appliqué. La migration produit un profil de restriction ou pulsotype, propre à chaque souche bactérienne, visualisé sous UV. Les photos de gels sont analysées grâce à des logiciels qui permettent alors de comparer les profils de restriction et de déterminer la proximité génotypique des souches.

Bien que largement utilisée, la PFGE peut s'avérer longue à mettre en œuvre et souffre d'un manque de reproductibilité inter- (voire intra-) laboratoires. De plus, les bandes de poids moléculaires très proches peuvent ne pas être différenciées.

Cette méthode d'analyse sera plus explicitée dans la suite de ce travail (Chapitre II).

### **2.2.2.1.2. Amplification par PCR : RAPD, AP-PCR, Rep-PCR, MLVA, DGE et HRM**

#### *RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

Cette méthode s'applique au génome entier de bactéries et nécessite une étape de culture. La connaissance de la séquence d'intérêt est inutile car le principe de cette technique repose sur l'usage d'amorces aléatoires de séquences courtes (9 à 10 pb) qui s'hybrident sur tout le génome en utilisant des conditions de faible stringence (température d'hybridation de 35°C en moyenne) (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Les sites d'hybridation des amorces voient leurs positions et leurs nombres varier entre isolats d'une même espèce bactérienne. Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse puis les profils sont comparés.

La RAPD est une méthode peu coûteuse, rapide, sensible, mais peut montrer des soucis de reproductibilité entre laboratoires, voire au sein d'un même laboratoire. Ses résultats sont principalement influencés par la séquence et la température d'hybridation des amorces, ainsi que la pureté et la concentration des ADN.

#### *AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)*

Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1990 pour la caractérisation des souches bactériennes du genre *Staphylococcus* et des souches de l'espèce *Streptococcus pyogenes* (Welsh and McClelland, 1990). Son principe est semblable à celui de la RAPD car les amorces utilisées (20 pb) sont sélectionnées au hasard et s'hybrident de manière peu spécifique dans le génome au cours d'une première série de cycles (2 à 3) où la température d'appariement est basse (de l'ordre de 40°C) (Welsh and McClelland, 1990). Une deuxième série de cycles est ensuite appliquée, avec une température d'appariement plus élevée (50 à 65°C). Le nombre de fragments obtenus dépend du nombre d'amorces appariées.

Malgré sa mise en œuvre rapide, les principaux reproches faits à cette méthode sont son manque de spécificité et de reproductibilité (MacPherson et al., 1993).

#### *Rep-PCR (Repetitive sequencing-based PCR)*

Le polymorphisme de longueur des séquences répétées présentes au sein des génomes (voir paragraphe 2.1.3) peut être utilisé pour le génotypage d'espèces bactériennes. Il s'agit en



particulier des éléments nommés REP, ERIC et BOX qui ont donné lieu au développement des protocoles REP-PCR, ERIC-PCR et BOX-PCR, respectivement (Gevers et al., 2001; Versalovic et al., 1991). Les séquences amplifiées sont séparées par électrophorèse sur gel ou par électrophorèse capillaire, pour lesquelles des conditions optimisées peuvent augmenter la résolution de la séparation des fragments.

Ces méthodes Rep-PCR sont peu coûteuses, rapides et plus reproductibles que la RAPD, du fait que les amorces utilisées sont spécifiques. Elles ne nécessitent pas une étape d'extraction d'ADN (Snelling et al., 1996) et peuvent rencontrer des limites dues à des artefacts et des contaminations.

### *MLVA (Multi-Locus VNTR Analysis)*

L'analyse MLVA correspond à l'étude du polymorphisme de longueur de différents loci VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) pour lesquels le nombre de répétitions constitue le polymorphisme. Les séquences répétées en tandem sont ciblées par des amorces dont la conception est facilitée par la connaissance de séquences répétées déjà identifiées dans les génomes séquencés (entièrement ou partiellement) et disponibles dans les banques de données. L'estimation de la taille des fragments d'ADN générés par PCR peut être obtenue après électrophorèse sur gel d'agarose (comparaison à un marqueur de taille) ou électrophorèse capillaire (comparaison des positions de pics). L'électrophorèse capillaire est une option particulièrement attrayante parce qu'elle permet d'atteindre une mesure extrêmement précise de la taille des fragments. Les nombres de répétitions des différents loci VNTR sont combinés pour donner un profil propre à chaque isolat analysé et l'ensemble des profils MLVA est comparé. L'approche MLVA s'est avérée appropriée dans la recherche de diversité génétique au sein d'espèces bactériennes très monomorphes telles que *Bacillus anthracis* et *Yersinia pestis* (Keim et al., 2000; Le Fleche et al., 2001).

Une fois les cibles identifiées, la mise en œuvre de l'analyse de VNTR peut être rapide, notamment avec la possibilité de réaliser des PCR multiplexes (Sobral et al., 2012). Les résultats sont reproductibles et le partage de données est possible grâce à leur enregistrement dans des banques de données. On peut noter que la différence (ou non) de poids moléculaire entre les produits d'amplification ne reflète pas toujours le véritable nombre de répétitions du fait d'insertions et délétions qui peuvent survenir au sein des séquences répétées. Ceci peut

être vérifié par séquençage et peut être évité par sélection de loci appropriés (en fonction de leur taille).

### ***2.2.2.1.3. Restriction enzymatique associée à la PCR : AFLP et PCR-RFLP***

#### ***PCR-RFLP***

La PCR-RFLP est, comme le ribotypage, un développement de la méthode RFLP où le produit de l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'une séquence d'intérêt, est digéré par une enzyme de restriction. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse et les profils de bandes sont alors comparés. Comme pour le ribotypage, l'ADNr 16S peut constituer la séquence cible : il s'agit de la technique ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) développée, à l'origine, pour distinguer les sous-espèces de *Streptococcus uberis* (Jayarao et al., 1991).

Le pouvoir discriminant de cette méthode dépend du locus amplifié et de sa variabilité. Elle présente néanmoins l'avantage de ne consommer que de faibles quantités d'ADN par rapport à la RFLP par Southern blot. De plus, le typage d'isolats sans étape de culture est possible grâce à une approche de PCR nichée (Rimbara et al., 2005).

#### ***AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)***

L'AFLP (Vos et al., 1995) implique une première étape de digestion d'ADN génomique (d'où une étape de culture obligatoire) par deux endonucléases de restriction dont l'une coupe fréquemment l'ADN, l'autre ayant une fréquence de coupure plus faible. Dans une deuxième étape, des adaptateurs oligonucléotidiques doubles brins, spécifiques de chaque site de restriction, sont ligués à l'extrémité des fragments générés. Ensuite les fragments de restriction sont amplifiés sélectivement par PCR, par utilisation d'amorces complémentaires des adaptateurs. Enfin, les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (conditions dénaturantes), ou par électrophorèse capillaire, et les différents profils sont comparés. Cette technique ne nécessite pas d'information préalable de séquence génomique.

#### **2.2.2.1.4. Méthodes d'analyse des profils électrophorétiques**

La parenté entre les isolats analysés est déduite de la similarité des profils de bandes après séparation électrophorétique des produits de restriction enzymatique ou des produits d'amplification par PCR. Selon leur complexité mais aussi le nombre d'isolats à analyser, la similarité des profils peut être déduite par observation directe des différences en nombre de bandes (exemple des profils de PCR-RFLP) ou par calculs de pourcentages de similarité entre les profils (cas de la PFGE). Ces pourcentages de similarité sont générés par des programmes informatiques dédiés à cet effet. Pour une même étude, le pourcentage de similarité entre les profils peut être influencé par l'opérateur qui décide du positionnement des bandes lors de la digitalisation des photographies de gels d'électrophorèse, et les isolats seront catégorisés en fonction d'un seuil de tolérance choisi.

Dans le cas de la méthode PFGE, un système d'interprétation (critères de Tenover) des profils obtenus a été proposé en 1995 (Tenover et al., 1995), pour lequel :

- si on n'observe aucune différence dans les profils considérés, les isolats référents sont « non distinguables » et appartiennent au même clone
- si on observe 1 à 4 bandes de différence, un seul événement de mutation est à l'origine de la diversité entre les isolats analysés qui sont étroitement liés
- si on observe 5 à 8 bandes de différence, celles-ci seraient le résultat de deux événements de mutation et les isolats référents seraient « possiblement » liés.

Ces critères de Tenover décrits initialement ont été revus en 2007 (Van Belkum et al., 2007). Finalement, (i) les isolats avec des profils différant de 1 à 4 bandes sont des sous-types d'un même type génétique, (ii) les isolats différant de 5 bandes à plus sont des types différents et (iii) la déduction de la relation épidémiologique entre 2 ou plusieurs isolats d'après les sous-types identifiés par la PFGE exige une réflexion approfondie et le couplage avec d'autres informations (par exemple caractéristiques cliniques et épidémiologiques de l'épidémie). L'analyse visuelle des différences du nombre de bandes entre profils s'applique généralement à un nombre limité de profils. Pour un nombre important de profils, on procède à une analyse

de similarité assistée par ordinateur, où le pourcentage de similarité est estimé par des coefficients tels que le coefficient de DICE (Dice, 1945) ou le coefficient de Jaccard (Jaccard, 1908).

Dans le cas des méthodes où des profils de restriction sont couplés à une amplification par PCR, les isolats dont les profils présentent une ou plusieurs bandes de différence appartiennent à des types génétiques différents. Les mesures de similarité sont donnée des coefficients tels que le coefficient de Pearson ou le coefficient qui sont utilisés.

Pour l'analyse des profils MLVA, l'approche la plus couramment utilisée est le « minimum spanning tree », basé sur des algorithmes tels que les algorithmes BURST, qui prédisent la parenté entre isolats sur la base des variations sur un ou deux loci (Feil et al., 2004).

### ***2.2.2.2. Méthodes combinant amplification par PCR et gradient de dénaturation***

#### ***2.2.2.2.1. DGE (Denaturing Gradient Electrophoresis)***

Dans le procédé DGE, les amplifiats (de même poids moléculaire) d'un locus d'intérêt sont séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide, où un gradient d'agent dénaturant entraîne la séparation des doubles brins d'ADN de manière séquence-dépendante (les doubles brins se séparent en fonction de leur composition en bases AT et GC, et donc en fonction de leur température de fusion). Le polymorphisme dans les séquences, généré par mutation, est alors à l'origine de différents encombrements stériques desquels résultent différents profils de migration (Muyzer et al., 1993). Les agents dénaturants peuvent être de différentes natures en fonction desquelles sont définies des déclinaisons de la techniques DGE :

- pour un agent chimique (tel que l'urée), on parle de méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel electrophoresis) (Myers et al., 1987) ;
- pour un gradient de température, on parle de la méthode TTGE (Temporal Temperature Gel electrophoresis) (Yoshino et al., 1991).

Une des cibles moléculaires utilisée pour le typage de communautés bactériennes par DGE est l'ARNr 16S, car il est présent chez toutes les espèces (Muyzer et al., 1993; Nakatsu et al., 2000).

Les méthodes DGE requièrent des équipements particuliers et peuvent être appliquées à l'étude d'échantillons environnementaux. Toutefois, dans ce cas, seules les espèces dominantes sont mises en évidence lorsque des amorces universelles sont utilisées (Ogier et al., 2002). L'un des avantages de ces méthodes est que le séquençage de bandes particulières est possible.

#### **2.2.2.2.2. HRM (*Hight Resolution Melting*) analysis**

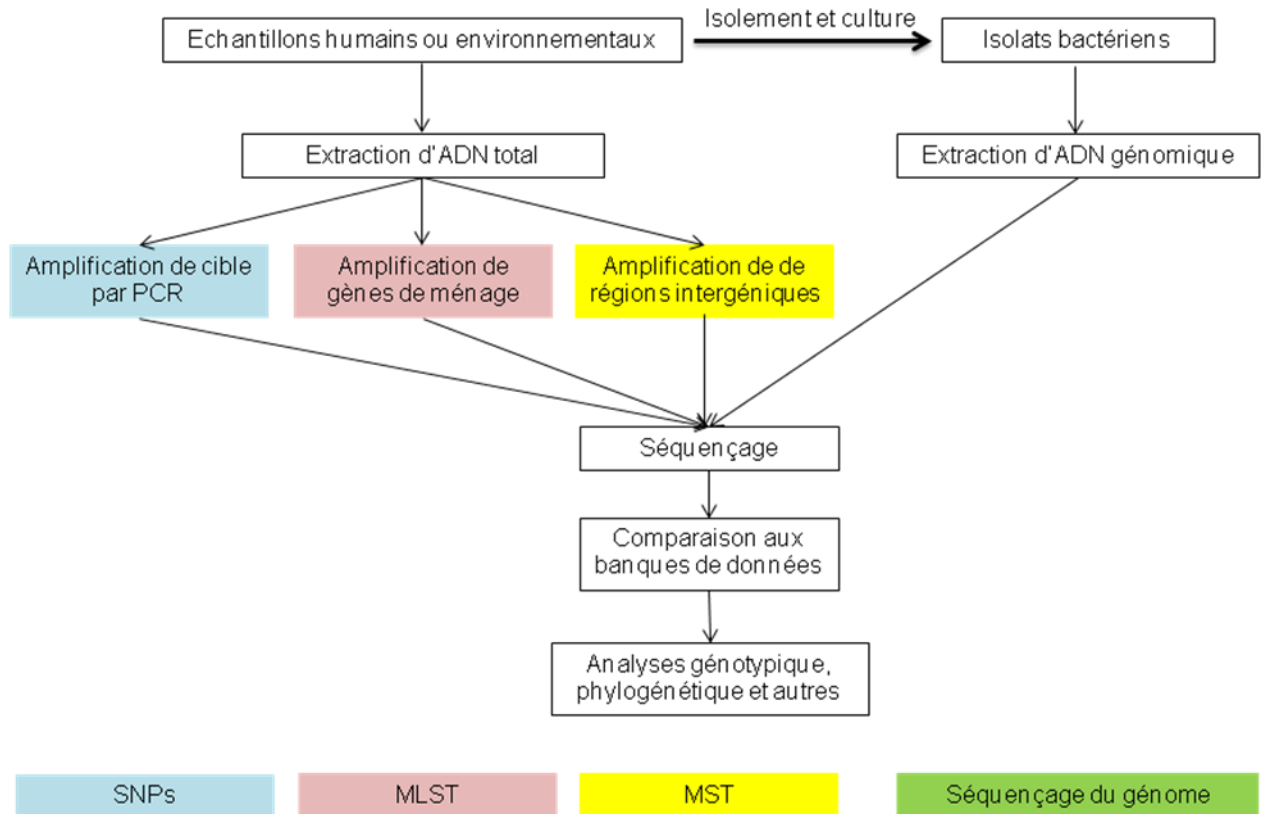
Avec la HRM, la discrimination d'isolats bactériens se fait *via* les différences de températures de fusion des séquences cibles (Wittwer, 2001), comme la DGE. Cette méthode combine la PCR en temps réel et l'analyse de courbe de fusion. L'amplification par PCR est réalisée en présence d'un colorant qui fluoresce fortement dans sa forme liée à l'ADN double brin. Lorsque l'amplification est terminée, un gradient de température est appliqué aux produits PCR qui sont alors progressivement dénaturés. Cette dénaturation entraîne la libération du colorant, traduite par une diminution de la fluorescence, elle-même corrélée à la température de fusion. La fluorescence émise est mesurée pour générer une courbe de fusion caractéristique. Le profil de fusion qui en résulte reflète le mélange d'amplicons présents. Des aspects tels que la teneur en GC, la longueur de séquence et l'hétérozygotie viendront s'ajouter aux caractéristiques de la courbe fusion pour chaque amplicon. Les profils qui en résultent permettent de détecter les mutations.

Les cibles amplifiées sont souvent des loci à évolution rapide (notion développée dans le paragraphe 2.3.2) tels que les loci CRISPR (Bratchikov and Mauricas, 2011; Price et al., 2007) ou les gènes codant pour les protéines de surface tels que le gène *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) chez les bactéries endosymbiotiques du genre *Wolbachia* (Henri and Mouton, 2012).

La HRM est une méthode rapide, sensible, spécifique et applicable aux échantillons environnementaux totaux. Elle nécessite un équipement de PCR en temps réel.

### 2.2.2.3. Méthodes basées sur l'analyse de séquences

Les méthodes basées sur l'analyse de séquences (Figure 4) voient leur intérêt principal résider dans le fait que l'analyse de la variabilité génétique repose sur des méthodes reproductibles dont les résultats sont échangeables *via* les banques de données en ligne.



**Figure 4:** Diagramme des méthodes de génotypage basées sur le séquençage de marqueurs génétiques (gène spécifique, gènes de ménage, régions intergéniques) (adapté de Li et al., 2009).

#### 2.2.2.3.1. Analyse des SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

L'analyse SNP implique l'identification d'une base nucléotidique variable au sein d'une population et de position connue. Cette méthode consiste à analyser les polymorphismes rares (moins d'un nucléotide toutes les 300 bases), le long du chromosome bactérien (Van Belkum et al., 2007). Elle est applicable aux échantillons environnementaux

grâce à une approche de PCR nichée, et aux cultures bactériennes pures. Pour ces deux cas, l'extraction d'ADN est nécessaire.

Le choix d'une cible appropriée pour l'analyse de SNP dépend de l'espèce bactérienne étudiée. L'analyse de SNPs peut concerner la totalité du génome d'une bactérie ou un locus particulier. La plupart des gènes cibles codent pour des protéines de surface ou des facteurs de virulence, à l'exemple des gènes *mce1* et *mce4* de *Mycobacterium tuberculosis*, associés à la virulence chez cette espèce (Pasricha et al., 2011).

#### **2.2.2.3.2. MLST (Multi Locus Sequence Typing)**

La MLST est une méthode d'analyse de SNP applicable seulement chez des espèces génétiquement hétérogènes où plusieurs SNPs sont localisés dans la portion des loci considérés (Maiden et al., 1998). Il s'agit en effet d'une approche basée sur le séquençage partiel de gènes indispensables pour le métabolisme d'une bactérie. Ces gènes dits « de ménage » ou « housekeeping genes » présentent des taux de mutation faibles. Dans ce type d'analyse, en général 5 à 10 gènes sont amplifiés et séquencés. Pour un isolat donné, l'ensemble des allèles identifiés pour chaque locus correspond à un profil allélique ou « Sequence Type » (ST). Les profils alléliques des différents isolats d'intérêt sont comparés et la distance génétique entre eux est évaluée. Par ailleurs, c'est une technique qui permet d'observer l'assortiment aléatoire des allèles de gènes de ménage généré par le phénomène de recombinaison dans une population, autorisant ainsi la possibilité de définir une structure génétique de la population (Smith et al., 1993; Turner and Feil, 2007).

Le typage par MLST a l'avantage de ne pas présenter d'ambiguïté dans l'analyse des résultats comme pour d'autres techniques qui font appel à l'analyse de profils de migration. De plus, les résultats sont reproductibles intra- et inter- laboratoires et les données stockables dans des banques de données internationales ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)). Même si cette méthode est de plus en plus utilisée pour le typage bactérien (Hamouda et al., 2010; Maatallah et al., 2011; Martino et al., 2011), elle reste trop coûteuse pour être utilisée en routine dans les laboratoires du fait du coût du séquençage.

Cette méthode d'analyse sera plus explicitée dans la suite de ce travail (Chapitre II).

### **2.2.2.3.3. MST (Multispacer Typing)**

La méthode MST a été développée pour la première fois chez *Yersinia pestis* (Drancourt et al., 2004). Elle a été utilisée ensuite avec succès chez d'autres espèces pathogènes telles que *Coxiella burnetii* (Glazunova et al., 2005) et *Mycobacterium tuberculosis* (Djelouadji et al., 2008). En MST, les cibles analysées sont des régions intergéniques non codantes. Il s'agit de régions très variables sélectionnées d'après un alignement soit de séquences génomiques de plusieurs souches d'une même espèce, soit de souches d'espèces proches. Le principe de cette méthode est semblable à celui de la MLST, où après amplification et séquençage d'un certain nombre de marqueurs, la combinaison des variations alléliques de tous ces marqueurs correspond à un génotype MST.

La MST peut nécessiter une étape de culture et présente l'avantage que les amorces peuvent être choisies pour être complémentaires des régions conservées dans les génomes.

### **2.2.2.3.4. Méthode d'analyse des résultats**

L'analyse des résultats de SNP ou de MLST repose sur l'alignement de séquences ADN par des outils bioinformatiques appropriés qui permettent d'observer les différences et classer les isolats en types génétiques (ST générés par la MLST par exemple). Un pré-requis important à l'interprétation des résultats est la qualité des séquences qui peut être visualisée sur les chromatogrammes.

Dans le cas de la MLST, la parenté des isolats analysés est estimée par des algorithmes BURST (Feil et al., 2004) qui génèrent des liens sur la base des variations observables sur un ou deux loci, comme dans l'interprétation des résultats de MLVA. Dans un contexte épidémique, ils font apparaître des complexes clonaux regroupant des isolats génétiquement très proches.

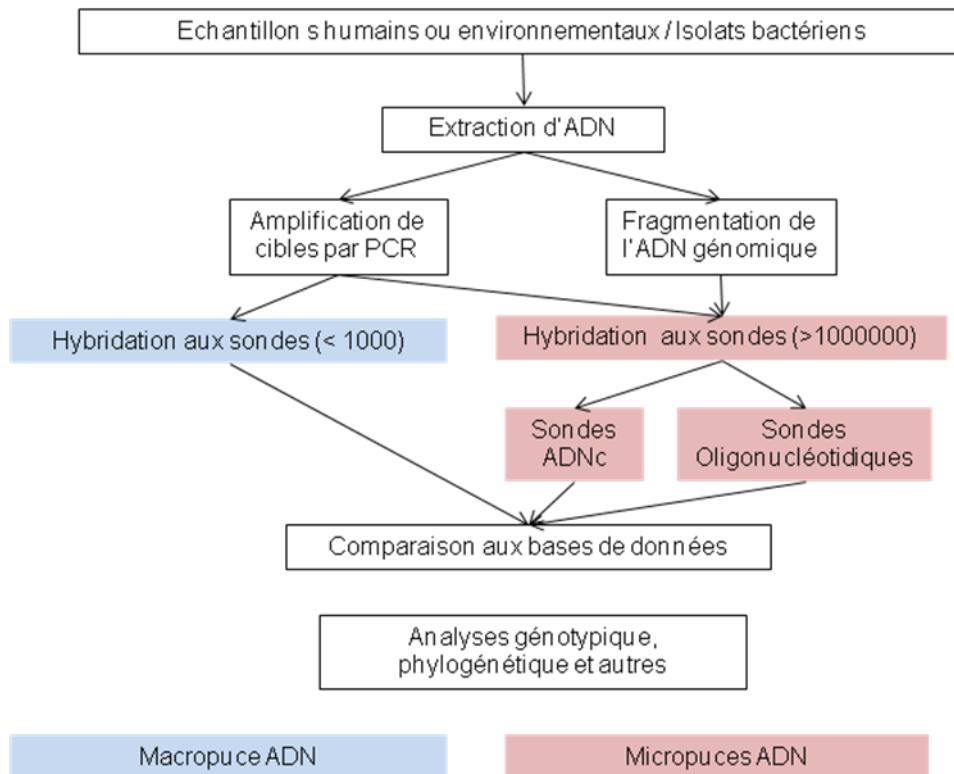
### **2.2.2.4. Méthodes basées sur l'hybridation moléculaire**

L'hybridation moléculaire est utilisée pour la détection de mutations car elle est basée sur le principe de complémentarité des bases nucléotidiques entre une sonde de séquence connue et une cible ADN. L'identité et l'abondance de la cible sont données grâce à un système de sondes fixées sur un support solide (membrane, verre, plastique ou métal),



auxquelles vont s'hybrider les cibles complémentaires marquées par différents colorants fluorescents : il s'agit des systèmes de puces. Ces systèmes sont souvent très coûteux et des ambiguïtés dans l'interprétation des ratios d'hybridation et de contre-hybridation de gènes paralogues constituent d'importantes limites à cette technique (Garaizar et al., 2006).

Le diagramme des systèmes de puces à ADN est présenté sur la Figure 5.



**Figure 5:** Diagramme des méthodes de génotypage basées sur l'hybridation ADN-ADN (adapté de Li et al., 2009).

#### 2.2.2.4.1. *Macropuces à ADN*

Dans ce système, jusqu'à 500 sondes sont fixées sur support (en général de nylon ou de nitrocellulose). Il s'agit de gènes complets amplifiés par PCR ou provenant de banques d'ADNc. Les gènes associés à la résistance aux antibiotiques, à l'exemple des gènes *rpoB*, *katG*, *inhA* et *ahpC* associés à la résistance à la rifampicine et l'isoniazide chez

*Mycobacterium tuberculosis*, (Zhang et al., 2007) ou encore les loci CRISPR (Mokrousov et al., 2009) font partie des cibles étudiées grâce aux micropuces d'ADNc.

Son pouvoir discriminant peut être limité à cause du nombre de cibles étudiées, même si c'est une méthode rapide et spécifique.

#### **2.2.2.4.2. Micropuces ADN**

Le nombre de cibles étudiées (jusqu'à 1000000) est plus important que pour les micropuces. Ces cibles peuvent représenter la plupart des gènes d'un microorganisme et le nombre d'isolats analysables peut être important. C'est donc un système de génotypage à haut débit (Garaizar et al., 2006). Les sondes utilisées sont choisies d'après des génomes de souches de référence chez lesquelles certains gènes peuvent être absents alors qu'ils sont bien présents dans d'autres souches de la même espèce : il s'agit des gènes accessoires (Lefebure and Stanhope, 2007). Ceci peut avoir pour conséquence la sous estimation de la diversité génétique au sein d'une population.

##### *Micropuce à ADN complémentaire (ADNc)*

Dans le système de micropuces à ADNc, les sondes sont des gènes amplifiés par PCR ou présents dans les banques d'ADNc. Il peut s'agir de gènes associés à la virulence, au sérotype, à la résistance aux antibiotiques... Une micropuce à ADNc peut contenir la totalité des séquences codantes d'un génome (Hinchliffe et al., 2003).

##### *Micropuce oligonucléotidique*

Dans ce cas, les sondes sont des oligonucléotides de 30 à 70 pb. Les micropuces oligonucléotidiques permettent de détecter les SNPs et les petites délétions. En effet, les sondes correspondent à plusieurs fragments d'un même gène. Leurs faibles longueurs font des micropuces oligonucléotidiques des systèmes plus discriminants que les micropuces à ADNc (Garaizar et al., 2006).

### **2.2.3. Bilan des avantages et inconvénients des différentes méthodes**

D'une manière générale, les techniques faisant appel à l'amplification par PCR présentent l'avantage d'être sensibles et spécifiques car la PCR permet de travailler sur de faibles quantités de bactéries et sur de l'ADN dégradé ou ancien. Ceci peut s'avérer profitable dans les études de bactéries fastidieuses telles que *Mycobacterium tuberculosis* qui nécessite près de 3 semaines de culture, ou dans le cadre d'étude d'isolats anciens. Dans certains cas où la disponibilité des échantillons est limitée, ou pour des échantillons environnementaux totaux, ils permettent de s'affranchir des problèmes liés à la disponibilité d'isolats (non-cultivabilité et mort cellulaire). Mais dans les faits, aucune technique de génotypage ne se montre parfaitement satisfaisante au vu de tous les critères de choix énoncés (Van Belkum et al., 2001). Seul le séquençage de génomes entiers reste la technique qui permettrait d'émettre des conclusions définitives quant à la clonalité de souches bactériennes. Les avantages et inconvénients des techniques de génotypage sont résumés dans le Tableau 2.

**Tableau 2** : Caractères des principales méthodes de génotypage (inspiré de Van Belkum et al., 2001)

<b>Technique de génotypage</b>	<b>"Typabilité"</b>	<b>Reproductibilité</b>	<b>Pouvoir discriminant</b>	<b>Facilité de mise en œuvre</b>	<b>Facilité d'interprétation</b>	<b>Accessibilité de la méthode</b>	<b>Coût</b>	<b>Utilisation actuelle</b>
<b>PFGE</b>	excellente	bonne	excellent	bonne	bonne	variable	élevé	élevée
<b>RFLP</b>	excellente	variable	variable	bonne	passable	variable	moyen	faible
<b>RAPD</b>	excellente	faible	faible	bonne	faible	bonne	moyen	faible
<b>Rep-PCR</b>	excellente	variable	variable	bonne	bonne	bonne	moyen	moyenne
<b>MLVA</b>	excellente	excellente	excellent	excellente	excellente	bonne	faible	moyenne
<b>HRM/ DGE</b>	excellente	bonne	variable	bonne	bonne	variable	élevé	moyenne
<b>AFLP</b>	excellente	bonne	excellent	bonne	passable	faible	élevé	élevée
<b>PCR-RFLP</b>	excellente	variable	Variable	bonne	excellente	bonne	faible	moyenne
<b>SNP</b>	excellente	excellente	Bon	bonne	bonne	variable	élevé	élevée
<b>MLST</b>	excellente	excellente	Excellent	bonne	excellente	bonne	élevé	élevée
<b>MST</b>	excellente	excellente	excellent	bonne	excellente	bonne	élevé	moyenne

## **2.3. Variabilité génétique et structures de population**

### **2.3.1. Notion d'espèce bactérienne**

Alors que la définition de l'espèce chez les eucaryotes est basée sur la biologie de la reproduction, la notion d'espèce chez les bactéries est définie plutôt en termes de similarité et de parenté entre les souches. Cette notion a longtemps reposé uniquement sur les similarités morphologiques/phénotypiques, mais la taxonomie actuelle se base sur les données génomiques. Néanmoins, la notion d'espèce bactérienne reste difficile à formuler sans ambiguïtés et à être acceptée de manière universelle.

Il a été longtemps admis qu'une espèce bactérienne rassemble en son sein des individus présentant au moins 70% d'homologie ADN-ADN (Wayne et al., 1987). Il s'agit là de la notion de géoespèce où la ressemblance entre génomes était calculée par hybridation ADN-ADN des génomes bactériens complets. Un autre concept plus général, propose de définir l'espèce bactérienne comme un groupe indivisible composé d'individus partageant une relation d'ascendance et de descendance (Cracraft, 1983). D'après ce concept, une espèce microbienne correspondrait donc à une unité de typage discrète. Elle repose lourdement sur la qualité des données de typage génétique et donc, sur la précision de la variabilité génétique observable au sein d'une population donnée. Cette dernière définition désigne l'espèce bactérienne comme une unité de typage discret et tend à séparer de manière arbitraire des microorganismes potentiellement inclus dans un continuum. De ce fait, quelques auteurs proposaient dès 1996 (Vandamme et al., 1996), une approche « polyphasique » consistant à utiliser le maximum de données fournies par différents champs disciplinaires de la biologie pour définir une espèce. Ce type d'approche a été fortement recommandé par un comité ad hoc en 2002 (Stackebrandt et al., 2002), qui encourage les communautés scientifiques à définir les espèces bactériennes sur la base de congruence des résultats obtenus par plusieurs méthodes avec les données d'hybridation ADN-ADN qui reste une base solide pour définir une espèce.

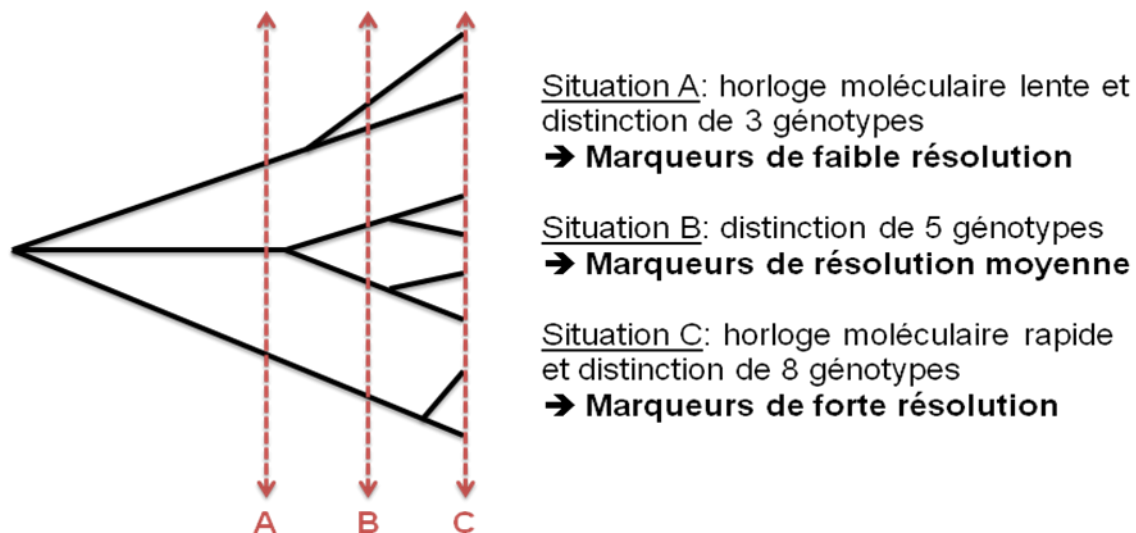
Finalement, même si la notion d'espèce bactérienne s'avère être en perpétuelle évolution, la définition la plus appropriée semble être celle donnée par Rosselló-Mora and Amann (2001) :

« une espèce est une catégorie qui circonscrit un ensemble génomiquement (de préférence) cohérent d'isolats individuels ou des souches, partageant un degré élevé de similitude des (nombreux) éléments indépendants, comparativement testés dans des conditions très standardisées ». La définition de l'espèce, à l'évidence, passe par l'étude de la variabilité intraspécifique et interspécifique. Ainsi, l'étude de la variabilité intraspécifique (de laquelle naissent les espèces, puisque partiellement définies par elle) sert aussi bien la taxonomie, la phylogénie, que l'épidémiologie.

### **2.3.2. Marqueurs de variabilité génétique au sein de populations bactériennes**

Une étude de variabilité peut concerner l'analyse soit de la totalité du génome, soit de séquences ou de gènes particuliers dits cible ou marqueur, comme énoncé dans la présentation des méthodes de génotypage. Le choix d'un ou plusieurs marqueurs dont dépend celui de la méthode de génotypage, dépend de la question de recherche. Ce choix apparaît donc comme une étape primordiale à ce type d'étude et doit répondre à un certain nombre de critères. En effet, les caractéristiques du (des) marqueur(s) vont influencer sur la qualité de l'information apportée. C'est cette influence qui oblige à l'utilisation de plusieurs méthodes rendant ainsi les résultats d'étude de variabilité génétique plus fiables.

Parmi les caractéristiques du marqueur, la vitesse de mutation de celui-ci est un élément à prendre en compte. En effet, selon l'évolution du marqueur, on observe plus ou moins de types génétiques différents : plus rapide est l'évolution, plus les types génétiques sont nombreux. Ceci est illustré dans la Figure 6 ci-après.



**Figure 6:** Arbre phylogénétique hypothétique décrivant la divergence évolutive entre des génotypes de bactéries (d'après Tibayrenc, 1998).

La présence et l'état (variation allélique) d'un marqueur répond à deux enjeux vitaux et complémentaires, à savoir conserver l'information génétique tout en s'adaptant à des environnements changeants. Les marqueurs à évolution lente (cas A, Figure 6) sont, pour la plupart, des éléments du core-génome. Ils sont présents chez tous les isolats d'une même espèce et sont utiles pour son fonctionnement vital. Dans un contexte d'étude de variabilité génétique au sein d'une population bactérienne, ils sont utiles à des échelles spatio-temporelles importantes, dans le cadre d'analyses phylogénétiques (Tibayrenc, 1998), par des méthodes telle que la MLST ou la PFGE (Li et al., 2009).

Les marqueurs à évolution rapide (cas C, Figure 6), jouent souvent un rôle dans l'adaptation d'une population à son environnement. Parmi les marqueurs à évolution rapide, on retrouve des gènes qui codent pour des protéines de surface, des facteurs de virulence, ou les espaceurs intergéniques. Ainsi, ils voient leur pertinence dans des études à court terme et échelle géographique restreinte, de type situation épidémique. Ce type d'étude est possible par des méthodes telles que la MST, la MLVA, la DGE et la HRM (Li et al., 2009).

La stabilité constitue un élément à prendre en compte lors du choix d'un marqueur de variabilité génétique. En effet, pour être pertinent, un marqueur génétique doit être stable dans

le temps pour tous les isolats après isolement et durant toute la période de stockage (Van Belkum et al., 2007). Cette stabilité est testée au travers de cultures successives d'isolats stockés sur des périodes différentes et dans des conditions différentes, afin de minimiser les variations introduites en laboratoire (Vogel et al., 1999).

On peut classer les différentes techniques présentées au paragraphe 2.2.3 en fonction du type de marqueur(s) choisi(s) pour répondre à la question d'étude (Tableau 3). Nous soulignons qu'il ne s'agit pas ici d'un classement strict.

**Tableau 3:** Sélection de méthode de génotypage selon la vitesse d'évolution des marqueurs.

	<b>Polymorphisme de longueur de fragment</b>	<b>Séquençage</b>	<b>Hybridation</b>
Marqueurs à évolution lente (surveillance à long terme)	PFGE	MLST, Séquençage de génomes	micropuces ADNc
Marqueurs à évolution rapide (histoire d'une épidémie)	MLVA, DGE, HRM, RFLP, PCR-RFLP, AFLP, RAPD, Rep-PCR	MST, Séquençage de génome	micropuces ADNc

### 2.3.3. Structures de population

L'étude de la variabilité génétique au sein d'une population est une investigation qui permet de définir la structure génétique d'une population bactérienne en déterminant s'il y a déséquilibre de liaison ou non. Le déséquilibre de liaison correspond à la survenue d'évènements de réassortiment non aléatoire d'allèles à différents loci, en fonction de leur position physique sur le chromosome.

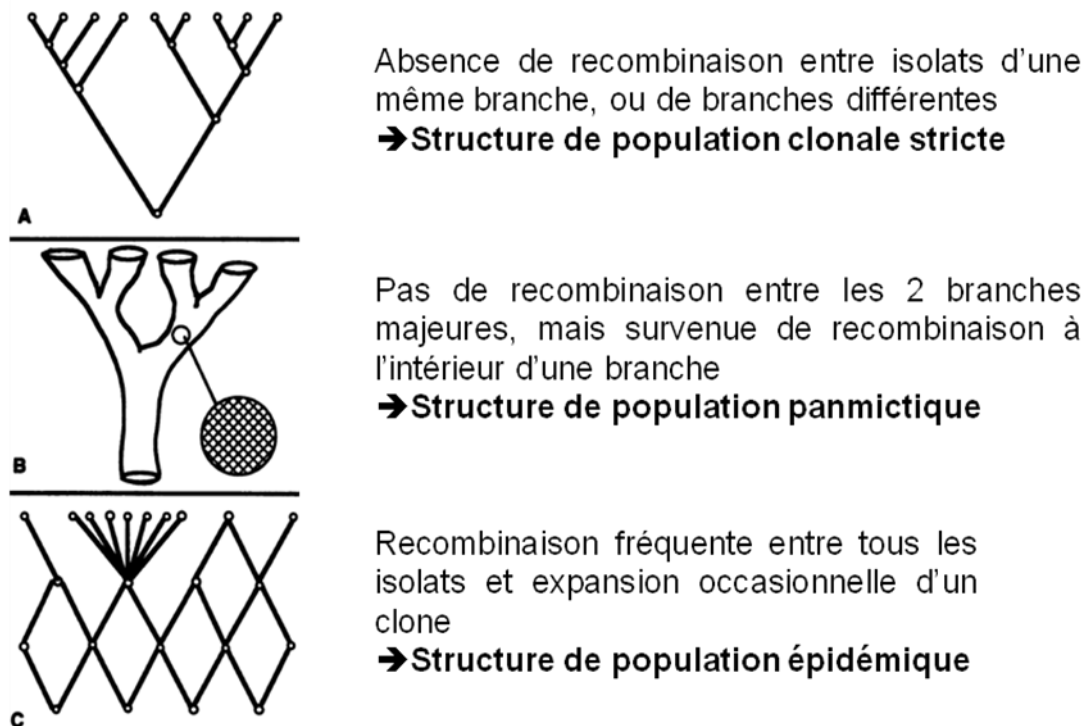
Dans le cas de populations clonales, le déséquilibre de liaison est très important et souvent expliqué par un taux de recombinaison très faible, à l'exemple du genre *Salmonella* (Smith et al., 1993). Cependant, un déséquilibre de liaison peut être observé dans des populations présentant de fortes fréquences de recombinaisons, comme dans le cas de *Rhizobium meliloti* (Smith et al., 1993). Ce fait peut être observé lorsque deux ou plusieurs sous-populations géographiquement isolées sont présentes au sein d'un même échantillon étudié, dans lequel le flux de gènes est limité à chaque sous-population : il s'agit d'une spéciation cryptique.



L'absence de recombinaison entre les sous-populations est alors due à des barrières géographiques, écologiques ou biologiques qui empêchent les échanges génétiques entre elles. A l'inverse des populations clonales, dans certains cas (*Neisseria gonorrhoeae*, Smith et al., 1993), le déséquilibre de liaison est absent et donc, les allèles sont distribués de manière aléatoire : on parle alors de populations panmictiques.

Dans un contexte épidémique, on assiste à la forte représentation d'un type génétique particulier (principal type responsable de l'épidémie). Cette surreprésentation conduit à l'observation d'un déséquilibre de liaison temporaire ; laissant penser à une population de type clonale, alors qu'elle est panmictique : on parle de population épidémique (Smith et al., 1993). Les différentes structures de populations sont représentées sur la Figure 7.

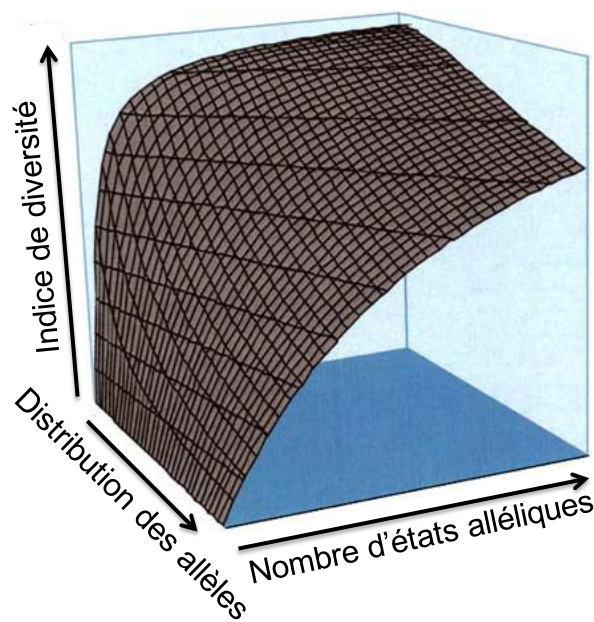
L'analyse de structure de population sera plus largement développée dans le Chapitre II.



**Figure 7** : Représentation des structures de populations (d'après Smith et al., 1993).

### 2.3.4. Impact des variations génétiques et de la sélection naturelle sur la structure de population

Si les mutations et les répétitions de séquences créent de nouveaux allèles, les transferts de matériel génétique et la recombinaison en particulier, vont affecter la distribution de ces allèles au sein d'une population. Plus les états alléliques diffusent, plus la diversité augmente et la diversité maximum au sein d'une population est atteinte seulement quand les états alléliques sont à fréquences égales (Keim et al., 2004), comme illustré sur la Figure 8.



**Figure 8 :** Diversité et nombre d'états alléliques affectant la diversité (donné ici par l'indice de diversité). La diversité à chaque locus est fonction du nombre d'allèles (états alléliques) et de leur fréquence de distribution (Keim et al., 2004).

La sélection naturelle aussi a des effets sur les variants génétiques au sein d'une population. Ses effets vont dépendre de deux éléments : les effets des nouveaux génotypes sur le fitness (bénéfiques ou délétères) des isolats et la taille de la population (Van Belkum et al., 2001) :

- si la variation n'entraîne aucun effet (effet neutre), la sélection naturelle n'a aucune incidence sur les variants alléliques et donc, aucun effet dans la population. Leur maintien au sein de la population dépend de leur « chance » à être transmis ;
- si la variation a des effets délétères, les variants concernés sont éliminés par sélection naturelle qui empêche ainsi l'augmentation de variabilité génétique au sein de populations évoluant indépendamment ;
- si la variation a des effets bénéfiques, l'effet de la sélection naturelle au sein de populations de taille réduite est neutre alors qu'elle est bénéfique (participe au maintien des « bons » variants) dans les populations de taille plus importante.

*Après avoir décrit les origines possibles des variations génétiques observables dans les populations bactériennes ainsi que les méthodes permettant de les observer, dans la partie suivante, nous nous attacherons à décrire différents aspects de la flavobactériose des eaux froides, ainsi que les caractéristiques de son agent, Flavobacterium psychrophilum, notre sujet d'étude.*



## 3. La flavobactériose et son agent

### 3.1. La maladie

#### 3.1.1. Historique

En 1941 puis en 1945, deux importantes épizooties touchant des alevins de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) se sont produites dans une exploitation aquacole aux Etats-Unis. Celles-ci étaient associées à une affection de la nageoire caudale et du pédoncule, d'où la désignation de « Peduncle disease », maladie du pédoncule (Davis, 1946). La même maladie a été ensuite observée dans des populations de saumons coho du Pacifique (*Oncorhynchus kisutsh*) en 1948, où la mortalité a été très sévère malgré des températures inférieures à 10°C. Pour cette dernière raison, cette maladie a été rebaptisée « low temperature disease » ou « maladie des eaux froides » (Borg, 1960), puis « Coldwater disease » (Wood and Yasutake, 1956). Dès 1999, par convention, « Bacterial Cold Water Disease » (BCWD) devient le nom établi pour désigner cette maladie aux Etats-Unis (Holt, 1988; Holt et al., 1993) qui touche préférentiellement les stades adultes de poissons, alors qu'en Europe, elle est plus connue sous le nom de « Rainbow trout fry syndrome » (RTFS) qui touche les stades juvéniles (Rangdale, 1999).

L'évolution de la position taxonomique de l'agent incriminé dans cette maladie, *Flavobacterium psychrophilum*, a joué un rôle important dans la désignation de la maladie. En France, après avoir pris le nom de myxobactériose viscérale (Baudin-Laurencin et al., 1989), puis de flexibactériose (Bernardet and Grimont, 1989), elle a pris le nom de flavobactériose des eaux froides qui sera utilisé tout au long de ce manuscrit.

#### 3.1.2. Espèces concernées

La flavobactériose des eaux froides touche principalement les poissons du genre salmonidés. Les stades juvéniles des espèces truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et saumon coho (*Oncorhynchus kisutsh*) y sont particulièrement sensibles, même si des cas de flavobactérioses sont observables à tous les stades de développement. Des cas ont été aussi enregistrés chez des espèces en dehors du genre des salmonidés, telles que l'ayu

(*Plecoglossus altivelis*), l'anguille (*Anguilla anguilla*) et divers cyprinidés tels que la carpe commune (*Cyprinus carpio*), le carassin (*Carassius carassius*) et la tanche (*Tinca tinca*) (voir Tableau 4). Cette maladie atteint aussi bien les populations sauvages que les poissons d'élevage (Starliper, 2010).

### **3.1.3.Répartition géographique**

Depuis sa première observation aux Etats-Unis (Davis, 1946), des cas de flavobactériose des eaux froides ont été enregistrés dans de nombreux pays, et notamment ceux où la pisciculture a connu un fort développement depuis les années 1950. Elle est apparue en Europe dès les années 80 où elle se serait répandue *via* les échanges commerciaux de poissons, d'alevins ou d'œufs embryonnés (Baudin-Laurencin et al., 1989; Rangdale, 1995). La flavobactériose des eaux froides a également été observée en Asie (Japon, Corée), en Amérique latine (Chili) et en Australie. Le Tableau 4 ci-dessous résume les principaux pays où des épizooties dues à *F. psychrophilum* ont été décrites (Starliper, 2010).

**Tableau 4 :** Principaux pays (A) d'Europe et (B) hors Europe, et espèces hôtes pour lesquels des cas de flavobactérioses ont été déclarés (d'après Starliper, 2010).

A/

<b>Origine géographique européenne</b>	<b>Poisson hôte</b>
Allemagne	Anguille ( <i>Anguilla anguilla</i> )
	Carassin ( <i>Carassius carassius</i> )
	Tanche ( <i>Tinca tinca</i> )
	Truite arc-en-ciel ( <i>Onchorynchus mykiss</i> )
Danemark	Tuite arc-en-ciel
Ecosse	Tuite arc-en-ciel
Espagne	Anguille ( <i>A. anguilla</i> )
	Tuite arc-en-ciel
Estonie	Ombre de rivière ( <i>Thymallus thymallus</i> )
Finlande	Gardon ( <i>Rutilus rutilus</i> )
	Ombre chevalier ( <i>Salvelinus alpinus</i> )
	Ombre de fontaine ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )
	Perche ( <i>Perca fluviatilis</i> L.)
	Poisson à chair blanche ( <i>Coregonus muksun</i> ),
	Truite de mer ( <i>Salmo trutta morpha trutta</i> ),
	Tuite arc-en-ciel
Tuite brune ( <i>Salvelinus trutta morpha lacustris</i> ),	
France	<b>Anguille (<i>A. anguilla</i>)</b>
	<b>Carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i>)</b>
	<b>Tuite arc-en-ciel</b>
Irlande du Nord	Tuite arc-en-ciel
Norvège	Truite brune ( <i>S. trutta morpha lacustris</i> )
Royaume Uni	Saumon atlantique ( <i>Salmo salar</i> )
	Tuite arc-en-ciel
Suède	Saumon atlantique
	Truite de mer
	Tuite arc-en-ciel
Suisse	Tuite arc-en-ciel

B/

<b>Origine géographique hors Europe</b>	<b>Poisson hôte</b>
Australie	Saumon atlantique Truite arc-en-ciel
Canada	Lamproie marine ( <i>Petromyzon marinus</i> L.) Omble chevalier Omble de fontaine Saumon atlantique Saumon coho ( <i>Onchorynchus kisutch</i> ) Truite arc-en-ciel
Chili	Saumon atlantique Truite arc-en-ciel
Corée	Ayu ( <i>Plecoglossus altivelis</i> )
Etats Unis	Esturgeon blanc ( <i>Acipenser transmontanus</i> ) Omble de fontaine Poisson rouge ( <i>Carassius auratus</i> ) Saumon atlantique Saumon coho Saumon kéta ( <i>Onchorynchus keta</i> ) Saumon quinnat ( <i>Onchorynchus tshawytscha</i> ) Touladi ( <i>Salmo namaycush</i> ) Truite brune Truite fardée ( <i>Onchorynchus clarkii</i> ) Truite arc-en-ciel
Japon	Anguille ( <i>Anguilla japonica</i> ) Ayu Carassin japonais ( <i>Carassius auratus langsdorfii</i> ) Carpe commune Gobie ( <i>Chaenogobius urotaenia</i> et <i>Rhinogobius brunneus</i> ) Poisson dragon ( <i>Zacco platypus</i> ) Saumon amago ( <i>Onchorynchus rhodurus</i> ) Saumon coho Saumon iwana ( <i>S. leucomaenis pluvius</i> ) Saumon kéta Saumon yamame ( <i>Onchorynchus masou</i> ) Truite arc-en-ciel Ugui ( <i>Tribolodon hakonensis</i> )
Pérou	Truite arc-en-ciel
Turquie	Truite arc-en-ciel



### 3.1.4. Signes cliniques

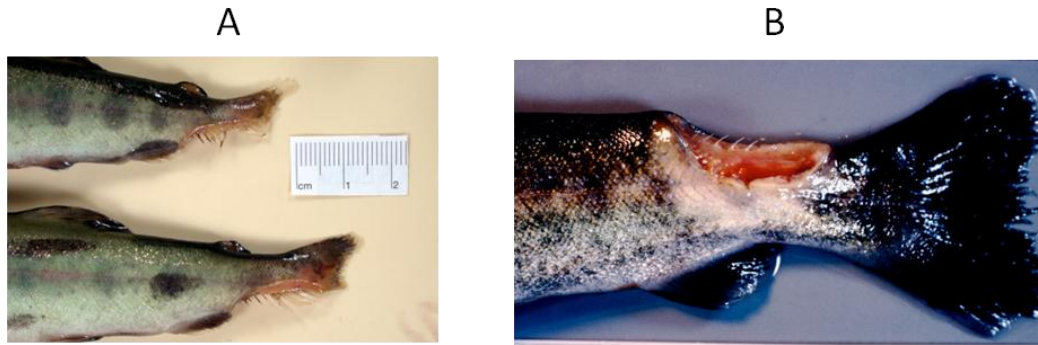
Les manifestations cliniques classiques de la maladie et les taux de mortalité dépendent de la taille des poissons infectés (Holt et al., 1993).

Pour la forme BCWD chez le saumon coho, la nageoire adipeuse constitue le point de départ de l'infection avec des signes cliniques qui varient au cours de l'épizootie. Au début de l'épizootie, des lésions sont observables au niveau de la peau. Dans sa progression, l'infection touche ensuite la nageoire dorsale, les faces latérales du corps, le ventre puis la mâchoire inférieure (Holt et al., 1993). Une pigmentation sombre de la peau, surtout au niveau du pédoncule, peut apparaître. Dans certains cas, d'autres signes très variés de la maladie tels que l'exophtalmie, la nage en spirale ou encore une déformation de la colonne vertébrale (Borg, 1960; Bustos et al., 1995; Evensen and Lorenzen, 1996; Lumsden et al., 1996) peuvent se manifester. Ces deux derniers symptômes, d'ordre neurologique, peuvent être observables longtemps après l'infection, chez les poissons survivants (Kent et al., 1989; Madsen et al., 2001).

La forme RTFS touche majoritairement les alevins chez lesquels des atteintes viscérales sont observées. Au niveau interne, des lésions nécrotiques ont été observées sur le foie, la rate et le rein (Ekman and Norrgren, 2003; Wood and Yasutake, 1956). L'autopsie de poissons atteints de flavobactériose a aussi révélé l'accumulation abdominale d'ascite, surtout chez les alevins, une pâleur du foie et du rein, et la rate souvent sujette aux hémosidéroses (Bruno, 1992), hémorragies, et nécroses (Ekman, 2008).

Starliper et al. (2010) différencie les manifestations cliniques en une forme classique où les lésions externes se développent préférentiellement sur la nageoire caudale et le pédoncule caudal (Figure 9), et en une forme aigüe où les lésions internes sont prédominantes.

Les infections à *F. psychrophilum* provoquent des taux de mortalité d'ordre variable. Celui le plus élevé jamais rapportée a atteint 90% chez la truite arc-en-ciel (Lorenzen and Olesen, 1997). Il a été démontré que l'infection entraînait des taux de mortalité plus importants chez les poissons juvéniles que chez les adultes (Decostere et al., 2001; Holt, 1988).



**Figure 9** : Signes cliniques externes de la flavobactériose des eaux froides chez des truites arc-en-ciel. (A) atteinte de la nageoire caudale chez des truitelles et (B) atteinte du pédoncule caudal chez des adultes (photos fournies par E. Duchaud).

### 3.1.5.Épidémiologie de la flavobactériose

#### 3.1.5.1. Réservoirs

*F. psychrophilum* a été retrouvé dans l'eau (Madetoja and Wiklund, 2002; Madsen et al., 2005; Wiklund et al., 2000) et dans d'autres compartiments environnementaux tels que les sédiments et les algues (Amita et al., 2000; Izumi et al., 2005). Le portage sain de *F. psychrophilum* par des populations naturelles de poissons, sans développement d'aucun signe clinique de la maladie, laisse supposer que ces populations de poissons peuvent jouer le rôle de réservoirs (Chen et al., 2008). Il a été montré que 58 à 100% d'ayu sauvages, apparemment sains, provenant de quatre rivières de la préfecture de Miyagi au Japon et n'ayant jamais été en contact avec des poissons d'élevage, étaient porteurs de *F. psychrophilum* (Kumagai et al., 2011).

#### 3.1.5.2. Transmission horizontale

Plusieurs études portant sur les voies de transmission de *F. psychrophilum* ont clairement démontré la transmission horizontale de la bactérie par cohabitation entre poissons malades et poissons sains (Lorenzen et al., 1991; Madsen and Dalsgaard, 1999). Il a été mis en évidence que les lésions de la peau constituent une importante voie d'entrée de la bactérie dans le poisson et que les poissons morts de flavobactériose excrètent dans leur environnement des quantités considérables de bactéries, augmentant ainsi le risque de contamination des poissons sains (Madetoja et al., 2000).

### **3.1.5.3. Transmission verticale**

La transmission verticale directe quant à elle a été fortement suspectée et incriminée dans la diffusion de la bactérie dans les régions salmonicoles au travers du commerce des œufs et ce, en dépit de leur désinfection systématique par des dérivés iodés.

En 1997, une équipe californienne a mis en évidence par des méthodes culturales, la présence de *F. psychrophilum* à la surface d'œufs fertilisés, d'embryons et de très jeunes alevins de truite argentée désinfectés (Brown et al., 1997). Cette équipe a aussi montré, pour la première fois, la présence de *F. psychrophilum* dans des homogénats de ces mêmes trois stades de développement après une désinfection poussée.

Au Japon, des élevages n'ayant pas reçu d'œufs importés se sont montrés indemnes de la présence de l'agent de la flavobactériose, contrairement aux élevages ayant reçu des œufs importés chez lesquels la bactérie a été retrouvée, démontrant ainsi, le rôle des échanges commerciaux dans la diffusion de l'agent et de la maladie (Kumagai and Takahashi, 1997).

La présence de *F. psychrophilum* a été mise en évidence dans le liquide ovarien et la laitance de géniteurs salmonidés (Kumagai and Nawata, 2011), à la surface et à l'intérieur d'œufs fertilisés ou non, et à différents stades de développement des poissons (Ekman et al., 1999; Kumagai and Nawata, 2010a; Kumagai et al., 1998). Il est à noter que dans toutes les études présentées ici, la détection de la bactérie ne s'est pas faite sur un œuf individuel mais, sur un pool d'œufs (au moins 5 œufs), et que la proportion des cas positifs est restée non majoritaire. Ce fut le cas d'œufs issus d'élevages danois sur lesquels aucune bactérie n'a été retrouvée ni en externe, ni en interne (Madsen et al., 2005).

Des essais d'infection expérimentale d'œufs par immersion dans un milieu de culture de *F. psychrophilum* ont montré que l'entrée de la bactérie dans l'œuf se produit avant le durcissement de l'œuf fécondé (« water hardening ») (Kumagai and Nawata, 2010a; Kumagai et al., 1998). Le dénombrement bactérien lors de ce challenge a montré que la concentration en *F. psychrophilum* passe de moins de 10 CFU/œuf juste après la fertilisation à plus de  $10^7$  CFU/œuf au stade œuf embryonné. Kumagai et Nawata (2010a) émettent l'hypothèse que lors du processus de durcissement de l'œuf, de faibles concentrations de bactéries (moins de 10 CFU/œuf) traverseraient de manière passive le micropyle, petit orifice présent sur la paroi de

l'œuf, dans lequel elles se multiplieraient au niveau de l'espace péri-vitellin. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'il a été montré que *F. psychrophilum* est capable de survivre après 7 jours d'incubation dans le contenu d'œufs infectés (Brown et al., 1997; Yousif et al., 1994).

### **3.1.6.Mécanismes de pathogénicité**

La colonisation des tissus d'un hôte par une bactérie pathogène dépend de la capacité d'adhérence (spécifique ou non) de celle-ci. Dans le cas de *F. psychrophilum*, l'adhésion spécifique est médiée par des composés situés à la surface de la bactérie, qui se lient à des récepteurs présents sur les tissus de l'hôte (Dalsgaard, 1993), alors que l'adhésion non spécifique dépend des interactions hydrophobes ou ioniques entre la surface de la bactérie et le substrat (Vatsos et al., 2001). L'adhésion, de même que la mobilité de *F. psychrophilum*, pourrait être aidée par une mince couche de mucus présente à la surface de la bactérie (Dalsgaard, 1993).

Une fois présent dans l'hôte, *F. psychrophilum* produit des toxines qui participeraient à l'apparition des signes cliniques de la maladie. En effet, l'anémie observée chez les truites arc-en-ciel juvéniles serait partiellement provoqué par la capacité de la bactérie à lyser et à agglutiner les érythrocytes de l'hôte (Lorenzen, 1994). Des essais *in vitro* ont montré la capacité d'une préparation extracellulaire de *F. psychrophilum* d'une part à dégrader la caséine, la gélatine et le collagène type II (collagène du cartilage), et d'autre part à provoquer une nécrose musculaire sévère après injection péritonéale chez la truite arc-en-ciel (Ostland et al., 2000). De plus, les enzymes extracellulaires de *F. psychrophilum* seraient importants dans le développement de la maladie au niveau externe.

### **3.1.7.Méthodes de lutte**

#### ***3.1.7.1. Mesures préventives***

La réduction de la prévalence de l'agent responsable de la flavobactériose des eaux froides en élevage repose sur le respect de conditions sanitaires (désinfection systématique des installations, installation de pédiluves... etc), la surveillance et le maintien d'une bonne qualité de l'eau (Cipriano and Holt, 2005; Madsen and Dalsgaard, 2008). La désinfection des œufs avec des iodophores est souvent répertoriée en tant que mesure préventive contre la

flavobactériose des eaux froides (Cipriano and Holt, 2005; Kumagai and Nawata, 2010b; Taylor, 2004). Cependant, *F. psychrophilum* est très tolérante à l'iode, et peut survivre à des traitements d'au moins 100 mg.L<sup>-1</sup> d'iode actif pendant 30 minutes (Brown et al., 1997; Kumagai, 2005; Kumagai et al., 1998). Des études récentes ont néanmoins démontré que la charge bactérienne sur les œufs pouvait être réduite grâce à des composés tels que le peroxyde d'hydrogène (Wagner et al., 2010). L'élimination rapide des poissons morts de flavobactériose des eaux froides, qui rejettent d'importantes concentrations en bactérie dans l'eau, est également fortement recommandée (Madetoja et al., 2000).

Le stress engendré par les manipulations répétées, les densités élevées dans les bassins et la présence d'autres pathogènes dans le milieu, peuvent influencer sur la sévérité des épizooties en jouant sur le fitness du poisson. Ce sont donc également des paramètres à prendre en compte pour limiter l'impact de la maladie dans les bassins.

Même si d'importants efforts ont été fournis pour la mise au point de vaccins, aucun n'a été, à ce jour, mis sur le marché. Des essais de vaccination par voie orale, balnéation ou injection ont montré des résultats de protection variables. Dans la plupart des essais, les solutions vaccinales ont été élaborées à partir de suspensions de cellules entières de *F. psychrophilum* inactivées au formol (Holt, 1987; Kondo et al., 2003; LaFrentz et al., 2002; Lorenzen et al., 2010; Rahman et al., 2000) ou à la chaleur (Obach and Baudin Laurencin, 1991). Obach et Baudin Laurencin (1991) ont confirmé des résultats antérieurs (Holt, 1987) qui montraient que la vaccination par injection offre une protection plus importante que la vaccination par immersion. L'émulsion de la solution vaccinale dans un adjuvant semble être un facteur élicitant l'action protectrice du vaccin (Rahman et al., 2000). Il est intéressant de noter qu'assez récemment, une étude a montré qu'une immersion dans un bain contenant des cellules non-inactivées de *F. psychrophilum* n'entraînait aucune mortalité chez des truites arc-en-ciel et était capable de générer de l'immunité (Lorenzen et al., 2010).

Les travaux de Rahman et al. (2002) ont montré que la fraction antigénique de la membrane externe (« outer membrane fraction » ou OMF) de *F. psychrophilum* utilisée dans une solution vaccinale engendrait une protection humorale supérieure à celle obtenue avec des cellules entières. Depuis, de nombreuses études ont porté sur l'identification de protéines

immunogènes présentes dans l'OMF potentiellement utilisables dans des solutions vaccinales pour le développement de vaccins recombinants (Dumetz et al., 2008; LaFrentz et al., 2009; LaFrentz et al., 2011; LaFrentz et al., 2004). Plusieurs fractions immunogéniques de l'OMF ont été testées, ainsi que les protéines EFTU (facteur d'élongation Tu), SufB (protéine d'assemblage (protéine d'assemblage SufB Fe-S) et l'ATP synthase $\beta$ . Elles ont été produites *in vitro* et administrées sans pouvoir montrer de protection chez les truites arc-en-ciel testées (Plant et al., 2011). Le même échec a été constaté avec les protéines recombinantes Hsp60 et Hsp70 (Plant et al., 2009), qui sont des protéines fortement immunogènes de *F. psychrophilum*.

### **3.1.7.2. Mesures thérapeutiques**

Les mesures thérapeutiques actuelles reposent essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques au moment des épizooties. Les antibiotiques autorisés et les procédures de traitement agréées varient d'un pays à un autre. Ces procédures sont soumises à l'approbation des autorités compétentes qui prennent en compte, entre autres, le temps d'élimination dans les tissus, la toxicité pour les poissons et la charge rejetée dans l'environnement (Starliper, 2010). Par exemple, le nifurpirinol, le furanace et les sulfonamides qui ont montré de l'efficacité dans le contrôle de la flavobactériose des eaux froides sont désormais interdits aux USA, du fait de leur propriétés cancérogènes (Cipriano and Holt, 2005; Starliper, 2010). Au niveau mondial, l'antibiotique autorisé le plus utilisé est l'oxytétracycline et en Europe, il s'agit de l'amoxicilline et de l'acide oxolinique (Barnes and Brown, 2011). Le développement de résistance à ces trois antibiotiques a été rapporté et a conduit à une préférence de prescription pour le florfénicol (Barnes and Brown, 2011; Bruun et al., 2000), majoritairement utilisée en France. Néanmoins, une récente étude a montré une résistance au florfénicol et à l'acide oxolinique et a confirmé la résistance observée à l'oxytétracycline (Henríquez-Nuñez et al., 2012).

Souvent administrés par voie orale *via* l'alimentation, les traitements antibiotiques peuvent voir leur action limitée par deux facteurs. D'une part les épizooties les plus sévères sont observées chez les très jeunes alevins, qui ne se nourrissent pas encore par voie orale et d'autre part, les poissons affectés par la maladie souffrent d'anorexie et n'absorbent donc pas les doses thérapeutiques (Cipriano and Holt, 2005).

D'autres thérapies reposent sur la combinaison d'un traitement antibiotique classique et de bains thérapeutiques réguliers contenant des agents antimicrobiens tels que le peroxyde d'hydrogène qui va permettre de diminuer la charge du pathogène dans l'environnement du poisson (Gultepe and Tanrikul, 2006).

## **3.2. L'agent *Flavobacterium psychrophilum***

### **3.2.1. Taxonomie**

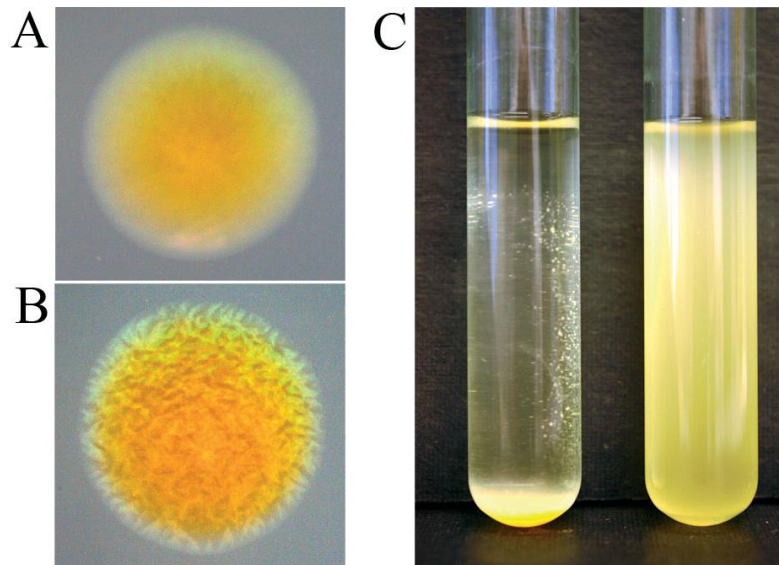
La taxonomie de l'agent de la flavobactériose des eaux froides a évolué depuis les travaux de Borg qui l'isola pour la première fois en 1948. Celui-ci, sur la base de ses caractéristiques biochimiques, le classa dans le genre *Myxobacter* et le nomma *Cytophaga psychrophila* (Borg, 1960). En 1989, Bernardet et Grimont l'ont reclassé dans le genre *Flexibacter* et renommé *Flexibacter psychrophilus*, suite à des études d'homologie d'ADN (Bernardet and Grimont, 1989). Des travaux basés sur l'hybridation ADN-ARNr ont ensuite conduit à son transfert vers le genre *Flavobacterium* et la bactérie prend alors son nom actuel de *Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet et al., 1996).

### **3.2.2. Morphologie et caractéristiques**

*F. psychrophilum* est un bacille à Gram négatif, filamenteux à bouts arrondis et sans pili, de 0,2 à 0,75 µm de diamètre sur 3 à 10 µm de longueur (Bernardet and Grimont, 1989; Madetoja et al., 2001; Pacha, 1968; Rangdale, 1995). Sa morphologie peut néanmoins être affectée par les conditions de culture (Kondo et al., 2001). Les colonies, isolées sur des milieux plutôt pauvres en nutriments, sont petites (1 à 5 diamètre), jaunes, brillantes et n'adhèrent pas à la gélose (Figure 10). Les colonies de *F. psychrophilum* peuvent présenter deux phénotypes (lisse et rugueux) en milieu de culture (Högfors-Rönholm and Wiklund, 2010).

*F. psychrophilum* possède une mobilité par glissement (« gliding motility ») très lente. Ce caractère n'est pas présent chez toutes les souches. Aérobie stricte, la croissance est

effective à des températures de 4 à 23°C mais elle est optimale à des températures de 14 à 18°C. La bactérie meurt lorsque la température dépasse 25°C.



**Figure 10 :** Phénotypes de culture de *F. psychrophilum*. (A) Colonie lisse et (B) colonie rugueuse, culture sur milieu TYE agar. (C) Bouillon de culture montrant une agglutination au fond du tube des colonies lisses (à gauche), et une absence d'agglutination des colonies rugueuses (à droite) (Högfors-Rönholm and Wiklund, 2010).

### 3.2.3.Méthodes d'identification

#### 3.2.3.1. Culture et identification phénotypique

Traditionnellement, l'identification phénotypique de *F. psychrophilum* passe par une étape culturelle d'isolats prélevés de la rate, du rein, du foie et parfois, du cerveau des poissons infectés. Plusieurs milieux non sélectifs (solides et liquides) ont été développés à cet effet. Les milieux les plus utilisés sont les milieux Tryptone-Extrait de levure-Sels (« Tryptone-Yeast extract-Salts »), sa déclinaison (FLP) par Cepeda et al. (2004), et le milieu d'Anacker et Ordal (AOA) (1959). Le milieu FLP permet la production de biomasses plus importantes de *F. psychrophilum* que certains des milieux cités, avec l'avantage d'avoir une préparation aisée (Cepeda et al., 2004).



Après incubation pendant 48 à 96 heures à 15-20°C selon les milieux, *F. psychrophilum* forme en milieu solide des colonies bombées, lisses ou rugueuses, et jaunes. L'examen phénotypique des colonies suspectées être de l'espèce *F. psychrophilum* commence par une coloration de Gram, et les colonies Gram négatives sont soumises à des tests biochimiques divers. Ceux-ci sont détaillés dans le Tableau 5. Certains de ces tests peuvent montrer une certaine variabilité pouvant fausser l'identification. Cette variabilité est attribuée à l'origine des isolats, ou encore aux concentrations de certains composants des milieux de culture (Lorenzen et al., 1997). Généralement, les auteurs se limitent aux tests d'activité de la catalase, la présence ou l'absence du pigment flexirubine et l'absorption du colorant rouge Congo (Lorenzen et al., 2010; Nilsen et al., 2011; Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009).

Outre les tests biochimiques, des méthodes complémentaires peuvent être utilisées pour confirmer l'identification. Parmi elles, on retrouve les méthodes sérologiques telles que la technique de l'IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Technique) (Lindstrom et al., 2009; Rangdale and Way, 1995) et l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Amita et al., 2000; Lorenzen and Karas, 1992).

**Tableau 5:** Caractéristiques biochimiques de *F. psychrophilum* (Cipriano and Holt, 2005).

<i>Test</i>	<i>Réaction</i>	<i>Test</i>	<i>Réaction</i>
Hydrolyse de la gélatine	+	Test ONPG	-
Digestion de l'albumine	+	Nitrate réductase	-
Hydrolyse de la tributyrine	+	Pigmentation sur gélose à la tyrosine	-
Autolyse d' <i>E.coli</i>	+	Hydrolyse de la tyrosine	Variable
Hydrolyse de la chitine	-	Croissance sur TSA <sup>1</sup>	-
Hydrolyse d'agar	-	Catalase	Faiblement +
Hydrolyse de caséine	+	Fléxirubine	+
Hydrolyse de l'amidon	-	Mobilité	+
Hydrolyse de la xanthine	-	Fermentation du cellobiose	-
Hydrolyse de la tyrosine	Variable	Sulfure d'hydrogène	-
Décomposition de la cellulose	-	Indole	-
Oxydation du glucose	-	Cytochrome oxydase	Faiblement +
Oxydation du cellobiose	-	Absorption du rouge congo	-
Croissance à 15°C	+	Flexirubine	+
Croissance à 20°C	+	Croissance à 0% NaCl	+
Croissance à 25°C	Variable	Croissance à 0.5% NaCl	+
Croissance à 30°C	-	Croissance à 1% NaCl	Variable
Croissance à 37°C	-	Croissance à 2% NaCl	-

### **3.2.3.2. Détection et identification moléculaire**

Selon les souches et/ou les conditions de culture, les tests biochimiques ne permettent pas toujours une identification claire de *F. psychrophilum*. Afin de palier ces problèmes et/ou pour en confirmer les résultats, des méthodes d'identification moléculaire de plus en plus utilisées ont été mises au point. Il s'agit notamment de méthodes basées sur l'amplification par PCR de cibles génétiques telles que l'ADNr 16S de *F. psychrophilum* (Toyama et al., 1994; Urdaci et al., 1998; Wiklund et al., 2000) et les gènes *gyrA* et *gyrB* (Izumi and Aranishi, 2004; Izumi and Wakabayashi, 2000). En plus des PCR conventionnelles, d'autres méthodes telles que la PCR nichée (« Nested PCR ») (Baliarda et al., 2002; Taylor, 2004; Wiklund et al., 2000), la T-RFLP (« Terminal restriction – RFLP ») (Nilsson and Strom, 2002), la PCR quantitative (Del Cerro et al., 2002) et la méthode LAMP (« loop-mediated isothermal amplification ») (Fujiwara-Nagata and Eguchi, 2009) ont été développées pour répondre aux besoins de sensibilité et de spécificité dans l'identification de *F. psychrophilum*.

Une PCR quantitative (qPCR) ciblant le gène ADNr 16S a été récemment développée pour l'identification spécifique de *F. psychrophilum* et sa quantification dans les tissus de poissons (Orioux et al., 2011). *F. psychrophilum* possédant 6 copies de l'ADNr 16S, cette technique s'est montrée très sensible (détection jusqu'à 2 bactéries détectées par réaction) et permet le diagnostic d'une infection par *F. psychrophilum* en moins de trois heures après prélèvement de tissus.

Une autre méthode couplant la séparation en gradient magnétique élevé (HGMS) de billes magnétiques capables de se lier spécifiquement à *F. psychrophilum* grâce à des anticorps (produits dans le sérum de lapin anti- *F. psychrophilum* SG 0011227), à la cytométrie en flux a été développée pour la détection de *F. psychrophilum* (Ryumae et al., 2010). Cette méthode s'est montrée sensible et spécifique avec  $10^{-1}$  à  $10^5$  UFC/mL détectées. Elle a connu un développement en 2012 avec l'ajout d'une étape de PCR spécifique du gène *ppiC* de *F. psychrophilum* (Ryumae et al., 2012). Cette étape de PCR permet de confirmer l'identité de *F. psychrophilum* dans un mélange de plusieurs espèces de bactéries. Le développement de cette méthode a permis d'abaisser la limite de détection entre  $4 \cdot 10^{-1}$  et  $4 \cdot 10^{-3}$  UFC/mL. Variabilité phénotypique et génotypique de *F. psychrophilum*

### 3.2.4. Variabilité phénotypique

Le typage phénotypique repose en partie sur l'utilisation de caractères biochimiques pour classer des isolats bactériens, à l'exemple des kits API-ZYM qui permettent d'observer des patterns de réaction enzymatique définissant des biovars. En 2008, l'utilisation de kits API-ZYM a permis de classer en 2 biovars distincts (I et II), 75 isolats de *F. psychrophilum* isolés de salmonidés présentant de signes cliniques de la maladie en Ontario (Canada) sur 16 années (Hesami et al., 2008). Au Chili, des isolats bactériens collectés sur deux espèces de salmonidés (truite arc-en-ciel et saumon coho), ont montré des profils de production enzymatiques (biovars) similaires (Valdebenito et al., 2009). Une étude antérieure a permis, par l'analyse de profils électrophorétiques de protéases, de diviser des isolats de *F. psychrophilum* en groupes selon l'absence ou la présence de certaines protéases, et de mettre en évidence une corrélation entre le groupe et l'espèce hôte de laquelle l'isolat référant a été prélevé (Bertolini et al., 1994). Plus récemment, deux phénotypes (lisse et rugueux) en milieu de culture ont été mis en évidence (Högfors-Rönholm and Wiklund, 2010).

En plus des méthodes et outils utilisant les propriétés et caractères biochimiques de *F. psychrophilum*, le sérotypage peut aussi être réalisé sur le principe de la différenciation des isolats par leurs caractères antigéniques (protéines ou lipopolysaccharides situés à la surface des membranes). Ces méthodes permettent de définir des sérotypes ou sérovars. Plusieurs études de sérotypage ont mis en évidence de la diversité antigénique chez *F. psychrophilum*, chacune conduisant à l'établissement d'un classement sérotypique propre.

Par exemple, Lorenzen et Olesen (1997) ont établi par ELISA et agglutination sur lame, sur la base des antigènes totaux, 3 sérotypes : Fp<sup>T</sup>, Th (sous types Th-1 et Th-2) et Fd (les anti-séras Th et Fd ont été réalisés à partir de deux souches de *F. psychrophilum* danoises et Fp<sup>T</sup>, à partir de la souche de référence NCIMB 1947<sup>T</sup>). Appliquée au sérotypage d'isolats européens (25 isolats du Danemark et 20 d'autres pays d'Europe), l'utilisation de ces anti-séras a montré que le sérotype Th était majoritaire, regroupant la plupart des isolats danois et quelques autres isolats européens.

Sur la base des antigènes thermostables O, Izumi et Wakabayashi (1999) ont défini les sérogroupes O1, O2 et O3, en majorité retrouvés respectivement chez le saumon coho, l'ayu et la truite arc-en-ciel. En 2002, des résultats de sérotypage par agglutination sur lame,

confirmés par ELISA, ont permis de proposer une harmonisation du système de sérotypage présenté dans le Tableau 6 (Mata et al., 2002).

**Tableau 6:** Harmonisation du système de sérotypage de *F. psychrophilum*. Les souches de références ayant servi à la production des anti-séras sont indiquées entre parenthèses (Mata et al., 2002).

Espèce hôte	Système de sérotypage		
	Mata et al., 2002	Lorenzen and Olesen, 1997	Izumi and Wakabayashi, 1999
Saumon	1 (NCIMB1947)	Fp <sup>T</sup>	O1
Truite	2a (NCIMB13384)	Fd	
Truite	2b (PT4.1)	Th-2	
Truite	3 (NCIMB13383)	Th-1	O3
Anguille	4 (AA3 1)		
Carpe	5 (Tours5/l)		
Tenche	6 (XP189)		
Ayu	7 (GFA9646)		O2

Cependant, dans cette étude de Mata et al. (2002), certains isolats provenant d'espèces hôtes différentes de l'ayu, de la truite arc-en-ciel et du saumon, et qui se sont avérés non typables par de précédents systèmes de sérotypage (Izumi and Wakabayashi, 1999; Wakabayashi et al., 1994) n'ont pas été pris en compte. Un nouvel anti-sérum préparé à base d'antigènes O d'isolats de *F. psychrophilum* échantillonnés à partir de l'espèce hôte amago (*Oncorhynchus masou rhodurus* Jordan & Gilbert) retrouvée principalement au Japon, et absorbé avec des souches de sérotype O1, O2 et O3, a été réalisé (Izumi et al., 2003b). Un nouveau sérotype (O4) a ainsi été mis en évidence et le sérotypage par antigènes O de 162 isolats de *F. psychrophilum* de 13 espèces hôtes (salmonidés, plecoglossidés, cyprinidés et anguilladés), a révélé l'existence de 6 sérotypes supplémentaires correspondant à des réactions croisées (sérotypes O-1/2, O-1/2/3, O-1/2/4, O-1/2/3 / 4, O-2/3/4, O-2/3). Ces résultats suggèrent que d'autres épitopes des facteurs antigéniques O de *F. psychrophilum* existent et qu'il est difficile d'établir des correspondances complètes entre ces derniers résultats et les systèmes de sérotypes précédemment définis (Izumi and Wakabayashi, 1999; Lorenzen et al., 1997; Mata et al., 2002), sur le modèle présenté par Mata et al. (2002).

Plus récemment, une étude portant sur le sérotypage de *F. psychrophilum* au Chili a été réalisée, sur la base de la diversité de l'antigène O (Valdebenito and Avendaño-Herrera,

2009). Les anti-séra ont été produits à partir de 4 souches chiliennes, différentes de celles utilisées précédemment (cf Tableau 6) (les souches 1739 et 1196 de truite arc-en-ciel et les souches 1731 et 1150 de saumon atlantique). Ces anti-séra non absorbés ont permis de classer, par agglutination sur lame, 20 isolats chiliens en 4 groupes. Le groupe 1 est constitué de 14 isolats de truite arc-en-ciel et de saumon atlantique, qui réagissent avec tous les anti-séra. Le groupe 2 comprend 4 isolats de truite arc-en-ciel qui réagissent avec 3 des anti-séra (pas de réaction avec le sérum anti-1150). Les groupes 3 et 4 sont minoritaires, chacun comprenant 1 seul isolat. L'isolat de groupe 3 est un isolat de saumon atlantique qui agglutine uniquement avec le sérum anti- 1739, et l'isolat du groupe 4 (isolat de truite arc-en-ciel) agglutine avec 3 anti-sérum (pas de réaction avec un sérum dirigé contre un isolat de saumon atlantique). Les réactions croisées observées pour les groupes 1 et 2, et reproduites avec des anti sera non agglutinés, montrent que les isolats compris dans ces groupes ont des antigènes communs et constituent des sérogroupes différents de ceux décrits par Mata et al., 2002 pour les isolats de saumon (sérotype 1) et de truite arc-en-ciel (sérotypes 2a et 2b), et auraient, d'après le système décrit par Lorenzen et Olesen (1997), majoritairement le sérotype Th-Fp<sup>T</sup>.

Un système de sérotypage de *F. psychrophilum* durable et reproductible utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes individuels est requis pour le partage et la comparaison des données au niveau international. Le sérotype semble être hôte spécifique, rendant cet objectif difficile à atteindre en raison de l'effort à fournir pour établir les sérotypes dans le panel important d'hôtes de *F. psychrophilum*. Le choix des antigènes cibles et des souches de référence (pour la préparation des anti-séra) est un élément essentiel à prendre en considération pour atteindre cet objectif.

### **3.2.5. Typage moléculaire**

Plusieurs méthodes de génotypage parmi celles décrites au paragraphe 2.2., ont été appliquées à l'étude de la variabilité génétique chez *F. psychrophilum*. L'ensemble des méthodes de génotypage appliquées à l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum*, leur contexte d'application et les résultats générés sont résumés dans le Tableau 7.

Dans les études ayant employé la méthode PCR-RFLP pour discriminer les isolats de *F. psychrophilum*, différents gènes cibles ont été testés : *gyrB* (Arai et al., 2007; Izumi et al.,

2003a; Izumi et al., 2007; Nagai and Nakai, 2011; Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009), *gyrA* (Fujiwara-Nagata et al., 2012; Henríquez-Nuñez et al., 2012; Izumi et al., 2007), l'ARNr 16S (Hesami et al., 2008; Soule et al., 2005b) et le gène *PPIC* (gène codant pour la peptidylprolyle cis-trans isomérase C) (Fujiwara-Nagata et al., 2012; Nagai and Nakai, 2011). Les résultats diffèrent selon les amorces et l'enzyme de restriction employées. Par exemple, l'amplification du gène *gyrB* par les amorces universelles conduit à deux produits, l'un étant le gène *gyrB* et l'autre un fragment anonyme. La digestion des produits d'amplification du gène *gyrB* par l'enzyme *HinfI* conduit à l'observation des génotypes A et B, (Izumi et al., 2003a). Tandis que lorsque *gyrB* est amplifié par des amorces spécifiques puis digéré par *RsaI*, deux autres génotypes sont observés (R et S) (Izumi et al., 2003a; Izumi et al., 2007). La combinaison des résultats de génotypage par PCR-RFLP de *F. psychrophilum* (couples amorces universelles *gyrB* – enzyme de restriction *HinfI* et amorces spécifiques *gyrB* – enzyme *RsaI*) permet d'observer quatre génotypes (AS, AR, BS et BR), dont la répartition semble être liée à l'espèce hôte. En effet, le génotype AS a été retrouvé majoritairement chez l'ayu dans plusieurs études japonaises (Arai et al., 2007; Izumi et al., 2003a; Izumi et al., 2007; Nagai and Nakai, 2011), alors que le génotype BR a été retrouvé souvent associé à l'espèce truite arc-en-ciel aussi bien au Japon qu'au Chili (Arai et al., 2007; Nagai and Nakai, 2011; Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009). Ce lien à l'espèce hôte a aussi été suggéré par les résultats de PCR-RFLP sur le gène 16S appliquée à un échantillon d'isolats originaires du Canada et provenant de poissons malades (Hesami et al., 2008). Pour un même protocole, cette association n'a pas été retrouvée sur un échantillon provenant cette fois-ci de sources géographiques plus diverses (Soule et al., 2005b). La PCR-RFLP appliquée au gène *gyrA* d'isolats corrélée au séquençage de ce gène a permis d'observer un génotype (G-C) particulièrement virulent chez l'hôte ayu, contrairement aux 3 autres génotypes retrouvés dans l'échantillon étudié (Fujiwara-Nagata et al., 2012).

Selon les amorces utilisées, la méthode RAPD permet d'identifier ou génotyper les isolats de l'espèce *F. psychrophilum* (Chakroun et al., 1997). Cette technique a en effet permis de distinguer *F. psychrophilum* d'autres espèces de *Flavobacterium* présentes dans le même environnement (Crump et al., 2001), et de distinguer des génotypes divers (Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009). Si Chakroun et al. (1997) ont pu, par cette

méthode, mettre en évidence un possible lien entre génotype et espèce hôte sans relation avec l'origine géographique, une autre situation a été observée pour des isolats chiliens échantillonnés d'espèces différentes (Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009). Cette dernière étude a montré que, sans pouvoir établir un lien à l'espèce hôte, tous les isolats chiliens avaient le même profil. Les méthodes REP-PCR et l'étude du polymorphisme du gène ANRr 16S (Soule et al., 2005b) ont montré des résultats similaires sur ce même échantillon d'isolats chiliens qui se sont révélés génétiquement homogènes, alors que la méthode ERIC-PCR n'a pas montré de résultats satisfaisants en raison de problèmes de reproductibilité (Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009).

Le ribotypage a montré qu'il existe bien de la variabilité génétique au sein de populations de *F. psychrophilum*, avec une répartition des génotypes liée à l'espèce hôte, et un pouvoir discriminant plus important que celui de la RAPD (étude sur 85 isolats provenant de zones géographiques et d'espèces différentes) (Chakroun et al., 1998). Une autre étude portant sur 299 isolats danois collectés sur truite arc-en-ciel a tout de même souligné que le ribotypage ne serait pas adapté au génotypage de *F. psychrophilum* à une échelle géographique restreinte en raison du peu de génotypes observés (dont un majoritaire), malgré la taille importante de l'échantillon (Madsen and Dalsgaard, 2000). Dans cette dernière étude, aucune correspondance claire n'a pu être mise en évidence entre ribotypes et profils plasmidiques.

Les études de profils plasmidiques ont révélé qu'un isolat de *F. psychrophilum* pouvait posséder de 0 à 3 plasmides en même temps. Nous avons répertorié jusqu'à 23 plasmides différents (Chakroun et al., 1998; Del Cerro et al., 2010; Kim et al., 2010b; Lorenzen et al., 1997; Madsen and Dalsgaard, 2000). Il a été démontré que selon l'état du poisson (malade ou sain), les isolats de *F. psychrophilum* pouvaient arborer un profil plasmidique caractéristique (Chakroun et al., 1998). De même, une différence de profils entre isolats provenant de poissons d'élevage et populations naturelles de poissons a été observée (Kim et al., 2010b). L'analyse parallèle de résistance aux antibiotiques a mis en évidence que la résistance observée chez certains isolats de *F. psychrophilum* n'était pas toujours liée à la présence de plasmides (Del Cerro et al., 2010).

Une micropuce contenant 103 sondes uniques sélectionnées dans une banque d'ADNc de *F. psychrophilum*, générée grâce au procédé d'hybridation soustractive suppressive, a permis de mettre en évidence deux lignées génétiques (I et II) sur 34 isolats, avec une association hôte spécifique (Soule et al., 2005a). La lignée I dont fait partie la souche de référence avirulente ATCC 49418, regroupe une majorité d'isolats échantillonnés de saumons coho, et la lignée II dont fait partie la souche de référence virulente CSF 259-93, regroupe une majorité d'isolats collectés de truites arc-en-ciel (Soule et al., 2005a). L'étude du polymorphisme du 16S chez *F. psychrophilum* a été mis au point dans le but de distinguer les allèles présentes chez les deux souches de référence CSF 259-93 et ATCC 49418 (Soule et al., 2005a). Les allèles CSF 259-93 et ATCC 49418 du gène 16S ont été inclus sur la micropuce mise au point par Soule et al. (2005a), et l'analyse de cette seconde micropuce a permis d'observer que les isolats de la lignée I possédaient les 2 allèles, tandis que les isolats de la lignée II ne possédaient que l'allèle CSF 259-93 (Soule et al., 2005b). Chacune de ces lignées a été testée pour sa capacité à hydrolyser la gélatine et l'élastine (capacité associée au processus de nécrose musculaire chez truite arc-en-ciel d'après Ostland et al., 2000) et sa résistance à l'oxytétracycline. La majorité des isolats des deux lignées se sont montrés capables d'hydrolyser la gélatine (type I et type II), la majorité des isolats de la lignée I n'ont pas dégradé l'élastine, alors que tous les isolats de la lignée II en ont été capables, et les isolats de la lignée I étaient plus sensibles à l'oxytétracycline que la lignée II. Ces observations seraient d'après Soule et al., 2005b, une indication sur l'importance de la mise au point de vaccins polyvalents pour lutter contre la maladie.

La distribution des allèles CSF 259-93 et ATCC 49418 du 16S liée à l'espèce hôte a été observée dans le cas de 77 isolats provenant de zones géographiques différentes. En effet, les isolats provenant de saumons pacifiques possédaient les deux allèles, tandis que ceux échantillonnés à partir de truites arc-en-ciel possédaient l'allèle unique CSF 259-93 (Ramsrud et al., 2007), confirmant ainsi les observations de Soule et al., 2005b. Des cas minoritaires d'absence de ces deux allèles, ou de présence de l'allèle ATCC 49418 ont été reportés dans un échantillon de 75 isolats échantillonnés au Canada, d'espèces diverses (16 isolats /75 et 1/75 respectivement) (Hesami et al., 2008).



La méthode PFGE a révélé que des truites arc-en-ciel, élevées dans une même zone géographique aux USA et présentant des signes cliniques de la flavobactériose des eaux froides, ont été infectées par un ensemble d'isolats génétiquement proches de *F. psychrophilum* (Chen et al., 2008). Un cas similaire a été observé au Chili, où des isolats collectés lors de mêmes épisodes cliniques (étude de plusieurs groupes d'isolats, chaque groupe d'isolats provenait de différents poissons d'un même élevage) se sont avérés génétiquement proches (Avendaño-Herrera et al., 2009). A l'inverse, une diversité intra-populationnelle plus élevée et des cas de portage de types génétiques différents par un même poisson ont été observés chez des saumons coho indemnes de signes, de même qu'une variation mensuelle de génotypes chez cette espèce (Chen et al., 2008).

L'approche MLST, appliquée à un échantillon d'isolats de *F. psychrophilum* collectés à partir des poissons hôtes différents provenant du monde entier, a pour la première fois, mis en évidence un taux élevé de recombinaisons homologues et un niveau moyen de variabilité génétique (Nicolas et al., 2008).

Finalement, l'ensemble de ces travaux démontre qu'il existe une variabilité génétique de *F. psychrophilum* plus ou moins importante selon les contextes et les méthodes employées. Des associations entre des types génétiques de la bactérie et les espèces de poissons hôtes ont été démontrées, même si elles n'ont pas toujours été exclusives. Le lien à l'origine géographique n'a pas été clairement établi.

**Tableau 7:** Méthodes de géotypage appliquées à l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* et leurs conclusions. Esp : espèce hôte ; Stat : statut du poisson (malade ou sain) ; Enz : enzyme ; Am : amorces utilisée en PCR ; G : géotype.

Méthode	Nb d'isolats traités	Origine géographique	Hôte et statut	Enzyme et/ou gènes	Résultats/Conclusions principaux	Références
PCR-RFLP	242	Origines diverses	Esp: diverses	Gène: <i>gyrB</i> Enz-Am: (1) GYR1/GYR1R + <i>HinfI</i> ; (2) PSY-G1F/PSY-G1R + <i>RsaI</i>	- L'amplification par GYR1/GYR1R donne un fragment anonyme supplémentaire - 4 G: A et B pour <i>HinfI</i> ; R et S pour <i>RsaI</i> - Association profil/espèce hôte statistiquement significative pour l'espèce ayu (géotype A uniquement chez ayu)	(Izumi et al., 2003a)
	244	Origines diverses	Esp: diverses	Gènes: <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> Am-Enz: ( <i>gyrA</i> ) GYRA-FP1F/GYRA-FP1R + <i>Mph1103I</i> , ( <i>gyrB</i> ) PSY-G1F/PSY-G1R + <i>RsaI</i> , ( <i>gyrB</i> ) GYR1/GYR1R + <i>HinfI</i>	- 2 G pour RFLP de <i>gyrA</i> : QR (majoritaire chez ayu) et QS - la combinaison des PCR-RFLP de <i>gyrA</i> et <i>gyrB</i> permet d'observer 8 G (1 très majoritaire chez ayu) - la PCR-RFLP semble adaptée au suivi épidémiologique de <i>F. psychrophilum</i> , et le choix des gènes peut permettre d'établir un lien avec les résistances aux antibiotiques	(Izumi et al., 2007)
	64	Japon	Esp: diverses Stat: Malades/morts	Gène: <i>gyrB</i> , Am-Enz: (1) GYR1/GYR1R + <i>HinfI</i> , (2) PSY-G1F/PSY-G1R + <i>RsaI</i>	- 4 G: AS, AR, BS et BR (avec 2 G par enz) - Association profil RFLP/ espèce hôte	(Arai et al., 2007)
	75	Ontario (Canada)	Esp: diverses Stat: Malades Collection sur 16 ans	Gène: ARNr 16S Am: 16S-336fwd / 16S-517rvs Enz: <i>MnlI</i> et <i>MaeIII</i>	- 4 types de profils - Pas de corrélation profil/ espèce hôte observable et pas de lien profil/épizootie	(Hesami et al., 2008)
	20	Chili	Esp: SA, TAC	Gène: <i>gyrB</i> Enz: <i>HinfI</i> et <i>RsaI</i>	2 G présents chez les deux espèces hôtes (BS et BR)	(Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009)
	36	Japon	Esp: diverses Stat: malades	Gène <i>gyrB</i> , <i>PPIC</i> ; Am-Enz: ( <i>gyrB</i> ) PSY-G1F/PSY-G1R + <i>RsaI</i> , ( <i>PPIC</i> ) fpPPIC1F/fpPPIC1R + <i>HinfI</i>	Association profil RFLP/ espèce hôte (AS en majorité chez ayu, BR uniquement chez TAC)	(Nagai and Nakai, 2011)
	40	Chili	Esp: SA, Tac et saumon coho	Gène: <i>gyrA</i> Am: GYRA-FP1F/GYRA-FP1R Enz: <i>NsiI</i>	- G QR pour 5 isolats/40 - 35 isolats sur 40 n'ont pas pu être typés (pas de digestion par <i>NsiI</i> )	(Henríquez-Nuñez et al., 2012)

Tableau 7 (suite)

Méthode	Nb d'isolats traités	Origine géographique	Hôte et statut	Enzyme et/ou gènes	Résultats/Conclusions principaux	Références
PCR-RFLP	232	Japon	Esp: diverses	Gène: <i>gyrA</i> , <i>PPIC</i> Am: ( <i>gyrA</i> ) GYRA-FP1F/GYRA-FP1R + <i>NsiI</i> et <i>Tsp509I</i> , ( <i>PPIC</i> ) fpPPIC1F/fpPPIC1R + <i>HinfI</i>	- Génotypage par PCR-RFLP de <i>gyrA</i> plus spécifique et sensible que celui de <i>PPIC</i> - 4 G: G-C, A-T, A-C et G-T - Le génotype G-C est très virulent chez ayu contrairement aux trois autres	(Fujiwara-Nagata et al., 2012)
	29	Origines diverses	Esp: diverses	G: ARNr 16S Am: 16S-336fwd / 16S-517rvs Enz: <i>MnlI</i> et <i>MaellI</i>	- Isolats de la lignée II (Soule et al. 2005a): digestion par <i>MnlI</i> =>1 fgmt, par <i>MaellI</i> =>2 fgmts - Isolats de la lignée II (Soule et al. 2005a): digestion par <i>MnlI</i> =>2 fgmts, par <i>MaellI</i> =>0 fgmt - Association profil RFLP/espèce hôte	(Soule et al., 2005b)
RAPD	60	19 pays	Esp: diverses	Am : OPH 06, OPH 08, OPG 08, OPG 14 et OPG 16	- Pas de corrélation profils RAPD/ origine géographique observable - Corrélation profils/espèce hôte observable - Selon les primers choisis, la RAPD peut s'adapter aussi à l'identification de l'espèce <i>F. psychrophilum</i> qu'à son génotypage	(Chakroun et al., 1997)
	16	Canada	Esp: diverses Poissons malades Janv-Avr 1997	2 Am (sans noms)	Amorces utilisable pour identification de l'espèce <i>F.psychrophilum</i>	(Crump et al., 2001)
	20	Chili	Esp: diverses Stat: malades et sains	Am: P5	- 2 G: Groupes I et II (IIa et IIb) - Tous les isolats chiliens sont du groupe I - Pas de lien à l'espèce hôte	(Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009)

**Tableau 7 (suite)**

Méthode	Nb d'isolats traités	Origine géographique	Hôte et statut	Enzyme et/ou gènes	Résultats/Conclusions principaux	Références
REP-PCR	20 et 1 ref. (ATCC 4948 <sup>T</sup> )	Chili	Esp: SA, TAC	REP 1D/REP 2D	- 2 génotypes: 1 (1a et 1b) et 2 - Tous les isolats chiliens ont le génotype 1 - Pas de lien à l'origine géographique ("intra-Chili")	(Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009)
ERIC-PCR				ERIC1/ERIC2		
Polymorphisme de l'ARNr 16S	77	4 continents	Esp: diverses Stat: malades	G: ARNr 16S	Distribution hôte-spécifique des allèles (saumon pacifique = les deux allèles; TAC = CSF 259-93)	(Ramsrud et al., 2007)
	75	Canada	Esp: diverses	Am(allèle CFS 259-93): A259-93/AR259-93	- 4 G: "CSF only", "ATCC only", "both", "neither" - Relation entre génotype et espèce hôte difficile à établir.	(Hesami et al., 2008)
	20 et 1 ref. (ATCC 4948T)	Chili	Esp: SA, TAC	Am(allèle ATCC 49418T): A49418/AF49418	Les isolats chiliens sont génétiquement homogènes (18/20 ont l'allèle CFS 259-93)	(Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009)

**Tableau 7** (suite)

<b>Méthode</b>	<b>Nb d'isolats traités</b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Hôte et statut</b>	<b>Enzyme et/ou gènes</b>	<b>Résultats/Conclusions principales</b>	<b>Références</b>
Micropuce	34	Origines diverses	Esp: diverses	103 sondes dont les allèles de l'ARNr 16S (CFS 259-93 et ATCC 49418 <sup>T</sup> )	Observation de 2 lignées (I et II) selon les 2 allèles de l'ARNr 16S. Association hôte spécifique: lignée I => saumon coho, lignée II=>TAC.	(Soule et al., 2005a)
	29	Origines diverses	Esp: diverses	idem + protocole PCR-RFLP	- Association hôte spécifique des lignées I et II. - Lignée I a les 2 allèles du 16S (CFS 259-93 et allèle ATCC 49418 <sup>T</sup> ), et la lignée II n'a que CFS 259-93.	(Soule et al., 2005b)
Profils plasmidiques	25	Danemark	Esp: diverses Stat: malades	---	- 7 plasmides retrouvés et 4 profils - la majorité des isolats danois et ceux des autres pays ont le même profil (plasmide 3,2 kb) - Dans les isolats de poissons malades : plasmide 3.5kb ; pour les autres isolats : 5 profils différents	(Lorenzen et al., 1997)
	20	autres pays européens				
	85	Origines diverses	Esp: diverses	---	- 10 plasmides observés et 11 profils - La majorité des isolats ont au moins 1 plasmide	(Chakroun et al., 1998)
	299	Danemark	Esp: TAC Stat: malades et sains	---	- 6 plasmides observés et 7 profils 95% des isolats ont le plasmide 3.3kb Pas d'association profil plasmidique / ribotype	(Madsen and Dalsgaard, 2000)
	169	Japon	Esp: diverses (naturelles) + ayu (même élevage)  Stat: ayu malades	---	- 6 plasmides observés et 7 profils - Association profil plasmidique/hôte - Variation annuelle des profils chez ayu - Les isolats de poissons sauvages présentent des profils plasmidiques différents de ceux des poissons d'élevage	(Kim et al., 2010b)
	25	Espagne	Esp : diverse (d'élevage) Stat : malades	---	- 3 plasmides observés, chacun représentant 1 profil - La majorité des isolats ont le plasmide 3.5kb (13 isolats/25) - Corrélation profil plasmidique / pulsotype	(Del Cerro et al., 2010)

**Tableau 7** (suite)

Méthode	Nb d'isolats traités	Origine géographique	Hôte et statut	Enzyme et/ou gènes	Résultats/Conclusions principaux	Références
Ribotypage	85	13 pays	Esp: diverses	Enz: <i>HincII</i> et <i>PvuI</i>	- Association ribotype/hôte - Pas de corrélation entre ribotype et origine géographique - Pouvoir discriminant : Ribotypage > RAPD	(Chakroun et al., 1998)
	299	Danemark	Esp: TAC Stat: malades et sains	Enz: <i>EcoRI</i>	- 9 ribotypes dont un dominant - Pas d'association profil plasmidique / ribotype - Le ribotypage semble inadapté pour les études épidémiologiques dans une échelle géographique limitée	(Madsen and Dalsgaard, 2000)
	48	Finlande, Estonie et Suisse	Esp: diverses Stat: malades	Enz: <i>Clal</i> , <i>Hael</i> et <i>PvuI</i>	- Hétérogénéité génotypique des isolats - Plusieurs types génétiques sont présents dans un même épisode épizootique	(Madetoja et al., 2001)
PFGE	81	Japon	Esp: diverses Stat: malades et morts	Enz: <i>BlnI</i> and <i>XhoI</i>	- 42 génotypes divisés en 20 clusters - Association génotype/espèce hôte - Pouvoir discriminant : PFGE > PCR-RFLP (gène: <i>gyrB</i> , enz: <i>HinfI</i> )	(Arai et al., 2007)
	95	Idaho (USA)	Esp: TAC d'élevage Stat: malades Suivi de 7 épizooties	Enz: <i>SacI</i>	- Infections par complexe d'isolats génétiquement proches chez les TAC - Variabilité génétique plus importante que chez les saumons coho par rapport aux TAC	(Chen et al., 2008)
	44	Washington (USA)	Esp: Saumon coho sauvages Stat: sans signes cliniques		- Cas de co-portage chez saumon coho - Observation d'un type génétique unique par mois chez le saumon coho	

**Tableau 7 (fin)**

<b>Méthode</b>	<b>Nb d'isolats traités</b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Hôte et statut</b>	<b>Enzyme et/ou gènes</b>	<b>Résultats/Conclusions principaux</b>	<b>Références</b>
PFGE	14	Chili	Esp: TAC et saumon coho	Enz: <i>SacI</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Association hôte spécifique des isolats</li> <li>- Différenciation entre isolats chiliens et autres (ATCC 49418T+ souche d'Ecosse)</li> <li>- Clusters d'isolats génétiquement proches impliqués dans les épizooties</li> </ul>	(Avendaño-Herrera et al., 2009)
	25	Espagne	Esp: diverses, d'élevage Stat: malades	Enz. <i>StuI</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Association pulsotype/origine géographique observable</li> <li>- Population génétiquement hétérogène</li> <li>- Pas d'association sensibilité aux antibiotiques / pulsotype observable</li> </ul>	(Del Cerro et al., 2010)
MLST	50	Origines diverses	Esp: diverses	G: <i>trpB</i> , <i>gyrB</i> , <i>dnaK</i> , <i>tuf</i> , <i>fumC</i> , <i>murG</i> , et <i>atpA</i> (n=7)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le fort taux de recombinaison associé à une faible diversité nucléotidique conduit à la conclusion d'une population homogène</li> <li>- Association profil/hôte &gt; Profil/origine</li> </ul>	(Nicolas et al., 2008)





# **Objectifs détaillés de la thèse**



Depuis les années 90, en Europe et plus particulièrement en France, une mortalité massive due aux infections à *Flavobacterium psychrophilum* a été observée dans les populations naturelles et surtout les élevages de truites et de saumons. Ainsi, en France, la flavobactériose des eaux froides constitue la deuxième maladie la plus enregistrée dans les bassins de production piscicoles après la furunculose (Guichard, 2004). Comme vu précédemment, de nombreux travaux ont été menés dans le but d'étudier la variabilité génétique de l'agent *F. psychrophilum*. Ces études ont mis en évidence, une variabilité génétique en lien (de manière non exclusive) avec l'espèce de poisson hôte, et une absence de structuration géographique de cette variabilité. Ces données en France sont limitées, voire inexistantes lorsque centrées sur une espèce hôte particulière de cet agent pathogène et sur une échelle géographique réduite (pisciculture ou bassin versant). Ces données sont pourtant essentielles pour comprendre à terme les modalités de diffusion de cet agent et ses réservoirs environnementaux afin de mieux adapter des stratégies de lutte en élevage dans un contexte de limitation des intrants médicamenteux.

L'espèce hôte de *F. psychrophilum* choisie dans ce projet de thèse est la truite arc-en-ciel, en tant que principale production piscicole en France et espèce particulièrement sensible à la flavobactériose des eaux froides. Les attentes des acteurs de la filière piscicole française sont donc fortes (Guichard, 2004). Afin de déterminer le niveau de variabilité génétique de *F. psychrophilum* isolé de truite arc-en-ciel, un premier niveau d'analyse a visé une échelle géographique nationale, en ciblant les bassins de production principaux situés le long de l'arc Atlantique français. Le choix de la méthode de typage s'est porté sur la MLST (MultiLocus Sequence Typing), selon les modalités précédemment décrites par l'équipe VIM de l'INRA de Jouy-en-Josas mise au point en 2008 (Nicolas et al, 2008), et en étroite collaboration avec ce partenaire. Ce choix a été basé sur la valeur discriminante déjà connue de cette méthode pour *F. psychrophilum* et sur l'intérêt comparatif des résultats générés avec les bases de données existantes. Les isolats analysés sont tous issus de poissons en phase clinique de la flavobactériose des eaux froides, ceci afin d'augmenter les chances d'isoler l'agent recherché, dans un contexte où la prévalence de portage dans l'ensemble des élevages concernés par cette étude et la capacité à isoler *F. psychrophilum* à partir de poissons porteurs asymptomatiques étaient inconnus. L'objectif de cette première partie de thèse est donc

d'établir une carte des variants génétiques de *F. psychrophilum* sur truite arc-en-ciel en France et si possible d'analyser la structure de population de cet agent pathogène.

Dans une deuxième étape, la variabilité génétique à une échelle géographique plus réduite a été analysée: la pisciculture et le bassin versant avec l'étude de piscicultures connectées entre elles par des réseaux commerciaux et fluviaux. Pour cette étude, la seule analyse d'isolats issus de poissons malades n'était plus suffisante dans le cadre d'un suivi régulier (mensuel) de ces élevages. Nous nous sommes donc intéressés aux isolats issus de poissons porteurs asymptomatiques, avec une analyse de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à différentes échelles : le poisson, la pisciculture et le bassin versant. Le choix de la méthode d'analyse s'est porté sur la PFGE. La PFGE constitue la méthode « gold standard » dans les études épidémiologiques dont le contexte général d'étude reste comparable à celui de cette étude (pas de temps courts entre les prélèvements et contexte géographique restreint) (Arai et al., 2007 ; Del Cero et al., 2010 ; Van Belkum et al., 2007). Son application possible sur un grand nombre de souches à un coût raisonnable (le nombre d'isolats collectés ne pouvait en effet pas être connu au départ et l'analyse devait débiter avant les résultats de la première étude par MLST et avant la fin de la période de collecte) a également motivé ce choix.

Dans une dernière partie, le pouvoir discriminant et l'intérêt des deux méthodes (MLST et PFGE) en épidémiologie moléculaire ont été comparés sur un sous-échantillon de la collecte précédente, sélectionné selon la variabilité observée par PFGE. L'objectif était aussi de déterminer si la PFGE pouvait servir à présélectionner des isolats représentatifs de différents types génétiques dans un échantillon global, pour ensuite les analyser par MLST afin d'établir leurs liens phylogénétiques.

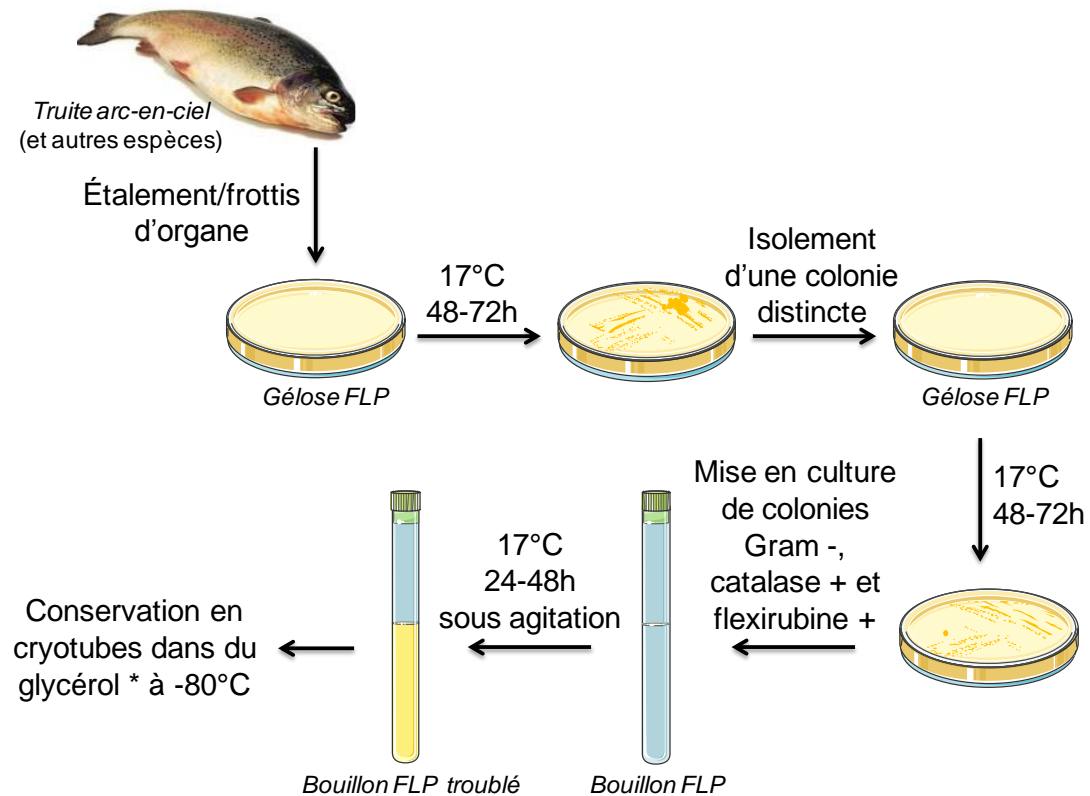
## **CHAPITRE II.**

# **Matériels et Méthodes**



# **1. Isolement, caractérisation biochimique et conservation de *F. psychrophilum***

Les isolats de *F. psychrophilum* étudiés dans ce travail de thèse, proviennent tous de l'espèce hôte truite arc-en-ciel prélevée sur site piscicole. Les poissons présentaient ou non des signes cliniques de la maladie. Les échantillonnages ont été réalisés aussi bien à partir d'organes internes (rate, rein, foie ou encéphale), que d'organes externes (peau, branchies ou nageoires). Après avoir été isolés, les organes ont été frottés (exemple de la rate) ou étalés (cas des branchies) sur gélose agar FLP (Cepeda et al., 2004) (composition en Annexe 1). Après incubation à 17° C pendant 48 à 72 heures, les colonies de couleur jaune correspondant au phénotype attendu pour *F. psychrophilum* ont été ré-isolées sur gélose FLP et mises en culture selon les mêmes conditions (17°C, pendant 48 à 72 heures). Après vérification de la pureté de la culture, une caractérisation préliminaire, basée sur les résultats de 3 tests (Gram négatif, catalase positive et flexirubine positive), a permis une première sélection d'isolats. Pour chaque isolat présélectionné, une colonie a été remise en culture dans 5 mL de bouillon FLP pour incubation à 17°C sous agitation pendant 48 heures. Enfin, 0,5 mL de bouillon de culture ajouté à 0,5 mL d'une solution de glycérol à 40% a été conservé en cryotubes à -80°C, pour analyses ultérieures dont la confirmation de l'identification de *F. psychrophilum* par biologie moléculaire. Les étapes d'isolement et de caractérisation des isolats sont schématisées sur la Figure 11.



**Figure 11 :** Isolement, caractérisation biochimique et conservation des isolats bactériens.  
\* Concentration finale du glycérol à 20 %.

## 2. Isolats bactériens utilisés dans l'étude

### 2.1. Souches de référence

Plusieurs souches bactériennes de référence ont été utilisées comme contrôle, notamment dans la mise au point du protocole d'identification moléculaire de *F. psychrophilum*. Il s'agit de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium aquatile*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium succinicans* et trois souches de *Flavobacterium psychrophilum*. Elles sont présentées dans le Tableau 8. Ces souches sont conservées au laboratoire en cryotubes à -80°C, dans une solution de glycérol en concentration finale à 20 %.



**Tableau 8:** Caractéristiques des souches de référence.

<i>Espèce</i>	<i>Référence</i>	<i>Autres références</i>	<i>Source</i>	<i>Origine géographique</i>	<i>Année d'isolement</i>
<i>F. psychrophilum</i>	JIP 02/86	ATCC 49511, CIP 103535	Jeune Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ), lésion dorsale	France	1986
	NCIMB 1947 <sup>T</sup>	ATCC 49418, CIP 103534, DSM 3660	Jeune Saumon coho ( <i>Oncorhynchus kitsuch</i> ), rein	Etats Unis	≤ 1973
	LNPAAs PO1/88	ATCC 49510, CIP 103536	Truite arc-en-ciel, rate	France	1988
<i>F. columnare</i>	NCIMB 2248 <sup>T</sup>	ATCC 23463, CIP 103531	Salmonidé malade, rein	Etats Unis	1955
<i>F. succinicans</i>	CIP 104744	DMS 4002, NCIMB 2277	Saumon quinnat ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> ), nageoire caudale	Etats Unis	1954
<i>F. aquatile</i>	CIP 103744	ATCC 11947, DSM 1132, NCIMB 8694	Espèce inconnue, lésion profonde	Royaume Uni	≤ 1963
<i>F. johnsoniae</i>	CIP 100931	ATCC 17061, DSM 2064, NCIMB 11054	Sol/Boue	Royaume Uni	≤ 1973
<i>A. salmonicida</i>	ATCC 14174	CIP 63.4, NCIMB 833	Omble de fontaine ( <i>Salvelinus fontinalis</i> ) malade	---	≤ 1953
<i>A. hydrophila</i>	CIP 7614	ATCC 7966, DSM 30187, NCIMB 9240	Boîte de lait avec une odeur de poisson	---	≤ 1961
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	CIP76.24, DSM1103, NCIMB 12210	Isolat clinique	---	≤ 1973

Selon les espèces, les conditions de culture sont les suivantes :

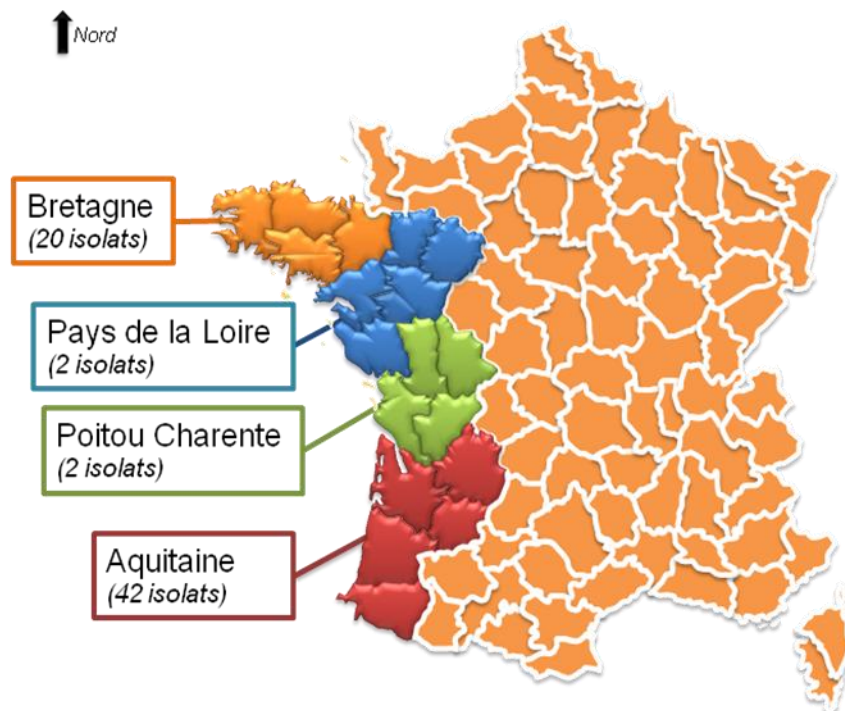
- *F. psychrophilum* : culture sur gélose FLP pendant 72h à 17°C
- *F. aquatile*, *F. columnare* et *F. succinicans*: culture sur gélose FLP pendant 72h à 22°C
- *F. johnsoniae* : culture sur gélose FLP pendant 48h à 22°C
- *A. hydrophila* et *A. salmonicida* : culture sur gélose TSA pendant 72h à 37°C
- *E. coli* : culture sur gélose TSA pendant 24 à 48 heures à 22°C.

Les compositions et conditions de préparation des milieux de culture sont précisées en Annexe 1.

## 2.2. Isolats échantillonnés sur l'arc Atlantique français

Les isolats de *F. psychrophilum* ont été sélectionnés à partir d'une souchothèque présente au laboratoire (Oniris - UMR BioEpAR - équipe VIP), regroupant des isolats collectés par différents vétérinaires et techniciens répartis sur l'ensemble du territoire français entre 2007 et 2010.

De cette souchothèque, 66 isolats ont été sélectionnés (Tableau 9). Ils ont été échantillonnés de truites arc-en-ciel présentant des signes cliniques de la maladie, et proviennent de sites piscicoles répartis sur 4 régions géographiques couvrant l'arc Atlantique français (Bretagne, Pays de la Loire, Poitou Charente et Aquitaine), dont deux (Bretagne et Aquitaine) constituent les deux principaux bassins de production française de salmonidés (2011) (Figure 12). Les échantillonnages concernant ces 66 isolats ont été réalisés sur un total de 48 sites piscicoles. Dans les cas où plusieurs passages ont eu lieu sur un même site, les isolats ont été choisis en respectant un intervalle minimum de six mois entre les prélèvements, afin de tenter de maximiser la variabilité des isolats.



**Figure 12:** Origine géographique des isolats. Le nombre d'isolats de *F. psychrophilum* échantillonnés est indiqué entre parenthèses pour chaque région.

Les isolats ont été échantillonnés selon le protocole décrit au paragraphe 1 de ce chapitre. Certains isolats ont été collectés à partir d'organes internes comme la rate, le rein, le foie, et l'encéphale, d'autres d'organes externes tels que la peau, les branchies et les nageoires (Tableau 9). Parallèlement à l'échantillonnage, plusieurs données relatives (i) aux sites d'échantillonnage (communes, régions, bassin versants, sources de l'alimentation en eau...), (ii) aux poissons eux-mêmes (poids, conservation de l'appétit, organes prélevés...), (iii) aux conditions d'élevage (température, densité des bassins), et (iv) aux traitements antibiotiques et vaccinaux administrés, ont été renseignés. Ces éléments étaient relevés *via* une fiche commémorative présentée en Annexe 3.

**Tableau 9:** Isolats échantillonnés sur l'arc Atlantique français. Organe d'isolement interne (rate, rein, foie ou encéphale) ou externe (peau, branchies ou nageoires).

<i>Identifiant CAE des isolats</i>	<i>Région d'origine</i>	<i>Bassin versant</i>	<i>Organe d'isolement</i>	<i>Année</i>
438	Aquitaine	Adour	Interne	2008
439	Aquitaine	Adour	Interne	2008
440	Aquitaine	Vignac	Interne	2008
441	Aquitaine	Garonne	Interne	2008
442	Aquitaine	Vignac	Interne	2008
444	Aquitaine	Adour	Interne	2008
445	Aquitaine	Adour	Interne	2008
446	Aquitaine	Adour	Interne	2008
448	Aquitaine	Adour	Interne	2008
449	Aquitaine	Adour	Interne	2008
737	Aquitaine	Magescq	Interne	2008
738	Aquitaine	Adour	Externe	2010
739	Aquitaine	Adour	Interne	2009
740	Aquitaine	Adour	Externe	2009
742	Aquitaine	Magescq	Interne	2008
743	Aquitaine	Lyere	Externe	2010
744	Aquitaine	Magescq	Interne	2008
746	Aquitaine	Adour	Interne	2010
747	Aquitaine	Adour	Interne	2009
749	Aquitaine	Adour	Interne	2009
755	Aquitaine	Adour	Interne	2008
756	Aquitaine	Adour	Interne	2008
759	Aquitaine	Adour	Externe	2010
760	Aquitaine	Adour	Externe	2009
802	Aquitaine	Garonne	Inconnu	2010
805	Aquitaine	Dordogne	Interne	2009
806	Aquitaine	Adour	Interne	2009
807	Aquitaine	Adour	Externe	2010
808	Aquitaine	Adour	Externe	2009
810	Aquitaine	Adour	Interne	2009
811	Aquitaine	Lyere	Interne	2010
812	Aquitaine	Dordogne	Interne	2008
814	Aquitaine	La Palue	Interne	2009
816	Aquitaine	Adour	Interne	2007
817	Aquitaine	Adour	Interne	2010
818	Aquitaine	Lyere	Interne	2009
820	Aquitaine	Adour	Interne	2007

**Tableau 9** (suite).

<i>Identifiant CAE des isolats</i>	<i>Région d'origine</i>	<i>Bassin versant</i>	<i>Organe d'isolement</i>	<i>Année</i>
822	Aquitaine	Dordogne	Inconnu	2009
823	Aquitaine	Adour	Interne	2010
824	Aquitaine	Adour	Interne	2009
825	Aquitaine	Magescq	Interne	2009
829	Aquitaine	Adour	Externe	2009
539	Bretagne	Le Guillec	Interne	2008
540	Bretagne	Hyere	Interne	2008
591	Bretagne	Rivière de Morlaix	Inconnu	2009
607	Bretagne	Le Guillec	Externe	2009
626	Bretagne	Penzé	Interne	2009
635	Bretagne	Aulne	Interne	2008
636	Bretagne	Douron	Interne	2008
637	Bretagne	Elorn	Interne	2009
687	Bretagne	Elorn	Externe	2009
697	Bretagne	Quillimadec	Interne	2010
721	Bretagne	Le Gouët	Interne	2010
724	Bretagne	Ster Goz	Interne	2010
729	Bretagne	Penzé	Interne	2010
730	Bretagne	Le Corroac'h	Interne	2010
733	Bretagne	Inconnu	Interne	2010
763	Bretagne	Inconnu	Interne	2010
771	Bretagne	Odet	Interne	2010
780	Bretagne	Rivière de Morlaix	Interne	2010
787	Bretagne	Le Corroac'h	Interne	2010
796	Bretagne	Douffine	Interne	2010
690	Pays de la Loire	Ruisseau des Loges	Externe	2010
718	Pays de la Loire	Eau de ville	Interne	2010
741	Poitou Charente	Charente	Interne	2009
745	Poitou Charente	Charente	Interne	2010

## **2.3. Isolats échantillonnés dans un bassin versant de Bretagne**

Un échantillonnage a été réalisé afin de répondre à la question de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle beaucoup plus fine (i) d'un poisson, (ii) d'un lot de poissons, (iii) d'une pisciculture, et (iv) d'un ensemble de piscicultures sur un même bassin versant dont le suivi mensuel a été réalisé pendant un an.

### **2.3.1. Contexte géographique**

Les 4 piscicultures suivies (notées de A à D, voir Figure 13) ont été sélectionnées en fonction de l'espèce de poisson élevé (uniquement truite arc-en-ciel), de leur positionnement sur les rivières, de leur fournisseur d'œufs, de la survenue déjà répertoriée de cas de flavobactériose des eaux froides et de l'accessibilité aux sites en accord avec les pisciculteurs et le vétérinaire aquacole de la région, M. Matthieu Jamin. Chaque pisciculture a été renseignée sur différents éléments d'information regroupés sur une fiche présentée en Annexe 3. Ces piscicultures sont situées sur le bassin versant du Queffleuth, en Bretagne. Elles sont positionnées les unes après les autres, excepté le site C positionné sur un autre bras de la rivière (voir Figure 13), et traitent chacune un ou plusieurs stades du développement du poisson.

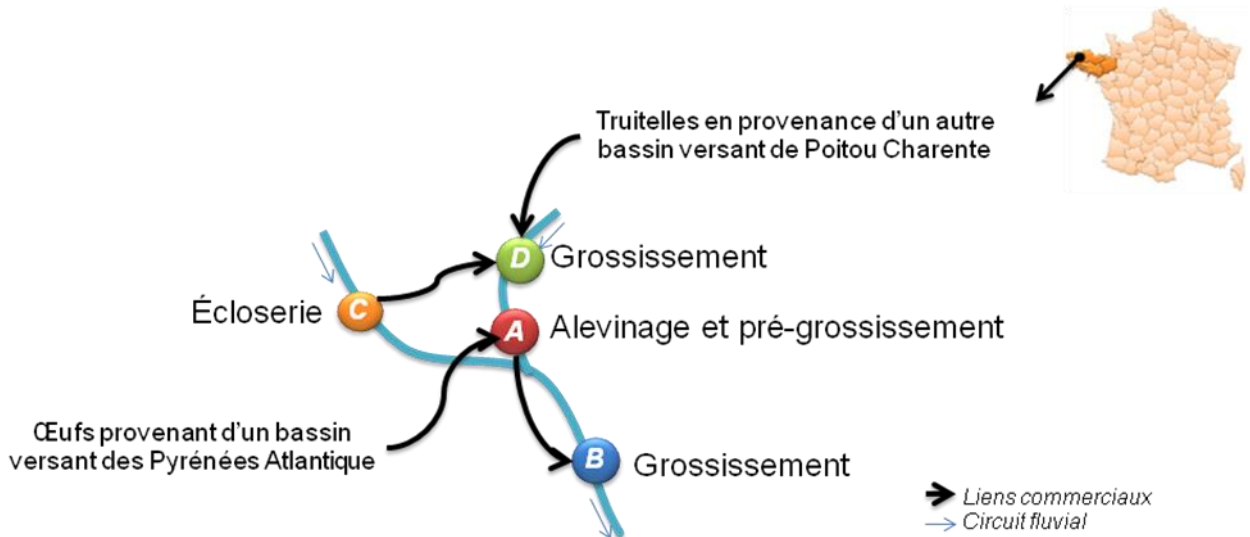
Le site A est un site d'alevinage et de pré-grossissement. Il reçoit des œufs provenant d'une pisciculture située dans les Pyrénées Atlantique ainsi que du site C. Les œufs y sont suivis jusqu'au stade « portion » (près de 300g) puis sont revendus à d'autres piscicultures ou transférés vers le site B, site appartenant au même pisciculteur.

Le site B procède au grossissement de poissons provenant du site A et sont destinés à la vente. Sur site sont présents des poissons pesant de 40 à 500 grammes. Ce site se trouve en aval de la rivière sur laquelle se situent les sites A et D et reçoit aussi l'eau du bras de rivière sur lequel est présente la pisciculture C.

Le site C est une écloserie positionnée en début de rivière, sans aucune pisciculture en amont. Il possède des géniteurs mâles et femelles qui servent à la production d'œufs destinés soit à la vente à d'autres piscicultures qui procèdent à l'alevinage et grossissement, soit à la production d'autres géniteurs mâles et femelles. Ces derniers sont eux-mêmes conservés sur site ou

vendus. On y retrouve des lots de poissons pesant de quelques grammes à près de 1,5 kg. Ce site ne présente donc pas d'introduction extérieure de poisson.

Le site D est positionné en début de rivière sans aucune pisciculture en amont. Il procède au grossissement de truites arc-en-ciel adultes reçues à la fois du site C, et d'une autre pisciculture située en Poitou Charente. On y retrouve des poissons de près de 300 g à 2 kg.



**Figure 13 :** Positionnement des piscicultures et liens commerciaux. Les sites sont indexés par une lettre (A à D) et ne sont séparés entre eux par aucune pisciculture. Les sites C et D sont situés en début de rivière, sans aucune autre pisciculture en amont.

### 2.3.2.Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés une fois par mois sur la période de mars 2011 à mars 2012, avec une coupure en août en raison de la mise en assec de certaines exploitations. A chaque passage sur site et pour chaque lot de poissons suivi, plusieurs informations telles que la température de l'eau, son débit, la densité du bassin contenant le lot, l'aliment et les vaccinations et/ou traitements antibiotiques éventuels, ont été renseignés sur une fiche de visite jointe en Annexe 4.

Sur chaque site piscicole, plusieurs lots de truites ont été suivis mensuellement, à raison de 15 poissons par lot. Pour chaque lot, les poissons ont été pêchés de manière aléatoire et ne présentaient pas de signes cliniques de la maladie. Sur chaque poisson, les prélèvements ont

été réalisés à la fois sur la rate, considérée comme référent pour la population bactérienne interne de l'animal, et sur les branchies considérées comme référent pour les isolats présents dans l'environnement direct de l'hôte truite. Pour chaque poisson, les ensemencements sur gélose FLP ont été réalisés sur site piscicole et les étapes de sélection des isolats, détaillées au paragraphe 1 de ce chapitre, ont été appliquées de retour au laboratoire.

**Tableau 10 :** Stratégies de prélèvement pour l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle d'un poisson, d'une pisciculture et d'un ensemble de piscicultures.

<b>Question de recherche</b>	<b>Objectifs</b>	<b>Prélèvements fixés</b>
<b>Q1:</b> Co-infection au niveau interne d'un même poisson	Analyse de variabilité génétique entre plusieurs isolats d'un même organe d'un même poisson	10 isolats de rate/poisson
<b>Q2:</b> Variabilité génétique entre souches externes et internes d'un même poisson	Comparaison de la variabilité génétique des isolats de rate et de branchies	10 isolats de rate ( <b>Q1</b> ) + 10 isolats de branchies / poisson
<b>Q3:</b> Evolution quantitative et qualitative des populations de <i>F. psychrophilum</i> intra-pisciculture, au cours du temps	Suivi de plusieurs lots de poissons sur un même site au cours du temps	isolats de <b>Q1</b> et <b>Q2</b> /poisson, 15 poissons/lot
<b>Q4:</b> Variabilité génétique inter-sites	Comparaison des diversités observées sur l'ensemble des sites	isolats de <b>Q3</b> /pisciculture

### 3.Extraction d'ADN et identification moléculaire

Pour toutes les souches de référence et les isolats répondant aux critères d'identification phénotypique et biochimique de *F. psychrophilum*, les ADN génomiques ont été extraits et purifiés à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN (Promega, France), selon les recommandations du fabricant. Les ADN extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

L'identification des isolats de *F. psychrophilum* a été confirmée au niveau moléculaire. Pour cela, une PCR duplex a été mise au point, avec une amplification spécifique des gènes *gyrA* et *gyrB*. Les amorces GYRA-FP1F (5'-GAAACCGGTGCACAGAAGG-3') et GYRA-FP1R (5'-CCTGTGGCTCCGTTTATTAA-3') pour *gyrA* (Izumi and Aranishi, 2004), et PSY-G1F (5'-TGCAGGAAATCTTACTCG-3') et PSY-G1R (5'-GTTGCAATTACAATGTTGT-3') pour *gyrB* (Izumi and Wakabayashi, 2000), ont été utilisées, avec des produits d'amplification de taille attendue de 396 et 1017 pb respectivement.



La spécificité de la PCR duplex a été contrôlée en incluant dans l'étude :

- des témoins positifs : 3 souches de référence de *F. psychrophilum* JIP 02/86, NCIMB 1947<sup>T</sup> et LNPA PO1/88
- des témoins négatifs : *E. coli* (ATCC 25922) et de l'eau
- des témoins de spécificité : souches potentiellement présentes sur le poisson (*A. hydrophila* et *A. salmonicida*) et autres espèces de Flavobactéries (*F. aquatile*, *F. columnare*, *F. johnsoniae* et *F. succinicans*).

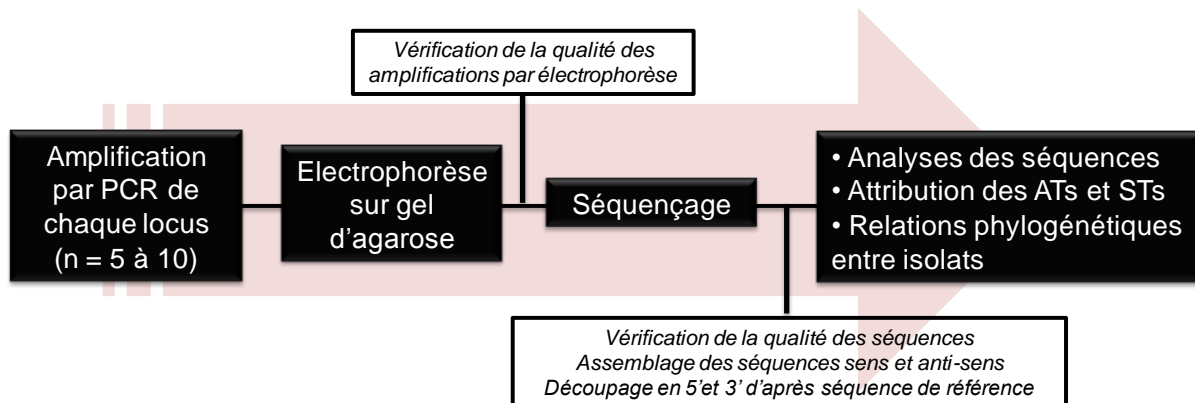
Dans un volume réactionnel de 25 µL, ont été mélangés 5 µL d'ADN à 10 ng.µL<sup>-1</sup>, 25 pmol de chaque amorce *gyrA* (Invitrogen, France), 37,5 pmol de chaque amorce *gyrB* (Invitrogen, France), 200 µM de chaque dNTP (Eurobio, France), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Eurobio, France) et 0,5 unité de Taq polymérase (Eurobio, France). Les étapes de thermocyclage suivantes ont été programmées dans l'appareil C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad): 94° C pendant 5 min, 35 cycles constitués d'une étape de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'une hybridation à 56° C pendant 1 min et d'une élongation à 72° C pendant 1,5 min, et enfin, une phase terminale d'élongation à 72° C pendant 5 min. Les produits d'amplification ont été visualisés sur un transilluminateur UV et photographiés (appareillages Chemidoc XRS, Bio-Rad) grâce au logiciel Quantity One (Bio-Rad), après séparation sur un gel d'agarose à 1,5% supplémenté en bromure d'éthidium (Prime, France) à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. La migration à 100V dure environ 30 min (appareillage Apelex, France).

## 4. Analyse MLST

Comme décrit dans le paragraphe 2.4.2.2.2, la MLST est une méthode d'étude de la variabilité génétique basée sur le séquençage de gènes de ménage. Les étapes de cette méthode sont schématiquement représentées sur la Figure 14.

Pour chaque locus, une séquence correspond à un allèle type (AT, « Allele Type ») identifié par un numéro. L'assignation d'un numéro d'allèle type se fait après alignement des séquences de l'échantillon d'isolats étudié, avec celles préexistantes dans les bases de données. L'apparition de chaque nouvelle séquence donne lieu à l'attribution d'un nouveau

numéro. Pour chaque isolat, l'ensemble des ATs correspond au génotype ou séquence type (ST, « Sequence Type »), lui-même identifié par un nombre.



**Figure 14:** Schématisation des étapes de la MLST

## 4.1. Méthodologie

Pour notre étude, le choix des gènes de ménage repose sur un schéma MLST décrit récemment (Nicolas et al, 2008). Il s'agit des loci *trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *fumC*, *murG*, *tuf*, et *atpA*, décrits (amorces spécifiques, taille de la séquence amplifiée) dans le Tableau 11. En prévision de l'étape de séquençage, chaque amorce, sens et anti-sens, est couplée avec une amorce universelle M13 forward ou reverse (M13\_f, CAGGAAACAGCTATGACC et M13\_r, TGTA AACGACGGCCAGT) (Invitrogen, France) respectivement.

Pour chaque isolat dont l'ADN a été extrait, une réaction d'amplification par locus a été réalisée. Pour chaque locus (Tableau 11), le mix réactionnel pour un volume final total de 20  $\mu\text{L}$ , contient 10  $\mu\text{L}$  d'ADN génomique ( $\approx 2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), du GoTaq Green Master Mix 1X (Promega, France), 1,87 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Eurobio, France), 0,15 mM de chaque dNTP (Eurobio, France), 0,25  $\mu\text{M}$  de chaque amorce (Invitrogen, France) et une unité de *Taq* polymérase (Promega, France). Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions suivantes:

- une dénaturation à 94°C pendant 5 min,

- 24 cycles : 94°C pendant 30 sec, 55°C (-0.4°C/cycle) pendant 30 sec et 72°C (+2 sec/cycle) pendant 1 min,
- 12 cycles : 94°C pendant 30 sec, 45°C pendant 30 sec et 72°C (+3 sec/cycle) pendant 2 min,
- une extension finale à 72°C pendant 10 min.

Les produits d'amplification ont été ensuite mis à migrer en même temps que le marqueur de poids moléculaire Euro ladder L (Eurobio, France), sur gel d'agarose (Eurobio, France). Cette électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 1% (p/v), supplémenté en bromure d'éthidium (Eurobio, France) à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Après électrophorèse (30 min à 120V), les produits PCR ont été visualisés sous UV et photographiés grâce à une camera placée dans une chambre UV (Chemidoc XRS, Bio-Rad), gérée par le logiciel Quantity One (Bio-Rad, France).

Après avoir vérifié la présence d'une bande unique au poids moléculaire attendu, les amplifiats ont été purifiés puis séquencés (LGC Genomics, Allemagne), grâce aux amorces universelles M13 forward et reverse. La qualité des séquences a ensuite été contrôlée par examen visuel des chromatogrammes résultants, et les séquences sens et anti-sens de chaque locus pour chaque isolat ont été assemblées grâce aux logiciels Phred et Phrap (<http://www.phrap.org/consed/consed.html#howToGet>) (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) afin de reconstituer la séquence entière du locus amplifié. Pour chaque locus, les séquences résultantes ont été alignées avec une séquence de référence (séquences de la souche JIP 02/86), puis les extrémités 5' et 3' ont été coupées afin d'une part, d'éliminer les portions de mauvaise qualité (zones où les pics correspondant à la détection de chaque base sont mal définis et/ou de faible hauteur) et d'autre part, de conserver des séquences de même longueur. Le découpage et l'alignement *in silico* des séquences ont été réalisés respectivement à l'aide des logiciels Consed (version 22.0) (<http://www.phrap.org/consed/consed.html#howToGet>) (Gordon et al., 1998) et BioEdit (version 7.0.5.3) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) (Hall, 1999). Dans notre étude, les séquences obtenues sont plus courtes que celles publiées dans le schéma MLST initial (Nicolas et al., 2008) pour des raisons d'automatisation du processus de coupe permettant

d'assurer le maintien d'une bonne qualité des portions de séquences conservées. Les portions éliminées ne comprenaient pas de SNPs.

Pour chaque nouvelle séquence, c'est-à-dire pour chaque séquence absente de la base de données MLST de *F. psychrophilum* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Flavopsy.html>), un nouveau numéro d'Allele Type ou AT est attribué. Cette étape d'attribution d'AT et de ST (ensemble des ATs d'un même isolat) a été réalisée à l'INRA de Jouy-en-Josas par le Dr. Nicolas P. (Département MIG - Mathématiques Informatique et Génome UR1077).

**Tableau 11:** Amorces utilisées pour l'amplification des loci MLST.

<i>Locus</i>	<i>Produit du gène</i>	<i>Amorce</i>	<i>Séquence (5'→3')</i>	<i>Taille de l'amplifiat (bp)</i>	<i>Taille de la séquence analysée *(bp)</i>
<i>trpB</i>	Sous-unité $\beta$ de la Tryptophane synthase	trpB_f	M13-f_AAGATTATGTAGGCCGCC	976	789
		trpB_r	M13-r_TGATAGATTGATGACTACAATATC		
<i>gyrB</i>	Sous-unité $\beta$ de l'ADN gyrase	gyrB_f	M13-f_GTTGTAATGACTAAAATTGGTG	1260	1077
		gyrB_r	M13-r_CAATATCGGCATCACACAT		
<i>dnaK</i>	Protéine chaperonne	dnaK_f	M13-f_AAGGTGGAGAAATTAAGTAGG	1068	882
		dnaK_r	M13-r_CCACCCATAGTTTCGATACC		
<i>tuf</i>	Facteur d'élongation <i>Tu</i>	tuf_f	M13-f_GAAGAAAAAGAAAGAGGTATTAC	981	795
		tuf_r	M13-r_CACCTTCACGGATAGCGAA		
<i>fumC</i>	Fumarate hydratase de classe II	fumC_f_new	M13-r_CCAGCAAACAATACTGGGG	936	750
		fumC_r_new	M13-f_GGTTTACTTTTCCTGGCATGAT		
<i>murG</i>	Undecaprényl diphospho-muramoylpentapeptide beta-N acétylglucosaminyl-transférase	murG_f	M13-f_TGGCGGTACAGGAGGACATAT	869	681
		murG_r	M13-r_GCATTCTTGTTTGATGGTCTTC		
<i>atpA</i>	Sous-unité $\alpha$ de l'ATP synthase	atpA_f	M13-f_CTTGAAGAAGATAATGTGGG	1019	834
		atpA_r	M13-r_TGTTCCAGCTACTTTTTTCAT		

\* Il s'agit ici de la taille de la séquence après nettoyage *in silico* des extrémités 5' et 3'.

## 4.2. Analyse des résultats de MLST

### 4.2.1. Analyse des séquences

Les séquences ont été analysées selon des critères qui permettent de les décrire et de les comparer. Ces critères ont été déterminés à la fois pour l'ensemble des allèles de chaque locus, et pour l'ensemble des isolats. Dans ce dernier cas et pour chaque isolat, les séquences des 7 loci MLST ont été concaténées et représentent une taille totale de 5808 pb. Les analyses portaient sur :

- le nombre de sites polymorphes ou SNPs ;
- la diversité nucléotidique par site ( $\pi$ ), calculé par le logiciel DnaSP version 5.10.01 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Librado and Rozas, 2009) et la diversité génétique (H) déterminée à l'aide du logiciel LIAN 3.5 (<http://pubmlst.org/analysis/>), calculée selon la formule  $H = [n/(n-1)](1-p_i^2)$ , où n est le nombre de séquences et donc d'isolats,  $p_i$  la fréquence relative de chaque ième allèle;
- le nombre de substitutions synonymes (S) et non-synonymes (N) est calculé grâce au logiciel MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura et al., 2011), et le ratio des substitutions synonymes/non synonymes (dN/dS) est obtenu à l'aide du logiciel START2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>) (Jolley et al., 2001). Le ratio dN/dS permet d'estimer la pression de sélection exercée sur les gènes codants.

### 4.2.2. Recombinaison et structure de population

La recombinaison fait partie des événements générateurs de variabilité génétique au sein des espèces bactériennes. La survenue de recombinaisons dans une population peut être statistiquement testée dans un alignement de séquences *via* l'index de paires d'homéoplasies ou « pairwise homoplasy index » (PHI), et l'index d'association standardisé ( $I_A^S$ ) qui mesure le déséquilibre de liaison, c'est-à-dire le réassortiment non aléatoire des allèles des différents loci, et apporte une précision sur comment est structurée la population. En absence de recombinaison ou lorsqu'elle survient à très faible fréquence, on observe un fort déséquilibre de liaison entre les marqueurs avec une valeur de  $I_A^S$  significativement différente de 0 : la

population apparaît clonale. La survenue de recombinaisons dans une population se traduit par l'absence de déséquilibre de liaison et une valeur de l' $I_A^S$  significativement proche de 0 : la population est panmictique.

L'observation d'une structure clonale peut être faussement déduite du calcul de  $I_A^S$  à partir de la totalité de l'échantillon (soit les séquences concaténées de tous les isolats), à cause de la sous-représentation de certains génotypes. Ce problème peut être évité en ne prenant en considération qu'une seule séquence concaténée par ST pour le calcul de l' $I_A^S$ . D'autre part, Smith et al. (1993) ont démontré que lorsqu'on procède à la clusterisation de STs proches, et que chaque cluster est considéré comme une unité (c'est-à-dire qu'on ne prend en compte qu'un unique ST par cluster pour le calcul de  $I_A^S$ ), une structure de population différente de celle déduite des premiers calculs peut apparaître. Le déséquilibre de liaison peut :

1. être conservé : la population est strictement clonale, ou
2. disparaître : la population apparaît alors épidémique.

Le PHI a été calculé à la fois pour chaque locus, et à la fois pour l'ensemble des isolats tels que décrit dans le paragraphe 4.2.1 précédent, par le logiciel SplitsTree 4 version 4.12.3 (<http://www.splitstree.org/>) (Huson and Bryant, 2006). L'index  $I_A^S$  a été calculé à l'aide du logiciel START2 (Jolley et al., 2001) (i) pour tout l'échantillon (soit l'ensemble des séquences concaténées), (ii) pour l'ensemble des STs uniques (soit une seule séquence concaténée par ST), et (iii) après clusterisation des STs proches, afin de confirmer le type de structure de population observé.

### **4.2.3. Analyses phylogénétiques**

Les relations phylogénétiques entre les différents génotypes ou STs ont été observées grâce à un arbre phylogénétique des séquences concaténées généré par MEGA5 (Tamura et al., 2011) et construit par la méthode du voisin le plus proche ou « Neighbor-joining » (NJ) (Saitou and Nei, 1987) avec 1000 répétitions ou « bootstrap ».

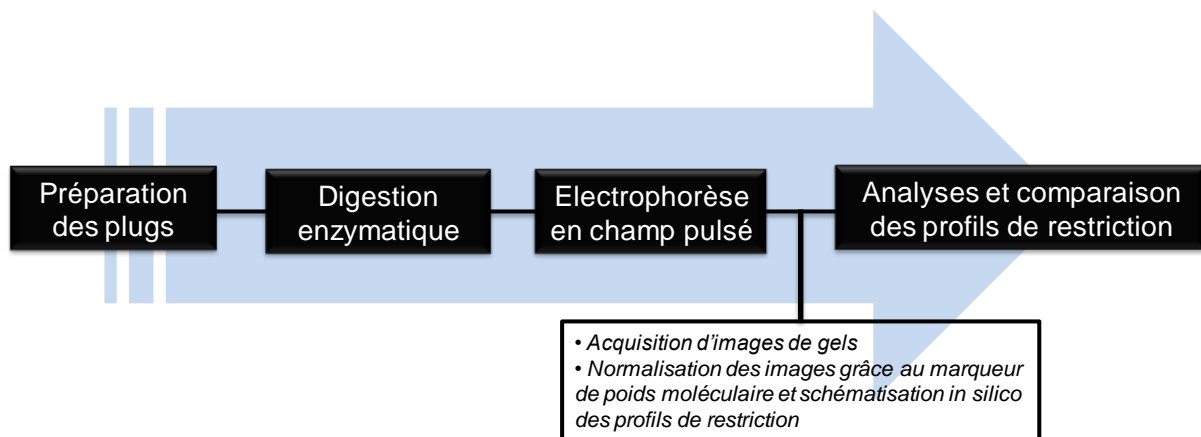
Une autre méthode a permis d'observer les filiations entre les STs où ceux-ci sont divisés en groupe de STs proches ou complexes clonaux. Cette analyse a été réalisée par le logiciel e-BURST v3 ([http://eburst.mlst.net/v3/enter\\_data/single/](http://eburst.mlst.net/v3/enter_data/single/)). Les complexes clonaux sont

statistiquement générés par la méthode bootstrap ( $n = 1000$ ) et définis selon les paramètres par défaut où les STs liés ont au minimum  $n-1$  ATs en communs et/ou selon des paramètres moins stringents où les STs liés ont au minimum  $n-2$  ATs en commun.

Afin de déterminer s'il y avait un lien entre les STs et la distribution géographique des isolats, nous avons utilisé un test exact de Fisher. Ce test statistique a été réalisé grâce au logiciel SAS statistical software - version 9.2 (<http://support.sas.com/software/92/index.html>) (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 5. Analyse PFGE

L'électrophorèse en champ pulsé ou "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) est une méthode de typage de souches bactériennes qui permet d'associer à chaque souche bactérienne, un profil de restriction ou pulsotype, caractéristique d'une enzyme de restriction donnée. Les étapes de cette technique sont schématisées sur la figure suivante (Figure 15). Cette méthode sera appliquée à l'étude de variabilité génétique de l'échantillon *F. psychrophilum* collecté dans le bassin versant Breton (cf paragraphe 2.4)



**Figure 15:** Schématisation des étapes de la PFGE



## 5.1. Méthodologie

### *Préparation des plugs à partir des cultures bactériennes*

Pour chaque isolat à tester, une colonie est repiquée sur gélose FLP et laissée incuber pendant 72 heures à 17°C afin d'en vérifier la pureté. De chaque culture, 3 à 4 colonies sont remises en bouillon FLP mis à incuber à 17°C sous agitation pendant 48 heures.

Ensuite, une solution d'agarose est préparée par mélange de 0,21 g d'agarose (concentration finale à 2% ; Pulsed Field Certified agarose, Bio-Rad, France) et 9,4 mL de tampon TE (10 mM Tris (Eurobio, France), 1 mM EDTA (VWR, France), pH 8,0) porté à 100°C. Après dissolution complète de l'agarose, la solution est placée à 55°C pendant 5 minutes. Ce mélange est supplémenté en Sodium Dodecyl Sulfate ou SDS (0,5 mL de SDS à 20% ; Bio-Rad, France) pour une concentration finale à 1% puis, homogénéisé et conservé à 55°C jusqu'à utilisation.

Parallèlement, les bouillons de culture bactérienne sont centrifugés pendant 5 minutes à 5000 g, et les culots résultants sont repris dans 2 mL de tampon Cell Suspension (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0). Après avoir vérifié que la densité optique de cette suspension était comprise entre 1,2 et 1,8 à 625 nm au spectrophotomètre (Genesys 20 de Thermo scientific, France), 400 µL sont prélevés et mis dans un tube Eppendorf, auxquels sont ajoutés 20 µL de protéinase K à 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Après homogénéisation, 400 µL de la préparation d'agarose conservée à 55°C sont ajoutés et mélangés doucement par aspiration et refoulement avec une pipette. Ce mélange est ensuite immédiatement réparti dans les moules à plugs, à raison de 100 µL par plug. Ceux-ci sont laissés à température ambiante pour se solidifier.

### *Lyse des cellules dans les plugs d'agarose*

Les plugs sont immergés dans 5 mL de tampon de lyse (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, et Sarcosyl (Sigma, France) à 1 %) additionnés de 25 µL de Protéinase K à 20 mg.mL<sup>-1</sup> (Promega, France). Les tubes contenant les blocs d'agarose et la solution de lyse sont placés à 37°C sous agitation (175-200 rpm) pendant 3 heures. Puis, le tampon de lyse est soigneusement éliminé par retournement des tubes sur papier absorbant. Les plugs sont rincés une première fois par agitation pendant quelques secondes dans 15 mL d'eau ultrapure stérile portée à 50°C, puis incubés pendant 15 minutes dans 15 mL d'eau ultrapure stérile

préchauffée à 50 °C. Un dernier rinçage avec 15 mL d'eau ultrapure stérile à 50°C est réalisé. L'eau est à nouveau soigneusement éliminée par retournement des tubes sur du papier absorbant et 15 mL de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) stérile préchauffé (50°C) sont rajoutés aux plugs. Les tubes sont incubés à 50°C au bain-marie pendant 15 minutes. Le tampon TE est ensuite éliminé et les étapes de rinçage avec le tampon TE sont répétées trois fois. Les plugs sont ensuite égouttés sur du papier absorbant et conservés en tube Eppendorf dans du tampon TE stérile à 4°C au maximum pendant 1 mois.

### ***Digestion enzymatique***

Les plugs soigneusement éponnés sont répartis individuellement dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, dans 200 µL d'un mélange enzymatique contenant 20 µL de Tampon NeBuffer 3 10X (concentration finale à 1X, Ozyme, New England Biolabs), 2 µL de BSA ou « Bovine Serum Albumin » à 10 µg.µL<sup>-1</sup> (concentration finale à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, Ozyme, New England Biolabs), 3 µL d'enzyme *Sal* I (Ozyme, New England Biolabs) à 10 U.µL<sup>-1</sup> soit 40 U dans la solution finale et 175 µL d'eau ultrapure stérile. Le plug ainsi immergé dans la solution enzymatique est incubé à 37°C pendant toute une nuit.

### ***Electrophorèse***

Ensuite les plugs, ainsi que 10 µL d'un marqueur de poids moléculaire de 24-300 kb (Mid Range II PFGE Marker, New England Biolabs) sont déposés dans les puits du gel d'électrophorèse à 1% (Pulsed Field Certified agarose, Bio-Rad, France) préparé à l'avance. Après que les puits aient été scellés avec cet agarose conservé à 55°C, la migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse en champ pulsé CHEF-DRIII system (Bio-Rad Laboratories), remplie de 2 L de tampon TBE 0,5X (Eppendorf). L'électrophorèse est réalisée à 14°C avec un voltage à 6 V/cm, pendant 18 heures et 30 minutes avec un temps de pulsation de 1-12 sec, et un angle de 120°.

La migration terminée, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Eurobio, France) à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> pendant 30 min dans un container fermé. Ensuite le gel est lavé dans 500 mL d'eau pendant 60 min, puis visualisé sous UV et photographié grâce à une camera placée dans la chambre UV (appareillages Chemidoc XRS, Bio-Rad, France), gérée par le logiciel Quantity One (Bio-Rad, France).

## 5.2. Analyse des résultats

Les analyses de profils PFGE ont été réalisées grâce au logiciel BioNumerics (Applied Maths). Les images des gels d'électrophorèse ont été normalisées après que les bandes de restriction du marqueur de poids moléculaire aient été identifiées.

### 5.2.1. Evaluation de la similarité des profils

La dissemblance entre 2 génotypes est quantifiée par le calcul du coefficient de Jaccard. Il permet d'estimer le degré de dissemblance entre deux profils de restriction par le calcul du pourcentage de bandes communes sur le nombre total de bandes (Jaccard, 1908). Le coefficient de similarité de Jaccard entre deux profils de restriction  $i$  et  $j$  est calculé comme suit :

$$S_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_{ij} + n_i + n_j}$$

$n_{ij}$  est le nombre de bandes communes entre les deux profils  $i$  et  $j$ ,

$n_i$  est le nombre de bandes du profil  $i$ ,

$n_j$  est le nombre total de bandes du profil  $j$ .

Le coefficient de Jaccard varie de 0 à 100%, un coefficient égal à 100% signifiant que les profils de restriction sont identiques.

Le coefficient de Jaccard entre 2 profils est ajusté grâce à des paramètres d'optimisation et de tolérance. Lorsque les profils  $i$  et  $j$  sont comparés, deux bandes sont considérées comme identiques si la position d'une bande du profil  $i$  est comprise dans une fenêtre autour de la bande du profil  $j$ . La taille de cette fenêtre correspond à la tolérance. Le critère d'optimisation correspond ici au même principe en prenant en compte le positionnement des profils entiers les uns par rapport aux autres. La tolérance et l'optimisation sont chacun fixées ici à 2%.

### 5.2.2. Analyse phylogénétique

Les liens de parentés entre les isolats sont établis par construction de dendrogrammes. Ceux-ci sont construits par classification hiérarchique selon la méthode UPGMA (Unweight

Pair Group Method with Arithmetic mean) qui fait l'hypothèse d'une évolution indépendante des différentes lignées à une vitesse constante, avec 1000 répétitions.

### **5.2.3. Attribution de pulsotype et de cluster**

Il s'agit d'identifier les différents profils de restriction grâce au seuil de tolérance défini précédemment. Dans notre étude, deux profils ayant au maximum 2% de différence, seront considérés comme identiques et appartenant au même pulsotype.

Les pulsotypes sont nommés d'après leur degré de similarité, c'est-à-dire que deux pulsotypes présentant un degré de similarité supérieur ou égal à 90% auront un même numéro d'identifiant suivi de a, b... etc (exemple : P1a, P1b...). L'attribution des pulsotypes sera réalisée pour l'analyse des résultats PFGE globale sur l'ensemble des 4 sites de l'étude de variabilité génétique dans le bassin versant Breton. Les pulsotypes présentant une similarité supérieure ou égale à 80%, sont regroupés dans un même cluster.

### **5.2.4. Mesure de la diversité génotypique**

La diversité des pulsotypes sera mesurée grâce à l'indice de Simpson (H) (Magurran, 2004). Cet indice mesure la probabilité que la méthode attribue 2 types différents à 2 isolats indépendants. Il est calculé comme suit :

$$H=1-\sum p_i^2,$$

$p_i$  est la fréquence du variant génétique  $i$ .

Plus cet indice se rapproche de zéro, plus la population étudiée est composée de pulsotypes très similaires.

Cet indice de Simpson sert aussi à estimer le pouvoir discriminant d'une méthode de typage. Dans l'étude de diversité génétique d'une même population bactérienne par plusieurs méthodes, la méthode présentant la valeur la plus forte de l'indice de Simpson sera considérée comme la plus discriminante.

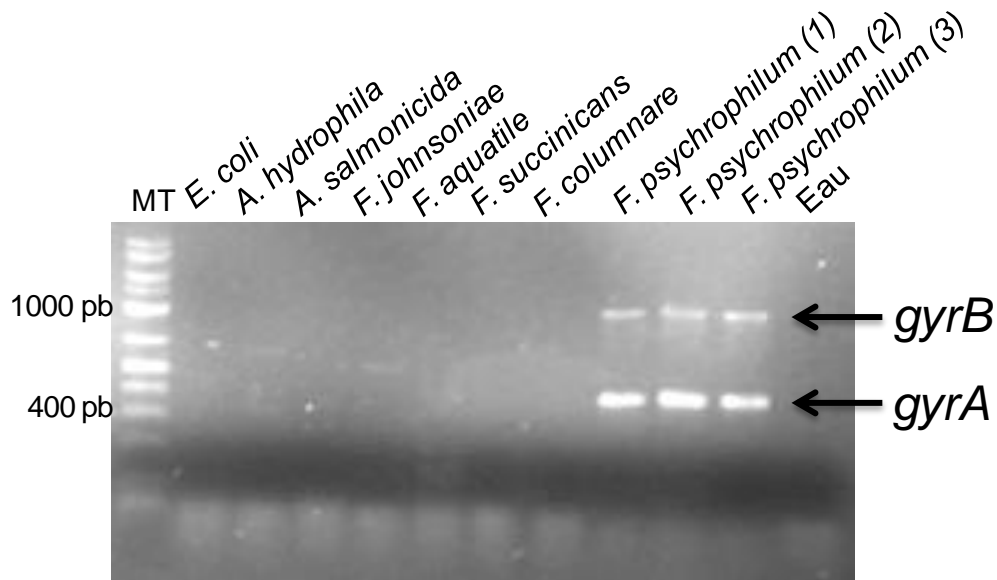
# **CHAPITRE III.**

## **Résultats**



# 1. Mise au point de l'identification moléculaire de *F. psychrophilum* par PCR duplex *gyrA/gyrB*

Une méthode d'identification moléculaire de *F. psychrophilum* par PCR duplex amplifiant les gènes *gyrA* et *gyrB* a été mise au point selon les modalités décrites au Chapitre II, paragraphe 3. L'amplification de ces gènes n'a été obtenue que pour cette espèce, comme le montre la Figure 16. La PCR duplex *gyrA/gyrB* a donc été appliquée pour tous les isolats utilisés dans cette thèse comme un outil d'identification rapide et spécifique de l'agent pathogène *F. psychrophilum*.



**Figure 16:** Amplification par PCR des gènes *gyrA* et *gyrB* pour l'identification spécifique de *F. psychrophilum*. (1) Souche de référence LNPAА PO1/88, (2) NCIMB 1947<sup>T</sup> et (3) JIP 02/86 ; MT : Marqueur de poids moléculaire Euroladder L (Eurobio).

## **2. Etude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* dans l'arc Atlantique français par la méthode MLST**

### **2.1. Identification moléculaire des isolats**

La PCR duplex décrite ci-dessus a permis de confirmer l'identité *F. psychrophilum* des 66 isolats collectés sur Truite arc-en-ciel dans l'arc Atlantique français, présélectionnés sur la base des critères phénotypiques suivants : couleur, allure de la colonie, Gram négatif, catalase négative et peroxydase positive (paragraphe 1 de ce chapitre).

### **2.2. Analyse des séquences des gènes de ménage**

Après l'amplification des 7 gènes de ménage (*trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *fumC*, *murG*, *tuf*, et *atpA*) choisis selon le schéma MLST décrit par Nicolas et al., (2008) des 66 isolats sélectionnés pour cette étude, le séquençage a montré aucune insertion ni délétion dans les loci analysés. Pour chaque isolat, la concaténation des 7 séquences MLST permet l'obtention d'une séquence d'une longueur totale de 5808 bp.

Les séquences ont été caractérisées par les indices de diversité  $\pi$  et H. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12. L'ensemble des séquences des 66 isolats de *F. psychrophilum* présente une diversité génétique moyenne (H) de 0,4313, avec des valeurs individuelles de H par locus comprises entre 0,3795 (*atpA* et *fumC*) et 0,5408 (*trpB*). La diversité nucléotidique par site ( $\pi$ ) varie elle, de 0,00066 à 0,00633 pour *fumC* et *atpA* respectivement, avec une valeur moyenne pour tous les loci de 0,00317.

Nous avons également estimé la pression de sélection sur ces gènes en calculant le rapport dN/dS. Celui-ci permet de comparer le taux de substitutions qui changent l'acide aminé codé (dN, le taux de mutations non-synonymes) et le taux des substitutions qui ne changent par la séquence protéique (dS, le taux de mutations synonymes). Les substitutions synonymes sont apparues plus fréquentes que les substitutions non-synonymes, avec un rapport substitutions



non-synonyme/synonymes (dN/dS) égal à 0 pour *trpB*, *gyrB*, *tuf* et *murG*, et compris entre 0,00205 à 0,2738 pour les trois autres gènes. Le rapport moyen dN/dS pour l'ensemble de l'échantillon est égal à 0,02.

**Tableau 12:** Caractéristiques des séquences des 7 loci MLST

<b>Locus</b>	<b>Taille (bp)</b>	<b>H<sup>[1]</sup></b>	<b><math>\pi</math> (bp<sup>-1</sup>)<sup>[2]</sup></b>	<b>S<sup>[3]</sup></b>	<b>N<sup>[4]</sup></b>	<b>dN/dS<sup>[5]</sup></b>
<i>trpB</i>	789	0,5408	0,00184	7	0	0,0000
<i>gyrB</i>	1077	0,4033	0,00332	23	0	0,0000
<i>dnaK</i>	882	0,4033	0,00176	10	1	0,0020
<i>tuf</i>	795	0,3837	0,00512	18	0	0,0000
<i>fumC</i>	750	0,3795	0,00066	5	0	0,2738
<i>murG</i>	681	0,5291	0,00343	7	5	0,0000
<i>atpA</i>	834	0,3795	0,00633	28	1	0,0171
Séquence concaténée	5808	0,4313	0,00317	135	9	0,0200

<sup>1</sup> H : diversité génétique

<sup>2</sup>  $\pi$  : diversité nucléotidique par site

<sup>3</sup> S : nombre de substitutions synonymes

<sup>4</sup> N : nombre de substitutions non-synonymes

<sup>5</sup> dN/dS : rapport substitutions non-synonymes/substitutions synonymes

## 2.3. Assignment des allèles types (ATs) et profils alléliques (STs)

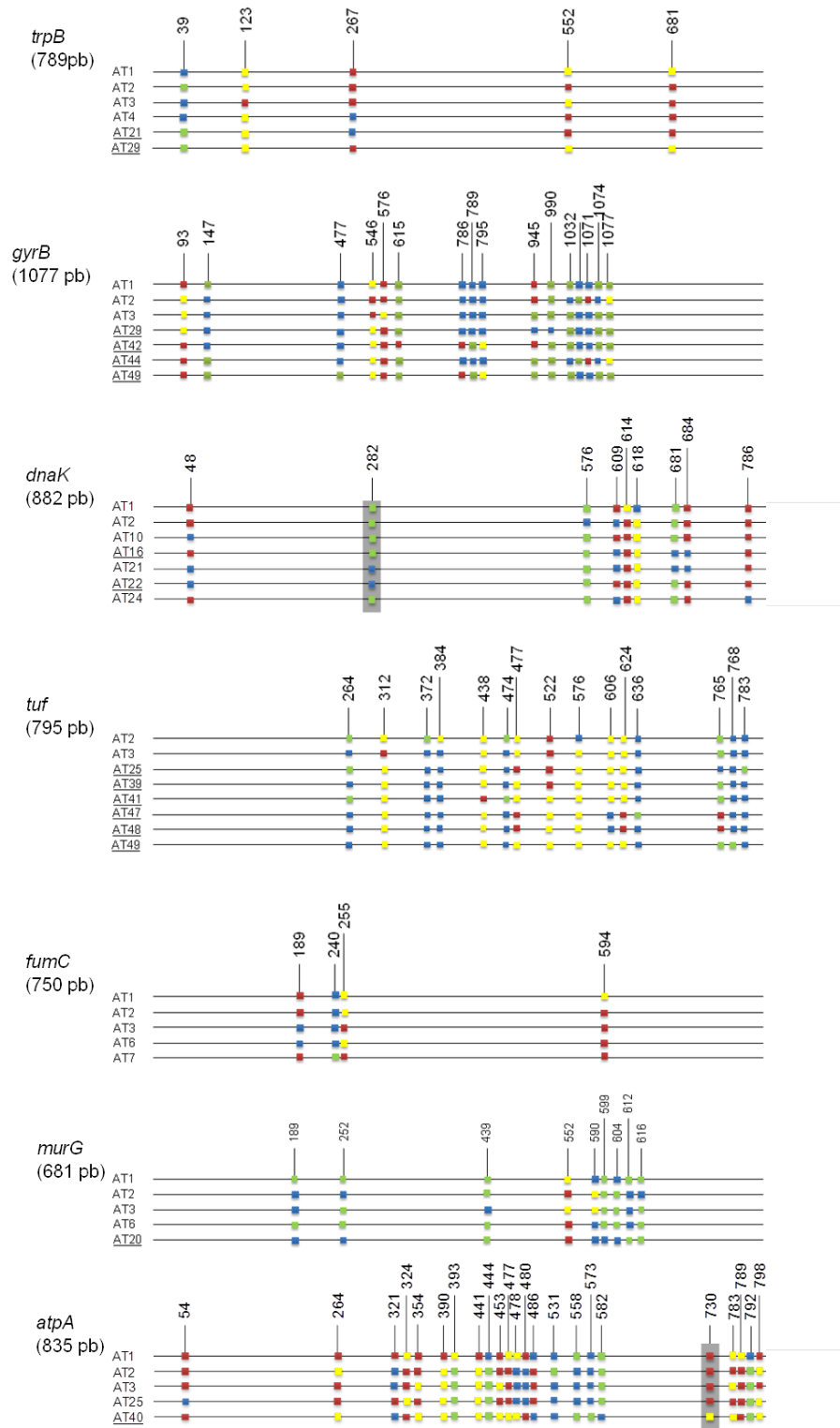
### 2.3.1. Identification et localisation des SNPs

L'alignement des séquences concaténées des 66 isolats de *F. psychrophilum* a permis d'observer 81 sites polymorphes, représentant près de 1,4% de la séquence concaténée totale. Chaque locus étudié est caractérisé par un nombre de SNPs qui varie de 4 pour *fumC* à 23 pour *atpA* (Tableau 13).

**Tableau 13:** Nombre de SNPs observés selon le gène de ménage amplifié

<b>Locus</b>	<b>Nombre de sites variables(%)</b>	
	<b>total</b>	<b>Nouveau</b>
<i>trpB</i>	5 (0,63%)	0
<i>gyrB</i>	16 (1,48%)	0
<i>dnaK</i>	9 (1%)	1
<i>tuf</i>	15 (1,9%)	0
<i>fumC</i>	4 (0,53%)	0
<i>murG</i>	9 (1,32%)	0
<i>atpA</i>	23 (2,7%)	1

Pour chaque gène étudié, la position et la nature du polymorphisme sont indiquées sur la Figure 17. Les sites polymorphes sont majoritairement bialléliques, exceptés pour *tuf* et *gyrB* qui ont montré chacun un site triallélique. Seuls deux nouveaux SNPs (1 pour *atpA* et 1 pour *dnaK*) ont été identifiés par rapport à ceux décrits dans l'analyse MLST précédente de *F. psychrophilum* sur truite arc-en-ciel (Nicolas et al., 2008).



**Figure 17:** Positionnement des SNPs sur les variants alléliques des gènes de ménage. Les bases A sont indiquées en bleu, T en rouge, G en vert et C en jaune. Les nouveaux SNPs obtenus dans cette étude (par rapport aux données MLST précédentes sur truite arc-en-ciel), sont indiqués en gris.

### 2.3.2. Identification des ATs

Pour chaque locus, les séquences des 66 isolats ont permis d'identifier entre 5 (pour *murG*, *fumC* et *atpA*) et 8 (pour *tuf*) ATs (allèle type). Parmi ces ATs, des nouveaux ont été mis en évidence (de 0 pour *fumC* à 4 pour *tuf*), par comparaison avec les données MLST obtenues en 2008 pour *F. psychrophilum* isolé de truite arc-en-ciel (Nicolas et al., 2008) (cf Figure 17 et Tableau 14). Sur les 43 ATs mis en évidence dans cette population de 66 isolats, 19 n'ont encore jamais été identifiés, ce qui représente 44,18% de nouveaux ATs, pour seulement deux nouveaux SNPs mis en évidence (soit 2,47% des SNPs de l'échantillon).

**Tableau 14:** Nombre de variants alléliques pour chaque locus (les nouveaux variants sont soulignés).

Locus	Nombre d'ATs		Identification des ATs
	total	nouveau	
<i>trpB</i>	6	2	1, 2, 3, 4, <u>21</u> , <u>29</u>
<i>gyrB</i>	7	4	1, 2, 3, <u>29</u> , <u>42</u> , <u>44</u> , <u>49</u>
<i>dnaK</i>	7	4	1, 2, 10, <u>16</u> , <u>21</u> , <u>22</u> , <u>24</u>
<i>tuf</i>	8	6	2, 3, <u>25</u> , <u>39</u> , <u>41</u> , <u>47</u> , <u>48</u> , <u>49</u>
<i>fumC</i>	5	0	1, 2, 3, 5, 7
<i>murG</i>	5	1	1, 2, 3, 6, <u>20</u>
<i>atpA</i>	5	2	1, 2, 3, <u>25</u> , <u>40</u>

### 2.3.3. Identification des profils alléliques

La combinaison des ATs des 7 loci a permis de définir 15 profils alléliques ou ST (Sequence Type) dans la population analysée. L'ensemble des résultats d'ATs et STs est présenté dans le Tableau 14. Dans ce tableau est aussi indiquée leur appartenance au complexe clonal mis en évidence grâce à l'analyse e-BURST explicitée dans le paragraphe 2.4 suivant.

**Tableau 15:** Variants (AT) et profils alléliques (ST) des isolats de l'arc atlantique. Les nouveaux ATs et STs sont soulignés. in : ST compris dans le complexe clonal CC. out : ST hors du CC. Sont indiqués en rouge les isolats d'Aquitaine, en bleu ceux de Bretagne, en vert ceux des Pays de la Loire, et en violet ceux de Poitou charente.

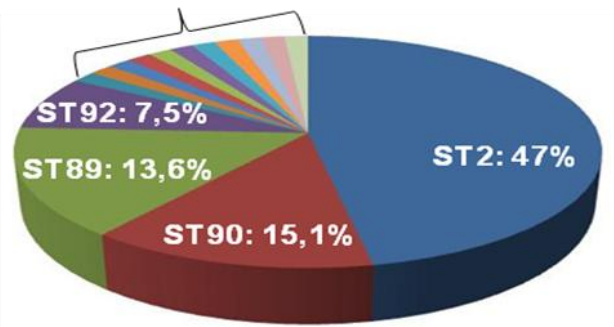
Identifiant CAE	Variants alléliques							ST	CC
	<i>trpB</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnak</i>	<i>fumC</i>	<i>murG</i>	<i>tuf</i>	<i>atpA</i>		
438	2	2	2	2	2	2	2	2	in
439	2	2	2	2	2	2	2	2	in
440	2	2	2	2	2	2	2	2	in
441	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
442	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
444	2	2	2	2	2	2	2	2	in
445	2	2	2	2	2	2	2	2	in
446	2	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>91</u>	in
448	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
449	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
737	2	2	2	2	2	2	2	2	in
738	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
739	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
740	2	2	2	2	2	2	2	2	in
742	2	2	2	2	2	2	2	2	in
743	2	2	2	2	2	2	2	2	in
744	2	2	2	2	2	2	2	2	in
746	2	2	2	2	2	2	2	2	in
747	2	2	2	2	2	2	2	2	in
749	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
755	2	2	2	2	2	2	2	2	in
756	2	<u>44</u>	<u>16</u>	3	3	3	3	<u>102</u>	out
759	2	2	2	2	2	2	2	2	in
760	1	<u>49</u>	10	7	<u>20</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>104</u>	out
802	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
05	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
806	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
807	2	2	2	2	2	2	2	2	in
808	2	2	2	2	2	2	2	2	in
810	2	2	2	2	2	2	2	2	in
811	2	2	2	2	2	2	2	2	in
812	2	2	2	2	2	2	2	2	in
814	2	2	2	2	2	2	2	2	in
816	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
817	1	1	1	2	1	<u>41</u>	1	<u>108</u>	out
818	2	2	2	2	2	2	2	2	in
820	2	2	2	2	2	2	2	2	in
822	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in
823	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
824	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
825	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
829	4	<u>29</u>	<u>24</u>	5	6	<u>49</u>	<u>40</u>	<u>113</u>	out

**Tableau 15** (suite)

Identifiant CAE	Variants alléliques								
	<i>trpB</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnak</i>	<i>fumC</i>	<i>murG</i>	<i>tuf</i>	<i>atpA</i>		
539	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in
540	4	2	2	2	2	2	2	<u>93</u>	in
591	4	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>95</u>	in
607	<u>29</u>	2	2	2	2	2	2	<u>97</u>	in
626	2	2	2	2	2	2	2	2	in
635	2	2	2	2	2	<u>48</u>	2	<u>98</u>	in
636	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
637	2	2	2	2	2	2	2	2	in
687	2	2	2	2	2	2	2	2	in
697	2	2	2	2	2	2	2	2	in
721	2	2	2	2	2	2	2	2	in
724	2	2	2	2	2	2	2	2	in
729	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
730	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
733	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in
763	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in
771	2	2	2	2	2	2	2	2	in
780	2	2	2	2	2	2	2	2	in
787	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
796	<u>21</u>	3	<u>22</u>	3	3	2	2	<u>105</u>	out
690	4	<u>42</u>	<u>21</u>	5	2	<u>39</u>	<u>40</u>	<u>99</u>	out
718	2	2	2	2	2	2	2	2	in
741	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
745	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in

Sur les 15 STs mis en évidence, 14 sont nouvellement décrits, et représentent 53% des isolats de cet échantillon. Tous les autres isolats appartiennent au ST2 déjà décrit pour *F. psychrophilum* isolé de Truite arc-en-ciel. Les fréquences des 15 STs identifiés varient de 1,51% (11 STs représentés par un unique isolat) à 46,9% pour le ST2 représentant le génotype majoritaire dans l'échantillon de 66 isolats de *F. psychrophilum*. Parmi les autres profils alléliques les plus fréquents, on retrouve ST90, ST89 et ST92, représentant de 7,5 à 15,5% de l'échantillon total. Les fréquences de chaque profil allélique sont représentées sur la Figure 18.

**ST91, ST93, ST95, ST97, ST98, ST99,  
ST102, ST104, ST105, ST108, ST113**  
11 STs, chacun à 1,5%



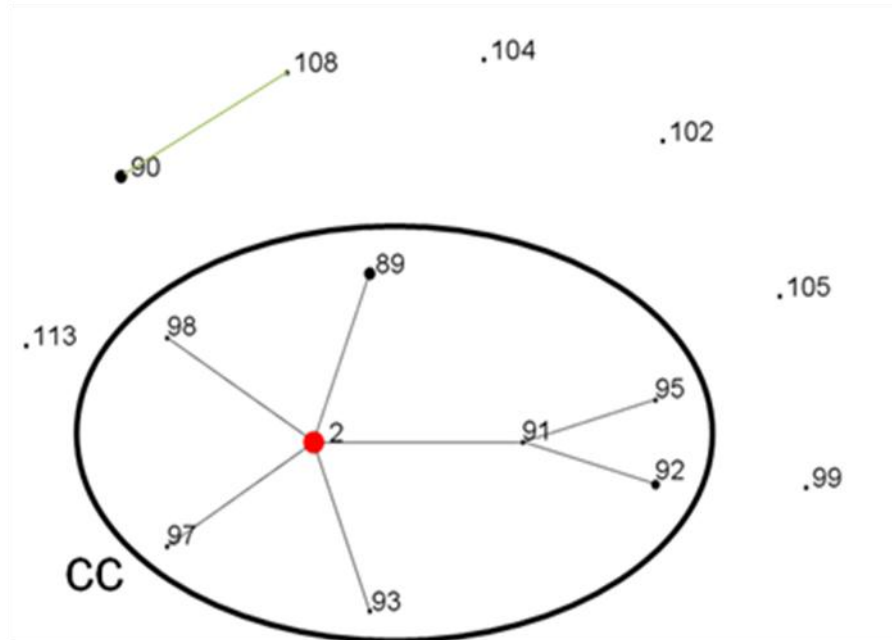
**Figure 18:** Fréquences des profils alléliques dans l'échantillon des isolats de *F. psychrophilum* de l'arc atlantique.

## 2.4. Liens évolutifs entre profils alléliques et analyse phylogénétique

La prédiction des liens évolutifs entre ces 15 STs a été étudiée grâce à la méthode de clustering e-BURST selon 2 critères de définition des génotypes liés ou proches (Feil et al, 2004). Nous avons considéré d'une part, le critère par défaut du logiciel où les génotypes liés ont en commun 6 ATs au minimum (on parle alors de Single Locus Variant ou SLV), et d'autre part, une configuration moins stricte où les profils alléliques liés partagent au minimum 5 ATs (paramètre « Double Locus Variant » ou DLV). Dans l'un ou l'autre des cas, les génotypes proches sont regroupés dans un même complexe clonal au centre duquel, se trouve le génotype ancestral supposé.

Lorsque le paramètre par défaut (SLV) a été appliqué à l'échantillon « arc Atlantique », les génotypes se répartissent en un complexe clonal CC unique composé de 8 STs (ST2, ST89, ST91, ST92, ST93, ST95, ST97 et ST98) représentant 75,7% de l'échantillon, et 7 singletons (ST90, ST99, ST102, ST104, ST105, ST108 et ST113). Cette analyse e-BURST montre que le génotype ST2 serait le potentiel ancêtre commun direct de ST89, ST93, ST97 ST98 et ST91, et indirect de ST92 et ST95 qui eux dérivent directement du génotype ST91 (Figure

19). Le paramètre DLV a permis d'observer un lien entre les génotypes ST90 et ST108 qui sont hors du complexe clonal (Figure 19).

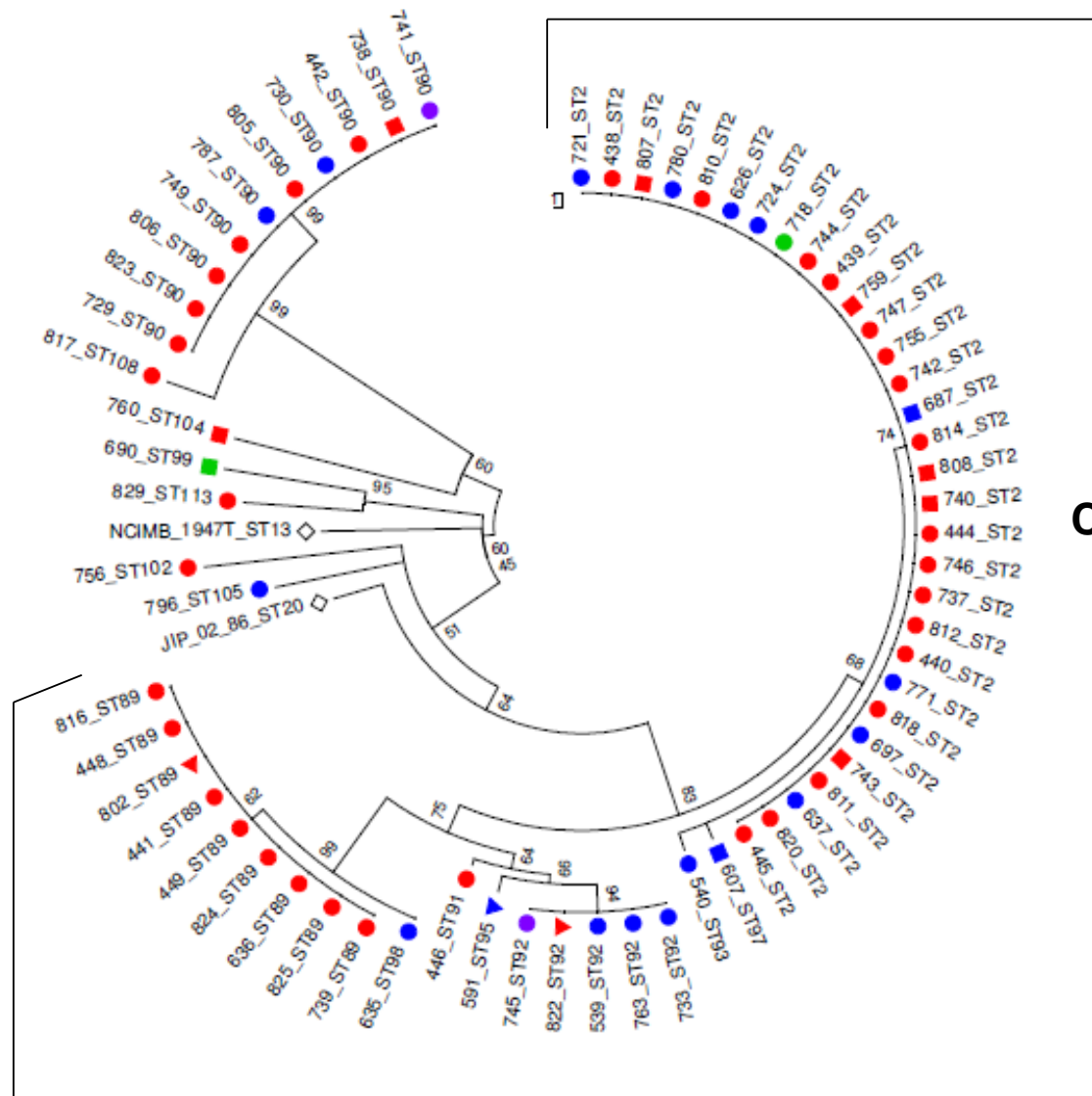


**Figure 19** : Liens évolutifs entre STs représentés sous la forme d'un diagramme e-BURST. Les STs avec 6 ATs en commun (SLV) sont reliés par un trait gris et forment un complexe clonal (CC) représenté par un cercle. Les ATs ayant 5 ATs en commun (DLV) sont reliés par un trait vert. L'importance des STs, en termes de fréquence, dans l'échantillon est représentée par la grosseur des points, et le potentiel ancêtre commun (ST2) du complexe clonal est identifié en rouge.

Les liens phylogénétiques entre les génotypes ont été observés sur un arbre phylogénétique non enraciné, construit sur la méthode du Neighbor Joining. Cet arbre a été construit à partir des séquences concaténées des 66 isolats de *F. psychrophilum* (voir Figure 20). Cet arbre présente des branches internes avec des valeurs de bootstrap relativement fortes (de 50 à 100 %), indiquant la valeur de cet arbre en termes de généalogie des séquences.

Cet arbre permet d'observer la proximité des isolats de *F. psychrophilum* dont les STs ont été regroupés au sein du complexe clonal défini par l'analyse e-BURST et du lien ST90 et ST108.





**Figure 20 :** Arbre phylogénétique circulaire des 66 isolats de *F. psychrophilum* collectés dans l’arc Atlantique français et des souches de référence JIP 02/86 et NCIMB 1947<sup>T</sup> (méthode Neighbor Joining, 1000 bootstrap). Pour chaque isolat, le ST est indiqué, un code couleur par région d’origine est appliqué (Aquitaine, Bretagne, Poitou Charente et Pays de la Loire), et la localisation des organes de provenance est indiquée par ○ (organe interne), ■ (organe externe) ou ▲ (provenance inconnue). Les isolats dont les STs appartiennent au même complexe clonal CC sont indiqués. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode du nombre de différences et sont dans les unités du nombre de substitutions de base par site.

## 2.5. Analyse des évènements de recombinaison et structure de population

### 2.5.1. Test PHI

Ce test est conduit sur l'alignement des séquences par locus et pour l'ensemble des séquences concaténées. La valeur de la p-value du test inférieure à 0,05 ( $p = 5,35 \times 10^{-9}$ ) pour l'ensemble des séquences concaténées de l'échantillon « arc Atlantique » a permis de démontrer que pour cet échantillon, des évènements de recombinaison ont bien eu lieu. D'après ce test, les évènements de recombinaisons ont concerné les loci *trpB*, *gyrB*, *dnaK* et *atpA* ( $p < 0,05$ ) (voir Tableau 16).

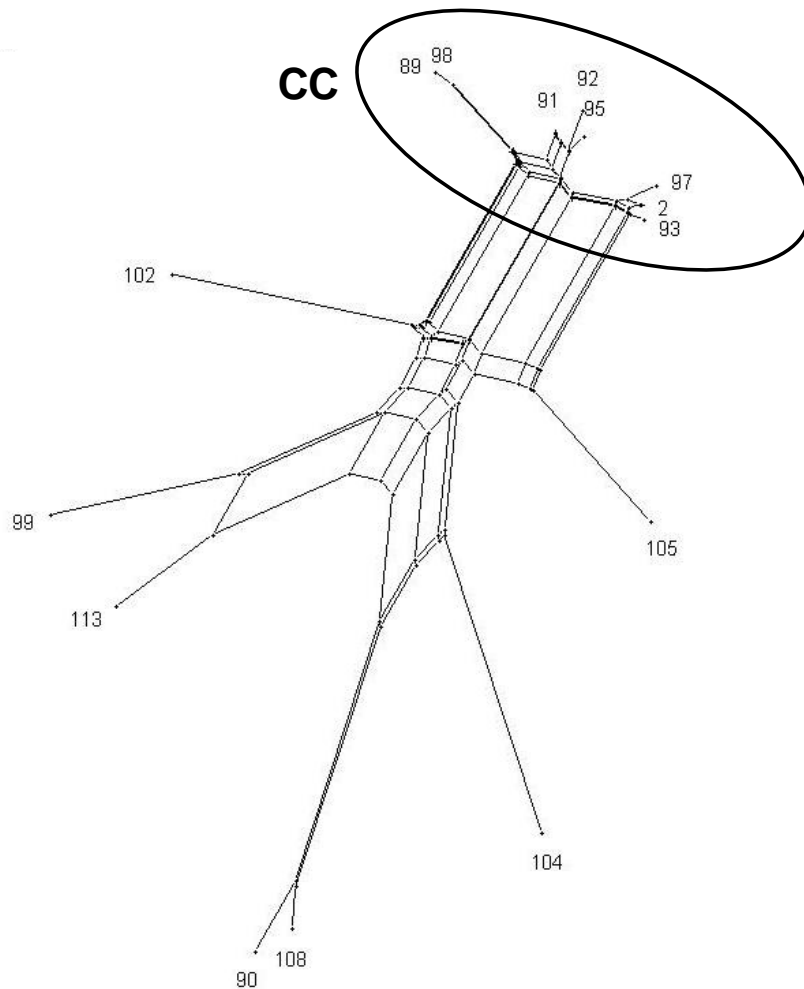
**Tableau 16:** Résultats du test PHI obtenus pour chaque locus et pour la séquence concaténée.

<i>Locus</i>	<i>PHI test p-value</i>
<i>trpB</i>	0,022*
<i>gyrB</i>	0,008*
<i>dnaK</i>	0,041*
<i>tuf</i>	0,806
<i>fumC</i>	1
<i>murG</i>	0,102
<i>atpA</i>	0,001*
Séquences concaténées	$5.35 \times 10^{-9}$

\* Traces de recombinaison statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ).

### 2.5.2. Analyse « Split Decomposition »

L'analyse des séquences concaténées des 15 STs par « split decomposition » a permis d'observer une structure phylogénétique réticulée (Figure 21). Cette structure composée de parallélogrammes représentant les relations entre ces STs, indique la survenue d'évènements de recombinaison. Les STs regroupés au sein du même complexe clonal par l'analyse e-BURST sont retrouvés également groupés dans l'analyse « split decomposition ».

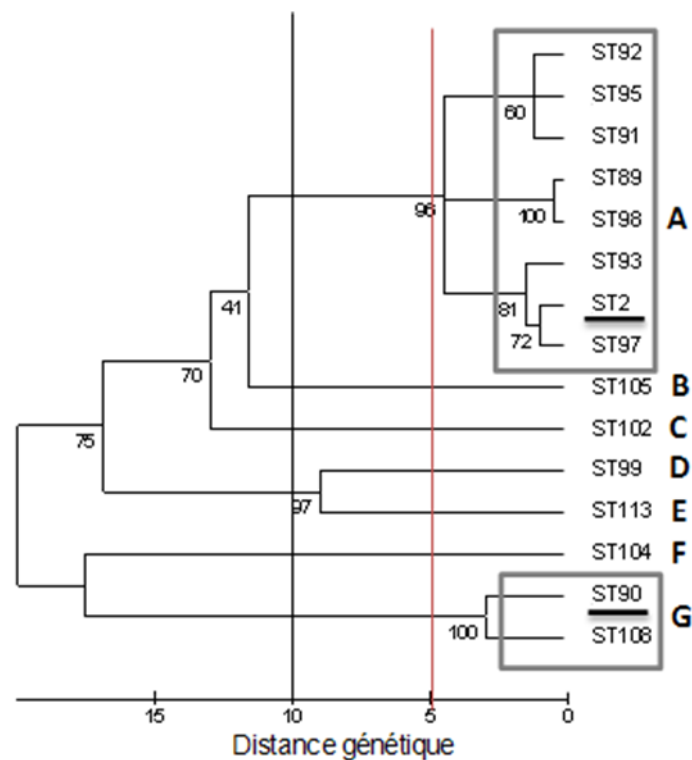


**Figure 21:** Analyse de « split decomposition » des STs retrouvés dans l’arc Atlantique français. Les STs appartenant au complexe clonal CC sont encerclés.

### 2.5.3. Indice d’association standardisé et structure de population

La valeur  $I_A^S$  pour les 66 isolats de *F. psychrophilum* significativement différente de 0 ( $I_A^S = 0,6088$ ,  $p < 0,05$ ) indique que les allèles sont en fort déséquilibre de liaison. La valeur  $I_A^S$  pour les 15 STs ( $I_A^S = 0,4567$ ,  $p < 0,05$ ) est plus faible que pour l’ensemble des données des 66 isolats, ce qui semble démontrer que les événements de recombinaison n’ont pas une forte incidence sur le lien entre les allèles et attester une possible structure clonale de la population de *F. psychrophilum*. Toutefois, lorsqu’on procède à la clusterisation de STs

proches selon une distance génétique maximum de 5 (pour faire apparaître les clusters de STs proches tels que décrits selon le critère DLV dans l'analyse e-BURST, cf. paragraphe 2.1) sur un arbre phylogénétique, tel qu'indiquée sur la Figure 22, la valeur de  $I_A^S$  devient significativement proche de 0 ( $I_A^S = 0,084$ ,  $p > 0.05$ ). La clusterisation a fait disparaître le déséquilibre de liaison, indiquant ainsi que des événements de recombinaison se produisent, et que la population de *F. psychrophilum* analysée ici s'avère être de type épidémique. Ce même résultat est reproduit lorsqu'on considère une distance génétique maximum de 10 ( $I_A^S = 0,0088$ ,  $p > 0.05$ ) (Figure 22).

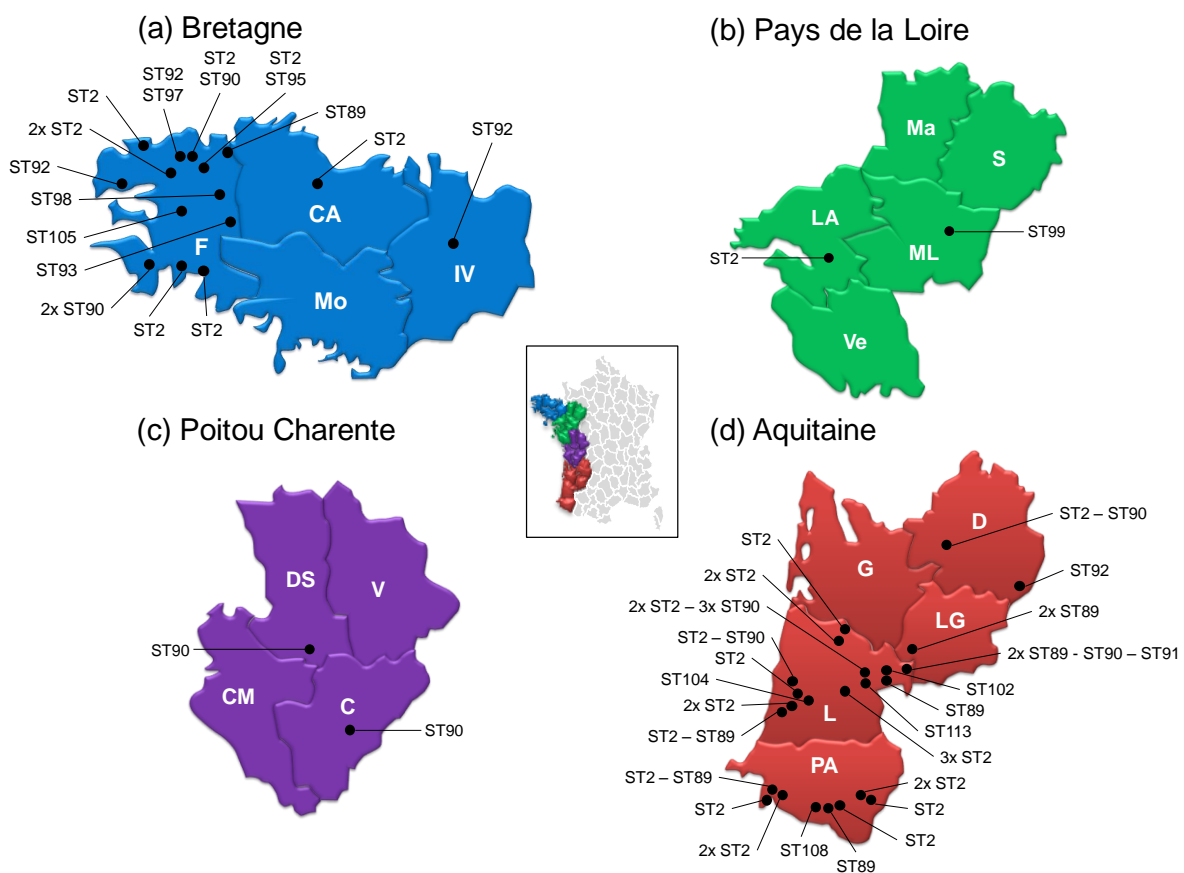


**Figure 22:** Clusterisation des 15 STs selon leur distance génétique. Ici sont représentées les relations phylogénétiques entre les STs d'après la méthode du Neighbor Joining. Les différents clusters, choisis d'après une distance génétique maximum de 5 entre les séquences concaténées représentatives de chaque ST, sont indiqués par des lettres (A à G). Les séquences concaténées choisies pour le calcul de l' $I_A^S$  dans les clusters A et G sont soulignées.

## 2.6. Répartition géographique des isolats

De l'arbre phylogénétique des 66 isolats de *F. psychrophilum* (Figure 20) on n'observe aucune organisation en cluster selon la région de collecte. Des profils alléliques très divers peuvent coexister dans une même région et des profils alléliques identiques exister dans plusieurs régions. En effet, les 4 génotypes identifiés chez plus d'un isolat sont présents dans au moins deux des régions de collecte (ST2, ST89, ST90 et ST92).

La Figure 23 fournit une représentation plus détaillée des régions de collecte et des génotypes identifiés.



**Figure 23:** Répartition géographique des profils alléliques (STs) selon les régions. Dans chaque région, les STs sont indiqués selon les départements. Bretagne : Côte d'Armor (CA), Ile et Vilaine (IV), Morbihan (Mo) et le Finistère (F). Pays de la Loire : Loire Atlantique (LA), Mayenne (Ma), Sarthe (S), Maine et Loire (ML) et Vendée (Ve). Poitou Charente : Deux Sèvres (DS), Vienne (V), Charente (C) et Charente-Maritime (CM). Aquitaine : Dordogne (D), Lot et Garonne (LG), Landes (L), Gironde (G) et des Pyrénées-Atlantiques (PA).

Sur cette figure, on peut voir que plusieurs prélèvements ont été réalisés sur un même site et ce pour un total de 17 sites. Pour 9 de ces sites, des STs différents ont été identifiés aux différentes époques de collecte. Pour les 8 autres sites, le ST2 est retrouvé plusieurs fois (7 sites). Pour deux sites, les STs 89 et 90 sont retrouvés aux deux périodes de collecte. Dans 94% de ces sites (soit 16/17), au moins un ST compris dans le complexe clonal a été retrouvé, majoritairement ST2 (retrouvé dans 82% des sites, soit 14/17).

L'absence de répartition géographique des STs a été confirmée par un test exact de Fisher où en raison de son abondance, seule la structure géographique du profil allélique ST2 dans les 4 régions analysées a été testée. Le test exact de Fisher a permis de démontrer de manière statistiquement significative ( $P > 0,05$ ) que cette structure géographique était inexistante.

## **2.7. Répartition par organe interne/externe**

La répartition des profils alléliques par organe interne et externe a été recherchée afin d'observer si certains profils alléliques étaient préférentiellement associés à une localisation particulière au niveau du poisson. Cette recherche pourrait être utile dans la mise au point de méthodes de lutte (vaccin par exemple), dans l'hypothèse que les profils retrouvés en majorité en interne seraient potentiellement virulents.

La diversité et la répartition des profils alléliques par organes interne et externe, ainsi que leur nombre et appartenance au complexe clonal sont représentés dans le Tableau 17. Celui-ci permet d'observer la présence de profils alléliques divers à la fois en interne et en externe (résultat visible aussi sur la Figure 20), même si la diversité génétique des isolats semble plus grande pour les isolats prélevés sur organes externes (branchies principalement). En effet, 6 STs sont identifiés pour 11 isolats prélevés sur organes externes, contre 10 STs pour 52 isolats prélevés sur les organes internes (Tableau 17).

Les fréquences en interne et en externe du ST2 qui est le profil majoritaire dans cette étude, sont comparables : on retrouve 54,5% des isolats « externes » contre 48% des isolats « internes ». On peut aussi remarquer que les profils alléliques ST89 et ST92 n'ont été retrouvés que dans les organes internes (respectivement 8 et 4 isolats). Le profil allélique ST90 est retrouvé très majoritairement en interne (9 isolats / 10).

**Tableau 17:** Répartition des STs par organe.

	<b>ST</b>	<b>CC</b>	<b>Nombre</b>
Organe externe	ST2	in	6
	ST90	out	1
	ST97	out	1
	ST99	out	1
	ST104	out	1
	ST113	out	1
Organe interne	ST2	in	25
	ST89	in	8
	ST90	out	9
	ST91	in	1
	ST92	in	4
	ST93	in	1
	ST98	in	1
	ST102	out	1
	ST105	out	1
ST108	out	1	

Un test exact de Fisher a été réalisé pour observer la répartition des profils alléliques, en fonction de leur appartenance au complexe clonal, dans les organes interne et externe. Pour la réalisation de ce test un seul représentant de chaque profil allélique a été pris en compte. Ce test montre qu'il n'y a pas de répartition interne/externe significative en fonction de l'appartenance au complexe clonal ( $P > 0.05$ ).

### Résumé

*L'analyse de la variabilité génétique d'isolats de F. psychrophilum collectés sur l'arc Atlantique à partir de poissons présentant des signes cliniques de la maladie met en avant la présence d'un complexe clonal dominant dans la représentation des échantillons et la présence d'un ST ancestral (ST2). Cette analyse ne permet pas de mettre en avant une structure géographique des variants génétiques ni une structure basée sur l'organe de prélèvement.*

*Les résultats présentés dans cette partie font l'objet d'une publication parue dans la revue Veterinary Microbiology en 2012 :*

*C. Siekoula-Nguedia, G. Blanc, E. Duchaud, S. Calvez, Genetic diversity of Flavobacterium psychrophilum isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex, Veterinary Microbiology, Available online 20 July 2012, ISSN 0378-1135, 10.1016/j.vetmic.2012.07.022.*

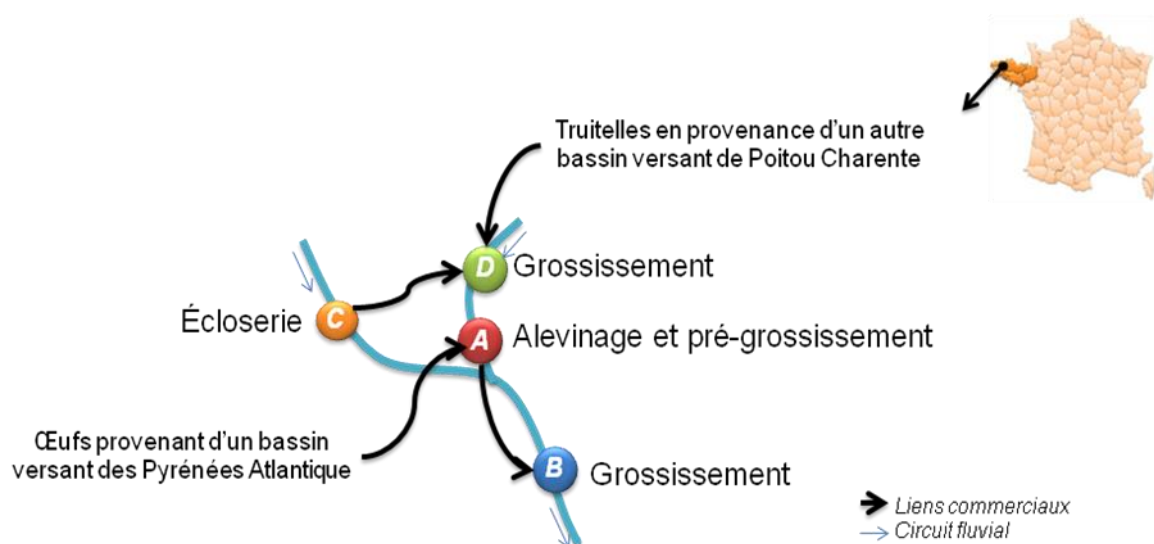
*Après avoir obtenu une image de la variabilité génétique de F. psychrophilum en France, par MLST et représenté par un échantillonnage réalisé dans les régions majoritairement productrices situées sur l'arc Atlantique, nous avons souhaité travailler sur la variabilité de cette même bactérie mais à une échelle plus réduite, un bassin versant. Nous avons voulu également comparer deux techniques d'étude de la variabilité, la MLST et la PFGE, afin de savoir laquelle était la plus résolutive sur l'analyse d'isolats proches géographiquement et temporellement.*



### 3. Etude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* dans un bassin versant français par la méthode PFGE

#### 3.1. Description du site d'étude, suivi des lots de poissons et isolement de *F. psychrophilum*

Les isolats de cette étude ont été collectés mensuellement sur 4 sites piscicoles situés dans un même bassin versant de Bretagne, pendant un an (voir paragraphe 2.4 du Chapitre II, et rappel de la Figure 13 ci-dessous).



**Figure 13** : Positionnement des piscicultures et liens commerciaux. Les sites sont indexés par une lettre (A à D) et ne sont séparés entre eux par aucune pisciculture. Les sites C et D sont situés en début de rivière, sans aucune autre pisciculture en amont.

Pour chaque pisciculture, plusieurs lots de poissons ont été suivis (Tableau 18) : 10 sur le site A (lots *a, b, c, d, e, l, m, n, o* et *p*), 4 sur le site B (*f, g, m* et *a*), 2 sur le site C (*h* et *i*) et 2 sur le site D (*j* et *k*). Un lot a été retrouvé simultanément sur le site A où il est noté lot *c*, et sur le

site B où il est noté lot *f*. Deux autres lots ont été transférés du site A vers le site B : lot *a* transféré en septembre et le lot *m* transféré au mois de décembre 2011. Ces transferts interviennent en fonction de l'avancée du développement des poissons, A étant un site d'alevinage - pré-grossissement et B un site de grossissement. Sur le site C, des échantillonnages à la fois sur les œufs et sur les fluides sexuels (liquide cœlomique et laitance mâle) de quelques géniteurs ont été réalisés.

Seuls trois lots de poissons ont pu être suivi sur les douze mois de l'étude, les lots *a* (réparti sur 2 sites : A et B), *h* et *i* (sur le site C) (cf Tableau 18). Les autres lots ont été suivis selon leur durée de présence sur site (avant transfert, vente... etc).

Le suivi de lot *a* permis d'observer les différents stades de développement du poisson classés comme suit: alevin (de 0 à 50g), truitelle (50 à 200g), portion (200 à 300g) et adulte (> 300g). Tous ces stades ont pu être observés pour les lots *h* et *i* du site C. Sur les sites A et B n'étaient présents que les stades alevins à portion, et sur le site D seuls les poissons adultes étaient présents. La représentation des différents stades d'élevage sur les sites est dépendante des débouchés commerciaux de chaque site.

**Tableau 18:** Lots de poissons par site, suivis pour l'étude de variabilité génétique de *F. psychrophilum* dans un bassin versant. Pour chaque lot, le poids moyen (en g) des poissons prélevés par mois est donné, ainsi que les stades de développement alevin (en jaune), truitelle (orangé clair), portion (orangé foncé) et adulte (en rouge).

Sites	Lots	Dates de prélèvement												
		mars 2011	avril 2011	mai 2011	juin 2011	juil 2011	août 2011	sept 2011	oct 2011	nov 2011	dec 2011	janv 2012	fev 2012	mars 2012
Site A	a	0,3	2,7	6,4	13,9	23,9								
	b	4,8	9,4	17,4	30,9	67,2		189,38	168,7	275				
	c=f	139,8	140,9	286,5	220,7	249,6								
	d	251,4												
	e		0,4	2	6,9	12,7		61,2	87,9	126,1	146,6	218,4	202,4	242,8
	l							1	2,9	16,6				
	m							3,2	12,2	20,9				
	n											93,5	169,3	193,7
	o											32,3	52,9	76,2
	p											4,2	7,2	9,9
Site B	f=c	67,7	152,9	168,3	182,8	121,8		119,2	195,9					
	g	256,2	264,1											
	a							62,7	83,3	131,7	156,8	201,3	381,3	467,8
	m										31,8	62,5	63,4	101
Site C	h	4,9	8,9	16,5	38,9	78,7		214,4	260	363	464,2	469,4	871	1034
	i	4,93	13	24,6	38,6	70,33		173,8	198,3	334,2	515,7	610,8	854,1	1095,9
Site D	k	678,6	754,9	NR*	830,9	1164,2		1085,8	NR	1135,6	967,5	1229,5	1044,8	1581,7
	j	698,7	758,1	NR	1025,2	1162,6								

\* NR : non réalisé

### **3.2. Prévalence d'infection des poissons et résultats des dénombrements au cours de l'année**

Chaque mois et pour chaque lot suivi, 15 poissons ont été analysés. Pour chaque poisson analysé, les colonies résultant de cultures à parir de rate (10 au maximum / poisson) et de branchies (10 au maximum / poisson) ont été sélectionnées sur critères phénotypiques (allure des colonies, Gram -, catalase + et flexirubine +), et l'identité des isolats a été confirmée par PCR duplex des gènes *gyrA* et *gyrB*.

Le nombre de poissons infectés par *F. psychrophilum* enregistrés chaque mois sur chaque site est présenté dans le Tableau 18. Dans l'ensemble de l'étude, le nombre de poissons infectés (104) ne représente que 6,73% des poissons analysés (1545 au total).

La prévalence de truites infectées est plus importante dans le site B où elle s'élève à 14% (42 / poissons infectés / 300 analysés). Les prévalences de poissons infectés sont comparables pour les sites A et D, avec respectivement une prévalence de 6,96% (47 poissons infectés / 675 analysés) et 4,7% (10 poissons infectés / 210 analysés). Le site C se démarque par sa prévalence très faible (1,4% soit 10 poissons infectés / 360 analysés).

**Tableau 19:** Nombre de poissons infectés par *F. psychrophilum* analysés par site et par mois. Le nombre total de poissons analysés par mois étant variable selon le site, celui-ci est indiqué selon un code couleur : rouge bordeaux pour 60 poissons analysés, rouge pour 30 et orangé pour 15.

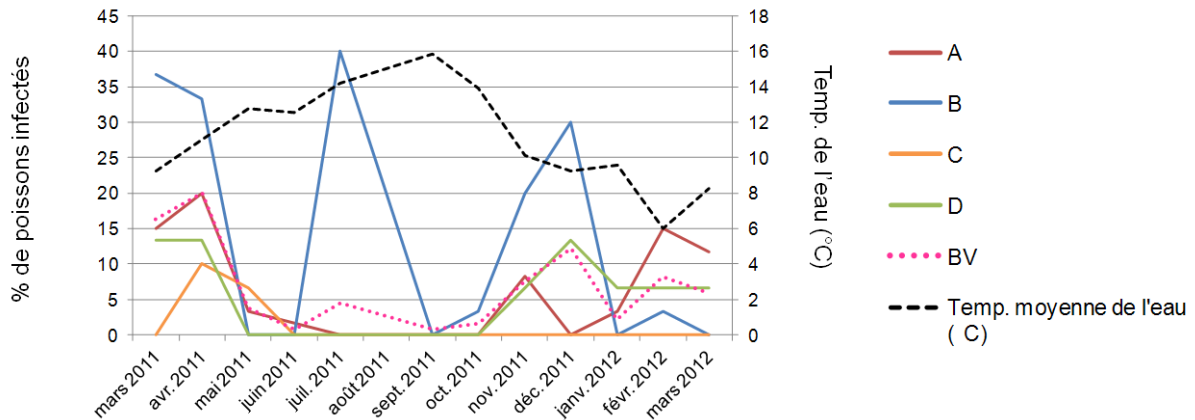
Dates de prélèvement	Sites piscicoles				Prévalence par mois sur les 4 sites	Temp. moyenne de l'eau (°C)
	A	B	C	D		
<i>mars 2011</i>	9	11	0	2	14,7% (22/150)	9,25
<i>avr 2011</i>	12	10	3	2	18% (27/150)	11
<i>mai 2011</i>	2	0	2	NR	3,8% (4/105)	12,75
<i>juin 2011</i>	1	0	0	0	0,7% (1/135)	12,56
<i>juil 2011</i>	0	6	0	0	4,4% (6/135)	14,18
<i>sept 2011</i>	0	0	0	0	0 (0/135)	15,87
<i>oct 2011</i>	0	1	0	NR	0,8% (1/120)	13,91
<i>nov 2011</i>	5	3	0	1	7,5% (9/120)	10,12
<i>déc 2011</i>	0	9	0	2	12,2% (11/90)	9,25
<i>janv 2012</i>	2	0	0	1	2,2% (3/135)	9,56
<i>févr 2012</i>	9	1	0	1	7,4% (10/135)	6
<i>mars 2012</i>	7	0	0	1	5,2% (7/135)	8,23
Total	47	42	5	10		
Prévalence par site	6,9% (47/675)	14% (42/300)	1,4% (5/360)	4,7% (10/210)		

L'évolution du pourcentage de poissons infectés au cours du temps est représentée sur la Figure 24. Bien que l'allure générale des courbes ne montre pas une évolution uniforme du nombre de poissons infectés sur les différents sites, on peut observer une tendance globale à la diminution de ce pourcentage entre mars et juillet 2011, puis une augmentation dès le mois de novembre 2011. Cette tendance concerne plus précisément les sites A, C et D. L'évolution de la prévalence des poissons infectés sur l'ensemble du bassin versant est aussi indiquée sur la Figure 24.

Sur la période de l'étude, la température moyenne de l'eau sur l'ensemble des sites a varié entre 4 et 16,5°C le matin, et entre 6 et 17°C en soirée. L'évolution de la température moyenne de l'eau par mois de l'ensemble des sites, est représentée sur la Figure 24.

Après les mois de mars 2011 et avril 2011 où le pourcentage de poissons infectés augmente en même temps que la température (de 15 à 20%), pour tout le reste de la période d'étude, ce pourcentage diminue lorsque la température augmente, et augmente lorsque la température

diminue. La prévalence de poissons infectés semble donc liée à l'évolution de la température de l'eau, les prévalences les plus élevées étant souvent observées quand la température de l'eau est basse. Un pic est cependant observé pour le site B durant la période estivale où la température de l'eau est proche du maximum mesuré dans notre étude (Figure 24). Ceci peut être lié à d'autres phénomènes météorologiques, comme les variations brutales de pression atmosphérique lors d'orage ou d'un fort charriage de la rivière lors de fortes précipitations.



**Figure 24 :** Evolution du pourcentage de poissons infectés par site piscicole dans un bassin versant breton, et évolution des températures moyennes.

Les prévalences des poissons infectés par stade de développement du poisson sont détaillées dans le Tableau 19. Le stade le plus porteur de la bactérie est le stade truitelle avec 12,70% d'infectés, suivi du stade alevin (5,40%), puis du stade adulte (2,77%), et enfin du stade portion (2,05%).

**Tableau 20:** Prévalence de poissons infectés en fonction du stade de développement.

<b>Stade</b>	<b>Pourcentage de poissons infectés (Nb infectés / Nb analysé)</b>
Alevin	5,40% (26 / 480)
Truitelle	12,70% (61 / 480)
Portion	2,05% (4 / 195)
Adulte	2,77% (10 / 360)

A partir de ces poissons infectés, un certain nombre d'isolats ont été collectés. Les résultats des dénombrements totaux des isolats de *F. psychrophilum* par site et par mois sont présentés dans le Tableau 21. Le nombre d'isolats est fortement variable entre site, en effet 160 isolats sur la durée de l'étude ont été collectés sur le site A contre 10 pour le site C (cf Tableau 21). La période de prélèvement semble également avoir une incidence sur le nombre d'isolats obtenus, avec un nombre d'isolats de 72 collectés sur la période printemps 2011 (avril-mai-juin), de 12 pour la période été (juillet-septembre), de 37 pour la période automne (octobre-novembre-décembre) et de 102 pour la période hiver 2012 (janvier-février-mars). Il faut rappeler qu'il n'y a pas eu de collecte pour le mois d'août, ce qui influence également le faible nombre d'isolats collectés en été.

**Tableau 21:** Nombre d'isolats de *F. psychrophilum* isolés par mois sur chaque site piscicole. (isolats PCR *gyrA/gyrB* +).

Dates de prélèvement	Sites piscicoles				Total
	A	B	C	D	
mars 2011	35	25	0	2	62
avr 2011	34	13	6	2	55
mai 2011	3	0	4	0	7
juin 2011	10	0	0	0	10
juil 2011	0	12	0	0	12
sept 2011	0	0	0	0	0
oct 2011	0	1	0	0	1
nov 2011	6	3	0	1	10
déc 2011	0	24	0	2	26
janv 2012	20	0	0	9	29
févr 2012	30	1	0	10	41
mars 2012	22	0	0	10	32
Total	160	79	10	36	285

### Résumé

*L'échantillonnage de F. psychrophilum sur le bassin versant a permis d'observer du portage sain chez les truites arc-en-ciel. Ce portage concerne majoritairement les stades truitelle et alevins des poissons et varie fortement d'un site piscicole à l'autre et la prévalence d'infection évolue avec les températures (lorsque les températures augmentent, elle diminue et inversement).*

Notre échantillon, collecté sur ces 4 sites de production d'un même bassin versant, nous a permis de travailler sur la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à différentes échelles :

- à l'échelle d'un poisson
- à l'échelle d'un site de production
- à l'échelle d'un bassin versant

### **3.3. Etude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum*, collectés dans un bassin versant, par la méthode PFGE**

#### **3.3.1. Variabilité génétique à l'échelle d'un poisson**

Les objectifs scientifiques de cette analyse sont :

- 1- de mettre ou non en évidence la présence de co-infections par des isolats génétiquement différents de *F. psychrophilum* chez un même poisson.
- 2- de déterminer si les isolats présents sur les organes de surface (branchies) sont génétiquement identiques à ceux qui ont envahi les organes internes (rate)
- 3- de comparer pour un même poisson la diversité des isolats prélevés sur les branchies (au contact avec le milieu environnant) avec celle des isolats collectés à partir de la rate (représentant ceux capables d'envahir le poisson et peut être plus virulents).

Pour atteindre cet objectif, plusieurs isolats ont été collectés sur chaque poisson selon les modalités suivantes : au moins 2 isolats prélevés sur une même branchie, au moins 2 isolats prélevés sur la même rate, au moins 1 isolat dans les branchies et 1 isolat dans la rate.

##### **3.3.1.1. Bilan et origine des isolats collectés pour cette analyse**

Au total, 28 truites remplissant une ou plusieurs des conditions énoncées ci-dessus sont rentrées dans cette étude. Le nombre de poissons répondant aux critères n'est pas identique en fonction des sites étudiés. Ainsi, nous avons 12 poissons provenant du site A (98 isolats de



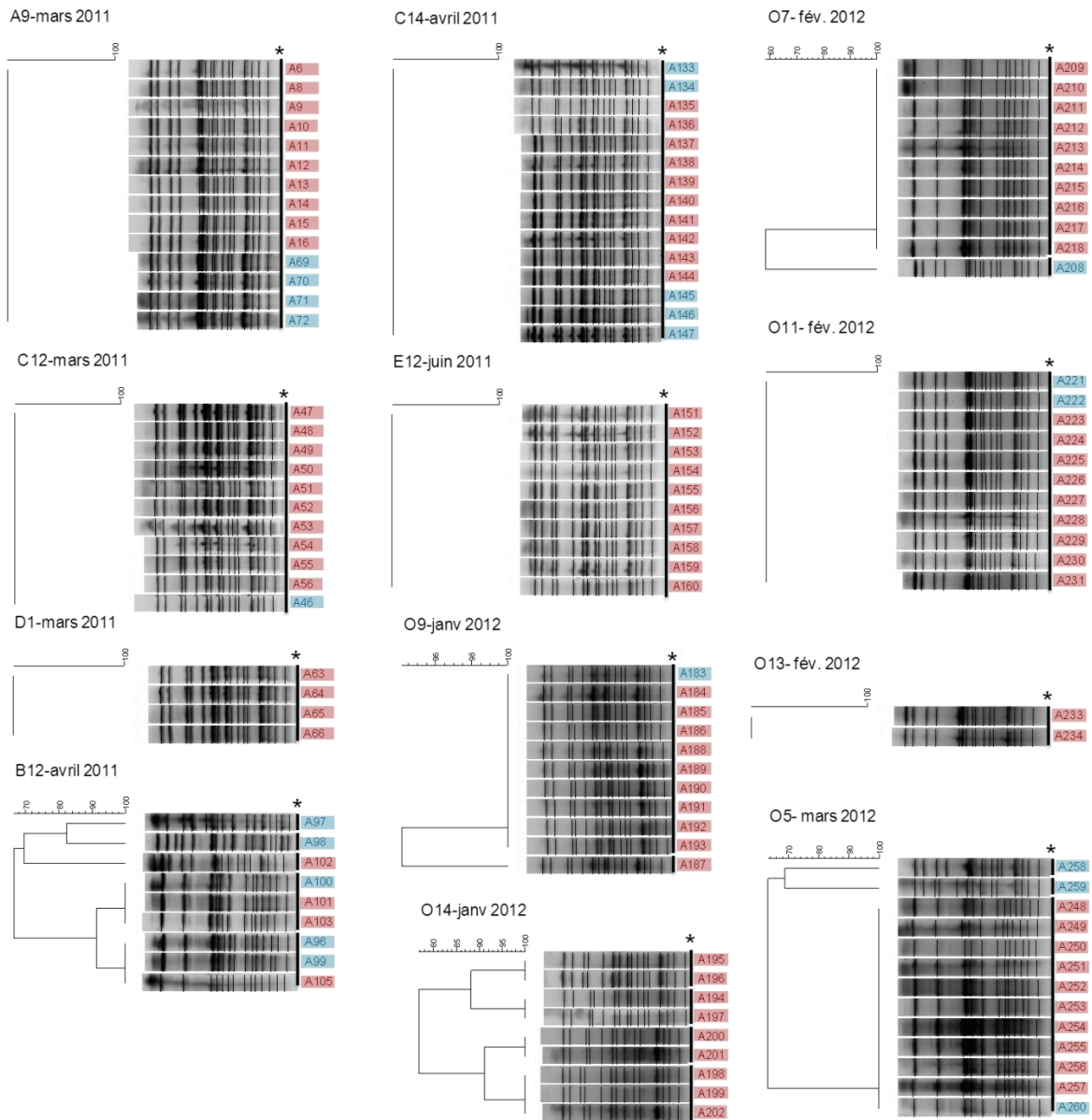
rate, 22 isolats de branchies), 12 du site B (26 isolats de rate, 22 isolats de branchies), un seul pour le site C (6 isolats de rate, 0 isolat de branchies) et 3 pour le site D (30 isolats de rate, aucun isolat de branchies). Pour cette étude, 160 isolats issus de rate et 44 isolats issus de branchies ont donc été collectés, soit un total de 204 isolats pour 28 poissons. Ces isolats sont collectés majoritairement sur truitelles (18 poissons et 111 isolats), mais aussi sur alevins (6 poissons et 59 isolats), adultes (3 poissons et 30 isolats) et portion (1 poisson et 4 isolats). Les détails sur l'origine des isolats collectés, ainsi que le nombre de pulsotypes obtenus à l'aide du logiciel BioNumerics sont décrits dans le Tableau 22.

**Tableau 22:** Origine des poissons (site, lot, numéro, mois, stade du poisson), nombre d'isolats collectés par organe (rate/branchie) et nombre de pulsotypes différents observés. Al : Alevin ; T : Truitelle ; P : Portion ; Ad : Adulte. Les résultats de pulsotypes sont indiqués par un code couleur : un seul pulsotype par rate, plusieurs pulsotypes par rate, un seul pulsotype par branchie, plusieurs pulsotypes par branchie, pulsotypes tous identiques entre rate et branchie, pulsotypes tous différents entre rate et branchie, pulsotypes communs entre rate et branchie. Les cases laissées en blanc ne peuvent rentrer dans l'analyse par manque d'isolats.

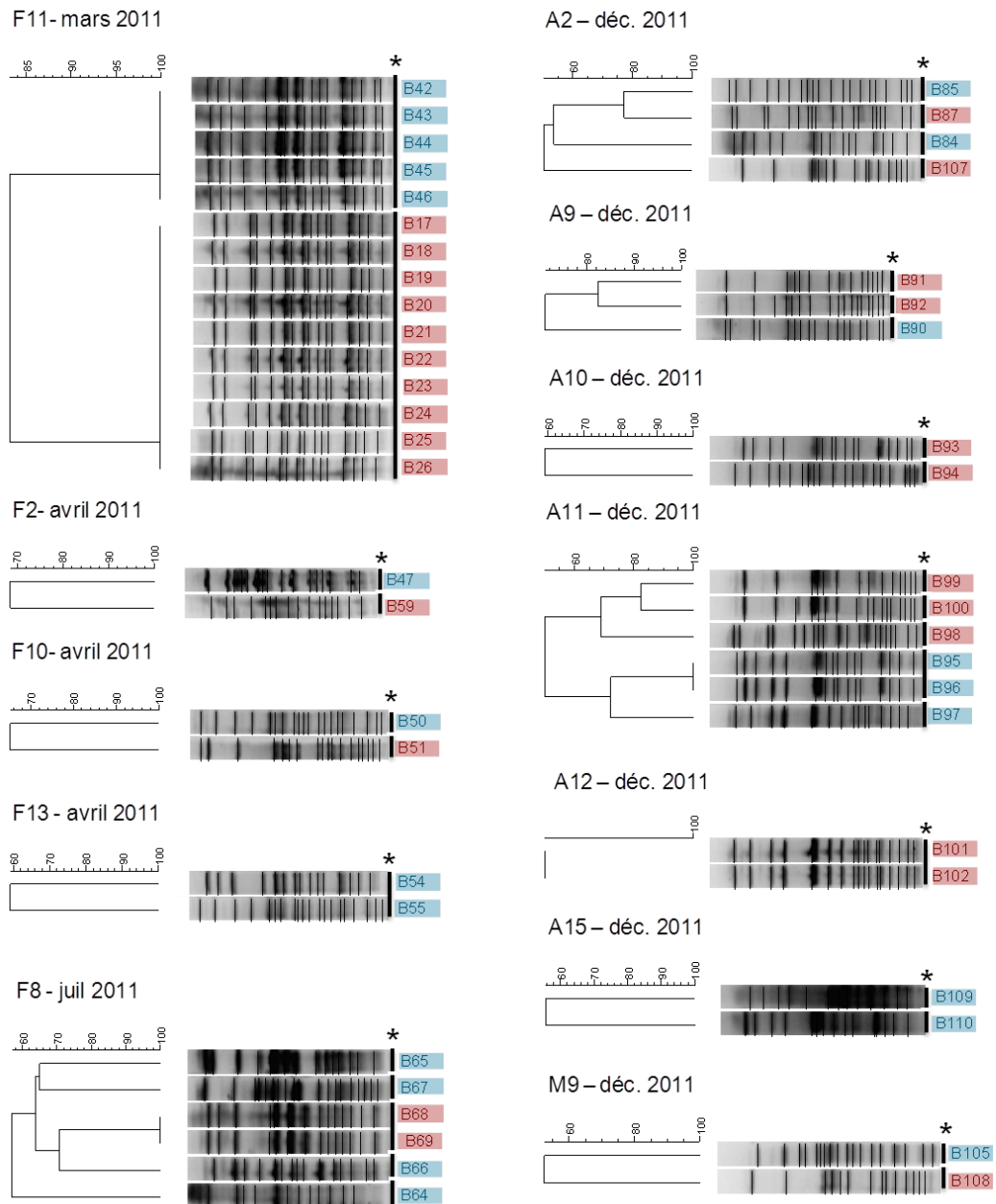
Site	Lot	Poisson	Date	Stade	Nb d'isolats de rate	Nb de Pulsotypes de rate	Nb d'isolats de branchie	Nb de Pulsotypes de branchie	Nb total de Pulsotypes
A	a	9	Mars-11	Al	10	1	4	1	1
	b	12	Avril-11	Al	4	3	5	4	5
	c	12	Mars-11	T	10	1	1	1	1
		14	Avril-11	T	10	1	5	1	1
	d	1	Mars-11	P	4	1	0	/	1
	e	12	Juin-11	Al	10	1	0	/	1
	o	9	Janv-12	Al	10	1	1	1	1
		14	Janv-12	Al	9	4	0	/	4
		7	Fév-12	T	10	1	1	1	2
		11	Fév-12	T	9	1	2	1	1
		13	Fév-12	T	2	1	0	/	1
5		Mars-12	T	10	1	3	3	3	
B	a	2	Déc-11	T	2	2	2	2	4
		9	Déc-11	T	2	2	1	1	3
		10	Déc-11	T	2	2	0	/	2
		11	Déc-11	T	3	3	3	2	5
		12	Déc-11	T	2	1	0	/	1
		15	Déc-11	T	0	/	2	1	1
	f	11	Mars-11	T	10	1	5	1	2
		2	Avril-11	T	1	1	1	1	2
		10	Avril-11	T	1	1	1	1	2
		13	Avril-11	T	0	/	2	2	2
		8	Juillet-11	T	2	1	4	4	5
m	9	Déc-11	Al	1	1	1	1	2	
C	h	11	Avril-11	Al	6	1	0	/	1
D	k	15	Janv-12	Ad	10	1	0	/	1
		12	Fév-12	Ad	10	1	0	/	1
		14	Mars-12	Ad	10	1	0	/	1

### 3.3.1.2. Analyse PFGE des isolats collectés

Pour chacun de ces 28 poissons, les profils PFGE obtenus pour les isolats collectés (rate et branchies) sont présentés sur les Figures 25 (site A), 26 (site B) et 27 (sites C et D). Le code attribué à chaque poisson correspond à la lettre du lot et au numéro de poisson autopsié (1 à 15), associé au mois de prélèvement.



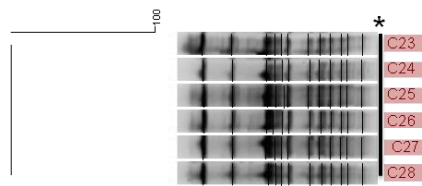
**Figure 25 :** Comparaison des profils des isolats de *F. psychrophilum* sélectionnés pour l'étude de variabilité génétique à l'échelle d'un poisson, échantillonnés sur le site A. \* Chaque pulsotype est représenté par un trait continu. Les isolats de rate sont surlignés en rouge et les isolats de branchies, en bleu.



**Figure 26 :** Comparaison des profils des isolats de *F. psychrophilum* sélectionnés pour l'étude de variabilité génétique à l'échelle d'un poisson, collectés sur des truites du site B. \* Chaque pulsotype est représenté par un trait continu. Les isolats de rate sont surlignés en rouge et les isolats de branchies, en bleu.

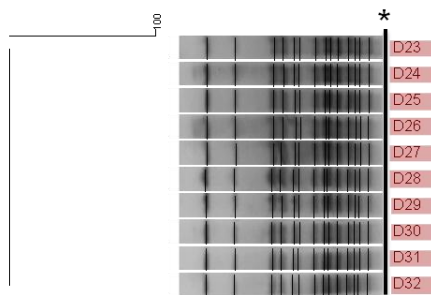
## Site C

H11 – avril 2011

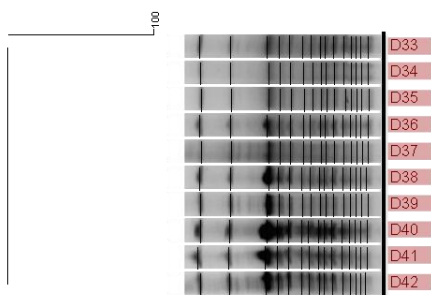


## Site D

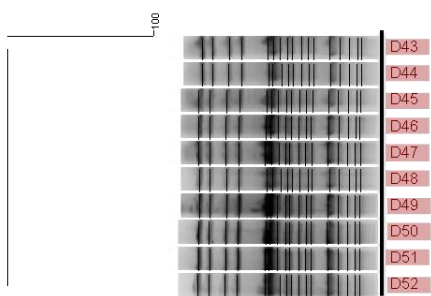
K15 – janv. 2012



K12 – fév. 2012



K14 – mars 2012



**Figure 27:** Comparaison des profils des isolats de *F. psychrophilum* sélectionnés pour l'étude de variabilité génétique à l'échelle d'un poisson, collectés sur les sites C et D. \* Chaque pulsotype est représenté par un trait continu. Les isolats de rate sont surlignés en rouge et les isolats de branchies, en bleu.

Les résultats des comparaisons de la diversité des pulsotypes isolats « rate » et des pulsotypes isolats « branchies » sont indiqués dans le Tableau 23 ci dessus.

Pour une majorité des poissons de cette étude (74% - 17/23 analysables), les isolats de rate présentent tous le même pulsotype (Tableau 23). Le nombre d'isolats analysés par rate est assez élevé (moy de 7,9), et pour 11 poissons sur les 17, 10 isolats différents/rate ont pu être typés et trouvés génétiquement non différenciables. Pour 26% des truites analysées (6/23), la présence de co-infections par des isolats génétiquement différents a été démontrée dans la rate. Le nombre d'isolats analysés par rate dans ces 6 cas est plus faible (3,6 isolats/rate en moyenne) que dans le cas précédent, et pour 4 poissons/6, tous les isolats analysés ont présenté des pulsotypes différents. A partir d'une même rate, la présence d'isolats de 4 pulsotypes différents a été démontrée.

Le nombre total d'isolats obtenus à partir des branchies est plus faible qu'à partir des rates, et l'analyse de potentielles co-infections n'a pu être réalisée qu'à partir de 11 poissons. Les résultats sont différents de ceux obtenus pour la rate, car dans le cas des branchies, le pourcentage de co-infections mises en évidence est plus élevé et concerne la moitié des poissons analysés. Cette valeur est probablement sous-estimée en raison du plus faible nombre moyen d'isolats analysés par branchies ( $42/11 = 3,8$ ) par rapport à la rate ( $157/23 = 6,8$ ). En effet, plus le nombre d'isolats analysés est faible, moins on a de chance de mettre en évidence une co-infection. Pour les branchies d'un même poisson, la présence d'isolats de 4 pulsotypes différents a également été démontrée, comme pour la rate.

La présence de co-infections semble donc être plus fréquente au niveau des branchies que de la rate. Par contre, le niveau de diversité semble comparable. En effet, si on analyse le nombre de pulsotypes différents dans les cas où la co-infection a été mise en évidence, des valeurs comparables sont obtenues (rate : 6 poissons, 16 pulsotypes/22 isolats ; branchies : 6 poissons, 15 pulsotypes/19 isolats).

Les co-infections ont été mises en évidence aussi bien chez les alevins (2 alevins/6) que chez les truitelles de poids allant jusqu'à 160g (7 truitelles/18). Elles n'ont pas été mises en évidence chez les truites plus grosses (portion et adultes), peut-être en raison du plus faible nombre de ces stades analysables (4 poissons). Les co-infections d'un même organe ont été

mises en évidence au niveau des sites piscicoles A et B, de façon plus importante pour les poissons du site B (6/9 poissons pour lesquels l'analyse était réalisable).

**Tableau 23** : Nombre de profils PFGE de *F. psychrophilum* pour des isolats provenant de rate ou de branchies.

Organe analysé	Nombre de poissons (%) dont les isolats présentent	
	des pulsotypes identiques / organe	des pulsotypes différents / organe
Rate (n=23)	17 (74%) - 135 isolats moyenne de 7,9 isolats/rate	6 (26%) - 22 isolats moyenne de 3,6 isolats/rate
Branchies (n=11)	5 (45%) - 23 isolats moyenne de 4,6 isolats/branchie	6 (55%) - 19 isolats moyenne de 3,1 isolats/branchie

n = nombre de poissons étudiés

Pour 16 poissons, la comparaison des isolats issus de branchies et de rate a été possible. Pour 5 poissons, les pulsotypes des isolats collectés à partir de la rate et des branchies sont identiques (62 isolats avec une moyenne de 12,4 isolats analysés par poisson, rate et branchies confondues). Pour deux poissons (22 isolats analysés), des pulsotypes communs sont retrouvés dans les deux organes collectés, avec en plus des isolats présentant des pulsotypes différents selon l'organe d'origine. Dans la majeure partie des cas analysés (9 poissons, 51 isolats), les pulsotypes des isolats de la rate sont tous différents de ceux des branchies. Plusieurs cas sont possibles :

- 1- un seul pulsotype isolat rate et un seul pulsotype isolat branchie (5 poissons : O7, F11, F2, F10, M9),
- 2- plusieurs pulsotypes identifiés dans chaque organe (2 poissons : A2, A11),
- 3- un des organes avec un pulsotype et l'autre des co-infections (2 poissons : F8, O5).

### Résumé

*L'analyse de la variabilité génétique des isolats de *F. psychrophilum* collectés sur un même poisson indique l'existence de co-infections aussi bien au niveau de la rate qu'au niveau des branchies. La fréquence des co-infections est plus élevée au niveau des branchies même si, pour ces deux organes, le niveau de diversité est comparable lorsque des co-infections sont mises en évidence. L'existence de ces co-infections est démontrée dès le stade alevin. La comparaison des pulsotypes entre organes d'un même poisson indique que les pulsotypes peuvent être différents, partagés ou identiques entre rate et branchies.*

### **3.3.2. Etudes de variabilité génétique de *F. psychrophilum* par site piscicole d'origine**

Pour chaque site, seuls les profils uniques par poisson ont été sélectionnés pour l'analyse de variabilité par site. C'est-à-dire, si plusieurs isolats ont été obtenus pour un même poisson : (i) soit les pulsotypes de ces isolats sont identiques (indifféremment de l'organe d'isolement), le pulsotype n'est représenté qu'une fois, et (ii) soit les pulsotypes sont différents et ils sont tous représentés.

L'indice de diversité de Simpson a été calculé à 2 niveaux, d'une part pour estimer la diversité en prenant en compte les pulsotypes, et d'autre part pour estimer la diversité en prenant en compte les clusters.

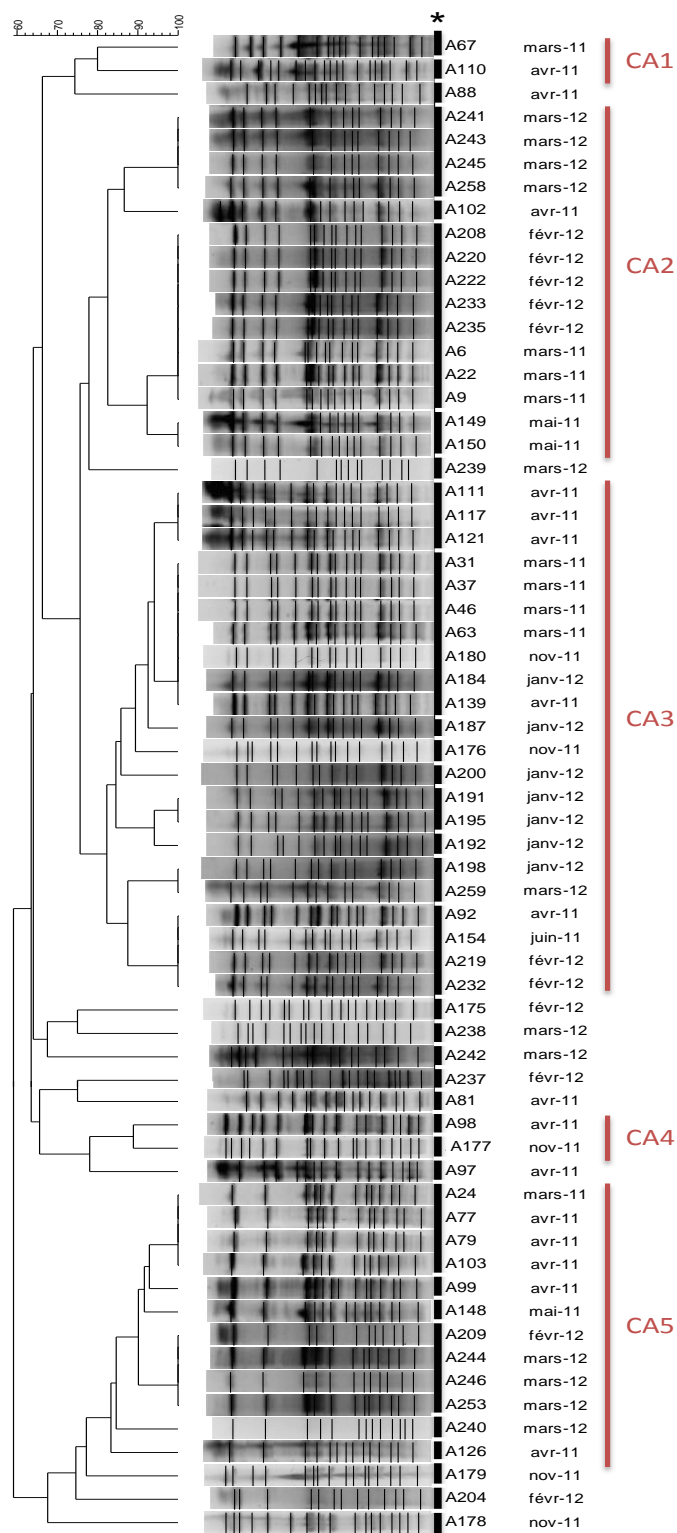
#### **3.3.2.1. Site A**

Pour le site A, l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* par PFGE a porté sur 47 poissons correspondant à 64 isolats.

Le dendrogramme obtenu pour ces 64 isolats est présenté Figure 28. Pour ces 64 isolats, 34 pulsotypes différents ont été identifiés. Ils sont divisés en 5 clusters et 11 profils indépendants. Le nombre d'isolats et le nombre de pulsotypes par cluster varie entre 2 et 18 et entre 2 à 9 respectivement : le cluster CA1 regroupe deux isolats de pulsotypes différents, CA2 comprend 15 isolats répartis en 4 pulsotypes, CA3 regroupe 18 isolats présentant au total 9 pulsotypes, CA5 regroupe 2 isolats aux pulsotypes différents et CA5 comprend 12 isolats représentant 6 pulsotypes.

Les pulsotypes différents observés sur le site A présentent entre eux des similarités de profils comprises entre 58 et 94% (voir Figure 28).





**Figure 28:** Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l'indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE *salI* des isolats de *F. psychrophilum* sur le site A. Le degré de similarité (%) est indiqué.

Le suivi de l'évolution de la variabilité génétique des isolats *F. psychrophilum* au cours de l'année montre que certains pulsotypes sont retrouvés sur plusieurs mois de l'étude. Ces mois peuvent être proches dans le temps. Ainsi le pulsotype P21b est retrouvé lors des campagnes de prélèvements de mars et avril 2011 et le pulsotype P21d lors des campagnes de février et mars 2012 (Tableau 24). D'autres pulsotypes identiques sont retrouvés avec un pas de temps plus grand. C'est le cas pour le pulsotype P52a identifié en mars 2011 et février 2012 et le pulsotype P56c identifié en avril 2011 et janvier 2012. Le pulsotype P58a est quant à lui retrouvé sur quatre mois différents lors de cette étude, mars, avril, novembre 2011 et janvier 2012 (Tableau 24).

**Tableau 24:** Evolution mensuelle sur le site A du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. Les pulsotypes retrouvés plusieurs fois sur le site sont soulignés.

	<i>mars-11</i>	<i>avr-11</i>	<i>mai-11</i>	<i>juin-11</i>	<i>juil-11</i>	<i>sept-11</i>
<b>Poissons</b>	9	12	2	1	0	0
<b>Isolats</b>	9	16	3	1	0	0
<b>Cluster</b>	CA2, CA3, CA5	CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 + 3 ind	CA2, CA5	CA3		
<b>Pulsotypes</b>	4 <u>P21b</u> , P38, <u>P52a</u> , <u>P58a</u>	12 P2, P4, P6, <u>P21b</u> , P22, P27, P33b, P41, P53a, <u>P56c</u> , P57a, <u>P58a</u>	2 P21c, P51a	1 P56a	0	0
	<i>oct-11</i>	<i>nov-11</i>	<i>déc-11</i>	<i>janv-12</i>	<i>févr-12</i>	<i>mars-12</i>
<b>Poissons</b>	0	5	0	2	9	7
<b>Isolats</b>	0	5	0	7	11	12
<b>Cluster</b>		CA3, CA4 + 2 ind		CA3	CA2, CA3, CA5 + 3 ind	CA2, CA3, CA5 + 3 ind
<b>Pulsotypes</b>	0	5 P5, P28, P29, P57b, <u>P58a</u>	0	6 <u>P56c</u> , <u>P58a</u> , P58c, P58d, P60, P61	7 P16, <u>P21d</u> , P35, P40, <u>P52a</u> , P56a, <u>P56c</u>	7 <u>P21d</u> , P25b, P32, P54, P55, P60, P63

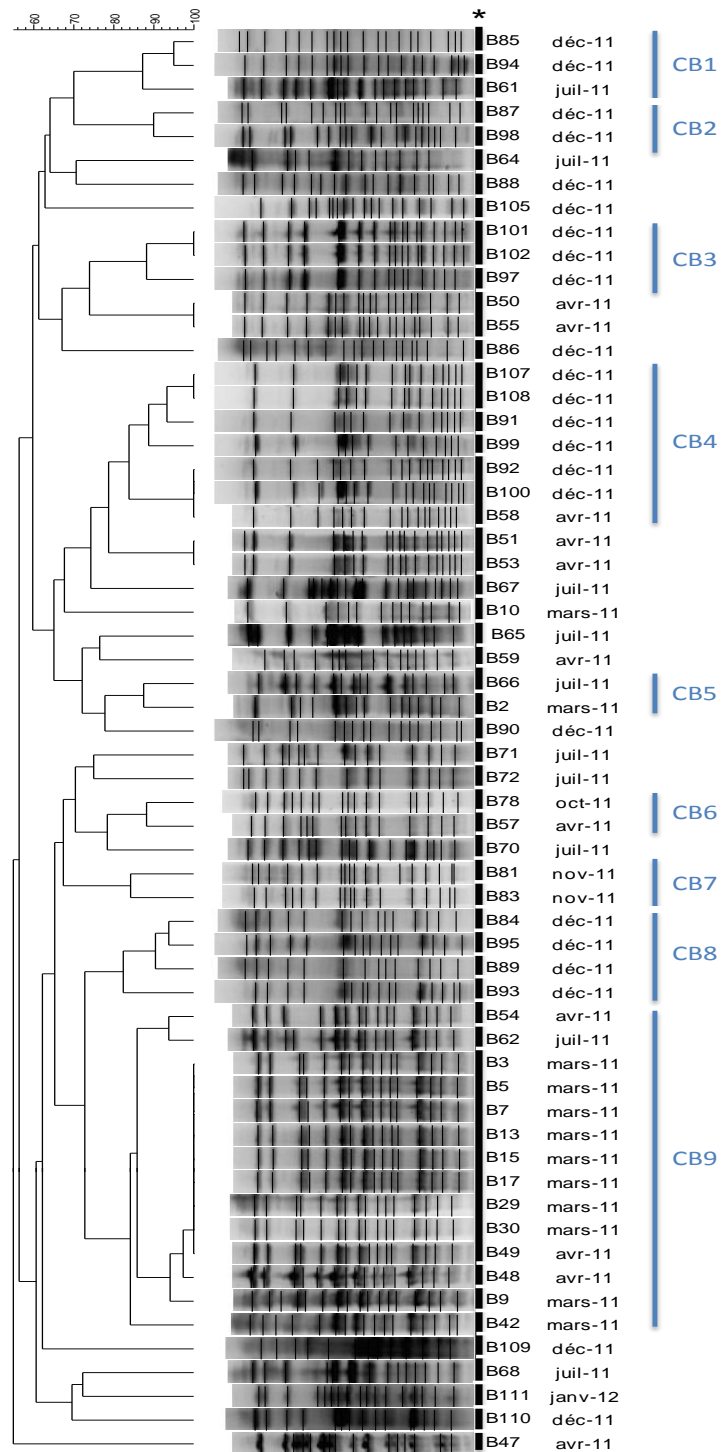
### **3.3.2.2. Site B**

Pour le site B, l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* par PFGE a porté sur 41 poissons correspondant à 60 isolats.

Le dendrogramme obtenu pour ces 60 isolats est présenté Figure 29. Pour ces 60 isolats, 46 pulsotypes différents ont été identifiés. Les 46 pulsotypes sont divisés en 9 clusters et 21 pulsotypes indépendants (Figure 29).

Ces clusters sont composés d'un nombre d'isolats variant entre 2 et 14 associés à des pulsotypes uniques variant entre 2 et 6. Les clusters CB2, CB5, CB6 et CB7 regroupent chacun 2 isolats aux pulsotypes différents, le cluster CB1 comprend 3 isolats de pulsotypes différents, le cluster CB3 regroupe 3 isolats répartis en 2 pulsotypes, le cluster CB4 comprend 7 isolats de quatre pulsotypes différents, le cluster CB8 regroupe 4 isolats de pulsotypes différents et le cluster CB9 comprend 14 isolats de 6 pulsotypes différents.

D'après le dendrogramme UPGMA présenté sur la Figure 29, les pulsotypes différents retrouvés sur le site B présentent entre eux des similarités comprises entre 56 et 98%.



**Figure 29:** Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l'indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE *salI* des isolats de *F. psychrophilum* sur le site B. Le degré de similarité (%) est indiqué.

Le suivi de l'évolution de la variabilité génétique des isolats *F. psychrophilum* au cours de l'année montre que sur ce site, seuls deux pulsotypes sont retrouvés sur deux périodes différentes, le pulsotype P58a qui est retrouvé lors des campagnes de prélèvements de mars et avril 2011 et le pulsotype P18 qui est retrouvé lors des campagnes de prélèvements d'avril 2011 et de décembre 2011 (Tableau 25).

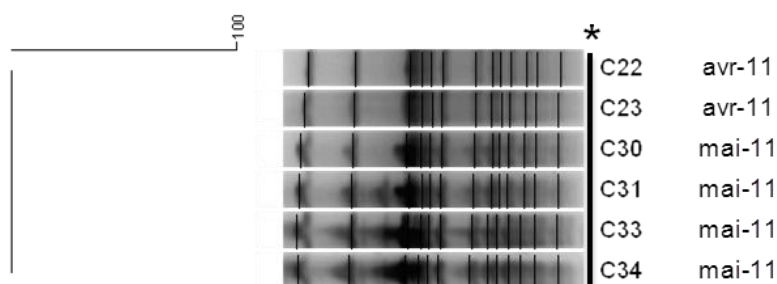
**Tableau 25:** Evolution mensuelle sur le site B du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. Les pulsotypes retrouvés plusieurs fois sur le site sont soulignés.

	<i>mars-11</i>	<i>avr-11</i>	<i>mai-11</i>	<i>juin-11</i>	<i>juil-11</i>	<i>sept-11</i>
<b>Poissons</b>	11	10	0	0	6	0
<b>Isolats</b>	12	11	0	0	10	0
<b>Cluster</b>	CB5, CB9 + 1 ind	CB4, CB6, CB9 + 6 ind			CB1, CB5, CB6, CB9 + 7 ind	
<b>Pulsotypes</b>	6 P14, P24, P57a, <u>P58a</u> , P58c, P59	9 P1, <u>P18</u> , P19, P34, P42, P43b, P5b, <u>P58a</u> , P58b	0	0	10 P9, P11, P13, P20, P30, P39, P45, P46, P56a, P65	0
	<i>oct-11</i>	<i>nov-11</i>	<i>déc-11</i>	<i>janv-12</i>	<i>févr-12</i>	<i>mars-12</i>
<b>Poissons</b>	1	3	9	0	1	0
<b>Isolats</b>	1	2	23	0	1	0
<b>Cluster</b>	CB6	CB7	CB1, CB2, CB3, CB4 + 6 ind		ind	
<b>Pulsotypes</b>	1 P44	2 P47, P48	20 P3, P7, P8, P10a, P10b, P12a, P12b, P15, P17a, P17b, <u>P18</u> , P23b, P37, P50, P51b, P51c, P53a, P53b, P62, P64	0	1 P36	0

### 3.3.2.3. Site C

Pour le site C, l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* par PFGE a porté sur 5 poissons correspondant à 6 isolats.

Le dendrogramme obtenu pour ces 6 isolats est présenté Figure 30. Ces 6 isolats présentent un pulsotype identique et font donc partie d'un unique cluster.



**Figure 30:** Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l'indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE *salI* des isolats de *F. psychrophilum* sur le site C. Le degré de similarité (%) est indiqué.

Le suivi de l'évolution de la variabilité génétique des isolats *F. psychrophilum* au cours de l'année montre que sur ce site aucune diversité n'est observable sur le nombre d'isolats analysés. Le pulsotype unique, P21 est retrouvé sur les mois avril et mai 2011 au cours de la campagne de prélèvements (Tableau 26).

**Tableau 26 :** Evolution mensuelle sur le site C du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. Les pulsotypes retrouvés plusieurs fois sur le site sont soulignés.

	<i>mars-11</i>	<i>avr-11</i>	<i>mai-11</i>	<i>juin-11</i>	<i>juil-11</i>	<i>sept-11</i>
<b>Poissons</b>	0	3	2	0	0	0
<b>Isolats</b>	0	2	4	0	0	0
<b>Cluster</b>		CC	CC			
<b>Pulsotypes</b>	0	1 <u>P21</u>	1 <u>P21</u>	0	0	0
	<i>oct-11</i>	<i>nov-11</i>	<i>déc-11</i>	<i>janv-12</i>	<i>févr-12</i>	<i>mars-12</i>
<b>Poissons</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Isolats</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Cluster</b>						
<b>Pulsotypes</b>	0	0	0	0	0	0

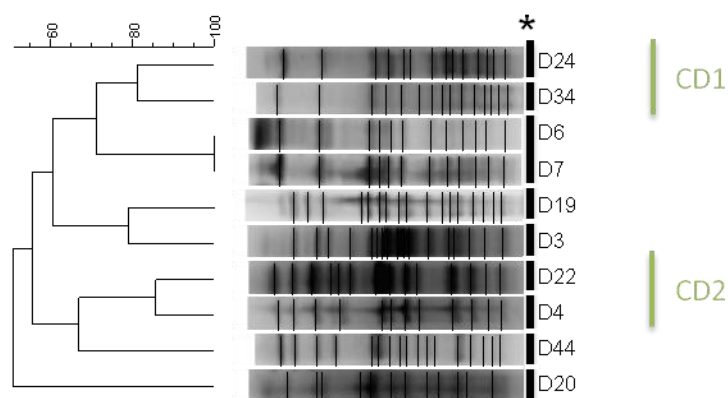
#### **3.3.2.4. Site D**

Pour le site D, l'étude de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* par PFGE a porté sur 10 poissons correspondant à 10 isolats.

Le dendrogramme obtenu pour ces 10 isolats est présenté Figure 31. Pour ces 10 isolats, 9 pulsotypes différents ont été identifiés. Les 9 pulsotypes sont divisés en 2 clusters et 6 pulsotypes indépendants.

Ces clusters (CD1 et CD2) sont composés chacun de deux isolats ayant eux même des pulsotypes différents.

D'après le dendrogramme UPGMA, les 9 pulsotypes présentent entre eux des degrés de similarité variant entre 56 et 86 %.



**Figure 31:** Dendrogramme généré par le logiciel Bionumerics, montrant la distance calculée par l'indice de similarité de Jaccard, des profils PFGE *salI* des isolats de *F. psychrophilum* sur le site D. Le degré de similarité (%) est indiqué.

Le suivi de l'évolution de la variabilité génétique des isolats *F. psychrophilum* au cours de l'année montre que sur ce site aucun pulsotype identique n'est retrouvé sur les différents mois de campagne de prélèvements. La diversité sur ce site malgré le peu d'isolats étudié semble être importante (Tableau 27).

**Tableau 27 :** Evolution mensuelle sur le site D du nombre de poissons infectés et d'isolats collectés ; identification des clusters et pulsotypes obtenus. (NR : non réalisé).

	<i>mars-11</i>	<i>avr-11</i>	<i>mai-11</i>	<i>juin-11</i>	<i>juil-11</i>	<i>sept-11</i>
<b>Poissons</b>	2	2	NR	0	0	0
<b>Isolats</b>	2	2		0	0	0
<b>Cluster</b>	CD2 + 1 ind	2 ind				
<b>Pulsotypes</b>	2 P33a, P49	1 P23a		0	0	0
	<i>oct-11</i>	<i>nov-11</i>	<i>déc-11</i>	<i>janv-12</i>	<i>févr-12</i>	<i>mars-12</i>
<b>Poissons</b>	NR	1	2	1	1	1
<b>Isolats</b>		1	2	1	1	1
<b>Cluster</b>		ind	CD2 + 1 ind	CD1	CD1	ind
<b>Pulsotypes</b>		1 P31	2 P43a, P66	1 P25a	1 P26	1 P52b



### **3.3.3. Comparaison des 4 sites : variabilité observée, communauté de pulsotypes**

L'étude de variabilité génétique des isolats *F. psychrophilum* portant sur quatre sites de production bretons a montré une hétérogénéité dans la collecte des isolats par rapport à ces sites. Ainsi, pour les sites C et D seulement 6 et 10 isolats respectivement, sont rentrés dans l'étude tandis que pour les sites A et B, les isolats étaient au nombre de 64 et 60 respectivement.

Sur le total des pulsotypes obtenus, les sites A et B ont quelques pulsotypes communs. C'est le cas des pulsotypes P53a, P56a, P57a, P58a et P58c et qui correspondent à 27 isolats, soit 22% des isolats collectés pour cette analyse sur les sites A et B.

Pour observer la communauté de diversité des isolats entre sites, nous avons observé les pulsotypes présentant une similarité de profil  $>$  à 90% entre eux. Nous pouvons ainsi voir que le pulsotype unique (P21) identifié sur le site C, a été retrouvé sur le site A. Cinq des pulsotypes identifiés sur le site D (P23, P25, P33, P43 et P52) ont également été retrouvés sur les sites A ou B. Enfin, sur le même critère de similarité, les sites A et B ont en commun les pulsotypes P51, P53, P56, P57 et P58. Les pulsotypes proches (similarité  $>$  à 90%) retrouvés sur les sites A et B représentent 31% des isolats collectés sur ces 2 sites.

Si nous observons la variabilité en termes de clusters, pour les sites A et B présentant un nombre d'isolats étudiés proche, 5 clusters et 11 profils indépendants sont retrouvés sur le site A pour 9 clusters et 21 profils indépendants sur le site B (Figures 28 et 29). La variabilité génétique de *F. psychrophilum* observée par PFGE sur le site B est plus importante que celle observée sur le site A.

Pour cette étude de variabilité génétique des isolats, l'indice de diversité de Simpson a été calculé pour les sites A, B, C et D. Son calcul a été réalisé en prenant en compte d'une part la diversité des pulsotypes (critère 1), et d'autre part la diversité des clusters (critère 2). Pour le calcul de l'indice de Simpson selon le critère 2, chaque pulsotype indépendant a été considéré comme un cluster. Les résultats sont indiqués sur le Tableau 28. Les indices de Simpson calculés selon le critère 1 montrent que sur les sites A, B et D, il y a une très grande diversité

de pulsotypes (H variant entre 0,88 et 0,95), contrairement au site C sur lequel un seul pulsotype a été retrouvé (H=0). Le calcul des indices de diversité selon le critère 2, qui est de 0,85 et 0,73 respectivement pour les sites B et D, montre qu'il existe une diversité de clusters. Une situation différente est observée pour le site A où l'indice de Simpson (H=0,4) montre que la majorité des pulsotypes sont associés en un nombre de clusters réduits.

**Tableau 28:** Indices de Simpson calculés par site d'étude. Les indices ont été calculés en prenant comme unité le pulsotype (critère 1) et le cluster (critère 2).

	<b>Critère 1</b>	<b>Critère 2</b>
Site A	0,94	0,4
Site B	0,95	0,85
Site C	0	0
Site D	0,88	0,73

### **3.3.4. Analyse globale des sites : variabilité génétique de *F. psychrophilum* au niveau du bassin versant**

Cette étude correspond à l'association des résultats PFGE obtenus sur chaque site (paragraphe 3.4). Elle porte donc sur 104 poissons représentant 140 isolats ayant 90 pulsotypes différents.

Les pulsotypes sont présentés sur la Figure 32, et présentent entre eux des similarités comprises entre 57,7 et 99 %.

Les pulsotypes sont divisés en 17 clusters (regroupement des pulsotypes présentant plus de 80% de similarité entre eux) et 24 pulsotypes indépendants. Il existe une majorité de clusters composés de 2 pulsotypes différents, il s'agit de C1, C2, C3, C5, C6, C10, C12, C14 et C15. Les clusters C4, C11 et C13 sont composés de 3 pulsotypes, les clusters C7 et C9 de 4 pulsotypes, le cluster C8 de 7 pulsotypes, le cluster C16 de 8 pulsotypes et le cluster C17 de 12 pulsotypes (Figure 32).

**Figure 32:** Dendrogramme représentant les 90 pulsotypes obtenus sur l'ensemble des 4 sites de l'étude.

Comme pour l'analyse de variabilité portant sur les différents sites, l'indice de diversité de Simpson a été calculé pour l'ensemble du bassin versant. Son calcul a été réalisé selon les mêmes critères, soit en prenant en compte d'une part la diversité des pulsotypes (critère 1), et d'autre part en prenant comme unité le cluster (critère 2). Pour le calcul de l'indice de Simpson selon le critère 2, chaque pulsotype indépendant a été considéré comme un cluster. Les résultats sont indiqués sur le Tableau 29.

L'indice de Simpson calculé selon le critère 1 pour l'ensemble du bassin versant est de 0,97 montrant une très grande diversité des isolats. Le calcul de l'indice de diversité selon le critère 2 est de 0,66, ce qui montre une baisse de la diversité lorsque l'on se repose sur l'association des isolats par clusters. Cette diminution de l'indice de Simpson indique que les pulsotypes observés dans chaque site se regroupent en clusters, et donc qu'une grande majorité de pulsotypes sont similaires au moins à 80%.

**Tableau 29:** Indices de Simpson calculés pour l'ensemble des sites. Les indices ont été calculés en prenant comme unité le pulsotype (critère 1) et le cluster (critère 2).

	<i>Critère 1</i>	<i>Critère 2</i>
Bassin Versant	0,97	0,66

L'indice de Simpson calculé pour l'ensemble du bassin versant est d'une valeur proche (0,97) de celle retrouvée pour l'analyse des sites A et B (0,94 et 0,95 respectivement) lorsque le calcul repose sur la diversité des pulsotypes. Cet indice diminue (0,66) lorsque le calcul repose sur la diversité des clusters, ce qui est également en lien avec la différence de valeur d'indice obtenu pour le site A et B (0,4 et 0,85 respectivement) (Tableau 28 et 29).

Des clusters ont donc été attribués suivant le profil de similarité des pulsotypes (> à 80%) par site et pour le bassin versant dans son ensemble, regroupant les quatre sites d'étude (Figure 32). Le Tableau 30 indique le recouvrement des clusters par site avec ceux attribués pour le bassin versant.

**Tableau 30:** Correspondance entre clusters définis dans l’analyse globale des pulsotypes du bassin versant et clusters définis par sites.

Bassin versant	Site A	Site B	Site C	Site D
C1	CA1	2 ind		
C2	CA4 +1 ind			
C3		CB3		
C4		CB1		
C5		CB2		
C6		CB5		
C7		CB4		
C8	CA5	CB4	CC	2 ind
C9	CA5			CD1
C10	1 ind	1 ind		
C11	1 ind	1 ind		1 ind
C12	1 ind	1 ind		
C13		CB6		CD2
C14		CB7		
C15		1 ind		CD2
C16	CA2	CB8		1 ind
C17	CA3	CB9		
Individuels	9	21		5

L’association cluster site indépendant et cluster bassin versant montre une bonne adéquation dans les regroupements des pulsotypes et permet d’observer le partage de clusters entre sites. Ainsi, le cluster C16 comprend le cluster CA2 et CB8, le cluster C17, les CA3 et CB9 tandis que le cluster C8 comprend le CA5, CB4 et le CC.

Il est à noter cependant, que des pulsotypes associés au cluster CA5 se retrouvent sur l’analyse globale associés à deux clusters différents, le C8 et C9. Il en est de même pour des pulsotypes représentant le cluster CB4, qui se retrouvent partagés entre deux clusters, le C7 et C8.

Les autres clusters du bassin versant sont tous associés à des clusters uniques d’un même site (Tableau 30).

## Résumé

*L'étude de la variabilité génétique de F. psychrophilum à l'échelle d'un poisson, d'un site de production et d'un bassin versant, par la technique PFGE a permis de montrer l'existence d'une variabilité génétique des isolats à une échelle aussi réduite que celle du poisson voire même de l'organe de prélèvement. Cette variabilité est observable également sur les différents sites de production mais est variable selon les sites. D'une façon générale, l'étude met en avant une très grande diversité des isolats F. psychrophilum de l'échantillon collecté sur un même bassin versant.*

*Après avoir étudié la variabilité génétique de F. psychrophilum à l'échelle de l'arc Atlantique français par la technique MLST et à une échelle plus réduite comme un bassin versant unique par la technique PFGE, il nous semblait intéressant de comparer ces méthodes sur l'analyse de la variabilité génétique d'un même échantillon.*

## **4. Comparaison des méthodes PFGE et MLST pour l'analyse de la variabilité génétique de *F. psychrophilum***

Au cours de ce travail de thèse, la méthode MLST a été utilisée pour analyser la variabilité génétique de *F. psychrophilum* isolé de truite arc-en-ciel sur une échelle géographique assez large, l'Arc Atlantique français. Bien que de nouveaux types génétiques aient été mis en évidence, la diversité génétique de *F. psychrophilum* reste faible, ce qui a motivé l'utilisation de la méthode PFGE pour l'étude focalisée sur une échelle plus restreinte (bassin versant, pisciculture, poisson), à laquelle une variabilité plus faible pouvait être attendue. Dans cette dernière partie, nous nous proposons de comparer les deux techniques précédemment utilisées (MLST et PFGE) et leurs pouvoirs discriminants respectifs. Cette comparaison fine est rendue possible grâce aux isolats collectés dans un bassin versant breton et qui ont fait l'objet d'une étude de variabilité génétique par la technique PFGE.

### **4.1. Choix des isolats**

Pour cette comparaison de méthode, les isolats analysés par la méthode MLST ont été sélectionnés sur la base des pulsotypes décrits précédemment. Le choix des isolats a été réalisé au cours de la campagne de prélèvements et avant l'obtention de la totalité des résultats PFGE, limitant ainsi le choix des isolats pour la comparaison de deux méthodes.

Afin de comparer les 2 techniques, les isolats ont été sélectionnés selon leurs pulsotypes suivant trois critères :

- Critère 1 : Isolats présentant un pulsotype identique isolés chez un même poisson.
- Critère 2 : Isolats présentant des pulsotypes différents isolés chez un même poisson. Il s'agit dans ces deux cas de comparer le pouvoir discriminant des deux méthodes sur un échantillon d'origine très homogène (un même poisson).

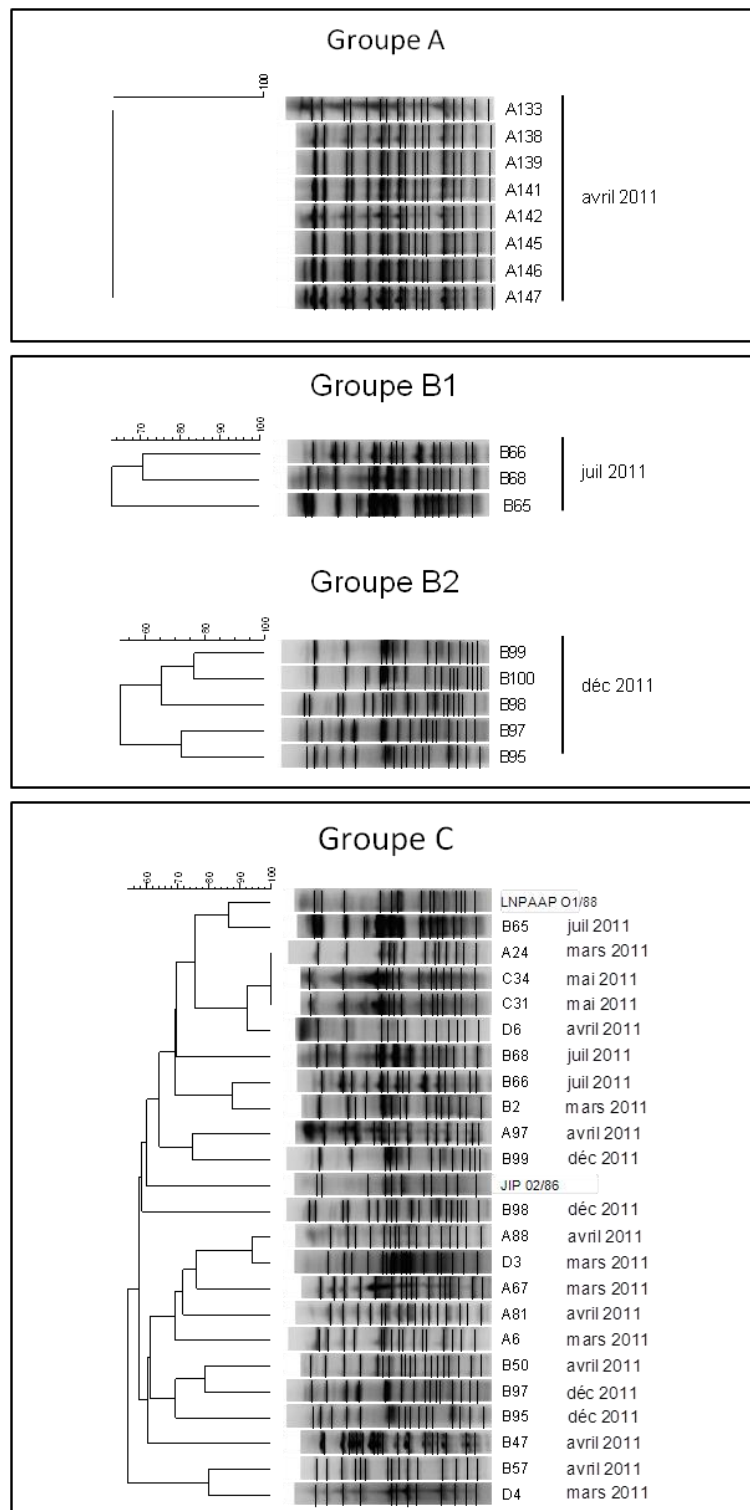
- Critère 3 : Isolats présentant des pulsotypes différents isolés chez des poissons différents et provenant de sites différents. Cette comparaison est réalisée pour déterminer si les deux méthodes permettent de regrouper de façon similaire les isolats et d'établir les mêmes liens génétiques potentiels entre isolats.

Trois groupes d'isolats ont donc été obtenus selon ces critères :

- Groupe A : 8 isolats d'un même poisson (4 de rate et 4 de branchies) présentant le même pulsotype (isolats A133-A138-A139-A141-A142-A145-A146-A147);
- Groupe B : 8 isolats provenant de 2 poissons, et subdivisés en deux sous groupes : Groupe B1 (3 isolats, B65-B66-B68) et groupe B2 (5 isolats, B95-B97-B98-B99-B100). Dans chaque sous-groupe des pulsotypes différents ont été observés ;
- Groupe C : 15 isolats provenant des 4 sites, de poissons différents pour lesquels des pulsotypes différents ont été observés par site (isolats A6-A24-A67-A81-A88-A97-B2-B47-B57-B60-C31-C34-D3-D4-D6). A ce groupe sont ajoutés 7 isolats provenant du groupe B et deux souches de référence (LNPAAP O1/88 et JIP 02/86).

En tout, 31 isolats ont été sélectionnés, un isolat pouvant répondre à plusieurs critères. Les pulsotypes obtenus par PFGE pour chaque isolat sont présentés Figure 33.





**Figure 33:** Pulsotypes des isolats choisis pour la comparaison des méthodes MLST et PFGE. Groupe A : isolats de même pulsotype provenant d'un même poisson. Groupes B1 et B2 : isolats de pulsotypes différents, provenant chacun d'un même poisson. Groupe C : isolats de pulsotypes variés et provenant des 4 sites, et 2 souches de référence.

## 4.2. Analyse MLST

### 4.2.1. Analyse des séquences des gènes de ménage

Après amplification et séquençage des gènes de ménage des isolats de *F. psychrophilum* collectés dans un bassin versant Breton, selon le même schéma MLST que décrit dans le matériel et méthodes, les séquences ont été caractérisées par le nombre de sites variables (SNPs), les indices de diversité nucléotidique par site ( $\pi$ ) et génétique (H), ainsi que par les indices de mutations synonymes et non synonymes (Tableau 31). Ces indices ont aussi servi à caractériser les séquences concaténées correspondant aux assortiments des variants alléliques des 7 loci, observés pour les isolats analysés. Le nombre de séquences concaténées différentes obtenues est de 18.

Pour les 31 isolats du bassin versant breton sélectionnés pour cette étude, l'analyse des séquences des loci MLST a montré un nombre de SNPs total de 75, avec des valeurs par locus comprises entre 4 (pour *fumC*) et 20 (pour *atpA*). L'alignement des séquences des allèles de chaque locus a permis d'identifier 4 nouveaux SNPs par rapport à l'étude précédente (paragraphe 2.3.1) : 1 pour le locus *trpB*, 1 pour *gyrB* et 2 pour le locus *murG*. Certains SNPs retrouvés précédemment sont ici absents chez 4 loci: 3 SNPs pour *atpA*, 3 pour *dnaK*, 1 pour *gyrB* et 2 pour *tuf*.

La diversité génétique (H) par locus est comprise entre 0,7059 pour *dnaK* et 0,8954 pour le locus *trpB*, donnant sur l'ensemble des séquences une valeur moyenne de 0,8413. L'indice  $\pi$  varie de 0,00289 (*trpB*) à 0,1199 (*atpA*), avec une valeur moyenne sur l'ensemble des séquences concaténées de 0,00481.

Les substitutions synonymes sont dans l'ensemble apparues beaucoup plus fréquemment que les substitutions non-synonymes (147 contre 11), avec des occurrences par locus comprises entre 5 (*dnaK* et *fumC*) et 24 (*tuf*) pour les substitutions synonymes, et comprises entre 0 (*trpB*, *gyrB*, *tuf* et *fumC*) et 7 (*murG*) pour les substitutions non-synonymes (cf. Tableau 31).

**Tableau 31:** Caractéristiques des séquences des 7 loci MLST des 31 isolats de *F. psychrophilum* collectés dans un même bassin versant breton.

<b>Locus</b>	<b>Taille (bp)</b>	<b>Nombre de SNPs</b>	<b><math>H^{[1]}</math></b>	<b><math>\pi</math> (bp<sup>-1</sup>)<sup>[2]</sup></b>	<b>S<sup>[3]</sup></b>	<b>N<sup>[4]</sup></b>	<b>dN/dS<sup>[5]</sup></b>
<i>trpB</i>	789	6	0,8954	0,00289	8	0	0,0000
<i>gyrB</i>	1077	15	0,8497	0,00636	15	0	0,0000
<i>dnaK</i>	882	6	0,7059	0,00359	5	1	0,0708
<i>tuf</i>	795	13	0,8562	0,00581	24	0	0,0000
<i>fumC</i>	750	4	0,8487	0,00240	5	0	0,0000
<i>murG</i>	681	11	0,8889	0,00677	9	7	0,2650
<i>atpA</i>	834	20	0,8431	0,1199	28	2	0,0240
Séquences concaténées	5808	75	0,8413	0,00481	147	11	0,0224

<sup>1</sup> H : diversité génétique

<sup>2</sup>  $\pi$  : diversité nucléotidique par site

<sup>3</sup> S : nombre de substitutions synonymes

<sup>4</sup> N : nombre de substitutions non-synonymes

<sup>5</sup> dN/dS : rapport substitutions non-synonymes/substitutions synonymes

#### **4.2.2. Identification des allèles types (ATs) et des profils alléliques (STs)**

Un nombre moyen de variants alléliques ou allèles types (ATs) de 8,14 par locus a été retrouvé sur l'ensemble des loci analysés, avec un nombre d'ATs identifiés pour chaque locus compris entre 5 (*dnaK*) et 11 (*gyrB*) (Tableau 32).

Sur 57 ATs, tous loci confondus retrouvés dans cette étude, 25 nouveaux ATs ont été décrits par rapport aux résultats obtenus lors de l'étude sur la variabilité génétique des isolats de *F. psychrophilum* collectés sur l'arc Atlantique français et 31 par rapport à l'étude précédente de 2008 (Nicolas et al., 2008) (cf. Tableau 12).

Les identifiants alléliques ou ATs et les profils alléliques des 31 isolats de *F. psychrophilum* sélectionnés, ainsi que ceux des souches de références (JIP 02/86 et LNPAAP O1/88) sont présentés dans le Tableau 33.

**Tableau 32:** ATs retrouvés dans la sélection d'isolats de *F. psychrophilum* collectés dans un bassin versant breton. Les nouveaux ATs sont soulignés.

<b>Locus</b>	<b>Nombre d'ATs total</b>	<b>Nombre d'ATs nouveaux</b>	<b>Identification des ATs</b>
<i>trpB</i>	9	4	1, 2, 3, 4, <u>8</u> , <u>15</u> , <u>18</u> , 29, <u>35</u>
<i>gyrB</i>	11	6	1, 2, 3, <u>15</u> , <u>21</u> , <u>37</u> , <u>43</u> , 49, <u>53</u> , <u>61</u>
<i>dnaK</i>	5	1	1, 2, <u>8</u> , 22
<i>tuf</i>	8	2	2, 3, <u>19</u> , 41, 48, 49, <u>54</u>
<i>fumC</i>	7	2	1, 2, 3, 7, <u>9</u> , <u>11</u>
<i>murG</i>	9	6	1, 2, <u>12</u> , <u>22</u> , <u>28</u> , <u>30</u> , <u>42</u> , <u>43</u>
<i>atpA</i>	8	4	1, 2, 3, <u>44</u> , <u>45</u> , <u>51</u> , <u>52</u>

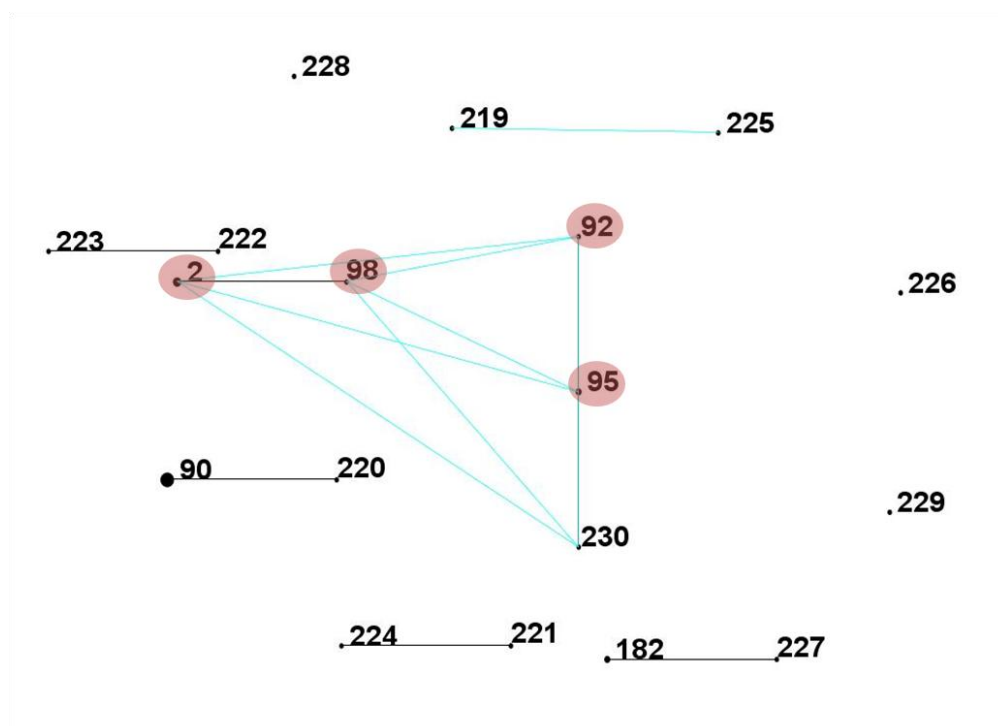
Sur les 31 isolats de *F. psychrophilum* analysés, 18 STs ont pu être observés : ST2, ST90, ST92, ST95, ST98, ST182 et ST219 à ST230. Ces résultats font apparaître 13 nouveaux STs par comparaison aux résultats de MLST précédemment obtenus sur des isolats de *F. psychrophilum* de l'arc Atlantique français, les ST182 et ST219 à ST230. Les nouveaux STs identifiés dans cette étude apparaissent soulignés dans le Tableau 32.

**Tableau 33:** Variants (AT) et profils (ST) alléliques des isolats du bassin versant de Bretagne étudié. Les nouveaux ST sont soulignés.

	<i>Isolat</i>	<i>Variants alléliques (AT)</i>						<i>ST</i>	
		<i>trpB</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnaK</i>	<i>fumC</i>	<i>murG</i>	<i>tuf</i>		<i>atpA</i>
Groupe A	A133	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A138	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A139	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A141	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A142	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A145	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A146	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A147	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
Groupe B1	B65	2	2	2	2	2	48	2	<b>98</b>
	B66	29	37	8	1	43	3	52	<b><u>226</u></b>
	B68	8	53	8	7	30	54	45	<b><u>227</u></b>
Groupe B2	B95	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	B97	18	43	8	11	28	3	2	<b><u>228</u></b>
	B98	4	3	2	9	22	49	3	<b><u>229</u></b>
	B99	4	2	2	2	2	49	2	<b><u>230</u></b>
	B100	2	2	2	2	2	2	2	<b>2</b>
Groupe C	A6	1	1	1	1	1	2	1	<b>90</b>
	A24	3	2	2	2	2	41	2	<b>92</b>
	A67	4	2	22	3	12	3	3	<b><u>221</u></b>
	A81	15	53	8	7	30	54	45	<b><u>182</u></b>
	A88	15	53	8	7	30	54	45	<b><u>182</u></b>
	A97	35	49	2	11	42	3	3	<b><u>222</u></b>
	B2	2	2	2	2	2	2	2	<b>2</b>
	B47	2	49	2	11	42	3	3	<b><u>223</u></b>
	B50	4	2	22	3	12	3	51	<b><u>224</u></b>
	B57	18	21	8	7	28	19	44	<b><u>225</u></b>
	C31	4	2	2	2	2	41	2	<b>95</b>
	C34	2	2	2	2	2	2	2	<b>2</b>
	D3	15	53	8	7	30	54	45	<b><u>182</u></b>
	D4	35	61	8	7	28	19	44	<b><u>219</u></b>
	D6	1	15	1	1	1	2	1	<b><u>220</u></b>
Souches de référence	JIP 02/86	8	8	2	2	2	2	2	<b>20</b>
	LNPAAP O1/88	2	2	2	2	2	2	2	<b>2</b>

### 4.2.3. Analyse des liens évolutifs entre profils alléliques

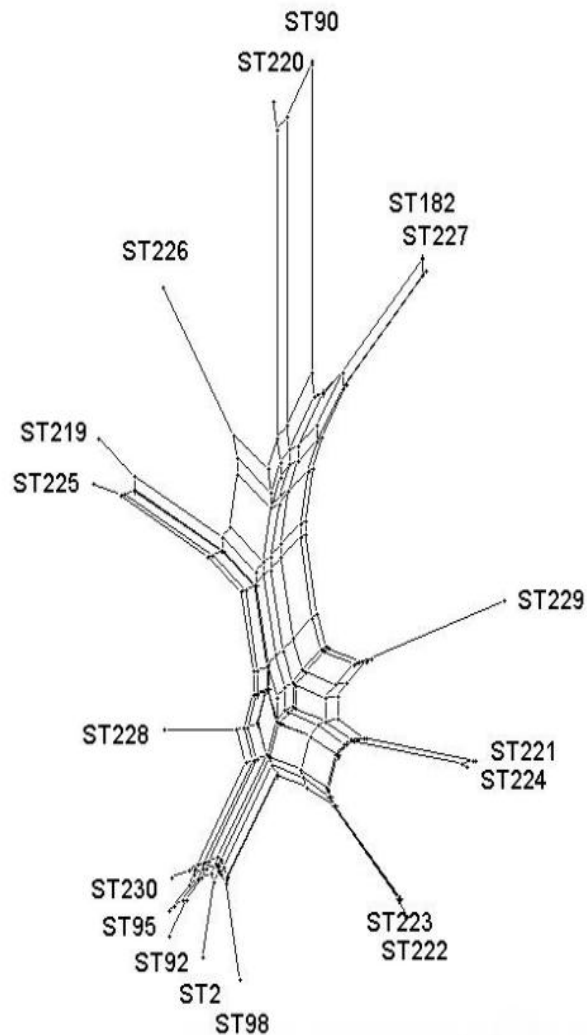
Les liens évolutifs entre profils alléliques ont été mis en évidence *via* l'analyse e-BURST (Figure 34). Ce diagramme permet d'observer les liens entre STs ayant en commun au minimum 6 ATs (Single Locus Variant ou SLV) et les liens entre STs ayant en commun au minimum 5 ATs (Double Locus Variant ou DLV). On observe 5 paires de SLVs (ST222-ST223, ST2-ST98, ST90-ST220, ST222-ST230 et ST98-ST92) et 8 STs indépendants. Le critère relâché de DLVs permet d'observer 10 paires, dont la moitié (5 paires) est concentrée entre les STs 2, 92, 95 et 98, précédemment inclus dans le complexe clonal défini par l'analyse e-BURST des STs identifiés chez les isolats collectés sur l'arc atlantique.



**Figure 34:** Diagramme e-BURST des isolats sélectionnés pour la comparaison des méthodes PFGE et MLST. Les SLVs sont liés par un trait noir, et les DLVs sont liés par un trait bleu. Les STs inclus dans le CC identifié dans l'analyse des isolats de l'arc Atlantique sont indiqués en rouge.

#### 4.2.4. Analyse de la recombinaison : analyse « Split decomposition » et Test PHI

La survenue d'évènements de recombinaison a été recherchée par l'analyse « Split Decomposition » sur les séquences concaténées des 18 STs retrouvés parmi la sélection d'isolats de *F. psychrophilum* du bassin versant breton. Cette analyse montre une structure réticulée confirmant la survenue d'évènements de recombinaison (Figure 35).



**Figure 35:** Analyse de « split decomposition » des STs retrouvés dans le bassin versant breton.

La survenue d'évènements de recombinaison a aussi été recherchée grâce au test PHI sur l'alignement des séquences concaténées et sur les alignements de séquences de chaque locus, afin d'identifier les locis touchés par la recombinaison. La p-value du test obtenue pour l'ensemble des séquences concaténées est inférieure à 0,05 ( $p = 8,28.10^{-10}$ ) et confirme ainsi l'observation de la recombinaison *via* l'analyse « split decomposition ». Les p-value sur les gènes de ménage montrent que seuls les loci *gyrB* ( $p = 7,31.10^{-4}$ ) et *atpA* ( $p = 3,70.10^{-5}$ ) ont subi, de manière statistiquement significative, de la recombinaison ( $p < 0.05$ ) (Tableau 34).

**Tableau 34 :** p-values du test PHI, pour chaque locus et pour les séquences concaténées.

<b>Locus</b>	<b>PHI test p-value</b>
<i>trpB</i>	0,2563
<i>gyrB</i>	$7,31.10^{-4}$
<i>dnaK</i>	NC*
<i>tuf</i>	0,2563
<i>fumC</i>	1
<i>murG</i>	0,866
<i>atpA</i>	$3,70.10^{-5}$
Séquences concaténées	$8,28.10^{-10}$

\*NC : non calculé par le logiciel SplitsTree.

### Résumé

*La variabilité génétique de F. psychrophilum dans le bassin versant a été analysée par MLST sur une sélection d'isolats. Un niveau de diversité bien supérieur à celui observé pour les isolats de l'arc Atlantique français a été mis en évidence avec un indice de diversité H de 0,84 comparé à 0,43 pour l'arc Atlantique. Cette diversité est apparente avec, pour 31 isolats, 25 nouveaux types alléliques et 13 nouveaux profils alléliques (arcAtlantique : 66 isolats, 19 nouveaux ATs et 14 nouveaux profils alléliques). La présence de recombinaison comme générateur de diversité existe mais à un degré plus faible que pour les isolats de l'arc Atlantique. Une part importante est laissée aux mutations avec 4 nouveaux SNPs pour 31 isolats contre 2 pour les 66 isolats de l'arc Atlantique. Le complexe clonal décrit dans la première partie est retrouvé et enrichi d'un nouveau ST (ST230). Dans ce complexe, le ST2 n'est pas majoritaire parmi les isolats analysés.*



## 4.3. Comparaison des résultats et pouvoirs discriminants

### 4.3.1. Pouvoir de discrimination des isolats

Pour cette analyse, les échantillons ont été sélectionnés d'après les profils PFGE comme étant identiques (même poisson) ou différents, avec dans ce deuxième cas un choix d'isolats d'origine proche (le même poisson) ou éloignée (différentes piscicultures).

Pour le groupe A de 8 isolats provenant d'un même poisson et présentant le même pulsotype (Figure 33), un unique ST a été retrouvé, le ST90. La même absence de diversité a donc été retrouvée avec les deux méthodes.

Concernant les groupes B1 et B2, chacun regroupant des isolats d'un même poisson et présentant tous des pulsotypes différents (Figure 33), les STs retrouvés sont tous différents :

- groupe B1 : B65 = ST 98 ; B66 = ST 226 ; B68 = ST 227
- groupe B2 : B95 = ST228 ; B97 = ST90 ; B98 = ST229 ; B99 = ST230 ; B100 = ST2

La diversité observée par PFGE est donc retrouvée par l'analyse MLST.

Pour le groupe C comprenant des isolats de *F. psychrophilum* provenant des 4 sites piscicoles de Bretagne étudiés, pour 21 pulsotypes observés (dont ceux des souches de référence LNPAAP O1/88 et JIP 02/86) (Figure 33), 19 STs ont été retrouvés. Différents cas de figures peuvent être notés :

- (i) Isolats aux pulsotypes identiques et aux STs identiques.

Ce cas de figure ne s'est pas présenté dans cette partie de l'analyse.

- (ii) Isolats aux pulsotypes différents et aux STs différents.

Pour 15 isolats (A6, A67, A97, B47, B50, B57, B65, B66, B68, B97, B98, B99, D4 et D6) et la souche de référence JIP 02/86, chaque pulsotype unique correspondant à un ST unique.

- (iii) Isolats aux pulsotypes différents et aux STs identiques.

Dans 3 cas, des isolats de pulsotypes différents présentent des profils alléliques identiques : ST2 (isolats B2, B100, C34 et souche de référence LNPAAP 01/88), ST90 (isolats A6 et B95) et ST182 (isolats A81, A88 et D3). Par contre, ces isolats sont souvent très proches dans

l'arbre phylogénétique (A88 et D3 avec une similarité de profils à 97,5%), ou dans les mêmes clusters (voir la suite).

(iv) Isolats aux pulsotypes identiques et aux STs différents.

Seuls 3 isolats présentent un pulsotype identique, P21. Il s'agit des isolats A24, C31 et C34. Mais leurs profils alléliques sont tous différents : respectivement ST92, ST95 et ST2. Il faut cependant noter que ces isolats sont regroupés dans le complexe clonal défini par l'analyse e-burst, et sont donc génétiquement proches.

### 4.3.2. Analyse de diversité

L'indice de diversité de Simpson a été calculé pour chaque groupe d'isolats et pour chaque méthode (Tableau 35). Ces indices sont utilisés dans notre contexte de comparaison de méthode, comme un indicateur de pouvoir discriminant. Il ne prend pas en compte la concordance entre résultats de PFGE et MLST. Ces résultats indiquent, dans le cas des groupes A, B1 et B2, des pouvoirs discriminants égaux entre la méthode PFGE et la méthode MLST ( $H$  vaut respectivement 0,66 et 0,88). Pour le groupe C, les pouvoirs discriminants des deux méthodes se montrent équivalents (0,94 pour la PFGE et 0,93 pour la MLST).

**Tableau 35:** Indices de Simpson calculés pour chaque groupe d'isolats, selon la méthode de génotypage (PFGE ou MLST).

	<i>Indice de Simpson (H)</i>	
	<i>PFGE</i>	<i>MLST</i>
Groupe A	0	0
Groupe B1	0,66	0,66
Groupe B2	0,88	0,88
Groupe C	0,94	0,93

### 4.3.3. Comparaison des liens phylogénétiques

Les isolats utilisés pour cette étude ont été repositionnés dans l'arbre phylogénétique global obtenu par analyse des profils PFGE des isolats du bassin versant étudié (Figure 36). Des tendances très intéressantes ressortent de cette analyse.

Les 6 isolats de cette étude appartenant au complexe clonal identifié par l'analyse e-burst des profils alléliques de l'arc Atlantique sont ainsi regroupés dans un cluster qui regroupe les

clusters C6, C7, C8, C9, C10 et des profils individuels. Aucun isolat de ce complexe clonal ne se trouve hors de ce cluster. Par contre, des isolats qui ne font pas partie du complexe clonal se trouvent dans ce cluster (D6 ST220, B66 ST226 et B99 ST230).

Les 3 isolats ST182 sont également regroupés dans un même cluster qui regroupe C11, C12 et des profils individuels. Mais dans ce cas, l'isolat ST227 relié lors de l'analyse e-burst au ST182 n'est pas localisé dans ce cluster et un ST non apparenté (ST221) se trouve dans ce groupe.

Les isolats présentant les ST219 et ST225, apparentés d'après l'analyse e-burst, sont également localisés dans un même cluster qui regroupe les clusters apparentés C13, C14 et C15.

Les 3 isolats présentant le ST90 sont localisés dans un grand cluster qui rassemble les clusters C16 et C17 apparentés et quelques profils individuels. L'isolat D6 du ST apparenté ST220 n'est cependant pas localisé dans ce cluster. Aucun autre ST identifié et non apparenté selon l'analyse e-burst ne vient se positionner dans ce groupe pourtant majoritaire.

Pour les STs apparentés ST222-ST223 et ST221-ST224, les regroupements ne sont pas clairs et ces isolats sont répartis dans d'autres clusters.

Les clusters ainsi définis regroupent des souches de similarités compris en moyenne entre 65 et 94 % de similarité, et pourraient correspondre à des complexes clonaux tels qu'ils sont définis par l'analyse e-burst des résultats de MLST.

**Figure 36 :** Dendrogramme de l'ensemble des pulsotypes observés un bassin versant de Bretagne, et isolats de l'étude comparative MLST-PFGE. Les isolats dont les STs sont compris dans le CC (étude « arc Atlantique») et le ST230 sont indiqués en rouge. Chaque paire de SLVs et DLVs en dehors du CC est représentée par une couleur. Les regroupements de clusters sont indiqués par des encadrés gris, et les valeurs de similarité minimum et maximum dans chaque regroupement sont indiquées en gris.

## Résumé

*La comparaison des deux méthodes d'analyse de la variabilité génétique de F. psychrophilum, la MLST et le PFGE, montre des résultats relativement concordants sur notre échantillon de 31 isolats. D'une manière générale, les pulsotypes différents présentent des ST différents et des pulsotypes identiques présentent des ST identiques. Nos résultats montrent que ce n'est pas vrai dans tous les cas mais qu'une corrélation fine existe entre pulsotype et ST. Ainsi des pulsotypes très proche, peuvent avoir des ST identiques et des pulsotypes identiques peuvent avoir des ST différents mais très proches phylogénétiquement.*



# **Discussion - Conclusions**





L'objectif général de ces travaux de thèse était de fournir des connaissances sur la variabilité génétique de la bactérie pathogène de poissons *F. psychrophilum*, sur le territoire français où cette bactérie fait partie des principaux pathogènes répertoriés responsables des cas déclarés de pertes dans les élevages de salmonidés (Guichard, 2004). Nous nous sommes centrés sur l'analyse de cette variabilité sur un hôte donné, la truite arc-en-ciel, car celle-ci représente l'espèce piscicole la plus produite en France. De plus, les travaux déjà existants sur ce pathogène concernent souvent des isolats issus d'hôtes différents et de pays différents, avec un effet souvent marqué de l'hôte d'origine sur la variabilité (Chakroun et al., 1998; Chakroun et al., 1997; Chen et al., 2008; Izumi et al., 2007; Nicolas et al., 2008). Des analyses approfondies de variabilité génétique sur un hôte donné manquaient donc, a fortiori à une échelle géographique réduite.

Nos recherches se sont orientées dans un premier temps sur l'étude de la variabilité génétique à l'échelle d'une zone de production : l'arc atlantique français, et ce sur plusieurs années. Dans cette étude, les isolats analysés provenaient de poissons en phase clinique de la maladie. Cette étude a été réalisée par l'approche MLST, outil déjà développé pour cet agent pathogène et que nous avons pu acquérir par collaboration avec E. Duchaux de l'INRA de Jouy-en-Josas. Dans un second temps, nous avons voulu aller plus finement dans l'étude de la variabilité génétique en travaillant à une échelle spatio-temporelle plus réduite : un bassin versant situé en Bretagne et sur une durée d'un an. Pour cette étude, le choix de la méthode d'analyse s'est porté sur la PFGE pour plusieurs raisons à la fois scientifiques, pratiques et économiques. Les résultats de la première partie des travaux n'étant pas encore disponibles, nous ne savions pas si la technique MLST serait suffisamment discriminante pour un échantillonnage et une analyse sur une population a priori plus homogène génétiquement. Le nombre élevé d'isolats susceptibles d'être collectés au cours de cet échantillonnage ne permettait pas d'envisager une analyse exhaustive de tous les prélèvements par la méthode MLST, sans assurance de données obtenues discriminantes. Le choix s'est donc porté sur la PFGE, méthode déjà validée au laboratoire, dont la mise en œuvre et le coût étaient compatibles avec la taille de la population attendue. Cette analyse par PFGE devait permettre de sélectionner des isolats bactériens représentatifs qui ont ensuite été analysés par MLST. Ainsi, nous nous sommes attachés à comparer les variabilités génétiques obtenues selon les deux méthodes de génotypage utilisées dans ce travail (PFGE et MLST) sur des isolats

sélectionnés sur la base de leurs profils PFGE comme étant identiques ou génétiquement très différents.

### Variabilité génétique de *F. psychrophilum* isolé de truite arc-en-ciel élevées sur l'arc atlantique français et estimée par la MLST

La MLST, rendue possible grâce aux avancées liées au séquençage de gènes et de génomes bactériens entiers, constitue une méthode de génotypage de plus en plus prisée par la communauté scientifique, du fait de la reproductibilité des résultats et de l'aisance du partage de données. Elle a été appliquée à l'étude de variabilité génétique chez de nombreuses espèces bactériennes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, important agent impliqué dans les infections nosocomiales (Maatallah et al., 2011), ou encore *Laribacter hongkongensis*, une bactérie découverte récemment, retrouvée chez les poissons et associée à la « diarrhée du voyageur » (Woo et al., 2009). Dans le cas de *F. psychrophilum*, un schéma MLST a été décrit pour la première fois en 2008 (Nicolas et al., 2008), pour une analyse de variabilité de souches provenant du monde entier et d'espèces de poissons hôtes diverses. Dans notre étude, la MLST sur 7 gènes de ménage (*trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *tuf*, *fumC*, *murG* et *atpA*) a permis l'analyse de variabilité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle spatiale de 4 régions situées sur l'arc atlantique (Aquitaine, Bretagne, Pays de la Loire et Poitou charente), sur une échelle temporelle de plusieurs années, en s'intéressant uniquement à des isolats responsables de cas cliniques observés chez la Truite arc-en-ciel. Soixante six isolats de *F. psychrophilum* ont été sélectionnés pour cette étude, après identification moléculaire par un protocole développé dans ce travail de thèse, basé sur l'amplification moléculaire des gènes *gyrA* et *gyrB* par PCR duplex.

Les données de séquences ont révélé un nombre d' « allèles types » variable selon le locus, sans aucune insertion ni délétions de bases. Le calcul du ratio dN/dS qui permet d'estimer la pression de sélection a montré pour chaque locus une valeur moyenne inférieure à 1, significative d'une sélection purificatrice agissant sur les gènes. Ceci indique que les éventuelles substitutions non-synonymes qui ont pu survenir dans la population bactérienne étudiée ne se sont pas fixées dans les gènes de ménage, confirmant ainsi que les gènes choisis sont neutres, résultat attendu pour des gènes utilisés dans une analyse MLST.

Un total de 15 profils alléliques (STs) a été observé dans l'échantillon de l'arc atlantique. La diversité génétique (H), estimée pour les séquences des 15 STs de notre étude, a mis en évidence une diversité globale de séquences assez moyenne ( $H = 0,4313$ ). Cette valeur H est proche de celle obtenue pour les séquences des 25 isolats de *F. psychrophilum* de truites arc-en-ciel ( $H=0,5333$ ) de l'étude de Nicolas et al. (2008). Ceci permet d'observer que, pour la même espèce de poisson hôte, même si les STs et les contextes spatio-temporels sont différents, on retrouve pour ces deux populations des diversités génétiques équivalentes.

La comparaison des séquences de nos STs à celles des STs obtenus précédemment chez la truite arc-en-ciel (Nicolas et al., 2008), a fait apparaître 2 nouveaux SNPs pour 14 nouveaux profils alléliques. Seul le profil allélique ST2 avait déjà été observé chez cette espèce. Il apparaît donc que différentes associations de SNPs dans chaque locus, couplées à différents assortiments d'ATs ont contribué à la genèse des 14 nouveaux STs observés dans l'échantillon « arc atlantique » de *F. psychrophilum*.

Le test statistique du nombre minimum d'homoplasies (test PHI) appliqué à chaque locus, a permis de montrer de manière statistiquement significative, que les loci *trpB*, *gyrB*, *dnaK* et *atpA* sont responsables de la recombinaison préalablement détectée par test PHI appliqué aux séquences des 15 STs, et par l'analyse « split decomposition ». L'analyse MLST appliquée à d'autres bactéries pathogènes de poisson, du genre *Aeromonas* (Martino et al., 2011), a montré une configuration très différente de celle de notre étude où la recombinaison est combinée à une diversité génétique relativement faible. Dans le cas d'*Aeromonas*, la variabilité génétique très élevée était combinée à une recombinaison intra-spécifique très rare. Pour l'espèce *Aeromonas veronii*, cette étude a aussi mis en évidence le fait que les plans d'échantillonnage et méthodes utilisées pour détecter la recombinaison peuvent influencer les conclusions, car une autre analyse de cette même espèce avait démontré un effet significatif de la recombinaison (Silver et al., 2011). Dans le cas de *F. psychrophilum*, la recombinaison s'est avérée être un générateur majeur de la diversité génétique tant dans notre étude à l'échelle d'une zone géographique dans un pays (la France), qu'à l'échelle du monde entier (Nicolas et al., 2008). Ces dernières données MLST, comparées à des données MLST sur 48 bactéries et archa, ont par ailleurs montré que *F. psychrophilum* possède le taux de

recombinaison homologue le plus élevé parmi les 46 espèces bactériennes comparées (Vos and Didelot, 2008).

Plusieurs plasmides (Chakroun et al., 1998; Duchaud et al., 2007) et des bactériophages (Kim et al., 2010a) ont été retrouvés chez *F. psychrophilum*. Bien que ces éléments soient des vecteurs ayant un rôle dans la recombinaison bactérienne en général, leur implication dans la recombinaison chez *F. psychrophilum* demeure encore inconnue. L'hypothèse d'échanges de plasmides potentiellement impliqués dans la recombinaison, via la conjugaison semble exclue puis qu'aucun gène codant pour des pilis (indispensable au transfert conjugatif) n'a été retrouvé dans le génome de *F. psychrophilum* (Duchaud et al., 2007). Ainsi, la recombinaison générée suite à l'action de bactériophages et/ou à l'acquisition d'ADN de l'environnement nous paraissent être les événements les plus probables.

Les valeurs de l'indice d'association standard ( $I_A^S$ ) calculées pour notre échantillon ont faussement identifié une structure clonale de la population étudiée, par ailleurs en contradiction avec la survenue d'évènements de recombinaison détectés dans cette population. En effet, lorsque le calcul de  $I_A^S$  a été effectué après regroupement des STs en cluster d'après le modèle établi par Smith et al. (1993), la valeur de l'indice a révélé une structure de type épidémique de la population (0,084 ;  $p > 0,05$ ). Un exemple similaire a été observé chez *Neisseria meningitidis* où la population analysée est apparue dans un premier temps clonale malgré les événements de recombinaison détectés, pour finalement s'avérer être de type épidémique après regroupement des STs en cluster (Smith et al., 1993).

L'analyse des liens évolutifs par e-BURST des 15 STs retrouvés dans cette étude a permis d'observer un complexe clonal (CC) composé de 8 STs avec ST2 comme profil allélique ancestral, et 7 STs indépendants. Dans la précédente étude portant sur la diversité de *F. psychrophilum* par MLST, trois complexes clonaux (CC1, CC2 et CC3) avaient été identifiés (Nicolas et al. 2008). ST2 est le seul profil allélique commun entre cette étude et la nôtre. Il a été identifié comme étant le ST ancestral du CC1, permettant ainsi de considérer CC1 et CC, identifié dans notre étude, comme similaires.

Le profil allélique ST2 semble être fortement lié à l'espèce truite arc-en-ciel car jusqu'à présent, il n'a été retrouvé que chez cette espèce (Nicolas et al, 2008). Cependant, de nombreux autres STs ont également été retrouvés associés à la truite arc-en-ciel. Il s'agit

néanmoins de profils alléliques pour lesquels il est difficile de suggérer aussi clairement, comme ? pour ST2, un lien à l'espèce, car ces STs n'ont été échantillonnés qu'une seule fois dans le monde (8 STs, Nicolas et al., 2008) et sur l'arc atlantique français (7 STs dans cette étude).

Notre étude montre que divers profils alléliques peuvent être retrouvés dans une même région, voire sur un même site d'échantillonnage (Figures 23 et 24). Dans notre étude, 73,3% des STs (soit 11 STs sur 15) n'ont été échantillonnés qu'une seule fois, rendant difficile l'observation d'une répartition géographique des STs. A ceci s'ajoute le fait que pour les régions Pays de Loire et Poitou Charente, un trop faible nombre d'isolats de *F. psychrophilum* a été collecté (2 pour chacune d'entre elles). Néanmoins, ST2 étant le profil allélique le plus représenté (47% de l'échantillon, soit 31 isolats de profil allélique ST2 sur 66), nous avons réalisé un test exact de Fisher qui a montré une absence de répartition géographique de ce profil allélique, de manière statistiquement significative. Une fois de plus, il s'agit d'un résultat à considérer comme partiel du fait de la surreprésentation des isolats dans les régions Aquitaine (42/66 soit 63,6% de l'échantillon) et Bretagne (20/66, soit 30,3% de l'échantillon). La présence de STs identiques dans des zones géographiquement éloignées dans le monde a, par ailleurs, été précédemment décrite (Nicolas et al., 2008). Ceci suggère un rôle probable de la commercialisation des œufs et des géniteurs dans la diffusion de certains profils alléliques de *F. psychrophilum* dans le monde. On peut penser que les isolats cliniques (ceux de notre première étude) correspondent probablement à ceux qui ont été en contact précoce avec le poisson (infection des stades juvéniles), et donc correspondent majoritairement à des souches dispersées par le commerce (œufs et/ou alevins notamment). Les isolats auraient alors eu le temps de coloniser durablement les produits échangés (œufs/alevins).

Plusieurs scénarii pourraient expliquer la présence des profils alléliques uniques ou minoritaires, outre le problème d'échantillonnage d'un nombre insuffisant d'isolats. Ils pourraient correspondre à des STs d'isolats endémiques, et donc ne pas être liés à la commercialisation des œufs et/ou des géniteurs de salmonidés. Ainsi ces profils alléliques uniques pourraient être représentatifs d'isolats bactériens dans l'environnement, et/ou d'isolats moins virulents que ceux retrouvés plus fréquemment en phase clinique, ou encore moins bien adaptés à l'espèce truite arc-en-ciel. Ces profils alléliques pourraient aussi

correspondre à des isolats qui infecteraient l'hôte à des stades de développement tardif, et entreraient en compétition avec le ST2 déjà présent dans l'hôte.

La présence de *F. psychrophilum* a été détectée dans l'eau (Madetoja and Wiklund, 2002) et dans des hôtes autres que des poissons, tels que des algues dont les diatomées (Amita et al., 2000; Izumi et al., 2005), qui pourraient servir de réservoirs. Les populations naturelles de poissons peuvent aussi constituer des réservoirs pour la bactérie *F. psychrophilum*, et il a été démontré que la variabilité génétique de la bactérie dans ces populations d'hôtes pouvait être plus importante que celle observée chez des poissons d'élevage (Chen et al., 2008). Nous signalons aussi que dans l'environnement des piscicultures où les échantillonnages ont été réalisés, des populations naturelles de truites, notamment l'espèce Truite fario, sont présentes et pourrait effectivement être porteuses d'isolats aux profils alléliques plus ou moins adaptés aux truites d'élevage.

La recherche d'une répartition des profils alléliques par organe interne/externe de truite a été effectuée. Nous avons pu observer que des profils alléliques divers étaient retrouvés indifféremment en interne et en externe et qu'il n'y avait pas de répartition par organe statistiquement significative selon l'appartenance au complexe clonal. Parmi les STs échantillonnés plus d'une fois, deux profils alléliques (ST89 et ST92) n'ont été retrouvés qu'en interne. Ceci indique que ces deux profils alléliques font probablement partie des STs les plus aptes à franchir les barrières de l'hôte et les mieux adaptés au milieu interne de la truite arc-en-ciel. Ces profils alléliques constitueraient ainsi des cibles intéressantes dans les problématiques d'étude de virulence et peut être, de mise au point de vaccins.

#### Variabilité génétique de *F. psychrophilum* échantillonné dans un bassin versant analysée par MLST

Nous avons voulu éprouver le pouvoir résolutif de la MLST appliquée à *F. psychrophilum* échantillonné dans un contexte spatio-temporel limité. A cet effet, 31 isolats ont été choisis d'après leurs origines (même poisson et poissons différents, même site et sites différents) et leurs pulsotypes (pulsotypes identiques et pulsotypes différents) obtenus d'une analyse PFGE discutée par la suite. Malgré sa petite taille, cet échantillon permet de faire des observations intéressantes lorsque les données MLST sont comparées à celles obtenues sur l'échantillon de l'arc atlantique.

Parmi les isolats sélectionnés, la MLST a permis d'observer un total de 18 profils alléliques. Les données de séquence de ces 18 STs montrent que, comme pour les isolats de l'arc atlantique, les loci MLST n'étaient pas soumis à pression de sélection avec des valeurs de ratio dN/dS équivalentes, confirmant une fois de plus l'adéquation du choix de ces gènes pour l'étude MLST pour *F. psychrophilum*. Les valeurs moyennes des indices de diversité nucléotidique par site et de diversité génétique se sont en revanche montrées plus élevées pour les isolats de bassin versant par rapport à ceux de l'arc atlantique, indiquant que, malgré une taille d'échantillon plus petite que celle de l'arc atlantique, les profils alléliques retrouvés ici présentent entre eux une variabilité supérieure à ceux de l'arc atlantique. A l'échelle des séquences, cette diversité s'explique par des combinaisons diverses de SNPs (par rapport à ceux observés pour l'arc atlantique, certains sont nouveaux alors que d'autres ont disparus) et aux événements de recombinaison qui ont été observés dans l'échantillon étudié.

Dans l'échantillon sélectionné du bassin versant en Bretagne, de nombreux profils alléliques qui n'ont été décrits ni au niveau mondial (Nicolas et al., 2008), ni à l'échelle de l'arc atlantique français, ont été retrouvés. Seul le profil allélique ST2 est commun à ces 3 échelles. Il se présente ainsi comme le profil le plus associé à l'espèce truite arc-en-ciel. Le profil allélique ST2 ainsi que certains STs inclus dans le complexe clonal décrits dans l'étude « arc atlantique » ont aussi été retrouvés dans le bassin versant. Sachant que ST2 est le profil allélique ancestral de ce complexe clonal, ST2 est un profil allélique associé à l'espèce truite arc-en-ciel qui se serait « installé » en France au travers de la commercialisation d'œufs et/géniteurs déjà porteurs de la bactérie, et qui se serait diversifié au travers de phénomènes de mutations et recombinaisons. L'hypothèse de la variabilité génétique observée dans le bassin versant breton, générée par des échanges de matériel génétique (acquisition spontanée de fragments ADN nus présent dans l'environnement de la bactérie et/ou *via* des bactériophages) entre les isolats ST2 de *F. psychrophilum* et des isolats endémiques, n'est pas exclue.

Finalement, dans un contexte spatio-temporel aussi limité que le nôtre (un bassin versant, suivi de variabilité génétique sur un an), la MLST a permis de discriminer les isolats et a mis en évidence une variabilité génétique plus importante que celle observée dans l'arc atlantique.

## Variabilité génétique de *F. psychrophilum* isolé de truite arc-en-ciel élevées dans un bassin versant de Bretagne et estimée par la PFGE

La PFGE, souvent qualifiée de méthode « gold standard », porte sur l'analyse de la totalité du génome et non sur un ensemble de gènes comme c'est le cas de la MLST, et se montre souvent plus discriminante que les méthodes basées sur le typage de quelques gènes (RAPD, ribotypage, PCR-RFLP ou encore MLST) (Arai et al., 2007; Li et al., 2009; Wang et al., 2003). Ainsi, le génotypage par la méthode PFGE a été choisi pour étudier la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle d'un bassin versant de Bretagne, dans l'hypothèse d'une variabilité génétique plus faible de la bactérie dans un contexte spatio-temporel plus restreint que celui présenté dans la première partie de ces travaux de thèse.

Nous avons étudié par PFGE, la variabilité génétique de *F. psychrophilum* échantillonné pendant une période d'un an, sur 4 sites piscicoles dédiés à l'élevage de truite arc-en-ciel. Les truites analysées tout au long de ce suivi ont été choisies de manière aléatoire dans les bassins et ne présentaient pas de signes cliniques de la maladie. L'observation de la présence de la bactérie *F. psychrophilum* nous a permis de confirmer le portage sain de la bactérie déjà décrit (Kim et al., 2010b; Madsen and Dalsgaard, 2000). Ce portage est caractérisé par une prévalence globale faible pendant toute la durée de notre étude (104 poissons infectés / 1545 analysés, soit 6,73%), avec des prévalences d'infection plus élevées chez les stades juvéniles du poisson (truitelle avec 12,70% et alevin avec 5,40%). L'évolution de la prévalence de poissons infectés est en lien avec celle des températures enregistrées pendant le suivi des sites : aux températures les plus faibles correspondent les prévalences les plus hautes, et inversement. Cette donnée corrobore la capacité de *F. psychrophilum* à entraîner la maladie (sous-entendu que la charge bactérienne chez l'hôte est importante) à des températures comprises entre 8 et 12°C, et l'observation de Nematollahi et al. (2003) qui ont noté une relation négative entre la température et la fixation de la bactérie chez la truite arc-en-ciel. Des poissons infectés ont tout de même été retrouvés pendant la période estivale, montrant ainsi que cet agent est également présent à des températures plus élevées. Cette observation est en cohérence avec les dires des pisciculteurs et vétérinaires de terrain qui observent des développements cliniques même durant l'été. Il pourrait s'agir d'une adaptation de la bactérie aux températures de l'eau enregistrées durant l'été, mais aucune de nos données



de variabilité génétique ne nous permet d'établir un lien entre ces pulsotypes et/ou clusters et les conditions de températures. En effet, les pulsotypes des isolats retrouvés à cette période sont inclus dans des clusters divers. On peut tout de même noter le maintien de certains clusters, notamment le cluster C17, à la fois durant la période estivale et durant les mois plus froids. Ces clusters regrouperaient donc des isolats bien adaptés à l'hôte Truite arc-en-ciel, aux conditions d'élevage, et aux fluctuations de température. On peut soupçonner leur potentielle implication dans le déclenchement de phases cliniques.

La prévalence des poissons infectés s'est montrée très variable selon les sites, avec une tendance très forte à augmenter de l'amont vers l'aval des rivières étudiées. Ceci pourrait suggérer une contribution de la diffusion de l'agent bactérien *via* le réseau hydrographique et éventuellement une contribution des potentiels réservoirs (poissons, sédiments) présents dans la rivière.

Nous avons mis en évidence un portage de *F. psychrophilum* plus faible en externe (branchies) qu'en interne (rate). Un élément explicatif pourrait résider dans l'étape de culture des prélèvements de branchies qui a laissé apparaître de nombreux contaminants ayant inhibé la croissance des colonies de *F. psychrophilum*, et rendant difficile l'isolement d'un nombre plus important de colonies pures.

L'analyse de la variabilité génétique de *F. psychrophilum* à l'échelle d'un poisson a permis d'observer que pour un même individu, des isolats aux pulsotypes très divers peuvent co-exister et ce, au sein de chaque organe interne (rate) et externe (branchies). Un résultat similaire avait été observé dans une population de saumons coho, où une analyse PFGE avait montré du co-portage d'isolats aux pulsotypes différents dans le rein (Chen et al., 2008). Le cas inverse, à savoir la présence d'isolats aux pulsotypes identiques au sein d'un même organe, a aussi été observée dans notre étude. La fréquence des co-portages s'est montrée plus élevée en externe (branchies) qu'en interne (rate), avec toutefois des niveaux de diversité comparables. Ce dernier résultat portant sur la diversité paraît surprenant, car on aurait pu s'attendre à une diversité beaucoup moins élevée en interne qu'en externe, en supposant qu'il existe un certain nombre de barrières liées à la capacité des isolats à pénétrer puis coloniser le milieu interne de l'hôte, qui auraient pu limiter ainsi le nombre de types génétiques de *F. psychrophilum* retrouvés en interne.

Notre étude montre qu'il existe une grande diversité de pulsotypes notamment sur les sites A, B et D, alors que dans le site C un seul pulsotype a été retrouvé. Cette diversité suit la tendance de la prévalence d'infection, et elle tend à croître de l'amont vers l'aval de la rivière. Pour rappel, le site C est une éclosérie positionnée sur un bras de rivière, sans aucune exploitation piscicole en amont et sans aucun apport extérieur de poissons, ce qui pourrait expliquer la variabilité génétique limitée sur ce site. Le site D est (i) situé en début de rivière, (ii) avec des truites provenant du site C et d'une pisciculture hors du bassin versant étudié, (iii) où seules des truites au stade adulte, stade peu sujet à la flavobactériose des eaux froides (Decostere et al., 2001; Holt, 1988), ont été analysées. Ces trois éléments pourraient être à l'origine du nombre limité d'isolats collectés (10) et de pulsotypes observés (9), même si ces pulsotypes sont variés. Les sites A et B sont les sites ayant montré le plus de diversité, notamment le site B. Ce dernier est positionné en bout de rivière, recevant ainsi les eaux potentiellement chargées de *F. psychrophilum*. Ceci tend à confirmer donc une diffusion de *F. psychrophilum* au travers du réseau hydraulique dont nous avons fait mention, et la raison de la grande diversité de pulsotypes de *F. psychrophilum* sur le site B pourrait résider dans l'association de plusieurs des facteurs cités ci-après :

- *F. psychrophilum* peut être présent librement dans l'eau et les sédiments (Madetoja and Wiklund, 2002; Madsen et al., 2005; Wiklund et al., 2000), et ainsi transmis aux truites d'élevage, puisque les piscicultures sont alimentées par dérivation des eaux de rivière ;
- Nous savons que des populations naturelles de poissons d'espèces différentes sont présentes dans la rivière sur laquelle sont positionnés nos sites d'étude, et pourraient constituer des réservoirs de la bactérie comme cela a pu être observé aux USA et au Japon (Chen et al., 2008; Kumagai et al., 2011). Parmi les espèces autochtones de cette rivière, on retrouve principalement la Truite fario, alors que la Truite arc-en-ciel n'en fait pas partie (même si quelques individus peuvent y être retrouvés). Chaque espèce présente dans la rivière pourrait être porteuse d'isolats aux pulsotypes spécifiques puisque l'association espèce hôte spécifique de génotypes de *F. psychrophilum*, obtenus par PFGE a été démontrée (Arai et al., 2007; Avendaño-Herrera et al., 2009). Parallèlement, il pourrait y avoir une certaine diversité de pulsotypes propre à chaque espèce, comme cela avait déjà été observé aux USA dans une population naturelle de saumon coho sans signes cliniques de la maladie (Chen et al., 2008). Ainsi il pourrait

exister un transfert *via* l'eau, d'isolats de pulsotypes finalement très divers de ces espèces naturelles vers les truites d'élevage. Nous pouvons aussi supposer un apport plus important de la part des truites fario (famille Salmoninae comme la Truite arc-en-ciel), génétiquement proches de la Truite arc-en-ciel. On assisterait peut être alors à une adaptation d'une certaine catégorie d'isolats de truites fario, à la truite arc-en-ciel. Malheureusement aucune donnée de variabilité génétique de *F. psychrophilum* chez la Truite fario n'étant connue, la vérification de cette hypothèse est difficile.

Par ailleurs, les sites A et B qui procèdent entre eux à des échanges commerciaux, n'ont en commun que 5 pulsotypes sur un total de 80 retrouvés pour ces deux sites durant la période d'étude. Ces 5 pulsotypes représentent 22 % des isolats collectés sur l'ensemble de ces 2 sites. Quatre d'entre eux appartiennent à un même cluster (C17), et les isolats de ce cluster ont été retrouvés à toutes les saisons durant ce suivi. Ces observations laissent penser que le cluster C17 comprend des isolats bien adaptés à l'hôte truite arc-en-ciel, maintenus durant les périodes estivales, et potentiellement capables de provoquer la maladie dans des conditions particulières. La variabilité observée à l'échelle des pulsotypes pourrait trouver une explication dans l'adaptation des isolats aux conditions d'élevage propre à chaque site.

D'autre part, aucun isolat dont le pulsotype appartient au cluster C17 n'a été échantillonné sur les sites C et D, ce qui laisse clairement apparaître le rôle des échanges entre piscicultures dans la diffusion de l'agent.

La méthode PFGE a permis d'observer une très grande hétérogénéité génétique de *F. psychrophilum* dans l'ensemble des 4 sites de l'étude. Aucun profil dominant n'a pu être observé, comme ce fut le cas avec des méthodes telles que la PCR-RFLP (Izumi et al., 2003a; Izumi et al., 2007) et le ribotypage (Madsen and Dalsgaard, 2000) appliquées à un nombre d'isolats de *F. psychrophilum* équivalent à celui de notre étude (entre 242 et 299, contre 282 dans notre étude) d'origines (géographie, espèce hôte) encore plus diverses que celle de notre étude. Un résultat différent aurait peut être été observé pour un même plan d'échantillonnage appliqué à des truites arc-en-ciel en phase cliniques, avec l'observation des clusters importants d'isolats génétiquement proches comme cela a pu être démontré chez des truites arc-en-ciel malades et de mêmes élevage aux USA (Chen et al., 2008).

## Comparaison des méthodes PFGE et MLST sur un échantillon du bassin versant de Bretagne

La MLST porte sur l'analyse de gènes de ménage qui ne sont pas soumis à pression de sélection et donc pour lesquels la variabilité n'est pas forcément observable dans un intervalle de temps limité. De ce fait, certains auteurs soutiennent que la méthode MLST serait plus adaptée à des études de variabilité génétique chez les bactéries dans un contexte de suivi à long terme (Li et al., 2009). Le génotypage des bactéries *Acetivibrio baumannii* et *Klebsiella pneumoniae* par PFGE et MLST a montré que ces deux méthodes pouvaient être complémentaires, chacune appropriée à des contextes distincts (épidémiologie locale pour la PFGE et structure de population à une plus large échelle géographique pour la MLST) (Hamouda et al., 2010; Vimont et al., 2008). Nous pouvons également supposer que les résultats de variabilité génétique obtenus selon chacune de ces deux méthodes, dépendent de l'espèce bactérienne étudiée.

Nous avons voulu observer la concordance (ou non) des résultats de MLST avec ceux de PFGE sur un échantillon d'isolats de *F. psychrophilum* dont les résultats de MLST ont été discutés en amont.

Cette étude a permis de mettre en évidence une assez bonne concordance entre les résultats de PFGE et ceux de MLST, avec des pouvoirs discriminants qui se sont avérés très proches. La correspondance parfaite entre les résultats pulsotypes-STs n'était pas toujours possible car des isolats aux pulsotypes différents ont présenté des STs identiques et inversement, des isolats aux pulsotypes identiques ont présenté des STs différents. Certaines de ces correspondances ont néanmoins été rétablies lorsqu'elles ont été observées entre clusters et STs, démontrant que des isolats aux profils alléliques identiques ont des pulsotypes qui demeurent proches du point de vue de leur similarité.

Les résultats de la méthode MLST semblent ainsi être prometteurs puisqu'elle a bien permis de classer comme identiques des isolats aux pulsotypes identiques provenant d'un même poisson, et surtout de discriminer des isolats aux pulsotypes différents collectés à la même période et sur un même poisson et/ou un même site. Des résultats similaires de MLST ont déjà été observés dans une étude de comparaison de diversité génétique de *P. aeruginosa* par ERIC-PCR, PFGE et MLST (Kidd et al., 2011). Cette étude montrait des pouvoirs discriminants équivalents pour les trois méthodes, sur un échantillon collecté sur une période

d'un an. Une telle comparaison de méthodes sur d'autres pathogènes de poisson du genre *Flavobacterium* est difficile puisque jusqu'à présent, aucun travaux sur ce sujet, impliquant la PFGE ou la MLST, n'ont été publiés.

### Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse portant sur la première analyse de variabilité de *F. psychrophilum* d'origine exclusivement française et uniquement sur l'espèce hôte Truite arc-en-ciel, par MLST et PFGE, a permis de produire des éléments de connaissance sur, d'une part des profils alléliques retrouvés en situation d'épidémies (arc atlantique), et d'autre part les STs et pulsotypes observés dans le cas de portage sain.

Il en ressort que l'une des premières stratégies de lutte contre la diffusion de l'agent *F. psychrophilum*, reste la limitation des échanges commerciaux. En effet, nous avons pu observer des prévalences d'infection très faibles sur l'un de nos sites d'étude dont la production d'œufs et l'alevinage/grossissement étaient réalisés sur place. Les échanges de produits avaient déjà été incriminés dans la diffusion de l'agent (Kumagai and Takahashi, 1997).

Des profils alléliques majoritaires ont été associés aux isolats de l'arc atlantique français, tandis qu'une grande diversité génétique obtenue par PFGE et MLST a été démontrée dans le contexte d'un bassin versant étudié sur une période d'un an. Ces observations corroborent de précédentes études qui ont montré pour une même espèce hôte, une forte homogénéité génétique d'isolats cliniques de *F. psychrophilum* contre une variabilité plus marquée dans des cas de portage asymptomatique (Avendaño-Herrera et al., 2009; Chen et al., 2008).

Le choix d'une méthode d'analyse est dépendant du pas de temps de l'étude et de la dispersion géographique des isolats. Il est aussi important de prendre en compte l'agent bactérien étudié, car selon les pouvoirs recombino-gènes, une même méthode pourra être adaptée pour une espèce et pas pour une autre. Dans notre cas, les méthodes PFGE et MLST se sont montrées adaptées à une surveillance épidémiologique de *F. psychrophilum* même à court terme. La préférence de l'une des deux méthodes parait pour l'instant prématurée même

si elles montrent une bonne concordance dans leurs résultats. Néanmoins, pour des suivis épidémiologiques futurs, les coûts d'analyses pourraient constituer un argument de poids dans le choix entre PFGE et MLST.

Un effort de génotypage de *F. psychrophilum* supplémentaire à une échelle aussi limitée qu'un bassin versant dans l'autre grand bassin de production français de Truite arc-en-ciel, l'Aquitaine, pourrait être intéressant. Cette étude permettrait de comparer les variabilités génétiques entre Bretagne et Aquitaine, et confirmerait la présence d'isolats endémiques capables de s'adapter à l'environnement piscicole local.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail de recherche afin de distinguer plus clairement les clusters de profils alléliques ou pulsotypes les plus souvent liés à l'environnement interne du poisson et donc potentiellement virulents. Ces groupes pourront alors être caractérisés par leur pathogénicité ou leur résistance aux antibiotiques, à l'exemple de l'identification d'un génotype virulent de *F. psychrophilum*, chez l'ayu (Fujiwara-Nagata et al., 2012). Ce type d'informations pourra à long terme, orienter la mise au point de vaccin et une meilleure recommandation quant aux antibiotiques appropriés au contexte français.

# **Références bibliographiques**





- AGRESTE, 2011, Recensements 2008 de la salmoniculture et de la pisciculture marine et des élevages d'esturgeons. Les Dossiers n°11, 7-39.
- Amita, K., Hoshino, M., Honma, T., Wakabayashi, H., 2000, An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa river. *Fish Pathol.* 35, 193-197.
- Anacker, R.L., Ordal, E.J., 1959, Studies on the myxobacterium *Chondrococcus Columnaris*: I. Serological typing. *J. Bacteriol.* 78, 25-32.
- Arai, H., Morita, Y., Izumi, S., Katagiri, T., Kimura, H., 2007, Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates derived from Japanese fish. *J. Fish Dis.* 30 345–355.
- Avendaño-Herrera, R., Araya, P., Fernández, J., 2009, Molecular analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from salmonid farms in Chile. *Bull. Eur. Assn. Fish P.* 29, 184-192.
- Baliarda, A., Faure, D., Urdaci, M.C., 2002, Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 510-516.
- Barnes, M.E., Brown, M.L., 2011, A Review of *Flavobacterium Psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. *The Open Fish Sci. J.* 4, 1-9.
- Baudin-Laurencin, F., Castric, J.C., Vigneulle, M., Tixerant, G., 1989, La myxobactériose viscérale de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* R: Une forme nouvelle de la maladie de l'eau froide à *Cytophaga psychrophila*. *Bull. Acad. Vét. France* 62, 147-157.
- Bernardet, J.F., Grimont, P.A.D., 1989, Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 346-354.

- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., 1996, Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 128-148.
- Bertolini, J.M., Wakabayashi, H., Watral, V.G., Whipple, M.J., Rohovec, J.S., 1994, Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *J. Aquat. Anim. Health* 6, 224-233.
- Borg, A.F., 1960, Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Wildlife Dis.* 8, 1-85.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- Bratchikov, M., Mauricas, M., 2011, Development of a multiple-run high-resolution melting assay for *Salmonella* spp. genotyping: HRM application for *Salmonella* spp. subtyping. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* 71, 192-200.
- Brown, L.L., Cox, W.T., Levine, R.P., 1997, Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Organ.* 29, 213-218.
- Bruno, D.W., 1992, *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the UK. *Bull. Eur. Assn. Fish P.* 12, 215-216.
- Bruun, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, L., Dalsgaard, I., 2000, Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* 187, 201-212.
- Bustos, P.A., Calbuyahue, J., Montana, J., Opazo, B., Entrala, P., Solervicens, R., 1995, First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bull. Eur. Assn. Fish P.* 15, 161-164.

- Cepeda, C., García-Márquez, S., Santos, Y., 2004, Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture* 238, 75-82.
- Chakroun, C., Grimont, F., Urdaci, M.C., Bernardet, J.F., 1998, Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Dis. Aquat. Organ.* 33, 167–177.
- Chakroun, C., Urdaci, M.C., Faure, D., Grimont, F., Bernardet, J.F., 1997, Random amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and among *Flavobacterium* species. *Dis. Aquat. Organ.* 31, 187-196.
- Chen, Y.C., Davis, M.A., LaPatra, S.E., Cain, K.D., Snekvik, K.R., Call, D.R., 2008, Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from commercially raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and spawning coho salmon, *O. kisutch* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 31, 765-773.
- Chevassus-au-Louis, B., Lazard, J., 2009, Situation et perspectives de la pisciculture dans le monde: consommation et production. *Cahiers Agriculture* 18, 82-90.
- Cipriano, R.C., Holt, R.A. 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome. In *Fish Disease Leaflet N° 86* (United States Department of Interior, U.S. Geological Service National Fish Health Research Laboratory).
- Cracraft, J., 1983, Species concept and speciation analysis, In: Johnson, R.F. (Ed.) *Current ornithology*. Plenum Press, New York, pp. 159-187.
- Crump, E.M., Perry, M.B., Clouthier, S.C., Kay, W.W., 2001, Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 750-759.
- Dalsgaard, I., 1993, Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 127-144.

- Davis, H.S. 1946. Care and diseases of trout. In United States Fish and Wildlife Service Research Report (Washington DC).
- Decostere, A., D'Hease, E., Lammens, M., Nelis, H., Haesebrouck, F., 2001, *In vivo* study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), spleen phagocytes. J. Fish Dis. 24, 481-487.
- Del Cerro, A., Márquez, I., Prieto, J.M., 2010, Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. J. Fish Dis. 33, 285-291.
- Del Cerro, A., Mendoza, M.C., Guijarro, J.A., 2002, Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. J. Appl. Microbiol. 93, 149-156.
- Dice, L.R., 1945, Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26, 297-302.
- Djelouadji, Z., Arnold, C., Gharbia, S., Raoult, D., Drancourt, M., 2008, Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. PLoS One 3, e2433.
- Drancourt, M., Roux, V., Dang, L., L, T.-H., D, C., Chenal-Francisque, V., Ogata, H., Fournier, P.E., Crubezy, E., Raoult, D., 2004, Genotyping, orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. Emerg. Infect. Dis. 10, 1585-1592.
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J.F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R., Caron, C., Bessieres, P., Gibrat, J.-F., Claverol, S., Dumetz, F., Le Henaff, M., Benmansour, A., 2007, Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Nat. Biotechnol. 25, 763-769.
- Dumetz, F., Duchaud, E., Claverol, S., Orioux, N., Papillon, S., Lapailierie, D., Le Henaff, M., 2008, Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics. Microbiology 154, 1793-1801.

- Ekman, E., 2008. Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish. Ph. D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Ekman, E., Borjeson, H., Johansson, N., 1999, *Flavobacterium psychrophilum* in baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. Dis. Aquat. Organ. 37, 159-163.
- Ekman, E., Norrgren, L., 2003, Pathology and immunohistochemistry in three species of salmonids after experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*. J. Fish Dis. 26, 529-538.
- Evensen, Ø., Lorenzen, E., 1996, An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Dis. Aquat. Organ. 25, 53-61.
- Ewing, B., Green, P., 1998, Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. Genome Res. 8, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998, Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. Genome Res. 8, 175-185.
- FAO 2008. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004, eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 186, 1518 - 1530.
- Fujiwara-Nagata, E., Eguchi, M., 2009, Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. J. Fish Dis. 32, 873-881.
- Fujiwara-Nagata, E., Ikeda, J., Sugahara, K., Eguchi, M., 2012, A novel genotyping technique for distinguishing between *Flavobacterium psychrophilum* isolates virulent and avirulent to ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis* (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis. 35, 471-480.

- Garaizar, J., Rementeria, A., Porwollik, S., 2006, DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? FEMS Immunol. Med. Mic. 47, 178-189.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001, Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol. Lett. 205, 31-36.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005, *Coxiella burnetii* genotyping. Emerg. Infect. Dis. 11, 1211-1217.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998, Consed: A graphical tool for sequence finishing. Genome Res. 8, 195-202.
- Grimont, F., Grimont, P.A.D., 1986, Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie 137, 165-175.
- Guichard, B., 2004, Principaux résultats de l'enquête "Pathologie de poissons 2004". Bulletin Epidémiologique Santé animale-alimentation 15, 5-6.
- Gultepe, N., Tanrikul, T.T., 2006, Treatment methods of *Flavobacterium psychrophilum*: cause of rainbow trout fry syndrome (RFTS) and bacterial coldwater disease (BCWD) in Turkey. Journal of Fisheries International 1, 102-105.
- Hall, B.G., 1991, Increased rates of advantageous mutations in response to environmental challenges. ASM News 57, 82-86.
- Hall, T.A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95-98.
- Hamouda, A., Evans, B.A., Towner, K.J., Amyes, S.G.B., 2010, Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes. J. Clin. Microbiol. 48, 2476-2483.

- Henri, H., Mouton, L., 2012, High-Resolution Melting technology: a new tool for studying the *Wolbachia* endosymbiont diversity in the field. *Mol. Eco. Resour.* 12, 75-81.
- Henríquez-Nuñez, H., Evrard, O., Kronvall, G., Avendaño-Herrera, R., 2012, Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354-355, 38-44.
- Hesami, S., Allen, K.J., Metcalf, D., Ostland, V.E., Mac Innes, J.I., Lumsden, J.S., 2008, Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. *Can. J. Microbiol.* 54, 619-629.
- Himmelreich, R., Plagens, H., Hilbert, H., Reiner, B., Herrmann, R., 1997, Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acid Res.* 25, 701-712.
- Hinchliffe, S.J., Isherwood, K.E., Stabler, R.A., Prentice, M.B., Rakin, A., Nichols, R.A., Oyston, P.C.F., Hinds, J., Titball, R.W., Wren, B.W., 2003, Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res.* 13, 2018-2029.
- Högfors-Rönholm, E., Wiklund, T., 2010, Phase variation in *Flavobacterium psychrophilum*: characterization of two distinct colony phenotypes. *Dis. Aquat. Organ.* 90, 43-53.
- Holt, R.A., 1987. *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold water disease in salmonid fish. Oregon State University, Corvallis.
- Holt, R.A., 1988, *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. *Dissertation Abstracts International, B (Sciences and Engineering)* 49, 605.
- Holt, R.A., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1993, Bacterial cold-water disease, In: Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R. (Eds.) *Bacterial Diseases of Fish*. Wiley-Blackwell, New York, pp. 3-22.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006, Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254-267.

- Izumi, S., Aranishi, F., 2004, Relationship between *gyrA* mutations and quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3968-3972.
- Izumi, S., Aranishi, F., Wakabayashi, H., 2003a, Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Organ.* 56, 207-214.
- Izumi, S., Fujii, H., Aranishi, F., 2005, Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *J. Fish Dis.* 28, 559-564.
- Izumi, S., Liu, H., Aranishi, F., Wakabayashi, H., 2003b, A novel serotype of *Flavobacterium psychrophilum* detected using antiserum against an isolate from amago, *Oncorhynchus masou rhodurus* Jordan & Gilbert, in Japan. *J. Fish Dis.* 26, 677-680.
- Izumi, S., Ouchi, S., Kuge, T., Arai, H., Mito, T., Fujii, H., Aranishi, F., Shimizu, A., 2007, PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 30, 141-147.
- Izumi, S., Wakabayashi, H., 1999, Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathol.* 34, 89-90.
- Izumi, S., Wakabayashi, H., 2000, Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* 35, 93-94.
- Jaccard, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44, 223-270.
- Jayarao, B.M., Dore Jr., J.J., Baumbach, G.A., Matthews, K.R., Oliver, S.P., 1991, Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2774-2778.
- Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.-S., Maiden, M.C.J., 2001, Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230-1231.



- Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000, Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182, 2928-2936.
- Keim, P., Van Ert, M.N., Pearson, T., Vogler, A.J., Huynh, L.Y., Wagner, D.M., 2004, Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol.* 4, 205-213.
- Kent, M.L., Groff, J.M., Morrison, J.K., Yasutake, W.T., Holt, R.H., 1989, Spiral swimming behavior due to cranial and vertebral lesions associated with *Cytophaga psychrophila* infections in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Organ.* 6, 11-16.
- Kidd, T.J., Grimwood, K., Ramsay, K.A., Rainey, P.B., Bell, S.C., 2011, Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 263-268.
- Kim, J.H., Gomez, D.K., Nakai, T., Park, S.C., 2010a, Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. *Vet. Microbiol.* 140, 109-115.
- Kim, J.H., Gomez, D.K., Nakai, T., Park, S.C., 2010b, Plasmid profiling of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) and other fish species in Japan. *J. Vet. Sci.* 11, 85-87.
- Kondo, M., Kawai, K., Okabe, M., Nakano, N., Oshima, S.-I., 2003, Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Organ.* 55, 261-264.
- Kondo, M., Kawai, K., Yagy, K.-I., Nakayama, K., Kurohara, K., Oshima, S.-I., 2001, Changes in the cell structure of *Flavobacterium psychrophilum* with length of culture. *Microbiology and immunology* 45, 813-818.
- Kumagai, A., 2005, Bacterial coldwater disease in coho salmon. *J Japan Soc Fisheries Sci* 71, 645-649.

- Kumagai, A., Nawata, A., 2010a, Mode of the intra-ovum infection of *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid eggs. *Fish Pathol.* 45, 31-36.
- Kumagai, A., Nawata, A., 2010b, Prevention of *Flavobacterium psychrophilum* vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathol.* 45, 164-168.
- Kumagai, A., Nawata, A., 2011, Concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the ovarian fluid and milt of cultured salmonids. *Fish Pathol.* 46, 116-119.
- Kumagai, A., Nawata, A., Ototake, M., 2011, The prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* among wild ayu in rivers that do not have a history of ayu stocking. *Fish Pathol.* 46, 91-94.
- Kumagai, A., Takahashi, K., 1997, Imported eggs responsible for the outbreaks of cold-water disease among cultured coho salmon in Japan. *Fish Pathol.* 32, 231-232.
- Kumagai, A., Takahashi, K., Yamaoka, S., Wakabayashi, H., 1998, Ineffectiveness of iodophore treatment in disinfecting salmonid eggs carrying *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.* 33, 123-128.
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Call, D.R., Wiens, G.D., Cain, K.D., 2009, Proteomic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* cultured in vivo and in iron-limited media. *Dis. Aquat. Organ.* 87, 171-182.
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Call, D.R., Wiens, G.D., Cain, K.D., 2011, Identification of immunogenic proteins within distinct molecular mass fractions of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 34, 823-830.
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., Cain, K.D., 2004, Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 17-26.
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., Congleton, J.L., Sun, B., Cain, K.D., 2002, Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent

- survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. J. Fish Dis. 25, 703-713.
- Le Fleche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F., Vergnaud, G., 2001, A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. C7 - 2 1, 1-14.
- Lefebure, T., Stanhope, M.J., 2007, Evolution of the core and pangenome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. Genome Biol. 8, R71.
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E., 2009, Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol. Rev. 33, 892-916.
- Librado, P., Rozas, J., 2009, DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25, 1451-1452.
- Lindstrom, N.M., Call, D.R.L., Moffitt, C.M., Cain, K.D., 2009, A quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Filtration-Based Fluorescent Antibody test as potential tools to screen broodstock for infection with *Flavobacterium psychrophilum*. J. Aquat. Anim. Health 21, 43-56.
- Lorenzen, E., 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to Rainbow trout Fry Syndrome (RTFS). Ph. D. thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Lorenzen, E., Brudeseth, B.E., Wiklund, T., Lorenzen, N., 2010, Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge. Fish Shellfish Immun. 28, 440-444.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., Bernardet, J.F., 1997, Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I : phenotypic and genomic studies. Dis. Aquat. Organ. 3, 208.

- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., From, J., Hansen, E.M., Horlyck, V., Korsholm, H., Mellergaard, S., Olesen, N.J., 1991, Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bull. Eur. Assn. Fish P. 11, 77-79.
- Lorenzen, E., Karas, N., 1992, Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from mortality syndrome: a rapid diagnostic method. Dis. Aquat. Organ. 13, 231-234.
- Lorenzen, E., Olesen, N.J., 1997, Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. Dis. Aquat. Organ. 31, 209-220.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., Ferguson, H.W., 1996, Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. J. Fish Dis. 19, 113-119.
- Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., Lanotte, P., Mastouri, M., Elghmati, M.S., Rojo, F., Mejd, S., Giske, C.G., 2011, Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five mediterranean countries: Evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS One 6, e25617.
- MacPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J., Gajadhar, A.A., 1993, Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. Mol. Cell. Probe. 7, 293-299.
- Madetoja, J., Hänninen, M.L., Hirvelä-Kosk, i.V., Dalsgaard, I., Wiklund, T., 2001, Phenotypic and genotypic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from Finnish fish farms. J. Fish Dis. 24, 469-479.
- Madetoja, J., Nyman, P., Wiklund, T., 2000, *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Organ. 43, 27-38.
- Madetoja, J., Wiklund, T., 2002, Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. Syst. Appl. Microbiol. 25, 259-266.

- Madsen, L., Arnbjerg, J., Dalsgaard, I., 2001, Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. *Aquaculture Research* 32, 235-241.
- Madsen, L., Dalsgaard, I., 1999, Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* 36, 169-176.
- Madsen, L., Dalsgaard, I., 2000, Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence. *J. Fish Dis.* 23, 211-218.
- Madsen, L., Dalsgaard, I., 2008, Water recirculation and good management: potential methods to avoid disease outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 31, 799-810.
- Madsen, L., Møller, J.D., Dalsgaard, I., 2005, *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. *J. Fish Dis.* 28, 39-47.
- Magurran, A.E., 2004, *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998, Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 3140-3145.
- Maki, H., 2002, Origins of spontaneous mutations: Specificity and Directionality of Base-Substitution, Frameshift, and Sequence-Substitution Mutageneses. *Annu. Rev. Genet.* 36, 279-303.
- Martino, M.E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., Cardazzo, B., 2011, Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4986-5000.

- Mata, M., Skarmeta, A., Santos, Y., 2002, A proposed serotyping system for *Flavobacterium psychrophilum*. Lett. Appl. Microbiol. 35, 166-170.
- McCullough, M.J., Clemons, K.V., McCusker, J.H., Stevens, D.A., 1998, Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. J. Clin. Microbiol. 36, 1035-1038.
- Mokrousov, I., Vyazovaya, A., Kolodkina, V., Limeschenko, E., Titov, L., Narvskaya, O., 2009, Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28, 701-703.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.
- Myers, R.M., Maniatis, T., Lerman, L.S., 1987, Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol. 155, 501-527.
- Nagai, T., Nakai, T., 2011, Growth of *Flavobacterium psychrophilum* in fish serum correlates with pathogenicity. J. Fish Dis. 34, 303-310.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V., Øvreås, L., 2000, Soil community analysis using DGGE Of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil Sci. Soc. Am. J. 64, 1382-1388.
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2003, Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Organ. 55, 101-107.
- Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J.F., Duchaud, E., 2008, Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. Appl. Environ. Microbiol. 74, 3702-3709.
- Nilsen, H., Johansen, R., Colquhoun, D., Kaada, I., Bottolfsen, K., Vågnes, Ø., Olsen, A.B., 2011, *Flavobacterium psychrophilum* associated with septicemia and necrotic myositis in Atlantic salmon *Salmo salar*: a case report. Dis. Aquat. Organ. 97, 37-46.

- Nilsson, W.B., Strom, M.S., 2002, Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 175-185.
- Obach, F., Baudin Laurencin, F., 1991, Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Dis. Aquat. Organ.* 12, 13-15.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002, Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691-3701.
- Orieux, N., Bourdineaud, J.P., Douet, D.G., Daniel, P., Le Hénaff, M., 2011, Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), tissues by qPCR. *J. Fish Dis.* 34, 811-821.
- Ostland, V.E., Byrne, P.J., Hoover, G., Ferguson, H.W., 2000, Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 23, 329-336.
- Pacha, R.E., 1968, Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated from outbreaks of bacterial cold-water disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 16, 97-101.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H.M., Whitehead, S., Barrell, B.G., 2000, The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665-668.
- Parveen, S., Portier, K.M., Robinson, K., Edmiston, L., Tamplin, M.L., 1999, Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3142-3147.
- Pasricha, R., Chandolia, A., Ponnann, P., Saini, N., Sharma, S., Chopra, M., Basil, M., Brahmachari, V., Bose, M., 2011, Single nucleotide polymorphism in the genes of

- mce1* and *mce4* operons of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of clinical isolates and standard reference strains. BMC Microbiol. 11, 41.
- Plant, K.P., LaPatra, S.E., Cain, K.D., 2009, Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. J. Fish Dis. 32, 521-534.
- Plant, K.P., LaPatra, S.E., Call, D.R., Cain, K.D., 2011, Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with *Flavobacterium psychrophilum* proteins elongation factor-Tu, SufB Fe-S assembly protein and ATP synthase $\beta$ . J. Fish Dis. 34, 247-250.
- Price, E.P., Smith, H., Huygens, F., Giffard, P.M., 2007, High Resolution DNA Melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 3431-3436.
- Rahman, M.H., Kuroda, A., Dijkstra, J.M., Kiryu, I., Nakanishi, T., Ototake, M., 2002, The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. Fish Shellfish Immunol. 12, 169-179.
- Rahman, M.H., Ototake, M., Iida, Y., Yokomizo, Y., Nakanishi, T., 2000, Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathol. 35, 199-203.
- Ramsrud, A.L., LaFrentz, S.A., LaFrentz, B.R., Cain, K.D., Call, D.R., 2007, Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. J. Fish Dis. 30, 175-180.
- Rangdale, R.E., 1995. Studies on Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). Ph. D. thesis. University of Stirling, Stirling.
- Rangdale, R.E., 1999, Rainbow trout fry syndrome. Bull. Eur. Assn. Fish P. 19, 295.
- Rangdale, R.E., Way, K., 1995, Rapid identification of *Cytophaga psychrophila* from infected spleen tissue using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull. Eur. Assn. Fish P. 15, 213-216.



- Rimbara, E., Noguchi, N., Yamaguchi, T., Narui, K., Kawai, T., Sasatsu, M., 2005, Development of a highly sensitive method for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from human feces. *Cur. Microbiol.* 51, 1-5.
- Rogozin, I.B., Pavlov, Y.I., 2003, Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* 544, 65-85.
- Rosselló -Mora, R., Amann, R., 2001, The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25.
- Ryumae, U., Hibi, K., Yoshiura, Y., Ren, H., Endo, H., 2010, Rapid and highly sensitive detection of *Flavobacterium psychrophilum* using high gradient immunomagnetic separation with flow cytometry. *Aquaculture* 309, 125-130.
- Ryumae, U., Hibi, K., Yoshiura, Y., Ren, H., Endo, H., 2012, Ultra highly sensitive method for detecting *Flavobacterium psychrophilum* using high-gradient immunomagnetic separation with a polymerase chain reaction. *Aquacult. Res.* 43, 929-939.
- Saitou, N., Nei, M., 1987, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984, Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Silver, A.C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A.J., Gogarten, J.P., Graf, J., 2011, Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *PLoS One* 6, e16751.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M., Spratt, B.G., 1993, How clonal are bacteria? *PNAS* 90, 4384-4388.
- Snelling, A.M., Gerner-Smidt, P., Hawkey, P.M., Heritage, J., Parnell, P., Porter, C., Bodenham, A.R., Inglis, T., 1996, Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1193-1202.

- Sobral, D., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., Vu-Thien, H., Hormigos, K., Lebeau, B., Loisy-Hamon, F., Munck, A., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2012, A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 2247-2256.
- Soule, M., Cain, K., LaFrentz, S., Call, D.R., 2005a, Combining suppression subtractive hybridization and microarrays to map the intraspecies phylogeny of *Flavobacterium psychrophilum*. *Infect. Immun.* 73, 3799-3802.
- Soule, M., LaFrentz, S., Cain, K., LaPatra, S., Call, D.R., 2005b, Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. *Dis. Aquat. Organ.* 65, 209-216.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B., 2002, Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043-1047.
- Starliper, C.E., 2010, Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* 2, 97-108.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Taylor, P.W., 2004, Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in eggs and sexual fluids of pacific salmonids by a Polymerase Chain Reaction assay: implications for vertical transmission of bacterial coldwater disease. *J. Aquat. Anim. Health* 16, 104 - 108.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Tibayrenc, M., 1998, Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85-104.

- Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H., 1994, Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.* 29, 271-275.
- Treangen, T.J., Abraham, A.-L., Touchon, M., Rocha, E.P.C., 2009, Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 539-571.
- Turner, K.M.E., Feil, E.J., 2007, The secret life of the multilocus sequence type. *Int. J. AG* 29, 129-135.
- Urdaci, M.C., Chakroun, C., Faure, D., Bernardet, J.F., 1998, Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Res. Microbiol.* 149, 519-530.
- Valdebenito, S., Avendaño-Herrera, R., 2009, Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *J. Fish Dis.* 32, 321-333.
- Van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H., Tibayrenc, M., 2001, Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 547-560.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007, Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infec.* 13, 1-46.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996, Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407 - 438.
- Vatsos, I.N., Thompson, K.D., Adams, A., 2001, Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 178-182.

- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R., 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* 19, 6823-6831.
- Vimont, S., Mnif, B., Fevre, C., Brisse, S., 2008, Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Med. Microbiol.* 57, 1308-1310.
- Vogel, L., Jones, G., Triep, S., Koek, A., Dijkshoorn, L., 1999, RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clin. Microbiol. Infect.* 5, 270-276.
- Vos, M., Didelot, X., 2008, A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J.* 3, 199-208.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.v.d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23, 4407-4414.
- Wagner, E.J., Oplinger, R.W., Arndt, R.E., Forest, A.M., Bartley, M., 2010, The safety and effectiveness of various hydrogen peroxide and iodine treatment regimens for rainbow trout egg disinfection, Vol 72. American Fisheries Society, Bethesda, MD, ETATS-UNIS, 9 p.
- Wakabayashi, H., Toyama, T., Iida, T., 1994, A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.* 29, 101-104.
- Wang, X.-M., Noble, L., Kreiswirth, B.N., Eisner, W., McClements, W., Jansen, K.U., Anderson, A.S., 2003, Evaluation of a multilocus sequence typing system for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 52, 989-998.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, P., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Star, M.P., Truper, H.G., 1987, Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463-464.

- Welsh, J., McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18, 7213-7218.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E.M., McDowell, C.I., McDonough, P.L., Batt, C.A., 1996, Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1086-1090.
- Wiklund, T., Madsen, L., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., 2000, Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *J. Appl. Microbiol.* 88, 299-307.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18, 6531-6535.
- Wisniewski-Dyé, F., Vial, L., 2008, Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. *Antonie van Leeuwenhoek* 94 (4), 493-515.
- Wittwer, C.T., 2001, Making DNA melting useful. *Clin. Chem.* 56, 1500-1501.
- Woo, P., Teng, J., Tsang, A., Tse, H., Tsang, V., Chan, K.-M., Lee, E., Chan, J., Ma, S., Tam, D., Chung, L., Lau, S., Yuen, K.-Y., 2009, Development of a multi-locus sequence typing scheme for *Laribacter hongkongensis*, a novel bacterium associated with freshwater fish-borne gastroenteritis and traveler's diarrhea. *BMC Microbiol.* 9, 21.
- Wood, E.M., Yasutake, W.T., 1956, Histopathology of Fish: III. Peduncle (Cold-Water ) Disease. *Prog. Fish-Cult.* 18, 58-61.
- Yoshino, K., Nishigaki, K., Husimi, Y., 1991, Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acid Res.* 19, 3153.
- Yousif, A.N., Albright, W., Evelyn, T.P.T., 1994, *In vitro* evidence for the antibacteriarial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Organ.* 19, 15-19.

Zhang, S.L., Shen, J.G., Xu, P.H., Li, D.X., Sun, Z.Q., Li, L., Yang, Z.R., Sun, Q., 2007, A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe array. J. Appl. Microbiol. 103, 1262-1271.

# **Annexes**





## Annexe 1 : Préparation des milieux de culture

### 1. Milieux FLP

<b>Composants</b>	<b>Quantités</b>		<b>Références</b>
	<b>Gélose FLP</b>	<b>Bouillon FLP</b>	
Tryptone (Bacto Tryptone)	4 g	4 g	BD, France
Extrait de levure (Yeast extract)	0,4 g	0,4 g	Oxoid, France
CaCl <sub>2</sub> (2 H <sub>2</sub> O)	0,2 g	0,2 g	Panréac, France
MgSO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O)	0,5 g	0,5 g	Panréac, France
Glucose	0,5 g	0,5 g	Labogros, France
Agar (Agar N°1)	10 g	---	Oxoid, France
Eau q.s.p.	1000 mL	1000 mL	---

Stérilisation pendant 15 minutes à 121°C. Pour le bouillon FLP, le pH doit être de 7,2 à 25°C.

### 2. Milieu TSA

<b>Composants</b>	<b>Quantités</b>	<b>Références</b>
TSA (en g/L Tryptone : 15 Peptone papaïnique de soja : 5 Chlorure de sodium : 5 Agar agar bactériologique : 15)	40 g	Biokar Diagnostics
Eau q.s.p.	1000 mL	---

## **Annexe 2 : Solutions utilisées pour la PFGE**

### **1. Préparation des solutions mères**

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration de la solution mère à obtenir</b>	<b>Quantité de réactif à peser</b>	<b>Eau qsp</b>
Sarcosyl	10 %	5 g	50 mL
EDTA	0,5 M	37,23 g	200 mL
Tris base	1 M	12,14 g	100 mL

*Remarque* : pour dissoudre l'EDTA (1 M) ajouter des pastilles de soude

### **2. Tampon TE**

pH 8. Qsp 1000 mL d'eau ultrapure

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration de la solution mère</b>	<b>Concentration finale dans le tampon</b>	<b>Volume de solution mère</b>
Tris base	1 M	10 mM	10 mL
EDTA	0,5 M	1 mM	2 mL

### **3. Tampon Cell Suspension**

pH8. Qsp 100 mL d'eau ultrapure

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration de la solution mère</b>	<b>Volume de solution mère</b>	<b>Concentration finale dans le tampon</b>
Tris base	1 M	10 mL	100 mM
EDTA	0,5 M	20 mL	100 mM

## 4. Tampon de lyse

pH 8. Qsp 500 mL d'eau ultrapure

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration de la solution mère</b>	<b>Concentration finale dans le tampon</b>	<b>Volume de solution mère</b>
Tris base	1 M	50 mM	25 mL
EDTA	0,5 M	50 mM	50 mL
Sarcosyl 10 %	10%	1%	50 mL

## 5. Références et fournisseurs des réactifs et agarose utilisés en PFGE

<b>Réactif</b>	<b>Nom commercial</b>	<b>Fournisseur</b>
EDTA	Gen-apex	VWR (BDH Prolabo), France
Sarcosyl	N- lauroylsarcosine sodium salt	Sigma, France
Tris	Tris base (500 g)	Eurobio, France
Proteinase K	Proteinase K (100mg)	Promega, France
<i>Sal</i> I	<i>Sal</i> I	Ozyme, France
Marqueur de taille	MidRange II PFG Markers	New England Biolabs, France
Pulsed Field Certified Agarose	Pulsed Field Certified Agarose (100g)	Biorad, France
SDS 20%	SDS 20%	Biorad, France
TBE	TBE 5X	Prime, France

## **Annexe 3 : Fiche commémorative pour l'échantillon « arc Atlantique »**



<p><b>QUESTIONNAIRE D'ENQUETE SOUCHES DE TERRAIN PRELEVEMENT DE YERSINIA RUCKERI ET/OU FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM</b></p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Nom du vétérinaire préleveur :**

**Date du prélèvement (J0) :**

**Nom de la pisciculture :**

Adresse (code postal, ville) :

Numéro de téléphone :

Numéro de la pisciculture (n°GDSAA) :

Alimentation en eau (source, forage, ... si rivière : son nom) :

Température de l'eau :                    °C (matin entre 7h-8h) et                    °C (soir entre 17h-18h)

Espèce (truite arc-en-ciel, truite fario...) :

Catégorie du lot : A1 = Alevins, P = Juvéniles ou adultes, G = Géniteurs

Poids moyen (g) :

Pisciculture d'origine des œufs ou alevins :

Nom et adresse :

Numéro de lot :

Numéro de bassin :

Densité du bassin (kg/m<sup>3</sup>) :

Biomasse totale du bassin (kg) :

Débit moyen journalier dans le bassin (m<sup>3</sup>/h) :

Taux d'oxygène en sortie de bassin ~ 2h après le dernier repas (ppm) :

**Vaccinations éventuellement effectuées sur le lot :**

Valence :

Dates de primo vaccination :

Poids moyen :

Balnéation

Voie orale

Injection

Nom du vaccin utilisé (CEVA, Schering, autovaccin..) :

Dates de rappel :

Poids moyen :

Balnéation

Voie orale

Injection

Nom du vaccin utilisé (CEVA, Schering, autovaccin..) :

Dates de rappel :

Poids moyen :

Balnéation

Voie orale

Injection

Nom du vaccin utilisé (CEVA, Schering, autovaccin..) :

Valence :

Dates de primo vaccination :

Poids moyen :

Balnéation                       Voie orale                       Injection

Nom du vaccin utilisé (CEVA, Schering, autovaccin..) :

Dates de rappel :

Poids moyen :

Balnéation                       Voie orale                       Injection

Nom du vaccin utilisé (CEVA, Schering, autovaccin..) :

Dates de rappel :

Poids moyen :

Balnéation                       Voie orale                       Injection

Nom du vaccin utilisé (CEVA, Schering, autovaccin..) :

**Traitement antibiotique précédent (joindre copie ordonnance du vétérinaire)**

(Pour les définitions et les unités, voir ci-dessous).

Dates du traitement précédent :

Nom complet du médicament :

Taux de nourrissage effectif (% biomasse/ jour) :

Concentration de l'antibiotique dans l'aliment médicamenteux :

Appétit apparemment conservé : oui                       non

Efficacité clinique : oui  non

**Traitement antibiotique actuel ou prévu (joindre copie ordonnance du vétérinaire)**

Dates du traitement :

Nom complet du médicament :

*Médicament préparé à partir d'un premix*

Nombre total de poisson dans le bassin:

Taux de nourrissage effectif (% biomasse/ jour) <sup>1</sup> :

Nombre d'administration journalière de l'aliment médicamenteux :

Préciser le taux d'incorporation du premix (kg premix/tonne d'aliment) et les quantités d'aliment contenant du médicament distribuées au lot atteint (en kg pour le lot atteint) :

	Jour 1 et Jour 2			Jour 3 à Jour : _____		
Taux d'incorporation Premix <sup>2</sup>						
	Ration matin	Ration midi	Ration soir	Ration matin	Ration midi	Ration soir
Quantité aliments (kg)						

*Médicament sous forme liquide mélangé à l'aliment*

Nombre total de poisson dans le bassin:

Taux de nourrissage effectif (% biomasse/ jour) <sup>3</sup> :

<sup>1</sup> Taux de nourrissage = ration quotidienne (kg d'aliment/100kg poisson/j)

<sup>2</sup> Taux d'incorporation du Premix (kg Premix / tonne d'aliment)

Nombre d'administration journalière de l'aliment médicamenteux :

Préciser le volume de médicament sous forme liquide (mL/100kgPC/j) et les quantités d'aliment contenant du médicament distribuées au lot atteint (en kg pour le lot atteint) :

	Jour 1 et Jour 2			Jour 3 à Jour : _____		
Volume de médicament <sup>4</sup>						
	Ration matin	Ration midi	Ration soir	Ration matin	Ration midi	Ration soir
Quantité aliments (kg)						

Appétit apparemment conservé : oui  non

Maladie intercurrente (parasite, virus, bactérie...), si oui lesquelles:

Nombre d'épisodes cliniques de : yersiniose  flavobactériose

relevés sur la bande depuis l'éclosion / l'arrivée sur site et avant l'épisode actuel si épisode.

### **Relevé des mortalités**

Mortalité depuis le premier jour où un taux anormal est détecté jusqu'au retour à la normale (sinon 5 jours après la fin du traitement).

Indiquer dans le tableau la date du début et de fin du traitement (TT) et J0 : jour de l'ensemencement pour l'isolement des souches

<sup>3</sup> Taux de nourrissage = ration quotidienne (kg d'aliment/100kg poisson/j)

<sup>4</sup> en mL / 100 kg de poissons/j



Jour	Date début TT	Date fin TT	% morts/j	nbre poissons morts/j	Variations de la qualité de l'eau
J-10					
J-9					
J-8					
J-7					
J-6					
J-5					
J-4					
J-3					
J-2					
J-1					
<b>J0</b>					
J1					
J2					
J3					
J4					
J5					
J6					
J7					
J8					
J9					
J10					
J11					
J12					
J13					
J14					
J15					

Autres éléments important à signaler pouvant influencer l'évolution de la maladie, l'efficacité du traitement, ... :

## **Annexe 4 : Fiches relatives à l'échantillonnage dans un bassin versant breton**

### **1. Fiche de renseignement**

#### Fiche de renseignement du site de prélèvement (Echantillonnage de *Flavobacterium psychrophilum*)

<b>Structure</b>	
Nom	
Adresse	
Numéro de téléphone	
Site web	
Alimentation en eau (source, rivière, forage...), précisez le nom	
Présence d'autres sites sur la rivière	Oui Non  Si oui, lesquels En amont :  En aval :
<b>Production</b>	
Espèces présentes sur le site	
Catégories	Géniteurs Œufs Alevins Juvéniles Adultes
Origine (nom et adresse) pour chaque catégorie	Œufs :  Alevins / truitelles:
Nombre de bassins par catégorie	Alevins : Juvéniles : Adultes :

## Gestion sanitaire et Historique de la prévention

Vétérinaire traitant habituel	
Adhésion à un GDS	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non  Si oui, lequel :
Suivi d'un protocole HACCP	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
Nettoyage des bassins	Fréquence :  Méthode :
Qualité de l'eau	Fréquence de mesure :  Méthode :
Traitement des œufs	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si oui, lequel
Vaccination des lots	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si oui, de quelle façon
Fréquence de pertes dans les bassins	<input type="checkbox"/> Tous les jours <input type="checkbox"/> 3fois/semaine <input type="checkbox"/> 2fois/semaine <input type="checkbox"/> 1fois/semaine <input type="checkbox"/> Autre, précisez
Pourcentage moyen de mortalité à chaque épisode clinique	

## Historique des maladies (depuis 2009)

Bactérioses	<input type="checkbox"/> Yersiniose <input type="checkbox"/> Flavobactériose <input type="checkbox"/> Autre, précisez
Traitements	Yersiniose :  Flavobactériose :  Autre, précisez :
Autres maladies	<input type="checkbox"/> Viroses, précisez : <input type="checkbox"/> Parasitoses, précisez

## Remarques

## 2. Fiche commémorative

### FICHE DE VISITE (Echantillonnage de *Flavobacterium psychrophilum*)

**Site :**

**Date :**

**Catégorie**

- Œufs
- Alevins
- Truitelles
- Adultes

Numéro de lot			
Identification du bassin (numéro...)			
Densité du bassin (kg/m <sup>3</sup> )	Minimale : Maximale :		
Caractéristique de l'eau	Température : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Matin (7h-8h) :</li> <li>○ soir (17h-18h):</li> </ul> pH : Débit journalier dans les bassins <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Moyen :</li> <li>○ Minimum :</li> </ul> Maximum :		
Oxygénation	Mode: Taux en sortie de bassin (2h après le dernier repas):      ppm		
Alimentation	Fabricant : Mode de distribution : Taux de nourrissage :		
Vaccination éventuelle sur le lot	date	Nom du vaccin	Moyen *
Traitement antibiotique	date	Nom du médicament	Efficacité clinique

\* **B** = Balnéation ; **VO** = Voie orale ; **I** = Injection

## **Annexe 5 : Liste des logiciels utilisés dans l'étude et leur lien de téléchargement et/ou utilisation on-line**

### **1. Traitement de séquences**

- BioEdit

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

- Consed, Phred and Phrap: outils de traitement des séquences (assemblage, alignement et manipulations diverses)

<http://www.phrap.org/consed/consed.html#howToGet>

- DnaSP version 5: analyse du polymorphisme dans un alignement de séquences

<http://www.ub.edu/dnasp/>

- MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis): outils d'analyses multiples de séquences (alignement de séquences automatique et manuel, construction d'arbres phylogénétiques, l'exploitation de bases de données on line...)

<http://www.megasoftware.net/>

- SplitsTree version 4.12.3: analyses des liens phylogénétiques à partir d'un alignement de séquences

(<http://www.splitstree.org/>)

### **2. Traitement de données MLST**

- e-BURST: observation des liens entre génotypes définis par la méthode MLST

[http://eburst.mlst.net/v3/enter\\_data/single/](http://eburst.mlst.net/v3/enter_data/single/)

- LIAN 3.5 : outil de détection de déséquilibre de liaison

<http://pubmlst.org/analysis/>)

- START 2 (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests): sélection d'outils pour l'analyse de données MLST (<http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>)

### **3. Traitements d'images**

- Quantity One (Bio-Rad, France): logiciel d'acquisition et analyse d'image pour les systèmes d'imagerie Bio-Rad  
<http://www.bio-rad.com/prd/fr/FR/adirect/biorad?cmd=catProductDetail&vertical=LSR&country=FR&lang=fr&productID=170-9600>
- BioNumerics (module GelCompar II): logiciel de traitement d'image et analyses diverses (normalisation de profils, détermination de poids moléculaires, comparaison et clusterisations de profils...)  
<http://www.applied-maths.com/download/software.htm>

### **4. Outils statistique**

- SAS statistical software version 9.2 (<http://support.sas.com/software/92/index.html>)

# Annexe 6 : Valorisation scientifique

G Model  
VETMIC-5849; No. of Pages 10

ARTICLE IN PRESS

Veterinary Microbiology xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)



## Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex

C. Siekoula-Nguedia<sup>a,b</sup>, G. Blanc<sup>b</sup>, E. Duchaud<sup>c</sup>, S. Calvez<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR1300 Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale, BP 40706, F-44307 Nantes, France

<sup>b</sup>LUNAM Université, Oniris, Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, UMR BioEpAR, F-44307 Nantes, France

<sup>c</sup>INRA, UR892 Virologie et Immunologie Moléculaires, F-78350 Jouy-en-Josas, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 April 2012

Received in revised form 10 July 2012

Accepted 12 July 2012

#### Keywords:

*Flavobacterium psychrophilum*

MLST

Rainbow trout

Salmonid fish

France

### ABSTRACT

*Flavobacterium psychrophilum* is the causative agent of “bacterial cold water disease” and “rainbow trout fry syndrome” in salmonid farming worldwide. These diseases, especially rainbow trout fry syndrome, are among the main hazards for French aquaculture. In this study, a multilocus sequence typing approach (MLST) was used to evaluate the genetic diversity of this bacterium.

Seven housekeeping genes in a set of 66 isolates were investigated. They were recently collected from rainbow trout during clinical episodes in French farms from the two main geographical areas of production. A total of 5808 bp of sequence were analyzed for each isolate and showed relatively low levels of gene ( $H = 0.4313$ ) and nucleotide ( $\pi \times 100 = 0.31\%$ ) diversities. MLST identified 15 sequence types (STs), of which 14 have never been described. eBURST analysis separated the 15 STs in one clonal complex of 8 genetically related STs (with ST2 as founder) and 7 singletons. Genetic diversity was largely due to recombination, as demonstrated by a pairwise homoplasy index ( $\text{PHI} = 5.35 \times 10^{-9}$ ) significantly different from zero ( $p < 0.05$ ). The evolution of standardized association index ( $I_{\lambda}^*$ ) (all isolates: 0.6088,  $p < 0.05$ ; single representative of STs: 0.4567,  $p < 0.05$ ; and clusters of STs: 0.084,  $p > 0.05$ ), showed an epidemic structure of the population.

These results emphasized the expansion of a limited number of dominant genetic variants in French clinical *F. psychrophilum* isolates from a single host species, with no geographic relationships.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Flavobacterium psychrophilum* is a Gram negative bacterium, responsible for rainbow trout fry syndrome (RTFS) and bacterial cold water disease (BCWD), two clinical expressions associated with important economic losses in salmonid fish farming. All salmonid fish

(especially coho salmon and rainbow trout) are susceptible to RTFS and BCWD, as well as some other non-salmonid fish, like cyprinids (Lehmann et al., 1991) and pale chub (*Zacco platypus*) (Iida and Mizokami, 1996). These infections are associated with skin ulcers, necrotic myositis, septicemia as well as exophthalmia (Nematollahi et al., 2003). Vaccines are currently still at the experimental stage (Plant et al., 2009) and treatments rely on antibiotics, with the risk of resistance emergence (Schmidt et al., 2000).

In France, RTFS has been reported as the second major bacteriosis, after furunculosis, affecting breeding fish, particularly rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) (Guichard, 2004). The impact of this disease on

\* Corresponding author at: Oniris, Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, UMR INRA-Oniris BioEpAR (Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale) F-44307 Nantes, France. Tel.: +33 240687675.

E-mail address: [segolene.calvez@oniris-nantes.fr](mailto:segolene.calvez@oniris-nantes.fr) (S. Calvez).



French fish production is considerable, as rainbow trout is the main fish species farmed in France. Information is required about the genetic diversity of *F. psychrophilum*, through the identification of epidemic clones or genetic variants with harmful behavior, in order to define appropriate management strategies to minimize the risks of pathogen introduction or transmission. This knowledge would be useful for future epidemiological monitoring. Several techniques like Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), ribotyping, Fragment Length Polymorphism of PCR products (PCR-RFLP), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Multi Locus Sequence Typing (MLST) have been employed to attain this goal (Li et al., 2009).

In this study, we used the previously published MLST scheme (Nicolas et al., 2008) as MLST is a well-established method for characterizing bacterial populations on the basis of sequence polymorphisms on conserved housekeeping

genes, and enables easy data sharing (Maiden, 2006). We attempted to assess the genetic diversity of *F. psychrophilum* isolates, recently collected from the main French areas of rainbow trout production (Aquitaine and Bretagne), and some from near-by counties in the Atlantic region of France (Pays de la Loire and Poitou Charente), from rainbow trouts with clinical signs.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates and phenotypic identification

Sixty six *F. psychrophilum* isolates were sampled between 2007 and 2010 from four French major rainbow trout producing areas, where cases of BCWD and RTFS are regularly reported. Their geographic origins are presented in Fig. 1. Isolates were collected from farmed trouts

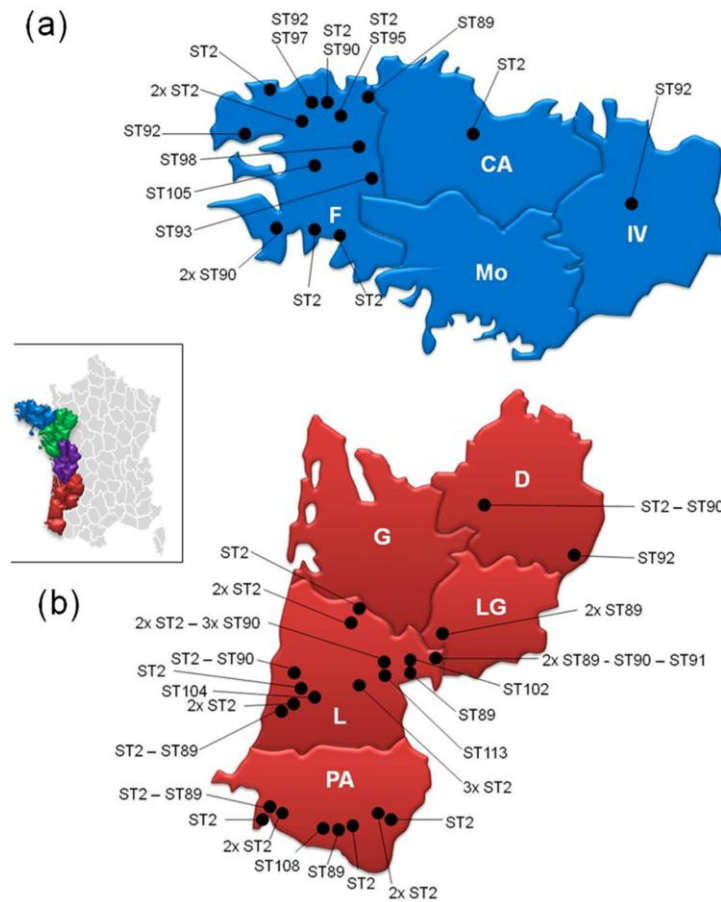


Fig. 1. Geographic origins of French isolates. Regions are indicated by different colours: Bretagne in blue, Pays de la Loire in green, Poitou Charente in violet, and Aquitaine in red. STs recovered from each farm are indicated for the two mains salmonid production regions that are subdivided in departments: (a) Bretagne [Côte d'Armor (CA), Ile et Vilaine (IV), Morbihan (Mo) and Finistère (F)] and (b) Aquitaine [Dordogne (D), Lot et Garonne (LG), Landes (L), Gironde (G) and Pyrénées Atlantiques (PA)]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. Vet. Microbiol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>



presenting clinical signs of flavobacteriosis, by veterinarians or technicians using different sampling protocols. Therefore, some isolates were collected from internal organs like spleen, kidney, liver, and encephalon, and others from external organs like skin, gills and fin (Table 1). Sometimes several samplings were performed at six or more months intervals at a given site (Fig. 1).

Each isolate was grown on FLP agar medium (Cepeda et al., 2004) at 17 °C for 48–72 h. A single developed colony was picked from the FLP agar plates and subcultured. The resulting colonies were selected after a preliminary biochemical and phenotypic characterization, based on Gram negative, catalase positive, and flexirubin pigment positive test results.

**Table 1**

MLST allele types and sequence types of 66 *F. psychrophilum* isolates. Geographic origins are indicated by region and watershed. Isolates were collected from internal (int), external (ext) or unknown organ (unk), and those included into the clonal complex (CC) are indicated by “in”, and the others by “out”. New ATs and STs are underlined.

Isolate	Geographic origin	Watershed	Tissue	Year	Allelic profile							ST	CC
					<i>trpB</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnak</i>	<i>fumC</i>	<i>murG</i>	<i>tuf</i>	<i>atpA</i>		
438	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
439	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
440	Aquitaine	Vignac	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
441	Aquitaine	Garonne	int	2008	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
442	Aquitaine	Vignac	int	2008	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
444	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
445	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
446	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>91</u>	in
448	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
449	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
737	Aquitaine	Magescq	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
738	Aquitaine	Adour	ext	2010	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
739	Aquitaine	Adour	int	2009	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
740	Aquitaine	Adour	ext	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
742	Aquitaine	Magescq	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
743	Aquitaine	Lyere	ext	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
744	Aquitaine	Magescq	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
746	Aquitaine	Adour	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
747	Aquitaine	Adour	int	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
749	Aquitaine	Adour	int	2009	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
755	Aquitaine	Adour	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
756	Aquitaine	Adour	int	2008	2	<u>44</u>	<u>16</u>	3	3	3	3	<u>102</u>	out
759	Aquitaine	Adour	ext	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
760	Aquitaine	Adour	ext	2009	1	<u>49</u>	<u>10</u>	7	<u>20</u>	<u>25</u>	<u>25</u>	<u>104</u>	out
802	Aquitaine	Garonne	unk	2010	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
805	Aquitaine	Dordogne	int	2009	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
806	Aquitaine	Adour	int	2009	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
807	Aquitaine	Adour	ext	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
808	Aquitaine	Adour	ext	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
810	Aquitaine	Adour	int	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
811	Aquitaine	Lyere	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
812	Aquitaine	Dordogne	int	2008	2	2	2	2	2	2	2	2	in
814	Aquitaine	La Palue	int	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
816	Aquitaine	Adour	int	2007	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
817	Aquitaine	Adour	int	2010	1	1	1	2	1	<u>41</u>	1	<u>108</u>	out
818	Aquitaine	Lyere	int	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
820	Aquitaine	Adour	int	2007	2	2	2	2	2	2	2	2	in
822	Aquitaine	Lyere	int	2009	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in
823	Aquitaine	Adour	int	2010	1	1	1	1	1	2	1	<u>90</u>	out
824	Aquitaine	Adour	int	2009	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
825	Aquitaine	Magescq	int	2009	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
829	Aquitaine	Adour	ext	2009	4	<u>29</u>	<u>24</u>	5	6	<u>49</u>	<u>40</u>	<u>113</u>	out
539	Bretagne	Le Guillec	int	2008	3	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>92</u>	in
540	Bretagne	Hyere	int	2008	4	2	2	2	2	2	2	<u>93</u>	in
591	Bretagne	Rivière de Morlaix	unk	2009	4	2	2	2	2	<u>41</u>	2	<u>95</u>	in
607	Bretagne	Le Guillec	ext	2009	<u>29</u>	2	2	2	2	2	2	<u>97</u>	in
626	Bretagne	Penzé	int	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
635	Bretagne	Aulne	int	2008	2	2	2	2	2	<u>48</u>	2	<u>98</u>	in
636	Bretagne	Douron	int	2008	2	2	2	2	2	<u>47</u>	2	<u>89</u>	in
637	Bretagne	Elorn	int	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
687	Bretagne	Elorn	ext	2009	2	2	2	2	2	2	2	2	in
697	Bretagne	Quillimadec	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
721	Bretagne	Le Gouët	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. *Vet. Microbiol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>

Table 1 (Continued)

Isolate	Geographic origin	Watershed	Tissue	Year	Allelic profile							ST	CC
					<i>trpB</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnak</i>	<i>fumC</i>	<i>murG</i>	<i>tuf</i>	<i>atpA</i>		
724	Bretagne	Ster Goz	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
729	Bretagne	Penzé	int	2010	1	1	1	1	1	2	1	90	out
730	Bretagne	Le Corroac'h	int	2010	1	1	1	1	1	2	1	90	out
733	Bretagne	Unknown	int	2010	3	2	2	2	2	41	2	92	in
763	Bretagne	Unknown	int	2010	3	2	2	2	2	41	2	92	in
771	Bretagne	Odet	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
780	Bretagne	Rivière de Morlaix	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
787	Bretagne	Le Corroac'h	int	2010	1	1	1	1	1	2	1	90	out
796	Bretagne	Douffine	int	2010	21	3	22	3	3	2	2	105	out
690	Pays de la Loire	Ruisseau des Loges	ext	2010	4	42	21	5	2	39	40	99	out
718	Pays de la Loire	Unknown	int	2010	2	2	2	2	2	2	2	2	in
741	Poitou Charente	Charente	int	2009	1	1	1	1	1	2	1	90	out
745	Poitou Charente	Charente	int	2010	3	2	2	2	2	41	2	92	in

Several bacterial strains were used as control: *F. psychrophilum* reference strains (JIP 02/86, NCIMB 1947<sup>T</sup> and LNPAA PO1/88), *Flavobacterium columnare* (NCIMB 2248<sup>T</sup>), *Flavobacterium johnsoniae* (CIP 100931), *Flavobacterium aquatile* (CIP 103744), *Flavobacterium succinicans* (CIP 104744), *Aeromonas salmonicida* (ATCC 14174), *Aeromonas hydrophila* (CIP 7614) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). All *Flavobacteria* strains were grown on FLP agar medium at 22 °C during 72 h, except *F. psychrophilum* cultured at 17 °C and *F. johnsoniae* cultured during 48 h. *Aeromonas* and *E. coli* strains were cultured on trypticase soy agar (TSA) medium at 22 °C and 37 °C, respectively.

## 2.2. DNA extraction and molecular identification of *F. psychrophilum*

A duplex PCR was developed for the rapid identification of *F. psychrophilum* isolates. This PCR was carried out to amplify *gyrA* and *gyrB* genes, using previous designed primer pairs, namely GYRA-FP1F (5'-GAAACCGGTGCACA-GAAGG-3') and GYRA-FP1R (5'-CCTGTGGCTCCGTTTAT-TAA-3') (Izumi and Aranishi, 2004), and PSY-G1F (5'-TGCAGGAAATCTTACACTCG-3') and PSY-G1R (5'-GTTGCAATTACAATGTTGT-3') (Izumi and Wakabayashi, 2000). The sizes of the expected PCR products were 396 and 1017 bp for *gyrA* and *gyrB* genes amplification, respectively. Three *F. psychrophilum* reference strains (JIP 02/86, NCIMB 1947<sup>T</sup> and LNPAA PO1/88) were used as positive controls in the PCR assays, *E. coli* was used as negative control, and six other bacterial fish pathogen were used to test the PCR specificity: *F. columnare*, *F. johnsoniae*, *F. aquatile*, *F. succinicans*, *A. salmonicida* and *A. hydrophila*.

Genomic DNA of reference strains and French isolates were extracted and purified using a Wizard genomic DNA purification kit (Promega, France). A 25 µL reaction volume contained 5 µL of DNA, buffer 1X (Eurobio, France), 25 pmol of each *gyrA* primer, 37.5 pmol of each *gyrB* primer, 200 µM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> and 0.5 units of *Taq* polymerase (Eurobio, France). The following thermocycling steps were used: 94 °C for 5 min, 35 cycles consisting of a denaturation step at 94 °C for 1 min,

hybridization at 56 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 1.5 min, and a final elongation phase at 72 °C for 5 min. The products were visualized on a UV transilluminator after separation on a 1.5% ethidium bromide agarose gel (30 min at 100 V).

## 2.3. Multilocus sequence typing

The seven housekeeping genes (*trpB*, *gyrB*, *dnak*, *fumC*, *murG*, *tuf*, and *atpA*) used for the MLST scheme are described in Table 2. They were present in a single copy at each locus and distributed along the chromosome of the reference isolate, JIP 02/86, which is a virulent type isolate of *F. psychrophilum* (Duchaud et al., 2007). These loci are considered as typical core genome genes with relatively little selective polymorphism and have already been used in MLST studies of some bacteria and particularly of *F. psychrophilum* (Nicolas et al., 2008). The *F. psychrophilum* reference strain, JIP 02/86 was used as amplification positive control.

Briefly, the amplification mix contained 10 µL of genomic DNA (at ≈2 ng µL<sup>-1</sup>), GoTaq Green Master Mix 1X, 1.87 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer (Table 2) and one unit of *Taq* DNA polymerase (Promega, France). PCR amplifications were performed in the following conditions: 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C (-0.4 °C/cycle) for 30 s and 72 °C (+2 s/cycle) for 1 min; followed by 12 cycles at 94 °C for 30 s, 45 °C for 30 s and 72 °C (+3 s/cycle) for 2 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. Five microliters of the PCR products were resolved on a 1% ethidium bromide agarose gel to check amplification.

The PCR products were sequenced (LGC Genomics, Berlin) using M13 forward and reverse primers: M13\_f, CAGGAAACAGCTATGACC and M13\_r, TGTAACACGACGGC-CAGT, included in each specific gene primer (Table 2). The quality of the resulting chromatograms was checked visually and sequences of each locus of each isolate were assembled with Phred and Phrap programs (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998). The sequences were trimmed and aligned using respectively Consed (version

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. Vet. Microbiol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>

**Table 2**  
Housekeeping genes analyzed in this MLST study, primers and amplicon sizes.

Locus	Gene product	Primers	Sequence (5'–3')	Size of PCR amplicon (bp)	Length of the target sequence (bp)
<i>trpB</i>	Tryptophan synthase beta subunit	trpB_f trpB_r	M13-f_AAGATTATGTAGGCCGCC M13-r_TGATAGATTGACTACAATATC	976	789
<i>gyrB</i>	DNA gyrase B subunit	gyrB_f gyrB_r	M13-f_GTTGTAATGACTAAAATTGGTG M13-r_CAATATCGGCATCACACAT	1260	1077
<i>dnaK</i>	Chaperone protein	dnaK_f dnaK_r	M13-f_AAGGTGGAGAAATTAAGTAGG M13-r_CCACCCATAGTTTCGATACC	1068	882
<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	tuf_f tuf_r	M13-f_GAAGAAAAGAAAGAGGTATTAC M13-r_CACCTTCACGGATAGCGAA	981	795
<i>fumC</i>	Fumarate hydratase class II	fumC_f_new fumC_r_new	M13-r_CCAGCAACAAATACTGGGG M13-f_GGTTTACTTTCTCGCATGAT	936	750
<i>murG</i>	Undecaprenyldiphospho- muramoylpentapeptide beta-N acetylglucosaminyltransferase	murG_f murG_r	M13-f_TGGCGGTACAGGAGGACATAT M13-r_GCATTCTTGTTGATGGTCTTC	869	681
<i>atpA</i>	ATP synthase alpha subunit	atpA_f atpA_r	M13-f_CTTGAGAAGATAATGTGGG M13-r_TGTTCCAGCTACTTTTTTCAT	1019	834

22.0) (Gordon et al., 1998) and BioEdit (version 7.0.5.3) (Hall, 1999) softwares. The resulting sequences were chosen to be shorter than in the initial MLST scheme (Nicolas et al., 2008) to automate the trimming process and ensure the maintenance of good sequence quality.

The nucleotide sequences of each housekeeping gene used for MLST were assigned allele numbers according to the MLST web site (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Flavopsy.html>). The numbered allele types (AT) at each locus of each isolate were combined in order to define a sequence type (ST).

#### 2.4. Population genetic analysis

Each MLST locus was analyzed for descriptive characteristics, such as the number of polymorphic sites and the nucleotide diversity per site ( $\pi$ ), performed by DnaSP version 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009). The gene diversity ( $H$ ) determined using LIAN 3.5 (<http://pubmlst.org/analysis/>), was calculated as:  $H = [n / (n - 1)](1 - p_i^2)$ , in which  $n$  is the number of samples and  $p_i$  the relative frequency of the  $i$ th allele. The number of synonymous and non-synonymous mutations were counted using MEGA5 software (Tamura et al., 2011). The average non-synonymous/synonymous mutations ratio ( $dN/dS$ ) and the linkage disequilibrium between alleles at the seven gene loci which is measured by standardized index of association ( $I_A^S$ ) were calculated with START2 software (Jolley et al., 2001). The index of association provides an indication of the recombination events that have generated genetic variability, as pairwise homoplasy index (PHI) (Bruen et al., 2006) calculated by SplitsTree 4 version 4.12.3 (Huson and Bryant, 2006). Evidence for recombination between STs was also investigated using split decomposition tree, constructed with 1000 bootstrap replicates based on parsimony splits implemented in SpleesTree4 version 4.12.3.

### 3. Phylogenetic analysis

A neighbor-joining (NJ) tree of concatenated housekeeping genes was constructed based on the NJ method (Saitou and Nei, 1987) using MEGA5 software (Tamura et al., 2011), with support for branches provided by bootstrapping ( $n = 1000$ ). The e-BURST v3 software was used to divide STs into groups of closely related ones (clonal complexes) (<http://pubmlst.org/analysis/>). These clonal complexes were statistically assessed by bootstrap method ( $n = 1000$ ) and the analysis was performed with default settings (a minimum of 6 alleles shared) and relaxed settings (a minimum of 5 alleles shared) defining the group parameters.

#### 3.1. Statistical analysis

Fisher's exact test is an appropriate statistical test for determining the presence of a non-random association between two categorical variables and was used to check whether the genetic variants of *F. psychrophilum* exhibited a geographical pattern. This statistical test was implemented with SAS software (SAS statistical software – version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### 3.2. Nucleotide sequence accession numbers

Only nucleotide sequences corresponding to new allele types (19 sequences, Table 1) have been deposited in GenBank (accession numbers JQ595418, JQ595419, JQ595424, JQ595426, JQ595429, JQ595431, JQ595433 to JQ595435, JQ595437, JQ595439, JQ595442 to JQ595449).

### 4. Results

#### 4.1. Phenotypic characterization and molecular identification of *F. psychrophilum*

The 66 selected isolates (Table 1) came from 45 farms (24 in Aquitaine, 17 in Bretagne, 2 in Pays de la Loire and 2

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. Vet. Microbiol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>



**Table 3**  
Characteristics, polymorphism and recombination of MLST loci.

Locus	Size (bp)	No. (%) of variable sites		No. of types <sup>a</sup>		<i>H</i> <sup>b</sup>	$\pi$ (bp <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	<i>S</i> <sup>d</sup>	<i>N</i> <sup>e</sup>	dN/dS <sup>f</sup>	PHI <sup>g</sup>
		Total	New <sup>h</sup>	Total	New						
<i>trpB</i>	789	5 (0.63%)	0	6	2	0.5408	0.00184	7	0	0.0000	0.022 <sup>*</sup>
<i>gyrB</i>	1077	16 (1.48%)	0	7	4	0.4033	0.00332	23	0	0.0000	0.008 <sup>*</sup>
<i>dnaK</i>	882	9 (1%)	1	7	4	0.4033	0.00176	10	1	0.0020	0.041 <sup>*</sup>
<i>tuf</i>	795	15 (1.9%)	0	8	6	0.3837	0.00512	18	0	0.0000	0.806
<i>fumC</i>	750	4 (0.53%)	0	5	0	0.3795	0.00066	5	0	0.2738	1
<i>murG</i>	681	9 (1.32%)	0	5	1	0.5291	0.00343	7	5	0.0000	0.102
<i>atpA</i>	834	23 (2.7%)	1	5	2	0.3795	0.00633	28	1	0.0171	0.001 <sup>*</sup>
Concatenate	5808	81 (1.4%)	2	15	14	0.4313	0.00317	135	9	0.0200	5.35 × 10 <sup>-9</sup>

<sup>a</sup> Number of allele types identified for each locus and number of sequence types identified for concatenate.

<sup>b</sup> Gene diversity.

<sup>c</sup> Nucleotide diversity per site.

<sup>d</sup> Number of synonymous substitutions.

<sup>e</sup> Number of non-synonymous substitutions.

<sup>f</sup> Ratio of non-synonymous to synonymous mutations.

<sup>g</sup> Pairwise homoplasy index.

<sup>h</sup> New by comparison with the results of Nicolas et al. (2008).

<sup>\*</sup> Statistically significant trace of recombination ( $p < 0.05$ ).

in Poitou Charente) (Fig. 1). They were negative for the Gram test and positive for the catalase and flexirubin tests. The *gyrA/gyrB* duplex PCR yielded products with the expected sizes: 396 and 1017 bp respectively (data not shown), confirming the identification of all isolates as *F. psychrophilum*. Amplicons were not observed for negative controls.

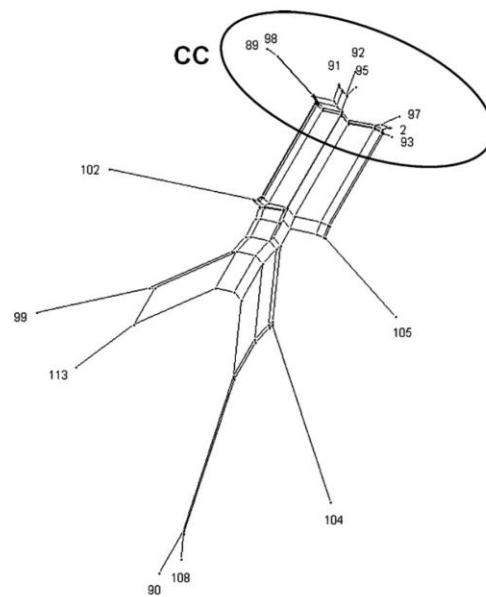
#### 4.2. Analysis of sequence diversity in housekeeping genes

All seven housekeeping MLST genes of the 66 isolates were successfully amplified and sequenced, and the genetic characteristics of each locus are described in Table 3. Within the 5808 bp of the concatenated sequence of seven loci in the 66 *F. psychrophilum* French isolates, 81 polymorphic sites (1.39% of the positions) were observed. No insertions or deletions were detected within the loci analyzed. The number of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) sites between loci varied from 4 (at locus *fumC*) to 23 (at locus *atpA*). Compared to the previous study data (Nicolas et al., 2008), new SNPs sites were identified in 2 loci (*dnaK* and *atpA*), each of them presenting one new SNP site. All SNPs sites were biallelic, except two that were triallelic (one in *tuf* and one in *gyrB*). The average number of allele types per locus was 6.1 (ranging from 5 at loci *atpA*, *fumC* and *murG*, to 8 at locus *tuf*) and new allele types were detected for all loci, except *fumC*.

The average gene diversity (*H*) over the seven loci was 0.4313, with *H* values for individual loci ranging from 0.3795 for *atpA* and *fumC*, to 0.5408 for *trpB*. Pairwise nucleotide diversity ( $\pi$ ) ranged from 0.00066 for *fumC* to 0.00633 for *atpA*, with an average value of 0.00317. Synonymous substitutions were more common than non-synonymous substitutions, and the ratio of non-synonymous to synonymous mutations (dN/dS) was less than 1 for all loci, with dN/dS equal to 0 for *murG*, *gyrB*, *trpB*, and *tuf*, while ranging from 0.0020 to 0.2738 for the three other genes. A dN/dS ratio less than 1 indicates that the diversity present in all these genes is likely driven by purifying selection.

#### 4.3. Analysis of recombination events

When the occurrence of recombination in each locus was investigated by PHI test, the results showed statistically significant recombination for four loci (*atpA*, *dnaK*, *gyrB* and *trpB*) (Table 3). Application of the PHI test to the concatenated sequences revealed statistically significant evidence of recombination ( $p < 0.05$ ). To test further for recombination traces, SplitsTree program was used on



**Fig. 2.** Split decomposition analysis. The tree was constructed under neighbor net graph option, with the concatenated sequences of each ST. STs of the clonal complex are circled.

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. Vet. Microbiol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>

concatenated sequence of all STs. This analysis showed a bushy network structure indicative of recombination events (Fig. 2). Evidence of recombination was also assessed from the standardized index of association ( $I_A^s$ ). This statistical clonality test attempts to measure the extent of linkage disequilibrium within a population by quantifying the amount of recombination occurring between a set of sequences and detecting association on population structure (clonal, panmictic, or epidemic). Here, the entire dataset of *F. psychrophilum* isolates yielded an  $I_A^s$  of 0.6088, significantly different from 0 ( $p < 0.05$ ). A lower value differing significantly from 0 ( $p < 0.05$ ) was obtained when the dataset of all single representatives of each of the 15 STs retrieved by MLST (Table 3) was analyzed ( $I_A^s = 0.4567$ ), indicating a linkage disequilibrium. This linkage disequilibrium disappears when STs are divided in clusters of genetically related STs (Supplementary data S1), with  $I_A^s$  value that drops sharply down to 0.084, significantly close to 0 ( $p > 0.05$ ).

#### 4.4. Phylogenetic relatedness of French *F. psychrophilum* isolates

This MLST study identified 15 STs among the 66 French *F. psychrophilum* isolates analysed, 14 of which have not been described before (Table 1 and Table 3). The STs occurred at unequal frequencies. The majority of STs (11/15) was found only once, each representing 1.51% of the total isolates, and the genetic variant most frequently encountered was ST2, representing 46.9% of the total isolates. The other most common genetic variants were ST90, ST89 and ST92 (7.5–15.5% of the total sample).

The predicted evolutionary descent of the 66 isolates was then investigated by clustering method, eBURST (Feil et al., 2004), using a default group definition in which STs differing at only one single locus (single locus variant or SLV) are grouped together. With these default parameters, STs that are linked share six common locus types and are grouped in a clonal complex at the center of which, a founder (common ancestor) is predicted. When this method was applied to our sample, the 15 STs retrieved could be divided into one clonal complex or CC (composed of 8 STs and representing 75.7% of the total isolates) and 7 singletons STs (Fig. 3). ST2 was identified as the potential founder and was connected with ST89, ST93, ST97, ST98 and ST91 which also shared alleles with ST92 and ST95. *F. psychrophilum* reference strains JIP 02/86 (isolated from rainbow trout) and NCIMB 1947<sup>T</sup> (isolated from coho salmon) were added in analysis in order to highlight possible relationship with French isolates. e-BURST analysis including JIP 02/86 and NCIMB 1947<sup>T</sup> respectively ST20 and ST13, show those STs as singleton.

The relatedness between STs can also be expressed by relaxed parameter that shows all pairs of STs sharing two ATs. ST20, the reference strain JIP 02/86 ST showed connections with ST2, ST93 and ST97. On the other hand, this relaxed double locus variants (DLV) criterion revealed that ST90 was linked to ST108.

The phylogenetic relationship between isolates was further analyzed by constructing a NJ unrooted tree, using

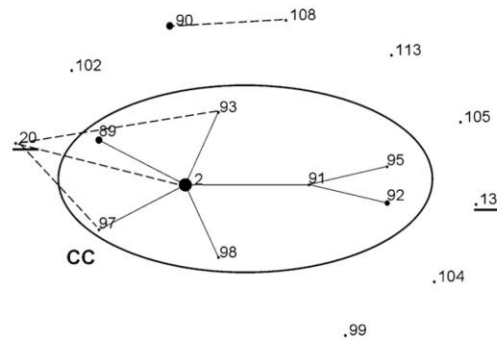


Fig. 3. eBURST diagram. Single locus variants (sequence types that differ by one allele type) are joined by straight lines, and circled in the same clonal complex (CC). Double locus variants (sequence types that differ by two allele types) are joined by dotted lines. Dot sizes are proportional to the number of isolates within each ST, and the bigger one is the founder of the CC, ST2. The underlined STs, ST13 and ST20, are the genotypes of reference strains NCIMB 1947<sup>T</sup> and JIP 02/86 respectively.

the number of differences method. This tree was constructed from the concatenated nucleotide sequences of the seven loci in all 66 isolates and of the reference strains JIP 02/86 and NCIMB 1947<sup>T</sup> (Fig. 4). The CC revealed by eBURST analysis was apparent as cluster on the phylogenetic tree, with good percentage values of the bootstrap support (Fig. 4). Examination of the NJ tree showed that very diverse STs could be found within a given French region. This was confirmed by applying an exact Fisher test to the *F. psychrophilum* sample. The presence and the absence of ST2 in the four French regions studied, as it is the most represented ST, were tested and the Fisher exact test did not reveal any significant geographical pattern in the distribution of the ST2 isolates ( $p < 0.05$ ).

## 5. Discussion

MLST has emerged as the technique of choice for studying the population structure of many bacterial species (Maiden, 2006). This typing method became possible as a result of access to DNA sequences of bacteria. In the case of the recognized threat of *F. psychrophilum* to the salmonid farming industry, the recent publication of the complete genome sequence of this bacterium (Duchaud et al., 2007) had already led to the development of a MLST scheme (Nicolas et al., 2008). In the present study, we used the 7 loci (*trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *fumC*, *murG*, *tuf*, and *atpA*) from this previously published MLST scheme to gain insight into the genetic diversity of clinical isolates of *F. psychrophilum* collected from rainbow trout farmed in France.

Analysis of the pattern of polymorphism in the entire dataset revealed a few polymorphic sites, characterized by low concatenate sequence nucleotide diversity per site ( $\pi \times 100 = 0.31\%$ ) and weak average gene diversity ( $H = 0.4313$ ). When the same seven MLST loci considered in the present study were analysed in light of the data of Nicolas and colleagues (2008), obtained for twenty four



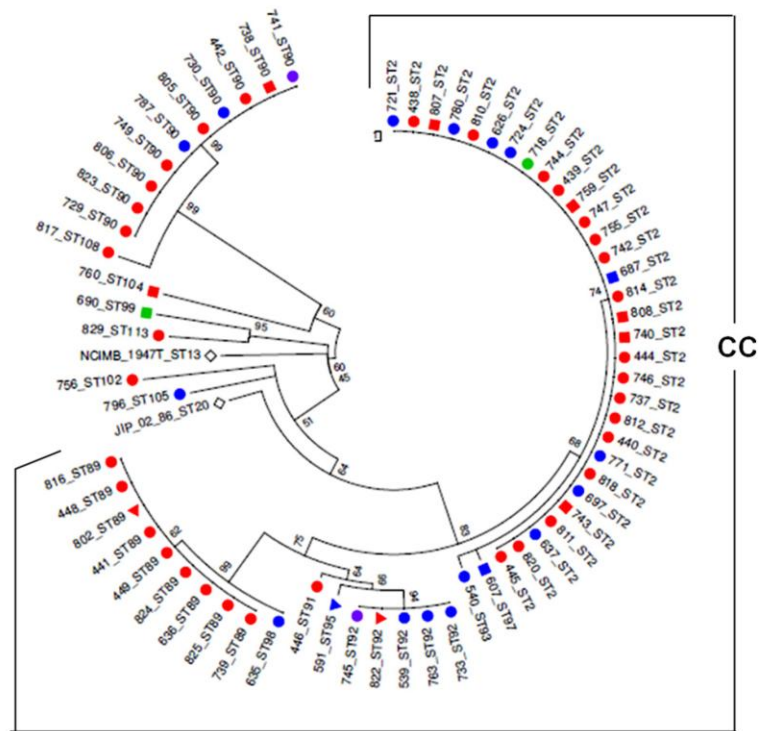


Fig. 4. Neighbor-joining unrooted tree of 66 French *F. psychrophilum* isolates, including *F. psychrophilum* reference strain JIP 02/86 and NCIMB 1947<sup>T</sup>. For each isolate, the French region, the tissue location and ST number are indicated. The evolutionary distances were computed using the number of differences method and are in the units of the number of base substitutions per site. French regions are indicated by different colors: Aquitaine in red, Bretagne in blue, Poitou Charentes in violet, and Pays de la Loire in green. Tissue locations are represented by different forms: internal by a circle, external by a square and unknown tissue by a triangle. Reference strains are indicated by diamonds. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

isolates from rainbow trout collected worldwide over a period of 14 years, the same order of gene diversity ( $H = 0.5333$ ) was observed. Thus the French rainbow trout isolates exhibited almost as much diversity as the diversity observed in rainbow trout isolates from previously examined countries, thereby emphasizing the strong association between genetically closely related isolates and the rainbow trout host, as discussed below.

Clonal populations are identified by an  $I_A^S$  value that differs significantly from zero and population under panmixia has an  $I_A^S$  value close to zero. Limited and non-random sampling may lead to over-representation of particular STs, as in this study, and to the observation of a "clonal" population structure (Smith et al., 1993). This problem can be avoided by using single representatives of each ST as units for  $I_A^S$  measurement. On the other hand, Smith et al. (1993) demonstrated that when STs are divided into clusters of genetically related STs and each cluster is treated as a unit (Caugant et al., 1987), an epidemic structure of the population can be observed. In this case, the clonal structure observed for the entire dataset of the isolates and the all single representatives of

each STs disappears. Here, the  $I_A^S$  value was significantly higher than 0 ( $I_A^S = 0.6088$ ,  $p < 0.05$ ) for all 66 *F. psychrophilum* samples which indicates that the alleles were in strong disequilibrium. The  $I_A^S$  value for the 15 STs ( $I_A^S = 0.4567$ ,  $p < 0.05$ ) was lower than 0 for the full dataset of 66 isolates, indicating that the number of recombination events which did not strongly affect the linkage between alleles was limited and attesting the possible clonal population structure of *F. psychrophilum* rainbow trout isolates in France. Equivalent  $I_A^S$  values were re-calculated from the data of Nicolas et al. (2008), and are globally similar to our data: 0.5984 for the entire sample (50 isolates) and 0.4936 using single representatives of the STs as units, both values being significantly higher than 0. However, when STs were clustered according to their genetic relatedness, the clonal structure of our sample disappeared ( $I_A^S = 0.084$ ,  $p > 0.05$ ), revealing an epidemic structure of the population. A similar example was observed with *Neisseria meningitidis* where the analyzed population appeared first clonal despite recombination events, to finally prove to be epidemic after  $I_A^S$  calculation following clustering (Smith et al., 1993). This demonstrates

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. Vet. Microbiol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>



the epidemic structure of the *F. psychrophilum* population analyzed here.

Those data emphasizes that the genetic diversity in *F. psychrophilum* was mainly driven by homologous recombination, as previously demonstrated (Nicolas et al., 2008; Vos and Didelot, 2008). Moreover, PHI values for the concatenate sequences, which differed significantly from zero, supported the recombinogenic nature of *F. psychrophilum*. The PHI test also indicated that *atpA*, *dnaK*, *gyrB* and *trpB* are the housekeeping genes which induced diversity through recombination. This is consistent with the observed conflicts on the trees at the different loci (Supplementary data S2), and strongly indicative of the role of homologous recombination in the generation of diversity in *F. psychrophilum*, also deducible by the bushy network structure done by split decomposition analysis.

The recently published MLST analysis of *Aeromonas* spp. (*A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. enteropelogenes*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, *A. popoffii*, and *A. sharmana*) commonly isolated from diseased and healthy fish, showed a very different pattern (Martino et al., 2011). Although the genetic diversity was very high, the methods used to detect evidence of recombination indicated that the intra-specific recombination was very low. This was the case for *A. veronii*, although a relevant effect of recombination was reported in another study (Silver et al., 2011). Thus, the different sampling schemes and methodologies used to detect bacterial recombination also clearly influence the conclusions drawn. In the present case of *F. psychrophilum*, recombination was shown to be a major evolutionary force driving genetic diversity in the French ecological niche, as observed worldwide (Nicolas et al., 2008).

Conjugating plasmids, phages and transposons that require bacterial competence, are the three vectors involved in bacterial recombination. Plasmids (Alvarez et al., 2004; Duchaud et al., 2007), a number of *F. psychrophilum* bacteriophages (Kim et al., 2010) and transposons (Alvarez et al., 2004) have been identified on *F. psychrophilum* but their involvement in recombination of this bacterium remains unknown.

In the present study, 15 sequence types were identified, including 14 new STs derived from only 2 additional single nucleotide polymorphic (SNP) sites. This implies that most of the described allele diversity originated from new intragenic associations of previously described SNPs, thus supporting the important role of homologous recombination in the evolution of this bacterium. The eBURST analysis with SLV criterion separated the 15 STs detected into one clonal complex (CC) where ST2 was identified as the primary founder, and several STs that did not share any similarity with this CC. In a previous publication (Nicolas et al., 2008), three clonal complexes (CC1, CC2 and CC3) had been detected and CC1 was also shown to have ST2 (isolated only from rainbow trout) as its primary founder. CC1 and CC can therefore be considered as similar. No members of the previously described CC2 and CC3 were identified in our isolates. With DLV criterion, analysis including the reference strains JIP 02/86 and NCIMB 1947<sup>T</sup>, showed that only the ST (ST20) of the reference strain

isolated from rainbow trout (JIP 02/86) shared ATs with STs included in the CC.

The occurrence of identical STs in geographically distant areas (worldwide) as described previously (Nicolas et al., 2008), and highlighted in Fig. 1, by the NJ tree (Fig. 4) and the statistical test, suggests a likely role of brood fish, egg fish and fish trading in the dissemination of *F. psychrophilum*, at least for some specific STs. Moreover, ST2 seems to be strongly associated to rainbow trout as it has only been found in this fish species (Nicolas et al., 2008). However, many singletons STs have also been characterized in rainbow trout both worldwide (8 in the study of Nicolas et al., 2008) and in France (7 in the present study). One explanatory hypothesis for the presence of these singletons STs, might be that these STs are not linked to the trading of salmonid products but are related to endemic isolates. Those endemic isolates might occur rarely and/or could be less virulent than the others or less well adapted to the rainbow trout species. Indeed *F. psychrophilum* has been found in water (Madetoja and Wiklund, 2002) and non-fish host that could act as reservoir (Amita et al., 2000; Izumi et al., 2005). Natural fish population can also serve as reservoirs of *F. psychrophilum*, and it was shown that the associated bacteria could demonstrate a greater genetic variability than observed in reared fish population (Chen et al., 2008). Then horizontal transmission through circulating water could be assumed. A detailed study of the genetic diversity of isolates on a more limited geographic scale (a fish farm) might reveal local clonal complexes otherwise masked by the CC1 members over-distributed as a result of fish trade.

In conclusion, MLST analysis supports the hypothesis of an epidemic population structure of this bacterium due mainly to the expansion of genetically closely related isolates. Additional analyses are now required to complete our knowledge of the genetic variants present at an even smaller geographical scale (a farm for example), to examine if singleton STs represent local and environmentally associated types with a local clonal structure. Such analyses could be simplified by designing an allele-specific real-time PCR for the most informative SNPs on each locus (Sheludchenko et al., 2010). As shown in the present study, very few new polymorphic sites were found in the 66 isolates analyzed (only 2 on the 429 kbp sequenced in this study), and the finding of new SNPs will probably be rare in this context (rainbow trout as host fish studied in France). A bar-coding technique would avoid the expensive and labor-consuming step of systematic sequencing and could be applied to a large set of isolates.

#### Acknowledgements

We are grateful to Pierre Nicolas (INRA, Jouy-en Josas, France) for assembling the sequences, attributing the ATs and STs (Allele and Sequence Types attributions), and fruitful discussions. We would like to thank Catherine Mangion, Michaëlle Larhantec and Isabelle Perray for their technical support, and Anne Lehébel for her help with statistical questions. We are also grateful to H. Seegers and L. Malandrin from the UMR BioEpAR for their advice during C. Siekoula-Nguedia's PhD thesis and their critical reading

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. *Vet. Microbiol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>



of this manuscript. Thanks to the “Plateau Fédératif de Biologie Moléculaire” of Oniris for providing the equipment for carrying out the experiments, to the “Agence Nationale de la Recherche” of France for 07-GMGE grant that supported the equipments dedicated to sequence treatments, and to France AGRIMER (constitution of the isolates collection). C.S.N.’s PhD thesis was supported by grants from the “Pays de la Loire” region, INRA and UMR BioEPAR.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>.

#### References

Alvarez, B., Secades, P., McBride, M.J., Guijarro, J.A., 2004. Development of genetic techniques for the psychrotrophic fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 581–587.

Amita, K., Hoshino, M., Honma, T., Wakabayashi, H., 2000. An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umi-kawa river. *Fish Pathol.* 35, 193–197.

Bruen, T.C., Philippe, H., Bryant, D., 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665–2681.

Caugant, D.A., Mocca, L.F., Frasch, C.E., Frøholm, L.O., Zollinger, W.D., Selander, R.K., 1987. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J. Bacteriol.* 169, 2781–2792.

Cepeda, C., García-Márquez, S., Santos, Y., 2004. Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture* 238, 75–82.

Chen, Y.C., Davis, M.A., LaPatra, S.E., Cain, K.D., Snekvik, K.R., Call, D.R., 2008. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from commercially raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and spawning coho salmon, *O. kisutch* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 31, 765–773.

Duchaud, E., Bousaha, M., Loux, V., Bernardet, J.-F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R., Caron, C., Bessieres, P., Gibrat, J.-F., Claverol, S., Dumetz, F., Le Henaff, M., Benmansour, A., 2007. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat. Biotechnol.* 25, 763–769.

Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185.

Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 186, 1518–1530.

Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8, 195–202.

Guichard, B., 2004. Principaux résultats de l’enquête “Pathologie de poissons 2004”. *Bull. Epidemiol. Santé Anim. Alim.* 15, 5–6.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.

Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.

Iida, Y., Mizokami, A., 1996. Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.* 31, 157–164.

Izumi, S., Aranishi, F., 2004. Relationship between *gyrA* mutations and quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3968–3972.

Izumi, S., Fujii, H., Aranishi, F., 2005. Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *J. Fish Dis.* 28, 559–564.

Izumi, S., Wakabayashi, H., 2000. Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* 35, 93–94.

Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.-S., Maiden, M.C.J., 2001. Sequence type analysis and recombination tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230–1231.

Kim, J.H., Gomez, D.K., Nakai, T., Park, S.C., 2010. Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. *Vet. Microbiol.* 140, 109–115.

Lehmann, J., Mock, D., Stürenberg, F.-J., Bernardet, J.-F., 1991. First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Dis. Aquat. Organ.* 10, 217–220.

Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E., 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 892–916.

Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.

Madetoja, J., Wiklund, T., 2002. Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 259–266.

Maiden, M.C.J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561–588.

Martino, M.E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., Cardazzo, B., 2011. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4986–5000.

Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 26, 563–574.

Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J.-F., Duchaud, E., 2008. Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3702–3709.

Plant, K.P., LaPatra, S.E., Cain, K.D., 2009. Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. *J. Fish Dis.* 32, 521–534.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L., 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4908–4915.

Sheludchenko, M.S., Huygens, F., Hargreaves, M.H., 2010. Highly discriminatory single-nucleotide polymorphism interrogation of *Escherichia coli* by use of allele-specific real-time PCR and eBURST analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4337–4345.

Silver, A.C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A.J., Gogarten, J.P., Graf, J., 2011. Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *PLoS One* 6, e16751.

Smith, J.M., Smith, N.H., O’Rourke, M., Spratt, B.G., 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4384–4388.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Vos, M., Didelot, X., 2008. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J.* 3, 199–208.

Please cite this article in press as: Siekoula-Nguedia, C., et al., Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. *Vet. Microbiol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>



# Insight into genetic diversity and population structure of *Flavobacterium psychrophilum* in France via an MLST approach



Y.J. Charlène Siekoula-Nguedia<sup>1</sup>, Eric Duchaud<sup>2</sup>, Guillaume Blanc<sup>1</sup>, Ségolène Calvez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, ONIRIS, UMR 1300 Unit of Biology, Epidemiology and Risk Analysis, Nantes, France.

<sup>2</sup> INRA, Virologie et Immunologie Moléculaires UR892, F-78350 Jouy-en-Josas, France.



## Background

*Flavobacterium psychrophilum* is the causative agent of the “bacterial cold water disease” and the “Rainbow trout fry syndrome”. These infections are responsible of important economic losses in salmonid farming worldwide. Nowadays, the control of this infectious agent proves to be difficult because of the emergence of antibiotics resistance due to antibiotic monotherapy, and the lack of vaccine. Improving management strategies requires a better understanding of the population structure of *Flavobacterium psychrophilum*.

## Objective

Investigate the diversity and the population structure of *F. psychrophilum* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farmed in the Atlantic French coast via a Multilocus Sequence Typing (MLST) approach. The study will focus on the main areas of salmonid production: Bretagne and Aquitaine.

## Materials and methods

➤ 56 strains isolated from rainbow trout internal organs (spleen, kidney and encephalon) or external organs (skin, gills and fins). Those strains were isolated between 2007 and 2010 during clinical episodes, and collected from different regions (see Fig. 1).

➤ Species identification confirmation: (i) phenotypic characterization (Gram test, catalase and flexirubin tests) and (ii) molecular identification by duplex PCR *gyr A/gyr B* (Izumi and Aranishi 2004; Izumi and Wakabayashi 2000).

➤ MLST on 7 loci (*trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *tuf*, *fumC*, *atpA*, *murG*) according to previous protocol (Nicolas et al, 2008).

➤ Predicted evolutionary descent analysis and network representation by E-BURST v3 (Feil et al, 2004).

## Results

➤ A total of 20 sequence types (ST) on 56 isolates were retrieved (Table 1), distributed in 2 clonal complexes (the first group with 9 STs and the second with 2 STs) and 9 STs singletons (Fig.2).

➤ ST2 dominant, especially in Aquitaine and Bretagne. ST2 has been previously described unlike all 20 other STs (Nicolas et al, 2008).

➤ No relationships between STs and organ of isolation (internal or external), however ST 89 was retrieved only on internal organ. ST89 observed only in Aquitaine and Bretagne.

## Conclusions

This is the first report on the genetic variability of French *F. psychrophilum* assessed by an MLST analysis. This preliminary study shows a diversity of clones with one dominant ST (ST2 with a frequency of 41%) among a total of 21 STs retrieved. ST2 has already been observed in France (where it was dominant in rainbow trout isolates), Switzerland and Denmark. All the other 20 STs have never been described before either for french isolates or published in previous studies. Those results suggest the emergence of new STs in comparison with those already found in France as well as in other countries like Chile and Japan (Nicolas et al, 2008 and data not shown). Moreover, no evident geographic structuring of the bacterium population has been highlighted, and no relationships could be clearly established between STs other than ST89, with a particular location on body fish. Besides, a larger sampling and additional statistical analyses are envisaged.

## References

- Feil E. J. et al (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186: 1518 - 1530.
- Izumi S et al (2003). Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* 56: 207-214.
- Izumi S. and H. Wakabayashi (2000). Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathology* 35(2): 93-94.
- Nicolas P. et al (2008). Population Structure of the Fish-Pathogenic Bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 74(12): 3702-3709.

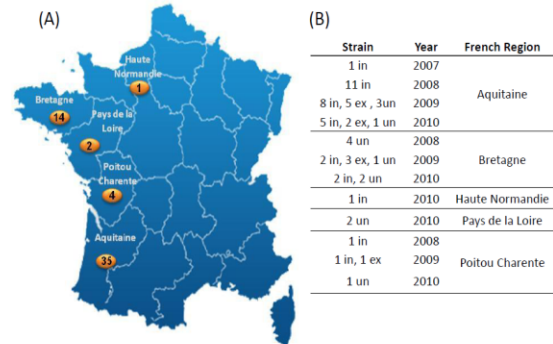


Figure 1: Geographic origin and number of *Flavobacterium psychrophilum* strains (A) and number of bacterial strains isolated in different parts of France from internal (in), external (ex) or unknown organ (un) of Rainbow trout (B)

Table 1: STs frequency for the *F. psychrophilum* strain collection studied

ST designation	Frequency
2	41,81 %
89	16,36 %
91	7,27 %
90	5,45%
92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 108, 109	1.81 % each

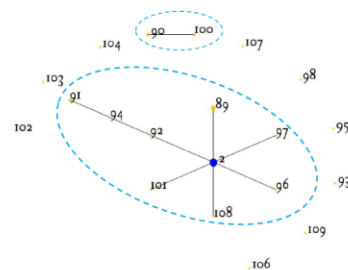


Figure 2: e-BURST STs diagram, with the two clonal complexes encircled

# Thèse de Doctorat

**Y. J. Charlène SIEKOULA-NGUEDIA**

**Etude de la variabilité génétique *Flavobacterium psychrophilum*, pathogène de salmonidés.**

## Résumé

*Flavobacterium psychrophilum* est une bactérie responsable de la flavobactériose d'eau froide touchant majoritairement les poissons de la famille des salmonidés, et plus particulièrement la Truite arc en ciel. Cette maladie entraîne une mortalité massive chez ces espèces avec pour conséquence, des pertes économiques importantes. Face à l'émergence de résistances aux traitements antibiotiques actuels et à l'absence d'un vaccin contre cette maladie, l'amélioration des stratégies de gestion visant à en limiter la diffusion nécessite une meilleure compréhension de la variabilité génétique et de la structure de la population de son agent. Dans cette optique, cette thèse vise l'étude de la variabilité génétique de *Flavobacterium psychrophilum* en France où, aucune investigation de ce genre n'a encore été menée. A cet effet, le génotypage de *F. psychrophilum* par la méthode MLST a été menée sur une population de *F. psychrophilum* échantillonnée sur des truites arc-en-ciel présentant des signes cliniques de la maladie, dans les principales régions françaises de production aquacole. Cette étude a révélé que les poissons étaient majoritairement infectés par un complexe d'isolats génétiquement proches, sans pouvoir observer une structuration géographique. Une deuxième méthode de génotypage, la PFGE a été appliquée à une population de bactéries échantillonnées sur des truites arc-en-ciel apparemment saines, à l'échelle plus fine de quatre sites piscicoles situés dans un bassin versant de Bretagne. La PFGE a montré de la variabilité génétique : sur un même poisson, dans une même pisciculture et entre pisciculture, sans mise en évidence d'un variant génétique majoritaire. Enfin, les méthodes MLST et PFGE appliquées à une sélection d'isolats, ont montré des résultats concordants et des pouvoirs discriminants similaires.

## Mots clés

***Flavobacterium psychrophilum*, diversité génétique, MLST, PFGE, truite arc-en-ciel, France**

## Abstract

*Flavobacterium psychrophilum* is the bacterial agent of "cold water disease" and "rainbow trout fry syndrome" affecting mainly the fish of the salmon family, especially the rainbow trout. This disease causes massive mortality in these species resulting in significant economic losses. With the emergence of antibiotics resistance and the lack of vaccines against this disease, the improvement of management strategies to limit the spread requires a better understanding of the genetic diversity and population structure of its agent. In this context, this thesis aims to study the genetic diversity of *F. psychrophilum* in France, where no such investigation has yet been conducted. For this purpose, genotyping of *F. psychrophilum* by MLST method was carried out on a population of sampled rainbow trout rainbow with clinical signs of the disease, in the main French regions of aquaculture production. This study showed that the fish were mainly infected by a complex of genetically closed isolates, without being able to observe a geographic structure. A second method of genotyping, PFGE, applied to a population of bacteria sampled on rainbow trout rainbow apparently healthy, at the finer scale of a sites located in a watershed in Britain, showed great genetic diversity: on the same fish, in a same farm and between sites, with no evidence of a major genetic variant. Finally, MLST and PFGE methods applied to a selection of isolates showed concordant results and similar discriminatory powers.

## Key Words

***Flavobacterium psychrophilum*, genetic diversity, MLST, PFGE, rainbow trout, France**