

BACTÉRIOSES DES POISSONS D'AQUACULTURE

BACTERIAL DISEASES OF FARMED FISH

Par Jean-François BERNARDET⁽¹⁾, Christian MICHEL, Éric DUCHAUD et Abdenour BENMANSOUR
(communication présentée le 23 novembre 2006)

RÉSUMÉ

Un aperçu général des infections bactériennes chez les poissons d'élevage est d'abord présenté: espèces bactériennes en cause, facteurs favorisants, types d'infection, modes de transmission, et méthodes de lutte. Les études menées par l'INRA sur le principal pathogène bactérien des salmonidés dans le monde, *Flavobacterium psychrophilum*, sont ensuite passées en revue. Après les techniques de culture, d'identification et de typage moléculaire des souches, un modèle expérimental reproductible de la maladie sur la truite arc-en-ciel a été mis au point. Les études moléculaires ont considérablement affiné la taxonomie et la phylogénie de l'ensemble de la famille des *Flavobacteriaceae*. Le génome complet d'une souche de *F. psychrophilum* vient d'être séquencé. Son analyse a déjà révélé de nombreux gènes impliqués dans le mode de vie de la bactérie, en particulier dans sa virulence pour l'hôte.

Mots-clés: maladies bactériennes, salmonidés, *Flavobacterium psychrophilum*, maladie expérimentale, virulence, génome

SUMMARY

An overview of bacterial diseases in farmed fish is presented, including bacterial species involved, predisposing factors, routes of infection, modes of transmission, and control. INRA studies on the main bacterial pathogen of salmonid fish worldwide, *Flavobacterium psychrophilum*, are also presented. Once techniques of culture, identification, and molecular typing of isolates were defined, a reproducible model of experimental infection was developed using the rainbow trout. Molecular studies improved considerably the taxonomy and phylogeny of the whole *Flavobacteriaceae* family. The full genome of a *F. psychrophilum* strain has recently been sequenced. Its analysis has already identified many genes involved in the pathogen's lifestyle, especially in its virulence towards the host.

Key words: bacterial diseases, salmonid fish, *Flavobacterium psychrophilum*, experimental infection, virulence, genome.

(1) Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, Équipe « Infection et Immunité des Poissons », Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex.

GÉNÉRALITÉS

Certaines bactéries jouent un rôle considérable dans la pathologie des poissons, constituant parfois des fléaux majeurs. Elles peuvent être inféodées à une ou plusieurs espèces de poissons ; elles sont alors considérées comme de vrais pathogènes, capables d'infecter des animaux sains. La plupart ne sont cependant que des pathogènes opportunistes dont le pouvoir infectieux ne s'exprime qu'à la faveur d'une baisse d'état du poisson et d'un affaiblissement de ses défenses naturelles, liés aux perturbations de l'environnement ou aux pratiques d'élevage. Les élevages intensifs représentent ainsi le contexte le plus favorable au développement des pathologies bactériennes.

De nombreuses espèces bactériennes sont pathogènes pour les poissons (Noga 1996 ; Austin & Austin, 1999 ; Woo & Bruno, 1999). Les infections les plus graves sous nos latitudes mettent en cause des *Aeromonadaceae*, des *Vibrionaceae*, des *Enterobacteriaceae* et des *Flavobacteriaceae*. La yersiniose à *Yersinia ruckeri*, la furunculose à *Aeromonas salmonicida*, et la flavobactériose d'eau froide à *Flavobacterium psychrophilum* sont fréquentes dans les élevages d'eau douce. Si la première, introduite en Europe vers 1980, est actuellement bien contrôlée par la vaccination, il n'en va pas de même de la furunculose (qui peut également se déclencher en mer et causer de très lourdes pertes dans les élevages de saumons) et de la flavobactériose (qui provoque de graves mortalités d'alevins de salmonidés un peu partout dans le monde). En milieu marin, les productions aquacoles payent surtout un lourd tribut à la vibriose due à *Vibrio anguillarum*. Les infections à germes à Gram positif (*Vagococcus salmoninarum*, *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Carnobacterium piscicola*...) progressent partout.

Les facteurs d'environnement (température, matières en suspension, pH, gaz toxiques dissous, parasites externes) ou d'élevage (charge excessive des bassins, excès de nourriture, interventions de gestion), connus pour favoriser la plupart des processus pathologiques, peuvent être déterminants dans le déclenchement de la maladie quand on a affaire à des agents de type opportuniste.

Il est rare que les maladies bactériennes des poissons soient immédiatement identifiables d'après leurs signes cliniques, généralement peu caractéristiques. On peut les regrouper par commodité en trois tableaux généraux :

- les septicémies hémorragiques et nécro-hémorragiques sont les plus fréquentes, impliquant le plus souvent des bactéries à Gram négatif ; la bactérie se multiplie d'abord dans des foyers d'infection locaux, externes (à l'origine d'hémorragies, d'ulcères cutanés, de nécroses des nageoires...) ou internes (provoquant anémie, exophtalmie, ascite). Lorsque les défenses naturelles de l'hôte sont débordées, la bactérie colonise tous les tissus et le poisson meurt rapidement ;
- les infections prolifératives externes sont bien plus rares ; elles évoluent chroniquement et provoquent une hyperplasie des lamelles branchiales qui affecte la fonction respiratoire ;

- enfin, les infections prolifératives profondes, mettant surtout en cause des bactéries à Gram positif (*Renibacterium salmoninarum*, *Mycobacterium* spp.), évoluent de façon lente et chronique, provoquant des réactions hypertrophiques et hyperplasiques qui se manifestent sous forme de granulomes dans les organes ou à la surface du poisson.

L'environnement aquatique est une source de contamination importante ; les pathogènes peuvent y survivre et parfois s'y multiplier. Les poissons eux-mêmes sont évidemment une importante source de contamination, qu'ils soient malades ou demeurés porteurs à la suite d'une infection clinique ou inapparente. Ce phénomène de portage, très répandu et parfois presque systématique (furonculose et yersiniose), peut aussi être assuré par des espèces sauvages, sensibles ou non à la maladie. La transmission directe est le plus souvent horizontale mais il existe des cas de transmission verticale ; elle résulte généralement de la contamination superficielle des œufs mais la bactérie est parfois présente *in ovo* (*R. salmoninarum*, *F. psychrophilum*).

Les techniques d'isolement et d'identification des bactéries des poissons ne présentent guère de particularités par rapport à celles des autres espèces animales, mais il importe d'avoir à l'esprit qu'elles ne poussent souvent pas sur les milieux de culture classiques et rarement à 37°C, mais plutôt à 22-25°C, voire plus bas (16-18°C pour *F. psychrophilum*, 15°C pour *R. salmoninarum*). L'utilisation de milieux particuliers et de températures relativement basses fait que les résultats des systèmes de diagnostic rapide et surtout les antibiogrammes, en particulier par diffusion, doivent être interprétés avec beaucoup de prudence en l'absence de réelle standardisation à de telles températures de culture. Les laboratoires vétérinaires départementaux sont à même d'identifier la plupart des pathogènes bactériens des poissons ; seuls les germes rares, difficiles ou nouveaux parviennent aux laboratoires de recherche.

Les infections strictement externes peuvent être combattues par des bains antiseptiques (chloramine T, dérivés iodés pour la désinfection des œufs...) mais le traitement de choix des maladies microbiennes reste l'antibiothérapie. Des abus dans son utilisation ont malheureusement conduit à l'apparition de souches résistantes et à de fréquents échecs de traitement. Il existe aussi un risque de transmission des résistances plasmidiques à d'autres bactéries, y compris celles pathogènes pour l'homme, et d'accumulation de résidus dans la chair des poissons et dans les effluents des piscicultures. Des législations sévères ont considérablement restreint l'emploi des antibiotiques en milieu aquatique, posant de gros problèmes aux pisciculteurs dont l'arsenal antibactérien est de plus en plus limité.

Outre les pratiques classiques d'hygiène et de prophylaxie sanitaire, la vaccination peut parfois permettre une prévention spécifique. Actuellement, la yersiniose et certaines vibrioses (*V. anguillarum*, *V. salmonicida*) sont apparemment bien contrôlées par des vaccins administrés par bain. Un vaccin contre *Edwardsiella ictaluri* est apparu, depuis quelques années, aux États-Unis, mais son efficacité réelle fait encore l'objet de

réserves. Quant à la furunculose, les différents vaccins mis au point ont donné des résultats douteux et la protection, quand elle existe, semble non spécifique. La vaccination par voie orale, la plus commode, confère malheureusement une protection de courte durée et nécessite des rappels. On compte sur les améliorations technologiques (encapsulation) et sur les approches moléculaires pour mettre au point de nouveaux vaccins.

Après une longue période de recherches sur différents pathogènes bactériens de la truite arc-en-ciel (*Y. ruckeri*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium* spp.), et différentes bactéries à Gram positif, les bactériologistes de l'équipe se sont recentrés sur un thème principal : la flavobactériose d'eau froide à *F. psychrophilum*.

FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM : DE LA MALADIE AU GÉNOME

Longtemps confinées aux USA et au Canada, les infections des salmonidés à *F. psychrophilum* sont apparues en Europe au début des années 80, sans doute suite à l'importation d'alevins ou d'œufs embryonnés. Au cours des années 90, ces infections ont diffusé dans tous les pays européens ainsi dans les autres régions salmonicoles du monde (Tasmanie, Corée et Japon, Chili, Kamchatka). La diffusion de la bactérie en dépit d'une désinfection systématique des œufs par des dérivés iodés a probablement été assurée par sa transmission verticale *in ovo*. Partout, les infections que cause *F. psychrophilum* se traduisent par une mortalité massive dans les populations naturelles et les élevages de salmonidés (truites, saumons) et d'ayu (*Plecoglossus altivelis*) principalement ; des cas moins graves ont été signalés chez l'anguille et divers cyprinidés. Ces dernières espèces, ainsi que les salmonidés guéris, peuvent servir de réservoirs. En outre, la bactérie peut survivre plusieurs mois dans l'eau et les biofilms. La maladie sévit uniquement dans les eaux douces froides (3-15 °C). Bien que des atteintes nerveuses, osseuses et branchiales aient été signalées, la flavobactériose d'eau froide se manifeste principalement sous deux formes pathologiques. Dans la forme américaine classique, des lésions ulcératives profondes apparaissent sur des animaux de taille commerciale et sont suivies d'une phase septicémique (« cold-water disease »). En Europe, la bactérie provoque plutôt une septicémie hémorragique chez des alevins et des truitelles présentant peu ou pas de signes externes (« rainbow trout fry syndrome ») (Bernardet & Bowman, 2006). La mortalité atteint des taux de 20 à 30 % chez l'alevin de truite arc-en-ciel, principale espèce élevée en France. Le florfénicol dans l'aliment reste efficace mais des résistances à l'oxytétracycline, à l'acide oxolinique et à l'amoxicilline se développent progressivement. Des vaccins expérimentaux ont été testés mais aucun n'a encore atteint la phase commerciale. Les éleveurs sont donc relativement démunis face à une maladie cosmopolite qui tend à réapparaître chaque année dans les mêmes piscicultures quand la température de l'eau diminue.

Les toutes premières souches européennes de *F. psychrophilum* ont été isolées et identifiées dans notre laboratoire en 1986 (Bernardet *et al.* 1988). À l'époque, la nomenclature et la classification de la bactérie étaient très floues et les premiers travaux de l'équipe ont consisté à comparer les souches françaises à des souches de référence américaines sur la base d'une vaste étude phénotypique complétée par des hybridations ADN/ADN. Cette étude a permis de confirmer les principales caractéristiques de l'espèce, de la décrire officiellement sur des bases phénotypiques et génétiques solides, et de la distinguer clairement des espèces voisines appartenant au « *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group » (CFB), qu'elles soient responsables d'autres maladies des poissons (telle la columnariose due à *F. columnare*) ou isolées de l'environnement (Bernardet & Grimont, 1989).

Au début des années 90, les recherches phylogénétiques et taxonomiques faisant appel à l'étude de l'ARNr 16S se développant, une large étude incluant toutes les espèces du CFB a été entreprise en collaboration avec le laboratoire de microbiologie de l'Université de Gand. Toutes les souches ont été étudiées grâce à trois techniques complémentaires : détermination des profils d'acides gras (par chromatographie en phase gazeuse) et de protéines (par électrophorèse en gel de polyacrylamide), et hybridation ADN/ARNr. Les résultats obtenus ont permis la redéfinition complète du genre *Flavobacterium* (auquel étaient désormais attribués les agents des flavobactérioses) et la création de la famille des *Flavobacteriaceae* (Bernardet *et al.* 1996).

Grâce à ces bases taxonomiques désormais saines, il devenait possible de revenir au niveau des espèces et d'essayer d'en typer les souches. L'équipe avait accumulé une large collection de souches de *F. psychrophilum* isolées d'espèces de poisson et de zones géographiques très diverses. Grâce au travail d'un doctorant tunisien, il a été possible d'appliquer trois techniques de typage moléculaire à un ensemble de 80 souches : l'amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphes (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), le ribotypage (ribotyping), et la détermination des profils plasmidiques. Si cette dernière a donné des résultats décevants, les deux autres sont parvenues au même constat : les souches étaient regroupées non par origine géographique mais par espèce de poisson hôte. Ainsi, les souches isolées de truite arc-en-ciel étaient groupées quelque soit leur continent d'origine, et il en était de même des souches de saumon coho, de saumon Atlantique, etc... (Chakroun *et al.* 1997, 1998). Une étude en cours utilisant le séquençage de gènes multiples (Multi Locus Sequence Typing, MLST) a corroboré ces résultats en analysant les séquences d'une dizaine de gènes codant pour des enzymes de ménage (S. Mondot & É. Duchaud, données non publiées).

Quelques études à portée plus pratique ont aussi été effectuées : mise au point et évaluation d'une technique de PCR pour la détection de la bactérie dans les poissons malades (Urdaci *et al.* 1998) ; amélioration des techniques de culture et de comptage en vue d'obtenir un nombre prévisible de bactéries viables (Michel *et al.* 1999) ; mise au point d'une méthode d'infection expérimentale reproductible de la truite (Garcia *et al.* 2000) ; utilisation de ce modèle pour comparer la virulence des souches

et déterminer la stabilité de la virulence en fonction du mode de mise en conservation (Michel & Garcia, 2003); et recherche de résistance au chloramphénicol et au florfenicol chez des souches de terrain (Michel *et al.* 2003).

En parallèle, notre expertise sur le genre *Flavobacterium* et sur la famille des *Flavobacteriaceae* nous a conduit à assurer le secrétariat du sous-comité de taxonomie correspondant (International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Flavobacterium* and *Cytophaga*-like Bacteria) et à créer son site (http://www.the-icsp.org/subcoms/Flavobacterium_Cytophaga.htm), à publier la liste des caractères nécessaires à la description des nouvelles bactéries de la famille (Bernardet *et al.* 2002), et à rédiger les chapitres correspondants dans un ouvrage de référence (Bernardet & Bowman, 2006).

Profitant de notre expertise sur *F. psychrophilum* et de la création en 2000 par l'INRA du réseau AGMIAL visant à séquencer le génome complet de plusieurs micro-organismes d'intérêt agro-alimentaire, nous avons décidé de séquencer le génome de la toute première souche isolée en France (et en Europe) en 1986. Le but principal de ce projet était d'identifier les principaux supports moléculaires de la virulence et les constituants immunogènes de la bactérie afin de comprendre les mécanismes de l'infection et de fournir des pistes solides pour la mise au point de vaccins efficaces. Une fois la taille du génome estimée à environ 3 Mb par électrophorèse en champ pulsé, le séquençage aléatoire (« whole-genome shotgun ») a été effectué avec une couverture finale de 9,3 x. Une première phase d'annotation automatique a été suivie par une phase d'annotation manuelle

minutieuse. Le génome de la souche comprend un chromosome circulaire de 2.861.988 pb et un plasmide cryptique de 3407 pb; le contenu moyen en guanine+cytosine est de 32,54 %. Les ARN ribosomiaux et de transfert sont respectivement au nombre de 6 et de 49; le nombre prédit de gènes codant pour des protéines est de 2432. Parmi ces dernières, l'analyse du génome a révélé des protéines impliquées dans la résistance de la bactérie aux conditions environnementales difficiles (chocs osmotiques, lésions de l'ADN dues au rayonnement ultraviolet, faibles concentrations d'O₂, molécules toxiques des vacuoles des macrophages...), dans la colonisation et la destruction des tissus de l'hôte (adhésines, hémolysines, métalloprotéases, collagénase, endotoxine...), et dans la réponse de ce dernier à l'infection (protéines de surface reconnues par l'hôte) (E. Duchaud *et al.* soumis pour publication). Ces premiers résultats donnent de précieuses indications sur le mode de vie psychrophile de la bactérie et sur les interactions hôte-pathogène. L'analyse se poursuit et nous essayons en parallèle (1) d'optimiser les outils génétiques existants afin de produire des banques de mutants par transposition et (2) de développer des méthodes de criblage pour évaluer leur virulence.

Les travaux effectués par l'équipe sur *F. psychrophilum* ont donc suivi une progression logique, de la maladie au génome en passant par tous les stades de caractérisation des souches. Le génome devrait permettre, au cours des prochaines années, d'améliorer notre connaissance de ce pathogène majeur et d'optimiser les méthodes de lutte. En outre, le génome de *F. psychrophilum* peut constituer un modèle pour l'étude des autres bactéries ichtyopathogènes et des autres flavobactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- Austin, B. & Austin, D.A. 1999. *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. 3rd edition. Springer et Praxis Publishing Ltd., Chichester, UK.
- Bernardet, J.-F. & Bowman, J.-P. 2006. The Genus *Flavobacterium*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic resource for the Microbiological Community* (eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt), 3rd edition, release 3.20, Springer-Verlag, New York, <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- 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., Baudin-Laurencin, F., Tixerant G. 1988. First identification of « *Cytophaga psychrophila* » in France. *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 8: 104-105.
- 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.
- Bernardet, J.-F., Nakagawa, Y., Holmes, B. 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 1049-1070.
- 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 Org.* 31: 187-196.
- Chakroun, C., Grimont, F., Urdaci, M.C., Bernardet, J.-F. 1998. Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Dis Aquat Org.* 33: 167-177.
- Garcia, C., Pozet, F., Michel, C. 2000. Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Dis Aquat Org.* 42: 191-197.
- Michel, C. & Garcia, C. 2003. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet Res.* 34: 127-132.
- Michel, C., Antonio, D., Hedrick, R.P. 1999. Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control. *Res Microbiol.* 150: 351-358.
- Michel, C., Kerouault, B., Martin, C. 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J Appl Microbiol.* 95: 1008-1015.
- Noga, E.J. 1996. *Fish disease, diagnosis and treatment*. Mosby, St Louis, Missouri.
- 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.
- Woo, P.T.K. & Bruno, D.W. 1999. *Fish diseases and disorders; volume 3: viral, bacterial and fungal infections*. CABI Publishing, Oxon, UK.